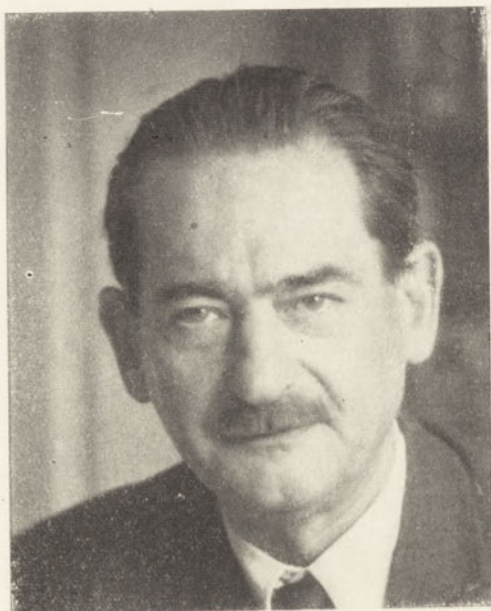


*Zeszyt ten jest poświęcony Prof. Drowi
Józefowi HELLEROWI w sześćdziesiątą
rocznicę Jego urodzin*

REDAKCJA



Józef Heller

SŁOWO WSTĘPNE

Organizacja biochemii polskiej po wielkich zniszczeniach osobowych i materiałowych ostatniej wojny nie jest rzeczą łatwą. Obejmuje ona wiele dziedzin, których interesy nie zawsze są zgodne. Dążenie do utrzymania na odpowiednim poziomie naukowym warsztatów pracy badawczej, podczas gdy bieżące potrzeby życiowe, a zwłaszcza dydaktyka, są dalekie od zaspokojenia; starania o przyrost liczbowy młodych adeptów biochemii i ochrona przed zniszczeniem młodego narybku biochemicznego; walka o przyznanie biochemii należnego miejsca w planowaniach państwowych, trud przekonywania odpowiedzialnych czynników państwowych o konieczności odpowiedniego zaopatrzenia pracowni biochemicznych; walka o utrzymanie kontaktu z biochemią światową; wydawnictwa biochemiczne: czasopismo archiwalne i przeglądowe oraz podręczniki i monografie — to wszystko stanowi codzienną troskę Komitetu Biochemicznego Polskiej Akademii Nauk a przede wszystkim przewodniczącego Komitetu prof. dr Józefa Hellera. W tej pracy rzuca się w oczy decydująca rola przewodniczącego i to zarówno w inicjatywie, jak i w wykonaniu. Należało więc w jakiś sposób stwierdzić, że biochemicy polscy zdają sobie z tego sprawę. Ofiarowanie prac zebranych w niniejszym zeszycie *Acta Biochimica Polonica* jest takim właśnie wyrazem uznania ze strony autorów tych prac i redaktorów. Ale to nie jest wszystko. Byłoby przecież wielką niesprawiedliwością, gdybyśmy podnosząc zasługi organizacyjne pominęli naukową działalność prof. Hellera. W okresie trzydziestu pięciu lat dokonał wielkiej pracy badawczej; nie porzucił jej w najcięższych nawet warunkach, także i w czasie ostatnich organizacyjnych prac. Praca badawcza Hellera była bardzo konsekwentna, o ściśle wykreślonej linii rozwojowej. Idealnym jej celem to poznanie praw, ogólnie obowiązujących w przemianie żywych organizmów, a badanych na materiale biologicznym wykazującym możliwie największą różnorodność nasilenia tych procesów; to też wybór Hellera pada na owoady z ich postaciami rozwojowymi, przedstawiającymi w ramach jednego gatunku bardzo rozległy zakres natężenia przemian ustrojowych. Skoncentrowanie badań na jednym gatunku motyla, wilczomlecisku *Celerio (Deilephila) euphorbiae* pozwoliło na dokładne poznanie tego gatunku, je-

go właściwości fizjologicznych i sposobu życia. Dzięki temu można było uniknąć błędów polegających na nieznamości materiału biologicznego będącego przedmiotem doświadczeń. Spośród 130 ogłoszonych drukiem prac Hellera i jego współpracowników i uczniów połowa dotyczy badań przemiany owadów. Zakres zagadnień opracowywanych doświadczalnie obejmuje: konstrukcję aparatu oddechowego, pomiary oddychania gąsienic, poczwerek i rozwiniętych motyli, zależność rozwoju od zmian temperatury, zagadnienia genetyczne, badania istoty chemicznej materiału pędnego w poszczególnych okresach rozwoju owada, przemianę białkową w czasie przeobrażeń, badania rentgenologiczne gąsienic i poczwerek, różnice chemiczne poczwerek o różnym okresie trwania rozwoju poczwarkowego (trzy tygodnie, rok, dwa lata), skład chemiczny hemolimfy, charakterystykę chemiczną moczu motyli, związki fosforowe w metamorfozie, oddychanie miazgi poczwerek. Z tej wielkiej liczby badań wydają mi się szczególnie cenne te, które dotyczą fosforanów i oddychania miazgi poczwerek. W roku 1930 stwierdza Heller, że „wielkość przemiany materii jest zawsze i niezawodnie odwrotnie proporcjonalna do zawartości jonu fosforanowego” w hemolimfie poczwerek; wagę tego stwierdzenia dopiero w ostatnich latach możemy odpowiednio ocenić. Rozpoczęte w latach 1940 i 1941 badania oddychania miazgi poczwerek nakreślają kierunek trwających obecnie prac nad chinonowym oddychaniem owadów; nie-cytochromowe oddychanie to jeden z bardzo dziś aktualnych problemów biochemicznych. W 1950 roku badania Hellera stwierdziły, po raz pierwszy w literaturze biochemicznej, istnienie nieorganicznych pirofosforanów w świecie zwierzęcym; ich rola jako związków „bogatych w energię” jest przedmiotem obecnie prowadzonych badań.

Druga połowa prac Hellera dotyczy rozmaitych dziedzin. Na pierwszym miejscu należy tu wymienić metodę Parnasa i Hellera (1924) oznaczania amoniaku i prace nad związkami azotowymi krwi, mięśni i mleka. Przemiana węglowodanów prątka gruzlicy, aktualne zagadnienia higieny związane z pracą Hellera w Państwowym Zakładzie Higieny, wreszcie około 20 wydawniczych pozycji, obejmujących prace podręcznikowe i referatowe to dalsza część tej drugiej połowy prac.

Nawet z tego wielce pobieżnego zestawienia można wyraźnie stwierdzić wagę pracy badawczej prof. Hellera, a więc i wielkość ofiary, jaką jest podjęcie się licznych prac organizacyjnych. I w tym właśnie leży istotny cel przedsięwzięcia, jakim jest nasz zeszyt *Acta Biochimica Polonica*. Przez poświęcenie Mu prac zawartych w tym zeszycie chcemy wyrazić i podziękowanie za trud prac organizacyjnych i uznanie za dokonaną pracę badawczą.

Zawarte w tym zeszycie prace pochodzą w pewnej części od biochemików pracujących poza Polską. Zasady gościnności kazały nam umieścić te prace na początku zeszytu; artykuły autorów zamieszkałych w Polsce wydrukowano w dalszej części zeszytu w kolejności nadsyłania prac do redakcji.

Kończąc to słowo wstępne chciałbym dodać od siebie, że długa, bo zwyż czterdziestoletnia przyjaźń łącząca mnie z prof. Hellerem pozwala mi na ocenę Jego wartości osobistych w sposób bardziej wnikliwy od tych ludzi, którzy nie tak długo cieszą się Jego przyjaźnią; dlatego z wdzięcznością zgodziłem się na propozycję kolegów, by napisać wstęp do numeru *Acta Biochimica Polonica*, poświęconego sześćdziesięcioleciu prof. Józefa Hellera.

Włodzimierz Mozolowski

The following is a list of the names of the members of the Society of Medicine, who have been elected to the office of President for the year 1911. The names are given in alphabetical order, and are followed by the names of the members of the Council, and the names of the members of the Executive Committee. The names of the members of the Society are given in full, and the names of the members of the Council and the Executive Committee are given in full, and are followed by the names of the members of the Society who have been elected to the office of President for the year 1911.

D. KEILIN

DISTRIBUTION AND DIVERSITY OF HAEMOGLOBIN

Molteno Institute, University of Cambridge

There are in nature four types of oxygen carriers which are all metallo-protein compounds, the metal being either Fe or Cu. They can be classified as shown in Table 1.

Table 1
Oxygen Carriers

Fe	{	Fe-Porphyrin-Protein	{	Haemoglobin
			{	Chlorocruorin
		Fe-Protein	{	Haemerythrin
Cu	{	Cu-Protein	{	Haemocyanin

While chlorocruorin, haemerythrin and haemocyanin have a very limited distribution among some invertebrates, haemoglobin, as will be shown, is very widely distributed in nature.

Distribution of Haemoglobin

As shown in Table 2, haemoglobin is present, with very few exceptions, in all vertebrates; it occurs in some representatives of practically every phylum of the invertebrates and it was recently found in a few Protozoa, Fungi and Plants.

The distribution and physiological properties of oxygen carriers including haemoglobin were examined in some detail by Redfield (1933) in his masterly review on "The evolution of the respiratory function of blood" which is frequently referred to by workers engaged in the study of the comparative physiology of respiration. We shall therefore examine here only those aspects of the distribution of haemoglobin which have not yet reached the reviews and text books.

Table 2
Distribution of Haemoglobin

Vertebrates Fish, Amphibia, Reptiles Birds, Mammals	All except a few species of fish
Invertebrates Molluscs { Gasteropoda Lamellibranch	Several species
Insects	Chironomus Gastrophilus and a few other forms
Crustacea	Daphnia, Cheirocephalus and a few other forms
Echinodermata Holothuroidea	Several species
Worms Turbellaria, Nemertea Nematoda	Few species Ascaris and a few other parasitic forms
Polychaeta } Oligochaeta } Hirudinea }	Many species
Protozoa	Paramecium, Glaucoma
Fungi	Yeast (Saccharomyces) Moulds (Penicillium, Neurospora)
Plants	Root nodules of leguminous plants

Haemoglobin in Vertebrates

Haemoglobin is present in practically all vertebrates, being localized in the nucleated red blood corpuscles or erythrocytes of Fish, Amphibia, Reptiles and Birds and in the non-nucleated erythrocytes of Mammals.

Only a few species of Fish are known to be completely devoid of haemoglobin. It is well known that the small pelagic and transparent larvae or leptocephali of the European eel (*Anguilla anguilla* (L.)) are completely devoid of haemoglobin as well as of blood corpuscles. These larvae drift passively with the current across the North Atlantic from the Sargasso Sea towards the coasts of Europe. They develop into elvers which actively migrate up the rivers and streams. At this stage of their development erythrocytes with haemoglobin appear in their blood. The respiratory requirements of leptocephali, as their small size and the

transparency of their body indicate, must be very low and can be fully satisfied by the oxygen dissolved in their blood plasma and other body fluids.

Of special interest in this respect is the recent study carried out by R u d (1954) in South Georgia Island on some sub-antarctic fish devoid of haemoglobin. Three species of fish: *Champscephalus gunnari* Lönnberg, *Pseudochaenichthys georgianus* Norman and *Chaenocephalus aceratus* (Lönnberg) which belong to the family of Chaenichthyidae were known for a long time to Norwegian whalers as "bloodless fish" and to British whalers as "ice fish", probably because of their transparency. Other species of this group are found off the Bouvet Island, Patagonian coast and the Falkland Islands. All these species, according to previous observers, have colourless blood and white gills. R u d was, however, the first to carry out a quantitative study of the blood of *Chaenocephalus aceratus*. The following are the main results of this study: The fresh blood of this fish is practically transparent, "with a slight yellowish tint". After being centrifuged the plasma becomes water clear and the sediment which represents about 1% of the blood volume is composed of white cells. The blood shows no absorption bands and histological study reveals no blood corpuscles resembling those of vertebrates. The estimation of the O₂ capacity of the blood equilibrated with air gave on an average 0.67—0.77 per cent oxygen by volume whereas the two species of fish with normal red blood found in the same region gave the values of about 6 per cent O₂ by volume. The oxygen capacity of *Chaenocephalus* blood is therefore what can be expected if the oxygen is simply dissolved in the blood plasma. The Fe content of this blood was found to be less than 1 mgm. per cent instead of 19—27 mgm. per cent found in red blood of different species of fish. What is, however, remarkable is that specimens of *Chaenocephalus aceratus* are 60 cm. or more long and weigh more than 1 kg. The fish seen alive appears to be very sluggish when compared to other fish from the same region and is very sensitive to lack of oxygen. It is probably the sluggishness of the fish and its presumably low metabolism, the relatively large respiratory surface of its yellowish-white gills, and the well aerated water at less than 2° C. that enable a fish of such a large size to survive without haemoglobin.

It must be remembered on the other hand that some species of fish which have red blood do not always use their haemoglobin as an oxygen carrier and depend for their respiratory activity upon the oxygen dissolved in their plasma. This was clearly demonstrated by N i c l o u x (1923) who found that carp, eels and pike were not much affected when their water was equilibrated with air containing 2% CO which transformed

about 90% of their haemoglobin into carbon monoxide haemoglobin which cannot act as an oxygen carrier. These species of fish use haemoglobin only when the oxygen tension in their surrounding medium is very low or when their metabolic activity increases the oxygen requirements of their tissues. In other fish, such as mackerel, haemoglobin is always functional even when the surrounding medium is well equilibrated with air.

Haemoglobin in Invertebrates

Among the invertebrates, as shown in Table 2, the distribution of haemoglobin is very irregular. It may be present in a few representatives of a very large phylum or order and absent in many hundreds of other very closely allied forms or replaced in some of them by other oxygen carriers such as chlorocruorin, haemerythrin or haemocyanin. This is well shown by spectroscopic studies of blood, coelomic or perivisceral fluids of molluscs, echinoderms, crustacea, insects, nematodes and annelids. The haphazard distribution of oxygen carriers in invertebrates is well illustrated by the study of polychaetes belonging to the family of Serpulidae. It was shown by Fox (1949) that even within a single serpulid genus *Spirobis* one species has chlorocruorin, another has haemoglobin, while a third has neither of these pigments and yet the habitats of these species are very similar. Moreover, the representatives of the genus *Serpula* have both haemoglobin and chlorocruorin in the blood of the same individual, whereas the genus *Magelona*, which also belongs to the polychaetes, has haemerythrin in its blood corpuscles.

The distribution of haemoglobin in insects is of special interest. Although insects form by far the largest group of invertebrates and exhibit the greatest variety of respiratory adaptations which are well illustrated by the larvae of Diptera (Keilin, 1944), haemoglobin was recorded in only a few species of Diptera and Hemiptera. Thus, among Diptera it was found in the perivisceral fluid of the larvae of certain Chironomids and in the tracheal cells and certain other tissues of the larvae of *Gastrophilus* (Keilin and Wang, 1946). Among Hemiptera haemoglobin was found in *Buenoa margaritacea* (Hungerford, 1922; Bare, 1928) and *Anisops producta* (Poisson, 1926) where it is localized in large masses composed of tracheal cells similar to those of *Gastrophilus* larvae. It was also found in *Macrocrixa geoffroyi*, where it fills the lumen of accessory glands of the male genital system (Haviland-Brindley, 1929). The fact that out of more than 500,000 species of known insects haemoglobin was recorded in so very few cases only indicates how very little attention was given to this aspect of entomology.

It may also be interesting to note that haemoglobin has not yet been recorded in any of the representatives of Porifera (sponges) and Coelenterata.

Haemoglobin in cells of Protozoa and Fungi

The occurrence of haemoglobin, even in a very low concentration, within cells rich in cytochrome can easily be recognized because the absorption spectra of components (*a*, *b* and *c*) of cytochrome especially their α -bands are very sharp when the components are reduced (a_{α} -605, b_{α} -563 and c_{α} -550 $m\mu$) and vanish when they are oxidized, whereas in haemoglobin it is only on oxygenation to HbO_2 that the two absorption bands (α and β) of the latter are very strong. They disappear on deoxygenation or in presence of CO, being replaced by diffuse absorption bands which in the dilute solution of the pigment are hardly perceptible. The components *a*, *b* and *c* of cytochrome are not autoxidizable, and do not react with either CN' or CO; their oxidation is catalyzed by cytochrome oxidase (cytochrome a_3). This component, the absorption bands of which are masked by those of cytochrome *a*, is autoxidizable and reacts both with CN' and CO which inhibit its catalytic activity.

Thus, when air is passed through a suspension of cells the bands of cytochrome disappear and are replaced by those of oxyhaemoglobin. When aeration is interrupted and the oxygen of the suspension is used up in the cell respiration, the sharp absorption bands of reduced cytochrome reappear while the two bands of oxyhaemoglobin are replaced by the faint band of haemoglobin which does not mask the absorption bands of cytochrome.

On the addition of cyanide to aerated cell suspensions the bands of reduced cytochrome can be seen side by side with those of oxyhaemoglobin. Cyanide, by inhibiting the reoxidation of the reduced components of cytochrome, prevents the utilization of oxygen in cell respiration. Under these conditions the α -band of oxyhaemoglobin which lies between the bands *a* and *b* of cytochrome appears as a narrow but distinct band, whereas the β -band of oxyhaemoglobin which lies between cytochrome bands *c* and *d* is hardly perceptible.

It may be mentioned here that the absorption bands of oxyhaemoglobin in Protozoa and Fungi, like those of myoglobin, lie nearer the red end of the spectrum (α -582 and β -545 $m\mu$) than the corresponding band of blood oxyhaemoglobin (α -578, β -539 $m\mu$). When the concentration of haemoglobin in cells is sufficiently high the absorption band of CO-haemoglobin can be seen at 574 and 539 $m\mu$. However, when haemoglobin is oxidized to methaemoglobin, the absorption bands of the latter are much too feeble and too diffuse to be seen at such a low concentration.

Haemoglobin in Protozoa

The occurrence of haemoglobin in Protozoa, which is one of the largest phyla of the animal kingdom, was for the first time recorded by Sato and Tamiya (1937) who discovered it in the ciliate *Paramecium caudatum*. This discovery was recently confirmed and extended to another ciliate *Tetrahymena (Glaucoma) pyriformis* and the concentration of haemoglobin in both ciliates was determined spectroscopically (Keilin and Ryley, 1953). In both species haemoglobin can easily be recognized by the appearance, on aeration of the suspension, of two bands at 582 and 545 $m\mu$, by their disappearance when the bands of reduced cytochrome become visible and by the appearance of bands at 574 and 539 $m\mu$ on passing through the suspension a current of gas mixture containing O_2 and CO .

Assuming that the equivalent weight of haemoglobin in ciliates is about 17,000, the haemoglobin content of *Paramecium* from several batches of culture gave values (on a dry-weight basis) varying between 1.12 and 1.74 per cent, whereas haemoglobin of *Tetrahymena* was found to vary between 0.22 and 0.3 per cent.

The presence of haemoglobin in two very common ciliates, *Paramecium caudatum* and *Tetrahymena pyriformis*, suggests the possibility that haemoglobin may have a much wider distribution in Protozoa than hitherto suspected. However, this problem can be solved only by careful spectroscopic examination, under different conditions, of thick suspensions of these organisms. Unfortunately pure mass cultures of Protozoa are not often easily obtained.

Haemoglobin in cells of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*)

Of the numerous samples of commercial baker's yeast which were examined spectroscopically at different times only two samples, one obtained in 1936 and the other in 1940, revealed the presence of a weak band at about 583 $m\mu$. The facts that this band is visible only during very strong aeration, that it disappears and is replaced by the bands of reduced cytochrome when aeration is interrupted or when the yeast suspension is treated with carbon monoxide, indicates, that it is the α -band of oxyhaemoglobin. The band at 583 $m\mu$ can be observed even in a moderately aerated suspension provided its respiratory activity is depressed by keeping it at about $0^\circ C$. or by treating it with a narcotic such as ethyl urethane. In the latter case this band remains visible together with the bands of reduced cytochrome b . In yeast suspension treated with cyanide and aerated, the band at 583 $m\mu$ remains visible in the presence of the bands of reduced cytochrome (Keilin, 1953).

Later, of several cultures of pure strains of yeast we examined, haemoglobin was detected in two strains (67 and 77) of the Institute of Brewing and in a strain we isolated from the top brewer's yeast of a local Cambridge brewery. From strain 77 ($Q_{O_2} = -82$, $Q_{CO_2}^{air} = +147$), the slow growing "petite colonie" strain 77A was isolated after cultivation in presence of acriflavine according to Ephrussi, Holtinger and Chmènes (1949). This strain ($Q_{O_2} = -5$, $Q_{CO_2}^{air} = +250$) was found to be rich in cytochrome c, practically devoid of cytochromes $a + a_3$ and b and rich in haemoglobin the content of which being as high as 0.127% of the dry weight of yeast (Keilin and Tissières, 1954). We suggested that the absorption band at about 580 $m\mu$ of the "petite colonie" mutant studied by Słoniński and Ephrussi since 1949 (see Słoniński, 1953) may also belong to haemoglobin.

The formation of haemoglobin in yeast cells was confirmed by Yčas (1956). By cultivating yeast aerobically in presence of a small concentration of antimycin A (0.37—2.5 $\mu\text{g./ml.}$ of medium) he obtained yeast cells completely devoid of cytochrome a but containing a typical haemoglobin.

Haemoglobin in Moulds

Haemoglobin in moulds was recently discovered on spectroscopic examination of mycelium of *Neurospora crassa* and *Penicillium notatum* (Keilin and Tissières, 1953). The moulds used for this examination were cultivated in a highly aerated fluid media, harvested on the 5th or 6th day of culture and washed free of nutrient medium giving a compact felt-like mass of mycelium. One of the difficulties presented by this material is that it cannot be easily aerated so that on direct spectroscopic examination the mycelium invariably shows the characteristic absorption bands of reduced components (a , b , and c) of cytochrome. There are, however, two ways of overcoming the difficulty of aeration: 1) on quick compression and release of the felt some of the water incorporated in it is replaced by air and 2) on treating the felt with a little hydrogen peroxide which, being rapidly decomposed by catalase, liberates oxygen in the form of minute bubbles which are kept imprisoned within the felt of mycelium. Under these conditions the components of cytochrome become rapidly oxidized, their absorption bands vanish and are replaced by the two bands of oxyhaemoglobin at 583 and 545 $m\mu$. Although haemoglobin can be seen in the wild type of *Neurospora crassa*, it was particularly prominent in one of its slow-growing mutants. From this material a cell-free extract rich in haemoglobin was easily obtained which made it possible to determine more precisely the characteristic properties of this haemoglobin and of some of its derivatives.

Haemoglobin in Plants

It was known from early times that the leguminous plants enrich the soil making it suitable for the growth of cereals. That they owe this property to their ability of absorbing atmospheric nitrogen was demonstrated only in 1838 by Boussingault. It was shown later (Frank, 1879) that root nodules of these plants fail to develop in seedlings grown in sterile soil but the bacteria which were known to be present within nodules were considered to be of a parasitic nature. We owe to Hellriegel and Wilfarth (1888) the demonstration that the nitrogen fixation takes place within root nodules and to Beijerinck (1888) that the micro-organisms in root nodules are symbiotic bacteria which can also be found free in soil and can be cultivated upon suitable media. Following these fundamental discoveries extensive investigations were carried out on the structure and development of root nodules brought about by different strains of *Rhizobium*, in different leguminous plants, on the physiology of this symbiotic association and on the possible mechanism of the nitrogen fixation.

When a fresh and active root-nodule is cut or crushed it invariably shows a bright red pigment. Although this fact could scarcely have been overlooked by numerous workers engaged in the study of root-nodules and nitrogen fixation since 1888 yet this pigment was recorded and its nature discussed for the first time only in 1938 by Pietz. He believed it to be the red intermediate product which appears on the oxidation of tyrosine or of dihydroxyphenylalanine catalysed by tyrosinase and that its function is to poise the oxido-reduction potential of nodules at a level favourable for the proliferation of symbiotic bacteria.

A year later the pigment was reinvestigated by Kubo (1939) both *in situ* and in fractionated extracts of nodules. He examined this pigment spectroscopically and identified it as a haemoprotein compound analogous to haemoglobin.

The pigment was re-examined by Burris and Haas (1944) who agreed with Kubo that it belongs to the haematin compounds but, contrary to his views, they found that "its behaviour towards oxygen indicates that it is not a haemoglobin-like substance"; they concluded that this pigment instead of undergoing oxygenation, undergoes reversible oxido-reduction.

About the same time, while reinvestigating the nature of the pigment in root nodules of different leguminous plants especially those of the soya bean (Keilin and Wang, 1945), we were able not only to corroborate the previous finding by Kubo but to establish without any element of

doubt that it is a typical haemoglobin reversibly combining with molecular oxygen, the iron of the oxygenated compound (HbO_2) remaining in the divalent state. Like haemoglobin it combines reversibly with CO and on treatment with oxidizing agents like potassium ferricyanide or quinone it undergoes oxidation to methaemoglobin. The spectrophotometric curves of its 3 main derivatives (Hb, HbO_2 and HbCO) are of the same pattern as those of ordinary haemoglobin except that the α -band of the oxygenated compound, like that of HbO_2 of some invertebrates, is somewhat lower than the β -band.

The affinity of this haemoglobin for oxygen, expressed as O_2 tension in mm. mercury which corresponds to 50% oxygenated compound at 15°C ., was found to be less than 0.1 mm. The relative affinity of this pigment for O_2 and CO expressed as the equilibrium constant

$$K = \frac{[\text{HbCO}] p\text{O}_2}{[\text{HbO}_2] p\text{CO}} \text{ at } 15^\circ \text{C. was found to be about 37.}$$

That the haemoglobin is in some way connected with the nitrogen fixation by nodules is supported by two facts: (1) its constant presence in active nodules of every leguminous plant so far examined and (2) the inhibition of nitrogen fixation by a low partial pressure of CO.

The presence of haemoglobin in root nodules of leguminous plants is of great biological interest apart from its bearing upon the mechanism of nitrogen fixation. The root nodule haemoglobin presents the first case of the occurrence of this pigment in plants, although other haemoprotein compounds such as cytochrome, peroxidase and catalase are known in plants. What is, however, of special interest is that neither the plant cells alone, nor the symbiotic microorganisms (*Rhizobium*) cultivated separately are capable of synthesizing haemoglobin. It is only when the root cells are invaded by specific symbiotic microorganisms and begin to proliferate that haemoglobin is formed. *Rhizobium* not only induces growth and multiplication of cells, but also supplies these proliferating cells directly or indirectly with a factor necessary for the synthesis of haemoglobin (Keilin and Wang, 1945).

Kubo's findings as well as our observations summarized above were confirmed by Virtanen (1945) and Virtanen and Laine (1946). However, they claimed that in addition to haemoglobin the root nodules always contain methaemoglobin, the concentration of which increases when the plants are placed in the dark. They claim to have found that even "during cloudy days the brown colour deepens in the nodules as the balance is shifted to methaemoglobin". They assumed that

in nitrogen fixation the function of haemoglobin is connected not so much with its property of oxygenation to oxyhaemoglobin as with its oxidation to methaemoglobin. Although the problem of the mechanism of nitrogen fixation lies outside the scope of this article it can be mentioned here that we failed to confirm the observations of these workers and could not accept their interpretation (Keilin and Smith, 1947). Neither the experimental evidence nor general considerations support their view that the nitrogen fixation in root nodules involves a cyclical change of the valency of haemoglobin iron. Moreover, it seems unlikely that oxidation-reduction reactions in nodules are catalysed by a compound such as haemoglobin, which has the remarkable property of oxygenation and is therefore an excellent oxygen carrier but a very inefficient catalyst.

The production of root-nodules, their structural characteristics and the state of their haemoglobin at different stages of development of leguminous plants grown under a great variety of conditions were reinvestigated by Nowotny-Mieczyska (1949). One of the main results of this study, which has a direct bearing on the problem discussed above, is the demonstration "that the greatest increase of dry matter in the plants and of their nitrogen compounds occurred at the time when the greatest number of their root nodules showed exclusively red colouration", in other words when the pigment is present in the state of oxyhaemoglobin.

Diversity of Haemoglobins

The very wide distribution of haemoglobin in nature raises the problem as to the similarity between haemoglobins of different origin. The results of an extensive study of this problem carried out by a great variety of methods clearly demonstrated that, although all haemoglobins can be characterized as haemoprotein oxygen carriers they show nevertheless very marked quantitative differences in several of their properties, which can be enumerated as follows: 1) absorption spectrum, 2) solubility, 3) ease of crystallization and crystalline structure, 4) molecular weight, 5) amino acid content of their protein, 6) isoelectric point, 7) susceptibility to denaturation, 8) affinity for O_2 and CO , 9) shape of O_2 dissociation curve, 10) antigenic and several other properties.

We shall now briefly examine some of these properties in the same order as they are enumerated above.

1. That the absorption spectra of haemoglobins of different origins are not the same was shown for the first time by Sorby (1876) in his classical paper "On the Evolution of Haemoglobin". He found that the absorption bands of *Planorbis* oxyhaemoglobin lie about 3 μ

nearer the blue end of the spectrum than those of human oxyhaemoglobin. He also understood that this difference is due to the difference in their proteins. These observations were confirmed by Vlès (1922) and by Anson, Barcroft, Mirsky and Oinuma (1924) who extended them to the haemoglobin of a great variety of organisms.

The difference in the absorption spectra is not confined to the position of the bands but can be seen in the sharpness and the relative heights of α - and β -bands which are reversed in the HbO₂ of root nodules (Keilin and Wang, 1945) and of *Ascaris lumbricoides* (Davenport, 1949).

2. The solubilities of haemoglobins of different origins show very marked variations. Thus, human haemoglobin is more soluble than haemoglobins of horse, rat and guinea-pig. Muscle haemoglobin (myoglobin) of horse is soluble in 3M-phosphate buffer (pH 6.6) in which blood haemoglobin is practically insoluble (Morgan, 1936). Landsteiner and Heidelberger (1923) used the mutual solubility test for differentiation of certain haemoglobins. There may also be a marked difference in solubility between the oxygenated (HbO₂) and deoxygenated (Hb) forms of the same haemoglobin. Whereas in horse, rat and guinea-pig Hb is more soluble than HbO₂, in man the reverse is true — Hb is less soluble than HbO₂. This leads us to consider haemoglobin in sickle cell anaemia, an inborn genetically transmitted blood disturbance. It is prevalent in some Negro communities in Africa, it occurs in about 1 in 40 Negroes in the United States, and is also known to occur in India, the Yemen and Greece. In this blood disturbance, while erythrocytes in the arterial blood are of normal shape, about 30 to 60% of erythrocytes in the venous blood are "sickle" or "oat" shaped. That this change in shape of erythrocytes is perfectly reversible and is due to deoxygenation of haemoglobin was demonstrated experimentally *in vitro*. It was shown by Pauling and his co-workers (1949) that sickle cell haemoglobin has a slightly different isoelectric point from normal haemoglobin. However, the most striking property of sickle cell haemoglobin determined by Perutz and his co-workers (1950, 1951) is the low solubility of its deoxygenated form. While the solubilities of sickle cell and normal HbO₂ are about the same, the solubility of sickle cell Hb is 50 times lower than that of normal Hb. It is the fact that the abnormal haemoglobin becomes insoluble on deoxygenation that causes the distortion of erythrocytes.

The study of the solubility of human haemoglobin at a constant temperature and pH, but rising salt concentrations enabled Roche and Derrien (1953) to recognize in the blood both of the adult and foetus

the presence of several distinct haemoglobins which can also be distinguished by some other properties.

3. The ease of crystallization and crystalline structure. Haemoglobin was the first protein observed in the crystalline form (Reichert, 1849). However, the ease with which haemoglobin crystallizes varies with its origin. Thus, on lysing a thick cold suspension of rat erythrocytes with an equal volume of cold distilled water and leaving the solution at 0°C. the whole of the haemoglobin turns into a solid crystalline mass. The same applies to haemoglobin of the guinea-pig and dog. Horse haemoglobin in a cold, concentrated solution when treated with cold alcohol to a final concentration of about 20%, rapidly crystallizes if left standing at 0°C. Other haemoglobins crystallize much more slowly and only in the presence of very high concentrations of salts. This applies for instance to human haemoglobin which in the presence of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ remains in solution at a concentration as high as 63.3 g. of haemoglobin per 100 ml. (Drabkin, 1946).

The great variation in the crystalline forms of haemoglobin was known to early workers on this subject and is well illustrated in the classical work by Reichert and Brown (1909) who also found that haemoglobin of the same origin may give three successive crops of crystals of different shape. On crystallizing the oxyhaemoglobins of man, dog and horse under similar conditions in the presence of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, three distinct types of crystals were obtained belonging to the tetragonal, orthorhombic and monoclinic systems respectively (Drabkin, 1946).

The haemoglobin crystals of adult sheep and foetal sheep, which are in the form of triangular plates and long needles respectively, were shown by X-ray studies (Kendrew and Perutz, 1948) to differ also in their symmetry and space groups as well as in the dimensions of the unit cells and the X-ray diffraction patterns.

4. The molecular weight of the haemoglobins of different origins, as shown in the Table 3, varies between 17,000 and 3,000,000. However, the molecular weight of the haemoglobins of all birds and mammals and the majority of other vertebrates is about 68,000. As each of these molecules contains 4 haem prosthetic groups the molecular weight per haem group is approximately 17,000 which is also the molecular weight of myoglobin.

5. The amino acid content was properly determined for the protein of only a few haemoglobins, those which could be purified by crystallization and obtained in sufficient amounts. For horse haemoglobin and horse myoglobin a complete balance sheet of the amino acid contents is

Table 3

Molecular weights of different Haemoglobins (II) and Erythrocruorins (I and III) according to Svedberg and Pedersen

Lampetra	17,000	I
Chironomus	{ 17,000	
Glycera	{ 34,000 34,000	
Fishes, birds and mammals	68,000	II
Amphibia and reptiles	{ 68,000	
	{ 150,000 290,000	
Daphnia	400,000	III
Planorbis	1,630,000	
Arenicola	3,000,000	
Lumbricus	3,000,000	

Table 4

Amino acids in respiratory pigments according to Roche and Roche and Fontaine

Respiratory pigment of	Pigment classified as	Arginine (per cent)	Histidine (per cent)	Lysine (per cent)	Cystine (per cent)
Lampetra	Erythrocruorin	3.52	3.37	7.51	4.40
Arenicola	"	10.04	4.03	1.85	4.08
Glycera	"	9.64	5.39	4.90	3.40
Lumbricus	"	10.07	4.68	1.73	1.47
Sabella (=Spirographis)	Chlorocruorin	9.64	2.38	3.64	1.64
Horse	Haemoglobin	3.57	8.13	8.31	0.74
Horse (according to Tristram)	Haemoglobin	3.65	8.71	8.51	1.01

already available (see Tristram, 1949). The haemoglobins of invertebrates have not so far been investigated in sufficient detail and the analytical results cannot be taken as final. However, the data for the content of a few amino acids in different haemoglobins, summarized in Table 4, clearly show that there are some striking differences in the composition of the protein moiety of these haemoglobins.

6. The isoelectric point of haemoglobins as shown in Table 5 varies between pH 4.6 and 7.5 and although precise determinations were made in only very few cases, the data already available form a complete series of transitions between the above mentioned limits.

Table 5

Isoelectric point of haemoglobins

Arenicola	4.6	Toadfish	5.75—6.23
Chironomus	5.4	Cyprinus	6.5
Lampetra	5.7	Horse	6.9
Notomastus	6.0	Man	7.1
Gastrophilus	6.2	Duck	7.5

7. The susceptibility to denaturation by alkali was mainly investigated in order to determine the differences between the adult and foetal haemoglobins. It was shown by Brinkman and Jonxis (1935) that human foetal haemoglobin is more resistant than adult haemoglobin. From the data based upon the resistance to denaturation by alkali and solubility tests it was calculated that just after birth the infant blood contains about 80% of foetal and 20% of adult haemoglobin; at the age of 4 months the relative concentrations are reversed, i. e. 19% of foetal and 81% of adult haemoglobin; from the age of 7 months onwards the blood contains about 10% foetal and about 90% of adult haemoglobin (see Roche, 1953).

8. The affinities of haemoglobin for oxygen and carbon monoxide depend upon the relative velocities of the associations of haemoglobin with these gases and the dissociation of the complexes formed. The specific differences in the affinities of mammalian haemoglobins for oxygen are mainly due to the differences in their velocities of oxygenation. According to Millikan (1936) the high oxygen affinity of mammalian myoglobin is the result of a high association velocity, the dissociation velocity being of the same order of magnitude as that of the blood haemoglobin of the same mammal. The position is very different with the haemoglobins of some invertebrates. *Ascaris suis* is known to

have two kinds of haemoglobin which can be recognized by the differences in their absorption spectra: haemoglobin of the body-wall and haemoglobin of the perienteric fluid (Keilin, 1925). However, the high affinity of these two haemoglobins for oxygen was found by Davenport (1949) to be due principally to a very low velocity of deoxygenation. Thus, in the presence of Na₂S₂O₄ at about 20° C. and pH 6 the time (t₅₀) for half completion of deoxygenation of perienteric haemoglobin is about 150 sec. whereas for sheep haemoglobin it is 0.008 sec. In other words oxygen dissociated from *Ascaris* haemoglobin about 19,000 times more slowly than from sheep haemoglobin.

The relative affinities of haemoglobin for O₂ and CO, which are expressed as an equilibrium of partition constant $K = \frac{[\text{HbCO}] p\text{O}_2}{[\text{HbO}_2] p\text{CO}}$ as shown in Table 6, varies considerably from 570 (the value for chlorocruorin of *Branchioma*) to 0.67, the value for haemoglobin in the tracheal cells of *Gastrophilus* larvae.

Table 6

		$K = \frac{[\text{HbCO}] p\text{O}_2}{[\text{HbO}_2] p\text{CO}}$	
Branchioma	570	Planorbis	40
Chironomus	400	Rabbit	40
Horse	280	Root nodules	37
Man	230	Gastrophilus	0.67
Arenicola	150	Myoglobins	28—51
Tubifex	40		

A value of K of 280 indicates that at certain well defined conditions the affinity of horse haemoglobin for CO is 280 times higher than for O₂. It is, however, important to note that although the association of haemoglobin with O₂ is about 36 times faster than its association with CO, the dissociation of HbCO is about 10,000 times slower than that of HbO₂. The value 280 therefore represents the ratio of 10,000/36. In other words the high affinity of haemoglobin for CO is due to slow dissociation of the HbCO complex.

9. The shape of the oxygen dissociation curve of haemoglobin is greatly influenced by the experimental conditions, such as dilution, pH, salt concentration and temperature. It was found, however, that haemoglobins of different origins, even when studied under similar conditions, show marked differences in the shape of their dissociation curves. On the other hand the physiological function of haemoglobin

can be properly understood only when its dissociation curve is determined under conditions which are as natural as possible (see Redfield, 1933). Of great physiological significance is the difference between the blood and muscle haemoglobins of the same animal. The O_2 dissociation curve of blood haemoglobin is S-shaped and its affinity for oxygen is lower than that of muscle haemoglobin, the dissociation curve of which is in the form of a rectangular hyperbola. At a low oxygen tension, when blood haemoglobin is about 80% deoxygenated, myoglobin is 80% oxygenated, oxygen thus being transferred from blood haemoglobin to myoglobin. The latter provides a temporary oxygen store which enables the muscle to bridge over the intermittent increases in demand or decreases in the supply of oxygen (Hill, 1936; Millikan, 1936 and 1937).

10. **Antigenic properties of haemoglobin.** Although haemoglobins were known to be weak antigens, it was shown by Heidelberger and Landsteiner (1923) that the immune sera produced by crystalline oxyhaemoglobin react species-specifically with haemoglobin solution. All native derivatives of haemoglobin such as HbO_2 , $HbCO$ and methaemoglobin give the same results. On acid denaturation haemoglobin loses its antigenic property. Antigenic specificity was also used for distinguishing adult and foetal haemoglobins of the same species (Darrow, Nowakowski and Austin, 1940).

Among other properties which were found to vary with the haemoglobin examined are the rate of spreading of their monolayers in the Langmuir trough and their electrophoretic mobilities.

Relationships between haemoglobins and their evolution

The great variations in practically every property of haemoglobin so far examined establish its remarkable heterogeneity. It can be concluded that there are many distinct haemoglobins in nature and since the prosthetic group in all of them is the same protohaem, the differences in their properties are due to the differences in the structure of their protein moiety.

In view of some of the variations in the properties of haemoglobins examined in the previous chapter, it was suggested by Svedberg and Eriksson (1933, 1934) and further developed by Svedberg and Pedersen (1940) and by Roche and Fontaine (1940) that haemoglobins should be divided into two groups: 1) haemoglobin and 2) erythrocrucorin. The term erythrocrucorin according to them covers the haemoglobin-like pigments of all invertebrates as well as of cyclostome fish

among the vertebrates, the name of haemoglobin being reserved for the blood pigments of all other vertebrates.

However, a detailed critical examination of the above classification (Keilin and Hartree, 1951) failed to support it. In fact one cannot find a single character of haemoglobins which makes possible the separation of these pigments into two groups. Thus, the isoelectric points (Table 5) and the relative affinity for O₂ and CO (Table 6) form a complete series of transitions with representatives of "haemoglobin" scattered among those of "erythrocrucorin". Moreover, according to the molecular weight, their group of "haemoglobin" occupies an intermediate position between two groups of "erythrocrucorin" (Table 3). The same applies to practically all other properties so far examined. The term erythrocrucorin should therefore be abandoned and the term haemoglobin can be adopted for all haemoproteins with protohaem as their prosthetic group and capable of combining reversibly with molecular oxygen.

The irregular and somewhat haphazard distribution of haemoglobin outside the vertebrates is difficult to explain. It shows however that haemoglobin could arise in nature independently in different organisms. In fact, each cell of every aerobic and even of some anaerobic organisms is to some extent a potential producer of haemoglobin, since each organism, from bacteria and yeast to higher plants and animals, contains cytochrome components which are haemoproteins closely related to haemoglobin.

Since every organism is capable of synthesizing the haem nucleus, the fact that haemoglobin is not universally present is mainly due to the comparatively limited distribution of the highly specific proteins which, when united with haem, impart to its iron the remarkable property of combining reversibly with molecular oxygen.

REFERENCES

- Anson M. L., Barcroft J., Mirsky A. E. and Oinuma S., *Proc. Roy. Soc. B* **97**, 61 (1924).
Bare C. O., *Kansas Univ. Sci. Bull.* **18**, 265 (1928).
Beijerinck M., *Bot. Zbl.* **39**, 356 (1888).
Boussingault, C. R., *Acad. Sci.* **6**, 102 (1833).
Brinkman R. and Jonxis J. H. P., *J. Physiol.* **85**, 117 (1935).
Burris R. M. and Haas E., *J. biol. Chem.* **155**, 227 (1944).
Darrow R. R., Nowakowski S. and Austin M. H., *Arch. Pathol.* **30**, 873 (1940).
Davenport H. E., *Proc. Roy. Soc. B* **136**, 255 (1949).
Drabkin D. L., *J. biol. Chem.* **164**, 703 (1946).
Fox H. M., *Proc. Roy. Soc. B* **136**, 378 (1949).

- Frank B., *Bot. Ztg.* **37**, 377, 393 (1879).
- Haviland-Brindley M. D., *Trans. Ent. Soc. Lond.* **77**, 5 (1299).
- Heidelberger M. and Landsteiner M. D., *J. exper. Med.* **38**, 561 (1923).
- Hellriegel H. und Wilfarth H., *Untersuchungen über die Stickstoffnahrung der Gramineen und Leguminosen*. Beilageheft. 2. Ver. Rübenzuckerind 1. (1888).
- Hill R., *Proc. Roy. Soc. B.* **120**, 472 (1936).
- Hungerford H. B., *Canad. Ent.* **54**, 262 (1922).
- Keilin D., *Proc. Roy. Soc. B* **98**, 312 (1925).
- Keilin D., *Nature, Lond.* **172**, 390 (1953).
- Keilin D., *Parasitology* **36**, 1 (1944).
- Keilin D. and Hartree E. F. *Nature, Lond.* **168**, 266 (1951).
- Keilin D. and Ryley J. F., *Nature, Lond.* **172**, 451 (1953).
- Keilin D. and Smith J. D., *Nature, Lond.* **159**, 692 (1947).
- Keilin D. and Tissières A., *Nature, Lond.* **172**, 393 (1953).
- Kerlin D. and Tissières A., *Biochem. J.* **57**, XXIX (1954).
- Keilin D. and Wang Y. L., *Nature, Lond.*, **155**, 227 (1945).
- Keilin D. and Wang Y. L., *Biochem. J.* **40**, 855 (1946).
- Kendrew J. C. and Perutz M. F., *Proc. Roy. Soc. A* **194**, 375, (1948).
- Kubo H., *Acta Phytochim.* **11**, 195 (1939).
- Landsteiner K. and Heidelberger M., *J. Gen. Physiol.* **6**, 131 (1923).
- Millikan G. A., *Proc. Roy. Soc. B* **120**, 366 (1936).
- Millikan G. A., *Proc. Roy. Soc. B.* **123**, 218 (1937).
- Morgan V. E., *J. biol. Chem.* **112**, 557 (1936).
- Nicloux M., *C. R. Soc. Biol. Paris* **89**, 1328 (1923).
- Nowotny-Mieczyska, *Bull. Acad. Polonaise Sci. et Lettres, B. Sc. natur.* (1), p. 53 (1949).
- Pauling L., Itano M. A., Singer S. J. and Wells I. C. *Science* **110**, 543 (1949).
- Perutz M. F., Liquori A. M. and Eirich F., *Nature, Lond.* **167**, 929 (1951).
- Perutz M. F. and Mitchison J. M., *Nature, Lond.* **166**, 677 (1950).
- Pietz J., *Z. Bakt.* (2) **99**, 1 (1938).
- Poisson R., *Arch. Zool. exp. gen.* **65**, 182 (1926).
- Redfield A., *Quart. Rev. Biol.* **8**, 31 (1933).
- Reichert E. T. and Brown A. P., *Crystallography of Haemoglobin*. Publ. No. 116 of Carnegie Institute, Washington (1909).
- Reichert K. E. *Müller's Archiv.* p. 197 (1849).
- Roche J., *Bull. Soc. Chim. Biol.* **16**, 793 (1934).
- Roche J. and Derrien. Y., *Sang* **24**, 97 (1953).
- Roche J. and Fontaine M., *Ann. Inst. Océan.* **20**, 77 (1940).
- Ruud J., *Nature, Lond.* **175**, 848 (1954).
- Sato T. and Tamiya H., in *Cytologia*, Fujii Jubilee Volume 1133 (Tokyo) (1937).
- Słonimski P., *La formation des enzymes respiratoires chez la levure*. Actualités Biochimiques, no. 17. Paris: Masson et Cie. (1953).
- Sorby H. C., *Quart. J. Micr. Sci. N. S.* **16**, 76 (1876).

- Svedberg T. and Eriksson I. B., *J. Amer. Chem. Soc.* **55**, 2834 (1933).
- Svedberg T. and Eriksson-Quensel I. B., *J. Amer. Chem. Soc.* **56**, 1700 (1934).
- Svedberg T. and Pedersen K. O., *The Ultracentrifuge*, Oxford: Clarendon Press (1940).
- Tristram G. R., *Advances in Protein Chemistry* **5**, 83 (1949).
- Virtanen A. I. *Nature, Lond.* **155**, 747 (1945).
- Virtanen A. I. and Laine T., *Nature, Lond.* **157**, 25 (1946).
- Vlès F., *Arch. de Phys. Biol.* **2**, 2 (1922).
- Yčas M., *Exper. Cell. Research* **11**, 1 (1956).

Otrzymano 23. 10. 1956 r.

TADEUSZ MANN

**FRUKTOZA W WYDZIELINIE PĘCHERZYKÓW NASIENNYCH
I JEJ ROLA W METABOLIZMIE PLEMNIKÓW***Z Zakładu Fizjologii i Biochemii Reprodukcyjnej Uniwersytetu w Cambridge**Dyrektor: doc. dr med. i fil. T. Mann, F. R. S.*

Wiadomości dotyczące występowania i funkcji fruktozy u człowieka i zwierząt ograniczały się przez długi czas niemal wyłącznie do danych dotyczących pewnych schorzeń i odchyłeń w przemianie węglowodanowej. Wielu badaczy interesowało się zagadnieniem fruktozemii i fruktozurii patologicznej, jak również kwestią obecności fruktozy w płynach obrzękowy, lecz liczba badań nad występowaniem i przemianą fruktozy w ustroju zdrowego człowieka i zwierzęcia była znikoma. Pewnego rodzaju wyjątkiem pod tym względem były prace nad zawartością fruktozy w płynach i we krwi płodu. Prace te pochodzą sprzed przeszło stu lat, kiedy to Claude Bernard (1855) zwrócił po raz pierwszy uwagę na obecność w płynach płodowych cukru lewoskrętnego, podobnego pod względem właściwości do lewulozy (fruktozy). W kilka lat potem Majewski w swojej pracy doktorskiej, przedłożonej w roku 1858 Uniwersytetowi Dorpackiemu, stwierdził ponad wszelką wątpliwość, że cukier płynów płodowych jest (częściowo przynajmniej) identyczny z fruktozą. Wkrótce potem zagadnienie fruktozy płodu stało się przedmiotem szeregu badań, uwieńczonych w latach ostatnich przeprowadzeniem dowodu ostatecznego, że fruktoza krwi płodu pochodzi z łożyska, i że tkanka łożyskowa ma zdolność przemiany glikozy na fruktozę (Huggett, Warren i Warren, 1951).

Fruktoza w płynie nasiennym

Wykazanie, że u człowieka i zwierząt istnieje normalnie inne jeszcze źródło fruktozy, a mianowicie w płynie nasienia męskiego, dokonane zostało stosunkowo niedawno (Mann, 1946), a byłc ono w dużej mierze rzeczą przypadku i wynikiem szczególnych okoliczności. Przez szereg lat poprzedzających odkrycie fruktozy w osoczu nasienia męskiego głównym

przedmiotem zainteresowań badawczych autora była przemiana węglowodanowa, początkowo w latach 1930—1935 w pracowni lwowskiej J. K. Parnasa w związku z zagadnieniem fosforylacji w mięśniu i w drożdżach (Mozołowski, Mann i Lutwak-Mann, 1931; Parnas, Ostern i Mann, 1934; Lutwak-Mann i Mann, 1935) a później w Instytucie Fundacji Molteno w Cambridge w związku z badaniami nad enzymami w roślinach i pleśniach (Mann, 1938, 1944). W czasie doświadczeń nad przemianą cukrową i fosforanową grzybni kropidlaka *Aspergillus niger* nadarzyła się sposobność do oczyszczenia oksydazy glikozowej, tj. enzymu, który utlenia specyficznie i ilościowo cukier gronowy (na kwas glikonowy i wodę utlenioną) nie naruszając praktycznie innych cukrów, a w szczególności fruktozy. Mając do dyspozycji preparat oksydazy glikozowej sporządzonej z pleśni, autor postanowił użyć go do ilościowego oznaczenia glikozy w różnych płynach ustrojowych, a między innymi także w płynie nasiennym. Było to w roku 1945, kiedy obecność cukru redukującego w płynie nasiennym była już powszechnie znana, ale sądzono ogólnie, że cukier ten jest glikozą, i wychodząc z tego założenia, używano wszędzie, zarówno w Europie jak i w Ameryce, glikozy do sporządzania roztworów dla rozcieńczenia spermy przy sztucznym zapłodnieniu. W rękę autora próba oznaczenia ilościowego „glikozy” w nasieniu dała wynik całkowicie ujemny, co skłoniło go natychmiast do przypuszczenia, że wbrew ustalonym poglądom cukier płynu nasiennego nie może być glikozą. Wykonał więc szereg prób chemicznych na cukry i stwierdził, że cukier nasienia daje wszystkie charakterystyczne odczyny fruktozy, a w dodatku, można z niego otrzymać łatwo krystaliczny glikosazon, a zatem pochodną charakterystyczną nie tylko dla glikozy, lecz również dla jej epimerów. Ostateczna identyfikacja nastąpiła przez izolację krystalicznego metylofruktosazonu, pochodnej charakterystycznej dla fruktozy, a wreszcie przez oczyszczenie i zbadanie fruktozy jako takiej.

Dane dotyczące poziomu i zachowania się fruktozy w nasieniu różnych zwierząt zebrano kilkakrotnie w formie artykułów sprawozdawczych (Mann, 1949; Mann i Lutwak-Mann, 1951), a także książki (Mann, 1954), która ukaże się wkrótce również w języku polskim, tłumaczona z inicjatywy Komitetu Biochemicznego Polskiej Akademii Nauk, pod redakcją Józefa Hellera. Celem tego artykułu jest więc nie tyle przedstawienie zarysu całokształtu badań ostatniego dziesięciolecia nad problemem występowania i roli fruktozy w płynie nasiennym, ale również przedstawienie krótkiego opisu tych problemów, które są obecnie przedmiotem badań autora i jego zakładu. W pierwszym rzędzie jednak artykuł ten został napisany przez autora do numeru specjalnego *Acta Bio-*

chimica Polonica dla uczczenia jubileuszu przyjaciela i kolegi, Józefa Hellera.

Pęcherzyki nasienne jako źródło fruktozy

W przeciwieństwie do płynów i krwi płodu, gdzie spotyka się fruktozę tylko u pewnych, bardzo nielicznych gatunków zwierzęcych, a w dodatku zawsze w towarzystwie glikozy, fruktoza nasienia jest rozpowszechniona wśród bardzo licznych gatunków zwierzęcych i stanowi prawie zawsze całość cukru w płynie nasiennym. U ssaków spotyka się ją w stężeniach od kilku mg % u knura, do kilkuset mg % u człowieka, byka i tryka. Nie brak jej w płynie nasiennym królika, szczura i innych gryzoniów, jak również u zwierząt owadożernych, a więc u jeża i kreta. Znaleziono ją u niektórych ryb a nawet u owadów (Humphrey i Mann, 1948; Humphrey, 1949; Mann, 1956). Badania wykazały, że u większości zwierząt, a także u człowieka, głównym źródłem fruktozy nasiennej są gruczoły znane pod nazwą pęcherzyków nasiennych lub *vesiculae seminales* (syn. *glandulae vesiculares*, *glandulae seminales*) lub też organów, które anatomicznie i funkcjonalnie są zbliżone do pęcherzyków nasiennych. Tak np. u knura płyn wydzielany w pęcherzykach nasiennych zawiera kilkadziesiąt mg % fruktozy, chociaż brak go zupełnie w gruczołach Cowpera, jądrach i najądrzach. Podobnie u byka, płyn wydzielany w pęcherzykach nasiennych zawiera często około 1% fruktozy, podczas gdy gruczoł krokowy, najądrza i jądra nie zawierają wcale fruktozy. Można śmiało twierdzić, że zdolność wydzielania fruktozy jest w tej samej mierze specyficzną funkcją chemiczną pęcherzyków nasiennych, względnie blisko z nimi spokrewnionych narządów, jak np. zdolność wydzielania laktozy w mleku przez gruczoły mlekowe. Specyficzność ta uwypukla się najdobitniej w fakcie, że jeżeli wyciąć tkankę gruczołową, która wydziela fruktozę i przeszczepić pod skórę, to tkanka taka nie zatracza bynajmniej swojej poprzedniej zdolności i przeszczep tego rodzaju wydziela w dalszym ciągu fruktozę, i to w stężeniu równie wysokim jak organ, z którego pochodzi (Lutwak-Mann, Mann i Price, 1949).

Regulacja procesów tworzenia i wydzielania fruktozy przez hormon płciowy męski

Od czasu przełomowych odkryć dokonanych przez uczonych tej miary, co Hunter (1792), Berthold (1849) i Brown-Séguard (1889), było wiadome, że usunięcie jąder pociąga zanik pęcherzyków na-

siennych, gruczołu krokowego i innych narządów dodatkowych męskich, a także, że zaburzenia te można usunąć albo przez powtórne wszczepienie tkanki jądrowej, albo przez podawanie wyciągów sporządzonych z jąder. Obecnie wiadomo już, że substancją jądrową, niezbędną dla normalnego rozwoju i czynności gruczołów dodatkowych męskich, jest hormon płciowy męski. Do niedawna jednakowoż stwierdzenie działania hormonu jądrowego u ssaków polegało niemal wyłącznie na użyciu zwierząt kastrowanych, i na mierzeniu wzrostu i analizie histologicznej męskich gruczołów dodatkowych po wstrzyknięciu preparatów hormonowych. Metoda ta, mająca w pewnej mierze charakter ilościowy, na dużą skalę może być zastosowana tylko do małych, niekosztownych zwierząt laboratoryjnych, a więc szczura czy myszy, gdyż użycie jej pociąga zawsze operacyjne wydobycie i przygotowanie organów, a zabieg tego rodzaju nie dałby się zastosować ani u człowieka, ani u kosztownych dużych zwierząt hodowlanych. Trudność tę można pokonać w pewnym stopniu, przez zastosowanie nowej metody do mierzenia działania hormonu płciowego męskiego, a mianowicie przez analizę chemiczną płynu nasiennego.

Pierwszą próbę w tym kierunku wykonaliśmy przed kilku laty na królikach (Mann i Parsons, 1947, 1951), pobierając za pomocą „sztucznej pochwy” skonstruowanej przez Macirone i Waltona (1930), płyn nasienny od tych samych zwierząt, przed kastracją, po kastracji i po zastosowaniu czystego testosteronu. Próba ta wykazała, że fruktoza znika z płynu nasiennego w ciągu dwóch do trzech tygodni po wykastrowaniu królika i że pojawia się znowu niemal natychmiast po wstrzyknięciu testosteronu, albo po podskórnej implantacji tabletek tegoż hormonu. Wyniki analogiczne otrzymaliśmy w latach następnych u innych zwierząt, przede wszystkim u byka (Mann, Davies i Humphrey, 1949; Mann i Walton, 1953; Mann i Rowson, 1956). Z badań tych wynika jednoznacznie, że zdolność wytwarzania fruktozy przez pęcherzyki nasienne zależy od obecności hormonu męskiego w ustroju zwierzęcia i że początek funkcji wydzielniczej pęcherzyków nasiennych zbiega się z tym momentem w rozwoju zwierzęcia, w którym jądra zaczynają wydzielać swój hormon. Tak więc obecność fruktozy w płynie nasiennym jest bezpośrednim wskaźnikiem, że pęcherzyki nasienne wykonują już swoją czynność wydzielniczą, a jednocześnie jest ona pośrednim wskaźnikiem funkcji hormonu jądrowego w ustroju męskim. Jako przykład zastosowania oznaczenia fruktozy w płynie nasiennym do badań endokrynologicznych związanych z funkcją hormonu męskiego posłużyć mogą następujące doświadczenia.

Stosując metodę bodźców elektrycznych do pobierania płynu nasiennego (Thibault, Laplaud i Ortavant, 1948; Rowson i Murdoch, 1954), udało się nam przeprowadzić analizę płynu nasiennego otrzymanego od młodych byczków na długi okres czasu przed ich dojrzewaniem płciowym. Za pomocą tej metody można było stwierdzić, że fruktoza pojawia się w płynie nasiennym młodych zwierząt już około 5 miesiąca życia, a w 8 lub 9 miesiącu, tj. w czasie kiedy w płynie nasiennym pojawiają się dopiero pierwsze i to bardzo nieliczne plemniki, osiąga dość wysoki poziom, mianowicie stężenie 100—200 mg⁰/_o.

Analogiczne wyniki otrzymano u innych gatunków zwierząt, i w każdym wypadku udało się stwierdzić, że moment, w którym fruktoza pojawia się w płynie nasiennym, a zatem i moment, w którym hormon jądrowy rozpoczyna swoje działanie na pęcherzyki nasienne, wyprzedza na szereg tygodni lub miesięcy ten moment, kiedy pierwsze dojrzałe plemniki przedostają się z jąder do płynu nasiennego.

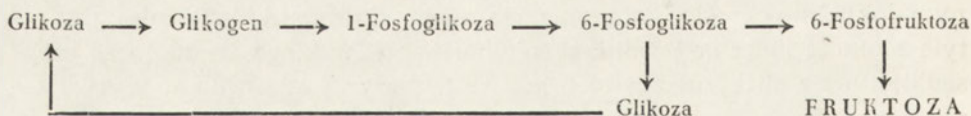
Rola przysadki mózgowej

Usunięcie przedniego płata przysadki mózgowej powoduje zanik czynności hormonalnej jąder, który z kolei pociąga za sobą zanik czynności wydzielniczej w dodatkowych gruczołach męskich. Tłumaczy to, dlaczego operacyjne usunięcie przysadki mózgowej zawsze pociąga za sobą szybkie zniknięcie fruktozy z płynu nasiennego (Mann i Parsons, 1950). Podobnie jak u zwierząt kastrowanych można przywrócić zanikłą funkcję wydzielniczą pęcherzyków nasiennej przez wstrzyknięcie testosteronu, tak i u zwierząt pozbawionych przysadki można to uczynić przez wstrzyknięcie bądź to wyciągów przysadkowych, bądź też oczyszczonego hormonu gonadotropowego sporządzonego z przysadki lub łożyska. Badania nasze, częściowo będące jeszcze w toku, wskazują na to, że czynnikiem, który decyduje dlaczego w rozwoju normalnego samca fruktoza pojawia się w pewnym dokładnie określonym momencie, a nie wcześniej i nie później, jest nie tyle zdolność jąder do produkowania hormonu męskiego, ile zdolność przysadki, która z bliżej nie znanych jeszcze przyczyn jest zdolna do wytwarzania gonadotropin dopiero w pewnym ściśle określonym okresie rozwoju zwierzęcia. Niedawno przekonaliśmy się na przykład, że u młodych byków można z łatwością pobudzić proces tworzenia się fruktozy w pęcherzykach nasiennych nawet przed 4 miesiącem życia, o ile wstrzyknąć im podskórną preparatę oczyszczonej gonadotropiny. Przekonaliśmy się również, że w wielu przypadkach opóźnienia (nieraz bardzo znaczne) w tworzeniu i wydzielaniu fruktozy przez pęcherzyki nasienne, zwłaszcza u zwierząt młodych, są wywołane nie tyle niedomogą hormonalną jąder jako takich,

ale brakiem funkcji gonadotrofinowej, tj. brakiem normalnej działalności przedniego płata przysadki mózgowej. Tak na przykład wiadomo było od dawna, że niedokarmianie lub nieodpowiednie odżywianie osobników młodych, dojrzewających, może wywołać zwłokę w procesach dojrzewania płciowego z powodu opóźnienia normalnej czynności gonadotrofinowej przysadki (Moore i Samuels, 1931; Mulinos i Pomerantz, 1941; Nelson i Heller, 1948; Pazos i Huggins, 1945). Nasze badania wskazują na to, że w tych przypadkach chemiczne oznaczenie poziomu fruktozy w płynie nasiennym może służyć jako przydatny wskaźnik do rozpoznania gonadotrofinowej niedoczynności przysadki i związanej z nią niedomogi wydzielniczej gruczołów dodatkowych męskich (Mann, 1956).

Mechanizm powstawania fruktozy

Oprócz jądra i przysadki trzeci jeszcze gruczoł dokrewny, a mianowicie trzustka, spełnia ważną, chociaż tylko pośrednią rolę w regulacji funkcji wydzielniczej pęcherzyków nasiennych i tworzeniu się fruktozy. Swoją rolę zawdzięcza trzustka zdolności regulacji poziomu glikozy we krwi, a od poziomu tegoż cukru we krwi zależy w pewnym stopniu nasilenie procesu tworzenia się fruktozy w pęcherzykach nasiennych. Wynika to przede wszystkim z obserwacji, że u osobników cierpiących na *diabetes mellitus* poziom fruktozy w nasieniu jest często patologicznie zwiększony. Wynika to również z doświadczeń nad królikami, u których wstrzyknięcie aloksanu powoduje nie tylko cukrzycę i związaną z tym hiperglikemię, ale zwiększenie się również poziomu fruktozy w płynie nasiennym. Badania nasze wskazują na to, że glikoza krwi jest substancją, z której pęcherzyki nasienne tworzą fruktozę, prawdopodobnie poprzez następujący łańcuch przemian enzymatycznych (Mann i Lutwak-Mann, 1951):



Za istnieniem wyżej wymienionych reakcji enzymatycznych przemawia zdolność przetwarzania przez tkankę pęcherzyków nasiennych, *in vitro*, nie tylko glikozy, ale również glikogenu i estrów glikozofosforowych i fruktozofosforowych, na wolną fruktozę. Zasadnicza różnica w przemianie węglowodanowej między pęcherzykami nasiennymi a innymi tkankami polega na tym, że podczas gdy większość tkanek przemienia estry

cukrowofosforowe na kwas mlekowy, pęcherzyki nasienne defosforują te estry i wytwarzają w ten sposób wolne cukry, a mianowicie glikozę z estru glikozo-6-fosforowego, a fruktozę z estru fruktozo-6-fosforowego. Podczas gdy glikoza zostaje szybko zużyta przez pęcherzyki nasienne celem wytworzenia fruktozy, ta ostatnia, gdy zostaje wytworzona, nie zużywa się, lecz jest wydalana przez komórki wydzielnicze pęcherzyków nasiennych wraz z ich wydzieliną. Za istnieniem mechanizmu, który przetwarza glikozę na fruktozę w pęcherzykach nasiennych przemawiają również ostatnie badania autora belgijskiego H e r s a (H e r s, 1955), który stwierdził, że glikoza zawierająca węgiel w formie radioaktywnej (^{14}C) zamienia się w pęcherzykach nasiennych tryka na fruktozę.

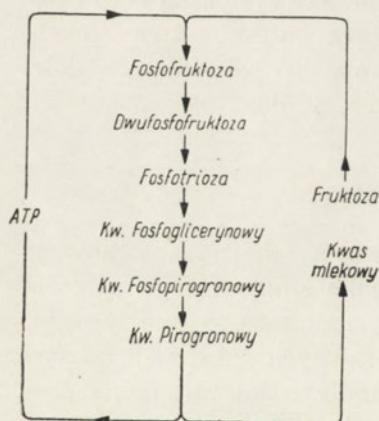
Oprócz wyżej podanego mechanizmu istnieje możliwość powstawania fruktozy w innym jeszcze procesie, a mianowicie przez utlenienie sorbitolu (W i l l i a m s - A s h m a n i B a n k s, 1954). Pęcherzyki nasienne, podobnie jak różne inne narządy zwierzęce, a zwłaszcza wątroba, zawierają oksydazę sorbitolową, która utlenia sorbitol na fruktozę. Jest jednak rzeczą wątpliwą, czy w warunkach fizjologicznych oksydacja ta spełnia rolę w procesie produkcji fruktozy przez pęcherzyki nasienne. Proces tego rodzaju zależałby od obecności sorbitolu, a w tym kierunku brak jak na razie konkretnych danych. Z drugiej strony charakterystyczną cechą pęcherzyków nasiennych (przynajmniej u niektórych gatunków zwierzęcych, zwłaszcza u knura) jest zdolność nagromadzania bardzo wielkich ilości innego heksitolu, mianowicie inozytolu (M a n n, 1951).

Fruktoliza

Plemniki posiadają stosunkowo niedużą ilość wewnątrzkomórkowego materiału zapasowego, który może im służyć jako źródło energii potrzebnej do przeżywania i do utrzymania ruchów, i dlatego są one w dużej mierze uzależnione od dowozu zewnątrzkomórkowych substancji odżywczych. I w a n o w (1931) był pierwszym, który zwrócił uwagę na charakterystyczne zachowanie się plemników psa, które potrafił przez długi okres czasu utrzymać przy życiu za pomocą glikozy; również i on pierwszy przeprowadził jasno dowód, że plemniki nie tracą zdolności przeżywania i zużywania glikozy, jeżeli ze środowiska zostanie usunięty tlen lub jeżeli ich oddychanie zostanie zatrute za pomocą cyjanku. Wkrótce potem R e d e n z (1933) wykazał, że plemniki byka są zdolne do przeżywania w warunkach beztlenowych, o ile dostarczyć im bądź to glikozy, bądź też fruktozy, albo mannozy. Inni badacze, głównie ze szkoły H u g g i n s a, wykazali w tym samym czasie, że osocze nasienia ssaków posiada cukier redukujący, który, jak to już wspomniano, uważano aż do roku 1945 za

glikozę. W rezultacie tych badań szybko przyjęto za pewnik, że przeżywanie plemników w nasieniu pełnym, a zatem w obecności osocza nasiennego, polega na glikolitycznym rozkładzie glikozy. Odkrycie fruktozy umożliwiło zbadanie mechanizmu, którego używają plemniki do przemian w nasieniu.

Przed wszystkim należy zaznaczyć, że plemniki sztucznie wydobyte z najądrzy nie mają jeszcze do dyspozycji fruktozy i są przeważnie nieruchome; nabierają zdolności do ruchów dopiero w zetknięciu z osoczem nasienia, głównie z wydzieliną pęcherzyków nasiennych, która dostarcza im fruktozy. W warunkach beztlenowych plemniki rozkładają fruktozę na kwas mlekowy, który nagromadza się w płynie nasiennym jako ostateczny produkt tzw. fruktolizy anaerobowej. Ilość fruktozy, którą plemniki na przykład byka w ten sposób rozkładają, wynosi około 1,5 do 2 mg na 10^9 plemników na 1 godz. w temp. 37° . Liczbom takim dano nazwę wskaźnika fruktolizy (M a n n, 1948). Wskaźnik ten może być użyty do szybkiej oceny nie tylko metabolicznej aktywności plemników, ale równocześnie do oceny stopnia ruchliwości plemników, gdyż aktywność fruktolityczną zachowują one tylko tak długo, jak długo jest utrzymana ich ruchliwość.



Rys. 1. Schemat fruktolizy w nasieniu ssaków

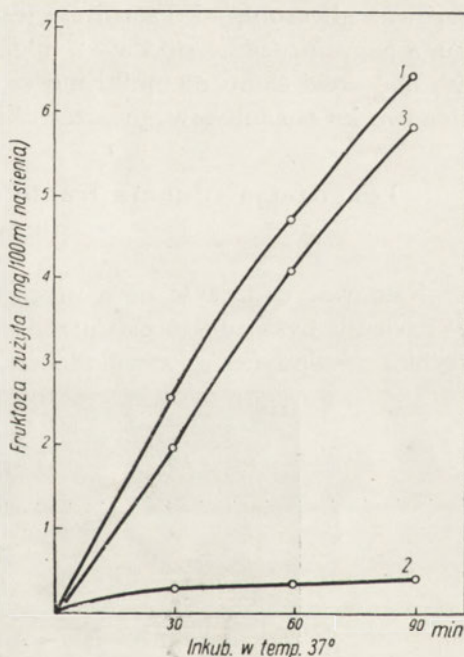
Drogę rozkładu enzymatycznego fruktozy przez plemniki w warunkach beztlenowych przedstawiono schematycznie na rys. 1. Pod wielu względami przypomina ona drogę rozkładu glikozy w tkankach zwierzęcych; tak samo jak w glikolizie czy glikogenolizie również i w fruktolizie rolę centralną spełnia kwas adenozynotrójfosforowy (M a n n, 1949). Jest on nie tylko stałym i charakterystycznym składnikiem komórki plemnikowej, ale od jego poziomu w komórce zależy szybkość, z którą plemniki zdolne są przetwarzać fruktozę na kwas mlekowy. Wynika to między innymi z pewnych badań przeprowadzonych ostatnio nad istotą tzw. wstrząsu chłodowego.

Polega on, jak to wykazał Miłowanow i jego szkoła (1952), na naglej utracie zdolności plemników do ruchu pod wpływem gwałtownego ochłodzenia. Na rys. 2 przedstawiono graficznie przebieg fruktolizy w zawieszynie plemników tryka, badanej: 1) w stanie świeżym, w temp. 37° ; 2) po gwałtownym oziębieniu do temp. 5° , inkubacji w temp. 5° przez 10 minut i następowym ogrzaniu do temp. 37° ; 3) po powolnym oziębieniu do temp. 5° (tj. stopniowym oziębianiu z szybkością

nie większą niż 5° na godz.) i następowym ogrzaniu do temp. 37° . Z rys. 2 wynika jasno, że gwałtowne oziębienie czyli „wstrząs” powoduje utratę zdolności fruktolitycznej przez plemniki, podczas kiedy powolne oziębienie bynajmniej nie powoduje tego efektu (Mann i Lutwak-Mann, 1955). W toku naszych doświadczeń okazało się, że utrata zdolności fruktolitycznej, wywołana nagłym oziębieniem komórek plemnikowych, jest zmianą nieodwracalną i jest związana z gwałtownym i nieodwracalnym spadkiem zawartości wewnątrz-komórkowego kwasu adenozynotrójfosforowego. Badania nasze wskazują na to, że plemniki poddane „wstrząsowi” różnią się od komórek normalnych brakiem zdolności do odbudowy, czyli resyntezy kwasu adenozynotrójfosforowego.

Obecność tlenu ma niewielkiego stosunkowo stopnia hamujący wpływ na fruktolizę plemników; pod tym względem plemniki różnią się od większości tkanek zwierzęcych, w których wpływ tlenu na procesy glikolityczne, czyli tzw. efekt Pasteura, występuje o wiele wybitniej. Tak więc nawet w obecności czystego tlenu plemniki produkują w zetknięciu z fruktozą wcale poważne ilości kwasu mlekowego. Aerobowa fruktoliza jednakowoż, w odróżnieniu od poprzednio omówionej fruktolizy anaerobowej, cechuje się mniejszym nagromadzeniem się kwasu mlekowego, którego część spala się na CO_2 i H_2O .

Oprócz kwasu mlekowego plemniki ssaków są również zdolne do utleniania innych kwasów organicznych, między innymi kwasu pirogronowego i octowego. Co ciekawsze, posiadają one również zdolność do utleniania glicerolu, a zatem substancji, która, jak to wykazali Polge, Smith i Parkes (1949), umożliwia zamrażanie nasienia do temp. -79° , mimo to plemniki po odmrożeniu odzyskują swoją ruchliwość. W badaniach przeprowadzonych ostatnio udało się nam wykazać, że produktem przemiany glicerolu jest kwas mlekowy, i że dwuhydroksyaceton zachowuje się pod tym względem podobnie do



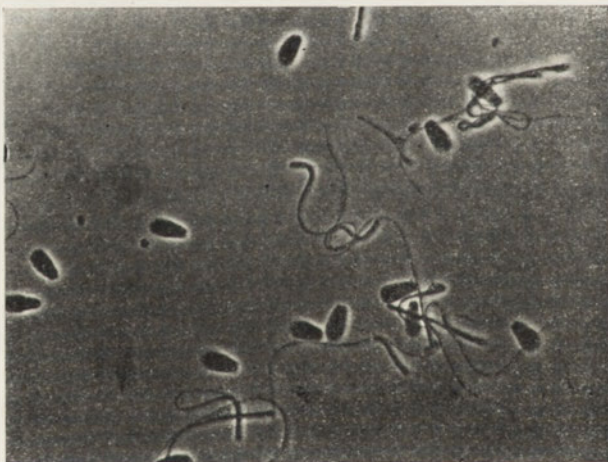
Rys. 2. Wpływ „wstrząsu chłodowego” na fruktolizę w plemnikach tryka

Fruktoliza beztlenowa w zbuforowanym nasieniu: 1) świeżym, 2) po gwałtownym oziębieniu do temp. 5° , 3) po bardzo powolnym oziębieniu do temp. 5°

glicerolu (Mann i White, 1956). Mechanizm przemiany glicerolu u plemników polega prawdopodobnie na tym, że naprzód utlenia się on do dwuhydroksyacetonu, ten z kolei zostaje ufosforylowany na fosfodwuhydroksyaceton, który następnie ulega przemianie glikolitycznej na kwas mlekowy poprzez kwas pirogronowy. Pośród wielu substancji przez nas przebadanych znaleźliśmy jeszcze jedną, która zachowuje się podobnie do glicerolu i dwuhydroksyacetonu. Substancją tą jest sorbitol. Przekonaliśmy się, że plemniki utleniają sorbitol na fruktozę, a cukier ten z kolei zamieniają na kwas mlekowy; wynika z tego nagromadzenie kwasu mlekowego przez plemniki, do których dodano sorbitolu. Proces utleniania zarówno glicerolu, jak i sorbitolu jest oczywiście zależny od obecności tlenu, a nagromadzenie się kwasu mlekowego spowodowane jest tym, że mimo obecności tlenu plemniki nie są w stanie dostatecznie szybko usunąć tlenowo kwasu mlekowego przez oksydację na CO_2 i H_2O .

Lokalizacja systemu fruktolitycznego wewnątrz komórki plemnikowej

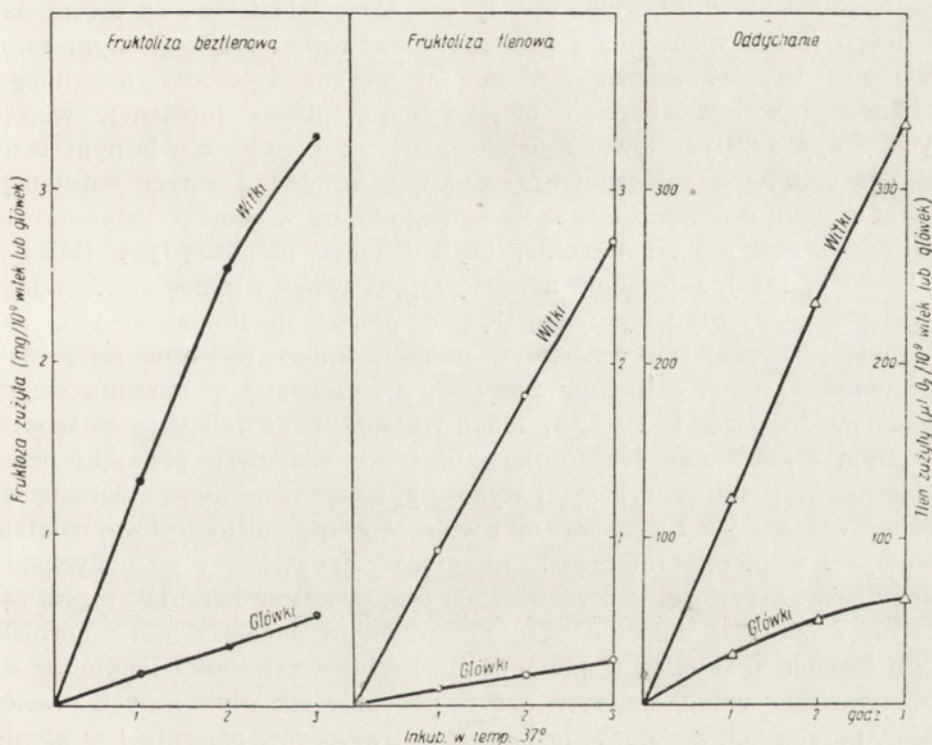
Niedawno nadarzyła się nam sposobność do wykonania pewnych badań w nasieniu byka, u którego przed dwoma mniej więcej laty stwierdzono szybko postępującą utratę płodności. Badania mikroskopowe nasienia wy-



Rys. 3. Nasienie niepłodnego byka, zawierające witki plemnikowe (ruchliwe) pozbawione główek i główki plemnikowe bez witek

kazały, że u tego zwierzęcia większość (około 95%) plemników znajduje się w postaci odrębnych główek i witek (rys. 3) zupełnie od siebie oddzielonych. Za pomocą powolnego wirowania udało się rozdzielić główki, które jako cięższe i nieruchome opadają łatwiej od witek, które, choć pozba-

wione główek, okazały się wysoce ruchliwe. Przez kilkakrotnie powtórzone przemywanie roztworem fizjologicznym i wirowanie otrzymaliśmy w końcu zawiesiny składające się wyłącznie z główek lub wyłącznie z witek. Na tych to zawiesinach wykonano pomiary fruktolizy, zarówno beztlenowej i tlenowej, jak również oznaczania zużycia tlenu. Wyniki przedstawiono na rys. 4; widać z nich jasno, że zdolności fruktolityczna i odde-



Rys. 4. Fruktoliza i zużycie tlenu przez witki i główki plemnikowe

Witki i główki otrzymane przez wirowanie i przemywanie nasienia byka (por. rys. 3), zawieszono w roztworze Ringera zawierającym fruktozę.

chowa pochodzą w przeważającej części od witek plemnika, a nie od ich główek. Nadmienić należy, że spostrzeżenia wykonane za pomocą spektroskopu mikroskopowego wykazały, że całość systemu cytochromowego, a zatem cytochromy *a*, *b*, *c* i tzw. cytochrom *a*₃, czyli oksydaza cytochromowa, znajdują się w witekach, a nie w główkach plemników. Zgodnie z przewidywaniem udało się odnaleźć całość kwasu nukleinowego w główkach, a nie w witekach.

Wpływ ergotioneiny na fruktolizę

Pośród czynników, które unieruchamiają albo nawet zabijają plemniki, znajduje się szereg substancji, które zawdzięczają tę właściwość zdolności łączenia się z grupami sulfhydryłowymi wewnątrzkomórkowych białek witki plemnikowej. Szczególną jadowitością odznaczają się pod tym względem kwas chlorortęciowobędźwinowy i kwas jodozobędźwinowy. Toksyczność obydwu tych substancji jest szczególnie duża przy działaniu na plemniki, które zostały uprzednio oddzielone od osocza nasiennego (przez wirowanie i przemycie roztworem fizjologicznym soli); działanie to jest znacznie słabsze w obecności osocza nasiennego. Zdolność przeciwdziałania i niejako zobojętniania substancji wiążących grupy sulfhydryłowe zawdzięcza osocze częściowo własnym białkom, a częściowo substancjom redukującym. Jedną z tych substancji udało się nam izolować z osocza nasiennego knura w stanie czystym, krystalicznym. Jest nią ergotioneina, czyli betaina tiolohistydyny (Mann i Leone, 1953), substancja zawdzięczająca swoje własności redukujące obecności grupy SH znajdującej się przy pierścieniu imidazolowym. Jej stężenie jest specjalnie wysokie w nasieniu knura, nie brak jej jednak u pewnych innych gatunków zwierząt, a szczególnie w nasieniu ogiera (Mann, Leone i Polge, 1956). Badania nad działaniem antagonistycznym ergotioneiny i czynników unieruchamiających plemniki przez wiązanie grup sulfhydrylowych wykazały, że zarówno kwas chlorortęciowobędźwinowy jak i inne czynniki wiążące grupy sulfhydryłowe działają hamująco w pierwszym rzędzie na procesy fruktolizy i na oddychanie plemników. Ergotioneina przeciwdziała tym procesom hamującym. Na razie nie wiemy, jak dalece działanie ergotioneiny związane jest z normalnym biegiem fruktolizy w plemnikach. Problem zależności fruktolizy od ergotioneiny wymaga dalszych badań, podobnie jak wiele innych problemów, związanych z obecnością i funkcją fruktozy w nasieniu i w płynie wydzielniczym pęcherzyków nasiennych.

Streszczenie

Fruktoza jest normalnym składnikiem płynu nasiennego u człowieka i wielu gatunków zwierzęcych; w większości przypadków powstaje ona w pęcherzykach nasiennych (*vesiculae seminales*) lub gruczołach pokrewnych. Proces wytwarzania i wydzielania fruktozy jest regulowany przez hormon płciowy męski, powstający w jądrach; pośrednio proces ten jest zależny od czynności gonadotropinowej przedniego płata przysadki mózgowej. Głównym źródłem fruktozy jest glikoza krwi, ostatnio jednak wy-

kazano istnienie dodatkowych prekursorów fruktozy. Plemniki przemieniają fruktozę na kwas mlekowy zarówno beztlenowo, jak i tlenowo. W warunkach tlenowych kwas mlekowy ulega dalszemu spalaniu. Plemniki posiadają także zdolność utleniania innych substancji, a w szczególności glicerolu, dwuhydroksyacetonu i sorbitolu. Produktem utlenienia glicerolu jest kwas mlekowy, który prawdopodobnie powstaje przez przemianę glicerolu na dwuhydroksyaceton z następującą fosforylacją na fosfodwuhydroksyaceton i przemianą glikolityczną tego związku fosforowego na kwas mlekowy. Produktem utlenienia sorbitolu jest fruktoza, która z kolei ulega przemianie na kwas mlekowy. Enzymy, które przeprowadzają rozkład fruktolityczny, znajdują się w witce plemnikowej. Ich działanie jest zależne od obecności czynnych grup sulfhydrylowych wewnątrzkomórkowych i od poziomu kwasu adenozyntrójfosforowego. Ergotio-
neina dzięki właściwościom redukującym utrzymuje grupy sulfhydrylowe w stanie czynnym.

LITERATURA

- [1] Bernard C., *Leçons de physiologie expérimentale* t. 1, str. 397, Baillière, Paris, 1855.
- [2] Berthold A. A., *Arch. Anat. u. physiol. u. wiss. Med.*, str. 42, 1849.
- [3] Brown-Séguard C., *Arch. physiol. et pathol.* **21**, 651, 1889.
- [4] Hers H. G., *3-ème Congrès International de Biochimie, Résumé des Communications*, Bruxelles, str. 46, 1955.
- [5] Huggett A. St. G., Warren F. L., Warren N. V., *J. Physiol.* **113**, 258, 1951.
- [6] Humphrey G. F., *Austral. J. Sci.* **12**, 29, 1949.
- [7] Humphrey G. F., Mann T., *Nature (Lond.)* **161**, 352, 1948.
- [8] Hunter J., „*Observations on Certain Parts of the Animal Oeconomy*”, 2-e wyd., str. 31, Nicol, London 1792.
- [9] Iwanow E. E., *Z. Zücht.* **B, 20**, 404, 1931.
- [10] Lutwak-Mann C., Mann T., *Sprawozdania T-wa Naukowego we Lwowie* **15**, 220, 1935.
- [11] Lutwak-Mann C., Mann T., Price D., *Proc. Roy. Soc.* **B, 136**, 461, 1949.
- [12] Macirone C., Walton A., *J. Agric. Sci.* **28**, 122, 1938.
- [13] Majewski, *De substantiarum que liquoribus Amnii et Allantoiblis insunt...* Dissertation, Dorpat, 1858.
- [14] Mann T., *Archiwum T-wa Naukowego we Lwowie* **9**, 421, 1938.
- [15] Mann T., *Biochem. J.* **38**, 339, 1944.
- [16] Mann T., *Biochem. J.* **40**, 481, 1946.
- [17] Mann T., *J. Agric. Sci.* **38**, 323, 1948.
- [18] Mann T., *Advances in Enzymology* **9**, 329, 1949.
- [19] Mann T., *Nature (Lond.)* **168**, 1043, 1951.
- [20] Mann T., „*The Biochemistry of Semen*”, Methuen, London 1954.
- [21] Mann T., *Recent Progr. Hormone Research*, Academic Press, New York, 353, 1956.

- [22] Mann T., Davies D. V., Humphrey G. F., *J. Endocrinol.* 6, 75, 1949.
- [23] Mann T., Leone E., *Biochem. J.* 53, 140, 1953.
- [24] Mann T., Leone E., Polge C., *J. Endocrinol.* 13, 279, 1956.
- [25] Mann T., Lutwak-Mann C., *Physiol. Rev.* 31, 27, 1951.
- [26] Mann T., Lutwak-Mann C., *Arch. di Scienze biol.*, 39, 578, 1955.
- [27] Mann T., Parsons U., *Nature (Lond.)* 160, 294, 1947.
- [28] Mann T. Parsons U., *Biochem. J.* 46, 440, 1950.
- [29] Mann T., Rowson L. E. A., 3-rd Intern. Congress on Anim. Reproduction at Cambridge, Proceedings, Section: Physiology, str. 21, 1956.
- [30] Mann T., Walton A., *J. Agric. Sci.* 43, 343, 1953.
- [31] Mann T., White I. G., *Nature (Lond.)* 178, 142, 1956.
- [32] Miłowanow W. i inni, *Nowe poglądy i osiągnięcia w biologii rozmnażania zwierząt gospodarskich*. Państw. Wyd. Roln. i Leśne, Warszawa 1952.
- [33] Moore C. R., Samuels L. T., *Amer. J. Physiol.* 96, 278, 1931.
- [34] Mozołowski W., Mann T., Lutwak-Mann C., *Sprawozdanie T-wa Naukowego we Lwowie*, 11, 35, 1931.
- [35] Mulinos M. G., Pomerantz L., *Endocrinology* 29, 267, 1941.
- [36] Nelson W. O., Heller C. G., *Recent Progr. Hormone Research* str. 197, Academic Press, New York, 1948.
- [37] Parnas J. K., Ostern P., Mann T., *Roczniki Chemii* 14, 1358, 1934.
- [38] Pazos R. Jr., Huggins C., *Endocrinology* 36, 416, 1945.
- [39] Polge C., Smith A. U., Parkes A. S., *Nature (Lond.)* 164, 633, 1949.
- [40] Redenz E., *Biochem. Z.* 257, 234, 1933.
- [41] Rowson L. E. A., Murdoch M. I., *Vet. Rec.* 66, 326, 1954.
- [42] Thibault C., Laplaud M., Ortavant R., *C. R. Acad. Sci. Paris*, 226, 2006, 1948.
- [43] Williams-Ashman H. G., Banks J., *Arch. Biochem. and Biophys.* 50, 513, 1954.

ФРУКТОЗА В СЕКРЕТЕ СЕМЕННЫХ ПУЗЫРЬКОВ И ЕЕ РОЛЬ В МЕТАБОЛИЗМЕ СПЕРМАТОЗОИДОВ

Резюме

Фруктоза является нормальным компонентом семенной жидкости человека и многих видов животных; в большинстве случаев она образуется в семенных пузырьках (*vesiculae seminales*) или в родственных железах. Процесс образования и выделения фруктозы регулируется половым мужским гормоном, образующимся в семенниках; косвенно этот процесс зависит от гонадотрофической функции передней доли гипофиза. Главным источником фруктозы является глюкоза крови, однако, в последнее время обнаружено существование добавочных предвестников фруктозы. Сперматозоиды превращают фруктозу в молочную кислоту как анаэробным, так и аэробным путем. В аэробных условиях молочная кислота подвергается дальнейшему сгоранию. Сперматозоиды обладают способностью окислять другие субстанции, в особенности глицероль, диоксиацетон и сорбитоль. Продуктом окисления глицерина является молочная кислота возникающая, по всей вероятности, путем превращения глицерина в диоксиацетон с последую-

щим фосфорилированием на фосфодиоксиацетон и гликолитическим превращением в молочную кислоту. Вследствие окисления сорбитоля получается фруктоза, подвергающаяся в свою очередь превращению в молочную кислоту. Энзимы, проводящие фруктолитический распад, находятся в хвосте сперматозоида. Их действие зависит от наличия активных внутриклеточных сероводородистых (сульфгидрильных) (SH-) групп, а также от уровня аденозинтрифосфорной кислоты. Эрготионеин, благодаря восстановительным свойствам, удерживает сероводородистые (сульфгидрильные) (SH-) группы в состоянии активности.

FRUCTOSE IN THE SECRETION OF SEMINAL VESICLES AND ITS ROLE IN THE METABOLISM OF SPERMATOZOA

S u m m a r y

Fructose is a normal constituent of seminal plasma in man and many animal species; in the majority of cases it originates in the seminal vesicles (*vesiculae seminales*) or in closely related glands. The process of formation and secretion of fructose is controlled by the male sex hormone produced in the testes; indirectly it is dependent on the gonadotrophic activity of the anterior pituitary. Blood glucose is the main source of fructose formation but recently additional substrates have been described. Spermatozoa metabolize fructose to lactic acid, both anaerobically and aerobically. In the presence of oxygen, lactic acid undergoes further oxidation. Spermatozoa are also capable of oxidizing various other substances, and in particular, glycerol, dihydroxyacetone and sorbitol. Lactic acid which is the product of glycerol metabolism, arises probably by the oxidation of glycerol to dihydroxyacetone which, in turn, is converted to phosphodihydroxyacetone and then broken down glycolitically to lactic acid. The primary oxidation product of sorbitol is fructose which, however, is subsequently metabolized to lactic acid. The enzymes which carry out the fructolytic processes are localized in the sperm-tail. Their action depends on the presence of intact sulphhydryl groups in the sperm cells, and on the level of adenosinetriphosphoric acid. Ergothioneine, owing to reducing properties, maintains the sulphhydryl groups in an active state.

Otrzymano 16.8.1956 r.

The first part of the paper discusses the importance of the research and the objectives of the study. It also describes the methodology used in the study and the results obtained. The second part of the paper discusses the implications of the research and the conclusions drawn from the study. The third part of the paper discusses the limitations of the study and the directions for future research.

THE CONCLUSION OF THE RESEARCH AND THE RECOMMENDATIONS FOR FURTHER STUDY

The research has shown that there is a significant relationship between the variables studied. The results of the study indicate that the independent variable has a positive effect on the dependent variable. This finding is consistent with the previous research in this area. The study also found that there are some limitations to the research, such as the sample size and the duration of the study. Further research is needed to confirm the findings of this study and to explore the relationship between the variables in more detail.

SØREN LØVTRUP

THE INDUCED SYNTHESIS OF ENZYMES IN MICRO-ORGANISMS

*Department of Histology,
University of Göteborg, Sweden*

Introduction

The phenomenon of enzymatic adaptation may be observed when micro-organisms, grown for some time on a certain substrate, are transferred to a medium of different composition. Under these circumstances, one of three possibilities may obtain: 1. The cells may begin to grow right away, indicating that they can handle the substances in the new medium without having to undergo any changes. 2. The cells may never come to grow, thus showing that the new substrate cannot be used by the cells as they are, and that they are unable to change in such a way as to be able to utilize it. 3. No growth may occur immediately, but after some time, short or long, the cells may start growing at a more or less normal rate. In this last case obviously a change, an adaptation, has occurred, by which the enzymatic range of the cells has been changed so as to enable the utilization of the new substrate.

The onset of growth may be explained by two different mechanisms: 1. Among the cells transferred to the new medium is a mutant, which normally produces the enzyme(s) in question. When conditions are changed, the bulk of the cells are unable to grow, and the mutant will therefore multiply and replace the "normal" ones. 2. All the cells present, and (or) the new ones arising from cell divisions in the new medium may synthesize the enzyme(s). The first case represents a selection, an adaptation based on genetical differences, whereas the second is a purely physiological adaptation. Generally, the first type of adaptation is quite slow, *i. e.* the lag phase is long. If the mutation frequency is say 10^{-7} , many generations are necessary before the mutants prevail. The second type of adaptation is on the other hand often quite fast, ranging maybe

from half an hour to some few hours. However, it is unwarranted to draw any conclusions about the mechanism of adaptation only from the duration of the lag phase.

Both types of adaptation are known to occur and often it is possible by plating experiments to decide which mechanism is at work. Thus, if the same number of colonies is observed on the old and the new substrate obviously the adaptation process is of the second type. The present review is concerned only with the mechanism of this physiological adaptation. It must be stated that the review does not include all pertinent literature, rather it has been attempted to make a selection so that all important aspects of the process are illustrated.

Often the criterion used for demonstrating the occurrence of adaptation has been the onset of growth of the micro-organisms in the new medium. Under these conditions a detailed analysis of the underlying mechanism is excluded. For this purpose it is necessary to follow the adaptation process by determining the enzymatic activity in extracts of the cells. Some adaptive processes are quite complex, including several enzymes. Thus, when bacteria adapt to one metabolite, they may at the same time adapt to several other substances *viz.* intermediate compounds arising during the metabolism of the added substance, provided these are not metabolized by constitutive enzymes. This phenomenon of simultaneous adaptation has been employed for investigation of oxidative metabolic pathways in bacteria (*cf.* review by Stanier [43]), by investigating which of various possible intermediates were attacked after adaptation to some substance, which was oxidized by *Pseudomonas fluorescens*. In other instances, the adaptation is clearly a matter of producing only one new enzyme. As will be seen below, most of our knowledge about the mechanism of enzymatic adaptation, has been gained in studies of one-enzyme adaptations, in which the process was followed by enzymatic analyses.

Enzymatic adaptation has been known to occur in micro-organisms since 1882, when W o r t m a n n published his observation that certain bacteria which ordinarily do not produce amylase, will synthesize this enzyme when starch is present as the sole carbon source (*cf.* the review by K a r s t r ö m [21]).

The beginning of the present era in the research on enzymatic adaptation may be said to date back to 1930 when K a r s t r ö m [20] advanced the following generalization regarding the synthesis of enzymes in micro-organisms: 1. Certain enzymes are never synthesized by a given species, because the genetical basis for producing this enzyme is lacking. 2. The enzymes which are synthesized by a given species, the species-specific enzymes, may be divided in two groups: The constitutive enzymes which

are always formed by the cells, and the adaptive enzymes which are produced only of need, *i. e.* conditioned by the substrate.

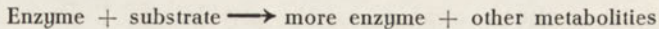
Many years had to pass, however, before time was ripe for gaining a deeper insight in the mechanism of the physiological enzymatic adaptation; thus, it will be seen from the present review that most of the fundamental work has been published during the last five years. The most important results have been obtained on two systems, *viz.* the adaptive synthesis of β -galactosidase in *Escherichia coli*, and of penicillinase in *Bacillus cereus*. These are two instances of enzymatic adaptation where only one enzyme is produced, and the process of adaptation may be followed directly by determining the appearance of, or increase in, enzyme activity. In the case of β -galactosidase the introduction by Lederberg [22] of *o*-nitrophenyl- β -D-galactoside (NPG) as a substrate for the enzyme has been of great value. This substance is faintly yellow, but upon exposure to β -galactosidase *o*-nitrophenol is liberated, giving an intense, yellow colour in alkaline solution. By measuring photometrically the increase in colour the activity of the enzyme may be determined in a simple way. A great part of what is known about the detailed mechanism of enzymatic adaptation has been obtained from work with this method, mainly by Monod and his co-workers.

The use of enzyme determinations, rather than growth measurements, for following the process of adaptation, has revealed one very important fact, *viz.* that even substances which cannot be utilized by an organism may still provoke adaptive enzyme synthesis (Monod, Cohen-Bazire and Cohn [30]). The word "adaptive" implicates a certain purpose, *i. e.* after adaptation has occurred the new substrate may be utilized. In cases where the micro-organisms do not "adapt", they do not benefit in any way by producing the enzyme, and Monod and Cohn [29] therefore suggested to change the name of this process, calling it instead "induced synthesis of enzymes". For substances which provoke such synthesis of enzymes was suggested the name "inducers". In those cases where enzyme synthesis occurs without benefit to the cells in any way, obviously no selection can occur and under these circumstances therefore, the mechanism must be the physiological and not genetical one. It is possible to state as a difference between the genetical and the physiological process that the former is always adaptive, whereas the latter in this respect may vary from case to case.

The mechanism of induction

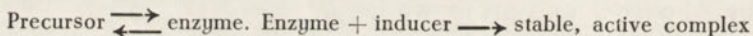
As discussed by Monod, Cohen-Bazire and Cohn [30] three different hypotheses have been suggested to explain the mechanism of the induced synthesis of enzymes:

1. **Function hypothesis.** This mechanism which has been advanced by Dubos [12] and elaborated by Hinshelwood [18] may in a simplified way be expressed by the equation:



Thus a certain amount of the enzyme in question has to be present already before the addition of the inducer. By the addition of this substance which must be a substrate for the enzyme in question, processes are initiated which ultimately lead to synthesis of more enzyme. Thus induction is associated with the function of the enzyme. One consequence of this scheme is that the phenomenon is autocatalytic, i.e. as the enzyme itself is taking part somehow in the further synthesis of enzyme, the rate of enzyme production must increase exponentially until a maximum rate has been reached (fig. 1, curve 1).

2. **Equilibrium hypothesis.** This mechanism has been suggested by Yudkin [45], Spiegelman (cf. [41]) and Monod [23]. According to this hypothesis the enzyme is in dynamic equilibrium with a precursor. After addition of some substance which by forming a complex with the enzyme may stabilize the latter, this equilibrium is disturbed and the amount of enzyme is increased:



It is seen that according to this hypothesis only affinity between enzyme and inducer is required, the inducer need not be substrate for the enzyme. Kinetically this hypothesis will give quite a high rate of enzyme synthesis at the beginning, decreasing gradually as the preformed precursor is depleted, finally approaching a constant value, corresponding to the rate of production of the precursor (fig. 1, curve 2).

3. **Organizer hypothesis.** This hypothesis has been advanced by Monod [27] and by Emerson [13]. According to this scheme a substance provoking enzyme synthesis does this by somehow directing cellular protein synthesis. No requirements are stated as to the relation between enzyme and inducer, as the effect is exerted on an early stage in the enzyme synthesis. These three different possibilities were tested experimentally by Monod, Cohen-Bazire and Cohn [30]. Various natural and synthetic glucides, especially galactosides were tested in *E. coli* with respect to their ability to induce synthesis of β -galactosidase, and to their utilization as energy source. After extraction and purification of the enzyme from the bacteria (Cohn and Monod [6]), the affinity between enzyme and the various substances was determined by competition experiments, and finally it was ascertained whether the substances were hydrolyzed by the enzyme, i.e. whether they were substrates.

The following results were found: 1. The induction of enzyme synthesis is not connected with the utilization of the inducer as energy source. Only one of all tested substances would supply energy, *viz.* lactose, and

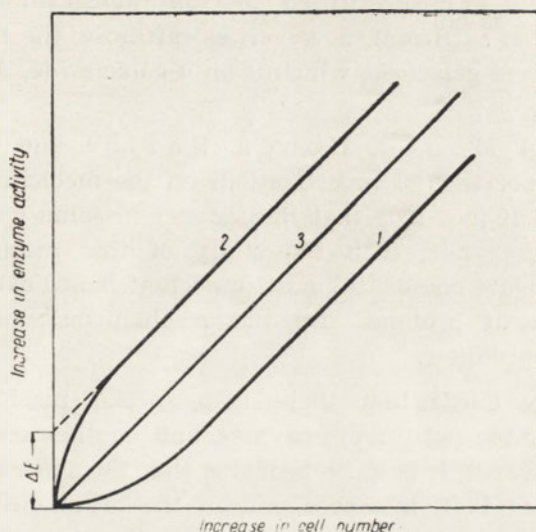


Fig. 1. The relation between bacterial growth and synthesis of enzyme. Curve 1: The course predicted by the function hypothesis. Curve 2: The course predicted by the equilibrium hypothesis, and the one found experimentally when the inducer is at the same time the only available energy source. ΔE represents the "excess" enzyme. Curve 3: The course found experimentally under "conditions de gratuité" and in already adapted cells

this only because glucose is liberated by the hydrolysis, as galactose cannot be utilized by the bacteria. 2. Synthesis of enzyme is induced also by substances which are not substrates. Thus α -D-galactosides like melibiose and α -methyl-galactoside would induce enzyme synthesis although they are not hydrolyzed. Being a substrate for the enzyme is thus not a necessary condition for being an inducer. That it is not a sufficient condition either is shown by the fact that *o*-nitrophenyl- α -L-arabinoside is hydrolyzed by the enzyme, but it has no inductive power. These results clearly reject the first hypothesis. 3. No connection was found between enzyme synthesis and affinity to the enzyme. The synthetic substance thiophenyl- β -D-galactoside does not induce enzyme synthesis, it is not hydrolyzed by the enzyme, but it has considerable affinity to the enzyme, inhibiting competitively the enzyme *in vitro* and *in vivo*. The latter was shown by the fact that this substance inhibits the growth of bacteria, in which β -galactosidase is a constitutive enzyme, when they are grown with

lactose as an energy source. Thus the equilibrium hypothesis may be rejected. 4. Only the organizer hypothesis remains, and from the results obtained with the various substances it was possible to state that a necessary condition for a substance to be an inducer is that it is either free galactose or contains an unsubstituted galactose radical (in α -or- β -binding). This condition is not sufficient, however, as raffinose, the trisaccharide of fructose, glucose, and galactose, which is an α -galactoside, does not induce enzyme synthesis.

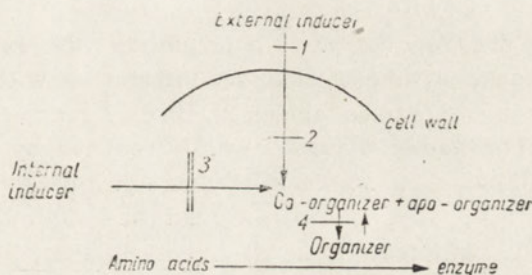
The findings of Monod, Cohen-Bazire and Cohn tend to emphasize the importance of investigations on the mechanism of induced enzyme synthesis. If it is true that the inducer in some way controls the enzyme synthesis proper, then the study of this mechanism affords a means to investigate one of the most important biological processes, the cellular synthesis of proteins and the mechanisms which control the specificity of the products.

The possibility exists that there is a special mechanism for the synthesis of inducible (adaptive) enzymes, and another one for constitutive enzymes. However, it is quite probable that the same kind of processes are at work in both instances, indeed the arguments advanced by Cohn and Monod [7] in support of this "unitary hypothesis" are very convincing. Thus in many cases it has been observed that the same enzyme is constitutive in one bacterial strain, and inducible in another. Generally inducible enzymes are partially constitutive, i.e. they are synthesized even in the absence of added inducer, although at very low rates (see e.g. Yudkin [45], Monod [28]). That the inducible and constitutive enzyme are identical is of course difficult to prove definitely, but investigations of various physical properties of the enzymes have in several cases shown identity. Thus the constitutive and inducible β -galactosidase in *E. coli* were tested, after purification, with respect to relative affinity for different substrates, activation by ions, thermal inactivation coefficient and immuno-chemical properties. No measurable differences were observed between the enzymes (Monod and Cohn [29]). Contrary to this is the observation that enzymes with the same catalytic properties, but isolated from different species often, but not always, exhibit various differences [29]. It has also been discovered that mutations may transform an inducible system into a constitutive one, e.g. β -galactosidase in *E. coli* (Lederberg [23], Cohen-Bazire and Jolitt [5]), and this mutation seems to correspond to a simple gene change. All these facts taken together seem to support the unitary hypothesis of Cohn and Monod. It is evident that the study of the induced synthesis of enzymes only gains in importance if the synthetic

mechanism is identical for inducible and constitutive enzymes, the main difference between the two groups of enzymes being a question of rate of synthesis, determined by genetical factors.

The function of the organizer

On the basis of the results mentioned above and others to be described below, Cohn and Monod [7] have suggested the following schematic picture of the inductive process:



The assumption that constitutive enzymes are synthesized by internal induction is represented by the arrow on the left from "internal inducer" to "co-organizer". This step is supposed to be inhibited (by a genetical factor) in the inducible strain (block 3) and operative in the constitutive one.

It is further assumed that, whether starting from an external or the internal inducer, a common active substance (co-organizer) is formed. This in turn unites with a cellular constituent (presumably macromolecular or particulate, the apo-organizer) forming the organizer. As will be discussed below, the stability of this organizer complex may vary. As various substances may function as exogenous inducers, all giving rise to the same co-organizer, a certain "inducer metabolism" *i.e.* some chemical transformation, has to be assumed (Pollock [34]). Nothing is known about the nature of this transformation. There is, however, experimental evidence supporting the suggestion that the exogenous inducers do not function directly. When testing a variety of carbohydrates for their effect on the differential rate of synthesis (*i.e.* the ratio: enzyme synthesis/protein synthesis) of β -galactosidase in constitutive mutants of *E. coli* it was found that pronounced effects were obtained only with β -galactosides (substrates for the enzyme) and galactose. These substances would temporarily inhibit synthesis completely, but gradually a partial reversal of the inhibition was observed. Now, if the exogenous inducers were

themselves co-organizers, addition to constitutive strains would lead to a situation in which two active substances, the internal co-organizer, and the added inducer, would compete in the synthesis of enzyme. Under these circumstances one would not expect a complete block of enzyme synthesis, but at most a decrease in the rate of synthesis. If the inducer is assumed to be only a precursor of the co-organizer, one may easier imagine that, by virtue of steric analogy with the co-organizer, it may interfere with the synthesis of the organizer (block 4). Thiophenyl- β -galactoside which, as mentioned previously, inhibits the enzyme *in vivo* thereby retarding the growth in constitutive strains, has no influence on the differential rate of synthesis.

This substance does, on the other hand, inhibit the exogenous induction of β -galactosidase synthesis, maybe interfering with the transformation of inducer to co-organizer (block 2). Block 1 represents the glucose "diauxic" effect. The name "diauxie" was introduced by Monod [26] to describe the following phenomenon: When *e.g.* a β -galactosidase inducible strain of *E. coli* is supplied with a medium containing both glucose and lactose, the cells will grow until all glucose is used, then a lag phase occurs, after which the growth continues with lactose as energy source. Enzyme determinations show that no synthesis of β -galactosidase occurs as long as any glucose is left (Løvtrup [24]). Glucose thus inhibits the synthesis of β -galactosidase, but the inhibition is not very specific (less than the inhibition by thiophenyl- β -galactoside), suggesting that the effect is exerted on a very early stage of inducer metabolism. In the schematical picture the inhibitory effect is represented as preventing the penetration of the inducer, but the true mechanism is unknown.

The study of the kinetics of induced synthesis of enzymes has been facilitated by working under "conditions de gratuité" (Monod and Cohn [29]), *i.e.* under such conditions that neither inducer nor induced enzyme play any role in the cellular metabolism. With β -galactosidase in *E. coli* this condition is easily met, because, as mentioned in the preceding section, only one inducer (*viz.* lactose) can be utilized for energy supply and many are not even hydrolyzed by the enzyme. In such a system it was found (Monod, Pappenheimer and Cohen-Bazire [31]), that no enzyme synthesis occurs when growth is inhibited (for instance by lack of sulfate). In logarithmically growing cells the rate of enzyme synthesis is proportional to the rate of growth, indicating that the synthesizing capacity (the organizer) is proportional to the number of new cells formed. Also, a constant fraction of all new protein is enzyme protein, so that plotting increase in enzyme content against increase in cell number gives a straight line through the origin (fig. 1, curve 3).

When the inducer (lactose) is also the only available energy source a somewhat different result is obtained (B e n z e r [1], L Φ v t r u p [24]). Under these conditions a lag period is observed, during which enzyme synthesis occurs (cf. below), but also during the early part of the growth phase an "excess" of enzyme is produced (fig. 1, curve 2). Gradually the rate of synthesis decreases, approaching the value found in already adapted cells, which under similar conditions would give a straight line through the origin (fig. 1, curve 3). The "excess" enzyme (ΔE) divided by the amount of cells present at the beginning of the experiment gives a value closely corresponding to the normal content of enzyme [24]. The difference between the two kinds of experiment might be interpreted as showing that with the inducer as energy source both old and new cells acquire the enzyme, while otherwise only new cells produce the enzyme. However, as seen from the experiments of B e n z e r [1], which are discussed below, this explanation is wrong. In both cases all cells contain the enzyme, the only difference being that when the inducer and the carbon source are different substances, the enzyme will be evenly distributed among the cells from the very beginning, while in the other case the total enzyme will first be present in a small fraction of the cells, but as enzyme synthesis continues, an even distribution will finally be obtained.

Synthesis of β -galactosidase in *E. coli* ceases immediately when the inducer is removed. This may be explained by assuming that the organizer is very unstable and is destroyed in some way so that continuous supply of inducer is needed.

It is thus not very easy to study the organizer in this case, but in the induced synthesis of penicillinase (which catalyzes the reaction: Penicillin + $H_2O \rightarrow$ penicilloic acid) in *B. cereus* studied by P o l l o c k (see review [34]) a system was found, in which the organizer is quite stable. Penicillin, but not penicilloic acid, induces the enzyme synthesis. It would therefore be impossible for a longer period to keep a constant concentration of inducer (except in a continuous-flow culture) because the induced enzyme destroys the inducer. Actually, it was found by P o l l o c k that only a short exposure to the inducer is needed. Thus if excess penicillin was removed after one minute by adding penicillinase to the medium, the ensuing enzyme synthesis would proceed at 50 per cent of the maximum rate. The rate of synthesis would increase with longer exposure times up to five minutes. When the rate of enzyme synthesis was determined in the logarithmically growing culture, it was found to be constant, independent of the number of bacteria. This was most easily explained by assuming that the organizer formed after the exposure to penicillin was quite stable, and able to continue its synthetic activity in the growing cells.

Using penicillin labelled with ^{35}S Pollock and Perret [35] could show that about 100 molecules of penicillin were retained in each cell after the treatment with penicillinase. This penicillin is not hydrolyzed when enzyme formation begins, and it therefore has to be assumed that the penicillin molecules are bound to some cellular constituent to form a complex, the postulated organizer. The experiments of Pollock (see [34]) has made it possible to distinguish between three phases in the process of induction: 1. **Primary interaction phase.** As mentioned above, this phase is very rapid, and reflects presumably the penetration of penicillin into the cell and the binding to some unknown receptor. This process must be dissociated from the oxidative metabolism as it occurs even under anaerobic conditions. 2. **Latent phase.** After the interaction phase there is an interval of 14 minutes during which enzyme is formed at an increasing rate. During this phase a gradual formation of organizer may occur. The process is inhibited by lack of O_2 and by ultraviolet irradiation. 3. **Active phase.** At the end of the latent phase enzyme production continues linearly, which is interpreted as showing that no further increase in organizer occurs. The enzyme synthesis is inhibited by lack of oxygen, but is relatively insensitive to ultraviolet radiation.

The chemical nature of the organizer

The question of about the chemical nature of the organizer is difficult to answer definitely. There are, however, many results showing that ribonucleic acid (RNA) is somehow involved, a finding which is in complete agreement with the present notions that RNA plays an important role in the cellular protein synthesis (Caspersson [3], Brachet [2]).

Among the results supporting the nucleic acid nature of the organizer is the inhibition by ultraviolet irradiation of the processes during the latent phase of penicillinase induction in *B. cereus* (Pollock [34]).

In this context the very interesting results obtained by Gale and Folkes [16] may be mentioned. Cells of *Staphylococcus aureus* were disintegrated by supersonic vibrations. The broken cells present in the supernatant after centrifugation could be shown to have lost about half of their protein and nucleic acids. More nucleic acid (up to 75 per cent of the remaining) might be removed by extraction with M NaCl or incubation with ribonuclease or desoxyribonuclease. It was shown that incorporation of labelled amino acids, associated with increase in protein-N, occurs in such preparations, when incubated with a complete mixture

of amino acids. The rate of incorporation was increased upon addition of purified staphylococcal nucleic acid.

This interesting observation was extended by an investigation of the ability of the disintegrated cells to synthesize specific proteins. The induced synthesis of catalase, β -galactosidase and the enzyme system involved in the formation of acid from glucose were analyzed. The cell preparations, from which nearly all nucleic acid had been removed, were incubated with adenosinetriphosphate, hexosephosphate, a complete mixture of amino acids, and an appropriate inducer. To various tubes was further added either DNA, RNA or a purine-pyrimidine mixture, or the latter plus one of the nucleic acids. The results with β -galactosidase are perhaps the most illustrating because no detectable traces of the enzyme was found before incubation, so that presumably no preformed organizer was present before the addition of the inducer. A small amount of enzyme could be demonstrated in the absence of nucleic acid, and after addition of either RNA or DNA. A considerably higher activity (about five-fold) was found after addition of the purine-pyrimidine mixture. Further addition of DNA or RNA seemed to decrease the effect of the bases. The synthesis of enzyme in the incubation mixture would proceed linearly for three hours. The increase in enzyme activity was abolished when either the amino acid mixture was omitted or chloramphenicol added, the latter substance being known to inhibit protein synthesis in these bacteria (Gale and Folkes [15]). The question of whether or not synthesis of nucleic acid occurred, was investigated by adding ^{14}C -labelled uracil and thymine. Incorporation of uracil occurred when the disrupted cells were incubated with both amino acids and the purine-pyrimidine mixture. With galactose added, the rate of incorporation was increased 5 — 6 times. Thymine was not incorporated under any circumstances.

Results supporting these findings were published by Creaser [11]. The induced synthesis of β -galactosidase in *S. aureus* will take place in the presence of galactose and a mixture of amino acids. Also in the living cells is the formation of enzyme stimulated by addition of a purine-pyrimidine mixture [10]. Addition of the purine analogues, 8-azaguanine and 2:6-diaminopurine inhibits the synthesis, but the inhibition may be reversed by various purines. When nucleic acid synthesis is measured by the incorporation of ^{14}C -uracil, which is partly converted to thymine and cytosine, no inhibition was found with concentrations of analogues which inhibit enzyme synthesis. Analyses showed 8-azaguanine to be incorporated in RNA, but not in DNA, and it was suggested that incorporation of the purine analogue might impair the normal function of RNA in protein synthesis.

The importance of RNA for the induced synthesis of β -galactosidase was also demonstrated by the results published by Pardee [32]. Working with purine or pyrimidine requiring mutants of *E. coli*, he found that the presence of these substances was needed for the enzyme synthesis to occur. Mustard gas, which inhibits DNA synthesis, had no effect on the induction.

Some very interesting results have been obtained by Cohen and Barner [4] with a thymine requiring strain of *E. coli*. This strain may be induced to synthesize xylose isomerase in the absence of thymine, *i.e.* under conditions where no multiplication can occur. As a consequence of the cytoplasmic growth accompanying the synthesis of xylose isomerase and the utilization of xylose in the absence of thymine, the cells lose the power to multiply. Adaptation under these conditions appears as "adaptation to death". The importance of the results lies in the fact that induced synthesis occurs in the absence of DNA synthesis, thus indicating that the cytoplasm is the site of induction and enzyme synthesis.

Taken together, these results seem to warrant the conclusion that an essential part of the synthetic apparatus (the organizer) is RNA. It is not surprising therefore, that measurements of the incorporation of $^{14}\text{CO}_2$ during adaptation to lactose in *E. coli* show that nucleic acid is synthesized even during the lag phase, before growth begins. It is interesting to note, however, that the ratios: protein synthesis/nucleic acid synthesis, and enzyme synthesis/protein synthesis are higher during the lag and early growth phase, indicating that the metabolism during induction is at least quantitatively different from that occurring during normal growth (Løvtrup [25]) This is also indicated by the work of Pardee [33] who found a much higher enzyme/protein ratio during β -galactosidase induction, in the absence of uracil, when working with a pyrimidine requiring mutant, and in the absence of an energy source, when working with a normal strain of *E. coli*.

The sources of protein synthesis

The possibility that the enzymes synthesized by induction might be formed from precursors already present in the cells has been discussed above, and it was mentioned that the kinetic experiments of Monod, Pappenheimer and Cohen-Bazire [31] made this unlikely. Some results by Cohn and Torriani [8] showed the presence in non-adapted cells of *E. coli* of a protein (P_z) with antigenic properties very similar to those of purified β -galactosidase from this species. It was

found that the induced synthesis of β -galactosidase was accompanied by a significant drop in P_z (Cohn and Torriani [9]). This relation would suggest that P_z was a precursor of the enzyme. However, various findings, especially the isotope experiments to be reported below, disprove this possibility, and it seems that the close relationship found between the two types of protein must be explained by assuming that they are synthesized by similar mechanisms within the cell.

Another suggestion which has been advanced, especially to explain the adaptation occurring in the absence of an exogenous nitrogen source (see below), is that the enzymes made useless under the new conditions are partially broken down and rebuilt into the new enzymes. Thus Spiegelman (see review [41]) showed that in yeast cells adapting to galactose in N-free medium the glucozymase disappeared simultaneously with the appearance of galactozymase, and suggested that a transformation of enzymes occurred.

The question about the source of protein synthesis has been answered experimentally in various ways. First of all it was shown that enzyme synthesis at least partly is a protein synthesis *de novo*. In yeast cells it was found that the induction of galactozymase was inhibited by amino acid analogues (Halvorson and Spiegelman (cf. [42])). By using mutants of *E. coli* deficient with respect to synthesis of some amino acid it was shown by Monod, Pappenheimer and Cohen-Bazire [31] that induced synthesis was completely blocked in the absence of the particular amino acid. Both types of experiment clearly show that incorporation of amino acids is involved in the induced synthesis of enzymes, but they do not exclude that a protein precursor may be involved also. This question has been definitely settled by Hogness, Cohn and Monod [19] for the β -galactosidase synthesis. Cells of *E. coli* were grown in a medium containing radioactive sulfate (^{35}S), which is incorporated into organic compounds. About 25 per cent of the labelled material is extractable, consisting mainly of glutathione (cf. Roberts, Abelson, Cowie, Bolton and Britten [38]) while the rest is incorporated in proteins. By keeping the cells under conditions of sulfur starvation for some time, all the extractable sulfur was incorporated into proteins. Afterwards the cells were transferred to a medium containing a β -galactosidase inducer, but no radioactive sulfate. After an appropriate time, the newly formed enzyme was extracted and purified, and the isotope content determined. The results showed that the isotope content in the enzyme was too low to allow for the possibility of protein precursor among the labelled bacterial protein, and a complete synthesis of enzyme thus proved.

The question of the stability of cellular enzymes, *i.e.* the possible reversibility of the synthesis (dynamic equilibrium) was also illustrated by the isotope experiments. It was found that neither in the presence nor in the absence of inducer was any appreciable exchange of isotope to be detected in the enzyme already present. The results of this work led to the conclusion that the "enzyme is evidently not in "equilibrium" with a precursor, nor with any other protein within the cells, nor with a pool of precursors or amino acids" [19]. This stability of induced enzymes has also been shown by determining enzyme activity during deadaptation, *i.e.* growth in the absence of inducer. Both with nitratase (Wainwright and Pollock [44]) and β -galactosidase in *E. coli* (Rickenberg, Yanofsky and Bonner [37]) it was found that the gradual disappearance of enzyme was a simple dilution effect, the amount of enzyme being constant. These results showing such remarkable stability of specific cellular proteins, reject the generally accepted picture of the dynamic equilibrium of the cellular constituents, being constantly broken down and resynthesized. It may be that these results on microorganisms will lead also to a revision of our concepts about the dynamic equilibrium in mammalian cells [19].

It remains to discuss the sources of protein synthesis in nitrogen-free media. As we have seen, the possibility has been ruled out that some other protein or specific precursor is available. Obviously the cells must contain a certain reserve of amino acids, which can be mobilized. Such amino acid reserves have been demonstrated in yeast cells by Roine [39], and it was directly shown by the work of Halvorson and Spiegelman [17] that this store was depleted when yeast cells adapt to maltose. Bacterial cells probably do not have such an amino acid reserve to any great extent, but some must be present, as enzyme synthesis does occur in the absence of nitrogen. Prolonged starvation leads to reduced enzyme synthesis, indicating that the reserves have been partly depleted. Starvation with respect to the energy source (glucose), in the presence of nitrogen, has a greater effect on the depletion of the reserves than nitrogen-starvation in the presence of glucose (LΦvtrup [24]).

In this context a brief discussion of the often stated "autocatalytic" nature of the adaptive process may be justified. This question has been dealt with in the review by Spiegelman [41], in which several possibilities of explaining the autocatalytic mechanism are listed. Among these the only one acceptable in the light of our present knowledge is that the inducer is at the same time the only available energy source. As energy supply is dependent upon the enzyme, and enzyme synthesis upon energy supply, an "autocatalytic" course of adaptation may be expected. Other-

wise, many different causes may be found to explain that enzyme synthesis often occurs at a gradually increasing rate. Thus in the results of Pollock [34] the explanation seems to be that the building up of the organizer is a quite slow process. Under conditions different from those employed in the laboratory of Monod, an "autocatalytical" course of β -galactosidase in *E. coli* was observed by Porter, Holmes and Crocker [36]. This phenomenon could be almost completely eliminated, provided conditions (inducer, concentration, nitrogen source, temperature, oxygenation etc.) were optimal for enzyme synthesis.

Similar results were obtained when the adaptation was allowed to occur in the absence of nitrogen (L Φ v t r u p [24]). It was found that cells starved for a short period with respect to glucose, would synthesize β -galactosidase "autocatalytically" when transferred to N-free medium con-

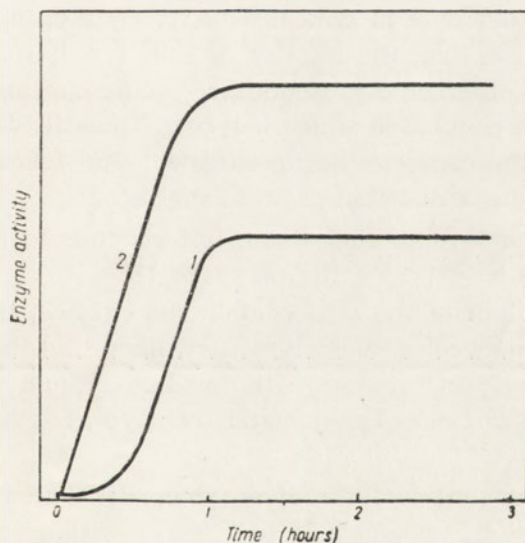


Fig. 2. Induced synthesis of β -galactosidase in *E. coli* in nitrogen-free medium. Inducer: lactose. Curve 1: Starved cells. 2. Log phase cells

taining lactose (fig. 2, curve 1). When cells were taken from a culture in the logarithmic growth phase, the enzyme synthesis would immediately proceed at maximum rate, and the amount of enzyme synthesized would be greater than in the first instance (fig. 2, curve 2), indicating that more reserves were available for the enzyme synthesis.

Analyses on the cellular level

Some very beautiful experiments have been published by Benzer [1] which actually represent an analysis of the problem on the cellular level. The basis of the work is the following: Infection of a bacterial cell by a phage blocks enzyme synthesis. Phage reproduction, culminating in lysis of the cell, requires the active metabolism of the host. Thus if a phage-infected cell is placed under conditions where a given intracellular enzyme is indispensable for metabolism, development of the phage will be dependent upon the presence of the enzyme before infection. If no enzyme is present, no lysis occurs, and if the cells lyse, the time of lysis will vary with the amount of enzyme, the more enzyme, the shorter the time required for lysis. The method may be made quantitative by measuring the enzyme released into solution by the lysed cells at various stages during lysis. The latter process may be followed simply by determination of the decrease in optical density. By plotting the fraction of enzyme liberated against the fraction of cells lysed, a curve will be obtained, the slope of which represents the specific enzyme activity of that component of the population which is lysing. Thus the distribution of the enzyme within the cells can be investigated. The following possibilities as to the intracellular distribution were suggested:

1. All cells contain an equal amount of enzyme. In this case a linear relationship is to be expected (fig. 3, curve 1).

2. Some, e.g. half of the cells contain the enzyme, the others not. In this case the former cells would lyse first, liberating the enzyme, which in turn, by hydrolyzing lactose in the medium, would supply energy to the cells without enzyme. These would then lyse, but no increase in enzyme would be observed (fig. 3, curve 2).

3. Finally, varying amounts of enzyme, distributed around an average value, might be imagined. If so, a curve with gradually decreasing slope should be found (fig. 3, curve 3).

Using this method, Benzer analyzed the enzyme distribution during adaptation when 1. inducer and energy source were the same substance, and 2. when they were different. In the first instance quite few cells contain most of the enzyme at the beginning, but gradually the culture becomes homogenous. In the second case the population is homogenous with respect to content at all levels of specific activity, i.e. all cells participate at comparable rates in the enzyme formation. This difference corresponds to the difference in kinetics of enzyme formation observed under the different conditions, as described above.

Some other experiments were made to investigate the enzyme distribution during deinduction (deadaptation), when, as mentioned, the enzyme is progressively diluted. It was found that also in this case the enzyme is equally distributed among all the cells.

The experiments by Ephrussi, Słonimski and co-workers on the induction and inhibition of cytochrome oxidase synthesis in yeast may not strictly fall within the scope of the present review, as the mechanism involved to a large degree is genetical. They will be included, however, partly because of the very interesting case of simultaneous induction of

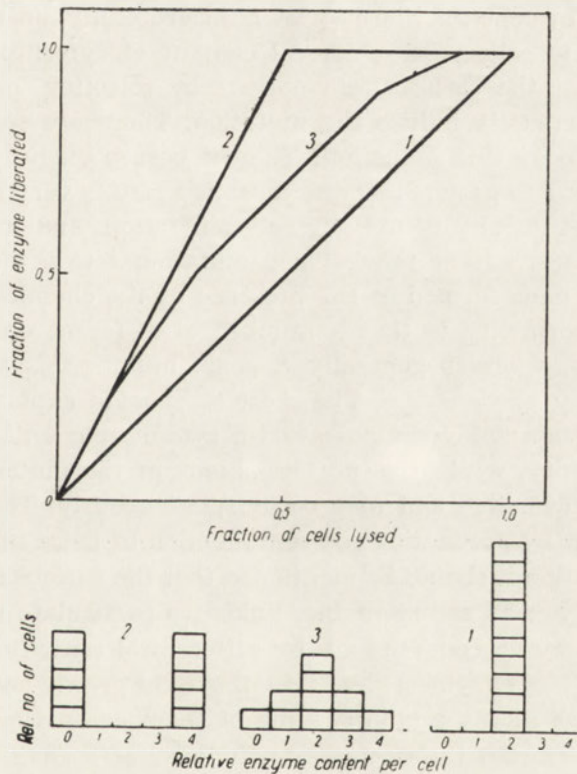


Fig. 3. Three hypothetical distributions of enzyme in bacterial populations, and the corresponding curves to be expected from analyses with the phage procedure (redrawn from Benzer [1])

oxidative enzymes observed in the yeast cells, and partly because they illustrate a very specific inhibition of induced enzyme synthesis (for details the reader may refer to the reviews by Ephrussi [14] and Słonimski [40]). In plate cultures of *Saccharomyces cerevisiae* colonies are occasionally found which are distinctly smaller than the

others. Investigation has shown that these colonies contain mutant cells, deficient with respect to a number of respiratory enzymes, *e.g.* succinic dehydrogenase and cytochrome oxidase, whereas they possess the normal fermentative power. Experimentally yeast lacking cytochrome oxidase may be obtained in two different ways, by growth in the absence of oxygen or in the presence of some organic substance from the group of acridines, *e.g.* euflavine. The resulting cells are different in the two cases, as may be shown by plating them on euflavine-free medium in aerobiosis. The euflavine-treated cells give rise to small colonies, the cells of which are stable, *i.e.* the inability to synthesize cytochrome oxidase is retained indefinitely. The cells previously grown anaerobically, on the other hand, will give rise to cells with a normal content of cytochrome oxidase. It was shown that the acridines do not act by selecting mutants already present, they actually induce the mutation. There are several exceptional features about this induction. Thus it occurs exclusively when the cells are allowed to grow. Next the mutation rate is very high, the spontaneous rate being about 10^{-3} per cell generation, and in certain range of acridine concentration the induced mutation rate is close to one, *i.e.* practically all buds formed in the presence of the chemical are mutants. The third abnormality is that a number of different enzymes are lost simultaneously, whereas generally a genic mutation is associated with the loss of only one enzyme. The most reasonable explanation of these results is that normal yeast possesses a cytoplasmic unit endowed with genetic continuity, while this unit is absent in the mutant. The loss of this unit is irreversible and may occur spontaneously. The acridines are supposed to act by preventing the reproduction of these units. In support of this explanation it should be mentioned that the various enzymes absent in the mutant are all sedimentable, linked to particulate material in the cell, as shown by Słoniński by differential centrifugation of yeast homogenates. The enzymes absent in the cells grown anaerobically are not the same as in the mutants, some of them are sedimentable, others not. In yeast, oxygen thus acts as an inducer of a chain of respiratory enzymes. When anaerobically grown yeast is transferred to aerobic conditions, the synthesis of these enzymes takes place before cell growth begins. This induction is blocked by euflavine; some time after the addition of this substance no further increase in respiratory rate is to be observed. It could be shown by enzyme determinations on extracts that euflavine inhibits the synthesis of cytochrome oxidase. The effect of the acridines is quite specific, there is no general inhibition of protein synthesis. Thus no effect was found on the adaptation to fermentation of galactose, rather a stimulation was observed.

Two effects of acridines have been described above, their mutagenic action resulting in an irreversible block of the synthesis of cytochrome oxidase, and their inhibitory action on the induced (adaptive) synthesis of cytochrome oxidase. The second effect might be a consequence of the first one, in which case the inhibition of the induced synthesis must be irreversible. This question was elegantly answered by Słoniński by showing that the inhibition of enzyme synthesis is almost complete before the mutants begin to appear. Thus the inhibitory effect on enzymatic induction is separated in time from the mutagenic action. Probably a causal relation may ultimately be found between these two phenomena. At the moment these results may serve as a hint of the wide-reaching scope and importance of the study of the induced synthesis of enzyme.

REFERENCES

- [1] Benzer S., "Induced synthesis of enzymes in bacteria analyzed at the cellular level", *Biochim. Biophys. Acta* **11**, 383—395, 1953.
- [2] Brachet J., "The localization and the role of ribonucleic acid in the cell", *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **50**, 861—869, 1950.
- [3] Caspersson T., *Cell growth and cell function*, New York 1950.
- [4] Cohen S. S. and Barner H., "Enzymatic adaptation in a thymine requiring strain of *Escherichia coli*", *J. Bact.* **69**, 59—66, 1955.
- [5] Cohen-Bazire G. et Jolit M., "Isolement par sélection de mutants d'*Escherichia coli* synthétisant spontanément l'amylomaltose et la β -galactosidase", *Ann. Inst. Pasteur* **84**, 937—945, 1953.
- [6] Cohn M. et Monod J., "Purification et propriétés de la β -galactosidase (lactase) d'*Escherichia coli*", *Biochim. Biophys. Acta* **7**, 153—174, 1951.
- [7] Cohn M. and Monod J., "Specific inhibition and induction of enzyme biosynthesis". In "Adaptation in micro-organisms", *Third Symp. Soc. Gen. Microbiol.* Cambridge 1953.
- [8] Cohn M. and Torriani A. M., "Immunochemical studies with the β -galactosidase and structurally related proteins of *Escherichia coli*", *J. Immunol.* **69**, 471—491, 1952.
- [9] Cohn M. and Torriani A. M., "The relationships in biosynthesis of the β -galactosidase- and P_z -proteins in *Escherichia coli*". *Biochim. Biophys. Acta* **10**, 280—289, 1953.
- [10] Creaser E. H., "The induced (adaptive) biosynthesis of β -galactosidase in *Staphylococcus aureus*", *J. Gen. Microbiol.* **12**, 288—297, 1955.
- [11] Creaser E. H., "Inhibition of induced enzyme formation by purine analogues", *Nature* **175**, 899—900, 1955.
- [12] Dubos R. J., "The adaptive production of enzymes by bacteria", *Bact. Rev.* **4**, 1—16, 1940.
- [13] Emerson S., "Genetics as a tool for studying gene structure", *Ann. Missouri Bot. Garden* **32**, 243—249, 1945.
- [14] Ephrussi B., *Nucleo-cytoplasmic relations in micro-organisms*, Oxford 1953.

- [15] Gale E. F. and Folkes J. P., "The assimilation of amino acids by bacteria 15. Actions of antibiotics on nucleic acid and protein synthesis in *Staphylococcus aureus*", *Biochem. J.* **53**, 493—498, 1953.
- [16] Gale E. F. and Folkes J. P., "Effect of nucleic acids on protein synthesis and amino acid incorporation in disrupted staphylococcal cells", *Nature* **173** 1223—1227, 1954.
- [17] Halvorson H. O. and Spiegelman S., "Net utilization of free amino acids during the induced synthesis of maltozymase in yeast", *J. Bact.* **65**, 601—608, 1953.
- [18] Hinshelwood C. N., *The chemical kinetics of the bacterial cell*, Oxford 1946.
- [19] Hogness D. S., Cohn M. and Monod J., "Studies on the induced synthesis of β -galactosidase in *Escherichia coli*: The kinetics and mechanism of sulfur incorporation", *Biochim. Biophys. Acta* **16**, 99—116, 1955.
- [20] Karström H., "Über die Enzyymbildung in Bakterien", *Ann. Acad. Sci. Fennica. Ser. A.* **33**, 2, 1—147, 1931.
- [21] Karström H., "Enzymatische Adaptation bei Mikroorganismen", *Erg. Enzymforsch.* **7**, 350—376, 1938.
- [22] Lederberg J., "The beta-D-galactosidase of *Escherichia coli*, Strain K-12", *J. Bact.* **60**, 381—392, 1950.
- [23] Lederberg J., "Genetic studies with bacteria". In L. C. Dunn: *Genetics in the 20 th century*, New York 1951.
- [24] LCVtrup S., "The induced synthesis of β -galactosidase in *E. coli*. I. Synthesis of enzyme under various experimental conditions". *Biochim. Biophys. Acta.* **19**, 247—255, 1956.
- [25] LCVtrup S., "The induced synthesis of β -galactosidase in *E. coli*. II. Analysis of the accompanying synthetic activity by means of isotopes", *Biochim. Biophys. Acta* **19**, 433—439, 1956.
- [26] Monod J., *Recherches sur la croissance des cultures bactériennes*, Paris 1942.
- [27] Monod J., "Influence de la concentration des substrats sur la rapidité d'adaptation chez le *B. coli*", *Ann. Inst. Pasteur* **69**, 179—181, 1943.
- [28] Monod J., "The phenomenon of enzymatic adaptation" *Growth* **11**, 223—289, 1947.
- [29] Monod J. et Cohn M., "La biosynthèse induite des enzymes (adaptation enzymatique)", *Adv. Enzymol.* **13**, 67—119, 1952.
- [30] Monod J., Cohen-Bazire G. et Cohn M., "Sur la biosynthèse de la β -galactosidase (lactase) chez *Escherichia coli*. La spécificité de l'induction", *Biochim. Biophys. Acta* **7**, 585—599, 1951.
- [31] Monod J., Pappenheimer A. M. jr. et Cohen-Bazire G., "La cinétique de la biosynthèse de la β -galactosidase chez *E. coli* considérée comme fonction de la croissance", *Biochim. Biophys. Acta* **9**, 643—660, 1952.
- [32] Pardee A. B., "Nucleic acid precursors and protein synthesis", *Proc. Nat. Acad. Sci.* **40**, 263—270, 1954.
- [33] Pardee A. B., "Effect of energy supply on enzyme induction by pyrimidine requiring mutants of *Escherichia coli*", *J. Bact.* **69**, 233—239, 1955.
- [34] Pollock M. R., "Stages in enzyme adaptation". In: "Adaptation in microorganisms", *Third Symp. Soc. Gen. Microbiol.* Cambridge 1953.

- [35] Pollock M. R. and Perret C. J., "The relation between fixation of penicillin sulphur and penicillinase adaptation in *B. cereus*", *Brit. J. Exp. Path.* **32**, 387—396, 1951.
- [36] Porter C. J., Holmes R. and Crocker B. F., "The mechanism of the synthesis of enzymes II. Further observations with particular reference to the linear nature of the time course of enzyme formation", *J. Gen. Physiol.* **37**, 271—283, 1953.
- [37] Rickenberg H. V., Yanofsky C. and Bonner D. M., "Enzymatic deadaptation", *J. Bact.* **66**, 683—687, 1953.
- [38] Roberts R. B., Abelson P. H., Cowie D. B., Bolton E. T. and Britten R., "Studies of biosynthesis in *E. coli*", Washington, D. C. 1955.
- [39] Roine P., "On the formation of primary amino acids in the protein synthesis in yeast." Diss. Helsinki 1947.
- [40] Slonimski P. P., "A specific relation between enzymatic adaptation and cytoplasmic mutation", in: "Adaptation in micro-organisms", *Third Symp Soc Gen. Microbiol.* Cambridge 1953.
- [41] Spiegelman S., "Modern aspects of enzymatic adaptation" In J. B. Sumner and K. Myrbäck: *The Enzymes*, New York 1950.
- [42] Spiegelman S. and Halvorson H. O., "The nature of the precursor in the induced synthesis of enzymes", in: "Adaptation in micro-organisms", *Third Symp. Soc. Gen. Microbiol.* Cambridge 1953.
- [43] Stanier R. Y., "Problems of bacterial oxidative metabolism", *Bact. Rev.* **14**, 179—191, 1950.
- [44] Wainwright S. D. and Pollock M. R., "Enzyme adaptation in bacteria: Fate of nitratase in nitrate-adapted cells grown in the absence of substrate", *Brit. J. Exp. Path.* **30**, 190—198, 1949.
- [45] Yudkin J., "Enzyme variation in micro-organisms", *Biol. Rev.* **13**, 93—106. 1938.

Otrzymano 12.3.1956 r.

K. BEŁŻECKA i I. CHMIELEWSKA

WPŁYW GLIKOZY NA WYKORZYSTANIE PRZEZ ORGANIZM LUDZKI PODANEGO DOŻYLNIE HYDROLIZATU BIAŁKA KRWI BYDŁĘCEJ

*Z Zakładu Chemii Fizjologicznej A. M. w Warszawie
i Katedry Chemii Organicznej U. W.*

Wstęp

Hydrolizaty białek o dużej wartości biologicznej jak kazeina, krew i tkanki mięśni wprowadzono podczas II-wojny światowej do terapii chirurgicznej, jak również do zwalczania niedoborów białkowych. Zagadnienie to ma duże znaczenie kliniczne. W razie niemożności podania pokarmu doustnie, np. w stanach pooperacyjnych dostarcza się hydrolizaty drogą pozajelitową. W wielu przypadkach podanie pozajelitowe hydrolizatu jest czynnikiem hamującym nadmierny katabolizm białkowy ustroju i bodźcem do syntezy własnych białek.

Celem lepszego wykorzystania związków azotowych wzbogaca się hydrolizaty w różnego rodzaju materiał kaloryczny — najczęściej w glikozę, [2, 5, 7, 20]. Dodatek glikozy według jednych autorów wpływa bardzo korzystnie na przyswajanie aminokwasów hydrolizatu przez organizm ludzki, [8, 9, 10, 13, 14, 16], natomiast według innych autorów hydrolizaty z glikozą, sterylizowane przez ogrzanie, wykazują w stosowaniu pozajelitowym obniżoną wartość biologiczną w porównaniu z hydrolizatami bez glikozy [3, 6, 11, 12]. Niezgodność zdań na ten temat wpływa prawdopodobnie ze stosowania różnego typu hydrolizatów, jak również różnego typu przypadków klinicznych.

W niniejszej pracy przeprowadzono badania nad wykorzystaniem hydrolizatu białka pełnej krwi bydłęcej bez glikozy i wzbogaconego w glikozę, podanego dożylnie ludziom zdrowym jako jedyne pożywienie azotowe.

Podstawą oceny klinicznej wartości hydrolizatu były: 1) najmniejsza ilość N-całkowitego hydrolizatu wystarczająca do utrzymania dodatniego

bilansu azotowego, 2) odsetkowa ilość nie przyswojonego N-aminowego hydrolizatu wyliczona ze wzoru:

$$\% \text{ N-amin. nie przysw.} = \frac{100 \cdot (\text{N-amin. wyd.} - \text{N-amin. wyd. 0})}{\text{N-amin. pobr.}}$$

N-amin. wyd. — ilość N-aminowego w g, wydalonego w ciągu doby w moczu poszczególnych badanych po podaniu hydrolizatu;

N-amin. wyd. 0 — średnia ilość N-aminowego w g, wydalonego w moczu w dni diety bezazotowej;

N-amin. pobr. — ilość N-aminowego w g, podanego w hydrolizacie w ciągu doby.

Część doświadczalna

I. METODY ANALITYCZNE

N-całkowity oznaczano metodą Kjeldahl'a, w skali półmikro [4]. N wolnych grup aminowych (aminokwasów i wolnych grup aminowych peptydów) oznaczano metodą Pope'a i Stevens'a w modyfikacji Albanesa i Irby [1].

II. CHARAKTERYSTYKA STOSOWANEGO HYDROLIZATU

Hydrolizat białka pełnej krwi bydlęcej otrzymany metodą uprzednio opisaną [15, 17] wykazywał następujące cechy:

Wygląd zewnętrzny: przezroczysta ciecz o barwie jasno-żółtej (hydrolizat bez glikozy) lub brązowo-czerwonej (hydrolizat z glikozą).

Test na obecność ciał gorączkotwórczych: ujemny.

Test na jałowość: posiew ujemny.

Skład chemiczny:

Aminokwasy i peptydy: 70 g/1000 ml

N-całkowity (met. Kjeldahl'a): 10,4 g/1000 ml

N wolnych grup α -aminowych (met. Pope'a i Stevens'a):

6,0 — 7,1 g/1000 ml,

NaCl: 1,8 g/1000 ml,

pH 6,6 — 6,8.

Zawartość aminokwasów egzogennych w 1000 ml hydrolizatu

feniloalanina	2,7 g	arginina	2,4 g
izoleucyna	1,1 g	histydyna	2,8 g
leucyna	8,4 g		
lizyna	4,2 g		
metionina	1,3 g		
treonina	2,8 g		
tryptofan	0,7 g		
walina	3,9 g		
R a z e m			
	25,1 g		

Aminokwasy egzogenne stanowiły w stosowanym hydrolizacie 36% całkowitej ilości aminokwasów, aminokwasy zasadowe 13,4%.

Celem otrzymania hydrolizatu z glikozą dodawano do niego glikozę o czystości Ph. P. II do wlewań dożylnych w ilości 50 g/1000 ml, mieszano i sterylizowano w warunkach identycznych jak hydrolizat bez glikozy, tj. przez 25 minut pod ciśnieniem 1,5 atm.

III. OPIS PRZYPADKÓW

Przeprowadzono ogółem 18 przypadków. Wśród badanych było 9 kobiet i 9 mężczyzn, w wieku od 23 do 64 lat, o wadze 40 do 72 kg.

Przebadany materiał kliniczny dzieli się na pięć zasadniczych serii doświadczeń:

Seria I (9 przypadków, I/1 — I/9). Badania polegały na podawaniu dożylnym różnych ilości gramów azotu całkowitego na kg wagi ciała hydrolizatu bez glikozy. Miały one na celu oznaczenie minimalnej ilości gramów azotu całkowitego, niezbędnej do uzyskania dodatniego bilansu azotowego, oraz oznaczenie odsetkowej ilości nie przyswojonego azotu aminowego tego hydrolizatu.

Seria II (3 przypadki, II/1 — II/3). Badania polegały na podawaniu dożylnym hydrolizatu z glikozą w sposób identyczny jak w serii I. Miały one na celu oznaczenie minimalnej ilości gramów azotu całkowitego, niezbędnej do uzyskania dodatniego bilansu azotowego, oraz oznaczenie odsetkowej ilości nie przyswojonego azotu aminowego tego hydrolizatu.

Seria III (2 przypadki, III/1 — III/2). Badania tej serii stanowią porównanie przyswojenia przez tego samego człowieka hydrolizatu wzbogaconego w glikozę i hydrolizatu bez glikozy.

Seria IV (2 przypadki, IV/1 — IV/2). Badania tej serii stanowią również porównanie przyswojenia przez tego samego człowieka obu typów hydrolizatorów, podanych w kolejności odwrotnej niż w serii III.

Tablica 1

Dzień	Rodzaj hydrol.	Ilość aminokw. i peptydów hydrol. w g	N całk. hydrol. w g	N całk. hydrol. w g/kg	N całk. moczu w g	Bilans azotowy	N amin. hydrol. w g	N amin. moczu w g	N amin. nie przysw. w g	N amin. nie przysw. w %
Przypadek III/1 K.B. (kobieta) wiek: 27 lat, waga: 70 kg										
1	—	—	—	—	6,2	-6,2	—	0,18	—	—
2	—	—	—	—	3,5	-3,5	—	0,22	—	—
3	H+G	68,9	10,2	0,15	7,1	+3,1	6,96	1,36	1,15	16,5
4	H	68,9	10,2	0,15	7,7	+2,5	6,96	0,68	0,47	6,8
5	—	—	—	—	5,9	-5,9	—	0,24	—	—
Przypadek III/2 F.H. (kobieta) wiek: 37 lat, waga: 70 kg										
1	—	—	—	—	6,1	-6,1	—	0,36	—	—
2	—	—	—	—	5,9	-5,9	—	0,38	—	—
3	H+G	68,9	10,2	0,15	10,6	-0,4	6,96	1,54	1,17	16,8
4	H	68,9	10,2	0,15	8,8	+1,4	6,96	0,79	0,42	6,0
5	—	—	—	—	4,7	-4,7	—	0,36	—	—
Przypadek IV/1 A.M. (mężczyzna) wiek: 63 lata, waga: 59 kg										
1	—	—	—	—	6,5	-6,5	—	0,78	—	—
2	—	—	—	—	7,0	-7,0	—	0,87	—	—
3	H	70,9	10,5	0,18	5,2	+5,3	6,70	1,12	0,38	5,7
4	H	70,9	10,5	0,18	8,5	+2,0	6,70	1,18	0,44	6,6
5	H+G	70,9	10,5	0,18	8,7	+1,8	6,60	1,76	1,02	15,5
6	H+G	70,9	10,5	0,18	10,1	+0,4	6,60	1,83	1,09	16,5
7	—	—	—	—	7,0	-7,0	—	0,58	—	—
Przypadek IV/2 S.H. (kobieta) wiek: 60 lat, waga: 61 kg										
1	—	—	—	—	3,7	-3,7	—	0,33	—	—
2	—	—	—	—	3,9	-3,9	—	0,42	—	—
3	H	71,6	10,6	0,17	5,1	+5,5	6,60	0,73	0,34	5,1
4	H	71,6	10,6	0,17	7,9	+2,7	6,60	0,78	0,39	5,9
5	H+G	71,6	10,6	0,17	9,4	+1,2	6,60	1,39	1,00	15,2
6	H+G	71,6	10,6	0,17	9,8	+0,8	6,60	1,28	0,89	13,5
7	—	—	—	—	4,1	-4,1	—	0,43	—	—

Tablica 1 c.d.

Dzień	Rodzaj hydrol.	Ilość aminokw. i peptydów hydrol. w g	N całk. hydrol. w g	N całk. hydrol. w g/kg	N całk. moczu w g	Bilans azotowy	N amin. hydrol. w g	N amin. moczu w g	N amin. nie przysw. w g	N amin. nie przysw. w %
Przypadek V/1 W.H. (kobieta) wiek: 43 lata, waga: 46 kg										
1	—	—	—	—	4,4	-4,4	—	0,15	—	—
2	H	68,9	10,2	0,22	8,6	+1,6	5,94	0,41	0,27	4,5
3	H	59,5	8,8	0,19	8,0	+0,8	5,13	0,38	0,24	4,7
4	H	50,0	7,4	0,16	7,3	+0,1	4,32	0,34	0,20	4,6
5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
6	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
7	—	—	—	—	5,0	-5,0	—	0,14	—	—
8	H+C	63,5	9,4	0,20	5,0	+4,4	5,90	1,04	0,90	15,2
9	H+G	57,4	8,5	0,18	8,3	+0,2	5,31	0,83	0,69	13,0
10	H+G	48,0	7,1	0,15	7,2	-0,1	4,43	0,89	0,75	16,9
11	—	—	—	—	4,6	-4,6	—	0,14	—	—
Przypadek V/2 A.M. (mężczyzna) wiek: 42 lata, waga: 60 kg										
1	—	—	—	—	4,8	-4,8	—	0,17	—	—
2	H	62,8	9,3	0,16	7,9	+1,4	5,40	0,45	0,28	5,2
3	H	56,8	8,4	0,14	8,3	+0,1	4,86	0,48	0,31	6,4
4	H	50,0	7,4	0,12	9,1	-1,7	4,32	0,41	0,24	5,6
5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
6	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
7	—	—	—	—	4,5	-4,5	—	0,15	—	—
8	H+G	63,5	9,4	0,16	7,6	+1,8	5,90	1,06	0,89	15,1
9	H+G	57,4	8,5	0,14	8,1	+0,4	5,31	0,85	0,68	12,8
10	H+G	50,7	7,5	0,13	8,3	-0,8	4,72	0,88	0,71	15,0
11	—	—	—	—	5,0	-5,0	—	0,18	—	—

Seria V (2 przypadki, V/1 — V/2). Badania miały na celu sprawdzenie wyników, uzyskanych w serii I, II, III i IV.

W czasie trwania doświadczeń badani otrzymywali doustnie pełno-kaloryczną dietę węglowodanowo-tłuszczową o następującym składzie: 500 ml 10% kleju z mąki pszennej, 200 — 250 g cukru, 150 — 200 ml soku owocowego, 500 g jabłek, pół cytryny, 70 — 80 g tłuszczu (przetopione masło), witaminy w pastylkach oraz wodę w nieograniczonej ilości. Zawartość N w diecie wynosiła 0,8—1,0 g. Kaloryczność tej diety wahała się od 2000 — 2500 cal.

Każdą serię badań rozpoczynano jednym lub dwoma dniami kontrolnymi, podczas których badani pozostawali wyłącznie na diecie bezazotowej. W ciągu dalszych dwóch do czterech dni badań podawano dożylnie hydrolizaty. Wszystkie serie kończono dniem kontrolnym diety bezazotowej.

Tablica 2

Wartości bilansu azotowego po podaniu hydrolizatu bez glikozy

Nr przy- padku	Waga ciała w kg	Aminokwa- sy i peptydy hydrol. w g	N całk. hydrol. w g	N całk. hydrol. w g/kg	Bilans azotowy
I/2	40	32,4	4,8	0,12	—
I/1	44	36,5	5,4	0,12	—
I/3	72	42,6	6,3	0,09	—
I/4	44	48,6	7,2	0,16	—
V/1	46	50,0	7,4	0,16	+
V/2	60	50,0	7,4	0,12	—
I/5	70	56,8	8,4	0,12	—
V/2	60	56,8	8,4	0,14	+
I/3	72	57,4	8,5	0,12	+
I/9	52	63,5	9,4	0,18	+
I/8	64	63,5	9,4	0,15	—
I/6	68	68,2	10,1	0,15	+
I/7	70	68,9	10,2	0,15	+
III/1	70	68,9	10,2	0,15	+
III/2	70	68,9	10,2	0,15	+
IV/1	59	70,9	10,5	0,18	+
IV/2	61	71,6	10,6	0,17	+
I/8	64	76,4	11,3	0,18	+
I/5	70	78,4	11,6	0,17	+

Ze względu na to, że w początkowych badaniach podstawą do wyliczenia ilości ml hydrolizatu podawanych jednorazowo badanym była ilość azotu całkowitego na kg wagi ciała, wartości 11,3 i 11,6 g azotu całkowitego (dwie ostatnie pozycje tablicy) są wartościami wyższymi od wartości wystarczających do utrzymania dodatniego bilansu azotowego

Hydrolizaty podawano badanym dożylnie metodą wlewów kroplowych z szybkością nie przekraczającą 60 — 80 kropeł na minutę. Czas podawania każdego 100 ml hydrolizatu wahał się od 30 — 35 minut. Wlewianie rozpoczynano o godz. 9 rano, licząc od tego czasu nową dobę.

Mocz dobowy zbierano do naczyń, do których wprowadzano uprzednio niewielką ilość toluenu i tymolu jako środków konserwujących. Mocz po

T a b l i c a 3

Wartości bilansu azotowego po podaniu hydrolizatu z glikozą

Nr przypadku	Waga ciała w kg	Aminokwasy i peptydy hydrol. w g	N całk. hydrol. w g	N całk. hydrol. w g/kg	Bilans azotowy
II/1	62	38,5	5,7	0,09	—
V/1	46	48,0	7,1	0,15	—
II/2	57	48,6	7,2	0,13	—
V/2	60	50,7	7,5	0,13	—
II/2	57	55,4	8,2	0,14	+
V/2	60	57,4	8,5	0,14	+
II/1	62	57,4	8,5	0,14	+
V/1	46	57,4	8,5	0,18	+
II/3	70	66,9	9,9	0,14	+
III/2	70	68,9	10,2	0,15	—
III/1	70	68,9	10,2	0,15	+
IV/1	59	70,9	10,5	0,18	+
IV/2	61	71,6	10,6	0,17	+

T a b l i c a 4

% nie przyswojonego N-aminowego hydrolizatu bez glikozy

Nr przypadku	Średnio dla danego przypadku
I/1	5,7
I/2	2,8
I/3	3,8
I/4	2,4
I/5	6,3
I/6	6,1
I/7	4,1
I/8	5,7
I/9	2,1
III/1	6,8
III/2	6,0
IV/1	6,2
IV/2	6,5
V/1	4,6
V/2	5,7
średnio	4,9

T a b l i c a 5

% nie przyswojonego N-aminowego hydrolizatu z glikozą

Nr przypadku	Średnio dla danego przypadku
II/1	10,8
II/2	17,2
II/3	17,9
III/1	16,5
III/2	16,8
IV/1	16,0
IV/2	14,4
V/1	15,0
V/2	14,3
średnio	15,4

podaniu hydrolizatu bez glikozy miał barwę prawidłową, natomiast po podaniu hydrolizatu z glikozą był zabarwiony ciemnobrązowo.

Po stwierdzeniu nieobecności białka przystępowano w ciągu kilku godzin do oznaczania w moczu dobowym zawartości azotu całkowitego oraz azotu wolnych grup α -aminowych. N-całkowitego w kale nie oznaczano ze względu na to, że hydrolizaty były podawane dożylnie. Nie uwzględniano również N-całkowitego, podanego w diecie (0,8 — 1,0 g N-całk.), ponieważ ilość ta jest tego samego rzędu, co ilość N-całk. wydalonego w kale.

Szczegółowe zestawienie wyników dla poszczególnych przypadków serii III, IV i V podano w tabl. 1. W tabl. 2 i 3 zestawiono dla wszystkich przypadków wartości bilansu azotowego, a w tabl. 4 i 5 odsetkowe ilości nie przyswojonego azotu aminowego hydrolizatu z glikozą i bez glikozy.

Dyskusja

Wyniki zestawione w tabl. 2 pozwoliły na ustalenie przeciętnej dawki minimalnej N-całkowitego w gramach i odpowiadającej jej ilości gramów aminokwasów i peptydów wystarczającej do utrzymania u ludzi zdrowych dodatniego bilansu azotowego przy podaniu dożylnym enzymatycznego hydrolizatu białka pełnej krwi bydłowej bez glikozy w warunkach opisanych w części doświadczalnej.

Dawka minimalna N-całk. w przeliczeniu na kg wagi ciała waha się dość znacznie (od 0,12 do 0,17 g). Mniejszym wahaniom ulega ilość gramów N-całk. w przeliczeniu na osobnika bez względu na wagę ciała. Przeciętna dawka minimalna wynosi 8,5 g N-całk., tj. 57,4 g aminokwasów i peptydów na człowieka na dobę, co odpowiada 820 ml stosowanego hydrolizatu; dawka gwarantująca utrzymanie dodatniego bilansu azotowego — 10,4 g N-całk., tj. 70 g aminokwasów i peptydów na człowieka na dobę, co odpowiada 1000 ml stosowanego hydrolizatu.

Takie same wartości otrzymuje się z zestawienia wyników doświadczeń przeprowadzonych z hydrolizatem wzbogaconym w glikozę (tabl. 3).

Wyniki te nie są zgodne z wynikami Pareira'y i wsp. [13, 14], według których azot podanych dożylnie aminokwasów jest w większym stopniu zatrzymywany przez organizm wówczas, gdy są one wprowadzone równocześnie z glikozą (tzw. czynnik równoczesności "time factor"). Rozbieżność wyników należy prawdopodobnie tłumaczyć tym, że ww. autorzy przeprowadzali badania na ludziach wyniszczonych, pozbawionych w znacznym stopniu własnych rezerw azotowych.

Brak oszczędzającego aminokwasy wpływu glikozy, jak również stwierdzenie mniejszych wahań indywidualnych przy wyznaczaniu przeciętnej dawki minimalnej N-całk., wystarczającej do utrzymania dodat-

niego bilansu azotowego w gramach na człowieka na dobę niż w gramach na kg wagi ciała na dobę (tabl. 2 i 3) nasunęły przypuszczenie, że czynnikiem określającym minimalną ilość hydrolizatu konieczną do utrzymania równowagi azotowej w stosowanych przez nas warunkach są zawarte w nim aminokwasy egzogenne. W tabl. 6 podano ustalone przez Rose'go [21] minimalne zapotrzebowanie dobowe człowieka na aminokwasy egzogenne oraz ilość aminokwasów egzogennych znajdujących się w 820 ml (tj. przeciętnej dawce minimalnej) stosowanego hydrolizatu.

Tablica 6

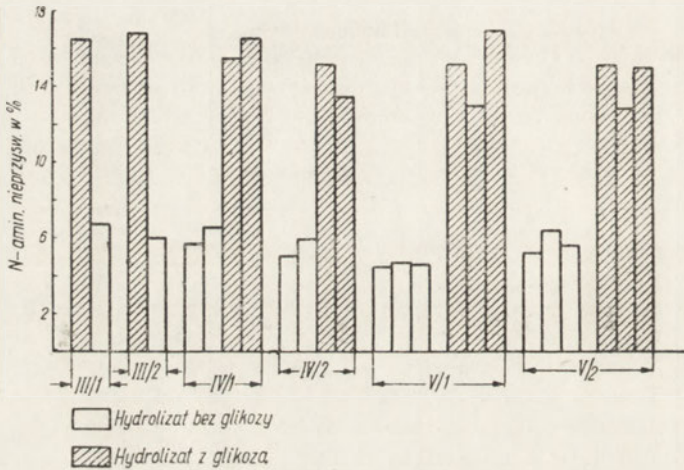
Rodzaj aminokwasu	Minimalne zapotrzebowanie dobowe człowieka na aminokwasy egzogenne w g wg Rose'go	Ilość aminokwasów egzogennych w g w 820 ml badanego hydrolizatu
Feniloalanina	1,10	2,21
Izoleucyna	0,70	0,90
Leucyna	1,10	6,89
Lizyna	0,80	3,44
Metionina	1,10	1,07
Treonina	0,50	2,30
Tryptofan	0,25	0,57
Walina	0,80	3,20

Jak widać z tablicy, ilość gramów poszczególnych aminokwasów egzogennych jest z wyjątkiem izoleucyny, metioniny i tryptofanu znacznie wyższa od ustalonego przez Rose'go minimalnego zapotrzebowania dobowego zdrowego człowieka na dane aminokwasy. Wskazuje to, że te trzy aminokwasy są prawdopodobnie czynnikiem wyznaczającym minimalną ilość stosowanego hydrolizatu, wystarczającą do utrzymania równowagi azotowej w warunkach opisanych w części doświadczalnej.

Zestawione w tabl. 4 i 5 wartości odsetkowej ilości nie przyswojonego N-aminowego hydrolizatu bez glikozy (od 2,1 do 6,8, średnio 4,9) i wzbogaconego w glikozę (od 10,8 do 17,9 średnio 15,4) wskazują, że N-aminowy hydrolizatu bez glikozy jest przyswajany przez ustrój w znacznie większym stopniu niż N-aminowy hydrolizatu z glikozą.

Na rysunku 1 zestawiono wyniki serii III, IV i V badań, w czasie których podawano tym samym ludziom zarówno hydrolizat bez glikozy, jak i z glikozą. Ilości nie przyswojonego N-aminowego hydrolizatu wywołane obecnością glikozy wahają się od 8,6 do 10,8%, średnio 9,7%.

Jedną z przyczyn tego zjawiska może być próg wydalania nerkowego. Podczas wlewania hydrolizatu białkowego, zawierającego jak w badanych przypadkach 7% aminokwasów i peptydów, następuje podniesienie poziomu aminokwasów we krwi i zjawisko „przelewania” („overflow”) nerkowego. Po wzbogaceniu hydrolizatu w glikozę zwiększa się w nim odsetkowa zawartość substancji organicznej (7 g aminokwasów i peptydów + 5 g glikozy/100 ml). To zwiększenie stężenia składników wprowadzonego dożylnie płynu może być przyczyną zwiększenia się zjawiska „przelewania” nerkowego, a tym samym zwiększonego wydalania N-aminowego w moczu.



Rys. 1.

Drugim powodem zmniejszenia się resorpcji N-aminowego może być obecność w hydrolizacie z glikozą nie przyswajalnych przez organizm związków, wytworzonych w wyniku reakcji składników hydrolizatu i dodanego cukru.

Wreszcie trzecim powodem upośledzonej resorpcji N-aminowego może być wytwarzanie się w roztworze hydrolizatu i glikozy połączeń hamujących normalną resorpcję N-aminowego.

W r. 1955 Christensen i wsp. [6] opublikowali wyniki swych badań nad wykorzystaniem aminokwasów i peptydów podanego dożylnie hydrolizatu włókniaka wzbogaconego w glikozę lub fruktozę. Według tych autorów podanie hydrolizatu autoklawowanego z cukrem powoduje w porównaniu z hydrolizatem bez cukru zwiększenie peptydemii, której towarzyszy odpowiednio zwiększona peptyduria. Autorzy ci nie stwierdzili

zwiększenia peptydurii po podaniu sterylnie zmieszanych roztworów hydrolizatu i glikozy bez autoklawowania ani też przy dożylnym podaniu roztworu glikozy przed wprowadzeniem hydrolizatu. Podobne wyniki uzyskała jedna z nas w badaniach wstępnych publikowanych w 1954 r. [19].

Według Christensen'a i wsp. czynnikiem hamującym resorpcję peptydów nie są produkty reakcji między cukrem a aminokwasami lub peptydami, bowiem autoklawowanie hydrolizatu z glikozą nie powoduje zmniejszenia się ilości wolnych aminokwasów oznaczanych metodą ninhydrynową ani też zmiany krzywej miareczkowania. Na tej podstawie autorzy ci wyrażają przypuszczenie, że w wyniku autoklawowania hydrolizatu z cukrem powstają małe ilości bliżej nie określonych związków, wywierających wpływ hamujący na metabolizm znacznej ilości peptydów hydrolizatu.

Porównanie wyników badań Christensen'a z wynikami uzyskanymi przez nas jest trudne ze względu na inną technikę oraz inny materiał stosowany do badań.

1000 ml 7% hydrolizatu białka pełnej krwi bydlęcej stosowanego przez nas zawierało 6,0 — 7,1 g N-aminowego, w czym 0,8 — 1,6 g N α -aminowego peptydów [18]. Mimo tej dość znacznej różnicy nie zaobserwowano zmiany w odsetkowej ilości nie przyswojonego N-aminowego hydrolizatu (tabl. 1).

Stwierdzone przez nas zwiększone wydalanie N-aminowego po podaniu hydrolizatu z glikozą może być częściowo pochodzenia nerkowego, tj. wynikać ze zwiększenia stężenia substancji organicznej w podanym roztworze. Jednakże główną przyczyną tak dużych zmian jest raczej nie sama obecność glikozy, lecz zmiany zachodzące w hydrolizacie w czasie autoklawowania z glikozą. Wydaje się najbardziej prawdopodobne, że następuje połączenie cukru z grupą lub grupami funkcyjnymi aminokwasów zasadowych wolnych lub związanych w peptydach hydrolizatu, przy zachowaniu bez zmian grup α -aminowych i α -karboksylowych. Sprawdzenie słuszności tego przypuszczenia możliwe jednak będzie dopiero po przeprowadzeniu analogicznych do opisanych w pracy badań z hydrolizatem wzbogaconym w znane ilości tych aminokwasów.

Wnioski

Na podstawie opisanych wyników można wyciągnąć następujące wnioski:

1. Minimalna ilość gramów azotu całkowitego enzymatycznego hydrolizatu białka pełnej krwi bydlęcej wystarczająca do utrzymania u ludzi

dotatniego bilansu azotowego przy podaniu dożylnym w opisanych warunkach wynosi od 0,12 do 0,17 g w przeliczeniu na kg wagi ciała.

2. Mniejsze wahania uzyskuje się przy wyznaczeniu przeciętnej dawki minimalnej azotu całkowitego hydrolizatu wystarczającej do utrzymania dodatniego bilansu azotowego wyrażonej w g na człowieka na dzień niż w g na kg wagi ciała na dzień.

3. Przeciętną dawką minimalną wystarczającą do utrzymania u ludzi dodatniego bilansu azotowego jest 8,5 g azotu całkowitego, tj. 57,4 g aminokwasów i peptydów na człowieka na dzień. Ilością gwarantującą utrzymanie dodatniego bilansu azotowego bez względu na wagę osobniczą jest 10,4 g azotu całkowitego, tj. 70 g aminokwasów i peptydów na człowieka na dzień, tj. 1000 ml stosowanego hydrolizatu.

4. Minimalna ilość gramów azotu całkowitego hydrolizatu (ilość gramów podanych aminokwasów i peptydów) wystarczająca do utrzymania dodatniego bilansu azotowego jest taka sama dla hydrolizatu bez glikozy, jak i dla hydrolizatu wzbogaconego w glikozę, a zatem tzw. „czynnik równoczesności” („time factor”) nie ma znaczenia w warunkach stosowanych w niniejszej pracy.

5. Czynnikiem określającym minimalną ilość gramów aminokwasów, wystarczającą do utrzymania w badanych warunkach równowagi azotowej, jest ilość występujących w minimum aminokwasów egzogennych stosowanego hydrolizatu, tj. metioniny, izoleucyny i tryptofanu.

6. Średni % niewykorzystania azotu aminowego hydrolizatu z glikozą [15,4] jest trzykrotnie wyższy niż średni % niewykorzystania azotu aminowego hydrolizatu bez glikozy [4,9].

7. Ilości nie przyswojonego azotu aminowego hydrolizatu wywołane obecnością glikozy wahają się od 8,6% do 10,8%, średnio 9,7%. Wyniki te nasuwają przypuszczenie, że w czasie autoklawowania hydrolizatu z glikozą powstają nie przyswajalne przez organizm przy podaniu dożylnym połączenia glikozy z grupą lub grupami funkcyjnymi reszt specyficznych aminokwasów hydrolizatu.

Prof. dr J. Hellerowi — kierownikowi Zakładu Chemii Fizjologicznej A. M. — dziękujemy za dyskusję i uwagi, które dopomogły przy ostatecznej redakcji pracy.

Prof. dr J. Mossakowskiemu — kierownikowi II Kliniki Chirurgicznej A. M. — dziękujemy za umożliwienie prowadzenia badań na terenie kliniki.

Doc. dr J. Manickiemu dziękujemy za opiekę lekarską nad badanymi w czasie prowadzenia doświadczeń i kontrolę nad wlewami dożylnymi hydrolizatów.

Streszczenie

Zbadano wpływ glikozy na wykorzystanie przez organizm ludzki hydrolizatu białka pełnej krwi bydłowej do wlewów dożylnych, podanego jako jedyne pożywienie azotowe. Stwierdzono, że minimalna ilość g N-całkowitego hydrolizatu wystarczająca do utrzymania dodatniego bilansu azotowego jest taka sama dla hydrolizatu bez glikozy, jak i dla hydrolizatu z glikozą. Średni % niewykorzystania N-aminowego hydrolizatu z glikozą jest trzykrotnie wyższy niż średni % niewykorzystania N-aminowego hydrolizatu bez glikozy.

LITERATURA

- [1] Albanese A., Irby V., *J. Biol. Chem.* **153**, 583, 1944.
- [2] Albanese A., Arnold W., Hays D., Belmont A., Orto L., Di Lallo R., *Metabolism, Clin. Exptl.* **3**, 523, 1954; *C. A.* **49**, 4110 f, 1955.
- [3] Basu P., *Pharm. J.* **165**, 130, 1950.
- [4] Belcher R., Godbert A., *Semi-micro Quantitative Analysis*, London-New York-Toronto 1945.
- [5] Calloway D., *Am. J. Clin. Nutr.* **2**, 405, 1954.
- [6] Christensen H., Wilber P., Coyne B., Fisher J., *J. Clin. Invest.* **34**, 86, 1955.
- [7] Ellison E., Mc Cleery R., Lollinger R., Case C., *Surgery* **26**, 374, 1949.
- [8] Elman R., *Advances in Protein Chem.* **3**, 269, 1947.
- [9] Elman R., *J. Clin. Nutr.* **1**, 287, 1953.
- [10] Elman R., Pareira M., Conrad E., Weichselbaum F., *Ann. Surg.* **136**, 635, 1952.
- [11] Friedmann L., Kline O., *J. Nutr.* **40**, 295, 1950.
- [12] Haugaard G., Tumermani L., Silvestri H., *J. Am. Chem. Soc.* **73**, 4594, 1951.
- [13] Pareira M., Conrad E., Elman R., *Surgery* **34**, 874, 1953.
- [14] Pareira M., Hicks W., Riley J., Elman R., *Ann. Surg.* **140**, 349, 1954.
- [15] Patent polski 34858, 1951.
- [16] Patton A., *Nutr. Rev.* **8**, 193, 1950.
- [17] Raczyńska-Bojanowska K., Jurecka B., Hennig J., Młodkowska-Iwaszkiewicz M., Pniewska K., Chmielewska I., *Przem. Chem.* **7**, 371, 1951.
- [18] Raczyńska-Bojanowska K., *Dysertacja U. W.* 1956.
- [19] Raczyńska-Bojanowska K., Belżecka K., Manicki J., *Pol. Tyg. Lek.* **9**, 134, 1954.
- [20] Rice C., *Arch. Surg.* **61**, 977, 1950.
- [21] Rose W., Wixom R., Lockhart H., Lambert F., *J. Biol. Chem.* **217**, 987, 1955.

ВЛИЯНИЕ ГЛЮКОЗЫ НА ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЧЕЛОВЕЧЕСКИМ ОРГАНИЗМОМ
ВВЕДЕННОГО ВЕНОЗНЫМ ПУТЕМ ГИДРОЛИЗАТА БЕЛКА КРОВИ
СКОТА

Резюме

Авторы исследовали влияние глюкозы на использование человеческим организмом гидролизата белка полной крови скота, вводимого венозным путем в качестве единственной азотной пищи. Констатируется факт, что минимальное количество в граммах общего N гидролизата достаточное для удержания положительного азотного баланса, одно и то же как для гидролизата без глюкозы, так и для гидролизата с глюкозой. Средний процент неиспользования аминного N гидролизата с глюкозой втрое выше среднего процента неиспользования аминного N гидролизата без глюкозы.

EFFECT OF GLUCOSE ON UTILIZATION OF INFUSED BOVINE BLOOD
PROTEIN HYDROLYSATE IN HUMAN SUBJECTS

Summary

A study has been made on the effect of glucose on the utilization in human subjects of bovine whole-blood protein hydrolysate administered intravenously as the only nitrogen source. It has been demonstrated, that the minimum quantity in grams, of total-N of hydrolysate, sufficient for maintaining a positive nitrogen balance is the same for the hydrolysate without glucose and the hydrolysate with glucose. The average percentage of the non-assimilated amino-N of the hydrolysate with glucose is three times higher than the percentage of the non-assimilated amino-N of the hydrolysate without glucose.

Otrzymano 28.6.1956 r.

L. SZARKOWSKA

**REDUKTAZA P-CHINONOWA U MOTYLA WILCZOMLECZKA
CELERIO EUPHORBIAE L.**

*Z Pracowni Biochemii Ewolucyjnej Zakładu Biochemii PAN
Kierownik pracowni prof. dr Irena Mochacka*

Przemiana oddechowa motyli w okresie poczwarkowym stanowi od dawna ciekawe zagadnienie w fizjologii owadów. W okresie tym obserwujemy gwałtowny spadek wymiany gazowej, utrzymujący się przez czas dłuższy, po czym następuje wzrost na poziom wyjściowy. Powstaje w ten sposób krzywa kształtu litery *U*, odnajdywana u najrozmaitszych gatunków przez prawie wszystkich badaczy, którzy się tą sprawą zajmowali. K r o g h [6] dla wytłumaczenia tego zjawiska wysunął hipotezę, że przemiana materii maleje w miarę postępu histolizy skutkiem ubytku zorganizowanej tkanki, następnie rośnie w miarę postępującej budowy ciała motyla w poczwarcie. Według K r o g h a więc wielkość przemiany w danym okresie byłaby proporcjonalna do ilości tkanki zorganizowanej. Ten pogląd był szeroko przyjęty aż do lat wojennych. W r. 1940 i 41 H e l l e r jako pierwszy przeprowadził pomiary oddychania miazgi poczwarek metodą Warburga i stwierdził, że oddychanie to daje się przedstawić w ciągu rozwoju poczwarkowego przez krzywą mającą również kształt litery *U*. Praca ta, która z powodu warunków wojennych mogła być ogłoszona i to tylko w skrócie dopiero w r. 1947 [3a,b], wykazała zatem, że mechanizm regulacji przemiany nie jest natury strukturalnej. Nasunęło to przypuszczenie, że grają tu rolę zmiany w aktywności układów enzymatycznych oddychania. H e l l e r wykazał w tej samej pracy, że oddychanie miazgi poczwarek zimujących (w diapauzie) jest niewrażliwe na takie stężenia KCN, które hamują oksydazę cytochromową. Dodanie kozymazy (DPN) powodowało wzrost oddychania, przedłużenie aktywności miazgi i wstrzymywało jej czernienie. H e l l e r wyciągnął stąd wniosek, że kozymaza pośredniczy w przenoszeniu wodoru z metabolitów na związki pośrednie melanogenezy. Wskazywało to na rolę tyrozynazy jako końcowej

oksydazy. Heller pisze [3b str. 235]: „Opisane doświadczenia wyjaśniły fizjologiczną rolę tyrozynazy. Znane dotąd działanie tyrozynazy z wytworzeniem melanotycznego barwika nie może być uważane za fizjologiczne już choćby dlatego, że występuje tylko przy zranieniach. Zjawisko to jest obecnie zrozumiałe. W ciele nieuszkodzonym istnieje równowaga między formą utlenioną pochodnych tyrozyny, powstającą pod wpływem tyrozynazy, a formą zredukowaną, która powstaje stale z poprzedniej pod działaniem dwuhydrokazy. Ta równowaga zostaje zachwiana przez nieograniczony dostęp tlenu przy zranieniu i gromadzi się forma utleniona, chinonowa, która się już samorzutnie przetwarza w melaninę”.

Wyniki Hellera zostały potwierdzone przez innych badaczy. W r. 1948 wykazał Williams [13] zupełnie niezależnie i metodą bezpośrednią, że w okresie diapauzy układ cytochromowy ulega rozłożeniu, a w okresie rozwojowym tworzy się na nowo. Równoległość między natężeniem oddychania całej poczwarki a miazgi, i enzymatyczną naturą regulacji potwierdzają prace Agrella [1] i Wojtczaka [14]. Zastrzeżenia wzbudziła tylko hipoteza o roli tyrozynazy jako końcowej oksydazy. Sussmann [12] na podstawie doświadczeń z inhibitorami tyrozynazy, przeprowadzonych na nietkniętych poczwarkach *Platysamia cecropia* L., oraz Wojtczak [14] na podstawie podobnych doświadczeń na gąsienicach molika woskowego *Galleria mellonella* L. stwierdzają, że tyrozynaza jest czynna jako końcowa oksydaza tylko w oddychaniu miazgi, natomiast nie spełnia tej funkcji w nietkniętym organizmie.

Trzeba również zaznaczyć, że od czasu badań Hellera poznano inną rolę fizjologiczną tyrozynazy, mianowicie jako czynnika powodującego twardnienie powłoki ciała owadów [10] przez wytwarzanie wielofenoli garbujących białko. Jednakże nowsze badania Wojtczaka [16] wykazują w uderzający sposób, że maximum aktywności tyrozynazy u poczwarki występuje w okresie minimalnej aktywności oksydazy cytochromowej, zaś aktywność ta spada gwałtownie w momencie, kiedy zaczyna wzrastać czynność oksydazy cytochromowej. Należy więc zgodzić się ze stanowiskiem Dawsona i Tarpleya [2], że rola tyrozynazy w oddychaniu owadów wymaga dalszych badań.

Nawiązując do pracy Hellera z 1940 — 41 badaliśmy oddychanie miazgi z zimujących poczwarek *C. euphorbiae* przy użyciu różnych substratów tyrozynazy. Nieoczekiwanie dobre wyniki, to jest równomierne oddychanie utrzymujące się przez całe godziny, otrzymaliśmy stosując hydrochinon, który nie jest specyficznym substratem dla tyrozynazy. Okazało się, że do pewnego stopnia można hydrochinon zastąpić jego chinonem; przy czym oddychanie początkowo nieznaczne nasilało się stop-

niowo. Nasunęło to przypuszczenie, że miazga zawiera reduktazę p-chinonową analogiczną do odkrytej przez Wosilaita i Nasona [17] w grochu. Podobny enzym redukujący filochinon opisali Martius i Strufe [7]. Badania nasze wykazały u *C. euphorbiae* obecność reduktazy p-chinonowej, co stanowi przedmiot obecnej pracy.

Część doświadczalna

PRZYGOTOWANIE PREPARATU ENZYMATYCZNEGO

Do badań użyto poczwarek w diapauzie oraz dorosłych motyli *Celerio euphorbiae*. Poczwarkę motyla lub oddzielone ciało tłuszczowe, mięsień lub hemolimfę rozcierano w szklanym homogenizatorze z ośmiokrotną ilością 0,1 M tiomocznika w 0,1 M buforze fosforanowym o pH 6,5. Homogenat wirowano przy 5 tys. obr./min. przez 15 min. Zbierano ostrożnie górną warstwę tłuszczu i odrzucano. Prawie klarowny płyn służył jako preparat enzymatyczny.

Tiomocznik zastosowano w celu zahamowania oksydazy fenolowej, której aktywność w homogenatach poczwarki jest duża i powoduje szybkie ciemnienie oraz mętnienie wyciągów na skutek wiązania się produktów działania tyrozynazy w białkiem [8]. Powstające zmętnienie i zaciemnienie uniemożliwia pomiar absorpcji.

Aktywność enzymu oznaczano przez pomiar szybkości utleniania DPNH w obecności p-chinonu pod wpływem dodawanej miazgi.

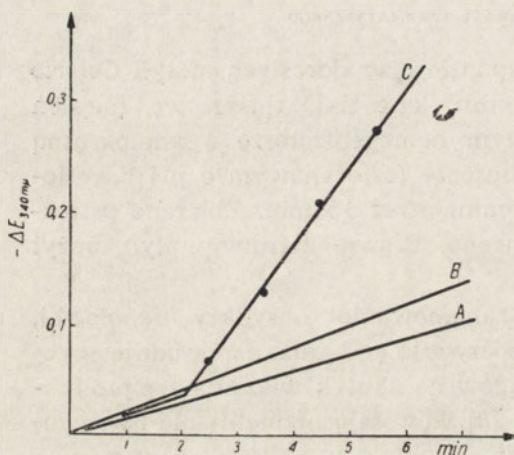
Aktywność enzymu podajemy w jednostkach wprowadzonych dla reduktazy chinonowej przez Wosilaita i Nasona [17], z tą różnicą, że pomiar aktywności był przeprowadzony w temperaturze 20° a nie w 25°. Wosilait i Nason przyjmują za jednostkę taką ilość enzymu, która powoduje zmianę $\lg \frac{I_0}{I}$ o 0,001 w ciągu jednej minuty, ustaloną przez pomiar pomiędzy 15 a 45 sekundą. Przy obliczaniu aktywności została uwzględniona reakcja nieenzymatyczna oraz endogenne utlenianie zredukowanej kozymazy w nieobecności p-chinonu.

Białko oznaczano po strąceniu go kwasem trójchlorooctowym. Osad białka odwirowywano, przemywano dwukrotnie 10% roztworem tego kwasu i rozpuszczano w 2% NaOH. Oznaczenia przeprowadzono metodą biuretową [5] oraz metodą Kjeldahla z końcowym kolorymetrowaniem odczytnu Nesslerera.

PRZYGOTOWANIE ZREDUKOWANEJ KOZYMAZY (DPNH)

DPNH otrzymano przez enzymatyczną redukcję kozymazy (DPN) za pomocą dehydrogenazy alkoholowej. Redukcję przeprowadzono w mieszaninie zawierającej 31,3 ml 0,1 M fosforanu dwusodowego, 2 ml alkoholu

lu etylowego 95%, 30 ml wody, 20 mg DPN o czystości 33%, oraz tyle dehydrogenazy alkoholowej, aby redukcja trwała ok. 30 min. Stopień redukcji kontrolowano spektrofotometrycznie, mierząc przyrost absorpcji przy 340 m μ . Po zakończeniu reakcji mieszaninę ogrzewano przez 5 min. na wrzącej łaźni wodnej i nastawiano pH na 6,5 za pomocą KH₂PO₄. Całość uzupełniano do objętości 100 ml. Roztwór ten określamy w tekście krótko jako DPNH.



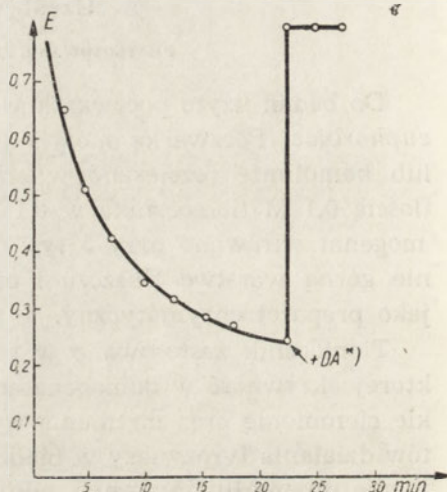
Rys. 1. Porównanie reakcji enzymatycznej i nieenzymatycznej

A — reakcja nieenzymatyczna

B — reakcja z zagotowanym enzymem

C — reakcja enzymatyczna

Warunki reakcji: 2,7 ml roztworu DPNH, 70 jednostek enzymu, całość uzupełniono do 3 ml buforem fosforanowym. Reakcję zapoczątkowano przez dodanie 0,15 ml, (0,45 μ M) roztworu *p*-chinonu



Rys. 2. Reakcja utleniania DPNH pod wpływem wyciągów enzymatycznych

Warunki reakcji w doświadczeniu podanym w reakcji C (rys. 1). Po prawie całkowitym wyczerpaniu DPNH nastawiono pH na 9 za pomocą NaOH, dodano 0,1 ml 95% etanolu i dehydrogenazę alkoholową

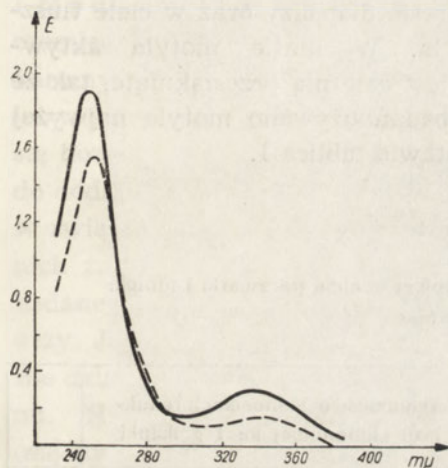
DPN otrzymano metodą Ohlmayera [9] z drożdży piwnych. Zawartość DPN w preparacie oznaczano spektrofotometrycznie po redukcji przez dehydrogenazę alkoholową. Dehydrogenazę alkoholową otrzymano z drożdży piekarskich metodą Rackera [11].

WYKAZANIE REDUKTAZY CHINONOWEJ

Przebadano szybkość utleniania zredukowanej kozymazy przez *p*-chinon pod wpływem wyciągów z poczwarki w okresie diapauzy. Aktywność enzymu mierzono w temperaturze 20° przy użyciu spektrofotometru Bekmana na podstawie spadku absorpcji przy 340 m μ .

Rysunek 1 przedstawia porównanie szybkości utleniania DPNH przez *p*-chinon enzymatycznie oraz dla kontroli w nieobecności enzymu.

Stężenie reduktazy chinonowej starano się utrzymać w zakresie, w którym istnieje proporcjonalność pomiędzy szybkością reakcji a ilością enzymu przy użytym stężeniu zredukowanej kozymazy.

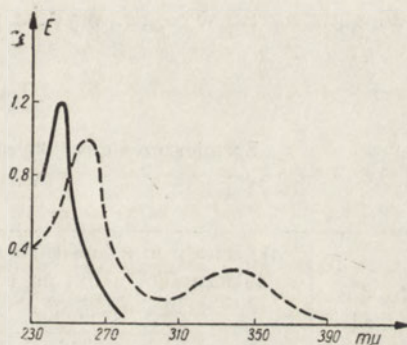


Rys. 3. Krzywe absorpcyjne ilustrujące równoległość znikania DPNH i *p*-chinonu.

Warunki reakcji jak w doświadczeniu podanym w reakcji C (rys. 1):

————— po upływie 0 min.
 - - - - - po upływie 5 min.

Krzywe uzyskane po odjęciu absorpcji samych wyciągów enzymatycznych



Rys. 4. Krzywe absorpcyjne *p*-chinonu i zredukowanej kozymazy

————— krzywa *p*-chinonu
 - - - - - krzywa DPNH

1,35 ml roztworu DPNH w obj. 3 ml.

0,075 ml (0,225 μ M) roztworu *p*-chinonu w obj. 3 ml

Należało wykazać, że znikanie widma zredukowanej kozymazy polega istotnie na utlenieniu DPNH, a nie np. na rozłożeniu go. W tym celu zredukowano powtórnie powstały DPN przez dodanie aktywnej dehydrogenazy alkoholowej. Na rys. 2 podano przebieg takiego doświadczenia. Powrót absorpcji do poziomu wyjściowego wskazuje, że spadek absorpcji przy 340 $m\mu$ jest wynikiem utlenienia zredukowanej kozymazy.

Z kolei pozostało wykazać, że znikające z DPNH atomy wodoru przenoszą się istotnie na *p*-chinon. Dowód tego widzimy na rysunku 3, który podaje absorpcje *p*-chinonu i DPNH, odczytywane równocześnie w czasie doświadczenia.

Przedstawione na rysunku 3 krzywe obrazują absorpcję na początku reakcji i po upływie 5 min. Przebieg krzywych wskazuje, że znikaniu

DPNH (maksimum absorpcji przy 340 m μ) towarzyszy równoczesne znikanie p-chinonu (maksimum absorpcji okoł. 245 m μ). Standardowe krzywe DPNH i p-chinonu podajemy dla orientacji na rysunku 4.

ROZMIESZCZENIE AKTYWNOŚCI REDUKTAZY CHINONOWEJ W CIELE POCZWARKI I DOROSŁEGO MOTYLA

Oznaczano aktywność reduktazy chinonowej w ciele tłuszczowym, mięśniach i hemolimfie poczwarki w okresie diapauzy oraz w ciele tłuszczowym i mięśniach dorosłego motyla. W limfie motyla aktywności nie oznaczano, gdyż ciało motyla jest całe nią przesiąknięte, tak że nie można jej oddzielnie uzyskać. Do badań używano motyle najwyżej w 24 godziny po wylęgu. Wyniki przedstawia tablica 1.

Tablica 1

Rozmieszczenie reduktazy chinonowej w ciele poczwarki i motyla
Celerio euphorbiae

Nr doświadczenia	Aktywność w jednostkach reduktazy chinonowej na 1 g białka wyciągu			Aktywność w jednostkach reduktazy chinonowej na 1 g tkanki			
	ciało tłuszczowe	mięśnie	hemolimfa	ciało tłuszczowe	mięśnie	hemolimfa	
1	12000	31000	0	1830	1390	0	poczwarka
2	15000	28000	0	2290	1260	0	
3	16000	26000	—	2450	1170	—	
1	60000	264000	—	8640	11880	—	motyl
2	51000	320000	—	7340	14400	—	
3	57000	308000	—	8210	13860	—	
	1	2	3	4	5	6	

W rubrykach 1 i 2 podana jest aktywność reduktazy chinonowej przeliczona na 1 g białka, przechodzącego do moderatora. Rubryki 4 i 5 przedstawiają aktywność, jaką zawiera 1 g wilgotnej masy ciała tłuszczowego i mięśni. Z danych przedstawionych w tablicy 1 widać, że aktywność reduktazy chinonowej posiada zarówno białko mięśni, jak i białko ciała tłuszczowego poczwarki i motyla. Aktywności tej nie posiada natomiast hemolimfa poczwarki. Aktywność reduktazy chinonowej w ciele tłuszczowym i mięśniach dorosłego motyla przewyższa kilkakrotnie odpowiednią aktywność u poczwarki w okresie diapauzy.

Dyskusja

Wykazanie obecności reduktazy chinonowej u owadów przemawia silnie za występowaniem oddychania chinonowego u tych zwierząt. Prawdopodobnie przyżyciowo nie *p*-chinon jest właściwym substratem tej reduktazy, lecz jakiś inny, nie zdefiniowany związek. Z pracy Hellera i Mochneckiej [4] nad ciałami redukującymi niecukrowymi u wilczomlecza wynika obecność znacznej ilości polifenoli dających odczyn barwny Folina i Ciocalteu. Nieogłoszone badania Hellera i Szarkowskiej wskazują na nieidentyczność tych ciał z tyrozyną. Spotyka się bowiem często miazgi o silnej aktywności tyrozinazowej w stosunku do dodanej tyrozyny, które samorzutnie nie czernieją, mimo że są bogate w związki dające odczyny tyrozyny. Można więc przypuszczać, że wśród nich znajduje się ciało, które w formie chinonowej stanowi substrat dla badanej obecnie reduktazy, zaś w formie fenolowej substrat dla fenoloksydazy. Już Wosilait i Nason [18] potrafili skojarzyć doświadczalnie działanie tych dwóch enzymów, używając jako substratu *o*-naftochinonu. Heller przypuszcza, że właściwego substratu należałoby szukać między produktami przemiany tlenowej tyrozyny. W przemianie tej występuje m. in. kwas homogentyzynowy stanowiący przejście od struktury orto — charakterystycznej dla działania tyrozinazy — do struktury para, swoistej dla naszej reduktazy. Hipoteza ta będzie przedmiotem następnych naszych badań.

Należy też mieć na względzie prace Martiusa i współpracowników nad udziałem witaminy K w przemianach oddechowych. Martius i Strufe [7] wyosobnili z mitochondriów wątroby świńskiej enzym, działający jako reduktaza filochinonowa. Podobny enzym otrzymali Wosilait i Nason [19] z *E. coli*, sądzą jednak, że jest to enzym odrębny, niż wcześniej przez nich opisana reduktaza *p*-chinonowa z grochu [17]. Zagadnienie specyficzności enzymu z owadów dla witaminy K będzie również przedmiotem dalszych badań.

Fakt występowania reduktazy chinonowej u motyli dojrzałych w znacznie większym stężeniu aniżeli u poczwarek pozwala zrozumieć wyniki L. Wojtczaka [15], że ani inhibitory oksydazy cytochromowej, ani inhibitory fenoloksydazy z osobna nie hamują oddychania owadów, działają natomiast łącznie. Widocznie system, dla którego oksydazą końcową jest tyrozinaza, istnieje także u motyla i w razie zahamowania oksydazy cytochromowej wstępuje na jej miejsce, podobnie jak u poczwarki w okresie diapauzy.

Streszczenie

Stwierdzono obecność reduktazy chinonowej u motyla *Celerio euphorbiae*. Aktywność enzymu znaleziono w ciele tłuszczowym i mięśniach tak u poczwarki w okresie diapauzy, jak i u dorosłego motyla. Nie posiada jej natomiast hemolimfa poczwarki. Aktywność reduktazy chinonowej w ciele tłuszczowym i mięśniach dorosłego motyla przewyższa kilkakrotnie odpowiednią aktywność w ciele poczwarki.

LITERATURA

- [1] Agrell I., *Acta Physiol. Scand.* **18**, 355, 1949; *Nature* **164**, 1039, 1949.
- [2] Dawson C. R., Tarpley W. B., *The Enzymes*, pod red. J. S. Sumnera i K. Myrbäcka, II. 1, str. 454, 1951, Academic Press, New York.
- [3a] Heller J., XVII Intern. Physiol. Congress, Oxford 1947, *Communications* 270.
- [3b] Heller J., *Acta Biol. Exper.* **14**, 229, 1947.
- [4] Heller J., Mochńska I., *Sprawozd. Wrocławskiego Tow. Naukowego* **6**, Dodatek 3, 1951.
- [5] Kingsley, *J. Lab. Clin. Med.* **27**, 840, 1942.
- [6] Krogh A., *Z. allg. Physiol.* **16**, 178, 1914.
- [7] Martius C., Strufe R., *Biochem. Z.* **326**, 24, 1954.
- [8] Mason H. S., Peterson E., 3-ème Congrès International de Biochimie, Bruxelles, 1955, *Communications* 107.
- [9] Ohlmayer P., *Biochem. Z.* **297**, 66, 1938.
- [10] Pryor M. G. M., Russel P. B., Todd A. R., *Biochem. J.* **40**, 627, 1946; *Nature* **159**, 399, 1947.
- [11] Racker E., *J. Biol. Chem.* **184**, 313, 1950.
- [12] Sussmann A. S., *Biol. Bull.* **102**, 39, 1952.
- [13] Williams C. M., *Bull. Biol. de France et de Belgique*, Sup. **33**, 52, 1946.
- [14] Wojtczak L., *Acta Physiol. Pol.* **5**, 593, 1954.
- [15] Wojtczak L., 3-ème Congrès International de Biochimie, Bruxelles 1955, *Communications* 112.
- [16] Wojtczak L., *Acta Biochim. Pol.* **3**, 197, 1956.
- [17] Wosilait W. D., Nason A., *J. Biol. Chem.* **206**, 255, 1954.
- [18] Wosilait W. D., Nason A., Terrel A. J., *J. Biol. Chem.* **206**, 271, 1954.
- [19] Wosilait W. D., Nason A., *J. Biol. Chem.* **208**, 785, 1954.

ПАРАХИНОНОВАЯ РЕДУКТАЗА У БАБОЧКИ БРАЖНИКА МОЛОЧАЙНОГО
CELERIO EUPHORBIAE L.

Резюме

Наличие парахиноновой редуктазы констатировано у бабочки бражника молочайного *Celerio euphorbiae*. Активность энзима найдена в жировом теле и мышцах как куколки в период диапаузы, так

и у взрослой бабочки; гемолимфа же куколки ею не обладает. Активность хиноновой редуктазы в жировом теле и мышцах взрослой бабочки в несколько раз превышает соответственную активность в теле куколки.

THE QUINONE REDUCTASE ACTIVITY IN HAWK-MOTH *CELERIO EUPHORBIAE* L.

S u m m a r y

The presence of quinone reductase has been proved in the hawk-moth *Celerio euphoriae* L. Enzymatic activity has been found in the fat body and in the muscles of the pupa (during diapause) as well as of the adult, the reductase activity in the latter form being several times higher than in the pupal one. Haemolymph, however, does not show any activity of this kind.

Otrzymano 28.6.1956 r.

T. CHOJNACKI

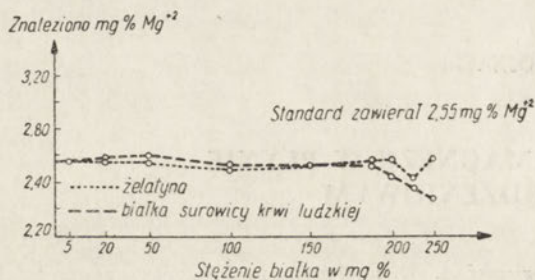
**POZIOM WAPNIA I MAGNEZU W PŁYNIE
MÓZGOWO-RDZENIOWYM***Z Zakładu Chemii Fizjologicznej A. M. w Warszawie*

Badania zawartości wapnia surowicy krwi w zależności od stężenia białka [5, 8] uzasadniają pogląd, że w płynie mózgowo-rdzeniowym zawierającym białko będzie wapnia więcej niż w płynach wolnych od białka. Zdawałoby się, że podobne rozumowanie można zastosować i do jonu magnezowego. Doświadczalne sprawdzenie tego przypuszczenia chciałem przeprowadzić badając zawartość Ca^{+2} i Mg^{+2} w płynach mózgowo-rdzeniowych o różnej zawartości białka.

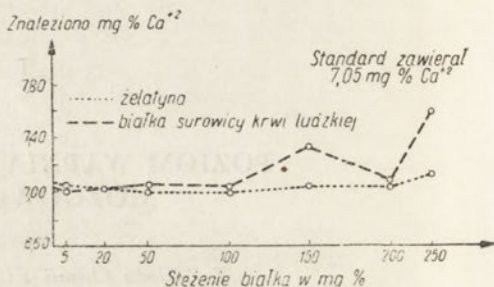
Dane z piśmiennictwa o zawartości wapnia i magnezu w płynie mózgowo-rdzeniowym są dosyć skąpe. Wartości podawane jako normalne różnią się między sobą szczególnie jeśli chodzi o zawartość magnezu. Różnice te prawdopodobnie zależą od wyboru metody. Merrit i Fremont-Smith [7] podają jako wartości normalne 3,01 — 3,55 mg^0/o Mg^{+2} (średnio 3,04 mg^0/o), i 5 mg^0/o Ca^{+2} . Według Flexnera [2] zawartość Mg^{+2} leży w granicach 3,04 — 3,67 mg^0/o , a zawartość Ca^{+2} 4,00—7,00 mg^0/o . Dane Stutzmana i Amatuzio [10] wynoszą: Mg^{+2} : $2,88 \pm 0,15$ mg^0/o ; Ca^{+2} : $4,86 \pm 0,1$ mg^0/o . Wartości oznaczone metodą wersenianową Buckleya i Bartolottiego wynoszą: Mg^{+2} : $3,01 \pm 0,06$ mg^0/o ; Ca^{+2} : $4,95 \pm 0,11$ mg^0/o według innych autorów [3].

Zawartości wapnia i magnezu oznaczałem metodą wersenianową opublikowaną przez Holaseka i Flaschkę dla odbiałczonej surowicy krwi [4]. Zasada metody polega na tworzeniu związków kompleksowych werseniu z jonami dwuwartościowymi metali. Pewnym uproszczeniem stosowanej metody było pominięcie odbiałczania w płynach normalnych lub zawierających niewiele białka. Badania kontrolne na płynach wzorcowych wykazały, że dodanie białka surowicy krwi ludzkiej lub żelatyny nie wpływa na wyniki, gdy ich stężenie nie przekracza 180 mg^0/o przy oznaczaniu magnezu, a 100 mg^0/o przy oznaczaniu wapnia (rys. 1, 2).

Na podstawie tych doświadczeń oznaczałem stężenie obu jonów bez odbiałczania, jeżeli zawartość białka nie przekraczała 100 mg⁰/₀. Płyny o większej zawartości białka odbiałczałem równą objętością 10⁰/₀ CCl₃COOH i odwirowywałem osad.



Rys. 1. Wpływ różnych stężeń białek na wyniki oznaczeń magnezu wersenem



Rys. 2. Wpływ różnych stężeń białek na wyniki oznaczeń wapnia wersenem

Wykonanie

Oznaczenie magnezu: Do 1 ml płynu mózgowo-rdzeniowego lub 2 ml odbiałczu w próbówce wirówkowej dodawano 1 ml 1⁰/₀ szczawianu amonu i amoniaku do żółtej barwy czerwieni metylowej. Po 4 — 6 godz. dolewano 4 ml wody podwójnie destylowanej i wirowano 10 min. z szybkością 1500 obr./min. W przejrzystym płynie oznaczano magnez, a osad zachowywano do oznaczenia wapnia. Do płynu dodawano 2 ml 3N amoniaku, 1 ml 1N kwasu solnego i 2 — 3 krople 0,5⁰/₀ alkoholowego roztworu czerni eriochromowej T. Miareczkowano roztworem 10⁻³M werseniu do zniknięcia barwy czerwono-fioletowej, a pojawienia się niebieskiej.

Obliczenie: Ilość ml werseniu 10⁻³M × 2,43 = mg⁰/₀ Mg²⁺.

Oznaczenie wapnia: Do odwirowanego osadu dolewano 1 ml 1N kwasu solnego i 4 ml wody podwójnie destylowanej. Po rozpuszczeniu się osadu dodawano 2 ml 3N amoniaku, 2 — 3 krople 0,5⁰/₀ roztworu czerni eriochromowej T, oraz 2 — 3 krople 2⁰/₀ roztworu wersenianu potasowo-magnezowego i miareczkowano jak wyżej.

Obliczenie: Ilość ml werseniu 10⁻³M × 4,00 = mg⁰/₀ Ca²⁺.

Wersenian potasowo-magnezowy otrzymano z kwasu wersenowego metodą Pfeifera i Offermana [9].

Zawartość białka oznaczałem metodą tanninową W. M e j b a u m K a t z e n e l l e n b o g e n [6].

Przy wielokrotnym oznaczaniu magnezu i wapnia w tym samym

płyńie średnia odchylenia z 10 oznaczeń wynosiła dla Ca⁺²: 0,69% wartości średniej, dla Mg⁺²: 1,2%.

Wyniki

Wykonano 83 badania płynów mózgowo-rdzeniowych u dzieci w wieku od 10 miesięcy do 6 lat. Z tego 70 płynów pobrano w różnych okresach gruźliczego zapalenia opon mózgowych. W 13 przypadkach płyny pobrano u dzieci wyleczonych po gruźliczym zapaleniu opon lub po przebytym podrażnieniu opon na innym tle. Wyniki badań podzielono na cztery grupy:

I grupa, 13 przypadków obejmuje płyny mózgowo-rdzeniowe dzieci wyleczonych o średniej zawartości białka 23 mg^{0/0} (10 — 34 mg^{0/0});

II grupa, 21 przypadków dzieci chorych o zawartości białka 23 — 50 mg^{0/0} (średnio 39 mg^{0/0});

III grupa, 24 przypadki dzieci chorych o zawartości białka 50 — 100 mg^{0/0} (średnio 76 mg^{0/0});

IV grupa, 25 przypadków dzieci chorych o zawartości białka powyżej 100 mg^{0/0} (średnio 163 mg^{0/0}).

Wyniki oznaczeń białka, wapnia i magnezu przypadków grupy I przedstawiono w tabelicy 1. W tabelicy 2 ujęto wartości średnie poziomów białka, wapnia i magnezu w grupach I — IV. Na podstawie danych przedstawiono graficznie na rysunku 3 zawartość Ca⁺² i Mg⁺² w grupach I — IV.

Wartości normalne poziomów jonów Ca⁺² i Mg⁺² w płynie mózgowo-rdzeniowym dzieci wyleczonych, zdrowych nie odbiegają znacznie od norm przyjętych dla dorosłych oznaczonych innymi metodami [2, 3, 7, 10]. Jak widać z tabelicy 2 i rysunku 3, istnieje zależność między poziomem białka a wapnia w płynie mózgowo-rdzeniowym. Przy wyższej zawartości białka również stężenie wapnia jest wyższe. Widać to wyraźnie na wykresach zawartości Ca⁺² (Rys. 3). Maxima funkcji ilości przypadków przesuwają się wraz ze wzrostem stężenia białka ku wyższym poziomom Ca⁺². Inaczej zachowuje się jon magnezu. Nie możemy dostrzec związku między poziomem tego jonu a zawartością białka. Częściej, jak wynika z podanych w tabelicy 2 wartości średnich, znajdujemy obniżony poziom Mg⁺² przy wyższej zawartości białka. Na rysunku 3 wykresy zawartości Mg⁺² w grupach II — IV przedstawiają krzywe o kilku maksimach położonych dość bezładnie. Można tu jedynie mówić o średnim obniżeniu zawartości magnezu we wszystkich grupach dzieci chorych w porównaniu do średniej zawartości u dzieci zdrowych przedstawionej jako wykres grupy I. Na uwagę zasługuje fakt, że przeciętna dla dzieci zdrowych (wyleczonych) dorównuje lub nawet przewyższa średnią wartość znaną dla surowicy krwi.

Tablica 1

Zawartość białka, wapnia i magnezu w płynach mózgowo-rdzeniowych dzieci gr. I (wartości w mg%)

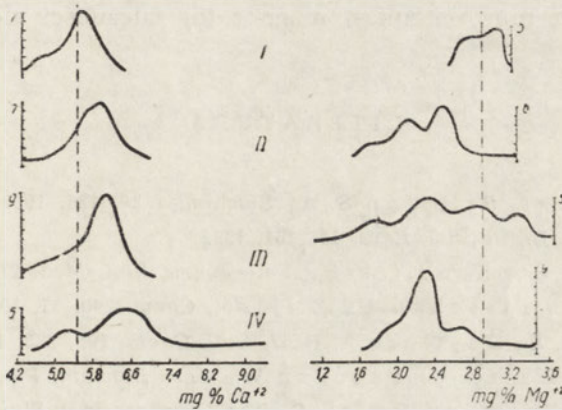
białko	Ca ⁺²	Mg ⁺²
31	5,45	2,81
24	5,78	3,06
34	5,17	3,02
28	4,89	2,98
28	5,20	2,78
32	5,40	2,80
22	5,55	2,77
23	5,58	3,16
16	5,05	2,74
23	6,40	3,05
15	5,65	3,14
10	5,50	2,68
16	4,89	2,82
średnio 23	5,42	2,91
śr. odch.:	± 0,40	± 0,18

Tablica 2

Średnia zawartość wapnia i magnezu w płynach mózgowo-rdzeniowych o różnej zawartości białka (wartości w mg%)

Grupa	białko	Ca ⁺²	Mg ⁺²
I	23	5,42	2,91
II	39	5,76	2,36
III	76	5,80	2,43
IV	163	6,25	2,33

Duża zawartość magnezu w tkance nerwowej mózgowia, rdzenia i nerwów [1] sugeruje możliwość przechodzenia jonów magnezu z tkanki nerwowej wprost do przestrzeni podpajęczynówkowej. Badania histologiczne stwierdzają obecność połączeń przestrzeni podpajęczynówkowej z przestrzeniami okołonaczyniowymi mózgowia i okołonerwowymi ner-



Rys. 3. Zawartość Ca⁺² i Mg⁺² w czterech grupach mózgowo-rdzeniowych przedstawionych w tabelicy 1

Rzymskie cyfry oznaczają grupy; linie przerywane średnią zawartość Ca⁺² i Mg⁺² w płynach gr. I; jedna podziałka osi rzędnych oznacza 1 przypadek

wów czaszkowych i rdzeniowych [11]. Można by więc pomyśleć, że ciecz pochodząca z przestrzeni okołonaczyniowych i okołonerwowych miesza się z płynem mózgowo-rdzeniowym wytwarzanym przez spłoty naczyniowe komórek. Gdybyśmy przyjęli ten pogląd, to poziom magnezu w płynie mózgowo-rdzeniowym byłby wyrazem udziału, jaki bierze tkanka mózgowa w wytwarzaniu tego płynu.

Prof. drowi Włodzimierzowi Mozołowskiemu dziękuję za dyskusję i życzliwe sugestie.

Streszczenie

Metoda oznaczania jonów metali przy pomocy wersenu nadaje się do oznaczania zawartości Ca⁺² i Mg⁺² w płynie mózgowo-rdzeniowym. Jeżeli poziom białka w płynie nie przekracza 100 mg^{0/0}, można do oznaczania wapnia i magnezu używać płynów nieodbielanych.

Zawartość wapnia i magnezu w płynie mózgowo-rdzeniowym dzieci zdrowych nie odbiega znacznie od norm przyjętych dla dorosłych, ozna-

czonych innymi lub podobnymi metodami. Średnie poziomy obliczone na podstawie 13 oznaczeń u dzieci wynoszą: Ca^{+2} : $5,42 \pm 0,40$; Mg^{+2} : $2,91 \pm 0,18$ mg⁰o.

Poziomy wapnia i magnezu w płynach o różnej zawartości białka zachowują się odmiennie; poziom wapnia jest zależny od stężenia białka i wzrasta wraz z nim, natomiast magnez tej zależności nie wykazuje.

LITERATURA

- [1] Dorfman S. I., Szpicyn S. A., *Biochimija* **20**, 136, 1955.
- [2] Flexner L. B., *Physiol. Revs.* **14**, 161, 1934.
- [3] Harris W., Sonnenblick E., *Yale Journ. Biol. Med.* **27**, 297, 1955.
- [4] Holasek A., Flaschka H., *Z. Physiol. Chem.* **290**, 57, 1952.
- [5] Mc Lean F. C., Hastings A. B., *J. Biol. Chem.* **108**, 285, 1935.
- [6] Mejbaum-Katzenellenbogen W., *Acta Biochim. Pol.* **3**, 279, 1955.
- [7] Merrit H., Fremont-Smith F., *The Cerebrospinal Fluid*, str. 12 Saunders Co., Philadelphia, 1937.
- [8] Niemiro R., *Acta Biochim. Pol.* **2**, 213, 1955.
- [9] Pfeiffer P., Offerman W., *Ber.* **75B**, 1, 1942.
- [10] Stutzman F. L., Amatusio D. S., *Arch. Biochem. Biophys.* **39**, 271, 1952.
- [11] Szamburow D. A., *Spinno-mozgowa żidkost*, str. 41, Medgiz, Moskwa 1954.

УРОВЕНЬ КАЛЬЦИЯ И МАГНИЯ В СПИННОМОЗГОВОЙ ЖИДКОСТИ

Резюме

Метод определения ионов металлов при помощи версена применим к определению содержания Ca^{+2} и Mg^{+2} в спинномозговой жидкости. Если уровень белка в жидкости не превышает 100 мг⁰o, можно для определения кальция и магния пользоваться жидкостью, не удаляя белка.

Содержание кальция и магния в спинномозговой жидкости здоровых детей не отклоняется значительным образом от принятых для взрослых, норм определяемых сходными или иными методами. Средние уровни, вычисленные на основании 13 определений, у детей равняются: Ca^{+2} : $5,42 \pm 0,40$; Mg^{+2} : $2,91 \pm 0,18$ мг⁰o.

Уровни кальция и магния в жидкостях с разным содержанием белка реагируют отличным друг от друга образом; уровень кальция зависит от концентрации белка и повышается вместе с ней, магний же такой зависимости не проявляет.

CALCIUM AND MAGNESIUM LEVELS IN THE CEREBRO-SPINAL FLUID

S u m m a r y

The method of determining metal ions by versene may be applied to the determination of Ca⁺² and Mg⁺² in cerebro-spinal fluid. If the protein level does not exceed 100 mg.0/0 fluids which have not been deproteinated, may be used for the determination of calcium and magnesium.

The calcium and magnesium content in the cerebro-spinal fluid of normal children does not differ much from the standards accepted for adults, determined by other or similar methods. Mean levels calculated on the basis of determinations in 13 children amount to: Ca⁺²: 5.42 ± ± 0.40; Mg⁺²: 2.91 ± 0.18 mg^{0/0}.

Calcium and magnesium levels differ in fluids with various protein contents: the calcium level depends on the protein concentration and increases with it, whereas the magnesium level shows no such dependence.

Otrzymano 28.6.1956 r.

THE EFFECT OF ...

The first ... the determination ... their level ... tented ... The control ... normal ... routes ... on the basis ... Custom ... controls ... excess with ...

J. W. SZARKOWSKI

BADANIA NAD ODDYCHANIEM KIEŁKÓW PSZENICY

Z Pracowni Biochemii Ewolucyjnej
Zakładu Biochemii PAN w Warszawie

Kierownik Pracowni: prof. dr Irena Mochnacka

Reifer, Rumieńska i Kączkowski [2] badali wpływ traktowania nasion żelazicyjankiem potasu na plon i zawartość alkaloidów w *Datura stramonium* L. Stwierdzili oni u roślin traktowanych wzrost alkaloidów w całej roślinie i w nasionach oraz przedłużenie okresu kwitnienia.

Nawiązując do tych ciekawych wyników zaplanowano podobne doświadczenia z nasionami zbóż. Łącznie z tym postanowiliśmy zbadać wpływ traktowania nasion żelazicyjankiem na oddychanie kielków. W braku odpowiednich danych w literaturze należało zacząć od oznaczenia normalnych wartości oddychania w zależności od wieku kielka. Badania te stanowią pierwszą część pracy.

Następnie przeprowadzono badania na kielkach wyrosłych z ziaren traktowanych żelazicyjankiem o różnym stężeniu. Doświadczenia te, stanowiące drugą część pracy, nie wykazały żadnego wpływu traktowania nasion żelazicyjankiem na oddychanie kielków.

Zajmując się oddychaniem myślimy dziś przede wszystkim o enzymach oddechowych. Według Jamesa [1] najważniejszą oksydazą końcową tkanki zarodkowej jest oksydaza cytochromowa. Czynność oksydazy cytochromowej w miarę rozwoju rośliny może zanikać lub być zastąpiona w różnych organach inną oksydazą końcową. Ciekawym i stosunkowo mało zbadanym jest udział oksydaz końcowych zawierających miedź w procesach życiowych roślin. W trzeciej części pracy przedstawiono wstępne badania nad wpływem tiomocznika jako inhibitora oksydaz miedziowych na wzrost i oddychanie części nadziemnej kielków pszenicy.

Część doświadczalna

Intensywność oddychania części nadziemnej kielków pszenicy lub całego kielkującego ziarna, badano metodą manometryczną Warburga. W przedziałach centralnych naczynek warburgowskich umieszczano 0,2 ml 10% wodorotlenku potasu. Wszystkie pomiary przeprowadzono w ciemności w temperaturze 30°. Badano pszenicę jarą (*Triticum vulgare*) Ostka chłopicka ze zbioru w roku 1955.

1. BADANIE INTENSYWNOSCI ODDYCHANIA CZĘŚCI NADZIEMNEJ KIELKÓW PSZENICY W ZALEŻNOŚCI OD WIEKU ROSLINY

Ziarna pszenicy moczoło w wodzie destylowanej w temperaturze pokojowej do ukazania się kielków, co trwało 48 godzin. Następnie wykładano je na podkład z waty i bibuły zwilżany wodą wodociągową. Hodowlę prowadzono w temperaturze pokojowej przy normalnym dostępie

T a b l i c a 1

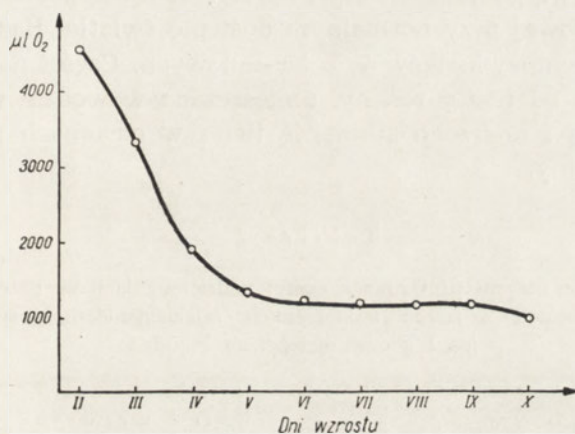
Oddychanie części nadziemnej kielków pszenicy w zależności od wieku kielków

Czas min.	Dzień wzrostu								
	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
0—30	1134	721	413	297	270	263	238	240	182
30—60	728	609	345	247	215	229	189	217	180
60—90	677	578	328	213	203	202	224	196	163
90—120	677	532	284	214	183	184	162	186	160
120—150	819	421	264	179	180	168	186	180	152
150—180	533	471	287	184	185	168	171	169	153
Suma po 3 godz.	4568	3332	1921	1334	1236	1214	1170	1188	990

Liczby wyrażają ilość $\mu\text{l O}_2$ w przeliczeniu na 1 g wagi świeżej. Wyniki są średnią z 3 doświadczeń.

światła. W odstępach jednodniowych, począwszy od drugiego dnia wzrostu aż do dziesiątego, części nadziemne kielków oddzielano od reszty rośliny i 0,2 do 0,3 g (dwa do kilku kielków) umieszczano w wodzie w naczynkach warburgowskich. Absorpcję tlenu mierzono w odstępach półgodzinnych przez trzy godziny. Wyniki przedstawiono w tabelicy 1 i na rysunku 1.

Z danych przedstawionych w tabelicy 1 i na rysunku 1 widać, że części nadziemne kielków pszenicy w pierwszych dniach wzrostu oddychają bardzo intensywnie. W drugim dniu wzrostu ilość zużywanego tlenu w ciągu trzech godzin w przeliczeniu na 1 g wagi świeżej sięga 4500 μl . W następnych dniach oddychanie maleje dość gwałtownie i około 5 dnia



rys. 1. Zależność oddychania od wieku kielków (Tabl. 1)

zaczyna ustalać się mniej więcej na jednakowym poziomie. Ilość zużywanego tlenu w 6, 7, 8 i 9 dniu wzrostu stanowi około 25% ilości tlenu zużywanego w drugim dniu.

Z tego faktu można wyciągnąć praktyczny wniosek, że do badań nad wpływem różnych czynników na oddychanie części nadziemnej kielków należy brać kielki w wieku powyżej 5 dni. W kolejnych seriach doświadczeń bardzo trudno jest utrzymać identyczne warunki temperatury, wilgotności, naświetlenia i inne wpływające na szybkość rozwoju kielka. Stąd w kolejnych doświadczeniach identyczny wiek w godzinach czy dniach nie musi być identyczny z wiekiem fizjologicznym. W okresie pierwszych dni rozwoju, kiedy zmiany w poziomie oddychania zachodzą szybko i na dużą skalę, już małe różnice w fizjologicznym wieku rozwojowym mogą wywołać duże różnice w „normalnym” zużyciu tlenu. Dlatego też wybór takiego okresu życia kielka, kiedy w ciągu szeregu dni zmiany w fizjologicznym poziomie oddychania są nieznaczne, pozwala w dużym stopniu wyeliminować błędy wynikające z wahań w warunkach wzrostowych w poszczególnych seriach doświadczeń.

2. WPŁYW TRAKTOWANIA ZIAREN NA ODDYCHANIE KIEŁKÓW I CAŁYCH KIEŁKUJĄCYCH ZIAREN

a) Kiełki. Ziarna pszenicy moczone do ukazania się kielków w roztworach żelazicyjanku potasu w temperaturze pokojowej. Ziarna kontrolne moczone w wodzie destylowanej. We wszystkich przypadkach czas moczenia wynosił 48 godzin. Stosowano roztwory żelazicyjanku 0,1; 0,3; 0,6 i 0,9%. Po ukazaniu się kielków ziarna wykładano na zwilżony wodą wodociągową podkład z waty i bibuły. Hodowlę prowadzono w temperaturze pokojowej przy normalnym dostępie światła. Badano oddychanie części nadziemnej kielków 7, 8 i 9-dniowych. Części nadziemne kielków oddzielano od reszty rośliny, umieszczano w wodzie w naczynkach warburgowskich i mierzono absorpcję tlenu w odstępach półgodzinnych przez trzy godziny.

Tablica 2

Średnie zużycie $\mu\text{l O}_2$ przez części nadziemne kielków pszenicy wyrosłych z ziaren traktowanych żelazicyjankiem potasu (na 1 g wagi świeżej na 3 godz.)

$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ w %	Dzień wzrostu		
	7	8	9
0 (kontrola)	1102	1020	925
0,1	1071	1100	1002
0,3	1049	1169	959
0,6	1055	1231	1105
0,9	976	1039	1120

Jak wynika z tablicy 2, traktowanie ziaren żelazicyjankiem w stężeniu od 0,1 — 0,9% nie wywarło wpływu na oddychanie wyrosłych z tych ziaren kielków i cały nasz materiał doświadczalny może służyć do rozpatrywania zależności oddychania od wieku kielka.

b) Całe ziarna kiełkujące. Wobec ujemnego wyniku badań nad wpływem żelazicyjanku na oddychanie wyrosłych kielków przeprowadzono badania nad oddychaniem całych kiełkujących ziaren.

Ziarna pszenicy traktowano sposobem opisanym powyżej, używając żelazicyjanku potasu w stężeniach: 0,01; 0,03; 0,06; 0,1; 0,3; 0,6; 0,9%. Ziarna kontrolne moczone w wodzie destylowanej. Po 48 godzinach kiełkujące ziarna umieszczano w naczynkach warburgowskich i mierzono absorpcję tlenu w odstępach półgodzinnych przez trzy godziny. Wyniki

T a b l i c a 3

Oddychanie kielkujących ziaren pszenicy traktowanych żelazicyjankiem potasu
 $\mu\text{l O}_2$ zużyte w przeliczeniu na 1 g suchej masy w ciągu 3 godzin.

Stężenie $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$	$\mu\text{l O}_2$ na 1 g suchej masy w ciągu 3 godzin				
	d o ś w i a d c z e n i e n r				
	1	2	3	4	5
0	439	421	434	444	424
0,01%	492	438	471	—	—
0,03%	514	456	446	—	—
0,06%	601	389	395	—	—
0,1%	441	450	436	377	495
0,3%	358	452	—	—	—
0,6%	319	423	—	—	—
0,9%	311	383	—	—	—

T a b l i c a 4

Oddychanie kielkujących ziaren pszenicy traktowanych żelazicyjankiem potasu
 $\mu\text{l O}_2$ zużyte w przeliczeniu na 10 mg całkowitego azotu ziarna w ciągu 3 godz.

$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ w %	$\mu\text{l O}_2$ na 10 mg N w ciągu 3 godzin		
	d o ś w i a d c z e n i e n r		
	1	2	3
0	145	142	161
0,1%	137	177	182
0,3%	131	106	147
0,6%	118	129	148
0,9%	108	117	142

w przeliczeniu na 1 g suchej wagi ziarna zestawiono w tablicy 3. W tablicy 4 podane są ilości zużytego tlenu przez kielkujące ziarna traktowane i kontrolne w przeliczeniu na 10 mg azotu całkowitego ziarna. Azot całkowity oznaczano metodą Kjeldahla po spaleniu ziaren, po doświadczeniu manometrycznym.

Z danych zawartych w tablicach 3 i 4 oddychanie kielkujących ziaren pszenicy traktowanych przez 48 godzin żelazicyjankiem potasu nie jest

zwiększone w porównaniu z oddychaniem ziaren kontrolnych. Wynosi średnio około 430 μl O_2 na 1 g suchej masy na trzy godziny względnie około 140 μl O_2 na 10 mg całkowitego azotu ziarna. Wyższe stężenia żelazicyjanku obniżają nawet intensywność oddychania.

3. WPLYW TIOMOCZNIKA

a) Wpływ na wzrost kiełków. Ziarna pszenicy moczono w wodzie destylowanej w temperaturze pokojowej do ukazania się kiełków (48 godzin). Następnie wykładano po cztery ziarna na gazę napiętą na naczynkach szklanych cylindrycznych o pojemności około 20 ml. Naczynka napełniano wodą destylowaną tak, żeby gazą była zwilżana. Po 4 dniach części nadziemne kiełków zmierzono, wodę w naczynkach zastą-

Tablica 5

Wpływ tiomocznika na wzrost części nadziemnej kiełków pszenicy

Nr naczynka	Stężenie tiomocznika	Wielkość części nadziemnej kiełków pszenicy w mm								Przyrost w ciągu 5 dni średnio mm
		w dniu podania działania tiomocznika		po 2 dniach		do 3 dniach		po 5 dniach		
		wielkości skrajne	średnia	wielkości skrajne	średnia	wielkości skrajne	średnia	wielkości skrajne	średnia	
1	0	22	26	65	74	98	107	123	136	110
		30		84		115		140		
2	0	25	29	68	76	102	107	128	138	109
		32		84		117		150		
3	0,1M	30	33	70	72	81	85	81	85	52
		37		74		88		88		
4	0,01M	32	36	78	88	105	116	120	130	94
		39		95		122		138		
5	0,001M	25	28	60	68	83	97	104	127	99
		30		79		116		153		

Czterodniowe kiełki pszenicy, wyrosłe na wodzie, hodowano przez 5 dni na roztworach tiomocznika. Rośliny kontrolne hodowano przez cały czas na wodzie. Temperatura pokojowa, oświetlenie normalne

T a b l i c a 6

Wpływ tiomocznika na oddychanie w ciemności części nadziemnej kielków pszenicy

Czas min.	Bez inhibitora μl O_2/lg	Tiomocznik					
		0,01 M		0,1 M		0,5 M	
		μl O_2/lg	hamowanie w stosunku do kontroli %	μl O_2/lg	hamowanie w stosunku do kontroli %	μl O_2/lg	hamowanie w stosunku do kontroli %
0—30	251	240	4,4	198	21,1	57	77,3
30—60	223	213	4,5	173	22,4	38	83,0
60—90	233	220	5,6	173	25,8	33	85,8
90—120	233	218	6,4	165	29,2	33	85,8
120—150	223	206	7,6	156	30,0	24	89,2
150—180	198	195	1,5	150	24,2	21	89,4

Tiomocznik w buforze fosforanowym 0,2 M o pH 7,0.

Wyniki są średnią z trzech doświadczeń.

piono roztworami tiomocznika o różnych stężeniach. Część naczynek napełniono ponownie wodą — te rośliny służyły jako kontrola. Korzonki roślin były całkowicie zanurzone w płynach. Hodowlę prowadzono w temperaturze pokojowej, przy normalnym dostępie światła. Po 2,3 i 5 dniach mierzono części nadziemne kielków. Wyniki podaje tablica 5.

Wpływ tiomocznika na wzrost kielków jest na podstawie wyników podanych w tablicy 5 całkiem wyraźny. Wpływ 0,001 M roztworu zaznacza się słabo, daje się stwierdzić przy porównaniu całego przyrostu w ciągu 5 dni. Natomiast roztwór 0,01 M hamuje wzrost między 3 a 5 dniem o połowę, zaś w stężeniu 0,1 M wzrost między 2 a 3 dniem spada poniżej połowy, a między 3 a 5 dniem ustaje zupełnie.

b) Wpływ na oddychanie. Mierzono oddychanie 5-dniowych kielków w temperaturze 30° w ciemności. 0,2 — 0,3 g pokrajanych poprzecznie kielków umieszczano w naczynku warburgowskim w 0,2 M buforze fosforanowym o pH 7,0 z dodatkiem tiomocznika o stężeniu 0,01; 0,1 względnie 0,5 M. W doświadczeniach kontrolne pokrojone kielki umieszczano w buforze fosforanowym bez tiomocznika. Przeprowadzono trzy serie doświadczeń, które dały wyniki jakościowo zupełnie zgodne, jakkolwiek bezwzględne wartości wykazują w poszczególnych seriach duży rozrzut. Wyniki podano w tablicy 6.

Widać, że tiomocznik w stężeniu 0,01 M hamuje oddychanie kielków w około 5%, w stężeniu 0,1 M około 25%. Spadek oddychania zależy od wpływu czasu doświadczenia, idzie przy obu tych stężeniach mniej więcej równolegle do kielków kontrolnych. Natomiast stężenia 0,5 M, które już w pierwszych 30 minutach daje zahamowanie 77%, powoduje znacznie szybszy spadek oddychania w czasie. Jednak wobec wysokiego stężenia molarnego inhibitora trudno uważać wpływ ten za swoisty.

Streszczenie

1. Zużycie tlenu przez części nadziemne kielków pszenicy wynosi w drugim dniu wzrostu około 4500 μ l na 3 godziny na 1 g wagi świeżej. W ciągu 3,4 i 5 dnia spada stopniowo na około 1200 μ l i utrzymuje się na tym poziomie do 9 dnia włącznie.

2. Moczenie ziaren pszenicy w roztworach żelazicyjanku potasu od 0,01 do 0,9% nie wpływa na oddychanie kielków ani kielkujących ziaren.

3. Tiomocznik w stężeniach 0,001 ; 0,01 i 0,1 M hamuje wzrost części nadziemnej kielków pszenicy odpowiednio do stężenia.

4. Tiomocznik w stężeniach 0,01; 0,1 i 0,5 M hamuje oddychanie części nadziemnej 5-dniowych kielków pszenicy odpowiednio w 5, 25 i 80%.

LITERATURA

[1] James W. O., *Biol. Rev.* 28, 245, 1953.

[2] Reifer I., Rumińska A., Kączkowski J., *Acta Biochim. Pol.* 2, 315, 1955.

ИССЛЕДОВАНИЕ ДЫХАНИЯ РОСТКОВ ПШЕНИЦЫ

Резюме

1. Использование кислорода надземными частями пшеничных ростков равно на второй день роста около 4500 μ л в течение трех часов на 1 г свежего веса. В продолжение трех, четырех и пяти дней оно постепенно падает до 1200 μ л и на этом уровне удерживается до девятого дня включительно.

2. Мочка зерен пшеницы в растворах железосинеродистого калия от 0,01 до 0,9% не влияет на дыхание ростков прорастающих зерен.

3. Тиомочевина в концентрациях 0,001, 0,01, 0,1 M тормозит рост надземной части пшеничных ростков, соответственно концентрации.

4. Тиомочевина в концентрации 0,01, 0,1 и 0,5 M тормозит дыхание надземных частей пятидневных ростков соответственно в 5%, 25% и 80%.

INVESTIGATIONS ON RESPIRATIONS OF WHEAT SEEDLINGS

S u m m a r y

1. Oxygen consumption of the surface portions of wheat seedlings during the 2nd day of growth amounts to 4500 $\mu\text{l/gm}$. fresh weight in 3 hours. During the 3rd, 4th and 5th days, it gradually drops to 1200 μl , and remains at this level to the 9th day.

2. When the wheat grains were soaked in 0.01 — 0.9% potassium ferricyanide, no difference was observed in the respiration of the seedling or the germinating grain.

3. Thiourea in 0.001; 0.01; 0.1 M concentrations inhibits the growth of the wheat seedlings to a degree corresponding to the concentration.

4. Thiourea in 0.01; 0.1; 0.5 M concentrations inhibits the respiration of 5-day old wheat seedlings to the extent of 5, 25 and 80%, respectively.

Otrzymano 28.6.1956 r.

I. MOCHNACKA i P. SZAFRAŃSKI

AKTYWNOŚĆ TRANSKETOLAZY W TKANCE NERWOWEJ GOŁĘBI Z AWITAMINOZĄ B₁

Z Pracowni Biochemii Ewolucyjnej Zakładu Biochemii PAN, Warszawa

Kierownik Pracowni: prof. dr I. Mochnacka

Odkrycie cyklu pentozowego glikozy jako nowej ważnej drogi metabolicznej cukrów kieruje naszą uwagę przede wszystkim na centralny układ nerwowy, którego metabolizm w tak znacznym stopniu jest metabolizmem cukrowym. Poznanie ilościowego udziału cyklu pentozowego i glikolizy w przemianie różnych części mózgu mogłoby posiadać duże znaczenie dla fizjologii i farmakologii centralnego układu nerwowego. Mogłoby się wprawdzie zdawać, że obie drogi mają zbyt wiele punktów styecznych (heksokinaza, związki pośrednie itp), by rozważać możliwość wybiórczego zahamowania jednej z nich. Doświadczenie wykazało jednak nieraz, że nasze schematy i uogólnienia często zawodzą w konfrontacji ze stanem faktycznym.

Awitaminoza B₁ powinna odbić się hamująco nie tylko na glikolizie przedłużonej o cykl Krebsa, ale i na cyklu pentozowym. Brak dwufosfotiaminy hamuje bowiem nie tylko tlenową dekarboksylację kwasu pirogronowego, ale również czynność transketolazy. Mimo pozornej oczywistości tego założenia postanowiliśmy zbadać doświadczalnie, jak się przedstawia cykl pentozowy w mózgu gołębia w stanie awitaminozy B₁. W tym celu badaliśmy reakcję katalizowaną przez transketolazę:

Rybozo-5-fosforan + rybulozo-5-fosforan \rightleftharpoons sedoheptulozo-7-fosforan +
aldehyd-3-fosfoglicerynowy.

Gołębie trzymano na diecie pozbawionej witaminy B₁ według P e t e r s a i współpr. [5]. Dieta ta składa się z nieograniczonej ilości autoklawowanego przez 6 godzin ryżu, soli kuchennej i tranu. Po 7 do 10 dniach takiej diety gołębie przestają jeść i trzeba je sztucznie karmić. W 2 do

3 tygodni występują typowe objawy awitaminozy, to jest opisthotonus, zaburzenia równowagi i porażenia¹.

Po 24 godz. od rozwinięcia się ostrych objawów awitaminozy gołębie zabijano przez dekapitację w narkozie. Wypreparowane mózgi i rdzenie kręgowo zamrażano i przerabiano zaraz lub przechowywano w -18° . Jako kontroli używano mózgow i rdzeni gołębi zdrowych, karmionych ryżem, grochem i pszenicą.

Z zamrożonych mózgow i rdzeni kręgowych robiono proszki acetonowe w sposób podany dla *Mycobacterium* w poprzednich pracach [2, 9]. Z 5 g mózgu otrzymuje się od 0,75 do 0,8 g suchego proszku acetonowego, zaś z 5 rdzenia około 0,6 g. Ogółem użyto do doświadczeń 13 gołębi chorych i 9 zdrowych.

Z proszków acetonowych robiono częściowo oczyszczone preparaty enzymatyczne. Preparatykę tę robiono w niskiej temperaturze, nie przekraczającej 3° . 200 mg proszku acetonowego rozcierano w moździerzku bakteryjnym z 8 ml 0,2 M roztworu moderatora weronalowego o pH 7,6. Po 20 minutach ekstrakcji roztwór, po odwirowaniu nierozpuszczonych części, zawierał około 60 mg białka. Białko wysalano stałym siarczanem amonowym do nasycenia 0,75. Alkalizowano do pH 7,6 — 2 N KOH i po 15 minutach sączono. Osad na bibule przemywano 1 ml roztworu siarczanu amonowego o 0,75 nasycenia. Zebrany z sączka osad rozpuszczano w 4 ml wody destylowanej i dializowano przez 2 godz. do bieżącej wody o temp. 10° . Po dializie i doprowadzeniu 0,1 N KOH do pH 7,6 odwirowywano części nierozpuszczone. Otrzymywano około 5 ml roztworów, które zawierały mniej więcej po 25 mg białka z mózgu lub 10,5 mg z rdzenia. Białko oznaczano metodą biuretową [4]. Tak otrzymane preparaty enzymatyczne w temp. -15° nie tracą swej aktywności transketolazowej co najmniej przez 2 miesiące.

W doświadczeniach badano szybkość znikania estru rybozo-5-fosforowego (R-5-P) przy pH 7,6, jak również powstawanie sedoheptulozy. R-5-P otrzymano z kwasu inozynowego, jak podano w poprzedniej pracy [9].

Na rys. 1 podano skład i wyniki jednego z typowych doświadczeń zużywania R-5-P. Z mieszaniny inkubowanej pobierano w czasie: 0, 10, 25, 50 i 90 minut po 0,4 ml i odbiańczano 10% kwasem trójchlorooctowym. Po odwirowaniu osadu oznaczano rybozę metodą orcyńolową [7].

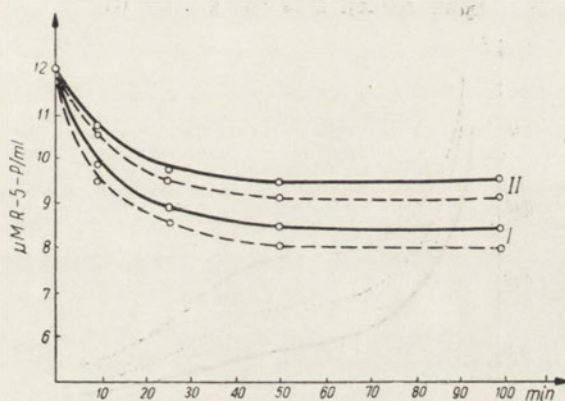
Jak widać na rys. 1, zarówno preparat enzymatyczny z mózgu (I), jak i rdzenia (II) gołębi z awitaminozą B_1 (linia przerywana) metabolizują dodany R-5-P. Szybkość przemiany jest nawet nieco większa niż w prepara-

¹ Asystentce mgr Czesławie Miczko dziękujemy za pomoc w tej fazie przygotowania materiału.

tach ze zwierząt zdrowych i równowaga ustala się przy większym zużyciu fosforybozy. I tak dla preparatów z mózgu przy zużyciu 35⁰/₀ R-5-P u chorych w porównaniu z 31⁰/₀ u zdrowych. Dla preparatów z rdzenia równowaga przesunięta jest również bardziej na prawo, przy awitaminozie — 25⁰/₀ wobec 22⁰/₀ u zdrowych.

W próbkach mieszanin inkubowanych 0 i 60 minut przeprowadzano cysteinową reakcję D i s c h e g o CyRI [1]. Typowe krzywe spektroskopowe tych odczynów (rys. 2 i 3) wykazały, że produktem przemiany R-5-P

Rys. 1. Zużycie estru rybozo-5-fosforowego przez preparaty z mózgow i rdzeni gołębi zdrowych i z awitaminozą B₁



Skład: 0,03 M R-5-P 1,6 ml; 0,01 M MgCl₂ 0,2 ml; 0,2 M bufor weronalowy pH 7,6, 0,6 ml; roztwór enzymu z mózgu (I) 1,6 ml zawierający 8 mg białka, lub z rdzenia (II) zawierający 3,4 mg białka. Temp. 37°.

————— gołąb zdrowy (kontrola)

- - - - - gołąb z awitaminozą B₁

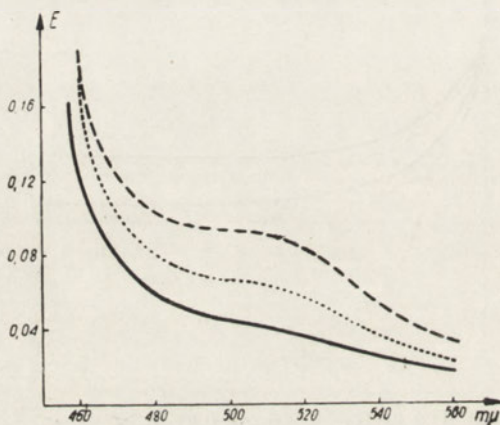
pod wpływem preparatów enzymatycznych z tkanek nerwowych gołębi chorych (linia przerywana) jest, tak jak i w przypadku gołębi zdrowych (linia kropkowana), sedoheptuloza — maksimum absorpcji przy około 520 mμ. Z preparatami mózgowymi wykazano nawet większe nagromadzenie się sedoheptulozy przy awitaminozie, co może wskazywać na zwiększoną aktywność transketolazy.

Wyniki naszych doświadczeń świadczą niewątpliwie, że transketolaza w mózgu gołębia zachowuje w pełni swą aktywność podczas typowego obrazu awitaminozy B₁. Nieoczekiwany ten fakt można by tłumaczyć dwojako:

1. Transketolaza mózgowa nie wymaga do swego działania obecności tiaminy (dwufosfotiaminy), w odróżnieniu od transketolazy ze szpinaku i wątroby [3] i z *Mycobacterium* [9]. Hipotezę tę można by sprawdzić przez oznaczanie tiaminy w odnośnych preparatach enzymatycznych. Na razie pominęliśmy ją jako mniej prawdopodobną.

2. Transketolaza mózgowa w awitaminozie B₁ rozporządza potrzebną ilością koenzymu. W tym przypadku należałoby rozważyć dwie możliwości:

Rys. 2. Powstawanie sedoheptulozy z R-5-P pod wpływem preparatów enzymatycznych z mózgow gołębi zdrowych i z awitaminozą B₁ (Krzywe spektroskopowe reakcji Dische go Cy RI)



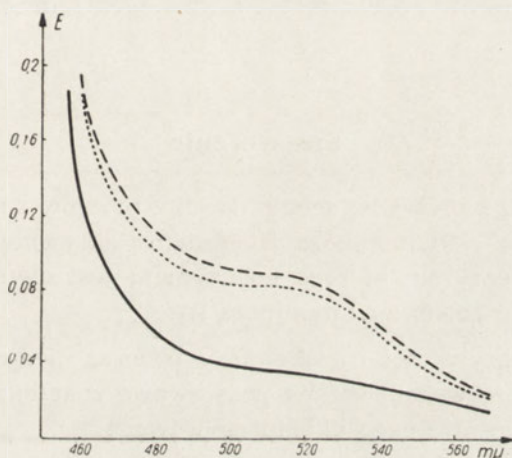
Skład: 0,03 M R-5-P 0,45 ml; 0,01 M MgCl₂ 0,05 ml; 0,2 M bufor wernonalowy o pH 7,6, 0,15 ml; roztwór enzymu: 0,35 ml = 1,5 mg białka. Temp. 37°.

———— Inkubacja 0 min. — gołębie zdrowe i chore
 inkubacja 60 min. — gołębie zdrowe
 - - - - - inkubacja 60 min. — gołębie z awitaminozą B₁

- Tkanka centralnego układu nerwowego zachowuje mimo awitaminozy całego ustroju potrzebne stężenie dwufosfotiaminy.
- Poziom dwufosfotiaminy spada w centralnym układzie nerwowym podobnie jak w całym organizmie, lecz transketolaza jest tak silnie związana z koenzymem, że go nie traci w tych warunkach.

Wyniki szkoły Westenbrincka przemawiają przeciw hipotezie 2a. W mózgu gołębi [6], u których awitaminozę wywołano przez podawanie pirytyaminy, stwierdzono spadek średniej zawartości dwufosfotiaminy z 2,61 na 0,78 μg na g świeżej tkanki mózgowej. Odpowiada to 70% ubytkowi; analogiczny ubytek dla wątroby wynosi 69,2%, mięśnia sercowego

Rys. 3. Powstawanie sedoheptulozy z R-5-P pod wpływem preparatów enzymatycznych z rdzeni kręgowych gołębi zdrowych i z awitaminozą B₁ (Krzywe spektroskopowe reakcji Discha-Cy RI)



Skład: 0,03 M R-5-P 0,45 ml; 0,01 M MgCl₂ 0,05 ml; 0,2 M bufor wewronalowy o pH 7,6, 0,15 ml; roztwór enzymu 0,35 ml = 0,63 mg białka. Temp. 37°.

———— Inkubacja 0 min. — gołębie zdrowe i chore
 inkubacja 60 min. — gołębie zdrowe
 - - - - - inkubacja 60 min. — gołębie z awitaminozą B₁

78%, mięśnia piersiowego 59,3%, a dla nerki 52,3%. Nie można więc mówić o specjalnym zatrzymaniu tiaminy przez mózg jako całość. Pozostaje przypuszczenie, że sama transketolaza mózgowa silniej wiąże dwufosfotiaminę w stosunku do innych apoenzymów tego koenzymu.

Za takim tłumaczeniem przemawiałaby obserwacja Monfoorta [8], że w mięśniu piersiowym i sercu gołębia z awitaminozą B₁ dekarboksylaza α -ketoglutarowa traci znacznie mniej na aktywności niż dekarboksylaza pirogronowa. Fakt ten najprościej wytłumaczyć można przez przyjęcie, że dekarboksylaza ketoglutarowa silniej jest związana z koenzymem niż pirogronowa. Przyjęliśmy więc to przypuszczenie za hipotezę roboczą. Wstępne nasze próby wykazały, że nie udaje się oddzielić odwracalnie dwufosfotiaminy od transketolazy mózgowej w takich warunkach, w jakich przeprowadzaliśmy to na transketolazie z *Mycobacterium* [9]. Dotychczasowe próby dawały nieodwracalną inaktywację enzymu.

Zachowanie aktywności transketolazy w mózgu i rdzeniu podczas niedostatku w ustroju jej koenzymu zdaje się wskazywać na podstawowe znaczenie cyklu pentozowego dla metabolizmu centralnego układu nerwowego.

Streszczenie

W preparatach z proszków acetonowych z mózgów i rdzeni kręgowych gołębi zdrowych i z awitaminozą B₁ badano aktywność transketolazy. Aktywność tego enzymu, którego koenzymem jest dwufosfotiamina, nie jest zmniejszona u gołębi z awitaminozą B₁.

Zachowanie aktywności transketolazy podczas niedostatku w ustroju jej koenzymu może wskazywać na podstawowe znaczenie cyklu pentozowego glikozy dla centralnego układu nerwowego.

LITERATURA

- [1] Dische Z., Shettles L. B., Osnos M., *Arch. Biochem.* **22**, 169, 1949.
- [2] Heller J., Szafranski P., *Bull. Acad. Polon. Sci. Cl. II.* **3**, 291, 1955; *Acta Biochim. Pol.* **2**, 435, 1955.
- [3] Horecker B. I., Smyrniotis P. Z., Klenow H., *J. Biol. Chem.* **205**, 661, 1953.
- [4] Kingsley C. R., *J. Lab. Clin. Med.* **27**, 840, 1942.
- [5] Kinnersley H. W., Peters R. A., Reader V., *Biochem. J.* **22**, 276, 1928.
- [6] Koedam J. C., Steyn-Parvé E. P., van Rheenen D. L., *Biochim. Biophys. Acta* **19**, 181, 1956.
- [7] Mejbaum W., *Z. physiol. Chem.* **258**, 117, 1939.
- [8] Monfoort C. H., *Biochim. Biophys. Acta* **16**, 219, 1955.
- [9] Szafranski P., *Acta Biochim. Pol.* **3**, 423, 1956.

АКТИВНОСТЬ ТРАНСКЕТОЛАЗЫ В НЕРВНОЙ ТКАНИ ГОЛУБЯ
СТРАДАЮЩЕГО АВИТАМИНОЗОМ В₁

Резюме

Активность транскетолазы исследовалась в препаратах из ацетоновых порошков из спинных и головных мозгов как здоровых, так и страдающих авитаминозом В₁ голубей. Активность этого фермента, коэнзимом которого является дифосфотиамин, не уменьшается у голубей, страдающих авитаминозом В₁.

Сохранение активности транскетолазы при недостатке ее коэнзима может указывать на основное значение пентозного цикла глюкозы для центральной нервной системы.

TRANSKETOLASE ACTIVITY IN THE NERVE TISSUE OF PIGEONS SUFFERING FROM
VITAMIN B₁ DEFICIENCY

Summary

The activity of transketolase has been investigated in preparations of acetone powder from the brain and spinal cord of normal pigeons, and of pigeons suffering from vitamin B₁ deficiency. The activity of this enzyme, the coenzyme of which is diphosphothiamine, revealed no decrease in pigeons suffering from vitamin B₁ deficiency.

The unimpaired transketolase activity, in spite of the deficiency of coenzyme, may indicate the importance of pentose cycle of glucose to the central nervous system.

Otrzymano 31.7.1956 r.

M. PIECHOWSKA

**PIROFOSFORANY PODCZAS KOPULACJI U MOTYLA
WILCZOMLECZKA**

Z Pracowni Biochemii Ewolucyjnej Zakładu Biochemii PAN w Warszawie
Kierownik Pracowni: prof. dr Irena Mochnacka

Heller i współpracownicy [5, 8] wykazali, że samce motyla wilczomlecza (*Celerio euphorbiae*) zawierają znaczne ilości fosforu odszczepiającego się podczas 7-minutowej hydrolizy w 1N HCl w 100°. U samic zaś ta frakcja fosforowa znajduje się w ilości 10-krotnie mniejszej. Dalsze badania (Heller, Karpiak i Zubikowa [6, 7]) wykazały, że około 80% tej frakcji u samca stanowi pirofosforan, którego u samic metodami chemicznymi nie udało się wykazać. Pirofosforan lokalizuje się głównie w części białej przewodu wytryskowego (*ductus ejaculatorius*). Było to pierwsze w literaturze stwierdzenie występowania znaczniejszych ilości pirofosforanów w świecie zwierzęcym. W tym samym czasie Niemierko i współpracownicy [10] znaleźli u molika woskowego (*Galleria mellonella*) duże ilości metafosforanu w przewodzie pokarmowym i odnodach. Oba te fakty, które do dzisiaj pozostały odosobnione, były wielokrotnie dyskutowane, lecz nie znalazły dotychczas biologicznego wytłumaczenia. W dyskusjach na plan pierwszy wysuwało się zagadnienie, czy wielofosforany te należy uważać za produkt odpadkowy, czy też stanowią one wysokoenergetyczny składnik ustroju o określonych funkcjach. Stąd wysunęło się zagadnienie, jaki jest dalszy los pirofosforanów z przewodu wytryskowego, zwłaszcza w okresie kopulacji.

Część doświadczalna

MATERIAL I METODY

Motyle pochodziły z własnej hodowli. Poczwaraki przed wylęgiem odosobniano, motyle trzymano bądź oddzielnie jako egzemplarze kontrolne, bądź też łączono w parki i obserwowano aż do składania jaj przez samicę.

Wtedy zabijano je przez uspienie eterem i preparowano lub oznaczano frakcje fosforowe w całych motylach. Motyle kontrolne analizowano w ciągu pierwszego lub drugiego dnia po wylęgu.

Motyle kontrolne. U samców łatwo oddzielić przewód wytryskowy od obfitego ciała tłuszczowego. Występował on w postaci jednolitej grubej nici zwiniętej w kłębek. Można w nim wyróżnić odcinek szary i biały. U motyli zaschniętych ciało tłuszczowe tworzy łącznie z przewodem wytryskowym dużą zbitą grudkę, w której można wykazać taką samą zawartość pirofosforanu, jak w przewodzie świeżym. U samic odwłok zawierał obok bardzo obfitego ciała tłuszczowego dużą ilość niezapłodnionych jajeczek.

Torebka kopulacyjna (*bursa copulatrix*), która służy jako zbiornik dla nasienia, przed kopulacją ma wygląd pomarszczonego i pustego balonika.

Motyle po kopulacji. Motyle po kopulacji zabijano dopiero po złożeniu jaj przez samicę. Żyły więc o kilka dni (2—4) dłużej niż kontrolne. U samców znajdowano ciało tłuszczowe w skąpej ilości. Przewód wytryskowy miał postać wyschniętej, cienkiej, pokurczonej nici, odcinek biały nie dawał się odróżnić.

U owadów wyschniętych tworzył on z ciałem tłuszczowym niewielką grudkę w dolnej części odwłoka. U samicy ciało tłuszczowe i po kopulacji było przeważnie obfite. Torebka kopulacyjna była wypełniona białą masą o dość twardej konsystencji. Rozmiary jej bywały różne, u niektórych samic osiągała wielkość ziarna pszenicy, u innych była mniejsza. W każdym odwłoku znajdowała się mniejsza lub większa ilość niezłożonych jajeczek.

Metody. Całe motyle wyciągano 4% CCl_3COOH , w stosunku 1 : 50. W wyciągu oznaczano metodą Fiskego i Subbarowa [2]: 1) ortofosforan (P_0); 2) ortofosforan po 7 minutowej hydrolizie w 1 N HCl w 100° (P_7); 3) fosfor całkowity (rozpuszczalny w kwasie) po spaleniu w kwasie siarkowym z dodatkiem kwasu azotowego (P_c). Natężenie barwy odczytywano w fotometrze stopniowym Pulfricha przy filtrze S 66. Z różnic wyników 2—1 obliczano ΔP_7 , z 3—2 fosfor estrowy P_E . Wyniki przeliczano na początkową wagę motyla, wyliczoną z początkowej wagi poczwerek za pomocą współczynników podanych przez Hellera [4].

Równocześnie z analizą frakcji fosforowych robiono w wyciągach trójchlorooctowych z całych motyli lub wypreparowanych części płciowych i osobno z reszty ciała oznaczenia chromatograficzne.

W niektórych doświadczeniach sporządzano specjalne wyciągi do chromatografii używając bądź większych, bądź mniejszych ilości 4% kwasu trójchlorooctowego. Na bibule Whatmann Nr 1 nakraplano wyciągi w ilości 10—15 μl oraz 5 μl 1% standardów. Chromatogramy rozwijano około

18 godzin w temp. 22—25° w środowisku kwaśnym, używając roztworów podanych przez E b e l a [1] (izopropanol 75 ml, woda 25 ml, kw. trójchloroocetowy 5 g, amoniak stężony 0,3 ml).

Stosowano technikę wstępującą jednokierunkową. Chromatogramy wywoływano mieszaniną 4% molibdenianu amonu, 1 N HCl i 60% HClO₄ i ogrzewano 7 minut w 85° według H a n e s a i I s h e r w o o d a [3].

Ze względu na ich kruchość impregnowano gotowe chromatogramy w parafinie.

Wyniki

W tabelicy 1 podane są wyniki analiz frakcji fosforowych u całych motyli samców kontrolnych (przed kopulacją).

Tablica 1

Frakcje fosforowe u samców przed kopulacją w mg % wagi ciała

Nr owada	P _o	P ₇	P _c	ΔP ₇	P _E
7169	184	300	366	116	66
7160	175	270	291	95	21
7154	157	292	323	135	31
7146	161	212	262	51	50
7152	164	284	323	120	39
7271	161	236	312	75	76
7208	180	234	273	54	39
7178	151	209	257	58	48
7229	166	228	257	62	29
7331	134	191	252	57	61
7338	248	282	303	34	21
7416	220	292	318	72	26
7499	236	298	325	62	27
Średnia	179,7	256,0	297,0	76,3	41,0

Tablica 2 przedstawia analogiczne wartości dla samic kontrolnych. Wartości ΔP₇ u samic odpowiadają zawartości kwasu adenylozynotrójfosforowego (ATP) i adenylozynodwufosforowego (ADP) [5, 8]. Występujące w tabelicy wartości zerowe dla ΔP₇ nie odpowiadają prawdopodobnie rzeczywistości, są one wynikiem trudności w uchwyceniu drobnych różnic pomiędzy P_o a P₇ w rozcieńczonych roztworach.

Tablica 2

Fracje fosforowe u samic przed kopulacją w mg% wagi ciała

Nr owada	P _o	P ₇	P _c	ΔP ₇	P _F
7221	64	64	111	0	47
7188	81	87	127	6	40
7156	74	85	113	11	28
7161	59	76	119	17	43
7223	59	72	117	13	45
7233	64	77	113	13	36
7380	75	91	128	16	37
7347	79	81	131	2	50
7358	65	76	114	11	38
7407	60	75	112	15	37
7336	62	73	115	11	42
7388	70	79	122	9	43
7500	105	105	160	0	55
7659	113	121	193	8	72
7593	96	96	140	0	44
Średnia	75,0	83,8	127,6	8,8	43,8

Tablica 3

Fracje fosforowe u samców po kopulacji w mg% wagi ciała

Nr owada	P _o	P ₇	P _c	ΔP ₇	P _E
7143	136	136	164	0	28
7164	114	114	166	0	52
7265	95	118	159	23	41
7239	130	139	182	9	43
7260	148	166	199	18	33
7322	96	113	147	17	34
7345	85	85	106	0	21
7317	140	150	214	10	64
7172	111	111	152	0	41
7279	59	75	106	16	31
7315	160	174	189	14	15
7274	77	102	139	25	37
7296	95	118	143	23	25
7266	91	114	150	23	36
7370	156	164	186	8	22
7272	129	139	181	10	42
7199	105	121	171	16	50
7361	145	145	189	0	44
7468	150	161	190	11	29
7465	150	166	200	16	34
7464	243	261	304	18	43
7491	108	119	147	11	28
7488	122	131	166	9	35
7501	141	162	199	21	37
7626	81	109	161	28	52
Średnia	122,7	135,7	172,3	13,0	36,6

Wartości w ciele 25 samców po kopulacji zestawione są w tabelicy 3. Widzimy tu spadek średniej zawartości ΔP_7 z 76,3 mg % na 13,0 mg %. Ta pozostałość odpowiada prawdopodobnie ATP i ADP zawartym głównie w mięśniach tułowia.

W tabelicy 4 podane są wartości dla 25 samic po kopulacji i po złożeniu jajek. Widzimy w niej wzrost frakcji ΔP_7 z 8,8 mg % (tabl. 2) na 60,8 mg %, to jest o 52,0. Odpowiada to z grubsza utracie ΔP_7 przez samca w przebiegu kopulacji.

Tabela 4

Frakcje fosforowe u samic po kopulacji w mg% wagi ciała

Nr owada	P _o	P ₇	P _e	ΔP_7	P _E
7142	128	217	238	89	21
7228	77	166	176	89	10
7176	81	143	177	62	34
7290	138	196	225	58	29
7294	136	169	228	33	59
7383	89	193	250	104	57
7424	149	184	229	35	45
7251	196	232	249	36	17
7183	125	168	208	43	40
7244	66	125	155	59	30
7385	186	209	234	23	25
7283	83	143	204	60	61
7258	92	179	213	87	34
7310	85	147	200	62	53
7356	92	161	192	69	31
7240	117	184	217	67	33
7246	72	121	157	49	36
7250	134	189	221	55	32
7456	142	191	233	49	42
7463	97	167	208	70	41
7458	152	251	308	99	57
7497	209	238	258	29	20
7513	115	161	185	46	24
7595	119	197	239	78	42
7649	106	176	222	70	46
Średnia	119,4	180,2	217,0	60,8	36,8

Tablica 5 podaje zestawienie średnich wyników z tablic 1 do 4.

Przechodzimy obecnie do opisu wyników analizy chromatograficznej. Fotografie 1 i 2 przedstawiają chromatogramy wykonane z tymi samymi płynami, które służyły do analizy chemicznej (tabl. 1—4). Fot. 1 przedstawia wyniki otrzymane z wyciągami z 3 samców przed kopulacją i 5 samców po kopulacji. Na wszystkich wyciągach stwierdzono obecność plam odpowiadających ortofosforanowi. U samców przed kopulacją występują ponadto wyraźnie plamy, których R_f pozwala na zidentyfikowanie ich jako pirofosforany. W wyciągach z 5 samców po kopulacji plam pirofosforanów nie dostrzegamy.

Tablica 5

Zestawienie średnich wyników zawartości 7-minutowej frakcji fosforowej (ΔP_7) u samców i samiczek przed i po kopulacji

	mg % ΔP_7	
	samce	samice
przed kopulacją	76,3	8,8
po kopulacji	13,0	60,8
różnica	-63,3	+52,0

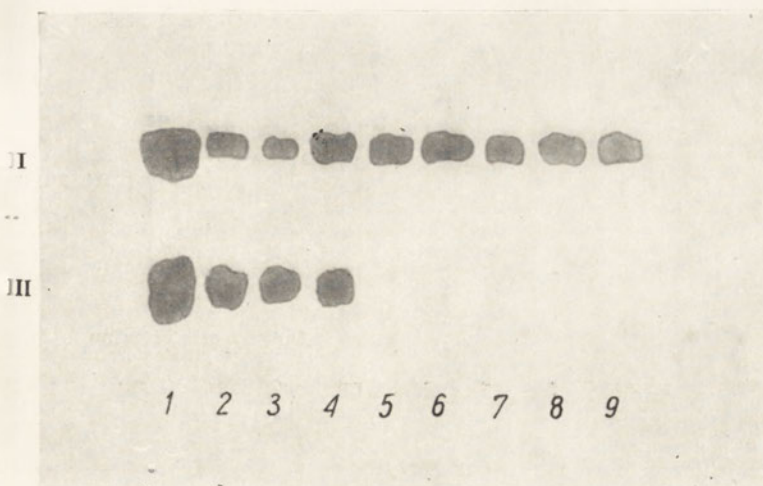
Fot. 2 przedstawia wyniki chromatografii wyciągów z 10 samic, z tych 5 przed kopulacją, 5 po kopulacji. Chromatogram ten stanowi wierny negatyw poprzedniego chromatogramu. Poza obecnymi wszędzie plamami ortofosforanów widzimy plamy o R_f charakterystycznym dla

pirofosforanu u 5 samic po kopulacji. Natomiast u 5 samic kontrolnych ani śladu pirofosforanów nie dostrzegamy.

Dalszą wymowną ilustracją przenoszenia pirofosforanów przy kopulacji jest fot. 3. Badano wyciągi z 5 par motyli obserwowanych podczas kopulacji i zabitych po zaczęciu składania jaj przez samicę. Dla każdej pary lewy pasek odpowiada wyciągowi z samca, prawy z samicy. Na 5 badanych par, w 4 widzimy całkowite przeniesienie pirofosforanu od samca do samicy. Nieco odbiega wynik dla pary piątej, w której przeniesienie było niecałkowite. U obu płci widzimy jednakowo silne plamki pirofosforanowe, słabsze niż tam, gdzie cała ilość pirofosforanu skupia się u jednej płci.

W ten sposób i metodą chromatograficzną wykazaliśmy przenoszenie pirofosforanów podczas kopulacji z samca do samicy.

Fot. 4 przedstawia wynik chromatograficznego badania lokalizacji pirofosforanów. Pasek A przedstawia wyciąg z ciała samicy po kopulacji i wypreparowaniu torebki kopulacyjnej. Widzimy wyraźną plamę ortofosforanową, brak natomiast plamy odpowiadającej pirofosforanom. Pasek B odpowiada wyciągowi z wypreparowanej torebki kopulacyjnej. Widzimy tu bardzo mocną plamę pirofosforanów, natomiast bardzo słabo zaznaczoną plamę ortofosforanów. Pasek C — wyciąg z wypreparowanych

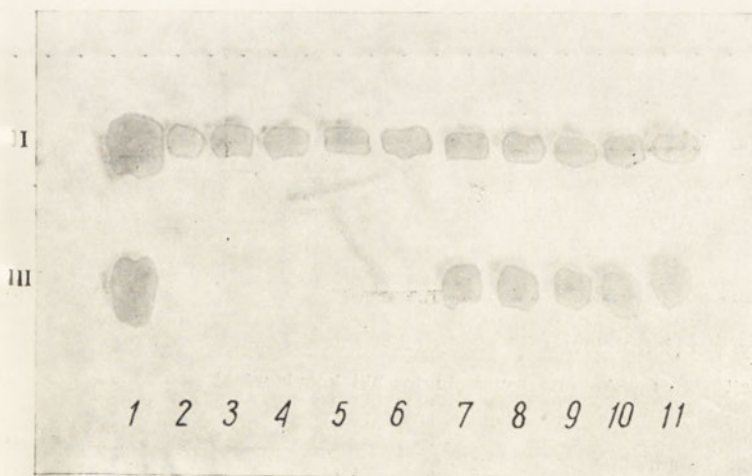


1. Standard orto- i pirofosforanu
2. Nr 7338 } Samce przed kopulacją (tabl. 1)
3. Nr 7331 }
4. Nr 7416 }
5. Nr 7345 } Samce po kopulacji (tabl. 3)
6. Nr 7370 }
7. Nr 7317 }
8. Nr 7322 }
9. Nr 7361 }

I plamy ortofosforanu
II plamy pirofosforanu

Fot. 1

Chromatogram wyciągów trójchlorooctowych z samców

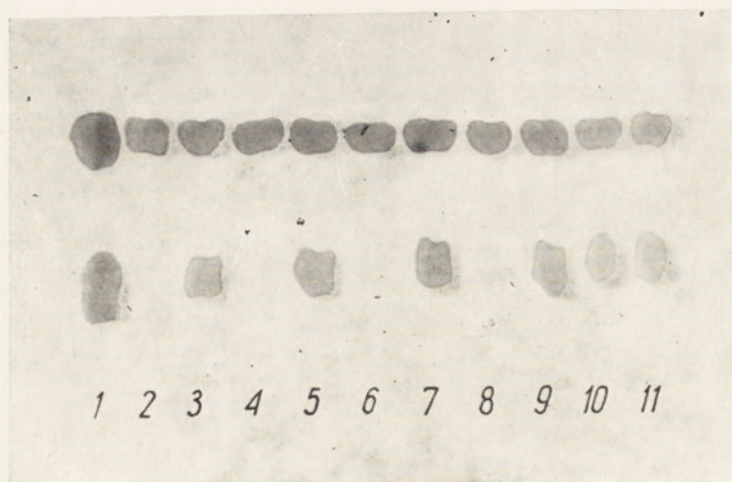


1. Standard orto- i pirofosforanu
2. Nr 7407 } Samice przed kopulacją (tabl. 2)
3. Nr 7358 }
4. Nr 7336 }
5. Nr 7388 }
6. Nr 7347 }
7. Nr 7424 } Samice po kopulacji (tabl. 4)
8. Nr 7356 }
9. Nr 7251 }
10. Nr 7383 }
11. Nr 7250 }

I plamy ortofosforanu
II plamy pirofosforanu

Fot. 2

Chromatogram wyciągów trójchlorooctowych z samic

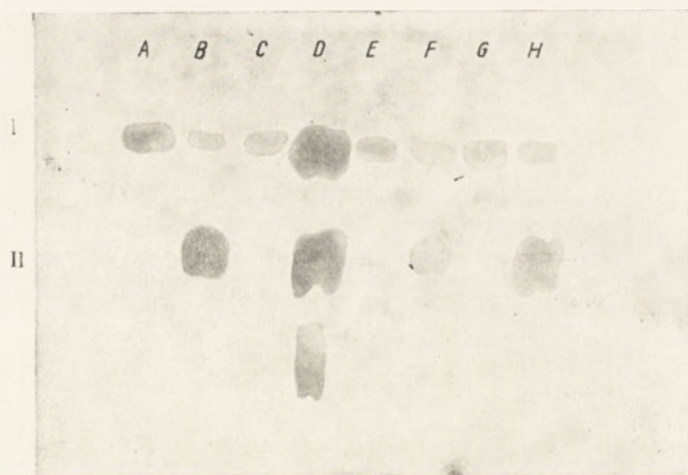


1. Standard orto- i piro-
fosforanu
2. Samiec Nr 7345
3. Samica Nr 7424
4. Samiec Nr 7370
5. Samica Nr 7356
6. Samiec Nr 7317
7. Samica Nr 7251
8. Samiec Nr 7322
9. Samica Nr 7363
10. Samiec Nr 7626
11. Samica Nr 7294
- (Tabl. 3 i 4)

I plamy ortofosforanu
II plamy pirofosforanu

Fot. 3

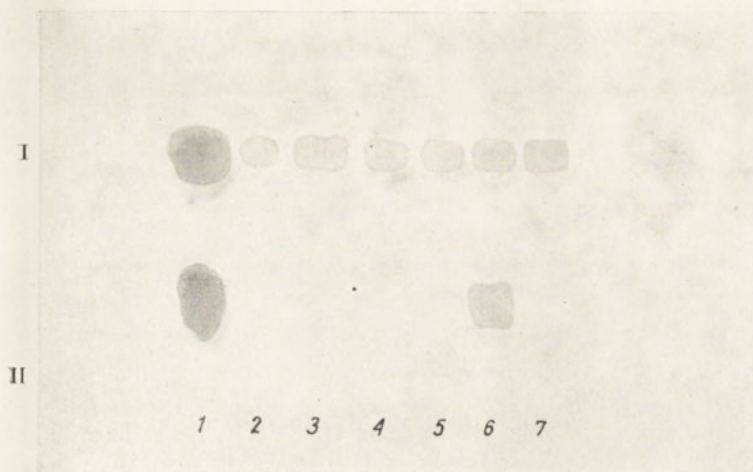
Chromatogramy wyciągów trójchlorooctowych z 5 par motyli
po kopulacji



Fot. 4

Chromatogramy z części płciowych i reszty ciała samca i samicy

- Samica po kopulacji
Nr 7176 (tabl. 4) : A. po usunięciu torebki kopulacyjnej
B. torebka kopulacyjna ($\Delta P_i = 62 \text{ mg\%}$)
C. wypreparowane jaja
D. Standard orto- i pirofosforanu
- Samiec po kopulacji
Nr 7265 (tabl. 3) : E. po usunięciu przewodu wytryskowego
F. przewód wytryskowy ($\Delta P_i = 23 \text{ mg\%}$)
- Samiec przed kopulacją
Nr 7271 (tabl. 1) : G. po usunięciu ductus ejaculatorius
H. ductus ejaculatorius ($\Delta P_i = 75 \text{ mg\%}$)
- I plamy ortofosforanu
II plamy pirofosforanu



1. Standard orto- i pirofosforanu

Samiec Nr 7370 : 2. przewód
(Tabl. 3) wytryskowy
3. reszta ciała

Samica Nr 7310 : 4. jaja za-
(Tabl. 4) płodnione
5. jaja nie za-
płodnione
6. bursa co-
pularia
7. reszta ciała

I plamy ortofosforanu
II plamy pirofosforanu

Fot. 5

Chromatogramy narządów płciowych samca i samicy oraz jaj po kopulacji

jaj teŝe samicy dał tylko słabą plamę ortofosforanową. Pasek *E* przedstawia chromatogram wyciągu z samca tej parki po usunięciu części płciowych, wykazuje on jedynie silną plamę ortofosforanów. Następny pasek *F* przedstawia chromatogram wypreparowanych części płciowych samca, wykazujący dobrze widoczną plamę pirofosforanową i dość słabą plamę ortofosforanową. Rzut oka na tablicę 3 pokazuje, że badany tu samczyk Nr 7265 zachował po kopulacji jeszcze 23 mg⁰/o ΔP_7 wobec średniej w tabeli wynoszącej 13 mg⁰/o. Dla porównania mamy na sąsiednich paskach *G* i *H* podobnie traktowanego samca przed kopulacją. Różnica występuje w chromatogramie z części płciowych (*H*), które dały bardzo silną plamę pirofosforanową.

Wreszcie fot. 5 daje pełną analizę chromatograficzną innej parki motyli po kopulacji i złożeniu jaj. Z samca i samicy wypreparowano części płciowe. Badano również jaja złożone (zapłodnione) i wypreparowane jaja nie zapłodnione. Poza występującymi wszędzie ortofosforanami tylko w *bursa copulatrix* można stwierdzić obecność pirofosforanów i to w ilościach rzędu mniej więcej takiego, jak u samca przed kopulacją. Mimo więc złożenia znacznej ilości jaj, zapas pirofosforanu w torebce nie ulega widocznej redukcji.

Te wyniki świadczące o tym, że zawartość pirofosforanu w torebce nie maleje widocznie przy składaniu jaj, nasunęły pytanie, czy w ogóle istnieje zależność między pozostałą zawartością pirofosforanów a ilością złożonych jaj. Myśleliśmy, że albo pirofosforanów zostaje w torebce tym mniej, im więcej jaj złożyła samica, albo przeciwnie, że te samice są w stanie składać więcej jaj, które mają więcej pirofosforanów. Wyniki obserwacji dotyczących tego zagadnienia przedstawiają tablice 6 i 7. W tablicy 6 zebrano 13 obserwacji obejmujących parki, w których samica złożyła mniejszą ilość jajeczek od przeciętnej, to jest 100. W grupie tej najniższa ilość wynosiła 3 jajeczka, najwyższa 91, a średnia 35 jajeczek. ΔP_7 u samców miała przeciętną wartość 10,5 mg⁰/o, u samic 58,4⁰/o. W drugiej grupie tabl. 7, obejmującej 10 par, samice złożyły od 126 do 215 jajeczek, średnio 165. ΔP_7 u samców wynosiła 16,3 a u samic 64,3 mg⁰/o. Wprawdzie średnie wartości ΔP_7 są u obu płci wyższe niż w grupie skąpo-jajowej, to jednak rozrzut poszczególnych wartości w grupach jest tak duży, że trudno tym wynikiem przypisywać znaczenie. Tak więc badania nie potwierdziły żadnej z wysuniętych hipotez.

Dyskusja

Badania zarówno chemiczne jak chromatograficzne wykazały jednoznacznie, że u wilczomlecza nieorganiczny pirofosforan, zawarty w męskim przewodzie wytryskowym, zostaje przeniesiony przy kopulacji pra-

Tablica 6

Fracja fosforowa 7-minutowa
u samca i samicy po złożeniu
małej ilości jaj

ΔP_7 mg%		Ilość złożonych jaj (szt)
samiec	samica	
0	89	41
0	89	18
0	43	50
23	62	8
9	58	10
16	59	70
18	33	32
17	104	50
0	35	48
14	23	91
11	36	20
18	99	17
11	29	3
Średnia 10,5	58,4	35,2

Tablica 7

„Fracja fosforowa 7-minutowa“
u samca i samicy po złożeniu
dużej ilości jaj

ΔP_7 mg%		Ilość złożonych jaj (szt.)
samiec	samica	
25	60	126
23	87	139
16	49	161
23	62	143
10	67	156
8	69	148
0	55	195
9	46	180
21	78	188
28	70	215
Średnia 16,3	64,3	165,1

wie ilościowo do torebki kopulacyjnej samicy. W torebce tej pozostaje bez widocznego ubytku poprzez cały okres składania jaj zapłodnionych nasieniem z *bursa copulatrix*. Odnosi się to nawet do tych samic, u których ilość złożonych jaj sięga górnej granicy spotykanej. Pirofosforan ten pozostaje dalej niezmieniony w ciągu całego kilkunastodniowego życia samicy i podobnie jak u samców, które nie kopulowały, da się wykazać w zaschniętych ciałach nawet po latach. Wskazuje to na brak pirofosfatazy w przewodzie wytryskowym i torebce kopulacyjnej, nawet w warunkach autolizy pośmiertnej.

Całość naszych badań zdaje się wskazywać na to, że rola pirofosforanów wiąże się w jakiś sposób ze zdolnością zatrzymania aktywnych plemników w torebce kopulacyjnej.

Mimo ujemnych dotychczas wyników badań nie możemy zasadniczo wykluczyć udziału pirofosforanu w metabolizmie plemników, do czego ich wysokoenergetyczny charakter zdaje się je predystynować. W każdym razie już te obserwacje wystarczają, by odrzucić hipotezę, jakoby wielofosforany nieorganiczne u zwierząt miały charakter wyłącznie odpadowy.

Streszczenie

U motyla wilczomlecza oznaczono metodą Fiskego i Subbarowa frakcje fosforanowe rozpuszczalne w kwasie i obliczono fosfor 7-minutowy (ΔP_7) u samca i samicy przed kopulacją i po kopulacji. Większość ΔP_7 będąca pirofosforanem znajduje się przed kopulacją u samca w *ductus ejaculatorius*, po kopulacji da się stwierdzić w *bursa copulatrix* samicy. Samica przed kopulacją nie ma pirofosforanu.

Pirofosforan nie przechodzi do zapłodnionych jaj w uchwytnej ilości, nie można też wykazać jego ubytku w *bursa* podczas składania jaj.

Nie stwierdzono zależności między ilością złożonych jaj a ilością przekazanego przez samca pirofosforanu.

Wyniki te znalazły pełne potwierdzenie w badaniach chromatograficznych.

LITERATURA

- [1] Ebel J. P., *Bull. Soc. Chim.* **34**, 321, 1952.
- [2] Fiske C. H., Subbarow Y., *J. Biol. Chem.* **66**, 375, 1925.
- [3] Hanes C. S., Isherwood F. A., *Nature* **164**, 1107, 1949.
- [4] Heller J., *Biochem. Z.* **169**, 208, 1926.
- [5] Heller J., *C. R. Soc. Biol. Paris* **131**, 414, 1936.
- [6] Heller J., Karpiak St., Zubikowa I., *Nature* **166**, 187, 1950.
- [7] Heller J., Karpiak St., Zubikowa I., *Spraw. Wrocł. Tow. Nauk.* **6**, 80, 1951.
- [8] Heller J., Świechowska W., Karpiak St., *Acta Physiol. Pol.* **3**, 295, 1952.
- [9] Jones L. T., *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.* **14**, 536, 1942.
- [10] Niemierko S., Niemierko W., *Nature* **166**, 268, 1950.

ПИРОФОСФАТЫ ВО ВРЕМЯ КОПУЛЯЦИИ У БАБОЧКИ БРАЖНИКА МОЛОЧАЙНОГО (*CELERIO EUPHORBIAE*)

Резюме

По методу Фиске и Суббарова авторы определили у бабочки бражника молочайного фосфатные фракции, растворимые в кислоте и исчислили ΔP_7 у самца и самки до и после копуляции. Большая часть ΔP_7 , представляющая собой пирогосфат, находится до копуляции в *ductus ejaculatorius* самца, после копуляции в *bursa copulatrix* самки. Самка до копуляции пирогосфата не имеет.

Пирогосфат не переходит в оплодотворенные яйца в уловимом количестве, а также нельзя обнаружить его убыли в *bursa* в период кладки яиц.

Зависимости между количеством отложенных яиц и количеством переданного самцом пирофосфата не констатировали.

Эти результаты нашли полное подтверждение в хроматографических исследованиях.

PYROPHOSPHATES IN THE HAWK-MOTH DURING COPULATION

Summary

Acid soluble phosphate fractions were determined by the method of Fiske and Subbarow in the hawk-moth, and 7-minute phosphorus (P_7) calculated in the male and female before and after copulation. Most of the ΔP_7 in the form of pyrophosphate is found in the *ductus ejaculatorius* of the male before copulation, whereas after copulation it may be demonstrated in the *bursa copulatrix* of the female. No pyrophosphate is evident in the female before copulation.

The pyrophosphate does not pass to the fertilized eggs in detectable quantities, neither can decrease of it in the *bursa* be demonstrated during egg laying.

No connection between the number of eggs laid and the amount of pyrophosphate transmitted by the male could be established.

These results were fully confirmed by chromatographic studies.

Otrzymano 1.8.1956 r.

J. OPIEŃSKA-BLAUTH, H. KOWALSKA i M. PIETRUSIEWICZ

NOWE SPOSOBY IDENTYFIKACJI AMINOKWASÓW NA CHROMATOGRAMACH JEDNO I DWUKIERUNKOWYCH

Z Zakładu Chemii Fizjologicznej Akademii Medycznej w Lublinie

Kierownik Zakładu: Prof. dr J. Opieńska-Blauth

Prof. drowi J. Hellerowi, przewodniczącemu Komitetu Biochemicznego Polskiej Akademii Nauk dla uczczenia jubileuszu Jego działalności naukowej tę pracę poświęcamy.

Wiele przyczyn składa się na trudności w chromatograficznym rozdzielaniu aminokwasów. Test ninhydrynowy stosowany ogólnie do ich wykrywania nie jest bynajmniej swoisty tylko dla aminokwasów. Peptydy, aminy i ich pochodne należą również do ninhydryno-dodatnich. Barwa próby ninhydrynowej nie jest jednolita dla całej grupy związków, przy tym otrzymane barwy nie są trwałe i zmieniają się w czasie.

Próby identyfikacji kilkunastu aminokwasów na jednym chromatogramie, nawet dwukierunkowym, prowadzą często do pomyłek. Przy najlepiej dobranym gatunku bibuły i układach rozpuszczalników wiele aminokwasów o zbliżonych współczynnikach R_F nie rozdziela się w oddzielne plamy, lecz tworzą skupiska trudne do interpretacji. Współczynniki R_F aminokwasów wykazują dużą zmienność nawet w stosunku do tego samego aminokwasu spowodowaną różnymi czynnikami. Na współczynniki R_F wpływają bowiem nie tylko gatunek bibuły, skład fazy rozwijającej, ale ponadto i skład jakościowy i ilościowy mieszaniny aminokwasowej, w końcu i substancje towarzyszące, np. sole mineralne. W ostatnich latach opracowano wiele sposobów i modyfikacji do znanej już podstawowej techniki chromatograficznej. Większość z nich dotyczy aminokwasów, co stanowi oczywisty dowód największych właśnie trudności spotykanych w tej grupie związków. Chromatografia wielokrotna [16], rechromatografia [9, 14, 15], kombinacja kilku technik, np. wstępującej i krążkowej, połączona ze zmianą składu fazy rozwijającej [2], wielobarwne testy różnicujące niektóre grupy aminokwasów ułatwiają bezsprzecznie analizę chromatograficzną mieszanin aminokwasowych, Saifer i Oreskes [13] stosują aż trzy testy barwne różnicujące aminokwasy, obok ninhy-

drynowego alloksanowy i izatynowy. Jednakowoż w przypadkach badań masowych i konieczności oszczędności materiału, np. surowicy, płynu mózgodzeniowego itp., dążymy do tego, by przy pomocy jednego tylko chromatogramu dwukierunkowego przeprowadzić identyfikację kilkunastu aminokwasów.

Wszystkie wyżej podane modyfikacje oparte bądź na różnicowaniu przy pomocy różnych faz rozpuszczalników, lub różnych testów wywoławczych są nieoszczędne w materiale wyjściowym i długotrwałe. Nasz nowy sposób odczytywania chromatogramów aminokwasowych oparliśmy na spostrzeżeniu, że znaczne korzyści daje technika zimnego wywoływania odczynnikami ninhydrynowym, ponieważ umożliwia notowanie czasów występowania zabarwienia poszczególnych aminokwasów. Przy ogrzewaniu chromatogramu występują od razu barwy ostateczne, a plamy wielu aminokwasów o zbliżonych współczynnikach R_f zlewają się w jedną większą plamę. Dodatkową jeszcze korzyść w proponowanej przez nas technice stanowi występowanie podczas „zimnego” wywoływania barw przejściowych charakterystycznych dla niektórych aminokwasów.

Część doświadczalna

Do badań używano: a) wzorcowe aminokwasy o najwyższym gatunku czystości, przeważnie w oryginalnych handlowych opakowaniach,

b) surowice ludzkie fizjologiczne i patologiczne.

Do rozdzielania mieszanin aminokwasowych stosowano: technikę wstępującą jedno i dwukierunkową na bibule Whatmana Nr 1 w następujących układach rozpuszczalników:

- a) fenol-woda (7 : 3)
- b) fenol-woda i pary amoniaku,
- c) propanol-woda (7 : 3),
- d) III—rz. butanol-HCOOH-woda (695 : 100 : 295),
- e) III—rz. butanol-metanol-woda (4 : 5 : 1),
- f) III—rz. butanol-metyloetyloketon-woda (2 : 2 : 1).

Chromatogramy wywoływano przez zanurzenie ich po rozwinięciu w 0,2% roztworze acetonowym ninhydryny w temperaturze pokojowej (zimny test ninhydrynowy). Identyfikację aminokwasów na chromatogramach przeprowadzano na podstawie:

- a) współczynnika R_f ,
- b) czasu występowania barw na bibule,
- c) pojawiania się barw przejściowych,
- d) stopnia intensywności plam (natężenia zabarwienia),
- e) zmian występujących na chromatogramie ogrzanym do 100° po 24 godzinach od momentu wywołania.

Tablica 1

Zimny test ninhydrynowy
(Bibula Whatmana Nr. 1, temp. 15 — 18°, pH 6 — 7, wodne roztwory czystych aminokwasów)

Lp.	Pochodzenie preparatu	Aminokwas czysty	Czas występowania barwy (min)		B a r w y *			Nateżenie** 24 godziny
			1,3-13 μg	13-26 μg	po-śred-nia	trwała	100 ⁰	
1	Light — Anglia	Alanina	6—3	3—2	—	F	R.F	+++
2	B. D. H. — Londyn	β-Alanina	120-60	60—45	obwódka Z.Z	N	R.F	+
3	B. D. H. — Londyn	Arginina	5—4	4—3	N	R.F	R.F	+
4	Riedel — Berlin	Asparagina	25—15	10—5	Ż.Br	N	R.F	+
5	B. D. H. — Londyn	Kw. asparag.	17—15	5—4	Ż.Br	N.F.	N.F	+
6	prod. polskiej	Kw. α-amino-izomasłowy	300	30	R	F	F	+
7	Schering — Berlin	Cystyna	10	10—5	Ż.R	R.N	F	+
8	prod. polskiej	Cysteina						+
9	z importu bez bliższych danych	Fen'loalanina	6	4—3	—	R.F	F	++
10	prod. polskiej	Glutamina	5	3—2	—	F	F	+++
11	Merck	Glicyna	6	3—2	Ż.R	F	F	++
12	Merck	Kw. Giutamin.	5—3	2—1	R	F	F	+++
13	Light — Anglia	Histydyna	3	3	—	R.F	St.N	+++
14	B. D. H. — Londyn	Lizyna	5	3	R.F	N.F	N.F	++
15	Light — Anglia	Leucyna	6—5	4	—	R.F	F	++
16	B. D. H. — Londyn	Izoleucyna	6	5	—	R.F	F	++
17	Merck	Metionina	4—3	2	R	F	F	+++
18	B. D. H. — Londyn	Ornityna	5—4	3—2	R	F	F	++
19	B. D. H. — Londyn	Prolina	6—5	2	Ż	Ż.Br	Ż.Br	++
20	Light — Anglia	Seryna	5—3	2	R	F	F	+++
21	B. D. H. — Londyn	Tauryna	48—30	25	R	F	F	+
22	Light — Anglia	Treonina	8—5	5	R	F	F	+++
23	B. D. H. — Londyn	Tryptofan	4	3	Ż.Br	R	F	++
24	prod. polskiej	Tyrozyna	8	8	R	F	F	++
25	Schuchardt	Walina	5	3	—	F	F	+++

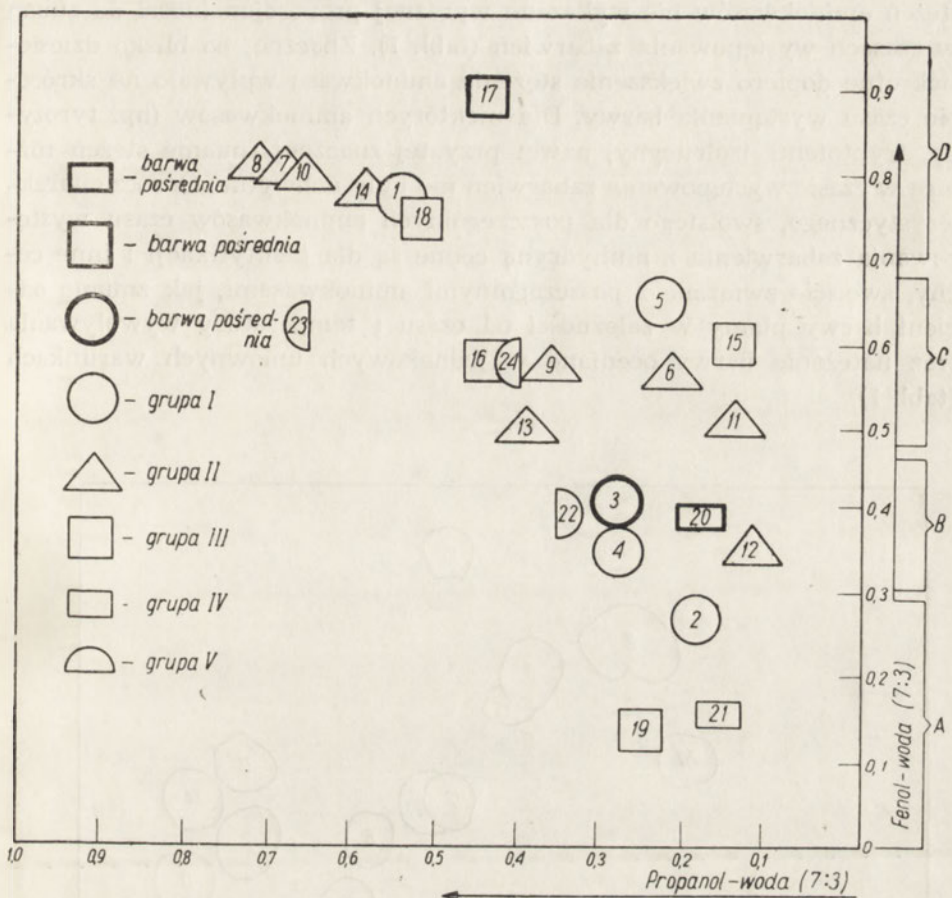
* F - fiolet, N - niebieski, R - różowy, Ż - żółty, R. F - różowy fiolet, N. F - niebieski fiolet, R. N - różowo-niebieski, Ż. Br - żółty brąz, St. N - stalowo-niebieski.

** +++ = silna, ++ = średnia, + = słaba, ± = ledwo widoczna.

Tablica 2

Podział aminokwasów na grupy na podstawie różnic w czasie występowania barwy w próbie ninhydrynowej

Nr aminokwasu w rys. 1	Grupa	Aminokwas 2,6 μ g	Czas występowania barwy (min.)	Barwy pośrednie	Strefa R_F fenol-woda (7 : 3)
1 2 3 4 5	I	Metionina Kw. glutaminowy Glicyna Seryna Histydyna	7—10	— — Ż.Br —	D A B B C
6 7 8 9 10 11 12 13 14	II	Glutamina Leucyna Izoleucyna Alanina Feniloalanina Lizyna Ornityna Treonina Walina	10—15	—	C D D C D C B C D
15 16 17 18	III	Arginina Tyrozyna Prolina Tryptofan	15—20	Ż	C C D D
19 20 21	IV	Cysteina Asparagina Kw. asparaginowy	20—30	Ż.Br	A B A
22 23 24	V	Tauryna Kw. α -aminoizomasłowy β - Alanina	kilka do kilkunastu godz. po ogrzaniu natychmiast		B C C

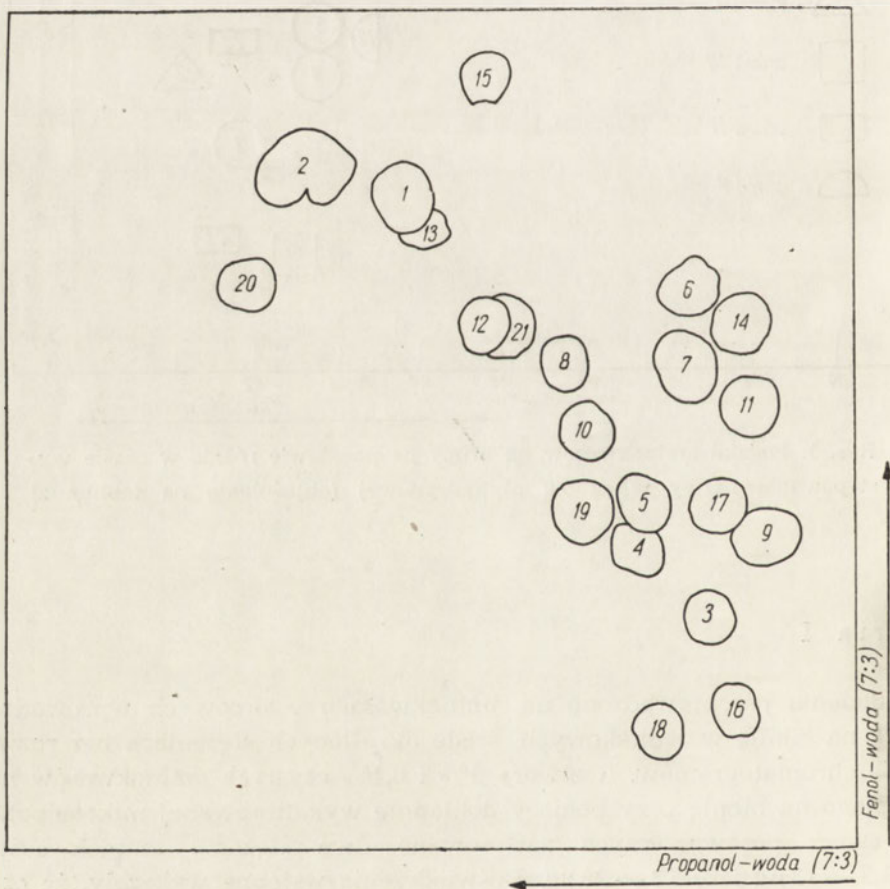


Rys. 1. Podział aminokwasów na grupy na podstawie różnic w czasie występowania barwy w próbie ninhydrynowej (objaśnienie na tablicy 2)

Seria I

Badania przeprowadzono na aminokwasach wzorcowych wprowadzonych na bibułę w jednakowych, ściśle określonych stężeniach bez rozwijania chromatogramów. Roztwory 1% i 0,1% czystych aminokwasów nakraplano na bibułę przy pomocy dokładnie wykalibrowanej mikropipetki. Do badań porównawczych zastosowano dwa stężenia aminokwasów: a) 1,3 — 13 μg i b) 13 — 26 μg . Doświadczenia wstępne wykazały, że czas występowania zabarwienia dla każdego aminokwasu był zawsze jednaki przy tych samych stężeniach. Natomiast odwrotnie, przy zmianach

stężeń aminokwasów nie wykazano wyraźnej proporcjonalności do zmian w czasach występowania zabarwień (tabl. 1). Znaczne, bo blisko dziesięciokrotne dopiero zwiększenie stężenia aminokwasu wpływało na skrócenie czasu wystąpienia barwy. Dla niektórych aminokwasów (np. tyrozyny, tryptofanu, izoleucyny) nawet przy tej znacznej zmianie stężeń różnice w czasie występowania zabarwień nie były uchwytne. Oprócz charakterystycznego, swoistego dla poszczególnych aminokwasów czasu występowania zabarwienia z ninhydriną cenne są dla identyfikacji i inne cechy, swoście związane z poszczególnymi aminokwasami, jak zmiana odcieni barwy plamy w zależności od czasu i temperatury wywoływania oraz natężenie barwy oceniane w jednakowych umownych warunkach (tabl. 1).



Rys. 2. Chromatogram dwukierunkowy mieszaniny aminokwasów w stężeniach po 2,6 μg (objaśnienie na tablicy 3)

Seria II

Badania przeprowadzono na rozwiniętych chromatogramach jedno i dwukierunkowych przy użyciu aminokwasów wzorcowych (stężenie 2,6 μg), wymiary bibuły 25 \times 25 cm.

Określano: a) czas wystąpienia zabarwienia; b) współczynnik R_F , c) barwy pośrednie, d) natężenie barwy po 24 godz.

Na podstawie różnic w czasie występowania plam na chromatogramach jedno i dwukierunkowych podzielono aminokwasy na 5 grup (rys. 1, tabl. 2).

Tablica 3

Chromatogram dwukierunkowy mieszany aminokwasów ukroplonych w stężeniu 2,6 μg —każdego aminokwasu

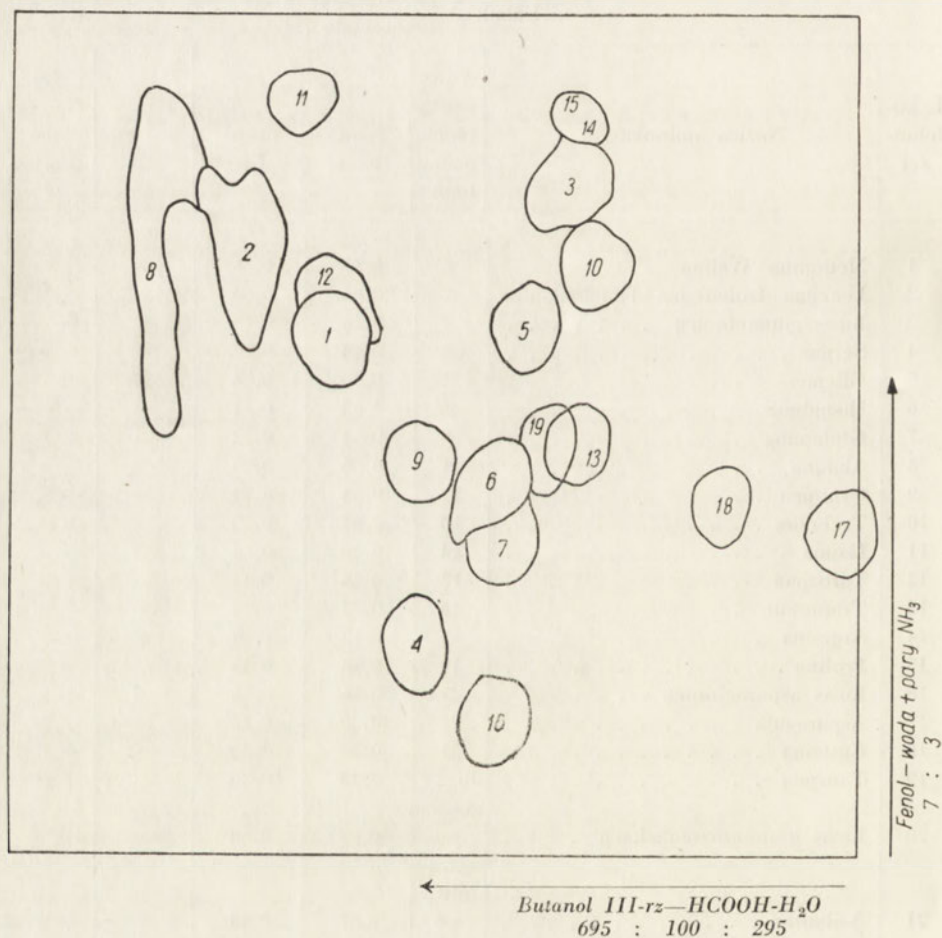
Układ: 1. propanol-woda 7:3
2. fenol-woda 7:3

L. kolejności	Nazwa aminokwasu	Czas wystąpienia plamy (min.)	R_F		Barwa pośrednia	Natężenie barwy
			fenol-woda	propanol-woda		
1	Metionina+Walina	6	0,75	0,54	—	+++
2	Leucyna+Izoleucyna+Fenylalanina	7	0,80	0,65	—	+++
3	Kwas glutaminowy	7	0,26	0,19	—	+++
4	Seryna	8	0,34	0,27	—	+++
5	Glicyna	8	0,39	0,26	Ż.Br	+++
6	Histydyna	8	0,63	0,21	—	+++
7	Glutamina	9	0,54	0,22	—	++
8	Alanina	11	0,55	0,36	—	++
9	Ornityna	12	0,34	0,12	—	++
10	Treonina	13	0,47	0,33	—	++
11	Lizyna	14	0,49	0,14	—	++
12	Tyrozyna	17	0,56	0,44	—	++
13	Tryptofan	18	0,75	0,54	—	++
14	Arginina	19	0,12	0,24	—	++
15	Prolina	19	0,88	0,44	Ż	+
16	Kwas asparaginowy	21	0,16	0,16	—	++
17	Asparagina	23	0,39	0,17	Br	+
18	Cysteina	31	0,55	0,20	—	+
19	Tauryna	do 24 godz.	0,38	0,29	—	++
20	Kwas α -aminoizomasłowy	po ogrzaniu	0,63	0,66	—	+
21	β -alanina	po ogrzaniu	0,57	0,43	—	++

Podane w tablicy 2 czasy występowania plam nie odgrywają bynajmniej roli jako wielkości stałe, zależą bowiem od warunków doświadczenia, np. wymiarów pasków bibuły, doboru rozpuszczalników i innych. Mają natomiast znaczenie jako wartości porównawcze przy ustalaniu kolejności występowania plam dla poszczególnych aminokwasów.

W celu identyfikacji większości aminokwasów na jednym tylko chromatogramie dwukierunkowym opracowano następujący sposób postępowania: Mieszanie aminokwasów nakrapla się na bibułę (arkusz 25×25 cm) i rozwija chromatogram w układach: propanol-woda (7 : 3) i fenol-woda (7 : 3) (wyniki podano na rys. 2 i w tabl. 3)

lub w układach: III-rz. butanol-HCOOH-woda (695:100:295) i fenol-woda (7 : 3) (rys. 3 i tabl. 4).



Rys. 3. Chromatogram dwukierunkowy mieszaniny aminokwasów wkroplonych w stężeniu po $2,6 \mu\text{g}$ (objaśnienie na tablicy 4)

T a b l i c a 4

Chromatogram dwukierunkowy mieszaniny aminokwasów ukroplonych w stężeniu $2,6\mu\text{g}$ — dla każdego aminokwasu

Układ: 1) III-rz. Butanol-HCOOH-woda
2) Fenol-woda + pary NH_3

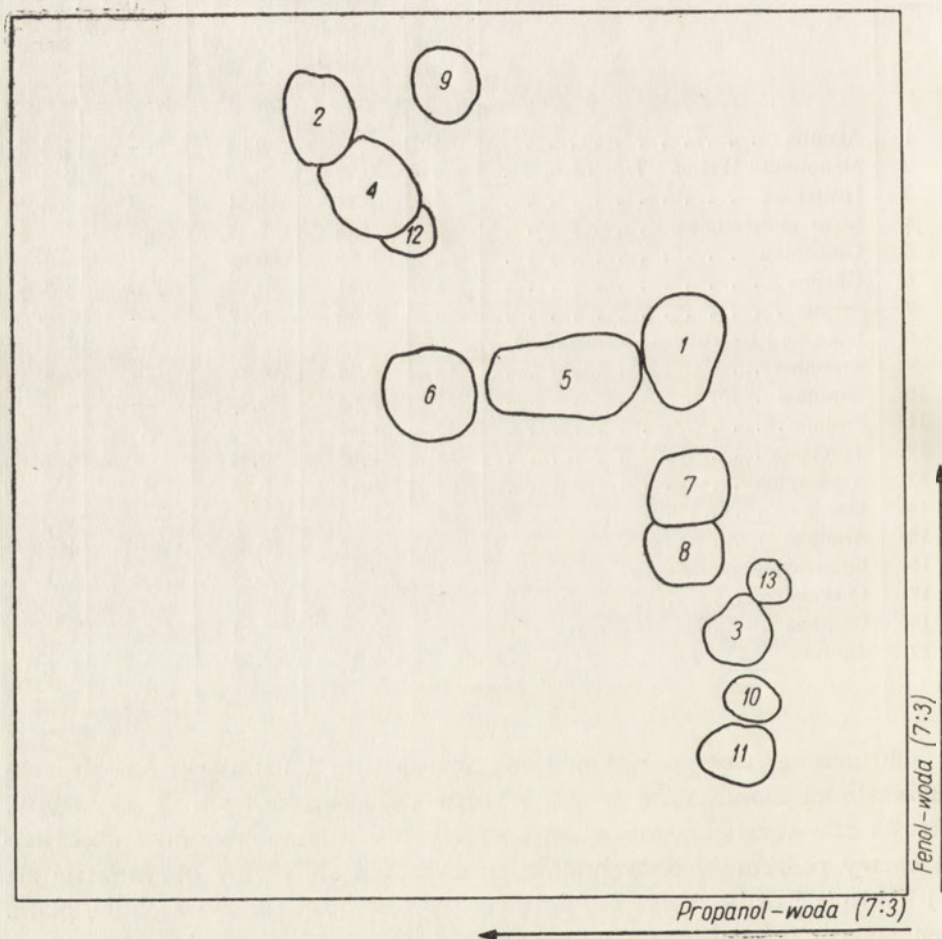
L. Kolejności	Nazwa aminokwasu	Czas wystąpienia plamy (min)	R_F		Barwa pośrednia	Natężenie barwy
			fenol-woda + p. NH_3	III-rz. butanol + HCOOH + woda		
1	Alanina	4	0,61	0,54	—	+++
2	Metionina + Walina + Tryptofan . .	4	0,73	0,66	—	+++
3	Histydyna	5	0,74	0,31	—	+++
4	Kwas glutaminowy	8	0,26	0,45	—	+++
5	Glutamina	8	0,59	0,35	—	++
6	Glicyna	8	0,41	0,38	Ż.Br	+++
7	Seryna	9	0,35	0,37	—	++
8	Leucyna + Izoleucyna + Fenylalanina	9			—	++
9	Treonina	10	0,44	0,46	—	++
10	Ornityna	11	0,63	0,28	—	++
11	Prolina	11	0,68	0,60	Ż	+
12	Tyrozyna	14	0,62	0,54	—	++
13	Asparagina	22	0,45	0,29	Ż	+
14	Lizyna	22	0,79		—	+
15	Arginina	22	0,79	0,30	—	+
16	Kwas asparaginowy	24	0,16	0,36	—	++
17	Cystyna	27	0,35	0,01	—	+
18	Cysteina	27	0,38	0,13	—	+
19	Tauryna	do 24 godzin	0,43	0,38	—	++

Chromatogramy po całkowitym wysuszeniu i usunięciu śladów rozpuszczalnika zanurza się w 0,2% roztworze acetonowym ninhydryny, określa czas występowania plam poszczególnych aminokwasów i obserwuje barwy pośrednie. Natychmiast po ukazaniu się plamy obrysowuje się jej kontury i oznacza cyfrą wynikającą z kolejności ukazywania się plam. Ten sposób pozwala nam odczytywać bezbłędnie chromatogramy dwukierunkowe zawierające dwadzieścia kilka aminokwasów.

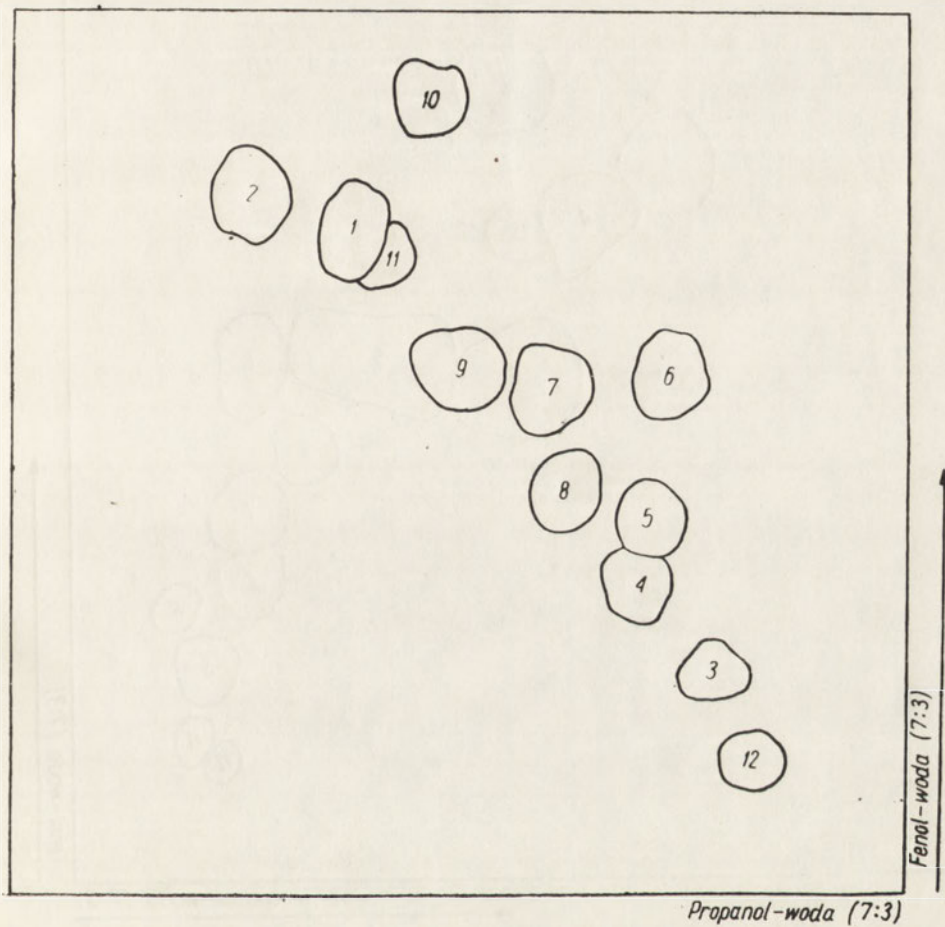
Seria III

Obejmowała identyfikację aminokwasów z chromatogramów dwukierunkowych surowic ludzkich. Jeden ml surowicy po odbiałczeniu i usunięciu substancji lipidowych [5] nakraplano na bibułę w ilości odpowia-

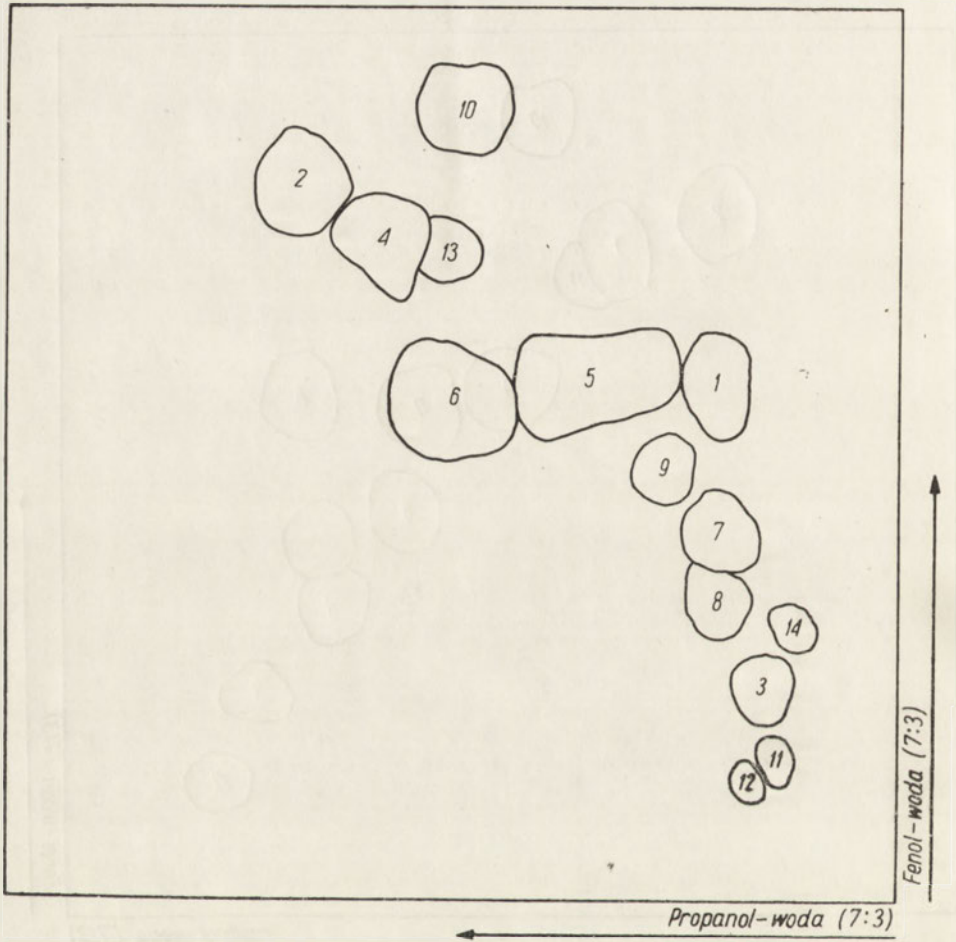
dającej 0,1 — 0,2 ml surowicy i rozwijano chromatogram dwukierunkowy w układach: propanol-woda i fenol-woda (rys. 4a, tabl. 5 a). Dla kontroli rozwijano chromatogramy w tych samych warunkach doświadczalnych: 1) aminokwasów wykazanych w badanej surowicy (rys. 4b, tabl. 5 b) oraz 2) surowicy z dodatkiem poprzednio wykazanych aminokwasów (rys. 4 c, tabl. 5c).



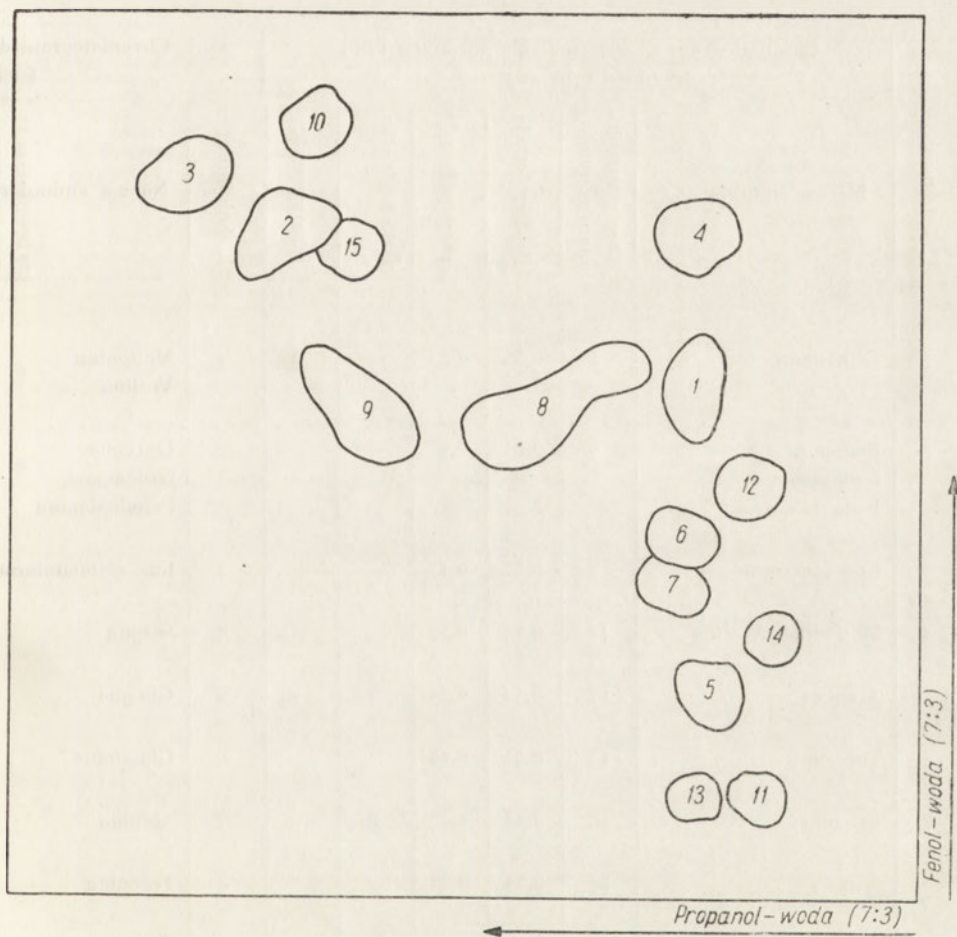
Rys. 4a. Chromatogram surowicy po odbiałczeniu i usunięciu lipidów (objaśnienie na tablicy 5)



Rys. 4b. Chromatogram aminokwasów wzorcowych występujących w surowicy (objaśnienie na tablicy 5)



Rys 4c. Chromatogram surowicy po odbiałczeniu i usunięciu lipidów + aminokwasy wzorcowe (objaśnienie na tablicy 5)



Rys 5. Chromatogram dwukierunkowy surowicy krwi
(objaśnienie na tablicy 6)

Chromatogram surowicy po odbiałczeniu i usu

a									
Chromatogram dwukierunkowy surowicy krwi (ilość 0,13 ml)							Chromatogram dwukierunkowy surowicy krwi (steż, 2,6)		
L. kolejności	Nazwa aminokwasu	Czas wystąpienia plamy (min)	R _F fenol-uroda	propanol-uroda	Barwa pośrednia	Intensywność	L. kolejności	Nazwa aminokwasu	
1	Glutamina	8	0,56	0,22	—	+++	1	Metionina Walina	
2	Leucyna Izoleucyna Fenylalanina	9	0,81	0,57	—	+++	2	Leucyna Izoleucyna Fenylalanina	
3	Kw. glutaminowy	9	0,27	0,17	—	+++	3	Kw. gładutaminowy	
4	Metionina, Walina	11	0,74	0,52	—	+++	4	Seryna	
5	Alanina	13	0,54	0,34	—	++	5	Glicyna	
6	Tyrozyna	13	0,51	0,46	—	++	6	Glutamina	
7	Glicyna	15	0,41	0,22	Ż. Br.	++	7	Alanina	
8	Seryna	18	0,34	0,23	—	++	8	Treonina	
9	Prolina	18	0,87	0,42	Ż	+	9	Tyrozyna	
10	Kw. asparaginowy	20	0,20	0,16	—	++	10	Prolina	
11	Cysteina	20	0,15	0,17	—	++	11	Tryptofan	
12	Tryptofan	22	0,58	0,48	—	+	12	Kw. asparaginowy	
13	Ornityna	28	0,32	0,14	—	+			

c a 5

nięciu lipidów oraz chromatogramy kontrolne

b					c						
runkowy aminokwasów μg)					Chromatogram surowicy krwi (ilość 0,13 ml) + aminokwas wzorcowe (stęż. 2,6 μg).						
Czas wystapie- nia plamy (min.)	R _F fenol-woda	propanol-woda	Barwa pośred- nia	Intensywność	L. kolejności	Nazwa aminokwasu	Czas wystapie- nia plamy (min.)	fenol-woda	propanol-woda	Barwa pośred- nia	Nateżenie barwy
7	0,75	0,61	—	+++	1	Glutamina	8	0,52	0,23	—	+++
8	0,77	0,71	—	+++	2	Leucyna Izoleucyna Fenylalanina	8	0,80	0,66	—	+++
8	0,25	0,23	—	+++	3	Kw. glutaminowy	11	0,24	0,17	—	+++
9	0,34	0,30	—	++	4	Metionina, Walina	12	0,73	0,58	—	+++
9	0,41	0,29	Ż.Br.	++	5	Alanina	15	0,56	0,35	—	++
10	0,56	0,26	—	++	6	Tyrozyna	15	0,55	0,51	—	++
11	0,56	0,39	—	+++	7	Glicyna	16	0,40	0,22	Ż Br.	++
12	0,46	0,38	—	++	8	Seryna	18	0,33	0,22	—	++
13	0,59	0,49	—	++	9	Treonina	18	0,47	0,28	—	++
18	0,88	0,53	Ż	+	10	Prolina	19	0,86	0,50	Ż	+
19	0,72	0,58	—	+	11	Kw. asparaginowy	20	0,16	0,16	—	++
20	0,16	0,18	—	+	12	Cysteina	21	0,14	0,16	—	++
					13	Tryptofan	23	0,71	0,51	—	+
					14	Ornityna	29	0,30	0,14	—	+

Tablica 6

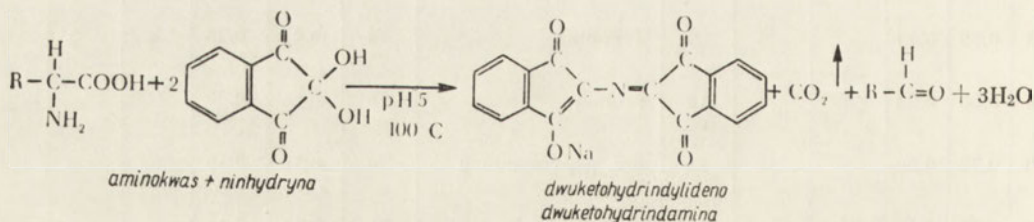
Chromatogram dwukierunkowy surowicy krwi (ilość 0,13 ml)

L. kolejności	Nazwa aminokwasu	Czas wystąpienia plamy w min.	R _F		Brawa pośrednia	Natężenie barwy
			fenol-woda	propa-nol-woda		
1	Glutamina	5	0,53	0,20	—	+++
2	Walina+Metionina	5	0,70	0,53	—	+++
3	Izoleucyna, Fenyloalanina, Leucyna	5	0,79	0,71	—	+++
4	Histydyna	6	0,70	0,27	—	++
5	Kw. glutaminowy	7	0,22	0,19	—	+++
6	Glicyna	8	0,37	0,22	Ż.Br	++
7	Seryna	8	0,33	0,23	—	++
8	Alanina	9	0,51	0,36	—	++
9	Tyrozyna	9	0,54	0,53	—	++
10	Prolina	9	0,85	0,58	Ż	+
11	Kwas asparaginowy	10	0,12	0,14	—	++
12	Lizyna	15	0,43	0,15	—	++
13	Cysteina	16	0,12	0,20	—	+
14	Ornityna	25	0,12	0,13	—	+
15	Tryptofan	25	0,67	0,55	—	+

Rys. 5 z dokładnym opisem w tabl. 6 przedstawia chromatogram dwukierunkowy innej surowicy.

Dyskusja i wnioski

Reakcja aminokwasów z ninhydriną przebiega według wzoru [10].



Produkt barwny dwuketohydrindylideno-dwuketohydrindamina DYDA powstaje z różną wydajnością dla poszczególnych aminokwasów [17]. Fakt ten ma znaczenie przy fotometrycznym oznaczaniu aminokwasów w eluatach z bibuły lub wyciekach z kolumn. Dla każdego aminokwasu

sporządza się krzywą wzorcową. Trzeba jednak stwierdzić, że przy interpretacji chromatogramów bibułowych wywołanych ninhydriną często nie bierze się pod uwagę różnych wydajności barwnego produktu reakcji. Na skutek tego popełnia się znaczne błędy w identyfikacji i przybliżonej ocenie ilościowej.

Dłuższa praktyka w chromatografii bibułowej aminokwasów wykazała, że opieranie identyfikacji plam aminokwasowych na współczynnikach R_F może prowadzić do błędów. Przykłady rozbieżności w podawanych przez różnych autorów współczynników R_F w jednakowym układzie zestawiono w tabelicy 7.

T a b l i c a 7

Współczynniki R_F według różnych autorów

Aminokwas	Block [1]	Linskens [8]	Opieńska i wsp.		Saifer, Oreskes technika [13] krążkowa	Conden [3]
	fenol-woda	fenol-woda	fenol-woda		fenol-woda	fenol-woda
	R_F	—	+NH ₃ (para)	—	+ NH ₃ (para)	+ HCN
		R_F	R_F	R_F	R_F	R_F
Arginina	0,89	0,59	0,79	0,62	0,86	0,59
Lizyna	0,81	0,46	0,79	0,46	0,86	0,46
Ornityna	0,79	—	0,63	0,32	0,83	0,83

Te dość znaczne różnice zmuszają do wyznaczenia współczynników R_F aminokwasów na podstawie wzorcowych chromatogramów rozwijanych w ściśle określonych warunkach, przestrzeganych w danej serii doświadczeń.

Nasz sposób identyfikacji aminokwasów na chromatogramach obejmuje oprócz współczynników R_F inne jeszcze czynniki związane głównie ze swoistością testu ninhydrynowego. Zimny test ninhydrynowy (wywoływa-

nie w temperaturze pokojowej) umożliwia nie tylko rozdzielenie wiąższości aminokwasów w jednym chromatogramie dwukierunkowym, ale pozwala zastosować jeszcze inne sposoby identyfikacji, jak czas występowania zabarwienia, barwy pośrednie i natężenie barw. Wywoływanie w 100° nie daje tych możliwości. Nasze obserwacje pozwalają nam podzielić aminokwasy na kilka grup na podstawie różnic w czasie występowania plam. Szybkość występowania plam w zimnym teście ninhydrynowym, natężenie barwy określane w jednakowym czasie od momentu zanurzenia bibuły w roztworze ninhydryny zależne są w głównej mierze od rodzaju aminokwasu (cechy swoiste), a w znacznie mniejszym stopniu od stężenia substancji.

Tablica 8a

Czułość próby ninhydrynowej a czas występowania zabarwienia

Aminokwas	Czas zabarwienia (min.)	Natężenie zabarwienia	Czułość testu ninhydrynowego			
			Dent [4]	Pratt [11]	Kirby i Berry [7]	Saifer i Oreskes [13]
			μg	μg	μg	μg
Metionina	2	+++	10,0	1,0	1,0	0,1
Kw. Glutaminowy	2-1	+++	3,0	0,1	0,5	0,3
Glicyna	3-2	+++	1,0	0,1	0,25	0,2
Histydyna	3	+++	20,0	25,0	3,0	0,4
Arginina	4-3	+	15,0	4,0	1,0	0,2
Kw. Asparaginowy	5-4	+	5,0	0,4	0,5	0,3
Lizyna	3	++	15,0	4,0	1,0	0,1
Tyrozyna	8	++	15,0	3,0	3,0	0,2

Nasze dane odnośnie do szybkości występowania zabarwienia oraz natężenia zabarwienia dla poszczególnych aminokwasów powinnyby wykazywać równoległość do wyników badań czułości testu ninhydrynowego podawanych przez różnych autorów. Należałoby przypuszczać, że aminokwasy należące do I grupy pod względem szybkości występowania plam, jak np. metionina, kwas glutaminowy, powinny się znaleźć w szeregu czułości na początku. Nie stwierdziliśmy jednak tej równoległości dla wielu aminokwasów (tabl. 8a). Jaskrawym przykładem braku wyraźnej zależności między tymi parametrami może być histydyna. Daje ona w naszych próbach bardzo szybko zabarwienie i zaliczamy ją do I grupy, zaś w teście ninhydrynowym ogólnie zaliczana jest do najmniej czułych. To samo da się powiedzieć o metioninie.

W tablicy 8a zestawiliśmy dane dla tych aminokwasów, dla których brak korelacji między czułością, natężeniem zabarwienia a szybkością występowania zabarwienia jest najbardziej widoczny. W celu wyraźnego

Tablica 8b

		Szeregi kolejności aminokwasów w teście ninhydrynowym								
Czas zabarw.		1	2	3	4	5	6	7	8	Autor
			Glu<	Met<	Gly<	His<	Lys<	Arg<	Asp<	Tyr
Natężenie plam		Met=	Glu=	Gly=	His<	Lys=	Tyr<	Arg=	Asp	własne
Czułość		Gly>	Glu>	Asp>	Met>	Lys>	Arg>	Tyr>	Hist	Dent i inni [4]
		Met=	Lys>	Tyr=	Arg=	Gly>	Glu=	Asp>	Hist	Saifera i Oreskes [13]

podania braku korelacji dla pewnych aminokwasów między szybkością występowania zabarwienia, natężeniem barwy i czułością ogólnie przyjmowaną, zestawiono malejące szeregi kolejności (Tabl. 8b). Nasze obserwacje i wyniki doświadczeń pokrywają się z obserwacjami Saifera i Oreskesa, którzy przeprowadzali ostatnio porównawcze badania nad czułością testu ninhydrynowego (w 100°), izatynowego i alloksanowego w ściśle określonych warunkach.

Powyższe zestawienia wykazują, ile sprzeczności występuje w wynikach dla tych samych aminokwasów u różnych autorów. Istotną trudność stanowiło, że odczyn ninhydrynowy — oceniany czy to według natężenia zabarwienia plam, czy też szybkości występowania plam tylko w nieznacznym stopniu, jest wyrazem stężenia aminokwasów w badanych mieszaninach, a pozostaje przede wszystkim w związku ze swoistością reakcji dla każdego aminokwasu. Wszystko to razem dowodzi, jak trudna i niepewna jest interpretacja chromatogramu dwukierunkowego mieszaniny kilkunastu aminokwasów występujących w różnych stężeniach. Powierzchnowa analiza oparta wyłącznie na współczynnikach R_F , wielkości plam i porównawczej ocenie natężenia zabarwienia plam prowadzi do wielu błędów.

Wprawdzie przy pomocy naszego sposobu stosowania i wykorzystywania testu ninhydrynowego nie rozwiązujemy wszystkich trudności, ale udaje się nam usunąć wiele wątpliwości, których nie rozstrzygnęlibyśmy innym sposobem.

Kwas glutaminowy i kwas asparaginowy, oba ze strefy A, rozdzielają się dobrze w chromatogramie dwukierunkowym w układach: fenol-woda i propanol-woda. Przy zimnym wywoływaniu występuje zawsze jako jedna z pierwszych plam kwas glutaminowy (I Gr.), a dopiero znacznie później kwas asparaginowy (IV Gr.).

Glicyna, seryna, asparagina, tauryna (Strefa B) dają zwykle na gorąco jedną nie rozdzielającą się plamę. Przy zimnym wywoływaniu występuje najpierw plama seryny (I Gr.) fioletowa, następnie żółta plama glicyny (I Gr.), która stopniowo ciemnieje, różowieje i przechodzi w trwałą fioletową. Znacznie później występuje żółta plama asparaginy (Gr. IV), która zmienia się na brązową. W końcu występuje plama tauryny (Gr. V).

Ornityna i lizyna (strefa B) (Gr. II) rozdzielają się dobrze dając oddzielne plamy.

Histydyna i arginina (strefa C) mogą tworzyć jedną plamę na zasadzie zbliżonych współczynników R_f , ale przy stosowaniu zimnego wywoływania plama histydyny (Gr. I) występuje znacznie szybciej niż plama argininy (Gr. III).

Glutamina, alanina, tyrozyna, treonina (strefa C) rozdzielają się dobrze w układzie fenol-woda i propanol-woda. Plamy glutaminy i alaniny (Gr. II) występują szybciej niż plamy tyrozyny i treoniny (Gr. III). Najpóźniej w tym zespole występuje plama tyrozyny.

β -alanina nie oddziela się wprawdzie od α -alaniny, ale daje się odróżnić zimnym wywoływaniem.

Prolina (strefa D) występuje pod postacią żółtej plamy oddzielnie.

Metionina, walina i tryptofan (strefa D) tworzą zwykle jedną plamę. Przy zimnym wywoływaniu występuje w pierwszej fazie wspólna plama metioniny (Gr. I) z waliną (Gr. III), a dopiero znacznie później słaba plama tryptofanu (Gr. III). Przy przeważającym stężeniu metioniny plama jej występuje w pierwszej kolejności szeregu aminokwasowego, a jeśli jest przewaga waliny, plama ta występuje później.

Leucyna, izoleucyna, feniloalanina (strefa D) dają jedną plamę bez względu na sposób wywoływania. Szybkość występowania plam jest dla wszystkich aminokwasów jednakowa, a współczynniki R_f w fenolu i propanolu zbliżone. Rozdzielenie metioniny, waliny, tryptofanu oraz leucyny, izoleucyny i feniloalaniny jest możliwe na oddzielnym

chromatogramie dwukierunkowym w układach: III-rz. butanol-metanol-woda (4 : 5 : 1) i III-rz. butanol-metyloetyloketon-woda (2 : 2 : 1).

Układ: III-rz. butanol-HCOOH-woda i fenol-woda-pary amoniaku zalecany przez Rocklanda i Underwooda [12] mniej nadaje się do interpretacji chromatogramu według naszego sposobu.

Rozdzielenie i identyfikowanie kwasu asparaginowego, glutaminowego, glicyny, seryny, asparaginy, tauryny, treoniny, glutaminy nie powoduje tak jak w poprzednim układzie żadnych trudności. Tyrozyna i alanina wprawdzie nie rozdziela się, jako oddzielne plamy, ale ich identyfikacja przy zimnym wywoływaniu jest łatwa na podstawie różnic w czasie występowania plam.

Poważniejsze trudności występują przy tym zespole rozpuszczalników dla całej grupy aminokwasów zasadowych, które występują pod postacią jednej trudno rozdzielającej się plamy. Przy zimnym wywoływaniu udaje się je częściowo identyfikować, mianowicie na początku występuje plama histydyny, później ornityny i jeszcze później lizyny wraz z arginina. Obie grupy aminokwasów ze strefy D: metioninowa i leucynowa tworzą w tym układzie dwie smugi. Identyfikowanie poszczególnych aminokwasów raczej nie daje się przeprowadzić. Zagadnienie rozmieszczenia cystyny i cysteiny na chromatogramach w obu układach rozwijających nie jest jeszcze rozwiązane. Dane z literatury nie są zgodne i mają braki. Zagadnienia rozmieszczenia cystyny i cysteiny na chromatogramach nie dało się jeszcze rozwiązać z powodu braku dostatecznie czystych preparatów.

Nasza technika w zastosowaniu do surowic daje w zasadzie niezłe wyniki. W surowicach fizjologicznych (0,1 — 0,2 ml) znajdujemy zwykle 17—18 aminokwasów. W kolejności występowania plam wysuwa się na pierwsze miejsce przed kwasem glutaminowym jeszcze glutamina. Wysoka jej zawartość w surowicy (8,3 µg w 0,1 ml surowicy) usprawiedliwia tę kolejność.

Plama metionina-walina-tryptofan występuje znacznie później. Znajduje to też uzasadnienie w nieznacznej zawartości metioniny (0,39 µg) w stosunku do waliny (2,9 µg). Jedno z pierwszych miejsc zajmuje łączna plama leucyny (2,7 µg), izoleucyny (0,89 µg) i feniloalaniny (0,84 µg) (łącznie 4,43 µg). W dalszej kolejności występuje zawsze glicyna (1,5 µg), seryna (1,1 µg), histydyna (1,2 µg), alanina (3,4 µg), prolina (2,4 µg), tyrozyna (1,0 µg). Zastanowienia godny jest brak plam lizyny i treoniny na chromatogramach w przeważającej ilości badanych przez nas surowic w je-dnakowych warunkach, ponieważ zawartości ich znajduwane metodą ży-wic jonowymiennych w/g Moora i Steina [10] są stosunkowo wysokie, lizyny (2,7 µg) i treoniny (1,4 µg). Odwrotnie kwas asparaginowy znajduwany metodą Steina i Moora w śladowych ilościach wy-

stępuje we wszystkich badanych przez nas surowicach. Zagadnienia składu aminokwasowego surowic badanego techniką chromatografii dwukierunkowej naszym sposobem będzie przedmiotem dalszych doświadczeń.

Z naszych dotychczasowych doświadczeń wynika, że zimny test ninhydrynowy umożliwia lepszą identyfikację aminokwasów niż wywoływanie ninhydryną na gorąco. Przy zimnym wywoływaniu dadzą się wykoryzystać oprócz współczynnika R_F jeszcze inne wskaźniki swoistości aminokwasów, jak szybkość występowania plam i barwy pośrednie. Należy jednak zawsze pamiętać, że tak jak współczynniki R_F , tak i czasy występowania plam w zimnym teście ninhydrynowym nie stanowią wielkości stałych, lecz są zmienne w zależności od warunków rozwijania i wywoływania chromatogramu. Dowodzą tego różnice w czasach występowania zabarwienia dla poszczególnych aminokwasów w dwu różnych układach rozwijających chromatogramy dwukierunkowe: fenol-woda, propanol-woda oraz fenol-woda + pary NH_3 i n-butanol- CH_3COOH -woda.

Streszczenie

Do wywoływania aminokwasów na chromatogramach bibułowych zastosowano zimny test ninhydrynowy. Wywoływanie ninhydryną w temperaturze pokojowej ma przewagę nad stosowanym powszechnie wywoływaniem w 100° , ponieważ umożliwia śledzenie czasu występowania poszczególnych plam i barw pośrednich.

Nowe wskaźniki będące wyrazem zarówno swoistości aminokwasów, jak i ich stężeń w badanym materiale, ułatwiają identyfikację aminokwasów na chromatogramach dwukierunkowych. Według opracowanej przez nas modyfikacji dla odczytywania chromatogramów uwzględnia się: 1) współczynniki R_F , 2) czas występowania zabarwienia, 3) barwę pośrednią i trwałą, 4) natężenie barwy (wizualnie) według dowolnie przyjętego schematu.

Wg tej techniki udaje się na jednym chromatogramie dwukierunkowym najkorzystniej w układzie fenol-woda (7 : 3) i propanol-woda (7 : 3) zidentyfikować większość aminokwasów znajdujących się w mieszaninach wzorcowych w stężeniach około $2,5 \mu g$. Do szczególnie interesujących sukcesów powyższej techniki zaliczyć można: 1) rozdzielenie glicyny, seryny, asparaginy i tauryny, 2) oddzielenie histydyny od argininy, 3) oddzielenie tryptofanu od metioniny i waliny.

Jedynie tylko zespół leucyny, izoleucyny i feniloalaniny nie daje się przy pomocy żadnego ze stosowanych przez nas sposobów rozdzielić. Rozdzielenie tych aminokwasów, podobnie jak i metioniny i waliny, jest możliwe przy pomocy innego układu rozpuszczalników rozwijającego chromatogram dwukierunkowy.

LITERATURA

- [1] Block R. J., Durrum R. L., Zweig G., *A Manual of Paper Chromatography and Paper Electrophoresis*, New York 1955.
- [2] Borkowski T., *Acta Biochim. Pol.* **3**, 333, 1956.
- [3] Consden R., Gordon A. H., Martin A. J. P., *Biochem. J.* **38**, 224, 1944.
- [4] Dent C. E., *Biochem. J.* **43**, 168, 1948.
- [5] Giri K. V., Krishnamurthy K., Venkitasubramanian T. A., *The Lancet* **263**, 562, 1952.
- [6] Jepson J. B., Smith S., *Nature* **172**, 1000, 1953.
- [7] Kirby Berry H., Sutton H. E., Cain L., Berry Y. S., *Univ. Texas Pubs.* **5109**, 22, 1951.
- [8] Linskens H. F., *Papierchromatographie in der Botanik*, Berlin 1955.
- [9] Mathias W., *Naturwiss.* **41**, 17, 1954.
- [10] Moore S., Stein W. H., *J. Biol. Chem.* **192**, 663, 1951.
- [11] Pratt J. J., Auclair J. L., *Science* **108**, 213, 1948.
- [12] Rockland L. B., Underwood J. C., *Anal. Chem.* **26**, 15557, 1954.
- [13] Saifer A., Oreskes J., *Anal. Chem.* **28**, 501, 1956.
- [14] Schlögl K., Siegel A., *Z. Physiol. Chem.* **292**, 263, 1953.
- [15] Schwerdfeger E., *Naturwiss.* **40**, 201, 1953.
- [16] Stöckli A., *Helv. Chim. Acta* **37**, 1581, 1954.
- [17] Troll W., Keith Cannan R., *J. Biol. Chem.* **200**, 803, 1953.

НОВЫЕ МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ АМИНОКИСЛОТ
НА ХРОМАТОГРАММАХ В ОДНОМ И В ДВУХ НАПРАВЛЕНИЯХ

Резюме

Для проявления аминокислот на бумажных хроматограммах авторы применили холодный нингидриновый тест. Проявление нингидрином в комнатной температуре обладает тем преимуществом над всеобщим применяемым проявлением при температуре 100°, что создает возможности проследить время выступления отдельных пятен и промежуточных окрасок.

Новые показатели, выражая как особенности, так и концентрации аминокислот в исследуемом материале, облегчают идентификацию аминокислот на хроматограммах в двух направлениях. Согласно разработанной нами модификации читки хроматограмм, принимаются во внимание:

- 1) коэффициенты,
- 2) время выступления окраски,
- 3) промежуточная и постоянная окраска,
- 4) интенсивность окраски (визуально) по произвольно принятой схеме.

Пользуясь такого рода техникой, удастся на одной хроматограмме в двух направлениях в системе фенол-вода (7:3) и пропанол-вода (7:3), наиболее выгодным образом, идентифицировать большинство аминокислот, находящихся в стандартных смесях при концентрациях приблизительно 2,5 г.

К особенно интересным успехам вышеуказанной техники следует причислить:

- 1) разделение глицина, серина, аспарагина и таурина,
- 2) отделение гистидина от аргинина,
- 3) отделение триптофана от метионина и валина.

Только комплекса лейцина, изолейцина и фенилаланина не удается разделить ни одним из применяемых нами методов. Разделение этих аминокислот, равно как метионина и валина, возможно путем иной системы, развивающей хроматограмму в двух направлениях.

NEW METHODS FOR IDENTIFICATION OF AMINO ACIDS ON ONE AND TWO-DIMENSIONAL CHROMATOGRAMS

Summary

The cold ninhydrine test was used for developing amino acids on paper chromatograms. Developing with ninhydrine at room temperature has the advantage — as compared with the method of developing at 100° C — that it makes it possible to record time as the spots and intermediate shades successively appear.

New indicators based on the particularities of the amino acids as well as on their concentration in the material investigated, facilitated identification on two-dimensional chromatograms.

In confirmity with the modified method of reading chromatograms elaborated by the author, the following points are taken into account:

- 1) R_F coefficients,
- 2) time of appearance of colours,
- 3) intermediate and stable colours,
- 4) colour intensity (visual) according to any arbitrary scheme.

By this technique, and on a single chromatogram, most amino acids contained in standard mixtures at a concentration of ca. 2,5 g. may be identified, preferably in the system phenol-water (7:3) and propanol-water (7:3). The following are examples of the most successful application of this technique:

- 1) the partition of glycine, serine, asparagine and taurine,
- 2) partition of histidine and arginine,
- 3) partition of tryptophane from methionine and valine.

Only the group including leucine, isoleucine and phenylalanine cannot be separated by our methods.

The separation of these amino acids as well as methionine and valine is possible by means of another system involving two-dimensional chromatography.

Otrzymano 3.9.1956 r.

J. PAWEŁKIEWICZ

BADANIA NAD BIOSYNTEZĄ ZWIĄZKÓW KOBALAMINOWYCH

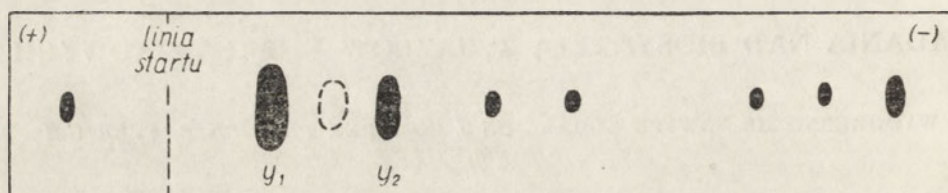
WYODRĘBNIE NIE NOWYCH KOBALAMIN Z KOMÓREK *PROPIONIBACTERIUM SHERMANII**Z Katedry Chemii Ogólnej Wyższej Szkoły Rolniczej w Poznaniu**Kierownik Katedry: doc. dr J. Pawełkiewicz*

Bakterie kwasu propionowego z gatunku *Propionibacterium shermanii* syntetyzują znaczne ilości związków kobalaminowych, a mianowicie witamin B_{12p} (czynnik B) oraz mniejsze ilości witaminu B_{12} i innych, nie określonych dotąd kobalamin [8, 9, 10].

Ten sam mikroorganizm hodowany na półsyntetycznych pożywkach ubogich w jonowe żelazo (do $0,1 \mu\text{g Fe}^{++}/\text{ml}$) wytwarza dużo wolnej koproporfiryny III [12]. Pawełkiewicz i Zodrow wykazali, że brak jonów żelazawych w pożywkach wpływa nie tylko na pojawianie się w hodowli wolnych porfiryn, lecz również na biosyntezę związków kobalaminowych [12]. Autorzy ci stwierdzili pojawianie się w komórkach bakteryjnych większych ilości nowej hydrofilnej kobalaminy, obok syntetyzowanego normalnie witaminu B_{12p} . Widmo absorpcyjne nowego związku było identyczne z widmem witaminu B_{12p} . Pojawianie się hydrofilnej, nie ekstrahującej się alkoholem benzylovym kobalaminy obserwowano wielokrotnie w czasie badań nad biosyntezą tych związków przez *Propionibacterium shermanii*. Jednak szczególnie dużo powyższej kobalaminy powstaje w hodowlach ubogich w jonowe żelazo w warunkach, w których bakterie propionowe syntetyzują równocześnie wolną koproporfirynę III. Analizy ilościowe wykazały, że w tych hodowlach ilość nowej kobalaminy dochodzi do 45% wszystkich związków kobalaminowych, co wskazuje na bardzo istotną rolę jonów żelaza w biosyntezie związków z grupy witaminu B_{12} .

Już pierwsze próby frakcjonowania hydrofilnej kobalaminy wykazały, że nie jest to substancja jednorodna. Metodą jonoforezy bibułowej, przy użyciu kwasu octowego jako elektrolitu przewodzącego [7], rozdzielono nową kobalaminę na 2 główne frakcje, które nazwano frakcjami y1

i y_2 . Występująca w przewodzie frakcja y_1 okazała się w warunkach jonoforezy substancją słabo kwaśną, a ilościowo mniejsza frakcja y_2 , słabo zasadową. Nadto stwierdzono występowanie w ilościach znacznie mniejszych lub śladowych 6 innych związków kobalaminowych. Rys. 1 przedstawia schematycznie rozmieszczenie na jonoforogramie poszczególnych frakcji znajdujących się w surowej hydrofilnej kobalaminie. W dalszej części pracy opisano właściwości frakcji y_1 i y_2 .



Rys. 1. Schemat jonoforogramu hydrofilnych kobalamin wyodrębnionych przez Pawełkiewicza i Zodrę [12] z komórek *Propionibacterium shermanii*. Miejsce zaznaczone kreskowaną linią wskazuje względne położenie witaminy B_{12} na jonoforogramie.

Wyodrębnione przez Pawełkiewicza i Zodrę hydrofilne kobalaminy mogą być produktami pośrednimi biosyntezy witaminy B_{12} i dlatego ich poznanie może się przyczynić do zrozumienia mechanizmu tej biosyntezy.

Część doświadczalna

1. HODOWLA *PROPIONIBACTERIUM SHERMANII* I METODA WYODRĘBNIEŃIA HYDROFILNEJ KOBALAMINY

Metodę hodowli bakterii propionowych jak i metodę wyodrębniania nowej kobalaminy opisali uprzednio Pawełkiewicz i Zodrę [12].

Według tej metody w pierwszej izoluje się witamin B_{12p} i B_{12} . Izolacja tych witamin polega na ich ekstrakcji alkoholem benzylowym z rozcieńzonego wodnego roztworu uprzednio wysyconego chlorkiem sodowym i zadanego nadmiarem NaCN . W tych warunkach hydrofilna kobalamina pozostaje w fazie wodnej. Z obojętnego lub słabo kwaśnego roztworu wodnego można ją zaadsorbować na węglu aktywowanym i oczyścić w znany sposób [8]. Zamiast adsorpcji na węglu można również użyć metody ekstrakcyjnej, wytrząsając słabo kwaśny roztwór z roztworem fenolu i chloroformu (1 : 1, v/v). Celem zmniejszenia ciężaru właściwego roztworu wodnego (wysyconego NaCl) należy przed ekstrakcją rozcieńczyć go równą objętością wody. Związki kobalaminowe przechodzą teraz do fazy fenolowej. Roztwór fenolowy sączy się przez sączek zwilżony roztworem fenolu w chloroformie. Do klarownego przesączu dodaje się 0,5 objętości *n*-butanolu i 1 objętość chloroformu, po czym kobalaminy reekstrahuje

się małymi porcjami wody. Połączone wyciągi wodne wytrząsa się 3-krotnie z chloroformem i odparowuje pod zmniejszonym ciśnieniem do sucha.

2. ROZDZIAŁ HYDROFILNEJ KOBALAMINY NA FRAKCJE y_1 i y_2

Stężony roztwór hydrofilnej kobalaminy nanoszono w formie wąskiego paska na bibułę Whatman nr 3 i poddawano elektroforetycznemu rozdzielaniu w 2 N CH_3COOH z dodatkiem 0,015 proc. NaCN wg. metody Holdswortha [7] przy gradieńcie napięcia ok. 8 Volt/cm. Z rozwiniętego elektroforogramu wycinano paski bibuły zawierające frakcje y_1 i y_2 i eluowano je wodą zawierającą ślady NaCN (dla zubożenia śladów kwasu octowego). Frakcje y_1 i y_2 po zagęszczeniu pod zmniejszonym ciśnieniem ponownie poddawano oczyszczaniu elektroforetycznemu. Oczyszczone w ten sposób frakcje służyły do dalszych badań.

3. WŁASNOŚCI FIZYKO-CHEMICZNE FRAKcji y_1 i y_2

Frakcji y_1 i y_2 nie udało otrzymać się w postaci krystalicznej. Pod tym względem są one podobne do witaminu B_{12p} (czynnika B), który również nie krystalizuje. Widma absorpcyjne obu frakcji są także identyczne z widmem witaminu B_{12p} i posiadają maksima absorpcji w pasmach 320, 354—355, 496—498, i 525—530 m μ . Własności te wskazują na brak nukleotydu w cząsteczkach obu kobalamin. Otrzymane koncentraty frakcji y_1 i y_2 są nierozpuszczalne w metanolu i acetonie. Oba związki dają trwale pochodne dwucyjanowe w roztworze obojętnym i słabo kwaśnym. Plamy tych pochodnych na bibule utrzymują dość długo fioletkowe zabarwienie typowe dla tych związków nawet w stanie wysuszonego. Elektroforeza bibułowa przeprowadzona w buforze fosforanowym o pH 6,5 (0,05 M bufor fosforanowy z dodatkiem 0,015 proc. NaCN) wskazuje na kwaśny charakter kobalaminy y_1 i y_2 , przy czym frakcja y_1 wędruje nieco szybciej niż frakcja y_2 . W buforze o pH 7 kobalamina y_1 wędruje 2 razy szybciej niż witamin B_{12} . Chromatografia bibułowa przeprowadzona na bibule Whatman Nr 1 metodą wstępującą dała dla frakcji y_1 i y_2 wartości R_f 0,03 i 0,09 (rozpuszczalnik: wysycony wodą sek.-butanol zawierający 0,19 proc. trójchlorooctanu sodowego i ślady cyjanku sodowego, [5]). Witamin B_{12} daje plamy o $R_f = 0,23$ a witamin B_{12p} o $R_f = 0,42$. W kwaśnym rozpuszczalniku (100 ml wysyconego wodą sek.-butonolu + 1 ml CH_3COOH + ślady NaCN) wartości R_f dla frakcji y_1 , y_2 , wit. B_{12} i wit. B_{12p} wynosiły odpowiednio: 0,02; 0,04; 0,19; i 0,34.

4. CZYNNOŚĆ MIKROBIOLOGICZNA FRAKcji y_1 i y_2

Mikrobiologiczną aktywność frakcji y_1 i y_2 zbadano przy pomocy mutantu *Escherichia coli* metodą płytową wg Boguckiej, Iwanowskiej i Kąkol [1], oraz przy pomocy *Euglena gracilis* wg metody

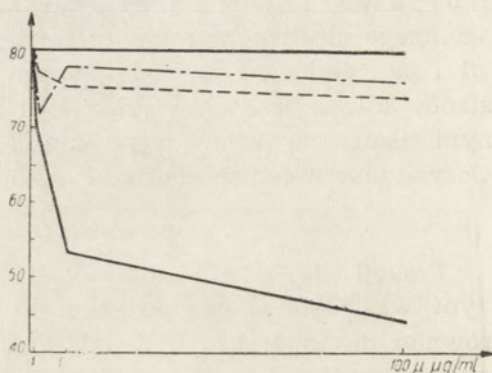
Heinricha [6]. Wobec *E. coli* frakcje *y1* i *y2* wykazywały podobną czynność jak witamin B_{12p} . Strefy wzrostu wywołane tymi kobalaminami są mniej wyraźne (dyfuzyjne), od analogicznych stref wzrostowych wywołanych obecnością witaminu B_{12} , chociaż przy tych samych stężeniach porównywanych substancji znacznie szersze. W tabelicy 1 podano średnice plam wzrostu dla obu frakcji i witaminu B_{12} .

Tabela 1

Średnica plam wzrostu *Escherichia coli* w mm*)

Stężenie w $\mu\text{g/ml}$	Witamin B_{12}	Frakcja <i>y1</i>	Frakcja <i>y2</i>
10	10,5	12	11,5
100	12,5	19,5	13,5
250	13,5	21	17

*) Na zestaloną pożywkę agarową nakładano krążki o średnicy 10 mm bibuły Whatman Nr 1 uprzednio zwilżone w roztworze o określonym stężeniu czynnika wzrostowego i wysuszone przed nałożeniem na płytę.



Rys. 2. Aktywność wzrostowa witamin B_{12} (—) frakcji *y1* (— · — ·) i frakcji *y2* (— · — ·) dla *Euglena gracilis*. Na osi rzędnych zaznaczono wartości procentowej przepuszczalności światła acetonowych wyciągów chlorofilu z komórek *Euglena gracilis*. Na osi odciętych stężenia substancji wzrostowych w $\mu\text{g/ml}$

Czynność wzrostowa mierzona metodą *Euglena gracilis* wynosiła dla kobalaminy *y1* ok. 10% aktywności witaminu B_{12} , przy czym wyraźnie zaznaczał się hamujący wpływ tego związku w stężeniach większych niż 1 $\mu\text{g/ml}$ (Rys. 2). Nieco większą aktywność, bo ok. 15% aktywności witaminu B_{12} , wykazywała kobalamina *y2*, u której nie obserwowano hamującego wpływu w miarę wzrostu jej stężenia (Rys. 2). Przedstawione wyżej badania aktywności mikrobiologicznej frakcji *y1* i *y2* wykonał w Katedrze Mikrobiologii Rolnej doc. dr K. Z o d r o w, za co składam mu serdeczne podziękowanie.

5. PRÓBY MIKROBIOLOGICZNEJ SYNTEZY WITAMINU B_{12p} I B_{12} Z FRAKCJI *y1* I *y2*

Dla zorientowania się, czy frakcje *y1* i *y2* mogą być związkami pośrednimi biosyntezy witaminu B_{12p} i B_{12} , wykonano dwa doświadczenia, w których do dwudniowej hodowli *Propionibacterium shermanii* na pożywce nie zawierającej kobaltu dodano określone ilości frakcji *y1* i *y2*.

W tym celu rozmnożono w ciągu 2 dni inkubacji bakterie kwasu propionowego na półsyntetycznej pożywce opisanej w publikacji Pawełkiewicza i Zodrówca [12], lecz nie zawierającej soli kobaltowych, natomiast zawierającej sole żelazawe w ilości $2,5 \mu\text{g Fe}^{++}/\text{ml}$ (dodane w postaci jałowego roztworu FeSO_4). Następnie do jednej hodowli dodano sterylnie $420 \mu\text{g}$ frakcji y_1 , a do drugiej $235 \mu\text{g}$ frakcji y_2 . (Ilość dodanych frakcji określono spektrofotometrycznie mierząc absorpcję dodawa-

Tablica 2

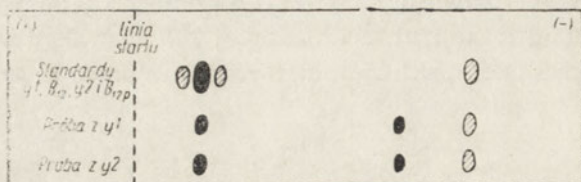
Intensywność rozwoju bakterii propionowych na pożywce bez soli Co^{++}

Próba	Obj. w ml 25% Na_2CO_3 zużytego do neutralizacji kwasów	Sucha masa komórek w 15 ml hodowli w mg
Kontrolna	17	10,7
Z dodatkiem $420 \mu\text{g}$ frakcji $y_1/0,5 \text{ l}$	50	34,4
Z dodatkiem $235 \mu\text{g}$ frakcji $y_2/0,5 \text{ l}$	48	35,9

nego roztworu dla fali $580 \text{ m}\mu$ po przeprowadzeniu odnośnej kobalaminy w kompleks dwucyjanyowy i przyjmujące $E_{1 \text{ cm}}^{1\%} = 105$). Trzecią próbę traktowano jako kontrolną. Przed dodaniem obu kobalamin hodowle posiadały sine podbarwienie, które ustąpiło w czasie dalszej hodowli, lecz pozostało niezmienione w próbie kontrolnej. Od momentu dodania związków kobalaminowych kultury hodowano dalsze 8 dni. W trakcie hodowli dodawano dwukrotnie do wszystkich prób w sumie po 15 ml 20 proc. roztworu glukozy, a tworzące się kwasy organiczne zobojętniano 25% roztworem węglańu sodowego. W tablicy 2 zestawiono objętości zużytego do neutralizacji roztworu węglańu sodowego, jak również wagę suchej masy komórek badanych hodowli.

Dane tablicy 2 wskazują wyraźnie na różnicę intensywności rozwoju bakterii propionowych w próbie kontrolnej w porównaniu z próbami z dodatkiem kobalaminy y_1 i y_2 . Sole kobaltu wydają się być niezbędne dla normalnego rozwoju *Propionibacterium shermanii*. Rolę soli kobaltowych mogą spełniać kobalaminy y_1 i y_2 . Z faktów tych wypływa wniosek, że dla bakterii propionowych sole kobaltu są potrzebne do syntezy kobalaminy, oraz że ostatnie związki muszą w nich spełniać ważną funkcję.

Po zakończeniu hodowli odwirowano komórki, dwukrotnie przemyto je 0,8% roztworem NaCl i następnie zawieszano w 200 ml wody zawierającej ok. 50 mg NaCN. Po zakwaszeniu roztworu 5 N H₂SO₄ do pH 6,5 próby autoklawowano 15 minut w temperaturze 110°. Po ostudzeniu



Rys. 3. Schemat jonoforogramu kobalamin wyodrębnionych z komórek *Propionibacterium shermanii* hodowanych na pożywkach bez Co⁺⁺ a z dodatkiem kobalamin y1 i y2.

Barwy plam zaobserwowane po dłuższym przecho-
wywaniu jonoforogramu:

- czerwono-fioletowa
- pomarańczowo-żółta

usuowano z roztworu substancje stałe drogą wirowania, a z klarownego płynu ekstrahowano kobalaminy roztworem fenolu w chloroformie (1 : 1, v/v). Po dalszym oczyszczeniu, jak opisano w pkt. 1, wyodrębnione kobalaminy rozdzielono elektroforetycznie w 2 N CH₃COOH wg Holdswortha [7]. W próbie kontrolnej nie stwierdzono kobalamin. Uzyskane w ten sposób „obrazy kobalaminowe” bakterii propionowych przedstawia schemat na rys. 3.

Z doświadczeń elektroforetycznych wynika, że komórki *Propionibacterium shermanii* hodowane na pożywkach pozbawionych Co⁺⁺ wykorzystują podane im w pożywce kobalaminowe frakcje y1 i y2 i przekształcają je co najmniej w 3 inne kobalaminy. Kobalaminy te można zidentyfikować, na podstawie położenia oraz barwy na bibule elektroforogramu, jako witamin B_{12p} i witamin B₁₂. Trzecia kobalamina jest prawdopodobnie 2-metyloadeninocyjanokobalamina (czynnik A).

Omówienie wyników

W trakcie badań nad produkcją wolnych porfiryn przez bakterie kwasu propionowego z gatunku *Propionibacterium shermanii* hodowanych na półsyntetycznych pożywkach ubogich w jonowe żelazo (ca. 0,1 µg Fe⁺⁺/ml) Pawełekiewicz i Zódrów stwierdzili pojawienie się w komórkach tego drobnoustroju nowej hydrofilnej kobalamin [12]. W pracy niniejszej wykazano, że otrzymany poprzednio związek nie jest substancją jednorodną, lecz jest złożony głównie z dwóch związków, któ-

re nazwano kobalaminami y_1 i y_2 . Opisano szereg cech fizyko-chemicznych oraz własności mikrobiologicznych tych związków.

Pojawienie się w dużych ilościach (do 45% wszystkich kobalamin) kobalaminowych frakcji y_1 i y_2 w hodowlach ubogich w jonowe żelazo pozwala wysnuć wniosek, że nowo izolowane związki są albo produktami pośrednimi biosyntezy witaminu B_{12p} i dalej witaminu B_{12} produkowanymi w hodowlach tych bakterii na doborowych pożywkach, albo też są produktami nienormalnego metabolizmu związków kobalaminowych, podobnie jak koproporfiryna III jest nienormalnym produktem przemian porfiryn [2]. Jak wiadomo koproporfiryna III nie jest zużywana do dalszych przemian w łańcuchu przemian porfiryńowych, podczas gdy np. uroporfiryna III będąca produktem pośrednim tych przekształceń ulega

Tablica 3

Podobieństwo kobalamin y_1 i y_2 z czynnikami C_1 i C_2

Cechy	K o b a l a m i n y			
	y_1	y_2	C_1	C_2
Własności elektroforetyczne przy pH 6,5	kwaśna	kwaśna	kwaśna	kwaśna
Chromatografia bibuł. sek. butanol: $\text{CH}_3\text{COOH}:\text{NaCN}$ wartości R_f	0,02	0,04	0,02	0,04
Aktywność mikrobiologiczna*)				
a) <i>E. coli</i> mutant	+++	+++	+++	+++
b) <i>Euglena gracilis</i>	+	+	+	+

Dane dla czynników C_1 i C_2 wg Kona [11]

*) +++ aktywność równa lub większa niż aktywność wit. B_{12}
+ aktywność ok. 15% aktywności wit. B_{12} .

dalszym zmianom. W analogiczny sposób starano się odpowiedzieć na postawione w niniejszej pracy pytanie i stwierdzono, że bakterie propionowe hodowane na pożywkę bez Co^{++} przekształcają podane im kobalaminy y_1 i y_2 w witamin B_{12p} , witamin B_{12} oraz prawdopodobnie w 2-metyloadeninocyanokobalaminę (czynnik A). Wynika stąd, że nowo izolowane frakcje y_1 i y_2 są zapewne produktami pośrednimi biosyntezy powyższych kobalamin. Jednak nie jest wykluczona, chociaż mniej prawdopodobna i inna droga przemian frakcji y_1 i y_2 . Mianowicie związki te mogą ulec najpierw rozkładowi z uwolnieniem kobaltu, z którego na-

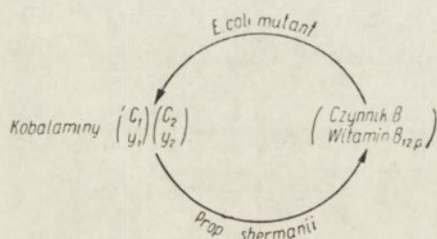
stępnie zsyntetyzowane zostają *de novo* witamin B_{12p} , witamin B_{12} i 2-metyloadeninocyjanokobalamina.

Z pomiarów intensywności wzrostu bakterii propionowych (Tablica 2) stwierdzono, że związki kobalaminowe są niezbędne dla silnego rozwoju tych bakterii. Z drugiej strony w syntezie kobalamin pewną rolę odgrywać muszą sole żelazawe, gdyż ich niedobór hamuje proces powstawania końcowych związków tej grupy.

Własności fizyko-chemiczne kobalaminy y_1 i y_2 , np. zachowanie się elektroforetyczne, dane chromatograficzne, jak również ich aktywność mikrobiologiczna wskazują na daleko idące podobieństwo lub ich identyczność z tzw. czynnikami C_1 i C_2 Forda i Portera (Tablica 3).

Czynnikiem C nazwali Ford i Porter jedną z kobalamin wyodrębnioną w roku 1952 z kału cieląt [4]. Później wykazano, że substancję tę można rozdzielić metodą elektroforezy lub chromatografii bibułowej na 2 związki, które nazwano czynnikami C_1 i C_2 [11]. W literaturze brak jest dotąd bliższych danych

tyczących tych związków, ponieważ nie izolowano ich dotychczas w większych ilościach, a ich obecność stwierdza się zazwyczaj metodami autobiograficznymi. Jest rzeczą wielce interesującą, że czynnik C powstaje z czynnika B (wit. B_{12p}) w komórkach



Rys. 4. Przemiany kobalaminy y_1 i y_2 (C_1 i C_2) oraz witaminu B_{12} (czynnika B)

kach mutantu *Escherichia coli*, mikroorganizmu używanego do oznaczania witaminów grupy B_{12} [3]. Zakładając identyczność kobalaminy y_1 i y_2 oraz C_1 i C_2 mielibyśmy tutaj do czynienia z procesem odwrotnym, jaki zachodzi w komórkach *Propionibacterium shermanii*.

Oba procesy przedstawia schematycznie rys. 4.

Streszczenie

1. Stwierdzono, że szczep bakterii propionowych z gatunku *Propionibacterium shermanii* hodowany na pożywce półsyntetycznej pozbawionej jonowego żelaza wytwarza obok witaminu B_{12p} (czynnika B) i witaminu B_{12} , 2 nowe kobalaminy, które nazwano y_1 i y_2 . W hodowlach tych ilość kobalaminy y_1 i y_2 dochodzi do 45% wszystkich związków tej grupy, ze znaczną przewagą kobalaminy y_1 w stosunku do y_2 .

2. Kobalaminy y_1 i y_2 posiadają widma absorpcyjne identyczne z widmem witaminu B_{12p} (czynnika B). Można je oddzielić od siebie i od witaminu B_{12p} metodami elektroforezy lub chromatografii bibułowej. Kobalaminy y_1 i y_2 nie udało otrzymać się w postaci krystalicznej.

3. Dane fizyko-chemiczne oraz aktywność mikrobiologiczna kobalaminy y_1 i y_2 wskazuje na daleko idące podobieństwo lub identyczność tych związków z czynnikami C_1 i C_2 Forda i Portera.

4. Bakterie propionowe z gatunku *Propionibacterium shermanii* przekształcają dodane do pożywki kobalaminy y_1 i y_2 w witamin B_{12p} , B_{12} oraz 2-metyloadeninocyjanokobalaminę (czynnik A).

5. Obecność soli kobaltowych w pożywkach jest konieczna do bujnego wzrostu bakterii propionowych. Rolę soli kobaltu spełniają również nowo wyodrębnione kobalaminy y_1 i y_2 .

LITERATURA

- [1] Bogucka J., Iwanowska J., Kąkol H., *Przemysł Chem.* 9, 14, 1953.
- [2] Flak J. E., Dresel E. I. B., Rimington C., *Nature* 172, 292, 1953.
- [3] Ford J. E., Kon S. K., Porter J. W. G., *Biochem. J.* 52, VIII, 1952.
- [4] Ford J. E., Porter J. W. G., *Biochem. J.* 51, V, 1952.
- [5] Friedrich W., Gross G., Bernhauer K., *Mikrochimica Acta*, 134, 1956.
- [6] Heinrich H. C., Lahann H., *Z. Naturforsch.* 8b, 589, 1953.
- [7] Holdsworth E. S., *Nature* 171, 148, 1953.
- [8] Janicki J., Pawełkiewicz J., *Acta Biochim. Pol.* 1, 307, 1954.
- [9] Janicki J., Pawełkiewicz J., *Bull. Acad. Pol. Sci., Cl. II*, 3, 5, 1955.
- [10] Janicki J., Pawełkiewicz J., *Acta Biochim. Pol.* 2, 329, 1955.
- [11] Kon S. K., *Biochem. Soc. Symp.* 13, 17, 1955.
- [12] Pawełkiewicz J., Zodrow K., *Acta Biochim. Pol.* 3, 225, 1956.

ИССЛЕДОВАНИЯ ПО БИОСИНТЕЗУ КОВАЛАМИНОВЫХ СОЕДИНЕНИЙ. ИЗОЛИРОВАНИЕ НОВЫХ КОВАЛАМИНОВ ИЗ КЛЕТОК *PROPIONIBACTERIUM SHERMANII*

Резюме

1. Констатировали, что штамм пропионовых бактерий вида *Propionibacterium shermanii*, культивированный в полусинтетической питательной среде, лишенной ионного железа, образует наряду с витамином B_{12p} (фактор В) и витамином B_{12} , два новых кобаламина, названных авторами y_1 и y_2 . В этих культурах количество кобаламинов y_1 и y_2 достигает 45% всех соединений этой группы с значительным перевесом кобаламина y_1 над y_2 .

2. Кобаламины y_1 и y_2 обладают абсорбционными спектрами, идентичными со спектром витамина B_{12p} (фактор В). Их можно отделить друг от друга и от витамина B_{12p} , пользуясь методами электрофореза или бумажной хроматографии. Не удалось получить кобаламинов y_1 и y_2 в кристаллическом виде.

3. Физико-химические данные, а также микробиологическая активность кобаламинов y_1 и y_2 указывают на далеко идущее сходство или идентичность этих соединений с факторами C_1 и C_2 Форда и Портера.

4. Пропионовые бактерии вида *Propionibacterium shermanii*, преобразовывают кобаламины y_1 и y_2 , прибавленные к питательной среде, в витамин B_{12p} , B_{12} , а также в 2-метиладенинцианокобаламин (фактор А).

5. Присутствие солей двувалентного кобальта в питательных средах необходимо для буйного роста пропионовых бактерий. Роль солей кобальта исполняют также новоизолированные кобаламины y_1 и y_2 .

STUDIES ON THE BIOSYNTHESIS OF COBALAMINE COMPOUNDS

ISOLATION OF NEW COBALAMINES FROM CELLS OF *PROPIONIBACTERIUM SHERMANII*

Summary

1. It has been established that a strain of *Propionibacterium shermanii*, grown on a semisynthetic iron-free nutrient produced, in addition to vitamins B_{12p} (factor B) and B_{12} also two new cobalamines which have been termed y_1 and y_2 . Cobalamines y_1 and y_2 account for up to 45 per cent of all the compounds of this group present in the cultures, cobalamine y_1 predominating over y_2 .

2. The absorption spectra of cobalamines y_1 and y_2 are identical with that of vitamin B_{12p} (factor B). They can be separated from each other and from vitamin B_{12p} by electrophoretic methods or by paper chromatography. Attempts to obtain cobalamines y_1 and y_2 in the crystalline form have failed.

3. Physico-chemical data and microbiological activity indicate that cobalamines y_1 and y_2 are very similar to, or possibly even identical with, the factors of C_1 and C_2 of Ford and Porter.

4. Propionic bacteria of the species *Propionibacterium shermanii* transform cobalamines y_1 and y_2 added to the nutrient medium, into vitamins B_{12p} and B_{12} and into 2-methyladeninecyanocobalamine (factor A).

5. Presence of cobalt in nutrients is indispensable for prolific growth of propionic bacteria, but these salts may be successfully replaced by cobalamine y_1 and y_2 .

Otrzymano 3.9.1956 r.

Z. KOCHAŃSKA i D. SHUGAR

**W SPRAWIE DEZAMINACJI PURYN PODCZAS KWAŚNEJ
HYDROLIZY KWASÓW NUKLEINOWYCH***Z Pracowni Biofizyki Zakładu Biochemii PAN w Warszawie*

Hydroliza kwaśna jest często stosowana do rozszczepienia kwasu rybonukleinowego (RN) w celach analitycznych na wolne puryny i nukleotydy pirymidynowe. Po hydrolizie w 1 N HCl (lub w innym kwasie) uzyskane produkty rozkładu rozdziela się przy pomocy chromatografii bibułowej, chromatografii na wymiennikach jonowych lub też przez wytrącenie puryn w postaci soli srebrowych [4]. Mimo doniesień szeregu autorów o ilościowym odzyskiwaniu puryn w takiej procedurze Abrams [1] stosując metodę rozcieńczeń izotopowych oraz metodę chromatografii na wymiennikach jonowych, stwierdził 70%-owy ubytek każdej z puryn; przyczynę tego ubytku Abrams upatruje w pierwszym rzędzie w dezaminacji przypuszczalnie zachodzącej podczas hydrolizy.

Pomimo poważnego udokumentowania poglądu przeciwnego, o braku strat w purynach podczas hydrolizy, wydawało się nam, że wyniki Abramsa mogą być słuszne, jeśli produkty dezaminacji adeniny i guaniny — hipoksantyna i ksantyna — posiadają te same wartości R_f w rozpuszczalnikach zazwyczaj używanych w chromatografii bibułowej kwasu rybonukleinowego. Również przy wytrącaniu puryn solami srebrowymi produkty dezaminacji guaniny i adeniny wytrącają się razem z guaniną i adeniną i chociaż ich absorpcja różni się od absorpcji związków macierzystych, to jednak absorpcja ta jest jeszcze wystarczająca, tak że pewien procent dezaminacji mógł ujść dotychczasowej uwadze.

Stwierdziliśmy, że rzeczywiście w rozpuszczalnikach najczęściej stosowanych w chromatografii bibułowej produktów hydrolizy kwasu RN, mianowicie w rozpuszczalniku Markhama i Smitha [5] lub w innych podobnych rozpuszczalnikach, ksantyna i hipoksantyna wykazują w przybliżeniu takie same wartości R_f , jak guanina względnie adenina.

Ze względu na wielokrotne wysiłki poświęcone analizie składników kwasów nukleinowych uważaliśmy za wskazane zbadać, czy dezaminacja

puryn rzeczywiście ma miejsce podczas hydrolizy kwaśnej i jeśli tak, jaki może mieć wpływ na wyniki analiz.

W tym celu wybraliśmy rozpuszczalnik do rozwijania chromatogramu puryn, w którym wartości R_f dla guaniny i ksantyny jak też dla adeniny i hipoksantyny są wystarczająco odległe od siebie: jest to układ Cartera [3] składający się z 5% wodnego roztworu Na_2HPO_4 nasyconego alkoholem amyłowym. Próbki adeniny, guaniny, ksantyny i hipoksantyny pochodziły z firm „Schwarz” i „La Roche”. Guaninę i adeninę hydrolizowano w 1 N HCl w temp. 100° przez 60 min. w probówkach ze szlifem.

Badano hydrolizaty w ilości wystarczającej do wykrycia dezaminowanej pochodnej, nawet gdyby dezaminacja zachodziła tylko w 0,5%. Obok hydrolizatu danej puryny umieszczano na bibule dla porównania roztwór tej puryny w stężeniu równym stężeniu hydrolizatu oraz małe ilości handlowej próbki dezaminowanej pochodnej.

Dodatkowe plamy otrzymane na chromatogramach — przypuszczalne dezaminowane pochodne — eluowano 0,1 N HCl w przypadku adeniny i 0,01 N HCl w przypadku guaniny.

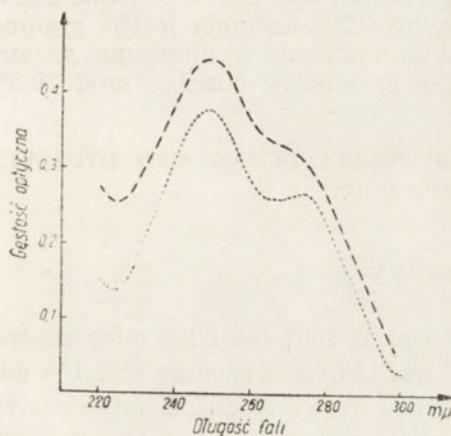
Ekstrahowane substancje identyfikowano przez porównywanie ich wartości R_f i kształtu krzywej absorpcyjnej z odpowiednimi ekstraktami chromatografowanych próbek handlowych. Spektrofotometryczne oznaczanie krzywej absorpcyjnej dostarczało zarazem danych potrzebnych do obliczenia stężenia. Chromatografując znane ilości substancji macierzystych, można było stwierdzić, jaki procent ulega dezaminacji.

W przypadku adeniny stwierdzono około 1,5% (od 1 do 2%) dezaminacji.

Jeśli chodzi o guaninę, nie tylko hydrolizat, ale również i roztwór oddzielał na chromatogramie dodatkową plamę. Identyfikując eluaty tych plam stwierdzono, że kształt ich krzywych absorpcji odpowiada całkowicie krzywej absorpcji guaniny przy danym pH (według danych Beavena, Holidaya i Johnsona [2]); okazało się więc, że pewna mała część guaniny (około 3 do 5%) przemieszcza się w rozpuszczalniku Cartera, podczas gdy cała reszta guaniny nie rusza z miejsca. Przemieszczanie się takiej ilości guaniny w rozpuszczalniku Cartera można było stwierdzić tylko w naszych warunkach doświadczalnych, gdzie chromatografowano szczególnie duże ilości substancji — od 200 do 300 μg — celem uchwycenia jak najmniejszych ilości dezaminowanej pochodnej.

Ponieważ stężenie tej wędrującej części guaniny było nieco większe w przypadku hydrolizatu, można było przypuszczać, że w tej przemieszczającej się części hydrolizatu jest jakaś domieszka ksantyny. Celem sprawdzenia tego przypuszczenia dodano do chromatografowanych ilości 250 μg — guaniny w roztworze i guaniny hydrolizowanej, po 5 μg ksan-

tyny, chcąc stwierdzić, czy takie ilości ksantyny stanowiące 2% guaniny, będą wpływały na zmianę krzywej absorpcyjnej. Okazało się, że krzywe absorpcji wędrującej części guaniny uległy wyraźnemu zniekształceniu, otrzymana krzywa, jak można było oczekiwać, stanowiła krzywą addy-



Rys. 1. Wpływ ksantyny na krzywą absorpcji guaniny. Ekstrakt dodatkowej płamy:

..... hydrolyzatu guaniny — 250 µg
 - - - - - hydrolyzatu guaniny — 250 µg
 + 5 µg ksantyny

tywną absorpcji guaniny i absorpcji ksantyny. Wpływ dodatku ksantyny pokazany jest na wykresie (Rys. 1).

Z wyniku tego doświadczenia można wnioskować, że oddzielająca się frakcja guaniny nie zawiera domieszki ksantyny, a w każdym razie nie zawiera jej w ilości przekraczającej 0,5%, gdyż sądząc ze zmian kształtu krzywej, spowodowanych 2% dodatkiem ksantyny, domieszka większa niż 0,5% musiałaby zmienić w sposób dostrzegalny przebieg krzywej, co nie ma miejsca.

Na podstawie powyższych wyników można twierdzić, że

błąd wynikający z dezaminacji w analizach ilościowego oznaczania składu kwasów nukleinowych, uwzględniając, że w stosowanych powszechnie rozpuszczalnikach produkty dezaminacji nie oddzielają się od swych substancji macierzystych, musi być niewielki i nawet w przypadku adeniny nie przekracza prawdopodobnie 0,5%.

Streszczenie

Hydrolyza kwasów nukleinowych w 1 N HCl w 100° przez 1 godzinę powoduje dezaminację mniej niż 2% adeniny i 1% guaniny. Przy analizie puryn w hydrolyzacie nieuwzględnienie dezaminacji powoduje dla adeniny i guaniny błąd mniejszy od 0,5%; błąd, który można pominąć.

LITERATURA

- [1] Abrams R., *Arch. Biochem.* 30, 44, 1951.
- [2] Beaven G. H., Holiday E. R. and Johnson E. A., „*The Nucleic Acids*” Acad. Press, New York 1955. t. I. rozdz. 14, str. 500.
- [3] Carter C. A., *J. Am. Chem. Soc.* 72, 1465, 1950.
- [4] Chargaff E. and Davidson J. N., „*The Nucleic Acids*” t. I. Acad. Press, New York 1955.
- [5] Markham R. and Smith J. D., *Biochem. J.* 46, 509, 1950.

ПО ВОПРОСУ ДЕЗАМИНАЦИИ ПУРИНОВ
ВО ВРЕМЯ КИСЛОГО ГИДРОЛИЗА НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Резюме

Гидролиз нуклеиновых кислот в 1 N HCl при 100° в течение одного часа вызывает дезаминацию менее, чем 2% аденина и 1% гуанина. При анализе пуринов в гидролизате не принятие во внимание дезаминации ведет относительно аденина и гуанина к ошибке ниже 0,5%, не имеющей значения.

ON THE QUESTION OF DESAMINATION OF PURINES DURING ACID HYDROLYSIS
OF NUCLEIC ACIDS

Summary

Hydrolysis of nucleic acids in 1N acid at 100° for 1 hour for analysis of purines results in desamination of less than 2% adenine and 1% guanine. If this desamination is neglected the errors introduced in the analytical results for adenine and guanine are less than 0.5%, and for all practical purposes may be ignored.

Otrzymano 6.9.1956 r.

D. SHUGAR i F. RZENDOWSKA

BADANIA NAD FOTOCHEMIĄ RYBONUKLEAZY*Z Zakładu Biochemii P.Z.H. w Warszawie*

Badania nad wpływem promieniowania pozafiołkowego na rybonukleazę (RNaza) podjęto w związku z podobnymi badaniami nad lizozymem (Shugar [29]). Ciężar cząsteczkowy obu enzymów wynosi ok. 15 000 i każdy z nich składa się z jednego łańcucha polipeptydowego powiązanego szeregiem mostków siarkowych (Anfinsen i współpr. [1], Fraenkel-Conrat [5]). Brak wolnych grup -SH w lizozymie stwierdzono już dość dawno (Fraenkel-Conrat, [5]) i wydaje się dość pewnym, że podobnie przedstawia się sytuacja także w RNazie (Anfinsen i współpr. [1], Rabinowitch i Barron [23], Shugar [32]). Podobieństwo obu tych enzymów, między innymi ich termostabilność, szczególnie w środowisku kwaśnym (Shugar i Syruczek [33], Gajewska i Shugar [7]), czyni interesującym porównanie wydajności kwantowej przy ich inaktywacji światłem pozafiołkowym. Rybonukleaza, w przeciwieństwie do lizozymu, nie zawiera tryptofanu; ponadto podczas gdy grupy fenolowe lizozymu są wolne (Fromageot i Schnek [6], Shugar [30], w cząsteczce rybonukleazy ok. 40% wchodzi w jakieś wiązania wodorowe i może dysocjować wyłącznie przy alkalicznej denaturacji enzymu (Shugar [30], Tanford i współpr. [34]). Oba te czynniki wpływają na widmo absorpcyjne tych dwóch białek, szczególnie w środowisku alkalicznym, gdy grupy hydroksylowe fenolu dysocjują i prawdopodobnie wpływają na ich zachowanie fotochemiczne.

W poprzedniej pracy [27] wykazano, że lizozym podlega inaktywacji przez fotosensybilizację w obecności ryboflawiny jako fotosensybilizatora, rybonukleaza zaś w identycznych warunkach pozostaje niezmienną i tę różnicę w zachowaniu przypisywano brakowi tryptofanu w RNazie. Nieco później Orlans [22] badając sensybilizowaną fotooksydację przeciwciał, doszedł do wniosku, że polega ona na fotooksydacji pięciocząłowych pierścieni tryptofanu i histydyny; stosował on jako fotosensybilizator eozyne. Ostatnio Weil i Seibles [35] wykazali, że rybonukleaza zostaje inaktywowana z równoczesnym zniszczeniem

reszt histydynowych, w obecności błękitu metylenowego jako uczulacza. Prawdopodobnie zachodzący typ fotooksydacji zależny jest w pewnym stopniu od istoty zastosowanego fotosensybilizatora. Wyniki te są interesujące ze względu na możliwą rolę fotooksydacji w inaktywacji enzymów pod wpływem ultrafioletu (patrz niżej).

Jak doniesiono już poprzednio na podstawie wstępnych pomiarów, wydajność kwantowa inaktywacji RNazy przy długości fali 2537 Å jest nieco większa niż 0,026, lecz nie udało się określić dokładnej wartości, ponieważ zauważono, że w procesie inaktywacji zachodzą jakieś anomalie (Shugar [29]). MacLaren w 1951 [17] podał wartość 0,026, a nieco później w 1953 MacLaren i współpr. [19] proponowali wartość 0,027 przy pH 4,1.

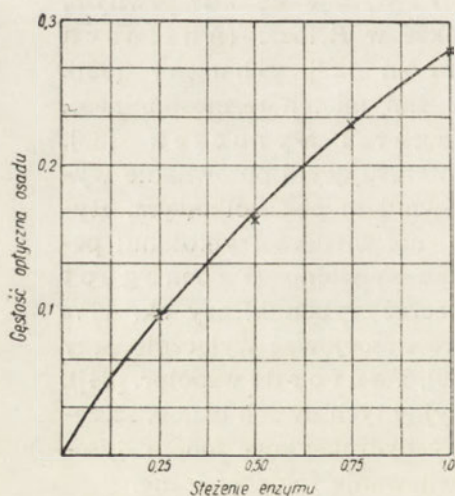
Material i metody

Stosowane próbki rybonukleazy były te same, jak opisane poprzednio [30]. Porównywano także próbki dostarczone przez dra A.D. MacLarena. W początkowej fazie pracy aktywność enzymów mierzono turbidymetrycznie modyfikacją metody

McCarty'ego [15]. Następnie zastosowano poprzednio opisaną [31] metodę kolorymetryczną. Oznaczenie stężenia enzymu i absorpcji w ultrafioletcie opierano na podanych uprzednio (Shugar [30]) stałych spektralnych. Proces naświetlania, pomiar intensywności światła i wyliczenie wydajności kwantowej opisano uprzednio [29] z tym wyjątkiem, że stosowano w czasie obecnej pracy dwie różne lampy rezonansowe firmy Thermal Syndicate. Intensywność światła wpadającego wahała się w zakresie $1,25 - 1,26 \times 10^{17}$ kwantów/cm²/min. Krzywa kalibracyjna aktywności enzymów w stosunku do stężenia stanowiła część składową każdego eksperymentu.

Należy być ostrożnym przy stosowaniu metody McCarty'ego [15] do pomiaru RNazy; polega ona na po-

miarze gęstości optycznej bardzo drobnego strątu niezhydrolizowanego kwasu RN powstającego przy zakwaszeniu mieszaniny reagującej. Gęstość optyczna tego strątu nie jest stała, lecz wzrasta stopniowo w ciągu 6 mi-

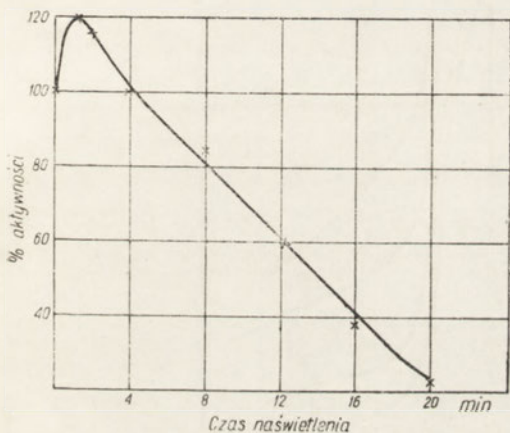


Rys. 1. Krzywa aktywności enzymu w stosunku do stężenia oznaczana metodą McCarty'ego [15] (gęstość optyczna osadu mierzona przy 4250 Å)

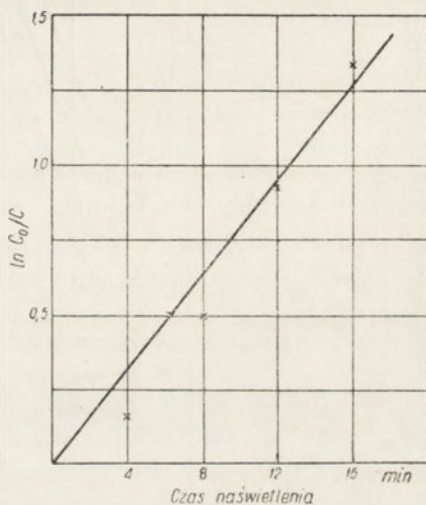
nut, pozostaje stałą przez kilka następujących minut, a następnie stopniowo opada. Stwierdziliśmy, że powtarzalne wyniki można uzyskać mierząc gęstość optyczną strątu w 5 — 6 minut po zakwaszeniu próbki. Rys. 1 pokazuje typową krzywą kalibracyjną aktywności enzymu w stosunku do stężenia wykonaną w ten sposób.

Wyniki i dyskusje

Stosując metodę McCarty'ego do oznaczania RNazy stwierdzono, że w wyniku krótkiego naświetlania, rzędu 0,5 — 4 minut, uzyskuje się początkowy wzrost aktywności enzymatycznej. Wzrost ten wynosi aż 25% początkowej wartości, po czym następuje normalna inaktywacja. Zjawisko to stwierdzono na 3 różnych preparatach enzymatycznych



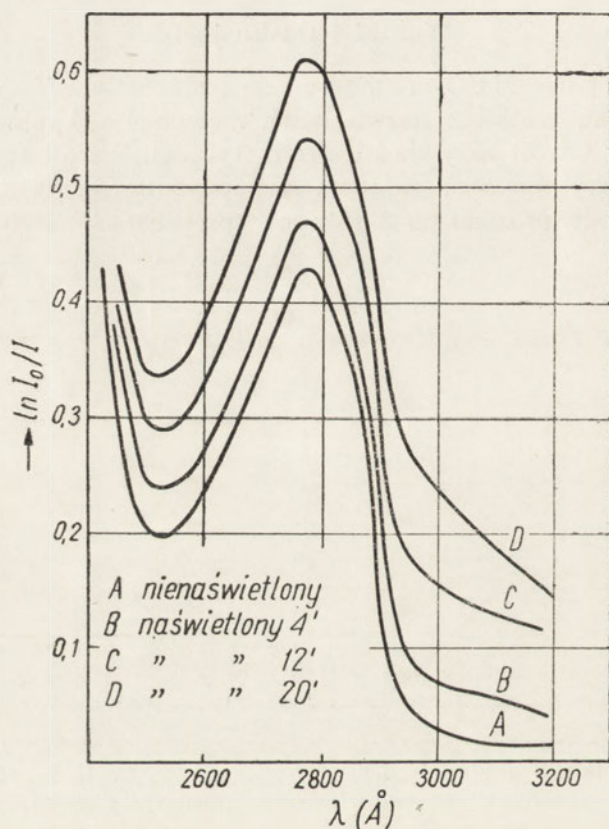
Rys. 2. Początkowa aktywacja RNazy oznaczonej metodą McCarty'ego [15]



Rys. 3. Część krzywej z rys. 2 między 4 i 20 minutami w skali półlogarytmicznej

i w szerokim zakresie stężeń i pH. Wyniki typowego doświadczenia pokazano na rys. 2 przy zastosowaniu próbki RNazy uzyskanej od dra M. Macdonalda dzięki uprzejmości prof. J. Bracheta. Jak widać z rysunku, po 4-minutach aktywność enzymu równa się aktywności w czasie 0. Od tego momentu inaktywacja ma charakter reakcji pierwszego rzędu, jak widać na rys. 3; wyliczenie wydajności kwantowej inaktywacji daje wartość 0,040. Wynik ten jest jednak zbyt wysoki, ponieważ absorpcja światła przez enzym wzrasta od momentu naświetlania (patrz rys. 4) i po zastosowaniu odpowiedniej korekty wartość ta wyniesie ok. 0,028. W niektórych przypadkach aktywność enzymu nie wzrastała, lecz pozostawała praktycznie bez zmian w ciągu dwóch do czterech mi-

nut, po czym następowała inaktywacja. Niestety, pomimo przeprowadzonej bardzo dużej liczby doświadczeń, wyniki nie zawsze były powtarzalne i czasem opisane zjawisko nie występowało, zaś enzym podlegał inaktywacji od momentu naświetlania z wydajnością kwantową 0,025 do 0,030 w kwaśnym środowisku.



Rys. 4. Widmo absorpcyjne rybonukleazy (0,6 mg/ml w H₂O) po naświetlaniu ultrafioletem w ciągu podanych okresów czasu

Następne eksperymenty oparto wobec tego na metodzie kolorymetrycznej oznaczania RNazy (Shugar [31]). Stosując tę metodę nie stwierdzono początkowej aktywacji nawet wówczas, gdy równolegle stosowana metoda McCarty'ego wykazywała taką aktywację.

W związku z tym warto wspomnieć, że Kalnitsky i Rogers [9] stwierdzili początkowy wzrost aktywności RNazy dochodzący niekiedy do 29% przy poddaniu jej trawieniu karboksypeptydazą. Stosowana przez nich metoda oznaczania RNazy polega także na kwaśnym strącaniu niezhydrolizowanego substratu, jak to ma miejsce w metodzie McCar-

t y'e g o. Doświadczenia ich wykazywały, że tylko część cząsteczki rybonukleazy niezbędna jest do normalnej działalności enzymatycznej i że zaobserwowany wzrost aktywności łączy się z odszczepieniem szeregu końcowych aminokwasów. Można sobie wyobrazić aktywację ultrafioletem jako wynik odszczepienia części cząsteczki RNazy przez przerwanie wiązania peptydowego. Nie można jednak uważać za stwierdzone, aby

T a b l i c a 1

Stała inaktywacji (k) i wydajność kwantowa (Θ) inaktywacji rybonukleazy przez promienie ultrafioletowe

pH	Bufor	$k \text{ min}^{-1}$	% absorpcji światła przy 2537Å	Θ
1,9	0,01N HCl	0,150	1,50	$0,042 \pm 0,003$
3,0	0,001N HCl	0,125	„	$0,036 \pm 0,003$
3,6	0,025M octanowy	0,100	„	$0,029 \pm 0,002$
4,4	„ „	0,100	„	$0,029 \pm 0,002$
5,6	0,025M fosforanowy	0,125	„	$0,036 \pm 0,003$
6,3	„ „	0,123	„	$0,035 \pm 0,003$
7,2	„ „	0,110	„	$0,032 \pm 0,003$
8,4	0,05M boranowy	0,148	„	$0,042 \pm 0,004$
9,3	0,025M glikolowy	0,174	2,5	$0,030 \pm 0,003$
10,3	„ „	0,162	4,8	$0,015 \pm 0,002$
12,0	0,01N NaOH	0,30	6,9	$0,019 \pm 0,002$

pierwotnym zjawiskiem przy fotolizie białek było przerwanie wiązania peptydowego (patrz niżej). Bardziej prawdopodobne wydaje się, że początkowy efekt naświetlenia polega na przerwaniu jakichś wiązań drugiego rzędu, np. mostków siarkowych. Engelhard i Eikenberg [3] wykazali, że fotochemiczna hydroliza wiązania S-S ma miejsce przy naświetlaniu albuminy surowiczej.

Trzeba zauważyć, że metoda McCarty'ego oznaczania aktywności RNazy wykazuje wyłącznie początkową depolimeryzację kwasu RN, podczas gdy metoda kolorymetryczna oparta jest na późniejszych stadiach reakcji, związanych z wyzwaniem wolnych grup kwasowych (Shugar, [32]).

Przy zastosowaniu metody kolorymetrycznej przebieg inaktywacji miał charakter reakcji pierwszego rzędu, której wydajność kwantowa była niezależna od stężenia w granicach od 0,01 — 0,50 mg enzymu/ml. W stosowanych czasach naświetlania (do 20 minut) powstający ozon nie miał wpływu na tempo inaktywacji. Tablica 1 przedstawia stałe szybkości i wydajności kwantowe inaktywacji w rozcieńczonych roztworach

(20 $\mu\text{g/ml}$) przy intensywności promieniowania wchodzącego $1,56 \times 10^{17}$ kwantów/ cm^2/min . Stałe k odpowiadają reakcjom pierwszego rzędu i w większości przypadków stanowią średnią szeregu oznaczeń. Wydajność kwantową wyliczano z następującego równania:

$$\begin{aligned} \Theta &= \frac{\text{ilość cząsteczek zinaktywowanych}}{\text{ilość zaabsorbowanych kwantów}} \\ &= \frac{C_0 k}{I_a} \end{aligned}$$

gdzie C_0 oznacza początkową ilość aktywnych cząsteczek w roztworze, k — stałą szybkości inaktywacji pierwszego rzędu i I_a oznacza absorpcję roztworu w czasie 0 (kwant/ cm^2/min).

Równanie uwzględnia zmniejszanie się absorpcji światła przez aktywne cząsteczki w przebiegu inaktywacji (Finkelstein i McLaren [4], Shugar [29], Labeyrie i Shugar [13]). Ciężar cząsteczkowy rybonukleazy przyjęto za 15 000.

Wartości Θ w pobliżu pH 4 wykazują dobrą zgodność z podanymi przez McLaren a i wspólr. [19] dla pH 4.1. Istnieje jednak znaczna zmienność wydajności kwantowej ze zmianą pH, w przeciwieństwie do stałych wartości w przypadku lizozymu w tym samym zakresie pH. Szczególnie ciekawe jest zmniejszenie się Θ dla alkalicznych pH, gdzie absorpcja enzymu znacznie wzrasta w wyniku dysocjacji grupy hydroksylowej reszt fenolowych (Shugar [30]); można by raczej oczekiwać szybszej inaktywacji enzymu w tak alkalicznych pH.

Podobnie jak w przypadku lizozymu (Shugar [29]), cysteina nie chroni rybonukleazy od inaktywacji, jak czyni to w przypadku dehydrogenazy fosfortriozy, enzymu z aktywną grupą SH (Shugar [28]). Można jednak zaobserwować znaczne działanie ochronne cysteiny w stężeniu 10^{-3} — 10^{-2} M przy pH powyżej 7, (kiedy to cysteina absorbuje dość silnie promieniowanie o fali 2537 Å) dla małych stężeń enzymu (około 20 μg w ml), z powodu silnej absorpcji cysteiny w porównaniu z absorpcją enzymu. Tego rodzaju „wewnętrzne filtrowanie” odgrywa bezwątpienia istotną rolę przy naświetlaniu materiału biologicznego i prawdopodobnie w ten sposób niektóre składniki komórki chronione są od bezpośrednich efektów promieniowania. Zwróciliśmy już na to uwagę w innym miejscu wskazując, że fotosensybilizacja może odgrywać równą lub nawet większą rolę przy naświetlaniu ultrafioletem żywych komórek, niż bezpośrednio efekty promieniowania (Shugar [27]).

W przeciwieństwie do szeregu doniesień w literaturze, wskazujących na zwiększenie się w obecności rozpuszczalników organicznych inaktywacji enzymu i denaturacji białek pod wpływem promieniowania ultra-

fioletowego, inaktywacja spowodowana naświetleniem RNazy w 95% etanolu (w którym rozpuszcza się ona w małych stężeniach bez inaktywacji) nie różniła się od zachowania w wodnych roztworach przy analogicznych pH.

Inaktywacji rybonukleazy towarzyszy silny wzrost absorpcji nie tylko w fali 2537 Å, jak podał *McLaren* [16], lecz w całym zasięgu widma. Rys. 4 pokazuje widmo absorpcyjne enzymu w wodzie, w stężeniu (0,6 mg/ml) przed i po różnych okresach naświetlania; górna krzywa odpowiada ok. 85% inaktywacji. W środowisku kwaśnym wzrost absorpcji jest większy, gdyż wartości gęstości optycznych w minimach i maksimach dla tych samych okresów naświetlania są ponad dwukrotnie większe. Ponadto można zaobserwować, że po około 16-minutowym naświetleniu dalszy powolny wzrost absorpcji zachodzi w dalszym ciągu po usunięciu źródła promieniowania, co wskazuje na obecność wtórnych reakcji. Nie ulega chyba wątpliwości, że zjawisko to związane jest z fotooksydacją, zaś w przypadku lizozymu wykazano, że reszty tryptofanowe nieomal ilościowo ulegają fotooksydacji podczas inaktywacji (*Shugar* [29]). Z braku dodatkowych dowodów nie można jednak twierdzić, jak proponują *McLean* i *Giese* [20], że tylko aromatyczne aminokwasy wchodzą tu w grę.

Imahori [8] wykazał, że część reszt tyrozynowych pepsyny podlega utlenieniu do dwuoksyfeniloalaniny (DOPA) w wyniku naświetlania ultrafioletem. Jego metoda polegała na hydrolizie naświetlonego enzymu i następnie chromatograficznym rozdzieleniu tyrozyny i DOPA. Jego wniosek, że inaktywacja ultrafioletem pepsyny związana jest wyłącznie z tym zjawiskiem, nie wydaje się pewny, ponieważ po 100% inaktywacji jeszcze ciągle obecnych jest 50% reszt tyrozynowych, zaś w nienaświetlanych roztworach stwierdzić można obecność małych ilości DOPA, powstałych prawdopodobnie podczas kwaśnej hydrolizy przez utlenienie.

Naświetlanie roztworów wolnej tyrozyny daje w wyniku tylko mały wzrost absorpcji w porównaniu do wzrostu, którego należałoby oczekiwać, gdyby produktem inaktywacji była DOPA. Przy tym samym czasie naświetlania rybonukleazy zachodzi znacznie większy wzrost absorpcji (rys. 4). Lecz także i w tym przypadku znaczna część tyrozyny nie uległa zmianie, co wykazuje fakt, że zakwaszenie roztworu do pH 12 (krzywa *D*) doprowadziło do znacznego dalszego wzrostu absorpcji, który był częściowo odwracalny przez zakwaszenie. Tego należałoby właśnie oczekiwać, gdyby niektóre reszty tyrozyny w cząsteczce naświetlonej nie ulegały zmianom; w istocie kształt i położenie maksimów krzywych *B*, *C*, *D* przypominają bardziej tyrozynę niż DOPA. Dłuższe okresy naświetlania prowadzą do głębszych zmian, lecz zjawisko to nie interesuje nas w związku z inaktywacją enzymów. Wydaje się, że najodpowiedniejszą metodą

śledzenia wpływu naświetlania na pojedyncze aminokwasy jest kwaśna hydroliza białka z następującą chromatografią; niestety, zabieg ten nie byłby wolny od dodatkowych trudności ze względu na wtórne reakcje fotolizowanego białka w przebiegu kwaśnej hydrolizy.

Przy zastosowaniu chromatografii bibułowej nie stwierdzono uwalniania się wolnych aminokwasów lub małych peptydów w przebiegu inaktywacji rybonukleazy. Podobne zachowanie stwierdzono już wcześniej dla lizozymu (Shugar [29]). Kaplan i współpracownicy [10] donieśli o uwalnianiu się tyrozyny z naświetlanych roztworów insuliny, potwierdzając wcześniejsze doniesienie Mitchella i Rideala [21], że z monomolekularnych warstw insuliny pod wpływem promieni ultrafioletowych tyrozyna przechodzi do roztworu. Przedstawione przez Mitchella i Rideala dowody opierały się na chemicznym oznaczeniu fenolu, co nie może być uważane za pewny dowód na obecność tyrozyny. Ponadto nie wolno nam sądzić, że zachowanie się monomolekularnych warstw odpowiada zachowaniu się roztworu, ponieważ w pierwszym przypadku cząsteczki są częściowo rozprostowane. Nie udało nam się znaleźć wolnej tyrozyny w fotolizowanych roztworach insuliny nawet przy zastosowaniu stężonych roztworów i różnych warunków naświetlania. Tylko w jednym doświadczeniu stwierdziliśmy ślady jakiegoś aminokwasu lub peptydu, którego nie mogliśmy z pewnością zidentyfikować z tyroziną.

Pewna ilość badaczy donosiła dawniej o uwalnianiu się jakichś składników z naświetlanych aminokwasów, opierając się często na oznaczeniach chemicznych raczej mało specyficznych. Na przykład Berthelot i Amoureux [2] twierdzili, że uzyskali kwas indolooctowy z naświetlanego tryptofanu; nie udało nam się tego potwierdzić metodą chromatograficzną, co nie wydaje się dziwnym ze względu na niezmiernie szybką fotooksydację kwasu indolooctowego przez ultrafiolet (Shugar, nie opublikowane). Acetylotryptofan, który jest nieco bardziej wrażliwy na naświetlanie, był źródłem szeregu związków chromatograficznie podobnych do uzyskanych z tryptofanu, nie uwalnia jednak ani kwasu indolooctowego, ani tryptofanu. Wynik taki jest zgodny z uzyskanym przez McLarena i współpr. [19], którzy nie stwierdzili uwalniania się aminokwasów z różnych aromatycznych peptydów pod wpływem naświetlania.

Schocken [25] podał, że otrzymał wolną tyrozinę z naświetlanej fenyloalaniny, którą wykrywał oznaczając kolorymetrycznie reszty fenolowe. McLean i Giese [20] wykazali już wcześniej powstawanie grup fenolowych w naświetlanej fenyloalaninie, lecz nie wysuwali sugestii co do istoty produktów reakcji. Nie udało nam się znaleźć żadnych dowodów na powstawanie wolnej tyrozyny z fenyloalaniny, jakkolwiek Matsuda i współpr. [14] ostatnio podawali, że w odpowied-

nich warunkach naświetlanie fenyloalaniny może prowadzić do powstania tyrozyny, seryny lub alaniny.

W szeregu przypadków zostały przedstawione dostateczne dowody fotolitycznego przzerwania wiązania peptydowego w cząsteczkach białka z uwalnianiem mniejszych fragmentów (Kaplan i współpracownicy [11, 12], Rideal i Roberts [24]) i czasem z agregacją (Rideal i Roberts [24]). Jednak dowody na uwalnianie się wolnych aminokwasów są raczej skąpe z wyjątkiem pracy McLarena i współpracownicy [19] nad różnymi modelowymi peptydami.

Wydajności kwantowe dla rozerwania wiązania peptydowego są stosunkowo niskie, zbyt niskie, aby wyjaśnić na tej podstawie inaktywację takich enzymów jak lizozym, insulina czy rybonukleaza. Nie wydaje się przypadkowym, że te trzy białka inaktywowane są z wydajnością kwantową stosunkowo wysoką (od 0,024 — 0,045) i niezbyt różną, o ile uwzględnimy zmienność wydajności kwantowej z pH. Wszystkie trzy posiadają mniej więcej ten sam ciężar cząsteczkowy, zaś ich konfiguracja i aktywność biologiczna oparta jest na mostkach siarkowych. Setlow [26] wskazał, że istnieje pewna korelacja między zawartością cystyny i wydajnością kwantową dla szeregu enzymów, lecz byłoby przedwczesnym wyciągnąć w tej chwili wniosek, że ta zbieżność ma większe znaczenie niż zbieżność między wydajnością kwantową i ciężarem cząsteczkowym (McLaren [18]). Analiza aminokwasów z naświetlanych ultrafioletem białek powinna wyjaśnić bliżej istotę zachodzących procesów.

Wyrażamy podziękowanie Ob. Ob. R. Grzelakowi i A. Gołdzie za cenną pomoc techniczną. Praca powyższa była częściowo finansowana z dotacji Komitetu Biochemicznego PAN.

Streszczenie

Używając kolorymetrycznej metody do badań rybonukleazy wykazano, że inaktywacja rybonukleazy w świetle ultrafioletowym przy 2537 Å jest reakcją pierwszego rzędu z wydajnością kwantową $0,029 \pm 0,002$ w okolicy pH 4. Wydajność kwantowa zmienia się wraz ze zmianą pH, natomiast istnieje widoczna niezależność od stężenia. W zasadowym pH, przy którym absorpcja światła przez enzym wzrasta, w wyniku dysocjacji grupy hydroksylowej reszt fenolowych wydajność kwantowa spada. Podczas procesu inaktywacji wolne aminokwasy i niskocząsteczkowe peptydy nie uwalniają się. Znaczny wzrost absorpcji spowodowany naświetleniem zależny jest od pH; kształt krzywej widma absorpcji wskazuje na to, że tylko część reszt tyrozyny ulega przemianie, przypuszczalnie

fotoutlenieniu. Przy zastosowaniu metody turbidimetrycznej do badania aktywności enzymu wykazano, że podczas pierwszych 0,5 — 4 minut naświetlania zachodzi wzrost aktywności, po czym następuje inaktywacja. Omówiono wyniki oraz ogólny mechanizm inaktywacji enzymów w ultrafiolecie.

LITERATURA

- [1] Anfinsen C., Redfield R. R., Choate W. L., Page J. i Carrol W. R., *J. Biol. Chem.* **207**, 201, 1954.
- [2] Berthelot A. i Amoureux G., *Compt. rend.* **206**, 699, 1938.
- [3] Engelhard H. i Eikenberg K. R., *Z. Naturforsch.* **10b**, 622, 1955.
- [4] Finkelstein P. i McLaren A. D., *J. Polymer Sci.* **3**, 223, 1948.
- [5] Fraenkel-Conrat H., *J. Am. Chem. Soc.* **73**, 625, 1951.
- [6] Fromageot C. i Schnek G., *Biochim. Biophys. Acta* **6**, 113, 1950.
- [7] Gajewska E. i Shugar D., *Bull. Acad. Polon. Sci., Cl. II*, **3**, 117, 1955.
- [8] Imahori K., *Biochim. Biophys. Acta* **18**, 216, 1955.
- [9] Kalnitsky G. i Rogers W. I., *Biochim. Biophys. Acta* **20**, 378, 1956.
- [10] Kaplan E. H., Campbell E. D. i McLaren A. D., *Biochim. Biophys. Acta* **4**, 493, 1950.
- [11] Kaplan J. G. i Fraser M. J., *Biochim. Biophys. Acta* **9**, 585, 1952.
- [12] Kaplan J. G., Andrews D. H. i Fraser M. J., *J. Colloid Sci.* **9**, 203, 1954.
- [13] Labeyrie F. i Shugar D., *J. Chim. Phys.* **48**, 1, 1951.
- [14] Matsuda G., Markawa T., Ohkawa I. i Yamada M., *Nagasaki Igak-kai Zassi* **29**, 10, 1954.
- [15] McCarty M., *J. Exp. Med.* **88**, 181, 1948.
- [16] McLaren A. D., *Advances in Enzymol.* **9**, 75, 1949.
- [17] McLaren A. D., *Science* **113**, 716, 1951.
- [18] McLaren A. D., *Biochim. Biophys. Acta* **18**, 601, 1955.
- [19] McLaren A. D., Gentile P., Kirk D. C. i Levin N. A., *J. Polymer Sci.* **10**, 333, 1953.
- [20] McLean D. J. i Giese A. C., *J. Biol. Chem.* **187**, 537, 1950.
- [21] Mitchell J. S. i Rideal E. K., *Proc. Roy. Soc. London A167*, 342, 1938.
- [22] Orlans E. S., *Brit. J. Exp. Path.* **34**, 164, 1953.
- [23] Rabinowitch M. i Barron E. S. G., *Biochim. Biophys. Acta* **18**, 316, 1955.
- [24] Rideal E. K. i Roberts R., *Proc. Roy. Soc. London A205*, 391, 1951.
- [25] Schocken K., *Exp. Med. Surg.* **9**, 465, 1951.
- [26] Setlow R., *Biochim. Biophys. Acta* **16**, 444, 1955.
- [27] Shugar D., *Bull. Soc. Chim. Biol.* **33**, 710, 1951.
- [28] Shugar D., *Biochim. Biophys. Acta* **6**, 548, 1951.
- [29] Shugar D., *Biochim. Biophys. Acta* **8**, 302, 1952.
- [30] Shugar D., *Biochem. J.* **52**, 142, 1952.
- [31] Shugar D., *Bull. Acad. Polon. Sci., Cl. II*, **1** 39, 1953.
- [32] Shugar D., *Postępy Biochemii* **1**, 269, 1955.
- [33] Shugar D. i Syruczek E., *Bull. Acad. Polon. Sci., Cl., II*, **2**, 73, 1954.
- [34] Tanford C., *J. Am. Chem. Soc.* **77**, 6409, 1955.
- [35] Weil L. i Seibles T. S., *Arch. Biochem. Biophys.* **54**, 368, 1955.

ИССЛЕДОВАНИЯ ПО ФОТОХИМИИ РИБОНУКЛЕАЗЫ

Резюме

При использовании колориметрического метода для исследований рибонуклеазы показано, что инактивирование рибонуклеазы в ультрафиолетовом свете при 2537 Å является реакцией первого порядка с квантовым выходом $0,029 \pm 0,002$ поблизости рН = 4. Квантовый выход изменяется вместе с рН, однако существует видимая независимость от концентрации. При щелочном рН, когда абсорбция энзима возрастает, квантовый выход падает в результате диссоциации гидроксильной группы феноловых остатков. В течение процесса инактивирования, свободные аминокислоты и низкомолекулярные пептиды не подвергаются гидратации. Значительный рост абсорбции в результате облучения зависит от рН, хотя вид кривой спектра абсорбции указывает на то, что по всей вероятности, только часть остатков тирозина подвергается фотоокислению. Применяя турбиметрический метод для исследования активности энзима обнаружили, что во время первых 0,5 — 4 минут облучения наступает возрастание энзиматической активности, а затем происходит инактивирование. Рассмотрены результаты, а также общий механизм инактивирования энзимов в ультрафиолетовом свете.

STUDIES ON THE PHOTOCHEMISTRY OF RIBONUCLEASE

Summary

Using a colorimetric procedure for ribonuclease assay, the inactivation of ribonuclease by ultraviolet light at 2537 Å is first order with a quantum yield of 0.029 ± 0.002 in the neighbourhood of pH 4. The quantum yield varies with pH but is sensibly independent of concentration. At alkaline pH where the enzyme absorption increases, as a result of phenolic hydroxyl dissociation, the quantum yield decreases. No free amino acids or small peptides are released during the inactivation process. The marked increase in absorption, resulting from irradiation, is dependent on pH; however, the shape of the absorption spectrum is such as to indicate that only a portion of the tyrosine residues are affected, presumably by photo-oxidation. When a turbidimetric procedure was used for enzymatic assay, it was found that during the first 0,5 — 4 minutes of irradiation an increase in enzymatic activity occurred, followed subsequently by inactivation. These results are discussed as well as the general mechanism of ultraviolet inactivation of enzymes.

Czrymano 10.9.1956 r.

E. SZEMPLIŃSKA, A. SZENBERG i D. SHUGAR

ZASTOSOWANIE PREPARATÓW HANDLOWYCH DEZOKSYRYBONUKLEAZY PACIORKOWCOWEJ DO CELÓW HISTOCHEMICZNYCH

Z Zakładu Biochemii PZH i Zakładu Biochemii PAN w Warszawie

Opracowanie metod otrzymywania oczyszczonych wzgl. krystalicznych preparatów rybonukleazy (RN-azy) (Kunitz [13]) i dezoksyrybonukleazy (DN-azy) (Fischer i współpr. [9]; McCarty [17]; Kunitz [14]) dało początek dużej ilości badań histochemicznych nad lokalizacją i identyfikacją kwasów nukleinowych w komórkach (Brachet [3,4]; Dempsey i Wislocki [7]; Sanders [22]; Pears [21]; Catcheside i Holmes [6]; Brachet i Shaver [5]; Vercauteren [26,27]). Zastosowanie tych preparatów stało się obecnie standardową metodą w badaniach histochemicznych, podlega jednak pewnym ograniczeniom ze względu na dosyć kłopotliwą preparatykę i wysoką cenę preparatów handlowych. W Polsce z podanych wyżej powodów zastosowanie nukleaz do badań histochemicznych było bardzo ograniczone.

Pewne szczepy paciorkowców hemolitycznych uwalniają do podłoża DN-azę znaną jako streptodornaza (SD-aza) razem z aktywującym plazminogen białkiem-streptokinazą (SK-aza). Wyciągi hodowli zawierające SK-azę i SD-azę znalazły szerokie zastosowanie kliniczne.

W ciągu dwóch ubiegłych lat opracowano odpowiednie metody częściowego oczyszczania streptokinazy-streptodornazy i streptodornazy wolnej od streptokinazy (Pakuła i współpr. [19,20]). Pierwszy z tych preparatów produkowany jest obecnie na skalę przemysłową dla celów leczniczych pod nazwą firmową „Streptdaza” i zawiera 20 000 j. m. SK-azy i co najmniej 5 000 j.m. SD-azy w ampułce. Produkcja przemysłowa SD-azy wolnej od SK-azy projektowana jest na najbliższą przyszłość. Przewidywane są ampułki zawierające 10 000 j.m. SD-azy ze śladami tylko SK-azy.

Udostępnienie tych preparatów zachęciło do przebadania możliwości ich zastosowania w badaniach biochemicznych i cytochemicznych. Prepa-

raty te są dostatecznie tanie, aby można je było stosować także w pracy szkoleniowej. Korzystną wydaje się także możliwość porównania działalności dezoksyrybonukleaz różnego pochodzenia.

Rasserman [2] w Niemczech doniósł o zastosowaniu preparatu amerykańskiego „Varidase”, który jest mieszaniną SK-azy i SD-azy. W trakcie naszej pracy ukazała się publikacja Jackson i Dessau [12] z laboratoriów firmy Lederle o zastosowaniu dezoksyrybonukleazy paciorkowcowej do usuwania barwiących się wg Feulgena substancji z jąder komórkowych; ten preparat SD-azy nie jest, zdaje się, jeszcze wprowadzony do handlu.

Material i metody

Streptdazę, którą opisaliśmy powyżej, otrzymano w darze od Warszawskiej Wytwórni Surowic i Szczepionek. Preparat ten zawiera bufor, tak że po rozpuszczeniu w wodzie pH jego wynosi około 8. Dodatkowo WWSS przygotowała dla nas szereg ampulek bez dodatku buforu. SD-aza wolna od SK-azy była opisana poprzednio [20]. Doświadczenia porównawcze przeprowadzono z krystaliczną dezoksyrybonukleazą trzustki firmy Worthington i z preparatem SK-SD firmy Wellcome, dostarczonym nam uprzejmie przez WWSS.

Badania przeprowadzono na tkankach szczura, a mianowicie: nerki, wątroby, jądra, mięśnia szkieletowego i ścianki żołądka. Wypróbowano następujące metody utrwalania: Carnoya, Susa, Zenker, Serra, Heidenheina, Bouina a także aceton. Głównie używano jednak metody Carnoya. Grubość skrawków wynosiła 6 μ .

Po usunięciu parafiny ze skrawków poddawano je działaniu preparatu enzymatycznego, którego odpowiednią ilość rozpuszczano w 0,1 ml wody względnie buforu. Na skrawek nakraplano 20 — 25 μ l roztworu i inkubowano w wilgotnej komorze (płytką Petriego z pewną ilością wody na dnie) przez 1 godz. w 37°. Skrawki kontrolne pokrywano odpowiednią ilością wody względnie buforu.

Obecność kwasu dezoksyrybonukleinowego badano barwiąc zielenią metylową i pyroniną wg Bracheta [3] oraz wg Feulgena [8] (hydroliza 1N HCl 6 — 18 minut w 60°, zależnie od rodzaju tkanki).

Wyniki i dyskusja

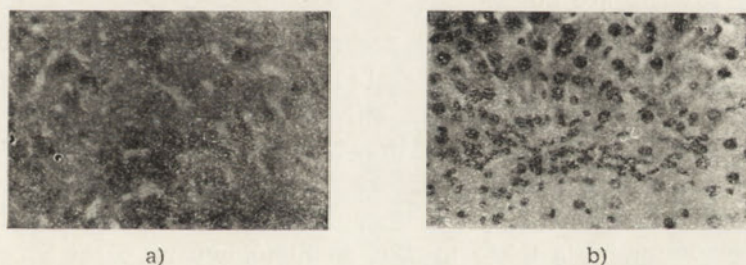
W początkowych doświadczeniach stwierdzono, że zarówno preparaty handlowe Streptdazy, jak też przygotowane w laboratorium, które w pomiarach wiskozymetrycznych wykazały odpowiednią aktywność enzymatyczną, nie działały na skrawki, niezależnie od sposobu ich utrwalania. Celem wyjaśnienia tego zjawiska przeprowadzono szereg doświadczeń z SD-azą wolną od SK-azy.

Zawartość ampułki SD-azy rozpuszczano w wodzie uzyskując stężenie enzymu 10 000 j.m./ml. Działaniu tych preparatów poddawano różne tkanki obserwując zachowanie się jądra. Najlepsze rezultaty uzyskano na preparatach utrwalonych metodą Carnoy'a. Podobne wyniki uzyskano na skrawkach utrwalonych metodą Heidenheina. Przy użyciu 25 μ l na skrawek, jedna ampłka wystarczała na 40 razy. Przy stężeniu enzymu 6.000 j.m./ml, jądra mięśni i nerki podlegały strawieniu, lecz jądra wątro-



Fot. 1. Jądro szczura, utrwalenie wg Carnoy'a, barwienie wg Feulgena, pow. 80 \times

- a) inkubacja z SK-SD, 6000 j. m. SD-azy/ml, w 37°, 1 godz.
b) inkubacja z H₂O



Fot. 2. Wątroba szczura, utrwalenie wg Carnoy'a, barwienie wg Feulgena, pow. 320 \times

- a) inkubacja z SK-SD, 10000 j. m. SD-azy/ml w 37°, 1 godz.
b) inkubacja z H₂O

by tylko częściowo. Przy stężeniu 3 000 j.m./ml uzyskano działanie tylko na tkankę jądra. Warto zauważyć, że plemniki w preparatach tkanki jądra nie traciły barwliwości nawet pod działaniem 10 000 j.m./ml. DN-aza krystaliczna w stężeniach 50 — 100 μ g/ml dawała podobne wyniki jak 6 000 j.m. SD-azy na ml. Rezultaty były identyczne zarówno przy zastosowaniu metody barwienia Feulgena jak zielenią metylową według Bracheta.

Powyższe wyniki uzyskane samą SD-azą nasunęły nam wniosek, że brak aktywności SK-azy-SD-azy na skrawki może być wywołany dużą siłą jonową środowiska spowodowaną przez obecność dodatkowego białka SK-azy i soli. Wiemy, że RN-aza podlega zahamowaniu w wysokich stężeniach soli lub nawet buforów (Shugar [23], [24]), zaś Kunitz [15] wykazał zahamowanie DN-azy wysokim stężeniem soli; ostatnio Asahina i Oka [1] wykazali, że także SD-aza podlega zahamowaniu w obecności nadmiaru jonów. Wobec tego zawartość kilku ampulek SK-azy-SD-azy poddano dializie wobec destylowanej wody przez szereg godzin, lecz nawet wówczas preparat nie był aktywny, dopiero po doprowadzeniu pH do 8,5 przez ostrożne dodawanie NaOH preparaty stawały się aktywne i trawiły jądra w skrawkach tkanki jąder i nerki.

Na podstawie tych wstępnych doświadczeń WWSS przygotowała pewną ilość ampulek SK-azy-SD-azy według bieżąco stosowanej procedury, lecz bez dodatku buforu w końcowej fazie produkcyjnej; pH tych preparatów w wodzie wynosi około 7, zaś ich aktywność histochemiczna była ta sama co SD-azy (fotografia 1 i 2). Dodatek buforu do tych preparatów nie wpływał na ich aktywność badaną na skrawkach, o ile stężenie jego nie przekraczało 0,05 M. Powyżej tego stężenia aktywność enzymu malała. Angielski preparat handlowy firmy Wellcome, który prawdopodobnie zawiera także dużo buforu, okazał się równie nieaktywny jak i polskie preparaty zawierające bufor.

Jackson i Dessau [12] donieśli o zastosowaniu SD-azy wolnej od SK-azy, przygotowanej na skalę laboratoryjną w firmie Lederle do celów histochemicznych. Stosowali oni enzym w stężeniu 1 000 j.m./ml w 37° przez jedną godzinę, lecz odnawiali roztwór enzymu co 15 minut. Jest to znacznie mniej wygodne niż stosowana przez nas technika, ponieważ zaś wyniki końcowe są te same, nie próbowaliśmy jej stosować. Autorzy ci wspominają także krótko, że handlowy preparat SK-azy-SD-azy firmy Lederle dawał im te same rezultaty.

W trakcie naszej pracy ukazała się publikacja Ghosha [10], który wykazał, że roztwór dezoksyrybonukleazy trzustki można przechowywać w minus 20° i nawet przy wielokrotnym zamrażaniu i odmrażaniu nie traci aktywności. Jakkolwiek nie badaliśmy specjalnie tego zagadnienia, stwierdziliśmy jednak, że roztwory obojętne SK-azy-SD-azy lub SD-azy można przechowywać przez noc w lodówce bez znacznej utraty aktywności. Dłuższe przechowywanie powoduje spadek aktywności. Wielokrotnie przechowywaliśmy roztwory na suchym lodzie bez widocznej utraty aktywności. Często także rozpuszczaliśmy zawartość ampułki w 1 ml wody, roztwór po rozdzieleniu do 10 mniejszych ampulek liofilizowano i używano w miarę potrzeby.

Dodatek jonów magnezu w naszych badaniach nie zwiększał aktywności preparatu, toteż zaniechaliśmy go w dalszej pracy. Na ten temat istnieje rozbieżność między autorami, i tak Gilbert, Overend i Webb [11] oraz Mazia i Jaeger [16] są zdania, że jony magnezu są zbyteczne do aktywności enzymu wobec tkanek, zaś Brachet i Shaver [5] wyrażają pogląd wręcz przeciwny.

Ponieważ w większości prac nad zastosowaniem DN-azy do celów histochemicznych posługiwano się metodą Feulgena, uszło uwagi badaczy ewentualne działanie tych preparatów na plazmę. W naszej pracy, stosując barwienie zielenią metylową i pyroniną, zauważyliśmy, że niezależnie od sposobu utrwalenia skrawków, plazma traci część swojej barwliwości pod wpływem inkubacji z roztworami SK-azy-SD-azy, samej SD, krystalicznej DN-azy, preparatu angielskiego SK-azy-SD-azy oraz z samymi buforami, co odbija się w różnym stopniu na różnych tkankach. Szczególnie wyraźnie efekt ten daje się zaobserwować na skrawkach wątroby. Stowell i Zorzoli [25] zaobserwowali podobne działanie roztworów elektrolitów. Ich zdaniem ulega wypłukaniu część kwasu rybonukleinowego. Podobny efekt ma wg nich woda destylowana o temperaturze 60°.

W związku z podaną powyżej obserwacją oznaczyliśmy także zawartość RN-azy w naszych preparatach SD-azy. Jak wykazał McCarty [18], paciorkowce wydzielają do środowiska małe ilości RN-azy i nie jest wykluczone, że małe ilości RN-azy ulegają zagęszczeniu w preparatach SD-azy. Analiza wykazała jednak, że jeśli nawet nasze preparaty SD-azy zawierały RN-azę, ilość jej nie mogła wynosić więcej niż 1 µg w ampulce i może nie być brana pod uwagę.

Należy także wspomnieć, że po utrwaleniu metodą Susy nie można stosować barwienia zielenią metylową, gdyż kwaśny ten utrwalacz powoduje częściową hydrolizę kwasu dezoksyrybonukleinowego do kwasu apurynowego, zaś ten ostatni nie wiąże zieleni metylowej.

LITERATURA

- [1] Asahina M., Oka M., *Bull. Nat. Hyg. Lab. Tokio*, nr 73, 245, 1956.
- [2] Basserman F. J., *Tuberkulosearzt* 6, 286, 1952.
- [3] Brachet J., *C. R. Soc. Biol.* 133, 88, 1940.
- [4] Brachet J., *C. R. Soc. Biol.* 133, 90, 1940.
- [5] Brachet J., Shaver J. R., *Stain Technol.* 23, 177, 1948.
- [6] Catcheside D. G., Holmes B., *Symp. Soc. exp. Biol.* 1, 225, 1947.
- [7] Dempsey E. W., Wislocki G. B., *Amer. J. Anat.* 76, 277, 1945.
- [8] Feulgen R., Rossenbeck H., *Z phys. Chem.*, 135, 203, 1924.
- [9] Fischer F. G., Böttger J., Lehmann-Echternacht H., *Z physiol. Chem.* 276, 271, 1941.

- [10] Ghosh C., *Stain Technol.* **31**, 17, 1956.
 [11] Gilbert L. M., Overend W. G., Webb M., *Exp. Cell. Res.* **2**, 349, 1951.
 [12] Jackson B., Dessau F. I., *Stain Technol.* **30**, 9, 1955.
 [13] Kunitz M., *J. Gen. Physiol.* **24**, 15, 1940.
 [14] Kunitz M., *Science* **108**, 19, 1948.
 [15] Kunitz M., *J. Gen. Physiol.* **33**, 349, 1950.
 [16] Mazia D., Jaeger L., *Proc. Nat. Acad. Sci.* **25**, 456, 1939.
 [17] McCarty M., *J. Gen. Physiol.* **29**, 123, 1946.
 [18] McCarty M., *J. Exp. Med.* **88**, 181, 1948.
 [19] Pakuła R., Тyc M., Walczak W., Shugar D., *Med. Doświad. i Mikrobiol.* **7**, 335, 1954.
 [20] Pakuła R., Тyc M., Shugar D., *Med. Doświad. i Mikrobiol.* **7**, 323, 1955.
 [21] Pearse A. G. E., *J. Clin. Path.* **2**, 81, 1949.
 [22] Sanders F., *Quart. J. Micr. Sci.* **87**, 207, 1946.
 [23] Shugar D., *Bull. Acad. Polon. Sci., Cl. II*, **1**, 39, 1953.
 [24] Shugar D., *Postępy Biochemii* **1**, 269, 1955.
 [25] Stowell R. E., Zorzoli A., *Stain Technol.* **22**, 51, 1947.
 [26] Vercauteren R., *Nature* **165**, 603, 1950.
 [27] Vercauteren R., *Bull. Soc. Chim. Biol.* **32**, 473, 1950.

ПРИМЕНЕНИЕ В ГИСТОХИМИИ ПОЛЬСКИХ ТОРГОВЫХ ПРЕПАРАТОВ
 СТРЕПТОКОККОВОЙ ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕАЗЫ

Резюме

Исследовалась пригодность для гистохимических целей отечественных торговых препаратов стрептокиназы со стрептодорназой (торговое название: „Streptdaza”) и стрептодорназы свободной от стрептокиназы. Работа содержит подробности относительно методов фиксации, необходимой концентрации энзимов, влияния молярной концентрации буфера и т.п. Путем сравнения исследовали торговый препарат английского происхождения и кристаллическую дезоксирибонуклеазу. В работе приводятся результаты, относящиеся к различным типам тканей.

THE APPLICATION OF POLISH COMMERCIAL PREPARATIONS OF STREPTOCOCCAL
 DESOXYRIBONUCLEASE IN HISTOCHEMISTRY

Summary

A study has been made of the applicability of Polish commercial preparations of streptokinase-streptodornase (Streptdaza), and of streptokinase-free streptodornase, to histochemical work. Details are presented regarding methods of fixation, enzyme concentrations required, influence of buffer molarity, etc., and comparisons have been made with an English commercial preparation and with crystalline desoxyribonuclease. Results obtained with different types of tissue are described.

Otrzymano 10.9.1956 r.

A. PIGOŃ

**WIELOCUKROWCE W ORGANIZMIE UROSTYLA W CZASIE
ŻYCIA AKTYWNEGO I ENCYSTACJI***Zakład Cytofizjologii UJ w Krakowie**Kierownik: doc. dr A. Pigoń*

Praca niniejsza — napisana do specjalnego numeru *Acta Biochimica Polonica* poświęconego 60-leciu urodzin prof. dra Józefa Hellera — jest jedną z zamierzonych prac dotyczących przemiany materii pewnego wycoczka (*Urostyla*) w okresie życia aktywnego i życia utajonego, encystacji. W dorobku naukowym prof. Hellera znajduje się wiele prac poświęconych podobnym zagadnieniom, tzn. porównaniu procesów biochemicznych w organizmie, przechodzącym z okresu życia aktywnego w okres spoczynku, w okres życia utajonego.

Proces encystacji, w czasie którego komórka otacza się grubą osłonką i na pozór nie przejawia cech życia, jest dość szeroko rozpowszechniony wśród pierwotniaków; rzadziej trafia się wśród organizmów wielokomórkowych. Fizjologia tego procesu jest słabo poznana. Mamy nieco danych dotyczących czynników wywołujących przejście formy aktywnej w cystę (proces encystacji) i cysty w formę aktywną (proces ekscystacji); literaturę przedmiotu zestawiał van Wagten donk [13], ale niewiele prac dotyczy porównania przemiany materii cysty i formy aktywnej. Wyjaśnienie procesu encystacji miałoby ogólno-biologiczne znaczenie; być może, przyczyniłoby się do wyjaśnienia procesów wzrostu i różnicowania się u organizmów wielokomórkowych. To zagadnienie znajduje się w centrum zainteresowań nauk biologicznych.

Materiał

Wycoczki stanowiące przedmiot tej pracy utrzymuję w hodowli od stycznia 1955 r. Hodowle wyprowadzone są z materiału pochodzącego z małego, zaniedbanego akwarium w Zakładzie Zoologii UJ, gdzie wycoczki te występowały pojedynczo wśród detritusu.

[613]

Przy próbach oznaczenia — posługiwałem się kluczem Kahla [7] — nie znalazłem opisu, który by odpowiadał hodowanemu wymoczko-
wi. Kształt jego, wielkość, układ rzęsek i rozproszone jądro przypominają *Hemicycliostyla sphagni* (Stokes), *Urostyla caudata* (Stokes) i *Urostyla grandis* (Stein). Od *H. sphagni* wymoczek różni się pojedynczą wodniczką tętniącą i występowaniem grupy szczecin w pobliżu tylnego końca ciała („*Transversalcirren*”). Od *U. caudata* odróżnia go brak chorągiewki rzęsek na końcu ciała i pojedyncza wodniczka tętniąca. Wreszcie od *U. grandis* odróżnia się istnieniem tylko dwóch rzędów szczecin

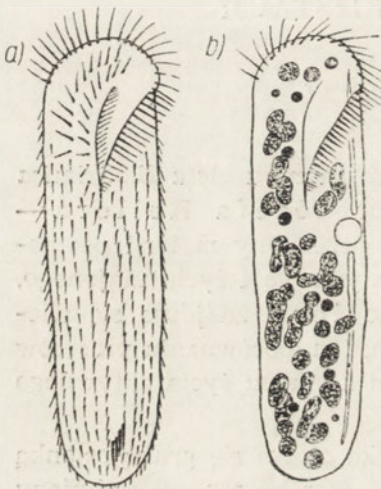


Fig. 1. *Urostyla*, szczep A. a) — układ rzęsek na stronie brzusznej wymoczka, b) — wodniczka tętniąca i aparat jądrowy; jądra duże (macronuclei) — kropkowane, jądra małe (micronuclei) — jednolicie czarne

na polu peristomalnym („*Frontalcirren*”). Nie będąc systematykiem, nie czuję się powołanym do opisywania nowych gatunków; dlatego też w tej pracy określam wymoczką prowizoryczną nazwą „*Urostyla*, szczep A”, tak jak określałem go w czasie doświadczeń. Poniżej podaję krótki opis wymoczka i jego rysunek. Stanowisko systematyczne tego gatunku zostanie określone w przyszłości przez odpowiedniego specjalistę.

Długość wymoczka wynosi 350 — 450 μ , szerokość — 80—140 μ . Peristom zajmuje około $\frac{1}{4}$ ciała. Na polu peristomalnym znajduje się dwa rzędy szczecinek, z których jeden przechodzi na stronę brzuszną. Na stronie brzusznej 11 rzędów rzęsek rozdzielonych wąskim zagłębieniem biegnącym wzdłuż ciała wymoczka (po jednej stronie zagłębienia — 6 rzędów, po drugiej — 5 rzędów, licząc razem z rzędami brzeżnymi, „*Marginalreihen*”). Przy końcu ciała znajduje się grupa 6—8 szczeci („*Transversalcirren*”), które jednak nie dochodzą do końca ciała. Wodniczka tętniąca pojedyncza z kanałem doprowadzającym wzdłuż ciała (czasem wygląda jak rząd wodniczek). Protrichocysty pod pellikulą nieliczne, nie ułożone w rzędy. Protoplazma nieprzejrzysta. Jądro duże (macronucleus), rozdzielone na kilkadziesiąt części (około 50), kilka (4—12) jąder małych (micronuclei). Różnice w zabarwieniu jąder dużych i małych i w ogóle cały aparat jądrowy podobny do aparatu jądrowego *Urostyla grandis* [10, 11, 12]. Wymoczek łatwo się encystuje; cysty są bardzo ciemne, kuliste, średnicy około 100 μ , otoczone przejrzystą błoną grubości około 15 μ .

Metoda

Jak wspomniałem, wymoczki używane do doświadczeń utrzymują się od dłuższego czasu w hodowlach. Pierwszą, wyjściową hodowlę zaszczyliłem pojedynczym osobnikiem *Urostyla*. Hodowle przeszczepia się do świeżego środowiska co kilka tygodni (4—8). Hodowle prowadzono w płytkach Petriego w płynie Pringsheima [6], do którego wrzuca się kilka ziarn gotowanego ryżu i kilka kawałków siana. Bakterie rozwijające się w tym środowisku stanowią wystarczający pokarm dla hodowanych wymoczków.

Hodowle prowadzono równolegle w temperaturach $+18^{\circ}$ i $+27^{\circ}$ C, tak że wymoczków hodowanych w pewnej temperaturze używano do szczepienia dalszych hodowli prowadzonych w tej samej temperaturze. Wymoczki hodowane w obu temperaturach stanowią potomstwo tego samego, wyjściowego osobnika.

Po przeszczepieniu do nowego środowiska wymoczki rozmnażają się szybko; w ciągu około 3 tygodni hodowla osiąga pełne zagęszczenie. Do doświadczeń i obserwacji używano wymoczków z około 2—3 tygodniowych hodowli, tzn. w końcowym okresie wzrostu. W hodowlach tego typu wymoczki odżywiają się bakteriami. Bezbakteryjnych hodowli *Urostyla* nie próbowano otrzymać. By — o ile możliwości — wyrównać stan fizjologiczny wymoczków, pobierano je z hodowli jednego wieku, a przed doświadczeniem głodzono przez 24 godz. z wyjątkiem specjalnych wypadków, o których będzie mowa.

Encystację wymoczków można wywołać w następujący sposób: z hodowli wybierano około 100 wymoczków posługując się pipetką z hamulcem [5] i umieszczano je w 2 ml płynu Pringsheima bez bakterii na 24 godz. Następnie przenosiłem wymoczki do 2 ml świeżego płynu Pringsheima na dalsze 24 godz. Po tym czasie wymoczki przenosiłem do małej objętości (0,2—0,3 ml) płynu Pringsheima, gdzie w przeciągu kilku dni encystowała się część wymoczków. Te, które nie encystowały się w ciągu kilku dni, nie encystowały się i przy dalszym głodzeniu. Jak widać, głodzenie wymoczków jest ważnym czynnikiem, wywołującym encystację. Warunki, w których encystacja zachodzi, zostaną przedstawione w oddzielnej publikacji.

Obserwacje wykonywano prawie wyłącznie na materiale utrwalonym i barwionym. Wymoczki utrwalano płynem Carnoya bez chloroformu (recepta z 1885 r.). Na szkiełko nakrywkowe zanurzone w płynie Carnoya wstrzykiwano wymoczki w jak najmniejszej ilości wody. Wymoczki opadają na szkiełko i przylepiają się do niego. Po 40 min. utrwalania szkiełko nakrywkowe delikatnie wyjmuje się z utrwalacza i suszy. Wymoczki tak przygotowane są płasko rozciągnięte na szkiełku i silnie do niego przyle-

gają. Gdy chodziło o lepsze zachowanie kształtu wymocзка, preparatów nie suszono. Wówczas kształt (rzęski itd.) jest co prawda lepiej zachowany, ale wymocзки łatwo odrywają się od szkiełka w czasie dalszej procedury preparowania.

Obserwacje uzyskane na całych wymoczkach sprawdzano, oglądając skrawki wymoczków, grubości 5 — 9 μ , uzyskane z form aktywnych i różnych form encystacji. Do tego celu wymocзки utrwalano w płynie Carnoya (1885) i zatapiano w celloidynie, a następnie w parafinie.

Glikogen barwiono metodą *B a u e r a* [8] (odczynnik Schiffa po utlenianiu kwasem chromowym) po pokryciu preparatu celloidyną. Kontrolne preparaty nie pokryte celloidyną, poddawano trawieniu śliną przez 3 godz. w temperaturze + 38° C [8]. Ten długi czas trawienia śliną okazał się potrzebny ze względu na znaczną grubość preparatów. W wypadkach, gdy posługiwano się skrawkami, trawienie śliną przez 1 godzinę wystarcza dla całkowitego usunięcia glikogenu.

Polisacharydy inne niż glikogen barwiono przy pomocy reakcji PAS (odczynnik Schiffa po utlenianiu kwasem nadjodowym, Periodic Acid Schiff) według przepisu *Lillie i Greco* [8]. Wobec tego, że glikogen przy tej reakcji daje bardzo silne zabarwienie, zazwyczaj przed przeprowadzeniem tej reakcji z materiału usuwano go przy pomocy trawienia śliną, jak w preparatach kontrolnych barwionych metodą *B a u e r a*.

Forma aktywna *Urostyle*

W protoplazmie wymoczków utrwalonych w okresie życia aktywnego metodą *B a u e r a* wybarwiają się bardzo liczne, drobne ziarenka (średnicy około 1 — 1,5 μ). Ziarenka te nie wybarwiają się, jeżeli wymocзки poddano trawieniu śliną. Dodatni wynik reakcji *B a u e r a* i rozpuszczanie się ziarenek pod działaniem śliny wskazują na to, że mamy do czynienia z glikogenem lub jakimś innym, bardzo podobnym wielocukrowcem. Z jodem ziarenka dają zabarwienie żółtawe lub czerwone — nie zawierają więc skrobi.

Prócz glikogenu szereg innych związków barwi się odczynnikiem Schiffa po utlenianiu kwasem nadjodowym (reakcja PAS). Wymocзки, na których przeprowadzano reakcję PAS, były z reguły przedtem poddane trawieniu śliną (by usunąć glikogen). Widzimy wówczas, że materiał barwiący się czerwono po przeprowadzeniu reakcji PAS związany jest z pelli-kulą pierwotniaka. Najsilniej zabarwiony jest „przełyk”, nieco słabiej — lecz również silnie — rżęski, a zwłaszcza rżęski peristomalne. Rżęski na ciele wymocзка barwią się nieco słabiej, ale silniej niż pellikula. W pelli-kuli widać miejsca zabarwione silniej i miejsca barwiące się słabiej, ale

nie dostrzega się żadnego charakterystycznego układu materiału wybarwionego.

Jak wspomniałem, po reakcji PAS struktury przelyku wybarwiają się najintensywniej. U niektórych jednak, bardzo nielicznych zresztą osobników nie stwierdziłem wybarwienia się przelyku. Jeśli przy tym barwione były jądra komórkowe (hematoksyliną), to czasem jądro duże (*macronucleus*) barwiło się szczególnie słabo. Taki okresowy zanik aparatu przelykowego mógłby być związany albo z podziałem komórki, albo z reorganizacją, tj. zjawiskiem opisanym przez Dembowską [3] u *Stylonychia*.

Wśród wielu związków dających dodatnią reakcję PAS znajduje się również kwas hyaluronowy. Wobec dodatniego wyniku reakcji PAS w rzęskach i pellikuli można by przypuszczać, że kwas hyaluronowy występuje w tych strukturach. Przypuszczenie takie oparte jest na fakcie, że szczecińki *Urostyla* — jak u wszystkich *Hypotricha* — są w rzeczywistości zlepionymi wiązkami rzęsek, w czym mógłby uczestniczyć kwas hyaluronowy. Ponadto, Bairati i Lehmann [1] wykazali obecność tego związku w pellikuli innego pierwotniaka, ameby. By przekonać się, czy pellikula *Urostyla* zawiera kwas hyaluronowy, wymoczki utrwalone, jak to opisano poprzednio, trawiono śliną przez 3 godziny dla usunięcia glikogenu, a następnie poddawano trawieniu roztworem hyaluronidazy (skład roztworu: płyn Ringera 4 ml, bufor fosforanowy 0,1M pH = 7,1 2 ml, preparat hyaluronidazy „Hyalas” Leo 50 V. R. E., kropla chloroformu). Trawienie hyaluronidazą przeprowadzano w temperaturze + 38° C przez 24 i 48 godzin. Kontrolne preparaty przetrzymywano przez ten sam czas w zbuforowanym płynie Ringera z dodatkiem chloroformu w temperaturze + 38° C. W ani jednym wypadku po przeprowadzeniu reakcji PAS nie dało się stwierdzić różnic w intensywności zabarwienia pomiędzy preparatami trawionymi hyaluronidazą a preparatami kontrolnymi. Aby skontrolować aktywność enzymu, równocześnie z wymoczkami trawienia hyaluronidazą poddawano skrawki z pępowiny cielęcia (grubości 8μ, utrwalone płynem Carnoya 1885), gdyż w pępowinie znajdują się duże ilości kwasu hyaluronowego. Kontrolne preparaty pępowiny umieszczano w zbuforowanym płynie Ringera, jak kontrolne preparaty wymoczków. Po 24 godzinach kwas hyaluronowy zostawał usunięty ze skrawków pępowiny, skutkiem czego po przeprowadzeniu reakcji PAS pępowina nie trawiona była zabarwiona znacznie silniej niż pępowina trawiona hyaluronidazą, jednak i ta wykazywała wyraźne — choć lekkie — zabarwienie. Trawienie dłuższe niż 24 godzin nie zmienia tego obrazu.

Tak więc, doświadczenia opisane tu wykazują w „przelyku”, rzęskach i pellikuli *Urostyla* obecność jakichś substancji pokrewnych węglowodanom. Nie ma podstaw przypuszczać, że w strukturach tych występuje w większych ilościach kwas hyaluronowy.

Wymoczki hodowane w temperaturze $+ 27^{\circ}$ i $+ 18^{\circ}$ różnią się nieco w wyglądzie. Wymoczki hodowane w temperaturze wyższej są nieco smuklejsze, ich protoplazma jest bardziej przejrzysta, jasnobrązowa. W wyższej temperaturze wzrost hodowli jest znacznie szybszy, hodowla osiąga też silniejsze zagęszczenie niż w temperaturze niskiej. Encystacja w temperaturze wyższej nie zachodzi lub zdarza się tylko wyjątkowo. Taki sam wpływ temperatury na encystację obserwował również Giese [4] u *Stylonychia curvata*.

Zawartość polisacharydów w komórkach wymoczków hodowanych w temperaturze $+ 18^{\circ}$ i $+ 27^{\circ}$ przedstawia się różnie. W temperaturze wyższej wymoczki zawierają wyraźnie mniej glikogenu niż wymoczki hodowane w temperaturze niższej. Nie przeprowadzałem tu pomiarów ilościowych, lecz oceniając „na oko” wymoczki hodowane w $+ 18^{\circ}$ zawierają około 3 razy więcej glikogenu niż wymoczki hodowane w $+ 27^{\circ}$. Ta różnica w zawartości glikogenu nie jest związana z wiekiem hodowli; również wymoczki z hodowli świeżo zaszczerpionej i szybko rosnącej zawierają mniej glikogenu niż wymoczki w takiej samej hodowli prowadzonej w temperaturze niższej. Ponieważ w temperaturze wyższej wymoczki rozmnażają się szybciej, a równocześnie zawierają mniej glikogenu, nie ma powodów do przypuszczeń, że mniejsza ilość glikogenu jest rezultatem gorszego odżywienia. Raczej różnice w zawartości glikogenu obrazowałyby różnice w metabolizmie, spowodowane różną temperaturą. Różnice te widać również w braku encystacji w temperaturze $+ 27^{\circ}$.

O ile można sądzić z intensywności zabarwienia, ilość węglowodanów dających dodatnią reakcję PAS jest taka sama w wymoczkach hodowanych w obu temperaturach. Również ich układ jest taki sam („przełyk”, rzęski, pellikula).

Głodzenie

Doświadczenia nad rolą węglowodanów w głodzeniu *Urostyla* przeprowadzano w temperaturze $+ 16^{\circ}$ i $+ 27^{\circ}$. Wymoczki hodowane w temperaturze $+ 18^{\circ}$ głodzono w temperaturze $+ 16^{\circ}$, wymoczki hodowane w $+ 27^{\circ}$ głodzono w tej samej temperaturze. Wymoczki z dobrze rosnących hodowli umieszczano w kilku szalkach, około 80 wymoczków w 2 ml bezbakteryjnego płynu Pringsheima. Płyn Pringsheima zmieniano co 24 godziny. Pierwszą partię wymoczków utrwalano bez głodzenia, wprost po wybraniu ich z hodowli; następnie codziennie, co drugi lub co trzeci dzień utrwalano kilkadziesiąt wymoczków na trzech szkiełkach nakrywkowych, aż do wyczerpania zapasu wymoczków. Utrwalone wymoczki barwiono metodą Bauera (pierwsze szkiełko), metodą Bauera po trawieniu śliną (drugie szkiełko), wreszcie wykonywano reakcję PAS na

wymoczkach trawionych śliną (trzęcie szkiełko). Uzyskane preparaty pokazywały glikogen i inne węglowodany w różnych stadiach głodzenia. Ilościowo glikogenu nie oznaczano, oceniano tylko jego ilość według cztero-stopniowej skali: „dużo” = wymoczek wypełniony ziarenkami glikogenu; „średnio” = ziarenka rozproszone w całej plazmie, ale dość luźno; „ślady” = niewielkie ilości skupionych ziarenek, głównie w środkowej części komórki; „nic” = plazma zupełnie pozbawiona glikogenu, najwyżej gdzieniegdzie pojedyncze ziarenko.

Wyniki uzyskane pokazują nieco inny przebieg głodzenia w temperaturze $+16^{\circ}$ i $+27^{\circ}$. W temperaturze wyższej nie głodzone wymoczki

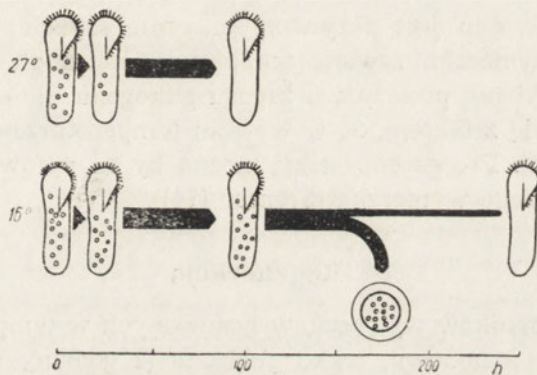


Fig. 2. Schemat przedstawiający przebieg głodzenia w zależności od temperatury (27° i 16°). Kółka wewnątrz wymoczków przedstawiają zapas glikogenu. Czas trwania głodzenia (w godzinach) podaje skala u dołu rysunku. Grubość strzałek oznacza w przybliżeniu ilość wymoczków (pełna grubość strzałki = 100% wymoczków)

zawierają na ogół niezbyt wiele glikogenu (około 80% — „średnio”). W ciągu 24 godzin głodzenia większa część tego glikogenu zostaje stracona — sądząc na oko, około $\frac{2}{3}$, tak że po 24 godzinach 90% wymoczków zawiera tylko „ślady” glikogenu lub „nic”. Pozostała reszta glikogenu zostaje zużyta wolniej, jednak po 100 — 120 godzinach głodzenia w temperaturze $+27^{\circ}$ wymoczki glikogenu praktycznie nie zawierają (około 90% wymoczków — „nic”). Ilość węglowodanów zawartych w pelliculi nie zmniejsza się w tym czasie w sposób widoczny (taka sama intensywność zabarwienia po reakcji PAS). Dalsze głodzenie prowadzi do zmniejszania się wymiarów wymoczków i wreszcie do śmierci.

Inaczej przebiega proces w temperaturze niższej. Wymoczki zaczynające głodówkę zawierają więcej glikogenu skutkiem hodowania ich w niższej temperaturze. W czasie głodówki glikogen znika z komórki dość wolno, zwłaszcza w niektórych wymoczkach. Wśród wymoczków wybranych wprost z hodowli około 75% osobników zawiera glikogenu „dużo”. Po

30 godzinach głodzenia — 60% osobników zawiera glikogenu „dużo”. Po 100 godzinach głodzenia — tzn. tuż przed zaczęciem encystacji — również około 60% osobników zawiera „dużo” glikogenu. W ciągu następnych 100 godzin pewna część wymoczków encystuje się; wszystkie cysty zawierają „dużo” glikogenu. Spośród nie encystowanych wymoczków po 220 godzinach głodzenia około 20% zawiera „dużo” lub „średnio” glikogenu, pozostałe 80% zawiera tylko „ślady” lub „nic”. Jeżeli w tym rachunku liczymy razem formy aktywne i encystowane w czasie głodzenia, to po 220 godzinach głodzenia około 60% komórek zawiera glikogenu „dużo” lub „średnio”.

Wyniki głodzenia, zestawione na rysunku 2, wykazują, że w wyższej temperaturze glikogen jest zużywany znacznie szybciej i że encystacji ulegają tylko wymoczki, zawierające pewien zapas glikogenu w organizmie. Wymoczki nie posiadające zapasu glikogenu nie encystują się, co zapewne wiąże się z faktem, że w wyższej temperaturze encystacja z reguły nie zachodzi. Proces encystacji można by tu porównać z procesem regeneracji u innego wymoczka (*Stentor* [14]).

Regeneracja

Około 300 osobników wymoczków hodowanych w temperaturze + 27°, po wybraniu ich z hodowli, lekko głodzono (2 godziny w temperaturze + 27° w bezbakteryjnym płynie Pringsheima). Wymoczki dzielono na dwie grupy: kontrolną i doświadczalną. Wymoczki w drugiej grupie przecinano igłą szklaną w $\frac{1}{3}$ długości ciała licząc od przodu. W ten sposób tylna część, większa, była pozbawiona peristomu i przełyku, natomiast zawierała większą część zapasu glikogenu. Co 60 minut (w innych doświadczeniach — co 24 godziny) utrwalano po kilkadziesiąt wymoczków operowanych i kontrolnych i wybarwiano glikogen metodą Bauera względnie inne polisacharydy — reakcją PAS po trawieniu śliną materiału utrwalonego.

W ciągu 2—4 godzin w temperaturze + 27° wymoczki operowane regenerują peristom i przełyk. O ile można sądzić po intensywności zabarwienia, ilość polisacharydów w pellikuli nie zmniejsza się w sposób widoczny skutkiem regeneracji. Być może, proces regeneracji zachodzi skutkiem ubytku glikogenu; odnosi się co prawda wrażenie, że po kilku godzinach regeneracji glikogenu jest mniej w komórkach operowanych niż w kontrolnych, ale zmiany te są tak drobne, że nie dają się ująć przy pomocy stosowanej tu czterostopniowej skali. W komórce glikogen jest rozproszony mniej więcej równomiernie; skutkiem tego nie da się przeprowadzić doświadczeń tego typu, jakie W e i s z [14] wykonał na wymoczku gatunku *Stentor coeruleus*.

Encystacja

Encystację wymoczków wywołać można głodząc je w odpowiednio niskiej temperaturze. Po kilku dniach głodzenia ciało wymocзка skraca się, a cytoplazma ciemnieje. Następnie w ciągu kilku godzin wymoczek zaokrągla się, przyczepia do dna naczynia i otacza przezrzystą błoną. Przez następne kilka godzin można obserwować ruchy wymocзка wewnątrz błony, ruchy te jednak wkrótce ustają. Komórka wymocзка w dalszym ciągu wydziela materiał tworzący błonę, tak że ta stopniowo grubieje przez 2 — 4 dni.

Ponad 200 cyst, po utrwaleniu płynem Carnoya, wybarwiono metodą Bauera. Wszystkie te cysty zawierają „dużo” glikogenu. Trzeba jednak zwrócić uwagę, że skutkiem zagęszczenia protoplazmy przy encystacji (objętość cysty jest mniejsza niż objętość formy aktywnej) pozornie cysty są bogatsze w glikogen. Kilkadziesiąt cyst poddano trawieniu śliną (3 godziny w temperaturze + 38°) i następnie zabarwiono je metodą Bauera. Trawienie śliną usuwa cały materiał dający barwną reakcję Bauera; jest więc to glikogen, jak w formie aktywnej.

Rozłożenie węglowodanów zawartych w pellikuli nie ulega w czasie encystacji większym zmianom. Resorpcja peristomu (rzęski i przelyk) zaczyna się już u wymoczków zaokrąglonych, nie otoczonych błoną. Preparaty z takich wymoczków, na których przeprowadzono reakcję PAS po uprzednim usunięciu glikogenu śliną, wykazują czerwono zabarwiony materiał na powierzchni komórki i słabe rzęski. Przelyk — struktura najsilniej barwiąca się u osobników aktywnych — tu barwi się słabo lub zupełnie nie daje się wybarwić. W cyście całkowicie wykształconej materiał dający się wybarwić reakcją PAS znajduje się w cienkiej warstewce na powierzchni protoplazmy, podobnie jak w żywym wymoczku. Wybarwiona warstwa pellikularna nie wykazuje żadnych struktur — rzęsek, przelyku czy tp. Gruba błona otaczająca cystę nie zawiera śladu czerwonego zabarwienia po przeprowadzeniu reakcji PAS.

Ekscystacja

Obserwacje podane poniżej zebrano na materiale wymoczków ekscystujących się samorzutnie. Po kilkunastu lub kilkudziesięciu dniach ekscystacji część cyst ulega reaktywacji, czego pierwszym widocznym objawem są ruchy wymocзка wewnątrz błony cysty. Po pewnym czasie (kilka godzin — kilka dni) wymoczek wydostaje się z błony i zaczyna życie aktywne. Często jednak wymoczek nie może wydostać się z otaczającej go błony i ginie. Materiał, na którym oparto obserwacje, jest szczupły: około 20 wymoczków w każdej grupie, gdyż tylko tyle wymoczków ekscystowało się samorzutnie z około 1500 cyst.

Ponieważ wysoka temperatura uniemożliwia encystację, przypuszczam, że będzie również przyspieszać ekscystację wymoczków, które encystowały się w niższej temperaturze. Rzeczywiście, w ciągu 24 — 48 godzin po umieszczeniu w temperaturze $+ 27^{\circ}$ około 60% cyst zostaje reaktywowanych (ruchy wymoczków wewnątrz błony cysty), lecz na ogół proces nie dobiega do końca, gdyż większa część wymoczków nie może wydostać się z błony i wreszcie ginie. Doświadczenia takie przeprowadzano w bezbakteryjnym płynie Pringsheima zmienianym co 24 godziny; prawdopodobnie więc wpływ flory bakteryjnej był tu nieznaczny. Wpływ temperatury i flory bakteryjnej na ekscystację pełzaka wykazała ostatnio D u d z i a k [2]. Warunki ekscystacji będą w przyszłości tematem dalszych doświadczeń.

Wymoczek bezpośrednio po opuszczeniu błony cysty różni się morfologicznie od formy prowadzącej życie aktywne, ale zazwyczaj w czasie nie dłuższym niż 2 godziny uzyskuje wygląd typowy.

Wymoczki ekscystowane samorzutnie utrwalano bezpośrednio po ekscystacji (około 30 minut po opuszczeniu błony cysty) lub przenoszono do czystego, sterylnego płynu Pringsheima o temperaturze $+ 18^{\circ}$; wymoczki te utrwalano następnie po 12 i 24 godzinach w zwykły sposób.

Ruchome wymoczki wewnątrz błony cysty zawierają „dużo” lub „średnio” glikogenu. Zapas glikogenu maleje następnie dość szybko, pomimo niskiej temperatury, w której wymoczki były trzymane, tak że po 24 godzinach wymoczki zawierają „średnio” lub „ślady” glikogenu. Materiał tworzący pellikulę u formy aktywnej, u cysty cienką warstwą rozdziela protoplazmę od otaczającej ją błony cysty. Przy ekscystacji warstwa ta przechodzi na komórkę; wymoczek, który dopiero co opuścił błonę cysty, ma pellikulę dającą silne zabarwienie po reakcji PAS. Natomiast opuszczona błona cysty nie zawiera lub prawie nie zawiera materiału wybarwiającego się przy tej reakcji.

Kilkaście godzin po ekscystacji wymoczek zewnętrznie nie różni się niczym od formy aktywnej, która encystacji nie przechodziła. Reakcja PAS przeprowadzona na wymoczkach ekscystowanych, z których usunięto glikogen przez trawienie śliną, wykazuje czasem wewnątrz ich plazmy skupienia wybarwionego materiału, przypominające wodniczki pokarmowe. Zapewne nie są to jednak wodniczki, gdyż wymoczki po ekscystacji przebywały w bezbakteryjnym płynie Pringsheima. Ponieważ nie jest to też glikogen, gdyż przed barwieniem zhydrolizowano go przy pomocy enzymu diastatycznego zawartego w ślinie, można przypuszczać, że w 12 — 24 godzin po ekscystacji wewnątrz protoplazmy wymoczek występuje materiał zbliżony do materiału budującego pellikulę. Czasowo pojawienie się tego materiału zbiega się ze zmniejszaniem zapasów glikogenu. Być może, że te dwa zjawiska pozostają ze sobą w związku; zbyt

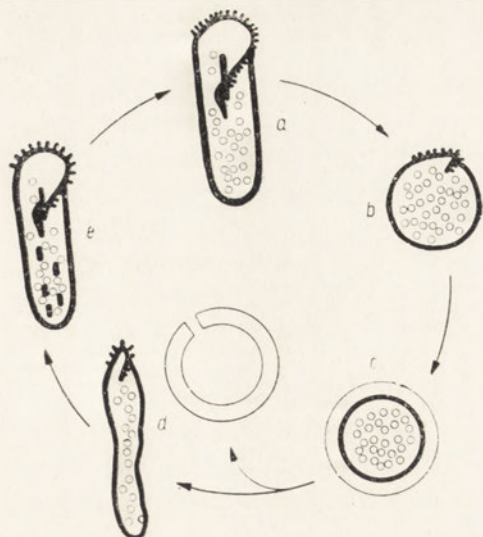


Fig. 3. Zmiany w polisacharydach w czasie encystacji i ekscystacji. Gruba linia oznacza materiał dający barwną reakcję PAS i nie ulegający hydrolizie pod wpływem hyaluronidazy i diastatycznego enzymu śliny. Kółka oznaczają glikogen.

a) forma aktywna, b) osobnik tuż przed encystacją, c) cysta, d) osobnik bezpośrednio po ekscystacji i błona cysty, e) osobnik około 24 godziny po ekscystacji



Rys. 4. Glikogen w komórkach *Urostyla*. a) osobnik z hodowli prowadzonej w temperaturze $+18^{\circ}$, b) osobnik z hodowli w temperaturze $+27^{\circ}$. Zarys komórki żle widoczny w oryginalnej fotografii, tu został obwiedziony czarną linią. Pow. $140\times$



Rys. 5. Polisacharydy pel-
likuli rzęsek i przelyku (re-
akcja PAS po enzymatycz-
nej hydrolizie glikogenu).
Pow. 300 ×

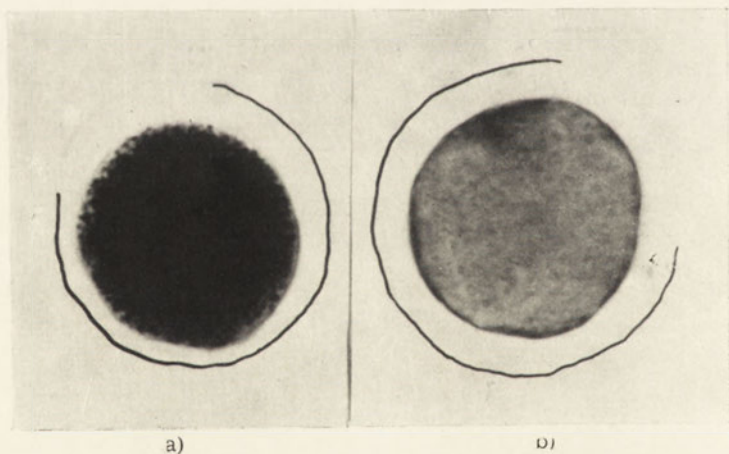


Fig. 6. Cysta *Urostyla*. Błona cysty źle widoczna, tutaj 3/4 obwodu błony zostało obwiedzione czarną linią. a) wybarwiony glikogen (reakcja Bauera), b) wybarwiony materiał pellikularny (reakcja PAS po enzymatycznej hydrolizie glikogenu). Pow. 300 ×

szczupły materiał obserwacyjny uniemożliwia jednak jakiegokolwiek wniosków. Dokładniejsze zbadanie procesu ekscystacji wymaga uprzedniego opracowania metody wywoływania ekscystacji u *Urostyla*. Badania tego typu przeprowadzano już na innych gatunkach wymoczków [13].

Zestawienie wyników

Węglowodany w organizmie *Urostyla* odgrywają rolę budulca i materiału zapasowego. Substancje wybarwiane przy pomocy reakcji PAS, występujące w pellikuli i tworach pellikularnych (rzęski, przełyk), zawierają niewątpliwie węglowodany, jakkolwiek ich bliższa charakterystyka nie jest możliwa na podstawie osiągniętych wyników. Węglowodany te mają znaczenie dla utrzymania struktury pierwotniaka. Świadczy o tym miejsce ich występowania (powierzchnia ciała) i brak wyraźniejszych zmian w ich ilości w czasie głodzenia komórki. Te węglowodany wewnątrz protoplazmy zasadniczo nie występują, prócz — być może — krótkiego okresu po ekscystacji. Pojawiające się wówczas w protoplazmie wymocзка związki, dające reakcję PAS a nie dające się zhydrolizować enzymem diastatycznym śliny, różnią się od glikogenu, normalnie występującego w protoplazmie komórki, a przypominają raczej materiał budujący pellikulę. Ponieważ pojawienie się tych związków zbiega się czasowo z pewnym ubytkiem glikogenu, można by przypuszczać, że te związki powstają właśnie z glikogenu. Kilkadziesiąt godzin po ekscystacji następowałoby więc „odnowienie” pellikuli.

Glikogen (lub związek podobny do glikogenu) występujący wewnątrz protoplazmy wymocзка ma charakter materiału zapasowego: zostaje zużyty podczas głodu. Tworzenie się zapasu glikogenu zależy od temperatury: wyższa temperatura hodowli nie sprzyja odkładaniu glikogenu w plazmie. Nie ma powodów do przypuszczeń, że mała ilość glikogenu u wymoczków hodowanych w wysokich temperaturach wynika z gorszego odżywienia, gdyż w wyższej temperaturze wymoczki rozmnażają się znacznie szybciej. Raczej należy wnosić, że podniesienie temperatury przyspiesza różne procesy życiowe komórki w różnym stopniu, skutkiem czego wymoczki w wyższej temperaturze szybciej dzielą się, odkładają mniej glikogenu, a encystacja nie może zajść, podczas gdy w niższej temperaturze podziały są wolniejsze, gromadzą większy zapas glikogenu i możliwa jest encystacja. Taki wniosek zgadza się z wynikami doświadczeń nad wywoływaniem względnie hamowaniem podziałów komórkowych przy pomocy zmian temperatury [9, 15].

Pragnę tu podziękować mgr B. Węglarskiej (Uniwersytet Jagielloński w Krakowie), która z wielką cierpliwością wprowadzała mnie w technikę parafinowo-celloidynową oraz doc. drowi S. Løvtrupowi (Uniwersytet w Göteborgu) za preparat hyaluronidazy.

Streszczenie

Substancje o charakterze wielocukrowców u wymocзка *Urostyle* grają rolę materiału budulcowego lub materiału zapasowego. W pellikuli, przełyku i rżeskach występują związki dające barwną reakcję PAS, prawdopodobnie jednak nie kwas hyaluronowy. Ich ilość nie ulega zmianom w czasie głodzenia. W procesie encystacji związki te utrzymują się na powierzchni protoplazmy. W komórce wymocзка występuje glikogen, który gra rolę materiału zapasowego, gdyż znika przy głodzeniu. Ilość glikogenu w plazmie maleje, gdy temperatura, w której hodowano wymoczki, wzrasta. Tylko wymoczki zawierające pewien zapas glikogenu mogą się encystować.

LITERATURA

- [1] Bairati A. and Lehmann F. E., *Exp. Cell. Research.* 5, 220, 1953.
- [2] Dudziak B., *Acta Microbiol. Polon.* 4, 115, 1955.
- [3] Dembowska W. S., *Arch. f. Protistenk.* 91, 89, 1938.
- [4] Giese A. C., *Anat. Rec.* 111, 299, 1951
- [5] Holter H. C. R., *Trav. Lab. Carlsberg, Ser. Chim.* 24, 399, 1943.
- [6] Johnson D. F., *Arch. f. Protistenk.* 86, 359, 1936.
- [7] Kahl A., *Wimpertiere oder Ciliata (Infusoria). Die Tierwelt Deutschlands, von F. Dahl. G. Fischer, Jena, 1935.*
- [8] Lison L., *Histochimie et cytochimie animales*, Gauthier-Villars, Paris, 1953.
- [9] Maaloe O. and Lark K. G., "Recent developments in cell physiology" ed. by J. A. Kitching, *Butterworths Sci. Publ.*, London 1954, p. 159.
- [10] Raabe H. *Ann. Univ. M. Curie-Skłodowska. Sect. C.* 1, 1, 1946.
- [11] Raabe H. *Ibid.* 1, 133, 1947.
- [12] Tittler I. A., *La Cellule.* 44, 189, 1935.
- [13] van Wagendonk W. J., "Physiology and biochemistry of Protozoa" ed. by Lwoff and Hunter. Vol. 2. *Acad. Press, New York, 1953* p. 85.
- [14] Weisz P. B., *Jour. Exp. Zool.* 108, 263, 1948.
- [15] Zeuthen E. and Scherbaum O., "Recent developments in cell physiology" ed. by J. Kitching. *Butterworths Sci. Publ.*, London 1954. p. 141.

ПОЛИСАХАРИДЫ В ОРГАНИЗМЕ UROSTYLA В ПЕРИОДЫ АКТИВНОЙ ЖИЗНИ И ИНЦИСТИРОВАНИЯ

Резюме

Вещества полисахаридного характера у инфузории *Urostyle* играют роль строительного или запасного материала. В пелликуле, пищеводе и ресничках выступают соединения, дающие цветную реакцию П.К.Ш. Однако, по всей вероятности, не гиалуриновая кислота. Их количество не подвергается изменению во время голодания. В процессе инцисти-

рования эти соединения не удерживаются на поверхности протоплазмы. В клеточке инфузории выступает гликоген, играющий роль запасного материала, так как при голодании он исчезает. Количество гликогена в плазме уменьшается, если температура культуры инфузорий возрастает. Только инфузории, содержащие определенный запас гликогена, могут инцистировать.

POLYSACCHARIDES IN A CILIATE *UROSTYLA* DURING ACTIVE LIFE AND ENCYSTMENT

S u m m a r y

In the pellicular structures of *Urostyla* (Fig. 1) — pellicle, cirri, and gullet — PAS-positive substances are found (Fig. 5). They are not removed by saliva or hyaluronidase digestion. The amount of the pellicular polysaccharides is approximately constant — as judged by the intensity of staining — irrespective of the nutritional condition of the cell (well fed or starving). During encystment the pellicular polysaccharides remain on the surface of the protoplasm, just below the cyst membrane (Fig. 6b). The membrane contains no PAS-positive material. In excystment the polysaccharides are incorporated into the pellicle of the excysted cell, while the cyst membrane is left free of them (Fig. 3).

Glycogen reserves in *Urostyla* depend on the temperature at which the animals were reared: less glycogen at higher temperature (Fig. 4 a and b). In starving animals glycogen disappears rapidly when the cells are starved at +28°C, and much slower when starved at +16°C. Starvation at lower temperatures induces encystment; this process occurs only when a certain minimum amount of glycogen is present in the *Urostyla* cell (Fig. 2). Therefore the cysts always contain glycogen (Fig. 6a).

Otrzymano 1.10.1956 r.

W. NIEMIERKO

**BADANIA NAD METABOLIZMEM *GALLERIA MELLONELLA* L.
i *BOMBYX MORI* L.**

Z Zakładu Biochemii Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Nenckiego w Warszawie

Kierownik: prof. dr W. Niemierko

Owady, jak dobrze wiadomo, zajmują w świecie zwierzęcym pod wieloma względami wyjątkowe stanowisko. Obserwujemy u nich niespotykaną gdzie indziej różnorodność form, wielką różnorodność sposobu odżywiania się, swoiste cechy procesów wzrostowych i rozwojowych, precyzyjną adaptację funkcji ustrojowych do warunków środowiska. Z tych więc powodów owady stanowią wyjątkowo ciekawy obiekt do wszelkiego rodzaju badań biochemicznych i fizjologicznych.

Badania nad biochemią i fizjologią owadów mają w Polsce swoją ustaloną tradycję. Wystarczy wspomnieć o pionierskich pracach Kopcza z dziedziny hormonów owadów, o licznych badaniach Białaszewicza i jego współpracowników z zakresu fizjologii wzrostu i rozwoju owadów oraz o dobrze znanych w piśmiennictwie światowym pracach Hellera, prowadzonych przez niego nieprzerwanie od przeszło trzydziestu lat i dotyczących różnych stron metabolizmu głównie wilczomlecza, *Celerio euphorbiae* L.

Prace w zakresie biochemii owadów, prowadzone w ciągu ostatnich lat dziesięciu w naszym laboratorium, dotyczą z jednej strony swoistych cech przemian chemicznych związanych ze specyficznym trybem życia i odżywiania się niektórych owadów, z drugiej zaś strony — są poświęcone zagadnieniom biochemii wzrostu i rozwoju. Obiektami badań są mól woskowy *Galleria mellonella* L. i jedwabnik morwowy *Bombyx mori* L. W badaniach prowadzonych na tych dwóch organizmach, odpowiednio do ich biologicznej i fizjologicznej swoistości, zainteresowania nasze szły w nieco odmiennych kierunkach, aczkolwiek niektóre z zagadnień opracowywano porównawczo zarówno na jednym, jak i na drugim owadzie.

Artykuł niniejszy stanowi przegląd uzyskanych przez nas ważniejszych wyników, które w większości przypadków są już ogłoszone drukiem, częściowo jednak są jeszcze nie opublikowane¹.

Wybór mola woskowego, jako obiektu badań biochemicznych, był związany z naszymi poprzednimi zainteresowaniami z zakresu przemiany lipidów. Owad ten, który jak powszechnie wiadomo, jest niebezpiecznym pasożytem uli pszczelich, żerującym na woszczynie, jest w świecie zwierzęcym niemal jedynym organizmem zdolnym do żywienia się woskiem. Danych, że zawarty w woszczynie wosk jest istotnym składnikiem pokarmowym, zużytkowywanym przez gąsienice *Galleria mellonella*, dostarczyły badania kilku dawniejszych autorów (Sieber i Metalnikow [54], Metalnikow [23], Dickman [5], Duspiva [6], Manunta [21] i inni). Cały szereg zagadnień związanych z przyswajaniem wosku pozostawał jednak nadal bardzo mało poznany. Między innymi nie zostało wyjaśnione, które ze składników wosku gąsienice zużywają, a które wydalają, jak przebiega trawienie i chłonięcie tych tak chemicznie inertnych substancji i jaki jest mechanizm tych procesów. Przyswajanie przez gąsienice *Galleria mellonella* wosku, ze względu na jego wyjątkową chemiczną odporność, jest jak gdyby krańcowym przykładem metabolizmu lipidów. Poznanie szczegółów tego procesu mogłoby, jak się nam wydaje, mieć bardziej ogólne znaczenie dla biochemii lipidów.

A priori można było sądzić, że metabolizm wosku w ciele *Galleria mellonella* jest procesem niezmiernie złożonym. Wyświetlenie tego zjawiska wydawało się możliwe jedynie na tle gruntownej znajomości biologii i całokształtu procesów biochemicznych tego organizmu. Z tego też względu pierwsze nasze badania w tym kierunku (Niemierko [39], Niemierko i Cepelewicz [40]) były prowadzone w aspekcie biochemii wzrostu i rozwoju mola woskowego.

Pomimo że w czasie przeprowadzania tych badań napotkano na znaczne trudności, opisane jeszcze przez Teissier [57] i związane głównie z bardzo nierównomiernym przebiegiem wzrostu różnych osobników i niemożliwością dokładnego zidentyfikowania poszczególnych okresów linienia i wzrostu, niemniej jednak udało się w badaniach tych uzyskać szereg wstępnych danych, które posłużyły za punkt wyjścia do dalszych doświadczeń.

Wyjaśniło się między innymi, że procentowa zawartość lipidów, wynosząca u gąsienic młodych 10 — 12% świeżej masy, wzrasta dość raptownie po ostatniej wylince, dochodząc do ponad 25%, co stanowi przeciętnie

¹ W niniejszym artykule ograniczono się do wymienienia zaledwie niektórych tylko prac spoza naszego Zakładu. Obszerne piśmiennictwo dotyczące się omawianych zagadnień cytowane jest w poszczególnych publikacjach podanych w dziale literatury.

około 56% w obliczeniu na substancję suchą. Ilość kwasów nienasyconych zawsze przewyższa ilość kwasów nasyconych, szczególnie u gąsienic dużych, stopień jednak nienasyconienia jest stosunkowo niewielki. Na podstawie oznaczenia liczby jodowej, liczby rodanowej i liczby kwasowej można było obliczyć, że w skład tłuszczów gąsienic *Galleria mellonella* wchodzi głównie kwasy o długości łańcucha węglowego C₁₆ i C₁₈ i że głównym kwasem nienasyconym jest prawdopodobnie kwas oleinowy. W ten sposób wyjaśniło się, że tłuszcze mola woskowego pomimo żywienia się tego owada zupełnie swoistymi lipidami (woskiem), są na ogół podobne do tłuszczów innych zwierząt. Różnią się one jednak od tłuszczów większości *Lepidoptera*, które zawierają zwykle znaczne ilości (Hilditch [15]) kwasów tłuszczowych wielonienasyconych.

W omawianej naszej pracy [40] wykazano ponadto, że ilość pobieranej przez gąsienicę woszczyny, zawierającej przeciętnie około 50% wosku, jest bardzo duża. W przeciągu jednej doby gąsienica może pobrać ilość pokarmu przewyższającą ciężar jej ciała.

Jak wynikało z naszych dalszych badań (Niemierko i Włodawer [44]), jedna gąsienica od momentu wyklucia się z jaja, gdy jej masa wynosi zaledwie 0,01 — 0,02 mg, do osiągnięcia swojej ostatecznej wielkości przed przepoczwarczeniem się (200 — 250 mg) w przeciągu całego swego okresu wzrostu pobiera z pokarmem około 1 g samego wosku.

Dla wyjaśnienia, które z głównych składników wosku i w jakim stopniu są przyswajane przez gąsienicę, wykonano szereg doświadczeń bilansowych, w których oznaczano zarówno ilości poszczególnych substancji zużytkowanych, jak i wydalanych (Niemierko i Włodawer [44]). Uzyskane na podstawie tych doświadczeń wyniki wskazywały na to, że gąsienica przyswaja około 50% spożytego wosku, pozostałą zaś ilość usuwa w wydalinach. Na wytworzenie jednego mg tłuszczów ciała gąsienica zużywa około 16 mg wosku; z ilości tej połowa zostaje wydalona, druga zaś połowa — zmetabolizowana.

Dane dotyczące zużytkowania przez gąsienicę poszczególnych składników wosku doprowadziły do zupełnie nieoczekiwanych wyników. Okazało się mianowicie, że ilość zmetabolizowanych substancji nie zmydlających się była zawsze niemal dwukrotnie wyższa niż ilość znikających kwasów tłuszczowych. Powyższe doświadczenia wskazywały przede wszystkim na przyswajanie przez gąsienicę wszystkich głównych składników wosku, tj. kwasów tłuszczowych i wyższych alkoholi, możliwe, że również i węglowodorów. O zużytkowaniu tych ostatnich substancji przekonały ostatecznie nasze dalsze doświadczenia (Niemierko i Włodawer [46], Włodawer [60]), w których stwierdzono, że gąsienice są zdolne do przyswajania i metabolizowania nawet parafiny dodawanej do pokarmu.

Interpretując uzyskane wyniki wysunęliśmy przypuszczenie, że większe zużycie substancji nie zmydlających się w porównaniu z kwasami tłuszczowymi jest być może zjawiskiem jedynie pozornym. Wydawało się, że może ono zależeć od tego, że wyższe alkohole, a być może i węglowodory zawarte w wosku, utleniają się w czasie swoich przekształceń w ciele gąsienicy do kwasów tłuszczowych. Wskutek tego obok normalnego spalania się kwasów tłuszczowych ustawicznie zachodziłoby wytwarzanie się nowych ich ilości, a zatem ilość spalanych w ustroju kwasów tłuszczowych jest większa, niż wynikałoby to z doświadczeń bilansowych.

Celem sprawdzenia słuszności tego przypuszczenia następnie doświadczenia wykonano na gąsienicach głodzonych, które były skazane na metabolizowanie składników swego ciała, względnie zużycie jedynie tej ilości wosku, która znajdowała się w przewodzie pokarmowym w momencie rozpoczęcia doświadczenia [45, 46].

Wyniki tych doświadczeń dostarczyły dalszych argumentów, przemawiających za słusznością wysuniętego przypuszczenia. W początkowych okresach głodu w pierwszym rzędzie znikaly z ciała substancje nie zmydlające się, natomiast ilość kwasów tłuszczowych bądź zmniejszała się zaledwie nieznacznie, bądź pozostawała na poziomie wyjściowym, w niektórych zaś doświadczeniach nawet się zwiększała.

Brak możliwości zastosowania w naszych badaniach substancji znakowanych izotopami promieniotwórczymi nie pozwolił na definitywne rozstrzygnięcie sprawy przekształcenia się wyższych alkoholi, a być może i węglowodorów w kwasy tłuszczowe. Zagadnienie to w świetle naszych dalszych doświadczeń przedstawia się w sposób następujący. Pobierany przez gąsienice wosk składa się zwykle z około 60% substancji nie zmydlających się i około 40% kwasów tłuszczowych, które występują pod postacią estrów. Analiza przewodu pokarmowego żerujących gąsienic wykazała natomiast, że znalezione w nim lipidy zawierają zaledwie 35% substancji nie zmydlających się i 65% kwasów tłuszczowych. Dość znaczna część kwasów (około 25%) występuje przy tym w stanie wolnym. Po krótkotrwałym głodzie ilość substancji nie zmydlających się znalezionych w jelicie spada do 30%, podczas gdy całkowita ilość kwasów tłuszczowych zmniejsza się tylko do 80% poprzedniej zawartości. W ten sposób stosunek substancji nie zmydlających się do kwasów tłuszczowych jeszcze bardziej przesuwają na korzyść tych ostatnich. Ogólna ilość lipidów znajdowana w przewodzie pokarmowym, w porównaniu z ogromną ilością pobieranego przez gąsienice wosku, jest nieznaczna. Świadczy to o bardzo dużej szybkości przyswajania tych substancji. Należy wobec tego sądzić, że powstające wskutek trawienia wosku kwasy tłuszczowe są szybko wchłaniane przez ścianki przewodu pokarmowego, a na ich miejsce powstają nowe ilości kwasów tłuszczowych jako produkty utlenie-

nia substancji nie zmydlających się. Za słusnością tego poglądu przemawia również i ten fakt, że procentowa zawartość substancji nie zmydlających się w lipidach znalezionych w ekskrementach jest taka sama, jak w spożywanym wosku. Wynika z tego, że przytoczonych powyżej faktów nie można tłumaczyć zwiększonym wydalaniem nieprzyswojonych substancji nie zmydlających się.

Dla bliższego scharakteryzowania lipidów jelita oznaczano w nich zawartość fosfolipidów (Niemierko i Włodawer [47], Włodawer [61]). Stwierdzono, że u gąsienic żerujących w tkance jelita, w przeciwieństwie do innych zbadanych narządów, zawartość fosfolipidów jest bardzo znaczna. Nasunęło to przypuszczenie o możliwej roli tych substancji w przyswajaniu wosku. Wykonano w związku z tym szereg doświadczeń, których wyniki przemawiają za słusnością tego przypuszczenia. Jeżeli gąsienice (o przeciętnej masie 200 mg) znajdowały się w stanie głodu, to już po jednym dniu zawartość fosfolipidów w jelicie szybko spadała z 400 — 500 μg , do około 180 μg , po dwóch dniach głodu wynosiła tylko 80 — 90 μg , tj. zaledwie 20% wartości początkowej. W czasie dłużej trwającego głodu dalszy spadek zawartości fosfolipidów był stosunkowo nieznaczny. Można było wobec tego sądzić, że fosfolipidy strukturalne nie zużywały się, natomiast szybkiemu rozpadowi ulegały te fosfolipidy, które wytworzyły się w jelicie w związku z pobieraniem pokarmu. Argumentów popierających takie przypuszczenie dostarczyły doświadczenia, w których po krótkotrwałym głodzie gąsienice ponownie były karmione. W doświadczeniach tych stwierdzono, że po zaprzestaniu przyjmowania pokarmu bardzo szybko znika znaczna część fosfolipidów ze ścianek jelita, natomiast w czasie ponownego żerowania następuje resynteza fosfolipidów. Należy przy tym podkreślić, że woszczyna, którą żywią się gąsienice, praktycznie biorąc nie zawiera fosfolipidów.

Uzyskane wyniki wskazują na to, że tkanka jelita *Galleria mellonella* zawiera bardzo aktywne fosfatazy, pod których wpływem zachodzi zaobserwowany w powyższych doświadczeniach rozpad i synteza fosfolipidów. Szybki rozpad fosfolipidów dał się łatwo wykazać zarówno w doświadczeniach na wyizolowanych jelitach inkubowanych w kamerze wilgotnej, jak i na inkubowanych zhomogenizowanych jelitach (Włodawer [61]). Danych eksperymentalnych o enzymatycznej syntezie fosfolipidów niestety jeszcze nie posiadamy. Nie ulega jednak wątpliwości, że do badań nad enzymatyczną syntezą tych substancji *in vitro* jelito gąsienic mola woskowego mogłoby stanowić bardzo dogodny materiał.

Rolę fosfolipidów w przyswajaniu wosku przez *Galleria mellonella* badano również metodami cytochemicznymi (Przełęcka [51]). Do wykrywania fosfolipidów w preparatach histologicznych zastosowano reakcję Bakera. Za pomocą tej metody zbadano jelita gąsienic znajdujących się

w różnych stanach fizjologicznych. Uzyskane wyniki całkowicie pokrywają się z wynikami badań biochemicznych. Stwierdzono mianowicie, że obfite występowanie fosfolipidów w komórkach nabłonka jelita obserwuje się tylko w odcinku środkowym (tj. tym gdzie zachodzą procesy chłonięcia) i jedynie u gąsienic żerujących. W gąsienicach głodzonych, bądź też w jelitach inkubowanych w kamercze wilgotnej, ilość barwnych granulacji, odpowiadających fosfolipidom, jest natomiast znacznie mniejsza, wzrasta zaś, gdy głodzone gąsienice ponownie zaczynają się odżywiać.

Należy zaznaczyć, że nie posiadamy jeszcze dotychczas bliższych danych co do charakteru chemicznego fosfolipidów, powstających w jelicie w czasie żerowania gąsienic. Nie wiemy, czy należą one do „klasycznych” fosfatydów, czy też ze względu na to, że tworzą się one z jakichś produktów rozpadu wosku, struktura ich jest zupełnie swoista. Dotychczas udało się jedynie stwierdzić (Włodawer [61], Przełęcka [51]), że spotykamy wśród lipidów jelita znaczną ilość acetalfosfatydów. Zawartość ich gwałtownie się zmniejsza pod wpływem głodu, wzrasta natomiast ponownie w czasie żerowania. Nasuwa się wobec tego pytanie, czy powstawanie w jelicie acetalfosfatydów, zawierających, jak wiadomo, wyższe aldehydy nie jest jakimś pośrednim etapem utlenienia wyższych alkoholi wosku do kwasów tłuszczowych — utlenienia, które jak sądzimy zachodzi w czasie przyswajania wosku. Rola acetalfosfatydów w świecie zwierzęcym jest do chwili obecnej bardzo niejasna. W przypadku zaś *Galleria mellonella* w świetle podanego przypuszczenia byłaby ona przynajmniej częściowo zrozumiała.

Jak już zaznaczono wyżej, badania nasze nad molem woskowym były prowadzone pod kątem widzenia poznania różnych procesów biochemicznych zachodzących w tym ustroju. Dlatego też równoległe do badań bezpośrednio związanych z interesującym nas zagadnieniem przyswajania wosku, studiowano również inne procesy metaboliczne, o których będzie mowa dalej.

W badaniach nad przemianą fosforową (Niemierko i Niemierko [25,26,27,30,31,32]) ustalono przede wszystkim zawartość w ciele gąsienic poszczególnych związków fosforowych zarówno kwasorozpuszczalnych, jak i nierozpuszczalnych, tj. kwasów nukleinowych i fosfolipidów. W dalszych pracach badano natężenie przemian fosforowych u gąsienic głodzonych. W toku badań, w których analizowano zarówno ciało gąsienic jak i ich wydaliny, zupełnie nieoczekiwanie stwierdzono, że tylko nieznaczna część fosforu zawarta w wydalinach występuje w nich pod postacią ortofosforanów. Większa natomiast część jest jakimś labilnym związkiem, prawie całkowicie przekształcającym się w ortofosforan po 7 — 10 minutach ogrzewania w 100° z *n* kwasem. Ponieważ pokarm gąsienic praktycznie nie zawierał, jak się okazało, innych zwią-

ków fosforowych poza ortofosforanami, należało sądzić, że znaleziony labilny związek fosforowy powstaje w ciele *Galleria mellonella*.

W dalszych badaniach, w których zastosowano strącanie tego związku solami baru i ołowiu w niskim pH, odczyn z błękitem toluidyny oraz niektóre inne reakcje, stwierdzono, że znaleziony w wydalinach *Galleria* labilny związek fosforowy jest prawdopodobnie metafosforanem, według zaś obecnie używanej nomenklatury — polifosforanem. Równocześnie stwierdzono, że miazga z gąsienic zawiera enzymy, które ten związek łatwo rozkładają do ortofosforanu.

Analiza wydalin całego szeregu innych owadów wykazywała w nich obecność tylko ortofosforanu. Jedynym wyjątkiem był tzw. mały mól woskowy, *Achroea grisella*, w którego wydalinach większa część fosforu również występowała pod postacią związku labilnego. Ponieważ *Achroea* tak jak i *Galleria* żywi się woskiem, nasunęło się przypuszczenie o możliwej współzależności pomiędzy zdolnością przyswajania wosku a powstawaniem w ciele tych gąsienic polifosforanów.

Ostatnie badania cytochemiczne prowadzone u nas przez Przełęcką i Wroniszewską [52] do pewnego stopnia popierają powyższe przypuszczenia. Stosując metodę Wachsteina i Pisano, wg Ebela [7] dało się mianowicie stwierdzić obecność obfitej ilości polifosforanów w komórkach nabłonka jelita gąsienic żerujących. Natomiast u gąsienic głodzonych ilość polifosforanów była zawsze znacznie mniejsza i znowu się zwiększała, gdy gąsienice ponownie otrzymywały pokarm.

Dla bliższej charakterystyki chemicznej labilnych związków fosforowych, występujących w wydalinach, zastosowano (Niemierko i Wojtczak [35], Wojtczak [62, 63, 64, 65]) celem ich identyfikacji metody frakcjonowanego strącenia solami baru i manganu, metody chromatograficzne i dializę. Na zasadzie uzyskanych wyników można było stwierdzić, że w skład badanych labilnych związków fosforowych wchodzi nie tylko polifosforany, lecz również i pirofosforany. Ilość tych substancji w wydalinach jest mniej więcej jednakowa. Próba identyfikacji polifosforanów nie doprowadziła jeszcze do ostatecznych wyników, ale wydaje się, że mamy do czynienia z polifosforanem nie cyklicznym, lecz łańcuchowym o długości łańcucha dość znacznej.

Dalsze badania nad enzymami występującymi w miazdze gąsienic doprowadziły do wykrycia w ciele gąsienic *Galleria mellonella* fosfataz rozkładających omawiane labilne związki fosforowe (Niemierko i Wojtczak [35]). Celem bliższego poznania tych enzymów (Wojtczak [63, 65]) ustalono charakterystyczne dla nich aktywatory i inhibitory. Specyficzną pirofosfatazę udało się ponadto wyizolować z ciała gąsienic, dość znacznie oczyścić oraz określić jej lokalizację w narządach gąsienicy. Stwierdzono, że najbardziej aktywnymi pod względem czyn-

ności pirofosfatazy są cewki Malpighiego i ciało tłuszczowe. W przewodzie pokarmowym czynność tego enzymu, w przeciwieństwie do czynności polifosfatazy, jest słaba. Zastosowanie wyizolowanej z ciała gąsienic specyficznie działającej pirofosfatazy pozwoliło wykryć obecność pirofosforanów w następujących narządach *Galleria mellonella*: w cewkach Malpighiego, w przewodzie pokarmowym i ciele tłuszczowym [66].

Stosując metody cytochemiczne udało się wykryć, jak podano wyżej, obecność polifosforanów w komórkach nabłonka jelita, ponadto również i w świetle cewek Malpighiego [52].

Dotychczasowe badania prowadzone w naszym laboratorium nad występowaniem u mola woskowego poli- i pirofosforanu nie pozwalają jeszcze na wyjaśnienie ich roli i znaczenia. Rola polifosforanów w świecie żywym jest zresztą w ogóle niejasna, aczkolwiek szereg autorów (np. Stich [55]) wysuwa przypuszczenie, że polifosforany mogą odgrywać rolę donatorów energii. Poza wspomnianym wyżej naszym przypuszczeniem o możliwej współzależności pomiędzy zdolnością do przyswajania wosku przez *Galleria* a powstawaniem polifosforanów w jej ciele nie potrafimy jednak jeszcze powiązać metabolizmu tych substancji z określonymi procesami biochemicznymi i fizjologicznymi tego organizmu.

Równocześnie z nami Heller i jego współpracownicy [13,14] wykryli pirofosforan i niewielkie ilości polifosforanów u *Celerio euphorbiae*, ponadto Stich i Grell [56] na podstawie badań histochemicznych przypuszczają, że polifosforany występują w cewkach Malpighiego *Culex pipiens*. Inne przypadki występowania polifosforanów w świecie zwierzęcym nie były opisywane, aczkolwiek enzymy rozkładające te substancje wykrywano niejednokrotnie (por. Mattenheimer [22]). Polifosforany były natomiast znalezione przez cały szereg autorów, zwłaszcza w ciągu ostatnich kilku lat, wyłącznie w drobnoustrojach (Mann [20], Ebel [7], Stich [55], Thilo [58], Mattenheimer [22], Hoffmann-Ostenhof [16], Kornberg [18] i inni)².

W interpretacji uzyskanych przez nas wyników należy zachować daleko idącą ostrożność. Niezwykłą zdolność *Galleria mellonella* do przyswajania wosku niektórzy autorzy (Dickman [5], Florkin [8], Rybicki [53]) tłumaczą czynnością w ich przewodzie pokarmowym bakterii. Bakterie takie wyizolowane z ciała i hodowane na pożywkach zawierających wosk nie tylko go hydrolizowały [5], lecz również w pewnej mierze utleniały [8].

Nie możemy całkowicie wykluczyć udziału mikroorganizmów w omawianych procesach. Porównując jednak bardzo powoli zachodzące i sto-

² Obszerna literatura do roku 1952, dotycząca tego zagadnienia, podana jest w artykule Niemierko [29]

sunkowo bardzo nieznaczne zmiany w wosku pod wpływem mikroorganizmów, obserwowane przez cytowanych autorów, z gwałtownie przebiegającymi procesami zużytkowania wosku w ciele gąsienicy sądzimy, że w procesach tych udział enzymów wytwarzanych przez *Galleria mellonella* jest w każdym bądź razie bardzo istotny. Zastosowanie antybiotyków być może pozwoli nam na wyjaśnienie udziału flory bakteryjnej w omawianych procesach.

Zupełnie niedawno ukazała się praca Friedmanna i Kerna [9], którzy opisują niezwykle ciekawe zjawisko występujące u ptaka *Indicator minor*. Ptak ten tzw. przewodnik miodowy (honey-guide) doprowadza ludzi i jeden z gatunków *Carnivora*, *Mellivora ratel* do dzikich gniazd pszczoł. Przynętą dla tego ptaka nie jest miód, lecz woszczyna pozostająca po wybraniu miodu przez doprowadzonego człowieka lub zwierzę. Ptak ten ponadto odżywia się również owadami, lecz woszczyna jest jego głównym pokarmem.

W kilku przeprowadzonych doświadczeniach autorzy wyizolowali bakterie z przewodu pokarmowego *Indicator minor* i stwierdzili, że mają one zdolności hydrolizy wosku.

Po zastosowaniu antybiotyków ptaki przeżywały na diecie z woszczyny, aczkolwiek nieco krócej niż zwierzęta kontrolne. Na podstawie swych doświadczeń autorzy wysuwają przypuszczenie, że *Indicator minor* wchłania wosk prawdopodobnie dzięki florze bakteryjnej przewodu pokarmowego.

Wydaje się, że bardzo interesujące byłoby bliższe zbadanie biochemizmu tego procesu, a między innymi, w nawiązaniu do naszych przypuszczeń, sprawdzenie, czy u *Indicator minor* występują polifosforany.

W pracach naszego Zakładu dotyczących różnych stron metabolizmu *Galleria mellonella* dużo uwagi poświęcono przemianom azotowym gąsienic. Badając metabolizm azotowy gąsienic głodzonych (Zielińska [80, 82]) dało się przede wszystkim stwierdzić jego bardzo wysokie i dość równomierne natężenie w ciągu całego okresu długotrwałego głodu eksperymentalnego. Ze względu, z jednej strony, na łatwość przyswajania wosku, z drugiej strony na nagromadzenie w ciele gąsienic bardzo dużych ilości tłuszczów oraz intensywność procesów ich spalania można było oczekiwać, że metabolizm lipidów dominuje nad przemianami innych składników ciała. Dane doświadczalne wykazały jednak, że metabolizm białkowy w czasie głodu ustępuje tylko nieznacznie przemianom lipidów. Stwierdzono, że głównym ostatecznym produktem przemian azotowych u *Galleria mellonella*, tak jak u większości innych owadów (por. pracę Hellera [12]), jest kwas moczowy. Wskutek wywołanego głodem upośledzenia

procesów wydalniczych wytworzony kwas moczowy w znacznej mierze nagromadzał się w ciele gąsienicy. Wynika z tego, że badanie natężenia przemian azotowych u owadów w czasie głodu na podstawie samego tylko oznaczenia ilości wydalonego azotu, jak to często spotyka się w piśmiennictwie, może łatwo doprowadzić do błędnych wniosków. W uzyskanych przez Zielińską wynikach [80, 82] zwraca na siebie uwagę fakt, że nawet w ostatnich okresach głodu, bezpośrednio poprzedzających śmierć głodową zwierzęcia, sama produkcja kwasu moczowego nie ulega upośledzeniu. Świadczy to o tym, że koordynacja czynności bardzo złożonych procesów enzymatycznych, z czym niewątpliwie jest związana synteza kwasu moczowego, może być w ustroju zachowana nawet wówczas, gdy znajduje się on w stanie daleko posuniętych zmian patologicznych.

W dalszych pracach nad przemianą azotową w czasie głodu *Galleria mellonella* (Zielińska [81, 83], Zielińska i Wroniszewska [84]) badano udział poszczególnych narządów gąsienicy w tych procesach. W pracach tych stwierdzono, że zużytkowanie białek w czasie głodu zachodziło we wszystkich zbadanych narządach, nie wykluczając nawet integumentu.

Szczególnie intensywny okazał się rozpad białek w hemolimfie i w gruczołach przednich, z których w czasie długotrwałego głodu zniknęło około 90% białek początkowo w nich zawartych. Intensywny metabolizm białek w gruczołach przednich zasługuje na specjalne podkreślenie. Białka nagromadzone w tym narządzie tworzą jedwab, który powstaje w ciele gąsienicy w ostatnim okresie jej wzrostu. W normalnym przebiegu procesów rozwojowych owada jedwab jest zatem jednym z ostatecznych produktów przemian azotowych, usuwanym z ciała pod postacią nici, z których gąsienica przedzie swój kokon. Stwierdzona przez Zielińską możliwość prawie całkowitego wykorzystania jedwabiu w przemianach głodowych świadczy wobec tego o znacznej plastyczności biochemicznej organizmu i możliwości całkowitego przestawienia procesów metabolicznych w zależności od potrzeb ustroju.

Prowadzone w naszym Zakładzie badania biochemiczne nad głodem gąsienic *Galleria mellonella* były możliwe jedynie przy zastosowaniu pewnego sztucznego zabiegu, polegającego na nałożeniu gąsienicom ligatury tuż nad głowę. Bez tego zabiegu pozbawione pokarmu małe gąsienice bardzo szybko giną, natomiast gąsienice większe, znajdujące się w ostatnim okresie wzrostu, natychmiast rozpoczynają snucie kokonu i przepoczwarzają się. Nakładanie owadom ligatury ma częste zastosowanie w badaniach ich czynności hormonalnych (por. Wigglesworth [59]). W przypadku *Galleria mellonella* nakładanie ligatury gąsienicom po raz pierwszy zastosował Metalnikow [24]

w swoich badaniach nad długością ich życia. Jak opisuje ten autor, gąsienice z nałożoną ligaturą, w zależności od temperatury otoczenia, mogą żyć przez szereg tygodni nie pobierając pokarmu, nie oprzędzając się i nie ulegając przeobrażeniu.

Gdy zastosowaliśmy ten zabieg w celu prowadzenia badań nad metabolizmem głodowym *Galleria mellonella* (Niemierko i współpracownicy [41, 49, 50]) mogliśmy stwierdzić, że po nałożeniu ligatury gąsienice stają się niemal natychmiast nieruchome i bardzo słabo reagują na dotknięcie. Po upływie jednak kilku lub czasem kilkunastu dni daje się zaobserwować pewien wzrost pobudliwości gąsienic, które przy najlżejszym dotknięciu reagują za pomocą gwałtownych ruchów, a nieco później zaczynają nawet dość intensywnie poruszać się spontanicznie.

W związku z zaobserwowanym zjawiskiem nasunęło się pytanie, w jakiej mierze wzmożonej pobudliwości odpowiada zwiększenie natężenia metabolizmu.

Przeprowadzone badania wymiany gazowej gąsienic (Niemierko i Wojtczak [50]) wykazały, że bezpośrednio po nałożeniu ligatury zużycie tlenu przez gąsienicę zaczyna gwałtownie spadać i po upływie kilku godzin stanowi zaledwie $\frac{1}{5}$ lub nawet $\frac{1}{10}$ wartości początkowej. Na tym niskim poziomie zużycie tlenu pozostaje przez dłuższy okres czasu, różny w różnych doświadczeniach i wynoszący od kilku do kilkunastu dni. Po upływie tego czasu zużycie tlenu zaczyna wzrastać bądź powoli, bądź nawet gwałtownie i wkrótce potem gąsienica ginie.

Przebieg zużycia tlenu u badanych gąsienic przypominał wobec tego krzywą o kształcie litery U, charakterystyczną dla zużycia tlenu w czasie metamorfozy u różnych *Lepidoptera* (Heller [10] i inni autorzy), w szczególności zaś również i u *Galleria mellonella* (Crescitelli [4]). Należy jednak zaznaczyć, że jak powiedziano wyżej, gąsienice z nałożoną ligaturą nigdy nie wykazywały żadnych objawów metamorfozy. W dążeniu do wyświetlenia przyczyn wzmożonego zużycia tlenu w ostatnich okresach głodu gąsienic udało się stwierdzić istnienie pewnej korelacji pomiędzy tym zjawiskiem a znaczną utratą wody i wysychaniem gąsienicy, które w tym czasie ma miejsce [50].

Wychodząc z powyższych doświadczeń Wojtczak przystąpił do systematycznych badań w zakresie enzymów oddechowych mola woskowego. Jedna z prac nawiązuje do badań Hellera [11] nad oddychaniem poczwerek w czasie metamorfozy. Heller stwierdził, że przebieg zużycia tlenu przez miazgę z poczwerek daje taką samą krzywą o kształcie „U” jak oddychanie żywych poczwerek. Wykonane analogiczne doświadczenia na miazdze poczwerek *Galleria mellonella* (Wojtczak [69]) wykazały, że również i u tego owada zużycie tlenu przez miazgę

i przez poczwarkę są zupełnie podobne. Gdy natomiast porównywano oddychanie głodzonych gąsienic z oddychaniem ich miazgi nie zaobserwowano przyrostu zużycia tlenu przez miazgę, który by odpowiadał wzmożonemu oddychaniu gąsienic w ostatnich okresach posuniętego głodu.

Systematyczne badania były następnie prowadzone nad czynnością poszczególnych enzymów oddechowych pełniących u *Galleria mellonella* funkcje oksydaz końcowych. Badano między innymi czynność fenoloksydazy i oksydazy bursztynowej w czasie rozwoju i w czasie głodu gąsienic [68,69,70,73]. W badaniach tych wykazano między innymi, że oksydaza bursztynowa jest czynna w ciągu całego okresu larwalnego, wkrótce zaś po przepoczwarczeniu się aktywność jej spada niemal do zera, wzrasta jednak następnie, osiągając maksimum pod koniec metamorfozy.

Fenoloksydaza natomiast zjawia się prawdopodobnie dopiero po ostatniej wylince i jest bardzo aktywna u gąsienic wyrosniętych. Na podstawie szeregu dalszych badań nad tym enzymem zostało wysunięte przypuszczenie, że fenoloksydaza musi odgrywać pewną rolę w procesach metamorfozy [72].

Badając udział poszczególnych oksydaz w całkowitym zużyciu tlenu przez gąsienice mola woskowego Wojtczak stwierdził, że w miazdze są czynne w tych procesach trzy rodzaje enzymów: oksydaza cytochromowa, fenoloksydaza i oksydazy niewrażliwe na KCN, prawdopodobnie oksydazy flawinowe. Procentowy udział tych enzymów w oddychaniu miazgi jest różny w różnych okresach wzrostu larwalnego [72].

Czynność powyższych enzymów była badana między innymi za pomocą dodawania do miazgi specyficznych dla nich inhibitorów. W dalszych doświadczeniach [75], które miały na celu bliższe wyświetlenie tych zagadnień, inhibitory hamujące bądź czynność fenoloksydazy bądź cytochromoksydazy były wprowadzane bezpośrednio do ciała żywych gąsienic, po czym mierzono stopień zahamowania zużycia tlenu przez gąsienice. Wyniki uzyskane na podstawie powyższych doświadczeń były dość nieoczekiwane. Wprowadzenie do organizmu bądź azydków, bądź tiomocznika wywarło zaledwie nieznaczny wpływ na oddychanie gąsienic, aczkolwiek każdy z tych inhibitorów w dużym stopniu hamował oddychanie miazgi. Co więcej, miazga sporządzona z gąsienic, do których uprzednio wprowadzony był któryś z tych inhibitorów, wykazywała poważne zmniejszenie zużycia tlenu. W dalszych seriach doświadczeń spróbowano wprowadzić do organizmu równocześnie obydwie inhibitory, hamujące obydwie oksydazy. W przeciwieństwie do poprzednich doświadczeń zabieg ten spowodował ogromny spadek zużycia tlenu przez gąsienice, dochodzący do 70, a nawet do 90%.

Na podstawie uzyskanych wyników Wojtczak [75] wysuwa następujące bardzo ciekawe przypuszczenie. Cytochromoksydaza i fenoloxydaza znajdują się w ciele gąsienic *Galleria mellonella* w stanie pewnego rodzaju równowagi fizjologicznej. Każdy z tych enzymów może prawdopodobnie pełnić rolę oksydazy końcowej w ciele owada. Gdy jeden z tych układów zostaje zahamowany, drugi przyjmuje na siebie jego funkcje. Dopiero gdy obydwie szlaki oddechowe są zablokowane, następuje bardzo znaczne zmniejszenie się zużycia tlenu przez organizm. Wydaje się, że powyższa hipoteza o korelacji różnych szlaków metabolicznych może mieć zastosowanie w szergu innych przypadków, dając możliwość biochemicznej interpretacji różnych przejawów plastyczności procesów życiowych.

Ostatnio rozpoczęto w Zakładzie badania nad wewnątrz-komórkową lokalizacją enzymów u owadów. Wojtczak, Chmurzyńska i Wojtczak [67], stosując technikę frakcjonowanego wirowania homogenatów, zbadali rozmieszczenie różnych enzymów oddechowych i fosfataz (ATPazy, pirofosfatazy, glicerofosfatazy kwaśnej i alkalicznej) w następujących frakcjach komórkowych u *Galleria mellonella*: 1) w jądrach, 2) w mitochondriach i 3) w małych ziarnistościach wraz z frakcją rozpuszczalną.

Stwierdzono, że lokalizacja badanych enzymów z wyjątkiem oksydazy cytochromowej jest na ogół podobna do lokalizacji występującej u innych owadów względnie ssaków. Oksydaza cytochromowa według nielicznych badań innych autorów na owadach występuje wyłącznie w mitochondriach. W pracach z naszego Zakładu znaleziono ten enzym zarówno w mitochondriach, jak i we frakcji rozpuszczalnej.

Jak wspomniano, w badaniach naszych nad biochemią *Galleria mellonella* zainteresowania nasze dotyczyły między innymi zagadnień związanych ze wzrostem i rozwojem tego owada. Ze względu na trudności, na które w tych badaniach napotkano i o których już wyżej była mowa, okazało się, że mól woskowy nie jest jednak dogodnym obiektem do badań procesów wzrostu i rozwoju od strony biochemicznej. Uzyskane przez nas w tym zakresie wyniki noszą wobec tego charakter raczej fragmentaryczny³. Wymienimy tu jedynie prace nad zmianą zawartości różnych związków fosforowych, obserwowane w czasie wzrostu gąsienic (Niemiernko [28]) i w czasie metamorfozy (Niemiernko i Wojtczak [36]), oraz cytowane już badania dotyczące zmian w zawartości kwasów tłuszczowych [40] i w aktywności niektórych enzymów oddechowych [69,73].

³ Niektóre z naszych analiz chemicznych były wykonane oddzielnie na osobnikach samczych i samiczych. W badaniach tych wykorzystano sposób rozróżnienia płci u gąsienic *Galleria mellonella* opisany przez Wroniszewską [78].

Obiektem bardzo odpowiednim do badań nad biochemią wzrostu i rozwoju jest natomiast jedwabnik. W procesach jego ontogenezy poszczególne stadia i momenty wzrostu i rozwoju dają się łatwo rozgraniczyć i zidentyfikować i, co jest szczególnie dogodnie, przejście z jednego etapu rozwoju do drugiego nie wykazuje poważniejszych różnic indywidualnych i u wszystkich hodowanych osobników zachodzi w barażo do siebie zbliżonych odcinkach czasu.

W piśmiennictwie poświęconym biochemii *Lepidoptera* większość prac dotyczy okresu metamorfozy. Badań nad wzrostem larwalnym jest natomiast znacznie mniej, dotyczą one głównie ostatniego okresu wzrostu gąsienic. Okres ten z punktu widzenia biochemicznego jest zresztą szczególnie ciekawy. W ciągu krótkiego czasu dochodzi do nagromadzenia w ciele gąsienicy dużych ilości substancji zapasowych, które są następnie zużytkowane w czasie metamorfozy. Ponadto w okresie tym zachodzą u niektórych owadów, jak np. u jedwabnika, skomplikowane przemiany azotowe, doprowadzające do wytworzenia jedwabiu. Ostatniemu okresowi wzrostu jedwabnika są poświęcone między innymi prace Bi a ł a s z e w i c z a [1, 2, 3], w których część wspomnianych przed chwilą procesów została w pewnej mierze wyświetlona.

Celem badań prowadzonych w naszym Zakładzie nad biochemią wzrostu i rozwoju jedwabnika było poznanie charakterystycznych procesów biochemicznych, które zachodzą w poszczególnych stadiach rozwojowych począwszy od jaja i kończąc na motyłu. Główną uwagę poświęcono okresom wzrostu, ze specjalnym uwzględnieniem okresów snu linkowego.

Zasadnicza metoda, którą się dotychczas posługiwano w naszych badaniach, polegała na oznaczeniu zawartości różnorodnych składników ciała rozwijającego się organizmu, jego tkanek i narządów, na oznaczeniu natężenia procesów oddechowych oraz na badaniu aktywności enzymów oddechowych w całym przebiegu ontogenezy. Zestawiając i porównując ze sobą otrzymane wyniki uzyskiwało się w pewnej mierze możliwość poznania charakteru metabolizmu i jego ewentualnych zmian w poszczególnych momentach procesów wzrostu i rozwoju.

Badania nad oddychaniem *Bombyx mori* były przeprowadzone w ciągu całego okresu rozwoju ontogenetycznego począwszy od gąsienic wkrótce po wykluciu się z jaja aż do formy imaginalnej. Oznaczano zarówno zużycie tlenu przez żywe gąsienice, poczwarki i motyle, jak i endogenne oddychanie miazgi, sporządzonej przeważnie z tych samych osobników (W o j t c z a k [76,77]).

Zużycie tlenu przez poczwarkę przebiegało na ogół według krzywej o kształcie litery „U”, charakterystycznej dla metamorfozy szeregu owadów. W przeciwieństwie jednak do tego, co stwierdzono poprzednio

u *Galleria* [69, 73] i co opisał Heller dla *Celerio* [11], endogenne oddychanie miazgi z poczwarek przebiegało równoległe do oddychania żywej poczwarki jedynie w pierwszej połowie metamorfozy. W drugiej połowie tego okresu zużycie tlenu przez miazgę znacznie spada, gdy równocześnie zużycie tlenu przez poczwarkę utrzymuje się do końca metamorfozy na bardzo wysokim poziomie. W badaniach czynności poszczególnych enzymów oddechowych w czasie metamorfozy wyjaśniło się, że w pierwszej połowie metamorfozy znaczny udział w funkcjach oksydazy końcowej bierze prawdopodobnie fenoloksydaza, natomiast w drugiej połowie tego okresu wzmagają się aktywność oksydazy cytochromowej i oksydazy burztywnej.

Badania Wojtczaka nad procesami oddechowymi w okresie larwalnym jedwabnika doprowadziły do bardzo interesujących wyników, będących w zgodzie z naszymi innymi badaniami biochemicznymi, o których będzie mowa dalej.

Jak dobrze wiadomo, rozwój larwalny gąsienic jedwabnika składa się z pięciu stadiów wzrostu przedzielonych okresami snu linkowego. W ciągu każdego okresu wzrostu gąsienica intensywnie się odżywia i bardzo znacznie powiększa ciężar swego ciała, natomiast w okresach snu nie pobiera pokarmu i jest zupełnie nieruchoma. W zależności od tego oddychanie gąsienic, jak już dawno stwierdzono, jest bardzo intensywne w czasie wzrostu i żerowania i bardzo obniżone w okresach snu linkowego. W przeciwieństwie do tego (Wojtczak [76, 77]) poziom zużycia tlenu przez miazgę był stosunkowo nieznaczny w okresach międzylinkowych i bardzo wysoki w okresie snu.

Zaobserwowana wysoka aktywność enzymów oddechowych w okresie snu linkowego była, jak można było sądzić, odbiciem procesów metabolicznych, które zachodzą w tym czasie w gąsienicy z dużą intensywnością. Szereg takich procesów został stwierdzony w naszych badaniach za pomocą analizy chemicznej ciała gąsienicy i jej narządów w różnych momentach wzrostu i snu linkowego. Zaobserwowano między innymi, że w czasie snu linkowego obok znikania pewnej ilości tłuszczów zachodzi dość intensywna synteza fosfolipidów (Niemiernko, Włodawer, Wojtczak [33,34]). Stwierdzono, że wytworzony przez gąsienice w czasie wzrostu glikogen, który gromadzi się głównie w ciele tłuszczowym, gdzie zawartość jego dochodzi do 8%, znika gwałtownie w czasie snu linkowego, zmniejszając się do $\frac{1}{5}$ swojej wartości poprzedniej (Niemiernko, Kąkol, Załuska [42]). Zaobserwowano, że równoległe ze znikaniem glikogenu zachodzi wytwarzanie się chityny. Bardzo niewielka jej część jest następnie usunięta z ciała razem ze zrzucaną skórą, znaczna natomiast część chityny pod koniec okresu snu ulega ponownemu zmetabolizowaniu (Załuska [79]).

Wszystkie te fakty, jak również niektóre inne posiadane przez nas dane, wskazują na to, że okres snu linkowego, podczas którego natężenie zużycia tlenu jest niskie, gąsienica zaś nie pobiera pokarmu i pozostaje zupełnie nieruchoma, jest mimo wszystko tylko pozornie stanem „biochemicznego spoczynku”. W tym okresie niewątpliwie zachodzą bardzo istotne przemiany biochemiczne doprowadzające w krótkim czasie do głęboko sięgającej przebudowy składników ciała, do zmiany aktywności czynnych w ciele enzymów i, być może, do powstawania nowych układów enzymatycznych.

W badaniach nad metabolizmem jedwabnika w czasie wzrostu gąsienic zajmowano się między innymi zagadnieniem przyswajania składników nieorganicznych pokarmu. W dotychczasowych doświadczeniach udało się wykazać istnienie zarówno wybiórczego chłonięcia niektórych kationów, jak też ich wybiórczego gromadzenia w poszczególnych tkankach i narządach (Kiełbasińska [17]).

Charakteryzując procesy biochemiczne, które zachodzą u jedwabnika w ciągu całej jego ontogeny, omówimy tylko niektóre ważniejsze i ciekawsze uzyskane przez nas wyniki. Zaobserwowano przede wszystkim już w czasie pierwszych kilku dni rozwoju embrionalnego znaczne zużycie glikogenu (Załuska [79]). Zużycie to stanowi około 70% ilości glikogenu zawartego w świeżo złożonych jajach. Dalszy spadek zawartości glikogenu następuje dopiero po diapauzie, gdy równocześnie zaczyna wytwarzać się chityna. Przemiany tych dwóch składników w każdym z następujących po sobie kolejno okresach wzrostu wykazują prawidłowości, o których pokrótce już była mowa wyżej. Do metabolizmu glikogenu, rozpatrywanego od nieco odmiennej strony, jeszcze dalej powrócimy.

W okresie postdiapauzy w czasie rozwoju embrionalnego zaobserwowano ponadto bardzo intensywną syntezę kwasów nukleinowych (Niemierko, Włodawer, Wojtczak [33,34]), ilość wytwarzanego kwasu dezoksyrybonukleinowego była przy tym większa niż ilość kwasu rybonukleinowego. Procentowa zawartość kwasów nukleinowych w obliczeniu na substancję suchą jest największa u świeżo wyklutych gąsienic. W czasie całego okresu wzrostu ilość ta stopniowo spada, nie wykazując jednak, w przeciwieństwie do przemian glikogenu, jakichkolwiek poważniejszych wahań w okresach snu linkowego.

W okresie rozwoju embrionalnego zaobserwowano wreszcie zużywanie się ogólnej ilości lipidów przy równoczesnej syntezie fosfolipidów (Niemierko, Włodawer [34a]). Analogiczne zjawisko zachodziło, jak już było podkreślone wyżej, w czasie każdego snu linkowego. W okresie metamorfozy występuje zarówno rozpad fosfolipidów, jak i ich synteza

[34], [38]. Przebieg tych procesów ma charakter krzywej o kształcie litery „U”.

Bardzo znaczne gromadzenie się lipidów w ciele gąsienicy ma miejsce w ciągu ostatniego okresu wzrostu w czasie poprzedzającym snucie kokonu. Zjawisko to zostało opisane przez różnych autorów, między innymi przez Białaszewicza [2]. W naszych badaniach (Niemierko [37]) dało się stwierdzić, że gromadzenie się tłuszczów jest związane z przyrostem większych ilości kwasów nienasyconych niż nasyconych i prawdopodobnie również z desaturacją kwasów tłuszczowych.

W badaniach nad metabolizmem lipidów podjęto próbę oznaczenia zawartości w ciele jedwabnika lipidów wolnych i lipidów związanych (Niemierko i Kurowski [43], Kurowski [19]). Jako lipidy wolne uważano te z nich, które się rozpuszczają w eterze naftowym, za związane natomiast tylko te, które się rozpuszczają w rozpuszczalnikach organicznych po uprzednim zadziałaniu alkoholem. Przeprowadzone za pomocą tej metody analizy, w których badane były gąsienice począwszy od czwartego okresu wzrostu, wykazały, że zaledwie około 30% lipidów występuje w ciele jako lipidy wolne, większa ich część natomiast jest związana, prawdopodobnie z białkami. W ostatnim okresie wzrostu, już po zaprzestaniu przyjmowania pokarmu, w czasie rozpoczęcia snucia kokonu obserwuje się jak gdyby gwałtowne „uwalnianie się” lipidów z ich połączeń i w ciągu całego dalszego życia jedwabnika aż do stadium *imago* ilość lipidów wolnych znacznie dominuje stanowiąc 60%, u motyla zaś nawet 30% wszystkich lipidów. Nasuwa się przypuszczenie, że „uwolnienie się” lipidów w okresie snucia kokonu jest być może raczej „uwolnieniem się” białek z ich połączeń lipoproteinowych w związku z wytwarzaniem się jedwabiu.

Analogiczne zagadnienie przemiany związków wieloskładnikowych było badane w dziedzinie metabolizmu glikogenu (Załuska [79]). Stosowana metodyka pozwalała nie tylko na oznaczenie zawartości „wolnego” i „związanego” glikogenu, lecz również na stwierdzenie powiązania glikogenu z różnymi frakcjami białkowymi. Badania były prowadzone na gąsienicach z czwartego i piątego okresu wzrostu oraz w czasie całego trwania metamorfozy.

Stwierdzono między innymi, że do końca życia larwalnego jedwabnika, znaczna część glikogenu jest związana z różnymi frakcjami białkowymi. „Uwalnianie się” glikogenu zachodzi dopiero bezpośrednio przed i w czasie przepoczwarczenia się. W młodej poczwarcie około 60% glikogenu występuje w stanie wolnym. W przebiegu metamorfozy możemy ponownie stwierdzić wiązanie się glikogenu i jego przerzucanie się z jednej frakcji białkowej do drugiej.

Uzyskane dotychczas wyniki wskazują na wybitny dynamizm przemian glikogenowych. Dynamizm ten przejawia się nie tylko od strony rozpadu i odbudowy glikogenu, o czym już była mowa wyżej, lecz być może jeszcze w większym stopniu od strony tworzenia się i rozpadu połączeń glikogenu z różnymi białkami.

Streszczenie

Przedstawione w niniejszym artykule najważniejsze z uzyskanych dotychczas przez nas wyników z badań nad biochemią owadów wyraźnie wskazują nie tylko na wielką różnorodność zachodzących w nich procesów, lecz i na ich plastyczność. Na przykładzie *Galleria mellonella* zetknęliśmy się z istnieniem w organizmie zupełnie swoistych biochemicznych mechanizmów adaptacyjnych, na przykładzie natomiast *Bombyx mori* mieliśmy możliwość stwierdzić, że w przebiegu wzrostu i rozwoju zwierzęcia obok bezpośrednio uchwytnych i rzucających się w oczy zmian morfologicznych występują częstokroć nie mniej jaskrawe zmiany w charakterze procesów biochemicznych.

LITERATURA

- [1] Białaszewicz K., *Acta Biol. Exper.* **10**, 352, 1936.
- [2] Białaszewicz K., *Acta Biol. Exper.* **11**, 20, 1937.
- [3] Białaszewicz K., *Acta Biol. Exper.* **11**, 229, 1937.
- [4] Crescitelli F. J., *Cell. Comp. Physiol.* **6**, 351, 1935.
- [5] Dickmann A. J., *Cell. Comp. Physiol.* **3**, 223, 1933.
- [6] Duspiva A. Z., *Z. vergl. Physiol.* **21**, 632, 1935.
- [7] Ebel J. P., *Bull. Soc. Chim. Biol.* **34**, 498, 1952.
- [8] Florokin M., Lozet F. i Sarlet H., *Arch. Intern. Physiol.* **57**, 71, 1949.
- [9] Friedmann H. i Kern J., *Quart. Rev. Biol.* **31**, 19, 1956.
- [10] Heller J., *Acta Biol. Exper.* **2**, 225, 1928.
- [11] Heller J., *Acta Biol. Exper.* **14**, 229, 1947.
- [12] Heller J. i Aremówna H., *Z. vergl. Physiol.* **16**, 362, 1932.
- [13] Heller J., Karpiak S. i Zubikowa J., *Nature* **166**, 187, 1950.
- [14] Heller J., Świechowska W. i Karpiak S., *Acta Physiol. Polon.* **3**, 295, 1952.
- [15] Hilditch T. P., *The chemical constitution of natural fats*, London 1949.
- [16] Hoffmann-Ostenhof O., *Naturwissenschaften* **39**, 303, 1952.
- [17] Kieibasińska J., Wyniki nie opublikowane.
- [18] Kornberg A., Kornberg S. R. i Simms E. S., *Bioch. Biophys. Acta* **20**, 215, 1956.
- [19] Kurowski C., Wyniki nie opublikowane.
- [20] Mann T., *Biochem. J.* **38**, 345, 1944.
- [21] Manunta C., *Reale Acad. Naz. Linzei*, Serie VI, 75, 1935.
- [22] Mattenheimer H., *Hoppe Seyler's Z.* **303**, 107, 1955.
- [23] Metalnikow S., *Arch. Zool. exp. et gen.* **4**, 489, 1908.

- [24] Metalnikow S. i Savitsch C., *C. R. Soc. Biol.* **124**, 907, 1937.
- [25] Niemierko S., *Acta Biol. Exper.* **15**, 91, 1950.
- [26] Niemierko S., *Acta Biol. Exper.* **15**, 101, 1950.
- [27] Niemierko S., *Acta Physiol. Polon.* **1**, Supl., 101, 1950.
- [28] Niemierko S., *Acta Biol. Exper.* **16**, 187, 1952.
- [29] Niemierko S., *Post. Bioch.* **1**, 50, 1953.
- [30] Niemierko S., i Niemierko W., *Abstr. of commun. I Intern. Cōngs. Biochem.* **620**, 1949.
- [31] Niemierko S. i Niemierko W., *Acta Biol. Exper.* **15**, 111, 1950.
- [32] Niemierko S. i Niemierko W., *Nature*, **166**, 268, 1950.
- [33] Niemierko S., Włodawer P. i Wojtczak A., *Acta Physiol. Polon.* **5**, 588, 1954.
- [34] Niemierko S., Włodawer P. i Wojtczak A. F., *Acta Biol. Exper.* **17**, 255, 1956.
- [34a] Niemierko S. i Włodawer P. Wyniki nie opublikowane.
- [35] Niemierko S. i Wojtczak A. B., *Acta Physiol. Polon.* III Zjazd P. T. F., 217, 1952.
- [36] Niemierko S. i Wojtczak A. F., *Acta Physiol. Polon.* **5**, 586, 1954.
- [37] Niemierko W., *Acta Biol. Exper.* **14**, 137, 1947.
- [38] Niemierko W., *Acta Biol. Exper.* **14**, 151, 1947.
- [39] Niemierko W., *Abstr. of comm. XVII Intern. Physiol. Congress*, **284**, 1947.
- [40] Niemierko W. i Cepelewicz S., *Acta Biol. Exper.* **15**, 57, 1950.
- [41] Niemierko W., Cepelewicz S., Kiernik-Zielińska Z., Niemierko S., Włodawer P. i Wojtczak L., *Acta Biol. Exper.* **15**, Supl. 38, 1949.
- [42] Niemierko W., Kąkol I. i Załuska H., *Acta Physiol. Polon.* **5**, 584, 1954.
- [43] Niemierko W. i Kurowski C., *Acta Physiol. Polon.* **5**, 583, 1954.
- [44] Niemierko W. i Włodawer P., *Acta Biol. Exper.* **15**, 59, 1950.
- [45] Niemierko W. i Włodawer P., *Acta Physiol. Polon.* **1**, Supl. 104, 1950.
- [46] Niemierko W. i Włodawer P., *Acta Biol. Exper.* **16**, 157, 1952.
- [47] Niemierko W. i Włodawer P., *Acta Physiol. Polon.* III Zjazd P. T. F., 219, 1952.
- [48] Niemierko W., Włodawer P. i Przełęcka A., *3éme Congr. Intern. Bioch.* **112**, 1955.
- [49] Niemierko W. i Wojtczak L., *Abstr. of commun. I Inter. Congr. Bioch.* **621**, 1949.
- [50] Niemierko W. i Wojtczak L., *Acta Biol. Exper.* **15**, 79, 1950.
- [51] Przełęcka A., *Acta Biol. Exper.* **17**, 231, 1956.
- [52] Przełęcka A. i Wroniszewska A., Wyniki nie opublikowane.
- [53] Rybicki M., *Ann. Uniw. M. Curie-Skłodowska* **8**, ser. C, 15, 1952.
- [54] Sieber N. i Metalnikow S., *Pflüg. Arch.* **102**, 269, 1904.
- [55] Stich H., *Chromosoma* **7**, 693, 1956.
- [56] Stich H. i Grell M., *Nature* **176**, 930, 1955.
- [57] Teissier G., *Trav. Station Roscoff* **9**, 31, 1931.
- [58] Thilo E., Grunze H., Hammerling J. Werz G., *Z f. Naturforsch.* **11b**, 266, 1956.
- [59] Wigglesworth V. B., *The principles of insect physiology*, London 1950.
- [60] Włodawer P., *Łódzkie Tow. Nauk.*, Wyd. III nr 29, 1954.

- [61] Włodawer P., *Acta Biol. Exper.* **17**, 221, 1956.
[62] Wojtczak A. B., *Acta Physiol. Polon.* **5**, 590, 1954.
[63] Wojtczak A. B., *Acta Biol. Exper.* **17**, 235, 1956.
[64] Wojtczak A. B., *Acta Bioch. Polon.* **3**, 355, 1956.
[65] Wojtczak A. B. *Acta Bioch. Polon.*, **3**, 369, 1956.
[66] Wojtczak A. B., Dane nie opublikowane.
[67] Wojtczak A. B., Chmurzyńska W., Wojtczak L., Praca przygotowana do druku.
[68] Wojtczak L., *Acta Biol. Exper.* **16**, 199, 1952.
[69] Wojtczak L., *Acta Biol. Exper.* **16**, 223, 1952.
[70] Wojtczak L., *Acta Biol. Exper.* **16**, 239, 1952.
[71] Wojtczak L., *Acta Physiol. Polon.* III Zjazd P.T.F. 219, 1952.
[72] Wojtczak L., *Acta Physiol. Polon.* **5**, 593, 1954.
[73] Wojtczak L., *Łódzkie Tow. Nauk.*, Wydz. III nr 31, 1954.
[74] Wojtczak L., *Acta Physiol. Polon.* **5**, 111, 1954.
[75] Wojtczak L., *3ème Congr. Intern. Bioch.*, 112, 1955.
[76] Wojtczak L., *Acta Bioch. Polon.* **3**, 197, 1956.
[77] Wojtczak L., *Acta Biol. Exper.* **17**, 205, 1956.
[78] Wroniszewska A., *Acta Biol. Exper.* **17**, 215, 1956.
[79] Załuska H., Wyniki nie opublikowane.
[80] Zielińska Z. M., *Acta Biol. Exper.* **16**, 187, 1952.
[81] Zielińska Z. M., *Acta Physiol. Polon.* **5**, 595, 1954.
[82] Zielińska Z. M., *Łódzkie Tow. Nauk.*, Wydz. III nr 33, 1955.
[83] Zielińska Z. M., *Acta Biol. Exper.* **17**, w druku, 1957.
[84] Zielińska Z. M., i Wroniszewska A., *Acta Biol. Exper.* **17**, w druku 1957.

ИССЛЕДОВАНИЯ ПО МЕТАБОЛИЗМУ
GALLERIA MELLONELLA L. и *BOMBYX MORI* L.

Резюме

В статье дается обзор исследований по биохимии насекомых, которые велись в течение последних десяти лет в Биохимической Лаборатории Института имени Ненцкого.

Воцинная моль *Galleria mellonella* исследовалась, главным образом, с точки зрения ее специфической способности ассимилировать воск. Работы же по тутовому шелкопряду *Bombyx mori* были направлены на изучение биохимических процессов во время его роста и развития.

Исследовался жировой, углеводный, азотистый, фосфорный и минеральный обмен при помощи не только биохимических, но также частично и цитохимических методов. Некоторые работы были посвящены, кроме того, деятельности ферментов, главным образом окислительных и их размещению в теле насекомых.

Главные выводы сводятся к следующему: с одной стороны у насекомых наблюдаются порой совершенно своеобразные биохимические процессы, как например, возникновение в теле *Galleria mellonella* боль-

ших количеств пиро- и полифосфата. С другой стороны — во время роста и развития насекомых, наряду с бросающимися в глаза морфологическими изменениями, неоднократно возникают не менее яркие изменения в характере обмена веществ.

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN STOFFWECHSEL BEI *GALLERIA MELLONELLA* L.
UND *BOMBYX MORI* L.

Z u s a m m e n f a s s u n g

Es wird eine Übersicht gegeben über die Untersuchungen auf dem Gebiete der Insektenbiochemie, die während der letzten zehn Jahre in dem Biochemischen Laboratorium des Nencki Instituts durchgeführt wurden.

Die Wachsmotte (*Galleria mellonella*) wurde hauptsächlich vom Standpunkte ihrer spezifischen Eigenschaft das Wachs zu assimilieren studiert; bei dem Seidenspinner (*Bombyx mori*) wurden dagegen in erster Linie die biochemischen Prozesse beobachtet, die mit den Wachstums- und Entwicklungsvorgängen verbunden sind.

Es wurden Fettstoff-, Kohlenhydrat-, Stickstoff-, Phosphor- und Mineralstoffwechsel untersucht. Dabei wurden sowohl biochemische wie teilweise auch zytochemische Methoden benutzt. Ausserdem wurde die Tätigkeit der Enzyme, hauptsächlich der Oxydationsenzyme, und ihre Verteilung im Insektenkörper studiert.

Die Ergebnisse richten die Aufmerksamkeit auf die Existenz bei den Insekten mancherlei ganz eigentümlicher biochemischen Prozesse. Als Beispiel dient die Entstehung sehr grossen Mengen Pyro- und Polyphosphate, die bei der Wachsmotte festgestellt wurde. Die Resultate, besonders jene die auf Grund der Untersuchungen des Seidenspinners erhalten wurden, zeigen ausserdem deutlich, dass man bei Insekten neben den auffallenden morphologischen Veränderungen, manchmal nicht weniger scharf ausgeprägte Stoffwechselveränderungen beobachten kann.

Otrzymano 22.10.1956 r.

W. OSTROWSKI, A. KRAWCZYK i B. GALOS-BICZOWA

ELEKTROFOREZA PASMOWA W OBECNOŚCI ADSORBENTÓW

Z Zakładu Chemii Fizjologicznej A M w Krakowie

Kierownik: prof. dr B. Skarżyński

Prawidłowy rozdział elektroforetyczny uzależniony jest od licznych czynników, które możemy ująć jako siły rozdzielające (driving forces — spadek potencjału, rodzaj i stężenie elektrolitów) i siły oporu (resistive forces — siły powierzchniowe, lepkość roztworu oraz zdolności adsorpcyjne środowiska) [14, 18]. Siły oporu będą miały wartości niezienne przy stosowaniu jednego i tego samego środowiska, natomiast będą zmieniać się wraz ze zmianą rodzaju środowiska. Odgrywają one szczególną rolę przy przeprowadzaniu tzw. elektroforezy pasmowej, gdzie środowiskiem są najrozmaitsze substancje stałe, jak bibuła, agar, celuloza oraz inne substancje o charakterze żelu lub porowatym, wysycone odpowiednim elektrolitem. Jakkolwiek najczęściej stosowana jest przy przeprowadzaniu elektroforezy pasmowej bibuła, zastosowanie znajdują również takie środowiska jak: żel agarowy [10], mieszanina agaru i metylocelulozy [16], skrobia [12], sproszkowane szkło [3], proszek z celulozy [17], pektyny poddane działaniu enzymów [9] i jeszcze inne substancje [2]. Dla umożliwienia rozdziału pewnych mieszanin (cukry, sterydy) składniki mieszaniny zostają uprzednio przeprowadzane w połączenia z innymi związkami, obdarzone odpowiednim ładunkiem elektrycznym [6, 11]. Stosowane jest również elektroforetyczne rozdzielanie mieszanin w obecności ciał zmniejszających napięcie powierzchniowe (detergenty) [1, 13].

Jakkolwiek do rozdziału elektroforetycznego, a szczególnie do rozdziału białek, znajdują zastosowanie coraz to inne i nowe środowiska, wpływ ich na sam proces elektroforezy nie był dotychczas dokładniej badany. Ta okoliczność skłoniła nas do przeprowadzenia odpowiednich doświadczeń, których wyniki poniżej podajemy.

Metody

Środowisko, w którym przeprowadzano rozdział elektroforetyczny, przygotowywaliśmy w następujący sposób: jako składnik podstawowy został użyty 0,2% roztwór agaru w odpowiednim buforze. Stężenie to stosowaliśmy jako tylko nieznacznie wyższe od stężenia potrzebnego do wytworzenia żelu, niemniej pozwalające ograniczyć ilość agaru do minimum, co jest ważne z tego względu, że sam agar jest elektrolitem i może z niektórymi białkami w odpowiednich warunkach dawać kompleksy, hamując tym samym rozdział elektroforetyczny. Do roztworu agaru w temperaturze ok. 60° dodawano odważoną ilość odpowiedniego adsorbenta, uzyskując w ten sposób roztwór względnie zawiesinę. Uzyskaną w ten sposób mieszaninę wylewano na płytkę szklaną, a po wytworzeniu się żelu na powierzchni płytki umieszczano ją w wilgotnej komorze w pozycji poziomej [15]. Dla przeprowadzenia elektroforezy do celów analitycznych używano płytek o wymiarach 32 × 4 cm, dla celów preparatywnych płytki miały wymiar 32 × 10 cm. Kontakt płytek z naczyniami elektrodowymi zapewniano przez połączenie przy pomocy krótkich pasków bibuły, przyklejonych do warstwy żelu na końcach płytek. Próbkę mającą być poddana elektroforezie nakładano przy pomocy szklanego pręcika lub pipetki i po przedyfundowaniu badanego roztworu do warstwy żelu włączano prąd o spadku potencjału 180 — 200 V przy natężeniu prądu ok. 15 mA. Czas rozdziału wynosił 12 — 14 godzin. Po ukończeniu elektroforezy płytki wyjmowano z komory i suszono na powietrzu, a następnie barwiono roztworem czerni amidowej 10 B [15]; barwnik niezaadsorbowany na białku wyplukiwano czystym metanolem. Dla przeprowadzenia ilościowych oznaczeń wybarwione płytki zanurzano w płynnej parafinie, przez co uzyskiwano należyłą przejrzystość emulsji. W ten sposób przygotowaną płytkę umieszczano w absorpcjometrze [15] i wykreslano krzywe elektroforetyczne, po czym powierzchnie krzywych planimetrowano.

Powyżej opisany sposób postępowania zastosowano również do celów preparatywnych. Na płytę szklaną o rozmiarach 10 × 32 cm wylewano zawiesinę i po wytworzeniu żelu nakładano badany roztwór w postaci wąskiej smugi. W ten sposób można dobrze rozdzielić 2 — 3 ml roztworu. Po ukończeniu elektroforezy na powierzchnię warstewki żelu przykładano wąski pasek bibuły, skutkiem czego część substancji zawartych w rozdzielonych elektroforetycznie frakcjach dyfundowała do bibuły. Następnie barwiono bibułę otrzymując tzw. odbitkę frakcji, pozwalającą na określenie ich rozmieszczenia na płycie. Po wysuszeniu żelu z rozdzielonymi frakcjami na powietrzu w temperaturze pokojowej do nieznacznej wilgotności, zbierano przy pomocy szpatułki do próbek odpowiednie odcin-

ki żelu, wypłukując następnie zaadsorbowaną substancję za pomocą właściwego rozpuszczalnika.

Ponieważ zagadnieniem, które nas głównie interesowało, była sprawa elektroforetycznego rozdziału mieszaniny białek, a szczególnie surowicy krwi, przygotowaliśmy żel agarowy z dodatkiem adsorbentów, które znajdowały już uprzednio zastosowanie w chromatografii białek.

Stosowaliśmy następujące adsorbenty:

wodorotlenek glinu świeżo wytrącany amoniakiem z roztworu soli glinu; żel fosforanu trójwapniowego, uzyskany wg Swingle i Tiseliusa [19];

kaolin oczyszczany (Merck);

żel krzemionkowy (USP);

bentonit (BDH);

guma arabska (Light);

skrobia rozpuszczalna (BDH);

celuloza sproszkowana (Whatman);

celit 535 (Light);

Hyflo-super Cel (Light);

dwutlenek tytanu (Merck);

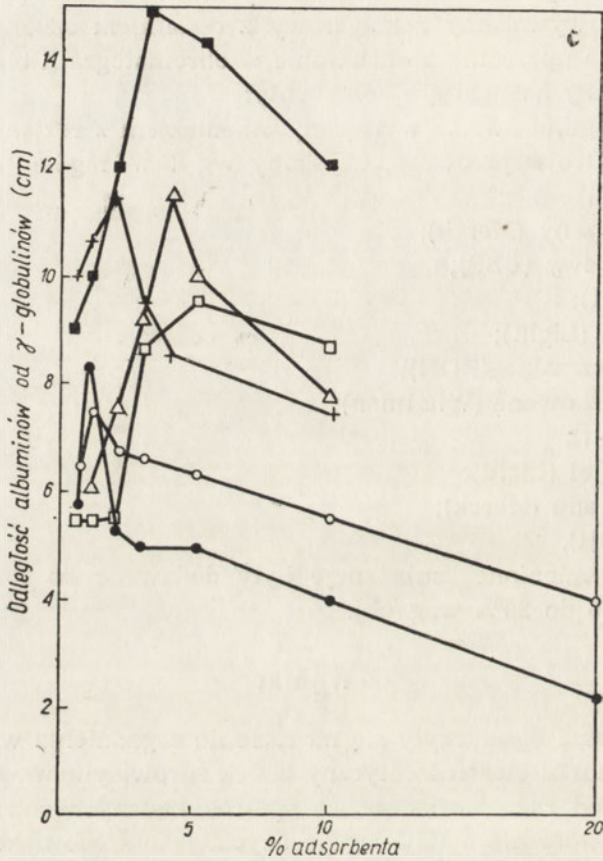
sacharoza (BDH).

Wyżej wymienione substancje były dodawane do roztworu agaru w ilości od 0,5 do 20% wag./obj.

Wyniki

Badania nasze ograniczyły się na razie do zagadnienia wpływu adsorbentów na rozdział elektroforetyczny białek surowicy krwi. Pragniemy na tym miejscu od razu zaznaczyć, że spośród badanych substancji adsorbujących, niektóre nie nadają się do użycia jako środowisko dla elektroforezy. Tymi substancjami są: wodorotlenek glinu, żel fosforanu trójwapniowego, kaolin, żel krzemionkowy, bentonit i guma arabska. Uniemożliwiają one rozdział elektroforetyczny z powodu dużej adsorpcji białek lub skutkiem niemożności uzyskania jednorodnej zawiesiny.

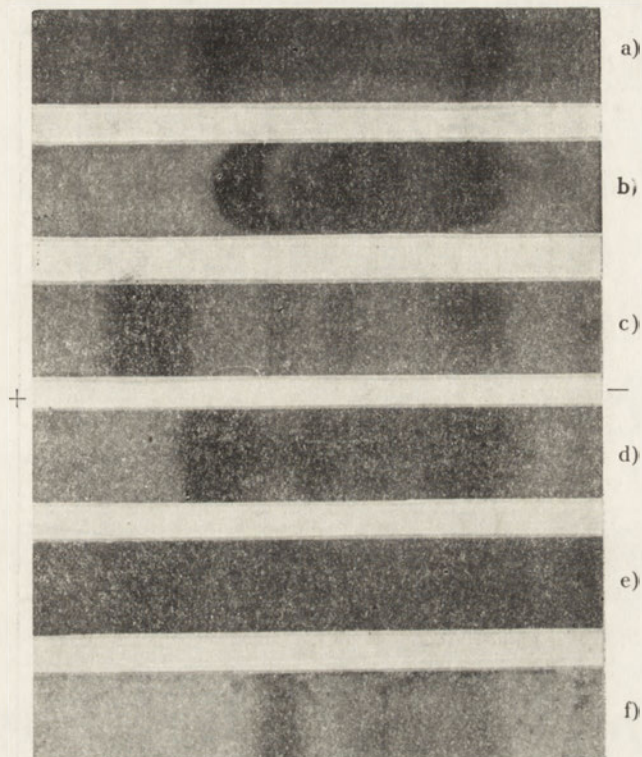
Rys. 1 przedstawia krzywe zależności szybkości wędrowania albuminów surowicy ludzkiej od stężenia adsorbenta, wykreślone dla tych substancji, które w warunkach doświadczenia dawały najlepsze możliwości rozdziału. Jak z powyższego rysunku widać, każda krzywa przedstawia podobny przebieg; w tych samych warunkach doświadczenia szybkość wędrowania albuminów wzrasta początkowo ze wzrostem stężenia adsorbenta, przy pewnym stężeniu jest najwyższa, a następnie przy wyższych stężeniach maleje. Dla każdego adsorbenta istnieje charakterystyczne optymalne stężenie, przy którym ruchliwość elektroforetyczna jest najwięk-



Rys. 1. Zależność szybkości wędrowania albuminów surowicy ludzkiej od stężenia poszczególnych adsorbentów:

- — sacharoza
- — skrobia
- △ — sproszkowana celuloza
- + — TiO₂
- — celit 535
- — Hyflo-super Cel

sza. Zwykle to stężenie nie przekracza 5‰ adsorbenta w zawieszynie. Przy stężeniu optymalnym uzyskuje się również najlepsze wyniki rozdzielania mieszaniny białek surowicy.

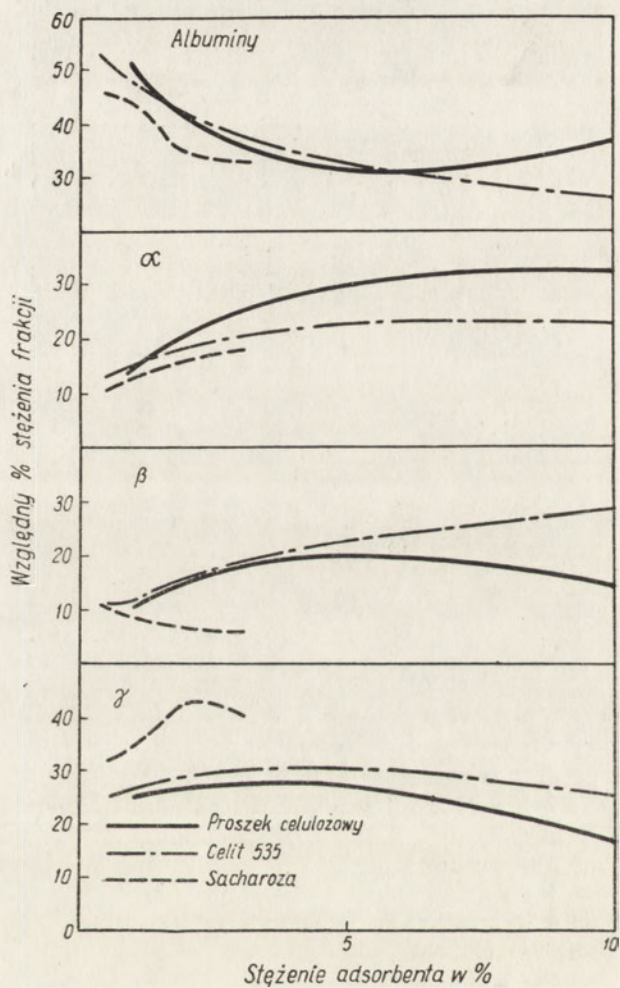


Rys. 2. Fotografia elektroferogramów tej samej surowicy ludzkiej w obecności różnych adsorbentów:

- a) 1‰ sacharoza
- b) 1‰ skrobia
- c) 4‰ sproszkowana celuloza
- d) 5‰ celit 535
- e) 5‰ Hyflo-super Cel
- f) 2‰ T.O₂

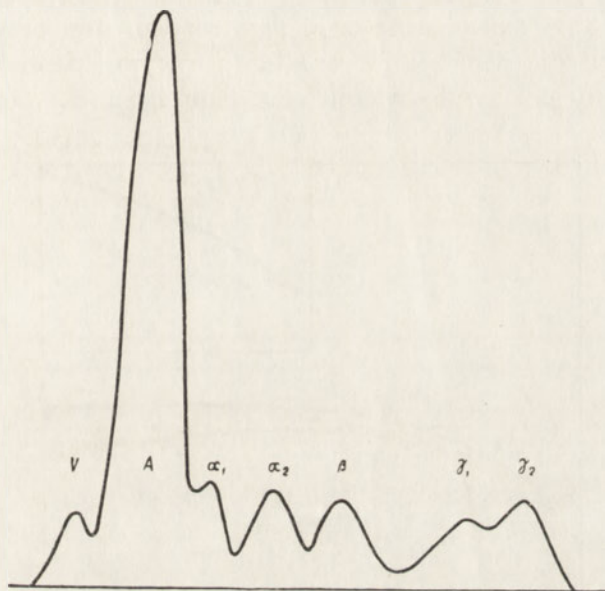
Wszystkie elektroferogramy barwiono czernią amidową 10 B.

Na rys. 2 przedstawiono kilka przykładów rozdzielania surowicy ludzkiej przy optymalnych stężeniach adsorbentów. Wszystkie elektroferogramy uzyskano w tych samych warunkach i z tej samej surowicy. Na uwagę zasługują różne ruchliwości oraz różne ilości białka przypadające na poszczególne frakcje, rozdzielone w obecności różnych adsorbentów.



Rys. 3. Wpływ stężenia celitu 535, sproszkowanej celulozy i sacharozy na ilość białka przypadającego na poszczególne frakcje surowicy ludzkiej

Różnice ilości białka przypadającego na poszczególne frakcje uzyskane elektroforetycznie przy użyciu różnych adsorbentów ilustruje wymownie rys. 3. Przedstawia on zależność ilości białka w poszczególnych frakcjach w zależności od stężenia adsorbenta, wykreślone dla sacharozy, sproszkowanej celulozy i celitu 535. Zawartość białka w poszczególnych frakcjach obliczano na podstawie planimetrowania powierzchni krzywych elektroforetycznych, wykreślonych przy pomocy absorpcjometru. Ilość białka



Rys. 4. Krzywa elektroforetyczna surowicy ludzkiej wykreślona w absorpcjometrze po rozdzieleniu 0,03 ml surowicy w obecności 1% Hyflo-super Cel

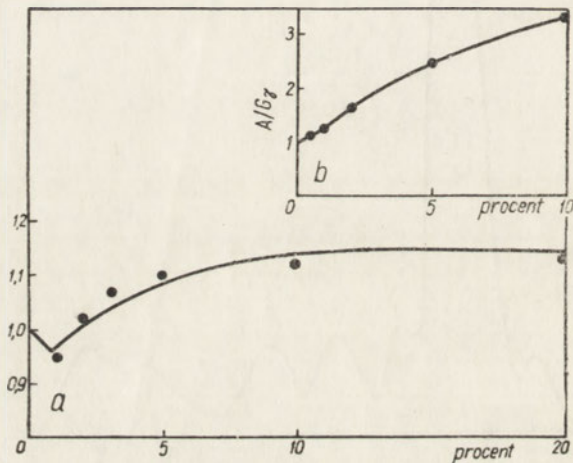
we frakcji albuminowej maleje przy wzroście stężenia adsorbentów. Natomiast ilość globulinów- α wzrasta. Wzrasta również ilość β -globulinów z wyjątkiem przypadków, w których była używana sacharoza. Globuliny- γ nasilają się początkowo w miarę wzrostu stężenia adsorbentów; przy wyższych stężeniach ich zawartość maleje.

Poszczególne adsorbenty wpływają nie tylko na przemieszczenie białka pomiędzy poszczególnymi frakcjami, ale doprowadzają również w toku elektroforezy do ujawniania się frakcji, nie dających się zaobserwować przy zwykłej elektroforezie na bibule.

Rys. 4 przedstawia krzywą elektroforetyczną frakcji białkowych surowicy ludzkiej po rozdzieleniu na żelu agarowym z dodatkiem 1% Hyflo-

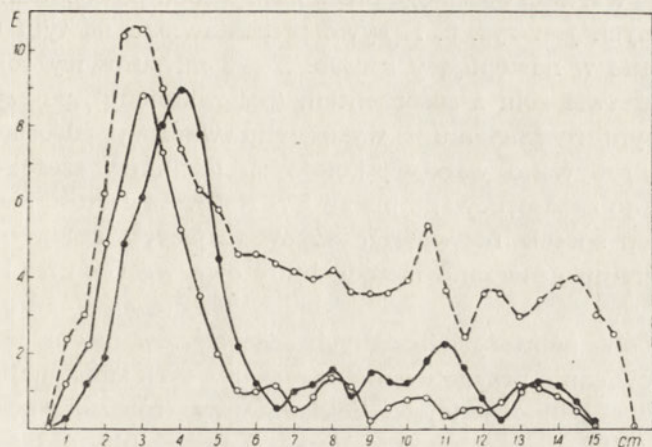
super Cel. Przy użyciu tego adsorbenta występuje przed albuminami nowa, jeszcze szybciej wędrująca frakcja, odpowiadająca prawdopodobnie frakcji V, opisywanej przez niektórych autorów [5]. Poza tym w tych warunkach γ -globuliny rozdzielają się na dwie frakcje.

Zmiana w składzie frakcji w zależności od rodzaju i stężenia adsorbenta powodowana jest adsorpcją białek na danym podłożu. W celu bliższego określenia wielkości tej adsorpcji przygotowano roztwór czystych albuminów i czystych γ -globulinów surowicy ludzkiej (frakcje V i II Cohna) w stosunku 1:1, umieszczano 30 μ l tego roztworu na przygotowanych płytkach z zawiesiną adsorbentów w żelu agarowym i po elektroforetycznym rozdzielaniu oraz wybarwieniu określano stosunek wartości liczbo-



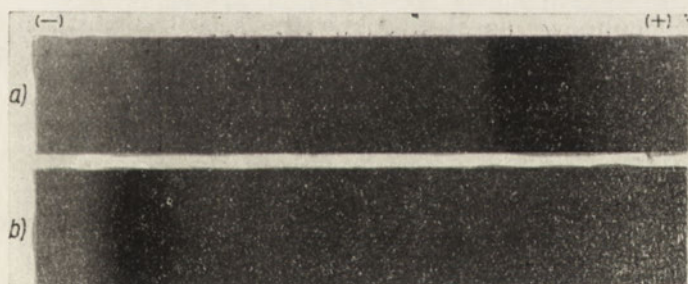
Rys. 5. Wpływ stężenia sproszkowanej celulozy (a) i Hyflo-super Cel (b) na stosunek Alb/G γ .
Objaśnienie w tekście

wych tych dwóch frakcji. Rys. 5 przedstawia graficznie zależność stosunku albuminów do γ -globulinów od stężenia adsorbentów w zawieszynie, wykreślone dla a) proszku celulozowego, b) Hyflo-super Cel. Przy stężeniu 1% sproszkowanej celulozy zmniejsza się ilość białka przypadająca na albuminy w stosunku do globulinów, natomiast przy wyższych stężeniach zaznacza się ubytek γ -globulinów na korzyść albuminów, wyrażając się stosunkiem Alb/G γ 1,15 przy 20% stężeniu adsorbenta w porównaniu ze stosunkiem 1,0 jako wyjściowym. W obecności Hyflo-super Cel strata γ -globulinów na korzyść albuminów wzrasta jeszcze szybciej wraz ze wzrostem stężenia adsorbenta i przy 10% jego stężenia stosunek Alb/G γ wynosi ok. 3,3. Wyjściowy stosunek albuminów do γ -globulinów uzyskuje się przy stężeniu ok. 0,5% Hyflo-super Cel. Przy użyciu tego adsorbenta pole zawar-



Rys. 6. Krzywe rozdzielu białek surowicy metodą preparatywną, otrzymane w obecności: sproszkowanej celulozy, TiO_2 i celitu 535. Stężenia białka w poszczególnych frakcjach oznaczano spektrofotometrycznie przy zastosowaniu reakcji biuretowej. Białko z adsorbenta wypłukiwano 5% roztworem NaCl.

- o ——— o Proszek celulozowy
- ——— ● TiO_2
- o — - - - o Celit 535



Rys. 7. Sprawdzenie na bibule czystości frakcji albuminowej (a) oraz γ -globulinów (b) surowicy ludzkiej, wydzielonych preparatywnie, stosując mieszaninę: 0,2% agar, 5% Hyflo-super Cel i 3% sproszkowanej celulozy. Elektroferogramy barwiono czernią amidową 10 B, (bibuła Munktell 20)

te między frakcją albuminów i γ -globulinów wykazuje dużą absorpcję w absorpcjometrze, co jest spowodowane rozwleczeniem globulinów.

Ilustracją wartości opisanego przez nas sposobu postępowania dla celów preparatywnych jest rys. 6. Krzywe przedstawione na tym rysunku zostały uzyskane w następujący sposób: 2—3 ml surowicy rozdzielano na większej warstwie żelu z adsorbentem (patrz Metody), po czym po elektroforetycznym rozdzielaniu i wysuszeniu warstwy adsorbenta na powietrzu zeszkrobywano warstwę kolejnych odcinków szerokości 0,5 cm i wypłukiwano zaadsorbowane białko 5% NaCl. Zawartość białka w uzyskanych w ten sposób roztworach odpowiadających kolejnym odcinkom elektroferogramu oznaczano metodą biuretową wg Gornalla i współprac. [8].

Z własności niektórych badanych adsorbentów można było wnioskować, że odpowiednio przygotowana mieszanina tych substancji będzie tworzyła środowisko umożliwiające dokładniejszy rozdział poszczególnych frakcji, niż to było osiągalne dotychczas. Dobre rezultaty daje mieszanina o składzie: 0,2% agaru + 5% Hyflo-super Cel + 3% sproszkowanej celulozy, zawieszona w buforze weronalowym o pH 8,6.

Rys. 7 jest ilustracją czystości poszczególnych frakcji białkowych rozdzielonych na żelu agarowym przy użyciu wyżej wymienionej mieszaniny adsorbentów. 3 ml surowicy ludzkiej rozdzielano na szerokiej płycie szklanej stosując mieszaninę agaru, Hyflo-super Cel i celulozy sproszkowanej, po czym po umiejscowieniu frakcji zebrano emulsję odpowiadającą poszczególnym frakcjom do próbek, wypłukiwano białko małą ilością 5% roztworu NaCl, po czym dializowano w buforze weronalowym o pH 8,6. Rys. 7 przedstawia elektroferogram na bibule frakcji albuminowej i frakcji γ -globulinów uzyskanych w ten sposób z surowicy ludzkiej. Z obrazu tego elektroferogramu wynika całkowita jednorodność uzyskanych białek.

Omówienie wyników

Jak o tym była mowa we wstępie do niniejszej pracy, zastosowanie różnych adsorbentów jako środowiska dla elektroforetycznego rozdziału było przedmiotem dociekań od kilku lat. Wszyscy autorzy, którzy opisuja doświadczenia polegające na zastosowaniu adsorbentów, posługują się tymi substancjami w postaci gęstej zawiesiny i jakkolwiek podkreślają pewne korzyści wynikające z tego sposobu postępowania, zwracają jednak również uwagę na znacznie dłuższy czas potrzebny do przeprowadzenia rozdziału w porównaniu z czasem wymaganym przy elektroforezie wolnej lub bibulowej. Badania nasze wskazują, że istotnie stężenia adsorbentów używane dotychczas przez innych autorów muszą stanowić czynnik hamu-

jący wędrowanie elektroforetyczne. Z badań naszych wynika, że zależność szybkości wędrowania od stężeń adsorbentów jest sprawą bardziej złożoną, ale że przy posługiwaniu się sposobem w tej pracy podanym można przeprowadzać elektroforezę osiągając korzyści, jakie daje zastosowanie adsorbentów bez znacznego zmniejszania szybkości wędrowania.

Małe stężenia adsorbentów można oczywiście użyć tylko w mieszaninie z odpowiednim żelem, którym w naszym wypadku jest żel agarowy. Charakterystyczny przebieg krzywych zależności szybkości wędrowania białka od stężenia adsorbenta dodanego do żelu jest spowodowany zmianą środowiska. Przy najniższych stężeniach adsorbentów ruchliwość jest mała skutkiem hamującego wpływu żelu agarowego; w miarę wzrostu stężenia adsorbenta żel agarowy ulega rozluźnieniu, przez co ruchliwość białek zwiększa się. Przy dużych stężeniach adsorbenta zbitość środowiska powoduje hamowanie szybkości wędrowania, które musi z reguły występować zawsze w tych warunkach, w jakich dotychczas stosowano adsorbenty jako środowisko dla procesu elektroforezy. Należy również zaznaczyć, że wzrost stężenia adsorbentów wzmagą efekt elektroosmotyczny. Białka znoszone skutkiem elektroosmozy w kierunku bieguna przeciwnego zostają po drodze zaadsorbowane i to w stopniu tym większym, im większe jest stężenie adsorbenta zwiększające drogę przebywania przez cząsteczki białka z powodu elektroosmozy. Zjawisko to oczywiście powiększa stratę frakcji białkowych. Analogiczną zależność efektu elektroosmotycznego od stężenia adsorbenta opisał również Bull [4], podając środowisko zawierające jako adsorbent proszek szklany.

Zastosowanie przez nas żelu agarowego jako podstawy środowiska dla elektroforezy pozwala stosować małe stężenia adsorbentów, a tym samym wyeliminować niedogodności, o których była poprzednio mowa. Stwierdziliśmy, że przy użyciu stężeń odpowiednich adsorbentów, obracających się w granicach od 1 — 5%, elektroforeza białek przebiega dostatecznie szybko, rozdział na frakcje jest ostry, a straty białek są minimalne. Opierając się na tych założeniach można sporządzić mieszaninę odpowiadającą wszelkim wymogom.

Opisany przez nas sposób postępowania, polegający na użyciu płytek szklanych pokrytych warstwą żelu agarowego z dodatkiem odpowiednich adsorbentów, spełnia te same zadania, jakie rozwiązuje elektroforeza kolumnowa, ale w sposób prostszy i wygodniejszy. Posługując się naszą metodą uzyskujemy możliwość bezpośredniej analizy ilościowej elektroforegramu przez wykreślanie krzywych w absorpcjometrze. Preparatywny rozdział poszczególnych frakcji białkowych w przypadku elektroforezy kolumnowej polega na eluowaniu większymi ilościami buforu i zbieraniu frakcji przy pomocy odpowiedniego kolektora. Otrzymuje się wówczas roztwory bardzo rozcieńczone, przy czym nierzadko dochodzi do zatarcia się

granic rozdzielanych frakcji w czasie eluowania. Niedogodności elektroforezy kolumnowej przy jej zastosowaniu do celów preparatywnych nie wchodzi w grę przy użyciu płyt szklanych pokrytych żelem zmieszany z adsorbentem. Wyniki uzyskane przez nas naszą metodą w toku preparatywnego wydzielenia niektórych frakcji białek surowicy ludzkiej są zupełnie zadowalające.

Metoda stosowania emulsji adsorbentów na płytkach szklanych może oddać również duże usługi przy badaniu takich substancji, których wykazywanie na bibule nastęcza trudności z powodu reagowania bibuły z używanym odczynnikiem. Użykaliśmy zadowalające wyniki przy wykazywaniu cholesterolu odczynem Liebermanna-Burhardta, nie dającym zastosować się do elektroferogramów na bibule. Podobnie przedstawia się sytuacja z wykrywaniem glikoproteidów odczynnikiem Mollischa. Odczynnik Mollischa jest bardzo czuły i prostszy od stosowanego w celu wykrywania cukrowców kwasu nadjodowego i fuksyny siarczynowej, lecz ze względu na użycie stężonego kwasu siarkowego nie nadaje się do traktowania elektroferogramów na bibule. Elektroferogram uzyskany w emulsji w żelu agarowym, potraktowany odczynnikiem Mollischa, zabarwia się cały na jasno różowo, natomiast miejsca, w których znajdują się glikoproteidy, przybierają barwę ciemnofioletową.

Jak wynika z danych omówionych w części doświadczalnej naszej pracy, rodzaj i stężenie adsorbenta używanego przy elektroforezie białek surowicy modyfikuje — i to nieraz znacznie — ilość białka przypadającego na poszczególne frakcje, jak również doprowadza do dalszego rozdziału frakcji, które w zwykłej elektroforezie bibulowej wędrują jako jednorodne frakcje. Ujawnienie nowych frakcji białkowych przy użyciu elektroforezy na adsorbentach jest odrębnym zagadnieniem, które musi być systematycznie badane. Zwraca na nie uwagę również Flodin i Kupke [7], którzy posługiwali się jako adsorbentem sproszkowaną celulozą stosując jednak metodę elektroforezy kolumnowej. Pomijając na tym miejscu tę sprawę musimy jednak zwrócić uwagę z całym naciskiem na to, że przy posługiwaniu się naszą metodą do celów analitycznych w każdym wypadku muszą być ściśle uwzględnione identyczne warunki przeprowadzania rozdziału. Przy posługiwaniu się metodą do celów preparatywnych nie wchodzi to w rachubę w większym stopniu.

Addendum: W chwili kiedy praca ta była przygotowana do druku, ukazała się publikacja autorów amerykańskich P. Bernfelda i J. S. Nisselbauma w J. Biol. Chem. 220, 851, 1956, w której doniesiono o zastosowaniu małych stężeń adsorbentów jako środowiska do elektroforetycznego rozdzielania białek surowicy, przy użyciu metody kolumnowej. Celem wytworzenia żelu autorzy zastosowali skrobię rozpuszczalną z dodatkiem amylozy. Jako adsorbenta używali 3% Hyflo-super Cel. Wymienieni autorzy doszli do podobnych re-

zultatów jak my, stwierdzając, że tylko określone stężenie adsorbenta jest optymalnym dla elektroforetycznego rozdzielania; zbyt duże stężenia utrudniają rozdział.

Streszczenie

Opracowano metodę elektroforetycznego rozdzielania białek surowicy, opartą na zastosowaniu płytek szklanych pokrytych warstwą żelu agarowego z dodatkiem różnych adsorbentów. Przebadano wpływ rodzaju i stężenia adsorbentów na rozdział elektroforetyczny białek podając odpowiednie recepty doprowadzające do najdogodniejszych wyników. Autorzy wykazali szczególną wartość tej metody dla preparatywnego oczyszczania białek na małą skalę.

LITERATURA

- [1] Ardry R., *Bull. Soc. Chim. Biol.* **36**, 595, 603, 1954.
- [2] Barnett A. J. G., Lees H. i Smith D. K., *Biochem. J.* **53**, 33, 1953.
- [3] Bradish C. J. i Smart N. V., *Nature* **174**, 272, 1954.
- [4] Bull H. B., *Biochim. Biophys. Acta* **19**, 464, 1956.
- [5] Bücher Th., Matzelt D. i Pette D., *Kli. Wo.* **30**, 325, 1952.
- [6] Conden R. i Stanier W. N., *Nature* **169**, 783, 1952.
- [7] Flodin P. i Kupke D. W., *Biochim. Biophys. Acta* **21**, 368, 1956.
- [8] Gornall A. G., Bardawill C. J. i David M. M., *J. Biol. Chem.* **177**, 751, 1949.
- [9] Grabar P., Nowiński W. W. i Genereaux B. D., *Nature* **178**, 430, 1956.
- [10] Grabar P. i Williams C. A., *Biochim. Biophys. Acta* **17**, 67, 1955.
- [11] Gross D., *Nature* **176**, 362, 1955.
- [12] Kunkel H. G. i Slater R. J., *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* **80**, 42, 1952.
- [13] Mora R., Rebeyrotte P. i Polonovski J., *Bull. Soc. Chim. Biol.* **37**, 957, 1955.
- [14] Ostrowski W., *Wiad. Chem.* **9**, 21, 1955.
- [15] Ostrowski W. i Mikucki A., *Acta. Physiol. Pol.* **3**, 277, 1952.
- [16] Ressler N. i Jacobson S. D., *Science* **122**, 1088, 1955.
- [17] Siliprandi N. i Bianchi P., *Biochim. Biophys. Acta* **16**, 424, 1955.
- [18] Strain H. H. i Sato T. R., *Anal. Chem.* **28**, 687, 1956.
- [19] Swingle S. M. i Tiselius A., *Biochem. J.* **48**, 171, 1951.

ПОЛОСАТЫЙ ЭЛЕКТРОФОРЕЗ В ПРИСУТСТВИИ АДсорбЕНТОВ

Резюме

Разработан метод электрофоретического разделения белков сыворотки, основанный на применении стеклянных пластинок, покрытых слоем агарового желя с прибавкой различных адсорбентов. Исследовалось влияние рода и концентрации адсорбентов на электрофоретическое разделение белков, а также приведены соответствующие рецепты ведущие к наиболее выгодным результатам.

Авторы показали особенные достоинства этого метода при препаративном очищении белков в небольшом масштабе.

ZONE ELECTROPHORESIS IN STABILIZED MEDIA IN THE PRESENCE OF ADSORBENT

S u m m a r y

A method for electrophoretic separation of serum proteins uses of glass slides coated with agar gel containing various adsorbents was described. The effect of different kinds and concentrations of adsorbents on the electrophoretic separation of proteins was investigated and directions assuring optimal results are given. The authors have demonstrated the special value of this method for small scale preparative purification of proteins.

Otrzymano 24.10.1956 r.

H. HOMAŃSKA-SZAFRANOWA i J. OLEKSY

ELEKTROFORETYCZNY ROZDZIAŁ ENZYMÓW SOKU TRZUSTKOWEGO PSA

Z Zakładu Chemii Fizjologicznej A. M. w Krakowie

Kierownik prof. dr B. Skarżyński,

i z Zakładu Fizjologii A. M. w Krakowie

Kierownik prof. dr J. Kaulbersz

Jakkolwiek obecność białka w soku trzustkowym psa została opisana po raz pierwszy już w r. 1894 przez Jabłońskiego [10], bardziej systematyczne badania, mające na celu scharakteryzowanie tego białka, zostały przeprowadzone dopiero w pierwszym dziesiątku lat bieżącego stulecia. Glaessner, Ellinger i Cohn oraz Wohlgemuth [9, 8, 19] rozdzielili białko soku trzustkowego, stosując wysalanie siarczanem amonowym, i stwierdzili, że białko to reprezentowane jest zarówno przez albuminy, jak i globuliny. De Zilva [7] wykrył również obecność nukleoproteidów, czego nie potwierdziły badania Wechslera [18]. Po dłuższej przerwie, w czasie której sprawa białek soku trzustkowego nie budziła żadnego zainteresowania, w r. 1939 wrócił do tego zagadnienia Langstroth i współpracownicy [12], nie rozstrzygając jednak ostatecznie sprawy ilości i rodzaju białek, występujących w soku trzustkowym.

Dopiero zastosowanie opracowanej przez Tiseliusa metody elektroforezy [17] skierowało zagadnienie charakteryzacji białek soku trzustkowego na nowe tory. Munro i Thomas [13] stwierdzili stosując tę metodę, że w soku trzustkowym psa, uzyskanym z przetoki trwałej, występuje 4 lub 5 frakcji białkowych, zależnie od zwierzęcia dostarczającego sok, a niezależnie od rodzaju stosowanego bodźca i ogólnej zawartości białka. Badacze ci nie próbowali jednak określić rozmieszczenia poszczególnych enzymów soku trzustkowego w uzyskanych przez nich frakcjach białkowych. Zagadnienie to podjęli dopiero w roku 1951 Byrne i współpracownicy [5]. Posługując się klasyczną metodą Tiseliusa stwierdzili, że w soku trzustkowym psa występuje 6 frakcji białko-

wych, które autorzy ci określali kolejnymi literami alfabetu. Wykazali, że 3 najważniejsze enzymy soku trzustkowego — proteinaza, amylaza i lipaza, są zlokalizowane w pewnych określonych frakcjach białkowych. W doświadczeniach tych posługiwano się sokiem uzyskanym z przetoki trwałej, przy czym bodźcami wydzielniczymi były rozmaite rodzaje pożywienia. Ilościowy stosunek białka w poszczególnych frakcjach oraz zawartość enzymów w odpowiednich frakcjach białkowych pozostawały zasadniczo niezmiennie przy użyciu różnych pokarmów wyzwalających produkcję soku trzustkowego.

W podobny sposób podjęli zagadnienie elektroforetycznego rozdziału enzymów soku trzustkowego małżonkowie Delcourt [6], posługując się elektroforezą bibułową. Wykazali oni w soku trzustkowym psa — podobnie jak Byrne — 6 frakcji białkowych, które identyfikowali z frakcjami białkowymi surowicy. Badali rozmieszczenie w tych frakcjach fosfatazy, lipazy, esterazy i amylazy, dochodząc do wyników nie pokrywających się całkowicie z wynikami badaczy amerykańskich. Zresztą praca Delcourtów musi wywołać zastrzeżenia o charakterze metodycznym i merytorycznym.

Skąpe i obfitujące w nieudomowienia i niezgodności piśmiennictwo dotyczące problemu elektroforetycznych frakcji białkowych soku trzustkowego i rozmieszczenia enzymów w tych frakcjach skłoniły nas do ponownego przebadania tego zagadnienia i zwrócenia uwagi zarówno na dokładne rozdzielenie frakcji białkowych, jak i dokładne zlokalizowanie enzymów w poszczególnych frakcjach. Zdecydowaliśmy się posługiwać sokiem trzustkowym psa, uzyskanym z przetoki ostrej, wydzielonym pod wpływem różnorodnych bodźców, albowiem właśnie zależność ilościowego składu enzymów od rodzaju bodźców wyzwalających produkcję soku jest wciąż jeszcze zagadnieniem spornym w fizjologii trzustki. Użyliśmy trojakiego rodzaju bodźce — kwas solny, sekretynę trzustkową i ehlorowodurek pilokarpiny.

Metoda

Doświadczenia przeprowadzono na psach wagi 13—18 kg ze świeżo założoną przetoką trzustkową, głodzonych przez 24 godziny przed zabiegiem. Zabieg chirurgiczny wykonywano w głębokiej narkozie morfinowo-eterowej, przechodząc na możliwie najpłytszą narkozę w czasie samego doświadczenia z pobieraniem soku trzustkowego. Kaniulę szklaną wprowadzano zewnątrzjelitowo do dolnego przewodu trzustkowego i po umocnieniu jej szwem okrężnym wyprowadzano na zewnątrz, po czym powłoki brzuszne zamykano. Czas trwania doświadczenia nie przekraczał 8 godzin [1].

Samorzutne wydzielanie soku trzustkowego było znikome.

Do pobudzenia go używano następujących bodźców:

1) podgrzany do 37° C roztwór 0,4% HCl wprowadzano dodwunastniczo przez uprzednio założony zgłębnik. Jednorazowa dawka roztworu wynosiła 150 — 200 ml; początek wydzielania soku następował po upływie 3—5 min,

2) preparat sekretyny trzustkowej otrzymany z błony śluzowej jelita wieprzowego stosowano dożylnie w dawkach po 20 ml. Wydzielanie po każdym wstrzyknięciu rozpoczynało się po upływie 30—60 sekund i trwało przeciętnie trzydzieści minut,

3) chlorowodurek pilokarpiny podawano domięśniowo w dawce 0,5 — 1,5 mg/kg wagi psa. Początek wydzielania soku następował w ciągu 2—9 minut po podaniu pilokarpiny.

Zebrany sok trzustkowy poddawano rozdzielaniu elektroforetycznemu najpóźniej w ciągu 6 godzin od pobrania. Rozdzielano 0,2 ml soku w buforze weronalowym o pH 8,6 na paskach bibuły Whatman nr 1 o wymiarach 10 × 33 cm. Po ukończeniu elektroforezy odcinano pasek o szerokości 1 cm i ustalano na nim położenie poszczególnych frakcji białkowych przez wybarwienie roztworem czerni amidowej 10 B. Z pozostałej, nie wybarwionej części paska wycinano miejsca odpowiadające poszczególnym frakcjom i wypłukiwano z nich białko roztworem fizjologicznym NaCl. W wypłuczynach odpowiadających poszczególnym frakcjom oznaczano zawartość amylazy, lipazy i enzymów proteolitycznych. Oznaczenia całkowitego azotu w badanych sokach przeprowadzano mikrometodą Kjeldahla. Procentowy rozkład białka na poszczególne frakcje elektroforetyczne obliczano planimetrycznie z krzywych uzyskanych przy pomocy fotoabsorpcjometru z wybarwionych pasków.

Ilościowe oznaczanie enzymów przeprowadzano przy użyciu następujących metod: amylazę oznaczano posługując się metodą Bauman na [3] przyjmując za jednostkę tę ilość enzymu, która rozkłada do stadium dekstryn 1ml 1% roztworu skrobi i w ciągu 30 min, w temp. 38° (jednostka Wohlgemutha). Metodę tę zmodyfikowano określając końcowy moment reakcji przy pomocy fotokolorymetru, mierząc ekstynkcję przy długości fali 580 mμ. Oznaczenia lipazy przeprowadzano metodą Perez a i Willemorta [15]; do roztworu każdej frakcji białkowej dodawano buforu glikokolowego o pH 9,4, roztworu taurocholalanu sodu i trójbutyryny. Mieszaninę trzymano przez 2 godziny w temperaturze 40°, po czym przeprowadzano miareczkowanie formolowe 0,4 N alkoholowym wodorotlenkiem potasu. Za jednostkę lipazy przyjęto tę ilość enzymu, która w warunkach doświadczenia hydrolizuje 1 mg trójbutyryny. Wysokie pH środowiska (9,4) uniemożliwia równoczesne oznaczanie esteraz, których

aktywność w tym oddziaływaniu nie przekracza 5% [16], natomiast aktywność lipazy odpowiada jeszcze 30% aktywności maksymalnej.

Enzymy proteolityczne oznaczano przy pomocy zmodyfikowanej metody Krijgsmána [11]. Do badania używano mieszaninę roztworu kazeinu wg. Krijgsmána, buforu fosforanowego o pH 7,8 i wody. 10 ml tej mieszaniny zadawano 1 ml roztworu badanej frakcji białkowej i trzymano przez 1 godzinę w temp. 38°. Rozkład kazeinu oceniano na podstawie nasilenia zmętnienia roztworu po dodaniu chlorowodoru chinidyny. Nasilenie zmętnienia określano przy użyciu fotokolorymetru przy długości fali 550 m μ . Jako jednostkę aktywności proteolitycznej przyjęto tę ilość enzymu, która w ciągu 1 godziny w warunkach doświadczenia powoduje zwiększenie przepuszczalności światła o 10%.

Sok trzustkowy uzyskiwany z przetoki okazywał od razu wybitną aktywność proteolityczną, nie wzmagającą się po dodaniu enterokinazy. Fakt ten, jakkolwiek stoi w pozornej sprzeczności z powszechnie przyjętymi podręcznikowymi opisami, znany jest wielu eksperymentatorom posługującym się sokiem trzustkowym uzyskiwanym z przetok trzustkowych [4, 14, 2].

Wyniki

Do badań naszych użyliśmy sok trzustkowy otrzymany z 9 psów. Wyniki tych badań zawarte są w poniższych tablicach.

Tablica 1 przedstawia zależność objętości soku wydzielonego z przetoki oraz zawartego w soku białka od rodzaju zastosowanego bodźca. Z podanych wartości liczbowych wynika, że największe ilości soku zostają wydzielone pod wpływem sekretyny, najmniejsze po użyciu kwasu solnego. Zawartość białka w soku wydzielonym pod wpływem HCl i pod wpływem sekretyny jest taka sama, ale oczywiście absolutna ilość wydzielonego białka przy użyciu sekretyny jest niemal pięciokrotnie większa. Odmiennie przedstawia się charakter soku trzustkowego wydzielonego pod wpływem pilokarpiny. Objętość soku trzustkowego jest w tym wypadku dwukrotnie większa niż po użyciu kwasu solnego, natomiast stężenia białka czterokrotnie większe. W rezultacie ilość białka zawartego w małej objętości soku wydzielonego pod wpływem pilokarpiny odpowiada 2/3 ilości białka zawartego w obficie wydzielającym się soku po zadziałaniu sekretyną. Fakty te zresztą pokrywają się całkowicie z licznymi danymi piśmiennictwa.

Dla nas interesujące było zagadnienie ilości frakcji białkowych zawartych w soku trzustkowym, wydzielonym pod wpływem różnych bodźców, oraz ilościowego rozmieszczenia białka w tych frakcjach. Zgodnie

Tablica 1

Objętości soku wydzielonego pod wpływem różnych bodźców i stężenia białka w soku

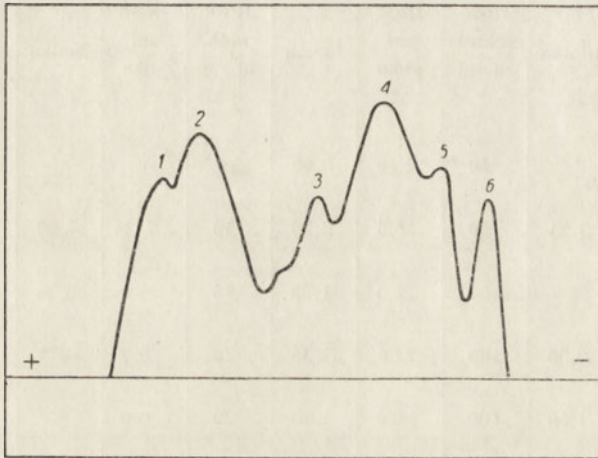
L.p.	Pies	0,4% HCl			Sekretyna			Pilokarpina		
		Ilość HCl w ml	Ilość ml soku	% białka	Ilość sekret. w ml	Ilość ml soku	% białka	Ilość pilok. w mg	Ilość ml soku	% białka
1	♂ 18 kg	—	—	—	60	25,0	2,62	—	—	—
2	♂ 16 kg	550	5,0	1,81	60	16,5	2,39	10	3,5	7,00
3	♂ 15 kg	—	—	—	100	22,5	1,38	15	25,0	5,36
4	♂ 17 kg	550	11,0	0,55	100	17,0	1,35	20	5,0	3,71
5	♀ 15 kg	550	2,5	1,60	100	16,0	1,40	20	0,0	—
6	♂ 16 kg	600	3,0	1,60	100	31,0	0,94	16	7,5	7,17
7	♂ 13 kg	450	6,0	2,00	100	39,5	1,57	15	9,0	5,11
8	♂ 15 kg	300	0,5	2,73	80	17,5	1,59	10	3,0	8,12
9	♂ 13 kg	250	8,0	1,30	110	29,5	1,57	15	15,0	8,31
	średnia		5,2	1,66		25,0	1,65		9,7	6,40

Tablica 2

Procentowy rozkład białka w poszczególnych frakcjach elektroforetycznych soku

Bodziec	% białka	Frakcje soku						suma
		1	2	3	4	5	6	
Kwas solny	1,66	5,9	26,7	13,1	29,4	20,1	4,8	100
Sekretyna	1,65	7,0	21,0	12,5	30,9	19,4	9,2	100
Pilokarpina	6,40	9,6	20,8	15,7	27,2	19,6	7,1	100

z wynikami Byrne'a stwierdziliśmy, że w buforze weronalowym o pH 8,6 białko soku trzustkowego rozdziela się w toku elektroforezy na 6 frakcji. Procentowy udział poszczególnych frakcji w ogólnej zawartości białka soku trzustkowego podaje tablica 2 i rysunek 1. Znamienne jest, że wartości dla poszczególnych frakcji białkowych nie zmieniają się w soku trzustkowym wydzielonym pod wpływem różnych bodźców. Rozmieszczenie białka w tych frakcjach jest takie samo w przypadku obfitującego w białko soku wydzielonego pod wpływem pilokarpiny, jak i zawierającym stosunkowo małe ilości białka soku wydzielonego pod wpływem kwasu solnego i sekretyny.



Rys. 1. Frakcje białkowe soku wydzielonego po podaniu sekretyny. Krzywa uzyskana z elektroforogramu przy użyciu fotoabsorpcjometru

Tablice 3, 4 i 5 podają rozmieszczenie badanych przez nas enzymów w poszczególnych frakcjach białkowych soku trzustkowego. Z tabel tych wynika, że aktywność enzymatyczna związana jest z pewnymi określonymi frakcjami i lokalizacja enzymów w poszczególnych frakcjach pozostaje niezmienną bez względu na rodzaj zastosowanego bodźca. Lipaza występuje głównie we frakcji 5, amylaza — we frakcji 4. Słaba aktywność wskazująca na zawartość tych enzymów w innych frakcjach, dająca się zaobserwować szczególnie w przypadku lipazy, najprawdopodobniej spowodowana jest niezupełnie dokładnym oddzieleniem sąsiadujących ze sobą frakcji, albo też jest wyrazem zawartości esterazy, która w naszych warunkach oznaczania lipazy okazuje aktywność bardzo małą, niemniej dającą się uchwycić. Nieco inaczej przedstawia się sprawa z proteinazami, aktywność proteolityczna dominuje zdecydowanie we frakcji 2, niemniej jest bardzo wyraźnie zaznaczona we frakcji 3. W tym przypadku tłumaczenie niedostatecznym rozdzieleniem obu frakcji jest niewystarczające. Nasuwa się przypuszczenie, że mamy do czynienia z dwoma enzymami proteolitycznymi, a więc przypuszczalnie z trypsyną i chymotrypsyną, występującymi w dwóch różnych frakcjach białkowych. Stosowana przez nas metoda określania aktywności proteolitycznej nie pozwalała na odróżnienie obu tych enzymów, a niestety nie dysponowaliśmy

Tablica 3

Rozmieszczenie aktywności amylazy w poszczególnych frakcjach soku, wartości podane w jednostkach aktywności na 1 mg N

Nr psa	Kwas solny					Sekretyna					Pilocarpina				
	frakcje:					frakcje:					frakcje:				
	1—2	3	4	5	6	1—2	3	4	5	6	1—2	3	4	5	6
1	—	—	—	—	—	0,0	3,3	525,0	19,2	0,0	—	—	—	—	—
2	3,4	—	48,3	—	6,9	2,6	5,2	538,0	0,0	0,0	0,0	0,0	266,5	0,9	0,0
3	—	—	—	—	—	0,0	9,0	904,0	36,0	0,0	0,0	0,0	678,0	35,1	0,0
4	0,0	0,0	113,6	—	0,0	0,0	0,0	232,5	18,6	0,0	0,0	0,0	337,0	27,0	0,0
5	0,0	0,0	31,2	0,0	0,0	0,0	0,0	37,4	0,0	0,0	—	—	—	—	—
6	0,0	0,0	63,0	0,0	0,0	0,0	13,2	600,0	0,0	0,0	0,0	0,0	697,0	13,8	0,0
7	0,0	0,0	169,0	0,0	0,0	0,0	0,0	—	0,0	0,0	0,0	0,0	489,0	—	0,0
8	0,0	0,0	686,0	0,0	0,0	0,0	0,0	392,0	2,0	0,0	0,0	0,8	1023,0	61,5	0,0
9	0,0	2,5	423,0	—	0,0	0,0	2,6	398,5	2,6	0,0	0,7	0,7	451,0	2,3	0,5
śr.	0,5	0,4	219,0	0,0	1,0	0,3	3,6	453,4	8,7	0,0	0,1	0,2	563,0	23,4	0,1
Średnie wartości wyrażone w jednostkach aktywności na 1 ml soku															
śr.	1,3	1,1	580,0	0,0	2,6	0,8	9,5	1197,0	23,0	0,0	1,0	2,0	5760,0	239,5	1,0

syntetycznymi peptydami dającymi się zastosować jako swoiste substraty dla każdego z tych enzymów z osobna.

Do interesujących wyników doprowadziły ilościowe oznaczenia enzymów w poszczególnych frakcjach, zależnie od rodzaju zastosowanego bodźca wydzielniczego. Wyniki te zawarte są w tablicach 3, 4 i 5 i wyrażone są w jednostkach aktywności enzymatycznej przeliczonych na 1 mg azotu. Z wykresów z tablic 3, 4 i 5 (rys. 2) wynika, że zawartość lipazy i amylazy zmienia się w zależności od rodzaju bodźca w analogiczny sposób, to znaczy najmniejsze ilości obu tych enzymów wydzielane są po użyciu kwasu solnego, największe po użyciu pilokarpiny. Inaczej przedstawia się sprawa enzymów proteolitycznych, dla tych enzymów nasilniejszym bodźcem wydzielniczym jest sekretyna. Zawartość enzymów proteolitycznych, przeliczona na 1 mg azotu w soku wydzielonym pod wpływem pilokarpiny i kwasu solnego, jest tego samego rzędu.

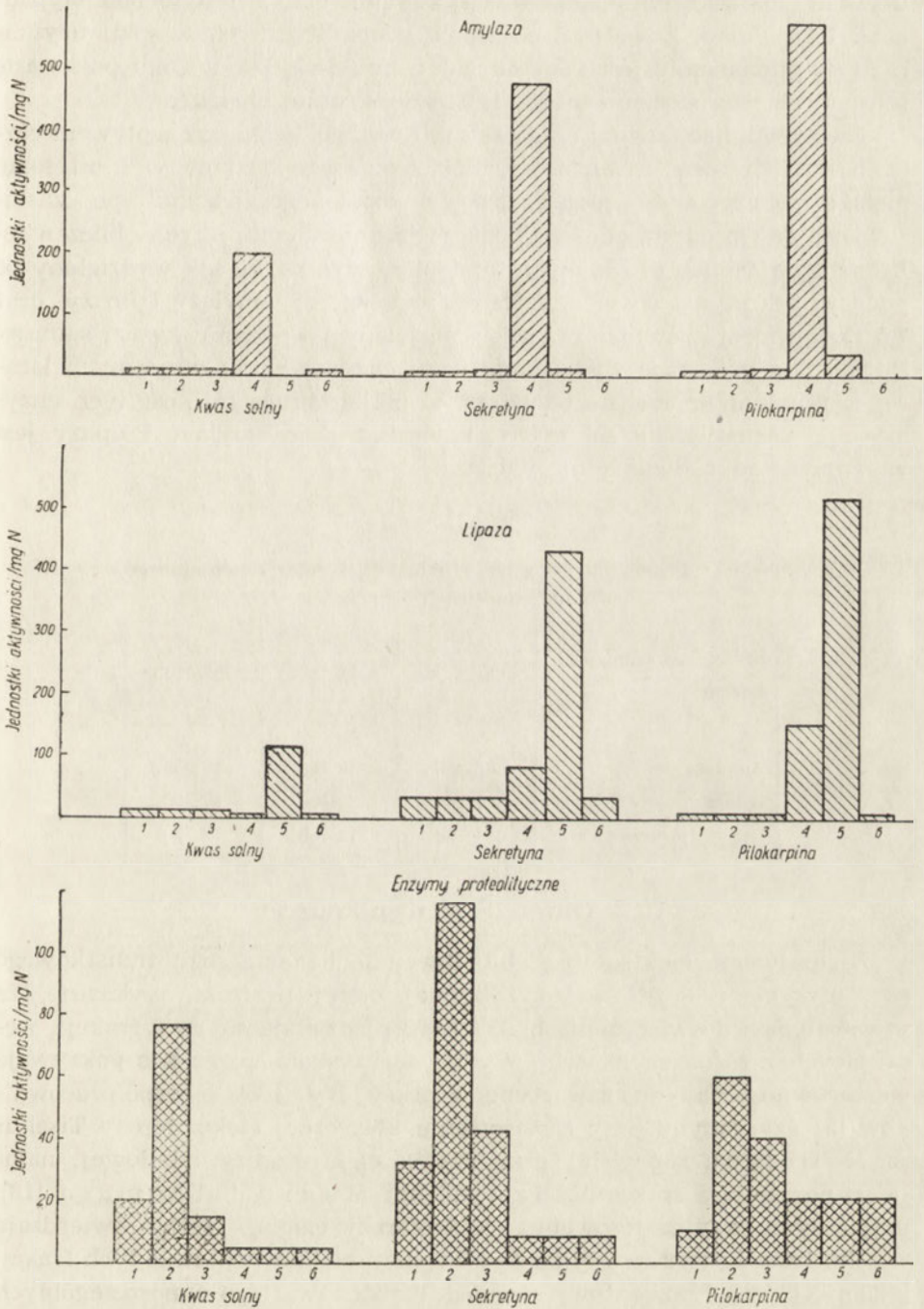
Porównanie ogólnej zawartości białka w soku trzustkowym oraz zawartości białka w poszczególnych frakcjach (tablica 1 i 2) z aktywnością enzymatyczną tych frakcji (tablica 3, 4 i 5) wskazuje na to, że ilość wydzielanych enzymów jest niezależna od ilości białka. Sok uzyskany po podaniu kwasu solnego zawiera o wiele mniej amylazy i lipazy niż sok

Tablica 4
Rozmieszczenie aktywności lipazy w poszczególnych frakcjach,
podane w jednostkach aktywności na 1 mg N

Nr psa	Kwas solny				Sekretyna				Pilocarpina			
	frakcje:				frakcje:				frakcje:			
	1—3	4	5	6	1—3	4	5	6	1—3	4	5	6
1	—	—	—	—	0,0	166,1	820,0	150,0	—	—	—	—
2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
3	—	—	—	—	0,0	0,0	238,1	15,4	0,0	27,7	476,5	0,0
4	0,0	—	115,9	0,0	50,0	78,5	408,0	0,0	5,7	5,7	910,5	0,0
5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
6	—	0,0	33,4	0,0	45,3	45,3	226,3	11,3	—	—	405,0	0,0
7	21,2	26,4	175,2	10,6	27,0	—	592,5	13,5	12,5	—	777,0	24,9
8	7,8	—	50,2	7,8	0,0	—	—	0,0	0,0	321,0	321,0	2,6
9	0,0	—	163,2	0,0	33,8	—	574,5	0,0	6,4	244,0	228,0	0,0
śr.	14,5	13,2	108,0	4,6	23,0	72,5	476,0	27,2	4,9	149,8	519,0	4,6
Średnie wartości podane w jednostkach aktywności na 1 ml soku												
śr.	38,4	35,0	286,0	12,2	60,6	191,3	1250,8	71,4	50,1	1532,0	5310,0	47,1

Tablica 5
Rozmieszczenie aktywności enzymów proteolitycznych w poszczególnych frakcjach,
wartości podane w jednostkach aktywności na 1 mg N

Nr psa	Kwas solny				Sekretyna				Pilocarpina			
	frakcje:				frakcje:				frakcje:			
	1	2	3	4—6	1	2	3	4—6	1	2	3	4—6
1	—	—	—	—	16,2	114,7	8,1	—	—	—	—	—
2	8,3	49,5	0,0	0,0	—	117,1	40,2	0,0	6,6	29,8	21,8	—
3	—	—	—	—	0,0	165,5	84,2	9,0	—	53,6	35,0	3,5
4	—	159,0	0,0	0,0	46,2	92,6	—	0,0	0,0	77,7	43,8	—
5	—	55,4	6,2	0,0	—	13,4	—	—	—	—	—	—
6	0,0	39,3	16,5	13,4	—	166,5	100,0	6,7	6,6	66,2	29,7	15,3
7	53,1	114,5	53,1	3,1	59,5	178,8	51,5	35,7	8,6	109,0	77,1	60,0
8	—	—	—	—	—	139,5	0,0	0,0	32,3	64,6	58,5	12,3
9	—	33,6	0,0	0,0	—	55,7	0,0	0,0	—	19,5	6,5	1,2
śr.	20,4	75,4	12,6	2,8	30,5	116,0	40,6	6,4	10,8	60,0	38,8	18,4
Średnie wartości wyrażone w jednostkach aktywności na 1 ml soku												
śr.	54,0	200,0	33,4	7,4	80,5	306,1	107,1	16,9	110,7	614,5	397,0	188,5



Rys. 2. Wykres aktywności enzymatycznej frakcji soku w zależności od bodźców

uzyskany po sekretynie, jakkolwiek stężenie białka jest w obu wypadkach takie samo. Zawartość enzymów proteolitycznych w soku uzyskanym po pilokarpinie jest taka sama lub mniejsza, jak w soku po kwasie solnym, chociaż stężenie białka jest czterokrotnie większe.

Uwzględniając średnią objętość soku wydzielonego pod wpływem różnych bodźców oraz zawartość jednostek każdego enzymu w 1 ml soku, można obliczyć ilość jednorazowo wydzielonego enzymu po zastosowaniu dawki odpowiedniego bodźca. Średnie wyniki z tych obliczeń zebrane są w tabelicy 6. Z danych tej tabelicy wynika, że sok wydzielony po podaniu sekretyny zawiera dziesięć razy więcej amylazy i lipazy oraz 7,5 razy więcej proteinaz niż sok wydzielony po podaniu kwasu solnego. Pilokarpina powoduje wydzielanie ilości enzymów proteolitycznych leżącej w tym samym rzędzie wielkości, w jakiej obraca się ilość tych enzymów po zastosowaniu sekretyny, natomiast ilość amylazy i lipazy jest w tym wypadku dwukrotnie większa.

Tabelica 6

Przeciętna zawartość enzymów w całej objętości wydzielonego soku (w jednostkach aktywności)

Enzym	Bodziec		
	kwas solny	sekretyna	pilokarpina
Amylaza	3.450	30.750	59.050
Lipaza	2.190	39.500	67.300
Enzymy proteolityczne	1.700	12.760	12.720

Omówienie wyników

Zastosowanie elektroforezy bibułowej do badania soku trzustkowego psa, otrzymanego ze świeżo założonej ostrej przetoki, wykazuje, że w warunkach doświadczenia białka soku rozdzielają się na 6 frakcji, wędrujących z różną szybkością. Wyniki te uzyskane przez nas pokrywają się zarówno z danymi zawartymi w pracy *Byrne'a* i współpracowników [5] uzyskanymi przy zastosowaniu klasycznej elektroforezy *Tiseliusa*, i *Delcourtów* [6] przy użyciu elektroforezy bibułowej, natomiast pozostają w sprzeczności z wynikami *Munro* i *Thomasa* [13], uzyskanymi przy zastosowaniu elektroforezy ciągłej, którzy stwierdzają w soku trzustkowym psa tylko 4 — 5 frakcji białkowych. Ilość tych frakcji białkowych jak i procentowy stosunek białka zawartego w poszczególnych frakcjach nie zmienia się przy zastosowaniu poszczególnych bodźców i w tym wypadku wyniki nasze pokrywają się z wynikami *Byrne'a*

i współpracowników, którzy pobierając sok z przetoki chronicznej nie zaobserwowali różnicy w ilości i charakterze frakcji białkowych soku w następstwie podawania różnego rodzaju pokarmów.

Wyraźne różnice natomiast zachodzą między wynikami naszymi a rezultatami badań *Byrne'a* w zakresie rozmieszczenia różnych enzymów w poszczególnych frakcjach. Zgodność zachodzi tylko w przypadku enzymów proteolitycznych, które wykazaliśmy we frakcji 2 podobnie jak *Byrne*. Amylazę stwierdziliśmy regularnie we frakcji 4, podczas gdy *Byrne* wykrywa ją zawsze we frakcji 5 i 6. Lipaza wędruje według *Byrne'a* z frakcją 3, podczas gdy w naszych doświadczeniach stwierdzamy ją zawsze we frakcji 5. Rozbieżności te wynikają prawdopodobnie stąd, że dokładny rozdział metodą *Tiseliusa* jest o wiele trudniejszy niż rozdział frakcji otrzymany w toku elektroforezy bibułowej. Poza tym na dokładność oznaczeń ilościowych wpływa ujemnie w elektroforezie *Tiseliusa* nie dający się dokładnie określić stopień rozcieńczenia roztworem buforowym z naczyń elektrodowych. Zaznaczyć przy tym należy, że *Byrne* nie badał zupełnie enzymów we frakcji 4, w której my stale spotykamy amylazę. Umieszczenie lipazy we frakcji 3 według *Byrne'a* oparte jest tylko na jednym doświadczeniu, podczas gdy zlokalizowanie jej we frakcji 5 przez nas oparte jest na doświadczeniach wielokrotnie powtarzanych.

Porównanie naszych wyników dotyczących rozmieszczenia enzymów w poszczególnych frakcjach białkowych z wynikami *Delcourt'a* jest trudne, gdyż praca autorów francuskich pomija te szczegóły.

Zachodzi jeszcze jedna możliwość tłumaczenia różnic między wynikami uzyskanymi przez nas a wynikami *Byrne'a* i współpracowników. Autorzy amerykańscy badali sok uzyskany z przetok chronicznych, podczas gdy my korzystaliśmy z soku uzyskanego z przetok świeżo założonych. Jakkolwiek takie tłumaczenie wydaje się mało prawdopodobne, zamierzamy w najbliższej przyszłości przeprowadzić doświadczenia z sokiem uzyskanym w tych samych warunkach, jakie zachodziły w doświadczeniach *Byrne'a*.

Inna znamienna różnica między wynikami naszymi a wynikami *Byrne'a* polega na tym, że autorzy amerykańscy nie zauważyli żadnej wyraźnej różnicy w ilości poszczególnych enzymów wydzielonych w zależności od różnych rodzajów pokarmów. Natomiast w naszych doświadczeniach stwierdzamy zasadnicze różnice w składzie enzymatycznym soku trzustkowego, zależnie od bodźców wyzwalających produkcję soku. Co prawda warunki doświadczeń, a przede wszystkim charakter bodźców w obu przypadkach były odmienne, ale trudno przypuścić, żeby wyłącznie one powodowały tak znamienne różnice.

Z doświadczeń naszych wynika wybitnie charakterystyczna niezależność różnych enzymów od ilości białka soku wydzielonego pod wpływem różnych bodźców. Równoległość wahań ilościowych można stwierdzić jedynie w odniesieniu do amylazy i lipazy, natomiast zawartość enzymów proteolitycznych zmienia się niezależnie od zmian w zawartości lipazy i amylazy. Zupełnie niezależną jest ilość enzymów od stężenia białka w soku trzustkowym. Dotychczasowe doświadczenia zdają się przemawiać za tym, że przeważająca ilość białka soku trzustkowego jest białkiem nie posiadającym własności enzymatycznych. Oczywiście bardziej jednoznaczne wyjaśnienie tej sprawy mogą dostarczyć badania przeprowadzone w ten sam sposób, mające na celu ilościowe określenie pozostałych enzymów soku trzustkowego. Badania takie są w tej chwili w pełnym toku w naszych pracowniach.

Streszczenie

Autorzy rozdzielali przy pomocy elektroforezy bibułowej białko soku trzustkowego psa, uzyskanego z przetoki ostrej, i oznaczali w poszczególnych frakcjach białkowych zawartość amylazy, lipazy i enzymów proteolitycznych. Stwierdzili, że niezależnie od bodźca wyzwalającego produkcję soku, białka soku trzustkowego rozdzielają się na 6 frakcji, cechujących się niezmiennym wzajemnym procentowym stosunkiem. Enzymy proteolityczne wędrują z frakcją 2 i 3, amylaza z frakcją 4, lipaza z frakcją 5. Zawartość poszczególnych enzymów zmienia się zależnie od zastosowania bodźca, ale w sposób odmienny dla poszczególnych enzymów.

LITERATURA

- [1] Babkin B. P., *Die äussere Sekretion der Verdauungsdrüsen*, Springer J. Verlag Berlin 1928, str. 456.
- [2] Babkin B. P., *Secretory Mechanism of the Digestive Glands*, Hoeber B. P., New York 1950, str. 64.
- [3] Baumann J., *Chirurg*, 366, 1931.
- [4] Von Brücke E., *Schmidts Jahrb. d. gest. Med.* 291, cytowane wg Abderhalden E., *Handb. d. biologischen Arbeitsmethoden*, Urban u. Schwarzenberg, Berlin 1932, str. 1434.
- [5] Byrne G. M., Phinney J. I., Schachter M., Gordon-Young E., *J. Biol. Chem.* 196, 683, 1951.
- [6] Delcourt A., Delcourt R., *Compt. rend. soc. biol.* 147, 1104, 1953.
- [7] De Zilva L. A. E., *J. Physiol.* 31, 230, 1904.
- [8] Ellinger A., Cohn M., *Z. physiol. Chem.* 45, 28, 1905.
- [9] Glaessner K., *Z. physiol. Chem.* 40, 465, 1903—1904.
- [10] Jabłoński J. M., *Dissertacija S-Petersburg* 1894.
- [11] Krijgsman B. J., *Z. physiol. Chem.* 228, 256, 1934.

- [12] Langstroth G. O., Mc Rae D. R., Komarov S. A., *Can. J. Research* **17**, 137, 1939.
- [13] Munro M. P., Thomas J. E., *Am. J. Physiol.* **145**, 140, 1945.
- [14] Pawłow I. P., *Handb. d. Physiologie des Menschen*, W. Nagel, Braunschweig **2**, 732, 1907.
- [15] Perez M., Willemort R., *Ann. Pharm. Franc.* **11**, 608, 1953.
- [16] Swell L., Dailey R. E., Field H., Treadwell C. R., *Arch. Biochem. Biophys.* **59**, 393, 1955.
- [17] Tiselius S. A., *Trans. Faraday Soc.* **33**, 524, 1937.
- [18] Wechsler E., *Z. physiol. Chem.* **66**, 284, 1910.
- [19] Wohlgemuth J., *Biochem. Z.* **39**, 302, 1912.

ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКОЕ РАЗДЕЛЕНИЕ ЭНЗИМОВ СОКА ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ СОБАКИ

Резюме

Авторы разделяли путем бумажного электрофореза белок сока поджелудочной железы собаки, полученного из острой фистулы и определяли в отдельных белковых фракциях содержание амилазы, липазы и протеолитических энзимов.

Они констатировали, что независимо от стимула, вызывающего производство сока, белки сока поджелудочной железы разделяются на 6 фракций, характеризующихся постоянной процентной взаимосвязью. Протеолитические энзимы передвигаются совместно с фракциями 2 и 3, амилаза — с фракцией 4, липаза — с фракцией 5. Содержание отдельных энзимов изменяется в зависимости от примененного стимула, но различным образом для каждого энзима.

ELECTROPHORETIC SEPARATION OF ENZYMES OF THE PANCREATIC JUICE IN DOG

Summary

The authors separated proteins of the pancreatic juice of dogs, obtained through an acute fistula, by means of paper electrophoresis and determined in each particular protein the content of amylase, lipase and proteolytic enzymes. It was found that irrespective of the stimulant used for releasing the juice production, the proteins divide into 6 fraction characterized by a constant reciprocal per cent ratio. The proteolytic enzymes travel with fraction 2 and 3, amylase with fraction 4, lipase with fraction 5. The content of the enzymes varies, although in a different way for each particular enzyme depending on the stimulant applied.

Otrzymano 26.10.1956 r.

SPIS TREŚCI

	Str.
W. Mozołowski, Słowo wstępne	435
D. Keilin, Distribution and Diversity of Haemoglobin	439
T. Mann, Fruktaza w wydzielinie pęcherzyków nasiennych i jej rola w metabolizmie plemników	459
S. Løvtrup, The Induced Synthesis of Enzymes in Micro-Organisms	475
K. Belżeczka i I. Chmielewska, Wpływ glikozy na wykorzystanie przez organizm ludzki podanego dożylnie hydrolizatu białka krwi bydłowej	497
L. Szarkowska, Reduktaza p-chinonowa u motyla w wilczomlecza <i>Celerio euphorbiae</i> L.	511
T. Chojnacki, Poziom wapnia i magnezu w płynie mózgowo-rdzeniowym	521
J. W. Szarkowski, Badania nad oddychaniem kielków pszenicy	529
I. Mochnacka i P. Szafranski, Aktywność transketolazy w tkance nerwowej gołębi z awitaminozą B ₁	539
M. Piechowska, Pirofosforany podczas kopulacji u motyla wilczomlecza	547
J. Opieńska-Blauth, H. Kowalska i M. Pietrusiewicz, Nowe sposoby identyfikacji aminokwasów na chromatogramach jedno i dwukierunkowych	557
J. Pawełekiewicz, Badania nad biosyntezą związków kobalaminowych. Wyodrębnienie nowych kobalamin z komórek <i>Propionibacterium shermanii</i>	581
Z. Kochańska i D. Shugar, W sprawie dezaminacji puryn podczas kwaśnej hydrolizy kwasów nukleinowych	591
D. Shugar i F. Rzendowska, Badania nad fotochemią rybonukleazy	595
E. Szemplińska, A. Szenberg i D. Shugar, Zastosowanie preparatów handlowych dezoksyrybonukleazy paciorkowcowej do celów histochemicznych	607
A. Pigoń, Wielocukrowce w organizmie <i>Urostyla</i> w czasie życia aktywnego i encystacji	613
W. Niemierko, Badania nad metabolizmem <i>Galleria mellonella</i> L. i <i>Bombyx mori</i> L.	627
W. Ostrowski, A. Krawczyk i B. Galos-Biczowa, Elektroforeza pasmowa w obecności adsorbentów	649
H. Homańska-Szafranowa i J. Oleksy, Elektroforetyczny rozdział enzymów soku trzustkowego psa	663