

A. DMOCHOWSKI i L. KŁYSZEJKO

FRAKCJE FOSFOROWE ŁUSEK ŁUSZCZYCY
(*PSORIASIS VULGARIS*)

Z Zakładu Biochemii Uniwersytetu Łódzkiego

Kierownik: prof. dr A. Dmochowski

Badania nad frakcjami fosforowymi łusek łuszczycy prowadzone w Zakładzie Biochemii U. Ł. ograniczyły się dotychczas do oznaczenia tzw. fosforu całkowitego, kwasorozpuszczalnego i kwasonierozpuszczalnego [19, 13]. Frakcja związków nierozpuszczalnych w kwasie trójchlooroctowym nie została bliżej zbadana. Oznaczenia ilości nukleoproteidów, izolowanych uprzednio z łusek różnymi metodami [13, 5, 6], przemawiały za wysokim udziałem tych związków we frakcji kwasonierozpuszczalnej. Wydawało się koniecznym uzupełnienie dotychczasowych badań nad biochemią łusek łuszczycy kompletniejszą analizą ilościową związków fosforowych wielkocząsteczkowych tj. kwasów nukleinowych i fosfoproteidów. W tym celu zastosowano znaną metodę Schmidta i Thannhausera [17] w modyfikacji Niemierki [15, 16].

Metody

Dokładnie zmielone łuski łuszczycowe, pochodzące od jednego chorego, odwadniano i pozbawiono lipidów mieszaniną acetonu i chloroformu (5 : 1) oraz alkoholu i eteru (3 : 1) wg metody Niemierki i współpr. [15, 16], a następnie suszono w próżni nad stęż. H_2SO_4 . Analiza ekstraktu lipidowego pozwoliła określić zawartość lipidów i fosforu lipidowego, a także ilość wody w badanych łuskach. Tak przygotowany materiał (70—150 mg) poddawano trzykrotnej 10-minutowej ekstrakcji 10% CCl_3COOH w temp. 0° . Pozostałość kwasonierozpuszczalną hydrolizowano 1N KOH w temp. 37° w ciągu 20 godzin, odsączając ślady zawiesiny. Kontrolne oznaczenia wykazały, że rozdział frakcji fosforowych łusek łuszczycy przebiegał identycznie po hydrolizie trwającej 15, 22, 25 i 36 godzin (Tabl. 1a). Z hydrolizatu wytrącano kwas dezoksyrybonukleinowy mieszaniną 6N HCl i 10% CCl_3COOH (1 : 5).

Celem zanalizowania frakcji kwasonierozpuszczalnej oznaczano:

- 1° całkowitą zawartość fosforu w hydrolizacie ($P_{\text{hydr.}}$),
- 2° całość fosforu w przesączu od kwasów DN zawierającym rybonukleotydy i fosforany odczepione od fosfoproteidów ($P_{\text{KRN+B}}$) oraz
- 3° ilość samych fosforanów nieorganicznych w przesączu (P_{B}). Fosforany te wytrącano w postaci $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, zaabsorbowanego na zawiesinie MgCO_3 i rozpuszczano w 60% HClO_4 (Delory [3]). Zawartość fosforu obu kwasów nukleinowych obliczano pośrednio z różnicy wyżej wymienionych oznaczeń¹.

Próbki na zawartość poszczególnych frakcji fosforowych spalano na mokro wg Niemierki tj. w mieszaninie nadmiaru stęż. HNO_3 wobec stęż. H_2SO_4 . Ortofosforany we frakcji kwasorozpuszczalnej określano metodą bezpośrednią. We wszystkich oznaczeniach posługiwano się metodą Fiske i Subbarowa [10] przy zastosowaniu amidolu i absorpcjometru Hilger-Spekkera (filtr czerwony o dł. fali 820 μ).

Do oddzielenia kwasów DN używano twardych sączków ilościowych firmy Gessner und Kreuzig, gdyż stosowanie odpowiednich sączków krajowych (B.00.-Gliwice) dawało błędne wyniki.

Część doświadczalna

Zanalizowano 6 rodzajów łusek łuszczycy pobranych od 5 różnych chorych. Łuski Va i Vb pochodziły od chorego z bardzo ciężką łuszczycą uogólnioną w dwu różnych okresach, tj. przed liczeniem (Va) i po upływie jednego roku leczenia różnymi środkami wewnętrznymi (Vb). Z każdego rodzaju łusek odwodnionych i pozbawionych lipidów wykonano 3—5 całkowitych analiz na związki fosforowe. Otrzymane wyniki załączono w tablicach 1—6. Tablica 7 jest zestawieniem średnich wartości na frakcje fosforowe w przeliczeniu na suchą masę łusek nieodlipidowanych, a tablica 8 przedstawia procentową zawartość tych frakcji w badanym materiale. Wartości załączone w tablicy 9 obrazują zawartość obu kwasów nukleinowych w łuskach łuszczycy nie pozbawionych lipidów, zostały wyliczone z odpowiednich ilości fosforu kwasów RN i DN (teoretyczna zawartość P 9,8%). Należy zauważyć, że oddzielne oznaczenia fosforu całkowitego w suchej pozostałości kwasonierozpuszczalnej łusek I i II (w przeliczeniu na suchą masę łusek odlipidowanych) były bardzo zbliżone do zawartości całkowitego fosforu w hydrolizacie i tym samym przemawiały za niemal kompletną alkaliczną ekstrakcją kwasonierozpuszczalnych związków fosforowych z łusek łuszczycowych (Tabl. 1 i 2).

¹ $P_{\text{KRN}} = P_{\text{KRN+B}} - P_{\text{B}}$;

$P_{\text{KDN}} = P_{\text{hydr}} - P_{\text{KRN+B}}$.

Tablica 1

Frakcje fosforowe w odlipdowanych łuskach łuszczycy I

Zawartość H ₂ O	10,3 %	Zawartość P _{lip.}	17,1 mg %
„ lipidów	8,6 %	„ P _c	łusek odlip. 311,3 mg %
		„ P _{k.w. nierozp.}	„ „ 182,6 mg %

L. p.	Frakcja kw. rozp. w mg %		Frakcja kw. nierozp. w mg %					Suma*)
	P _{k.r.}	P _n	P _{hydr.}	P _{KRN+B}	P _{hydr.}			
					P _B	P _{KRN}	P _{KDN}	
1	120,3	105,4	177,6	152,7	49,2	103,5	24,9	297,9
2	119,4	105,4	178,8	151,9	48,7	103,2	26,9	298,2
3	118,2	107,6	179,2	152,8	46,8	106,0	26,4	297,4
4	119,7	104,3	179,8	150,4	49,0	101,4	29,4	299,5
5	121,8	108,4	177,9	151,8	48,5	103,3	26,1	299,7
Srednio	119,9	106,2	178,7	151,9	48,4	103,5	26,5	298,6

*) Suma = P_{k.r.} + P_{hydr.}

Tablica 1a

Zawartość frakcji fosforowych kw. nierozp. w łuskach I w zależności od czasu hydrolizy

L. p.	Czas hydrolizy	Odważka w mg	Frakcja kw. nierozp. w mg %				
			P _{hydr.}	P _{KRN+B}	P _{hydr.}		
					P _B	P _{KRN}	P _{KDN}
1	15 godz.	108,0	179,8	150,6	48,6	102,0	28,2
2	22 godz.	112,3	178,3	151,8	47,8	103,1	27,2
3	25 godz.	109,5	177,5	150,3	47,2	103,1	27,2
4	36 godz.	124,0	175,8	151,5	48,3	103,2	24,3

Tablica 1b

Frakcje fosforowe w odlipdowanych łuskach I po długotrwałym (ok. 60 godz.) suszeniu łusek w temp. 105°

L. p.	Frakcja kw. rozp. w mg %		Frakcja kw. nierozp. w mg %					Suma*)
	P _{k.r.}	P _n	P _{hydr.}	P _{KRN+B}	P _{hydr.}			
					P _B	P _{KRN}	P _{KDN}	
1	172,5	128,4	135,5	99,5	93,2 *	6,3	37,0	308,0
2	173,8	129,6	134,6	98,7	92,8	5,9	36,9	308,4
3	172,9	130,1	136,3	101,2	90,5	10,7	36,0	309,1
Srednio	173,1	129,4	135,4	99,6	92,2	7,6	36,6	308,5

*) Suma = P_{k.r.} + P_{hydr.}

Tablica 2

Frakcje fosforowe w odlipidowanych łuskach II

Zawartość H ₂ O	11,3%	Zawartość P _c	łusek odlip.	458,5 mg %
„ lipidów	11,9%	„ P _{kw. nierozp.}	„ „	307,2 mg %
		„ P _{lip.}		22,9 mg %

L. p.	Frakcja kw. rozp. w mg %		Frakcja kw. nierozp. w mg %					Suma*)
	P _{k.r.}	P _n	P _{hydr.}	P _{KRN+B}	P _{hydr.}			
					P _B	P _{KRN}	P _{KDN}	
1	140,2	129,1	301,8	243,7	81,6	161,2	68,1	442,0
2	138,3	128,4	304,3	225,1	83,2	141,9	79,2	442,6
3	139,9	123,4	299,8	233,8	82,5	151,3	66,0	439,2
4	141,2	130,8	302,4	233,3	86,7	146,6	69,1	443,6
Średnio	139,9	125,4	302,1	234,0	83,5	150,5	73,1	442,0

*) Suma = P_{k.r.} + P_{hydr.}

Tablica 3

Frakcje fosforowe w odlipidowanych łuskach III

Zawartość H ₂ O	9,2%	Zawartość P _c	łusek odlip.	267,2 mg %
„ lipidów	12,8%	„ P _{lip.}		12,2 mg %

L. p.	Frakcja kw. rozp. w mg %		Frakcja kw. nierozp. w mg %					Suma*)
	P _{k.r.}	P _n	P _{hydr.}	P _{KRN+B}	P _{hydr.}			
					P _B	P _{KRN}	P _{KDN}	
1	94,5	88,2	159,2	127,5	38,6	88,9	31,7	253,7
2	96,1	79,1	155,4	118,9	39,4	79,5	36,5	251,5
3	95,2	85,2	154,7	121,6	37,6	84,0	33,1	249,9
Średnio	95,3	84,2	156,4	123,7	38,5	84,1	33,7	251,7

*) Suma = P_{k.r.} + P_{hydr.}

Tablica 4

Frakcje fosforowe w odlipowanych łuskach IV

Zawartość H₂O 7,9% Zawartość P_c łusek odlip. 357,6 mg%
 „ lipidów 14,0% „ P_{lip.} 14,4 mg%

L. p.	Frakcja kw. rozp. w mg%		Frakcja kw. nierozp. w mg%					Suma*)
	P _{k.r.}	P _n	P _{hydr.}	P _{KRN+B}	P _{hydr.}			
					P _B	P _{KRN}	P _{KDN}	
1	101,3	93,0	242,3	189,0	65,0	124,0	53,2	343,6
2	100,9	95,6	241,7	193,8	66,2	126,6	47,9	342,6
3	110,3	96,8	239,2	188,6	64,8	123,8	50,6	349,5
4	108,2	94,3	237,5	184,6	65,0	119,6	52,2	343,7
Srednio	105,2	94,9	240,2	189,0	65,3	123,5	51,2	345,4

*) Suma = P_{k.r.} + P_{hydr.}

Tablica 5

Frakcje fosforowe w odlipowanych łuskach Va

Zawartość H₂O 10,4% Zawartość P_c łusek odlipid. 567,2 mg%
 „ lipidów 13,0% „ P_{lip.} 23,8 mg%

L. p.	Frakcja kw. rozp. w mg%		Frakcja kw. nierozp. w mg%					Suma*)
	P _{k.r.}	P _n	P _{hydr.}	P _{KRN+B}	P _{hydr.}			
					P _B	P _{KRN}	P _{KDN}	
1	163,1	122,5	382,8	298,4	98,2	200,2	84,4	545,9
2	162,2	130,1	380,4	294,3	96,3	198,0	90,1	542,6
3	156,7	120,8	396,8	303,0	99,5	203,5	93,8	553,5
4	162,8	124,7	389,9	301,6	100,2	204,4	85,2	552,7
Srednio	161,2	124,5	387,5	300,1	96,6	201,0	88,4	548,7

*) Suma = P_{k.r.} + P_{hydr.}

Tablica 6

Łuski Vb

Zawartość H₂O 7,8% Zawartość P_c łusek odlip. 528,3 mg %
 „ lipidów 16,1% „ P_{lip.} 29,3 mg %

L. p.	Frakcja kw. rozp. w mg %		Frakcja kw. nierozp. w mg %					Suma*)
	P _{k.r.}	P _n	P _{hydr.}	P _{KRN+B}	P _{hydr.}			
					P _B	P _{KRN}	P _{KDN}	
1	168,6	130,2	341,8	279,9	86,4	193,5	61,9	510,4
2	165,2	129,1	346,4	281,0	85,1	195,9	61,3	511,6
3	167,4	131,2	349,8	278,6	85,1	193,5	61,2	517,2
4	164,9	128,9	342,3	277,3	85,4	191,9	65,0	507,2
Srednio	166,5	127,6	342,6	279,2	85,4	193,7	62,4	509,1

*) Suma = P_{k.r.} + P_{hydr.}

Tablica 7

Zestawienie średnich zawartości frakcji fosforowych w łuskach łuszczycy w przeliczeniu na suchą masę łusek nie odlipidowanych (w mg^{g/100})

Łuski	P _c	P _{lip.}	P _{k.r.}	P _n	P _{hydr.}	P _{KRN+B}	P _{hydr.}			Suma*)
							P _B	P _{KRN}	P _{KDN}	
I	303,7	17,1	110,4	97,8	164,6	139,9	44,6	95,3	24,7	292,1
II	432,7	22,9	125,0	112,1	270,0	209,1	74,6	134,5	60,9	417,9
III	249,3	12,2	84,5	74,7	138,8	100,8	31,7	78,1	29,0	235,5
IV	325,6	14,4	91,6	82,6	206,1	165,4	54,8	110,6	43,7	315,1
Va	524,9	23,8	142,7	110,2	342,0	265,6	87,3	178,3	76,4	508,5
Vb	484,3	29,3	143,4	109,9	295,1	240,5	73,2	167,3	54,6	463,8

*) Suma = P_{lip.} + P_{k.r.} + P_{hydr.}

Tablica 8

Procentowa zawartość frakcji fosforowych w łuskach łuszczycy (w przeliczeniu na suchą masę łusek nie odlipidowanych)

Łuski	P _c w mg %	Frakcje fosforowe w % P _c								Suma*)
		P _{lip.}	P _{k.r.}	P _n	P _{hydr.}	P _{KRN+B}	P _{hydr.}			
							P _B	P _{KRN}	P _{KDN}	
I	303,7	5,6	36,4	32,2	54,2	46,1	14,7	31,4	8,1	96,2
II	432,7	5,3	28,9	25,9	62,4	48,6	17,3	31,3	13,8	96,6
III	249,3	4,9	33,9	30,0	55,7	44,0	12,7	31,3	11,7	94,5
IV	325,6	4,4	28,1	25,4	64,2	50,8	16,8	34,0	13,4	96,7
Va	524,9	4,5	27,2	21,0	65,2	50,6	13,9	36,7	14,6	96,9
Vb	484,3	6,1	29,6	22,7	60,9	49,7	15,1	34,6	11,2	96,6

*) Suma = P_{lip.} + P_{k.r.} + P_{hydr.}

Dyskusja

Praca niniejsza jest uzupełnieniem dotychczasowych badań nad nukleoproteidami i kwasami nukleinowymi łusek łuszczycy prowadzonych w Zakładzie Biochemii U. Ł. Łoza [13], stosując ekstrakcję alkaliczną, izolował 37% nukleoproteidów suchej masy łusek, a na zasadzie dodatniej reakcji Dischego [4], przypisał im charakter prawie wyłącznie dezoksyrybonukleoproteidowy. Dmochowski i Drabikowski [5] przy pomocy łagodnych metod ekstrakcji (wg Mirsky'ego i Polliera [14]), a także bardziej drastycznych (Levene [11], Smith i Wyatt [18], Javillier i Allaire [10]) wykazali udział obu rodzajów nukleoproteidów w strukturze łusek łuszczykowych, ze znaczną przewagą rybonukleoproteidów (w łuskach odlipidowanych RNP: DNP = 3,7:1 (wagowo)). Wspomniani autorzy stwierdzili ponadto, że nawet po zastosowaniu długotrwałej i dość drastycznej ekstrakcji za pomocą 10% NaCl (na gorąco) dawało się wyciągnąć tylko około połowy fosforu nierozpuszczalnego w CCl_3COOH . Następnie Dmochowski, Sempłńska i Kłyszajko [6] wykazali, że główną masę nukleoproteidów łusek łuszczycy stanowią tzw. β -nukleoproteidy, otrzymane podczas kolejnej wielogodzinnej ekstrakcji łusek wrzącą wodą (ok. 40% suchej masy łusek, a 86% fosforu kwasonierozpuszczalnego). Nieznaczny odsetek związków fosforowych, nie ulegających ekstrakcji wrzącą wodą, pozostał niezbadany. Zastosowana przez nas metoda Schmidta i Thannhausera [17] wyświetliła nieco tę kwestię, dzięki odmiennemu rozfrakcjonowaniu połączeń fosforowych zawartych w łuskach łuszczycy.

Wyniki uzyskane w niniejszej pracy (Tabl. 1—8) potwierdzają w przybliżeniu dotychczasowe dane Zakładu Biochemii U. Ł. co do procentowej zawartości fosforu związków fosforowych rozpuszczalnych i nierozpuszczalnych w 10% CCl_3COOH .

Ilość fosforu całkowitego w badanych przez nas łuskach łuszczycy waha się w granicach 249,3—524,9 mg^0/o . Stosunkowo niski odsetek tych wartości przypada na fosfor lipidowy (4,4—6,1%), co wobec dość wysokiej zawartości tłuszczowców w łuskach przemawia za znikomym udziałem fosfolipidów w ich strukturze.

Odsetek kwasorozpuszczalnych związków fosforowych (27,2—36,4%) w łuskach przebadanych obecnie jest nieco niższy od odnośnych wyników uzyskanych w poprzednich pracach (30,8—54,7% [5], 36,6—63,3 [13], 44,6—46,3 [19]). Dla wytłumaczenia tej różnicy skontrolowano dynamikę ekstrakowania łusek 10% CCl_3COOH i wykazano, że już w pierwszym wyciągu (patrz: Metody) znajduje się główna masa drobnocząsteczkowych związków fosforowych, podczas gdy wyciąg trzeci i woda z prze-

mywania pozostałości kwasonierozpuszczalnej były zupełnie wolne od fosforu. Być może, że zachowanie przez nas dużej ostrożności przy suszeniu łusek oraz ekstrahowaniu ich kwasem trójchloroocetowym (trzykrotne 10-minutowe działanie w temp. 0°) wykluczyło ewentualny znaczniejszy rozkład kwasów RN na związki niskocząsteczkowe, co mogło mieć miejsce w poprzednich pracach.

Fracja kwasorozpuszczalna łusek jest reprezentowana w 76,9—90,4% przez ortofosforany. Rzeczywista zawartość ortofosforanów prawdopodobnie jest nieco niższa z uwagi na możliwość rozpadu w CCl_3COOH labilnych drobnocząsteczkowych połączeń fosforowych. Charakter tych związków nie został dotąd zbadany.

Związki fosforowe nierozpuszczalne w 10% CCl_3COOH stanowią główną masę całkowitego fosforu łusek (54,2—65,2%). Więcej niż połowa fosforu tych związków (50,2—57,9%) przypada na fosfor kwasów RN. Pozostałość stanowi fosfor kwasów DN (14,9—22,4%) i tzw. fosfoproteidów (22,8—27,7%). Procentowa zawartość obu kwasów nukleinowych w łuskach nie odlipidowanych (Tabl. 9), wyliczona z odpowiednich war-

Tablica 9

Procentowa zawartość kwasów nukleinowych w łuskach łuszczyca nie pozbawionych lipidów

(wyliczona z zawartości P kwasów RN i DN)

Łuski	KRN (%)	KDN (%)	Ogólna ilość KN (%)
I	0,98	0,25	1,23
II	1,39	0,63	2,02
III	0,80	0,30	1,10
IV	1,14	0,45	1,59
Va	1,84	0,79	2,63
Vb	1,72	0,56	2,28

tości na fosfor kwasów DN i RN, ilustruje znaczną (2,5—3,9-krotną) przewagę kwasów RN, co pozostaje w zgodzie z naszymi poprzednimi pracami nad nukleoproteidami łusek łuszczyca [5, 6].

Nieprawdopodobnie wysoką w porównaniu z innymi tkankami (1—5 mg % P [14]) wydaje się zawartość P fosfoproteidowego w łuskach (12,7—17,3 mg% suchej masy). Jednak w świetle ostatnich prac B r e s l e r a i w s p ó ł p r. [1, 2] oraz D o u n c e ' a i K a y ' a [7, 8] nad labilnymi, wysokoenergetycznymi grupami pirofosforanowymi w ogniwie spolimerizowanego łańcucha kwasu RN, można by zaryzykować interpretację tego fosforu frakcji fosfoproteidowej, jako obecności dodatkowych grup pirofosforanowych, ulegających podczas hydrolizy alkalicznej odczepieniu od kwasów RN. Upoważniają nas do tego obserwacje poczynione w po-

przedniej pracy [6] nad występowaniem w β -nukleoproteidach łuszczykowych znacznych ilości fosforanów nieorganicznych, odczepianych od tych nukleoproteidów w 1N NaOH.

Na marginesie należy podkreślić znaczenie właściwego przygotowania łusek łuszczycy do analizy wg Schmidta i Thannhausera [17]. Długotrwałe (ok. 60 godz.) suszenie łusek w temp. 105° doprowadziło do zupełnie odmiennego rozfrakcjonowania połączeń fosforowych: zawartość fosforu kwasorozpuszczalnego zwiększyła się o 43,4%, fosforanów nieorganicznych o 17,9%, a „fosfoproteidów“ o 89,8%. Odpowiednio ilości całkowitego fosforu kwasonierozpuszczalnego spadły o 21,1%, a fosforu kwasów RN o 92,7% (Tabl. 1b).

Mimo pewnych ogólnych zastrzeżeń co do metody Schmidta i Thannhausera (niedokładność ekstrakcji i wytrącania) wyniki otrzymane w niniejszej pracy zdają się charakteryzować dosyć znamienne łuski łuszczykowe pod względem zawartości niektórych związków fosforowych, zwłaszcza wielkocząsteczkowych. Wyrażna przewaga rybonukleoproteidów wydaje się być niewątpliwą, a nadspodziewanie wysoka zawartość fosforanów nieorganicznych w alkalicznym hydrolizacie (tzw. frakcji fosfoproteidowej) nasuwa konieczność bliższego zbadania możliwości występowania dodatkowych wysoko energetycznych grup fosforanowych w kwasach RN łusek łuszczycy.

Streszczenie

W 6 rodzajach łusek łuszczycy pochodzących od 5 różnych chorych oznaczono frakcje fosforowe wg metody Schmidta i Thannhausera [17] w modyfikacji Niemierki [16]. Wyniki analiz są następujące:

1. Ilość fosforu całkowitego w badanych łuskach waha się w granicach 249,3—524,9 mg%.

2. Na fosfolipidy przypada zaledwie 4,4—6,1% całkowitego fosforu łusek nie odlipidowanych.

3. Fosfor związków fosforowych kwasorozpuszczalnych stanowi 27,3—36,4% fosforu zawartego w łuskach nie pozbawionych lipidów podczas gdy na związki wielkocząsteczkowe (nukleo- i fosfoproteidy) przypada 54,2—65,2%.

4. W ramach frakcji nierozpuszczalnej w 10% CCl_3COOH stwierdzono, że główny odsetek fosforu całkowitego łusek stanowi fosfor kwasów RN (31,3—36,7%). Fosfor kwasów DN wynosi 8,1—14,6%, a tzw. fosfoproteidów 12,7—17,3%.

L I T E R A T U R A

- [1] Bresler S. E. i Nidzian E., *Dokł. Akad. Nauk SSSR* **75**, 79, 1950.
 [2] Bresler S. E. i Rubina Ch. M., *Biochimija* **20**, 740, 1955.
 [3] Delory G. E., *Biochem. J.* **32**, 1161, 1936.
 [4] Dische Z., *Mikrochemie* **8**, 4, 1930.
 [5] Dmochowski A. i Drabikowski W., *Acta Biochim. Polon.* **2**, 9, 1955.
 [6] Dmochowski A., Sempłńska E. i Kłyszejko L., *Acta Biochim. Polon.* **2**, 33, 1955.
 [7] Dounce A. L., *Enzymologia* **15**, 251, 1952.
 [8] Dounce A. L. i Kay H. R. M., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **83**, 321, 1953.
 [9] Fiske C. H. i Subbarow Y., *J. Biol. Chem.* **66**, 375, 1925.
 [10] Javillier M. i Allaire H., *Bull. Soc. Chim. Biol.* **13**, 678, 1931.
 [11] Levene P. A. i Bass. Z. W., *Nucleic Acids*, Chem. Catal. Comp., N. York. 1931.
 [12] Lisowskaja N. P., *Biochimija* **19**, 626, 1954.
 [13] Łoza E., *Pol. Tyg. Lek.* **8**, 617, 660, 1953.
 [14] Mirsky A. E. i Pollister A. W., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **28**, 344, 1942.
 [15] Niemierko W., *Postępy Biochemii PZWL* **1**, 34, 1953.
 [16] Niemierko W., Niemierko S. i Włodawer P., *Acta Biol. Exper.* **16**, 247, 1952.
 [17] Schmidt G. i Thannhauser S. J., *J. Biol. Chem.* **161**, 88, 1945.
 [18] Smith J. D. i Wyatt S. R., *Biochem. J.* **49**, 146, 1951.
 [19] Wolszlegier D., *Badania nieopublikowane*, 1952.

ФОСФОРНЫЕ ФРАКЦИИ ЧЕШУЕК ОБЫКНОВЕННОГО ПСОРИАЗА
 (PSORIASIS VULGARIS)

Резюме

В шести родах чешуек псориаза, происходящих от пяти различных больных, определяли фосфорные фракции по методу Шмидта и Таннгаузера в модификации Немерки [16].

Результаты анализа следующие:

1. Количество всего фосфора в исследуемых чешуйках колеблется в пределах 249,3—524,9 мг⁰/₀.
2. На фосфатиды приходится едва 4,4—6,1⁰/₀ всего фосфора в не лишенных липидов чешуйках.
3. Фосфор фосфорных соединений, растворимых в кислотах, составляет 27,3—36,4⁰/₀ фосфора, содержащегося в чешуйках не лишенных липидов в то время, как на макромолекулярные соединения (нуклео- и фосфопротеиды) приходится 54,2—65,2⁰/₀.
4. В пределах нерастворимой в 10⁰/₀ CCl₃COOH фракции констатировали, что основной процент всего фосфора чешуек составляет фосфор рибонуклеиновых (RN) кислот (31,3—36,7⁰/₀). Фосфор дезоксирибонуклеиновых (DN) кислот составляет 8,1—14,6⁰/₀, а так называемых фосфопротеидов 12,7—17,3⁰/₀.

PHOSPHORUS FRACTIONS OF PSORIATIC SCALES (*PSORIASIS VULGARIS*)

Summary

Phosphorus fractions of six kinds of psoriatic scales from five different patients were determined by the method of Schmidt and Thannhauser [17] as modified by Niemierko [16]. Results of analyses were as follows:

1. Total phosphorus of the scales analysed was between 249.3 and 524.9 mg per cent.
2. Phospholipids accounted for 4.4—6.1 per cent only of the total phosphorus of non-delipidized scales.
3. The phosphorus of acid-soluble phosphorus compounds amounted to between 27.3 and 36.4 per cent of the phosphorus contained in non-delipidized scales, whereas macromolecular compounds (nucleo- and phosphoproteins) accounted for between 54.2 and 65.2 per cent.
4. In the fraction insoluble in 10% CCl_3COOH , the main percentage of the total phosphorus of the scales was found to be represented by the phosphorus of ribonucleic acids (31.3—36.7 per cent). The phosphorus of desoxyribonucleic acids and of the so-called phosphoproteins accounted for between 8.1 and 14.6 per cent and between 12.7 and 17.3 per cent, respectively.

Otrzymano 5.12.1956 r.

G. KUPRYSZEWSKI i T. SOKOŁOWSKA

NOWE METODY ESTRYFIKACJI AMINOKWASÓW*Z Katedry Chemii Ogólnej Politechniki Gdańskiej**Kierownik Katedry: Prof. dr E. Taschner*

Estry aminokwasów znalazły szerokie zastosowanie jako substraty w syntezach peptydów. Klasyczne syntezy peptydów polegają na kondensacji N-acylowanego aminokwasu posiadającego „aktywowaną” grupę karboksylową z innym aminokwasem o zablokowanej grupie karboksylowej. Jedyną metodą służącą do blokowania grup karboksylowych jest estryfikacja. Najczęściej stosuje się estry metylowe i etylowe oraz benzylowe. Te ostatnie używa się ze względu na możliwość ich rozszczepiania przez hydrogenolizę.

Estryfikacja służy nie tylko do blokowania grupy karboksylowej, lecz także niekiedy do jej „aktywowania”. Ostatnio stwierdzono, że np. estry cyjanometylowe i nitrofenylowe aminokwasów są doskonałymi środkami acylującymi. Na tym spostrzeżeniu oparto syntezę peptydów przez aminolizę tych tzw. „aktywnych” estrów [1], [13].

Estry cyjanometylowe i nitrofenylowe były dotychczas otrzymywane jedynie metodami pośrednimi [6]. W niniejszej pracy podajemy bezpośrednią metodę otrzymywania estrów nitrofenylowych.

Najstarsza bezpośrednia metoda estryfikacji aminokwasów, opracowana przez T. Curtiusa [4] i ulepszona przez E. Fischera [8], polega na ogrzewaniu aminokwasu w alkoholu nasyconym chlorowodorem. Modyfikacje tej metody opracowali K. Felix i H. Rauch [7] oraz H. Fraenkel-Conrat i H. S. Olcott [9]. H. K. Miller i H. Waelsch [12] oraz J. C. Sheehan i E. J. Corey [14] zastosowali metodę azeotropową do otrzymywania estrów benzylowych aminokwasów. B. F. Erlanger i R. M. Hall [5] otrzymywali estry benzylowe aminokwasów stosując kwas polifosforowy jako czynnik odwadniający.

W niniejszej pracy podajemy nową metodę estryfikacji wolnych oraz N-acylowanych aminokwasów i peptydów opartą na zaobserwowanym

Tablica 1

Estry aminokwasów otrzymane za pomocą chlorku tionylu

L. p.	Ester	R	Wydajność w %
1	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{CH}_2-\text{COOR} \end{array}$	$-\text{CH}_3$	97 **
2	estry glicyny	$-\text{C}_2\text{H}_5$	98 **
3	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{CH}_3-\text{CH}-\text{COOR} \end{array}$	$-\text{CH}_3$	88 *
4	estry DL-alaniny	$-\text{C}_2\text{H}_5$	92 *
5	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOR} \end{array}$	$-\text{CH}_3$	92 *
6	estry DL-norwaliny	$-\text{C}_2\text{H}_5$	89 *
7	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ (\text{CH}_3)_2-\text{CH}-\text{CH}-\text{COOR} \end{array}$	$-\text{CH}_3$	91 *
8	estry DL-waliny	$-\text{C}_2\text{H}_5$	85 *
9	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ (\text{CH}_3)_2-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOR} \end{array}$	$-\text{CH}_3$	92 *
10	estry DL-leucyny	$-\text{C}_2\text{H}_5$	87 *
11	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{C}_6\text{H}_5-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOR} \end{array}$	$-\text{CH}_3$	90 *
12	estry DL-feniloalaniny	$-\text{C}_2\text{H}_5$	66 *
13	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{p-HO-C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOR} \end{array}$	$-\text{CH}_3$	70 *
14	estry L-tyrozyny	$-\text{C}_2\text{H}_5$	75 *
15	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOR} \end{array}$	$-\text{CH}_3$	72 *
16	estry DL-tryptofanu	$-\text{C}_2\text{H}_5$	75 *
17	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{ROOC}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOR} \end{array}$	$-\text{CH}_3$	92 *
18	estry kwasu DL-asparaginowego	$-\text{C}_2\text{H}_5$	84 *

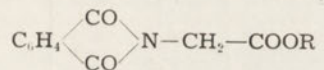
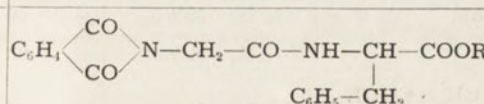
* Wydajności podane są dla estrów uzyskanych z chlorowodorków metodą Hillmana.

** Wydajności podane dla chlorowodorków estrów.

Uwaga: Estry identyfikowaliśmy w postaci chlorowodorków lub pikrynianów przez oznaczenie ich temperatury topnienia i mieszanej temperatury topnienia.

Tablica 2

Estry N-acylowanych aminokwasów i peptydów otrzymane za pomocą chlorku tionylu

L. p.	Ester	R	Wydajność w %
1		-CH ₃	88
2		-C ₂ H ₅	89
3	C ₆ H ₅ -CO-NH-CH ₂ -COOR estry kwasu hipurowego	-CH(CH ₃) ₂	97
4		-C ₄ H ₉	96
5		-C(CH ₃) ₃	15
6		-CH ₂ -C ₆ H ₅	85
7	 N-CH ₂ -COOR	-CH ₃	98
8	estry ftalilglicyny	-C ₂ H ₅	96
9	C ₆ H ₅ -CO-NH-CH-COOR (CH ₃) ₂ CH-CH ₂	-CH ₃	96
10	estry benzoilo DL-leucyny	-C ₂ H ₅	97
11	C ₆ H ₅ -CO-NH-CH-COOR C ₆ H ₅ -CH ₂	-CH ₃	88
12	estry benzoilo DL-feniloalaniny	-C ₂ H ₅	95
13	C ₆ H ₅ -CO-NH-CH-COOR C ₆ H ₅ -CO-O-C ₆ H ₄ -CH ₂	-CH ₃	90
	ester dwubenzoilo L-tyrozyny		
14	C ₆ H ₅ -CO-NH-CH ₂ -CO-NH-CH-COOR p-HO-C ₆ H ₄ -CH ₂	-CH ₃	89
	ester hipurylo L-tyrozyny		
15	 N-CH ₂ -CO-NH-CH-COOR C ₆ H ₅ -CH ₂	-CH ₃	82
	ester ftalilglicylo DL-feniloalaniny		

Uwaga: Estry identyfikowaliśmy przez oznaczenie ich temperatury topnienia i mieszaną temperaturę topnienia.

Tablica 3

Estry N-acylowanych aminokwasów otrzymane za pomocą chlorku acetylu

L.p.	Ester	R	Wydajność w %
1	$C_6H_5-CO-NH-CH_2-COOR$ estry kwasu hipurowego	$-CH_3$	86
2		$-C_2H_5$	96
3		$-CH(CH_3)_2$	91
4		$-C_4H_9$	97
5		$-C(CH_3)_3$	0
6		$-CH_2-C_6H_5$	97
7	$C_6H_4 \begin{matrix} \diagup CO \\ \diagdown CO \end{matrix} N-CH_2-COOR$ estry ftaliloglicyny	$-CH_3$	97
8		$-C_2H_5$	94
9	$C_6H_5-CO-NH-CH-COOR$ $(CH_3)_2CH-CH_2$ estry benzoilo DL-leucyny	$-CH_3$	96
10		$-C_2H_5$	95
11	$C_6H_5-CO-NH-CH-COOR$ $C_6H_5-CH_2$ estry benzoilo DL-fenylalaniny	$-CH_3$	87
12		$-C_2H_5$	87

Uwaga: Estry identyfikowaliśmy przez oznaczenie ich temperatury topnienia i mieszanej temperatury topnienia.

Tablica 4

Estry N-acylowanych aminokwasów otrzymane za pomocą chlorku kwasu benzeno-sulfonowego

L.p.	Ester	R	Wydajność w %
1	$C_6H_4 \begin{matrix} \diagup CO \\ \diagdown CO \end{matrix} N-CH_2-COOR$ estry ftaliloglicyny	$-CH_2-C_6H_5$	83
2		$-C(CH_3)_3$	96
3		$-C_6H_5$	92
4		$-C_6H_4-NO_2p$	86
5		$-C_6H_4-NO_2o$	93
6	$C_6H_5-CH_2-O-CO-NH-CH_2-COOR$ ester karbobenzoksyglicyny	$-C_6H_4-NO_2p$	89

Uwaga: Estry identyfikowaliśmy przez oznaczenie ich temperatury topnienia i mieszanej temperatury topnienia.

przez K. Freudenberg [10] wpływie chlorków kwasowych na reakcję estryfikacji. W opracowanej przez nas metodzie estryfikacja aminokwasów alkoholami zachodzi w temperaturze pokojowej pod wpływem chlorku tionylu. Czas reakcji wynosi około 48 godzin. Po odpędzeniu nadmiaru alkoholu uzyskuje się z dobrą wydajnością estry N-acylowanych aminokwasów lub chlorowodorki estrów aminokwasów. (Tablica 1 i 2). Do estryfikacji N-acylowanych aminokwasów stosowaliśmy także chlorek acetylu uzyskując również dobre wydajności (Tablica 3).

Z uzyskanych rezultatów wynikają ograniczenia stosowalności metody. Dobre wyniki uzyskuje się dla niskich alkoholi alifatycznych pierwszo- i drugorzędowych. Z alkoholami trzeciorzędowymi uzyskuje się minimalne wydajności. Estry benzytowe powstają z dobrą wydajnością pod warunkiem przedłużenia czasu reakcji. Opisana wyżej metoda nie nadaje się do otrzymywania estrów alkoholi trzeciorzędowych i alkoholi stałych.

Jak podaliśmy uprzednio, estry fenyłowe i nitrofenyłowe są ważnymi substratami w syntezach peptydów. W literaturze wzmiankowane są jedynie pośrednie, dość skomplikowane i uciążliwe metody ich otrzymywania, nie dające dobrych rezultatów. Poszukując zadowalających metod otrzymywania fenyłowych i nitrofenyłowych estrów aminokwasów zastosowaliśmy metodę J. H. Brewstera i C. J. Ciotti [3] nie stosowaną dotychczas w dziedzinie aminokwasów. Opracowana przez nas metoda polega na tym, że acylowany aminokwas rozpuszcza się na zimno w pirydynie, a następnie zadaje stechiometryczną ilością aromatycznego sulfochlorku i alkoholu lub fenolu. Metoda ta daje dobre wyniki estryfikacji N-acylowanych aminokwasów fenolami i alkoholami trzeciorzędowymi (Tablica 4).

Stwierdziliśmy także, że do otrzymywania estrów aminokwasów można zastosować mieszane bezwodniki używane ostatnio do syntez peptydów [2], [15]. Próby przeprowadzone z tlenochlorkiem fosforu i chloromrówczanem metylu dały zadowalające wyniki. Szersze ujęcie tego zagadnienia podane zostanie w innej publikacji.

Część doświadczalna

1. ESTRYFIKACJA AMINOKWASÓW WOBEC CHLORKU TIONYLU

Zawiesinę aminokwasu (0,1 mola) w odpowiednim alkoholu (1,2—2,0 moli) zadaje się z jednoczesnym mieszaniem i chłodzeniem w lodzie chlorkiem tionylu (0,12 mola). Mieszaninę reagującą pozostawia się w temperaturze pokojowej na 48 godzin. Po upływie tego czasu nadmiar alkoholu oddestylowuje się pod zmniejszonym ciśnieniem z kąpieli wodnej. Uzyskany w ten sposób chlorowoderek estru oczyszcza się przez krystalizację, bądź przerabia metodą Hillmanna [11] na wolny ester (wyniki w tabelicy 1).

2. ESTRYFIKACJA N-ACYLOWANYCH AMINOKWASÓW WOBEC CHLORKU TIONYLU

Roztwór lub zawiesinę N-acylowanego aminokwasu (0,1 mola) w odpowiednim alkoholu (1,2—2,0 moli) zadaje się, mieszając i chłodząc w lodzie, chlorkiem tionylu (0,12 mola). Mieszaninę reagującą pozostawia się w temperaturze pokojowej na 48 godzin. Po upływie tego czasu nadmiar alkoholu oddestylowuje się pod zmniejszonym ciśnieniem z kąpeli wodnej. Uzyskany ester oczyszcza się przez krystalizację. Wyniki w tablicy 2.

3. ESTRYFIKACJA N-ACYLOWANYCH AMINOKWASÓW WOBEC CHLORKU ACETYLU

Estryfikację przeprowadza się w sposób identyczny, jak w punkcie 2, stosując zamiast chlorku tionylu, chlorek acetylu. Wyniki w tablicy 3.

4. ESTRYFIKACJA N-ACYLOWANYCH AMINOKWASÓW W PIRYDYNIE WOBEC CHLORKU KWASU BENZENOSULFONOWEGO

N-acylowany aminokwas (0,1 mola) rozpuszcza się w 20 ml bezwodnej pirydyny i uzyskany roztwór zadaje się w temperaturze ok. 0° chlorkiem kwasu benzenosulfonowego (0,1 mola). Po 5 minutach dodaje się fenol lub alkohol (0,1 mola). Mieszaninę reagującą pozostawia się w temperaturze pokojowej na 2 godziny, po czym wylewa się na 80—100 g wody z lodem. Wydzielony ester oczyszcza się przez krystalizację. Wyniki w tablicy 4.

Streszczenie

Opracowano następujące metody estryfikacji aminokwasów:

1. Do zawiesiny aminokwasu w alkoholu dodaje się, chłodząc w wodzie z lodem, chlorek tionylu i pozostawia w temperaturze pokojowej. Po 48 godz. odpędza się nadmiar alkoholu uzyskując z dobrą wydajnością chlorowoderek estru aminokwasu.

2. Do roztworu lub zawiesiny N-acylowanego aminokwasu lub peptydu w alkoholu dodaje się, chłodząc w wodzie z lodem, chlorek tionylu lub chlorek acetylu i pozostawia w temperaturze pokojowej. Po 48 godzinach odpędza się nadmiar alkoholu uzyskując z dobrą wydajnością ester N-acylowanego aminokwasu lub peptydu. Obie powyższe metody nadają się do estryfikacji alkoholami płynnymi, pierwszo- i drugorzędowymi.

3. Acylowany aminokwas rozpuszcza się na zimno w pirydynie i do uzyskanego roztworu dodaje się, chłodząc w lodzie, chlorek kwasu benzenosulfonowego, a następnie alkohol lub fenol i pozostawia w temperaturze pokojowej na 2 godziny. Ester wytrąca się przez wylanie mieszaniny do wody z lodem. Metoda nadaje się do estryfikacji fenolami, nitrofenolami oraz alkoholami trzeciorzędowymi.

LITERATURA

- [1] Bodanszky M., *Nature* **175**, 685, 1955.
- [2] Boissons R. A., *Helv. Chim. Acta* **34**, 874, 1951.
- [3] Brewster J. H., Ciotti C. J., *J. Am. Chem. Soc.* **77**, 6214, 1955.
- [4] Curtius T., *Ber.* **16**, 753, 1883.
- [5] Erlanger B. F., Hall R. M., *J. Am. Chem. Soc.* **76**, 5781, 1954.
- [6] Farrington J. A., Kenner G. W., Turner J. M., *Chem. Ind.* **601**, 1955.
- [7] Felix K., Rauch H., *Z. physiol. Chem.* **200**, 27, 1931.
- [8] Fischer E., *Ber.* **28**, 3254, 1898.
- [9] Fraenkel-Conrat H., Olcott H. S., *J. Biol. Chem.* **161**, 259, 1945.
- [10] Freudenberg K., Jacob W., *Ber.* **74**, 1001, 1941.
- [11] Hillmann G., *Z. Naturforsch.* **1**, 682, 1946.
- [12] Miller H. K., Waelsh H., *J. Am. Chem. Soc.* **74**, 1092, 1952.
- [13] Schwyzer R., Feurer M., Iselin B., *Helv. Chim. Acta*, **38**, 83, 1955.
- [14] Sheehan J. C., Corey E. J., *J. Am. Chem. Soc.* **74**, 4553, 1952.
- [15] Wieland T., Heinke B., *Ann.* **599**, 70, 1956.

НОВЫЕ МЕТОДЫ ЭТЕРИФИКАЦИИ АМИНОКИСЛОТ

Резюме

Разработаны следующие методы этерификации аминокислот:

1. К суспензии аминокислоты в спирте прибавляют, охлаждая в воде со льдом, хлористый тионил и оставляют в комнатной температуре. 48 часов спустя, отгоняют избыток спирта, получая с хорошим выходом хлористоводородный эфир аминокислоты.

2. К раствору или суспензии N-ацилированной аминокислоты или пептида в спирте добавляют, охлаждая в воде со льдом, хлористый тионил или хлористый ацетил и оставляют в комнатной температуре. 48 часов спустя, отгоняют избыток спирта, получая с хорошим выходом эфир N-ацилированной аминокислоты или пептида. Оба вышеупомянутых метода пригодны к этерификации жидкими первичными и вторичными спиртами.

3. Ацилированная аминокислота растворяется в холодном состоянии в пиридине и к полученному раствору прибавляют, охлаждая льдом, бензолсульфохлорид, а затем спирт или фенол. Смесь оставляют в комнатной температуре на два часа. Эфир осаждается путем выливания смеси в воду со льдом. Метод пригоден для этерификации фенолами, нитрофенолами, а также третичными спиртами.

NEW METHODS FOR THE ESTERIFICATION OF AMINO ACIDS

Summary

New methods for the esterification of amino acids have been elaborated;

1. A suspension of an amino acid in alcohol cooled to 0°C. treated with thionyl chloride and left at room temperature for 48 hrs., gave amino-acid ester hydrochloride in good yields (Table 1).

2. N-acylated amino acids and peptides were esterified by means of thionyl chloride as well as acetyl chloride under the same conditions as above (Table 2 and 3). Both methods may be used for esterification with primary and secondary liquid alcohols.

3. A solution of N-acylated amino acid in pyridine was cooled in an ice bath, treated with benzenesulphonyl chloride and after 5 minutes either alcohol or phenol was added. After 2 hrs. ester was precipitated by pouring the reaction mixture into cold water. This method may be used for esterification with phenols, nitrophenols or tertiary alcohols (Table 4).

Otrzymano 11.1.1957 r.

A. MANITIUS

ZAWARTOŚĆ POTASU W SUROWICY KRWI LUDZI ZDROWYCH**II. WPLYW ZASTOJU ŻYLNego KRWI, POSIŁKU I WYSIŁKU. STAŁOŚĆ OSOBNICZA POZIOMU POTASU**

*Z Zakładu Chemii Fizjologicznej Akademii Medycznej w Gdańsku
Kierownik: Prof. dr Włodzimierz Mozółowski*

W poprzedniej pracy [6] opisano sposób otrzymywania surowicy do badań na zawartość potasu i określono normalny poziom potasu surowicy krwi ludzi zdrowych. W obecnym doniesieniu przedstawione są wyniki badań nad wpływem sztucznie wywołanego zastoję żylnego krwi, posiłku oraz wysiłku fizycznego na poziom potasu surowicy krwi ludzi zdrowych. Kierunek badań podyktowany był tym, że właśnie te czynniki mogą w praktyce, przy pobieraniu krwi, wpływać najbardziej na wynik oznaczeń. Ponadto przeprowadzono badania mające na celu wykazanie, czy istnieje osobnicza stałość poziomu potasu surowicy u osobników zdrowych.

Metody**1. Materiał doświadczalny**

Przedmiotem badań byli osobnicy obojga płci, subiektywnie zdrowi, w wieku od 18—30 lat. Krew pobierano z żyły łokciowej, przy pomocy strzykawki typu „Luer“, przy czym w zależności od rodzaju wykonywanych badań, postępowano w jeden z czterech następujących sposobów:

a) Przy określaniu normalnej zawartości potasu w surowicy postępowano w sposób podany w poprzedniej pracy [6].

b) Przy określaniu wpływu zastoję żylnego na poziom potasu surowicy, pierwszą porcję pobierano w sposób podany w punkcie a), po czym uciskano ramię manszetem sfigmomanometru, w którym utrzymywano ciśnienie pośrednie między skurczowym a rozkurczowym, przez okres 5 minut. Następnie pobierano krew, utrzymując przez cały czas trwania tego zabiegu zacisk.

c) Przy określaniu wpływu posiłku na zawartość potasu surowicy otrzymywano pierwszą porcję krwi tak jak w punkcie a); następnie badany spożywał posiłek składający się z: 200 g bułki pszennej, 20 g masła, 50 g kielbasy (lub 30 g żółtego sera) i 0,5 l mleka. W ciągu następnych 2 godzin zajmował się zajęciami nie wymagającymi wysiłku fizycznego (czytanie, pisanie), po czym leżał przez 15 minut przed powtórnym pobraniem krwi. Krew pobierano unikając stosowania zacisku.

d) Przy określaniu wpływu wysiłku fizycznego na poziom potasu w surowicy pierwszą próbkę krwi pobierano jak w punkcie a), następnie badany wykonywał jaknajbardziej intensywny 20-sekundowy bieg w miejscu, po czym natychmiast kładł się i pobierano od niego krew, unikając stosowania zastoju. Między zakończeniem wysiłku, a końcem pobierania krwi upływał czas nie dłuższy niż 3 minuty.

2. Otrzymywanie surowicy

Niezależnie od sposobu pobierania krwi, surowicę otrzymywano w sposób opisany w poprzedniej pracy [6].

3. Oznaczanie potasu w surowicy

Potas oznaczano na fotometrze płomieniowym f-y Zeiss, model III, w sposób przedstawiony w poprzednim doniesieniu [6].

4. Oznaczanie białka w surowicy

Białko całkowite surowicy oznaczano przy użyciu refraktometru zanurzeniowego Pulfricha z klinem dodatkowym. Według Mozolowskiego [7] przyjęto dla refrakcji ultrafiltratu wartość 1,3355, a przyrost refrakcji na 1 g białka w 100 ml za równy $1,83 \cdot 10^{-3}$.

5. Sposób przedstawienia wyników

Przedstawione wyniki są wartościami średnimi z dwóch równoległych oznaczeń.

Wartość dyspersji (σ) obliczono według wzoru:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (X - A)^2}{n - 1}},$$

gdzie A = średnia arytmetyczna wszystkich oznaczeń danego szeregu,

X = wynik poszczególnego oznaczenia,

n = ilość oznaczeń.

Wartość „P”, oznaczającą prawdopodobieństwo braku istotnej różnicy pomiędzy dwoma szeregami wyników, obliczono przy użyciu tabel Fishera i Yatesa [3] w oparciu o wartości:

a) średniego błędu średniej arytmetycznej (S),

$$S = \frac{\sigma}{\sqrt{n}} \text{ (znaczenie symboli jak wyżej),}$$

b) wskaźnika istotnej różnicy (t),

$$t = \frac{A_1 - A_2}{\sqrt{S_1^2 + S_2^2}} \text{ (znaczenie symboli jak wyżej),}$$

c) liczby stopni swobody (N),

$$N = n_1 + n_2 - 2 \text{ (znaczenie symboli jak wyżej).}$$

Wyniki

1. Wpływ zastoju żylnego na zawartość potasu surowicy krwi

Wyniki badań zestawiono w tablicy 1. Wartość „P” obliczona dla obu szeregów jest mniejsza aniżeli 0,01, co wskazuje na to, że — ze statystycznego punktu widzenia — różnica w poziomie potasu surowicy krwi pobieranej bez stazy i ze stazą jest istotna.

Tablica 1

Wpływ zastoju żylnego krwi na poziom potasu w surowicy krwi ludzi zdrowych

I — surowica krwi pobranej bez zastoju

II — surowica krwi pobranej po 5-minutowym zastoju żylnym

L.p.	Białko g/100 ml			Potas g/100 ml		
	I	II	% przyrostu	I	II	% przyrostu
1	7,85	9,50	21,0	17,0	18,4	8,2
2	8,00	11,25	40,6	15,9	16,9	6,3
3	7,40	9,60	29,7	17,0	18,4	8,2
4	7,80	9,55	22,4	16,2	17,3	6,8
5	7,35	8,75	19,0	16,4	17,3	5,5
6	8,00	8,30	3,8	15,5	16,1	7,1
7	7,00	8,15	16,4	16,2	16,4	1,2
8	7,30	10,60	45,2	17,2	20,6	19,8
9	7,55	8,40	11,3	17,1	17,9	4,7
10	7,10	9,80	38,0	17,6	18,8	6,8
11	7,60	9,35	23,0	15,6	16,6	6,4
12	8,05	10,85	34,8	17,6	18,1	2,8
13	7,35	9,45	28,6	16,4	17,4	6,1
14	7,50	10,65	42,0	18,7	19,5	4,3
	Średnio		26,8	Średnio		6,7

Z przedstawionych liczb wynika, że:

- a) pięciominutowy zastój żylny krwi powoduje przyrost poziomu potasu w surowicy krwi ludzi zdrowych,
- b) nie ma równoległości między przyrostem zawartości potasu, a wzrostem zawartości białek surowicy.

2. Wpływ posiłku na zawartość potasu w surowicy krwi

Wyniki badań przedstawione są w tabelicy 2. Z zestawionych liczb wynika, że podawany posiłek nie wpływa w uchwytny sposób na poziom potasu surowicy. Obserwacje te zgodne były ze spostrzeżeniami innych autorów, np. [11].

Tablica 2

Wpływ posiłku na zawartość potasu surowicy krwi ludzi zdrowych

L. p.	K w mg na 100 ml		Różnica I — II
	I Na czczo	II 2 godziny po posiłku	
1	16,2	16,4	+ 0,2
2	16,1	16,4	+ 0,3
3	15,8	15,8	0,0
4	16,8	16,5	— 0,3
5	20,7	20,5	— 0,2

(Posiłek składał się z: 200 g bułki pszennej, 20 g masła,
50 g kiełbasy - lub 30 g sera żółtego i 0,5 l mleka)

3. Wpływ wysiłku fizycznego na poziom potasu surowicy

Uzyskane wyniki zestawiono w tabelicy 3, wynika z niej, że:

- a) wykonana praca fizyczna wywiera istotny wpływ na poziom potasu surowicy,

Tablica 3

Wpływ wysiłku fizycznego na poziom potasu w surowicy krwi ludzi zdrowych

I — surowica krwi pobranej przed wysiłkiem

II — surowica krwi pobranej po 20-sekundowym biegu

L. p.	Białko			Potas		
	g na 100 ml		% przyrostu	mg na 100 ml		% przyrostu
	I	II		I	II	
1	7,85	9,20	17,2	16,0	17,8	11,3
2	6,70	8,15	21,7	17,4	19,6	12,7
3	6,70	8,25	23,1	18,0	19,0	5,6
4	7,60	8,95	17,8	15,3	17,0	11,1
5	7,85	9,20	17,2	17,3	18,4	6,4

b) nie znaleziono zgodności między przyrostem poziomu potasu a wzrostem zawartości białek surowicy.

Ponieważ i te wyniki zgodne były z obserwacjami innych autorów, np. [2, 5], ograniczono się do wykonania 5 oznaczeń.

4. Stałość osobnicza poziomu potasu surowicy krwi

Dla stwierdzenia czy istnieje osobnicza stałość poziomu potasu w surowicy krwi ludzi zdrowych, wykonano w kilkumiesięcznych odstępach czasu oznaczenia zawartości potasu u 8 osobników obojga płci. Wyniki przedstawione są w tablicy 4. Z zestawionych liczb wynika, że nie stwier-

Tablica 4

Zawartość potasu w surowicy krwi tych samych osobników, badanych w kilkumiesięcznych odstępach

L. p	Symbol	Nr badania	Data	Białko g na 100 ml	Potas mg na 100 ml
1	H. D.	I	9.6.54	7,05	17,9
		II	23.9.54	7,80	16,9
2	B. Ch.	I	4.6.54	8,10	18,1
		II	19.10.54	8,05	16,0
3	K. C.	I	8.6.54	7,30	17,4
		II	19.10.54	7,60	17,4
4	A. M.	I	2.4.54	7,25	19,2
		II	21.10.54	6,65	17,5
		III	23.12.54	7,00	18,5
		IV	12.5.55	7,50	18,7
		V	6.3.56	6,70	17,4
5	R. N.	I	31.3.54	—	16,5
		II	22.10.54	7,60	14,6
		III	25.2.55	8,00	15,9
		IV	6.3.56	7,85	16,0
6	W. R.	I	3.4.54	7,25	16,9
		II	25.10.54	7,30	16,8
		III	1.3.55	7,40	17,0
7	W. C.	I	5.4.54	8,00	16,0
		II	25.2.55	7,85	17,0
8	L. Ż.	I	27.10.54	7,90	16,3
		II	20.3.56	7,85	17,3

dza się jakiejś bezwzględnej stałości poziomu potasu w surowicy tego samego osobnika, w sensie bardzo nieznacznej tylko oscylacji dokoła pewnej wartości stałej. Niemniej jednak należy zauważyć, że w żadnym z badanych przypadków nie obserwowano przeskoków od wartości najniższych do najwyższych i odwrotnie.

Dyskusja

Przedstawione w tej pracy badania miały na celu określenie wpływu na poziom potasu surowicy tych czynników, które mogą mieć praktyczne znaczenie przy pobieraniu krwi do badań.

O ile wyniki badań nad wpływem posiłku i wysiłku fizycznego potwierdziły spostrzeżenia innych autorów, o tyle doświadczenia nad wpływem zastoju żylnego krwi były sprzeczne z jedyną znalezioną w literaturze uwagą dotyczącą tego zagadnienia. Uwaga ta, podana przez *Platina* [9] stwierdza, że sztucznie wywołany zastój żylny krwi nie wpływa na poziom potasu surowicy. Stwierdzenie to jest sprzeczne z wynikami przedstawionych tu badań. We wszystkich 14 przebadanych przypadkach notowaliśmy wyraźny przyrost zawartości potasu w surowicy. Porównanie wyników badań obu serii (bez stazy i z 5-minutową stazą) wskazuje na istotną, ze statystycznego punktu widzenia, różnicę w stężeniu potasu surowicy krwi pobranej bez zastoju i podczas stazy. Przyczyny tego zjawiska nie można wytłumaczyć na podstawie dotychczasowych prac. Wydaje się, że w grę wchodzi tu mogą dwa czynniki, a mianowicie: 1. niedotlenienie tkanek i 2. zagęszczenie krwi. W odniesieniu do pierwszego z tych czynników szereg autorów, m. i. [4, 8, 9] stwierdza, że anoksja wpływa na uwalnianie potasu wewnątrzkomórkowego i przenikanie jego do płynów pozakomórkowych. Związane to jest ze zmianą przepuszczalności błon komórkowych. Natomiast rola zagęszczenia krwi jako ewentualnego czynnika wpływającego na zwiększenie poziomu potasu wydaje się niejasna. Doświadczenia *Dickera* [1] wykonane na szczurach wykazały, że zagęszczenie krwi, wywołane odwodnieniem powoduje zwiększenie poziomu potasu w surowicy. Trudno jest stwierdzić czy w przypadku hemokoncentracji czynnikiem zwiększającym zawartość potasu miałyby być ewentualnie równoczesne podwyższenie poziomu białek jako substancji trudnodyfundujących przez ściany naczyń włosowatych. Badania różnych autorów nad wiązaniem się potasu z białkami dały wyniki niejednoznaczne. Podczas gdy np. *Levy* i *Pacu* [5] znajdowały, że praktycznie biorąc cały potas surowicy przechodzi do ultraprzesącza, to inni autorzy jak np. *Tarail* i współpracownicy [10] stwierdzali, że część potasu surowicy nie ulega ultrafiltracji. W naszych doświadczeniach nie udało się znaleźć zgodności między przyrostem zawartości potasu

a wzrostem stężenia białek surowicy zagęszczanej sztucznie wywołanym zastojem żylnym krwi.

Badania nad wpływem posiłku na zawartość potasu potwierdziły tylko wyniki badań Zwemera i Truszkowskiego [11], którzy znajdowali, że podanie doustne soli potasu w ilości 15 mg/kg wagi ciała nie wywołuje wzrostu zawartości potasu w surowicy. Zawartość potasu w podawanym przez nas posiłku oceniamy w przybliżeniu na 1,5 do 2,0 g. Posiłek taki nie powodował zmian w zawartości potasu surowicy krwi pobranej w dwie godziny po spożyciu jedzenia. Warto tu przypomnieć, że według Zwemera i Truszkowskiego podanie doustne związków potasu może służyć jako test przy wykrywaniu niewydolności kory nadnerczy. Mianowicie dawka 15 mg potasu na kg wagi ciała powoduje u ludzi z ukrytą nawet niewydolnością kory nadnerczy przejściowy wzrost poziomu potasu w surowicy.

Badania nad wpływem pracy fizycznej na poziom potasu potwierdziły także obserwacje innych autorów, np. [2, 9]. Wydaje się, że przyczyny tego zjawiska należy, podobnie jak przy zastojach krwi, szukać w niedotlenieniu tkanek i zagęszczeniu krwi. Podobnie jak w tamtych badaniach, tak i tutaj, nie udało się stwierdzić równoległości między przyrostem poziomu potasu a wzrostem zawartości białek surowicy, spowodowanym wysiłkiem.

Wreszcie jako oddzielne zagadnienie należy postawić kwestię istnienia osobniczej stałości poziomu potasu surowicy. Z przedstawionych w tej pracy wyników wypływa, że trudno jest mówić o jakiejś bezwzględnej stałości poziomu potasu u tego samego osobnika na przestrzeni okresów kilkumiesięcznych. Z drugiej jednak strony nie stwierdza się, aby u tego samego osobnika występowały nagle przeskoki od niskich do wysokich wartości stężenia potasu, względnie odwrotnie. Wydaje się, że można nawet wypowiedzieć wniosek, że podczas gdy u jednych osób poziom potasu na przestrzeni nawet dłuższego okresu czasu oscyluje stale w granicach wartości wysokich, to u innych zawartość potasu jest wciąż raczej niska, trzecia grupa oscyluje dokoła wartości średnich. I w tym też znaczeniu można by mówić o pewnej stałości osobniczej poziomu potasu w surowicy krwi ludzi zdrowych.

Streszczenie

Przeprowadzone badania wykazały, że:

1. Pięciominutowy zastój żylny krwi powoduje niedwuznacznie zwiększenie poziomu potasu surowicy.

2. W dwie godziny po spożyciu posiłku, zawierającego około 1,5—2,0 g potasu, nie stwierdza się zmian w poziomie potasu surowicy krwi ludzi zdrowych w porównaniu z zawartością tego składnika oznaczoną w surowicy krwi pobranej na czczo.

3. 20-sekundowy intensywny bieg w miejscu powoduje podwyższenie poziomu potasu w surowicy.

4. U ludzi zdrowych, na przestrzeni kilkumiesięcznych odstępów czasu, stwierdza się tylko stosunkowo niewielkie wahania poziomu potasu w surowicy.

LITERATURA

- [1] Dicker S. E., *Biochem. J.* **44**, 274, 1949.
- [2] Fenn W. O., *Physiol Rev.* **20**, 377, 1940, wg Rona's Ber. **124**, 310, 1941.
- [3] Fisher R. A., Yates F., *Statistical Tables for Biological, Agricultural and Medical Research*, Oliver and Boyd, London-Edinburgh 1948.
- [4] Hoffmann W. S., *JAMA* **144**, 1157, 1950.
- [5] Levy J., Pacu M. M., *Bull. Soc. Chim. Biol.* **15**, 158, 1933.
- [6] Manitius A., *Acta Biochim. Polon.* **2**, 231, 1955.
- [7] Mozołowski W., *Acta Biochim. Polon.* **1**, 59, 1954.
- [8] Nadler C. S., *Am. J. Med. Sci.* **226**, 88, 1953.
- [9] Plattner H. C., *Le métabolisme du potassium et ses perturbations*, Masson et C-ie Editeurs, Paris 1954.
- [10] Tarail R., Hacker E. S., Taymor R., *J. Clin. Inv.* **31**, 23, 1952.
- [11] Zwemer R. L., Truszkowski R., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **35**, 424, 1936.

СОДЕРЖАНИЕ КАЛИЯ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ

Резюме

Проведенные исследования показали, что:

1. Пятиминутный венозный застой крови вызывает, недвусмысленно, повышение уровня калия в сыворотке.

2. Два часа спустя после принятия пищи, содержащей около 1,5—2,0 г калия, не констатируются изменения уровня калия в сыворотке крови здоровых людей, по сравнению с содержанием этого компонента в сыворотке крови, взятой натощак.

3. Двадцатисекундный интенсивный бег на месте влечет за собой повышение уровня калия в сыворотке.

4. У здоровых людей, на протяжении нескольких месячных интервалов времени, констатируются лишь сравнительно небольшие колебания уровня калия в сыворотке.

POTASSIUM CONTENT IN BLOOD SERUM OF HEALTHY MAN

II. THE EFFECTS OF VENOUS STASIS, FOOD AND EFFORT. INDIVIDUAL CONSTANCY OF POTASSIUM LEVEL

Summary

Investigations referred to in the paper showed that:

1. Venous stasis lasting 5 minutes caused an unmistakable rise in the potassium level of blood serum.
2. No changes of potassium level in the blood serum of healthy men could be established after ingestion of a meal containing between 1.5 and 2.0 g of potassium, as compared to that found in serum of blood taken upon fasting.
3. An intensive stationary run of 20 sec. caused a rise in the potassium level of serum.
4. In healthy men only relatively minor changes in the potassium level of blood serum could be established at interval of several months.

Otrzymano 24.1.1957 r.

J. DZUŁYŃSKA

**KWAS NEURAMINOWY WE FRAKCJACH BIAŁKOWYCH
SUROWICY OTRZYMYWANYCH METODAMI: WYSALANIA
I WYTRĄCANIA METANOLEM***Z Instytutu Dermatologii i Wenerologii**Kierownik Sekcji Biochemicznej: Doc. J. Dzułyńska*

Dotychczas nie zostało całkowicie poznane rozmieszczenie we frakcjach białkowych surowicy, substancji odpowiedzialnej za powstawanie purpurowo-fioletowego zabarwienia w reakcji surowicy z dwufenyloaminą. Według Wernera i Odina [20] substancją tą jest kwas sjałowy, wyodrębniony przez Blixa [2] z gruczołów podszczękowych wółu, natomiast C. i P. Chatagnonowie [8] odnoszą tę reakcję do kwasu neuraminowego, izolowanego przez Klenka [12] z gangliozydów, glikolipidów pochodzenia mózgowego. Jakkolwiek oddawna znajdowano ścisły związek między kwasem sjałowym a neuraminowym, a nawet wyrażano przypuszczenia, że mogą to być identyczne związki (Werner i wsp. [20], Chatagnon i wsp. [6], Trucco i wsp. [16], Blix i wsp. [3] i inni), jednak dopiero badania Klenka i wsp. [13] wykazały ścisłą tożsamość kwasu: N-acetyloneuraminowego i kwasu sjałowego z mucyny owczej. Dotychczasowe badania, w kierunku poznania rozmieszczenia kwasu neuraminowego we frakcjach białkowych surowicy, prowadzone były prawie wyłącznie na drodze elektroforezy. (Uzmann [17], C. Chatagnon i wsp. [6], Boehm i wsp. [5]). Badań przy użyciu metody chemicznej frakcjonowania (wysalania białek siarczanem amonu) dokonał jedynie Boehm [4] uwzględniając przy tym tylko rozmieszczenie kwasu neuraminowego w dwu frakcjach: albuminowej i globulinach całkowitych.

Celem niniejszej pracy było zbadanie rozmieszczenia kwasu neuraminowego we frakcjach białkowych surowicy, otrzymywanych metodami chemicznymi. Dla wysnucia pewniejszych wniosków przeprowadzono badania we frakcjach uzyskiwanych równolegle kilkoma różnymi sposobami rozdzielania białek.

Część doświadczalna

Do badań używano surowic pochodzących z krwi pobranej od osób zdrowych, w wieku od lat 20 do 30, na czczo. Surowicę oddzielano przez wirowanie, po trzygodzinnym staniu w t. pokojowej.

1. FRAKCJONOWANIE BIAŁEK

Białka rozdzielano trzema różnymi sposobami frakcjonowania surowicy: wg metody wysalania Kibricka i wsp. [14], oraz dwiema metodami wytrącania metanolem: Pillemera i wsp. [15] oraz Duberta

Tablica 1

Zawartość (w %) różnych białek surowicy w izolowanych frakcjach (wartości średnie)

Ilość badanych prób	Metoda frakcjonowania	Izolowane frakcje	Zawartość w %			
			α -globuliny	β -globuliny	γ -globuliny	albuminy
11	Kibricka i wsp. (wysalanie siarczanem sodu) [14]	γ -globuliny	—	7,2	92,8	—
		$\gamma + \beta$ -globuliny	7,2	16,5	75,9	0,4
		albuminy + α -glob.	10,8	10,3	1,8	77,1
		albuminy	11,2			88,8
13	Duberta i wsp. (wytrącanie metanolem) [9]	$\alpha_1 + \alpha_2 + \beta_1$ -globuliny	45,0	14,0	5,6	35,4
		$\gamma + \beta_2$ -globuliny	10,6	14,9	59,7	14,8
		albuminy	4,2	8,1	1,7	86,0
15	Pillemera i wsp. (wytrącanie metanolem) [15]	globuliny	19,4	19,9	35,3	25,4
		albuminy	11,4			88,6

t a i wsp. [9]. Frakcję mukoproteinową izolowano wg metody Winzlera i wsp. [19]. Frakcje otrzymywane wyżej wymienionymi metodami wysalania oraz wytrącania metanolem, poddano badaniu na jednorodność przy użyciu elektroforezy bibułowej. Wyniki dotychczasowych badań w tym kierunku, prowadzonych w naszej pracowni [11] pozwalają na zorientowanie się w czystości użytych frakcji. Wyniki te uwidocznione są w tabl. 1.

a) Frakcjonowanie wg metody Kibricka i wsp.

Wysalania dokonywano, zachowując ściśle warunki podane przez autorów. Próby surowicy w ilości 2 ml wysalano 15,8% roztworem siarczanu sodu, zaś w ilości 1 ml kolejno 19,9 i 27,2% roztworami. Wysala-

nia dwóch pierwszych frakcji (15% i 19%) dokonywano w probówkach wirowniczych; po dwugodzinnym staniu w cieplarni przy 37° wirowano przez 30 min., przy 3000 obrotach. Frakcjonowania 27% roztworem siarczanu sodu przeprowadzano w kolbce stożkowej, po czym sączono do próbki wirowniczej w cieplarni, w myśl wskazań autorów. Osad na sączku przemywano roztworem 27% siarczanu sodu z odpowiednią ilością wody (19 części obj. 27% siarczasu sodu + 1 część obj. wody). Postępując w powyższy sposób otrzymywano w postaci osadu następujące frakcje: „ γ -globuliny”, następnie „ $\beta + \gamma$ -globuliny”, wreszcie na sączku globuliny całkowite. W roztworach pozostały frakcje: „albuminowa + α + β -glob.”, następnie albuminowa wraz z α -globulinami oraz albuminowa.

Ponieważ do dalszego postępowania celem oznaczania kwasu neuraminowego mogą być użyte frakcje jedynie w postaci osadów, pozostające w roztworze frakcje wytrącano 5% kwasem trójchlorooctowym (ok. 10 ml na 20 ml roztworu), po czym wirowano.

b) Frakcjonowanie wg metody Pillemera i wsp.

Próby surowicy w ilości 1 ml umieszczano w kalibrowanych probówkach wirowniczych i frakcjonowano metanolem ściśle przestrzegając warunków określonych przez autorów. Frakcje rozdzielano drogą wirowania w chłodzonej wirówce w t. 0°, przy 4000 obr., r = 19 cm, przez 30 min. Otrzymaną w roztworze frakcję albuminową dekantowano do próbki wirowniczej, po czym wytrącano 10 ml etanolu w t. pokojowej i wirowano jak poprzednio. W ten sposób otrzymywano w postaci osadów dwie frakcje: globulin całkowitych i albumin.

c) Frakcjonowanie wg metody Duberta i wsp.

Do frakcjonowania używano prób surowicy w ilości 2 ml. Białka rozdzielano drogą wytrącania odczynnikiem metanолоwym w warunkach określonych przez autorów, po czym wirowano w wirówce chłodzonej, w t. 0°, 4000 obr., przez 30 min. Zebrane w probówkach wirowniczych osady zawierały wg nomenklatury autorów frakcje: „ $\gamma + \beta_2$ -globuliny”, następnie „ $\alpha_1 + \alpha_2 + \beta_1$ -globuliny” oraz frakcję albuminową. Wydzielone frakcje pozostawiano do dalszego postępowania bez przemywania zaleconego przez Duberta i wsp., ze względu na znaczne straty z tym związane, co zresztą sami autorzy metody podkreślają.

d) Wyodrębnianie mukoprotein wg metody Winzlera i wsp.

Mukoproteiny izolowano z 3 ml surowicy, postępując ściśle wg metody autorów. Zebrane w kalibrowanej próbce mukoproteiny, po dokładnym przemyciu etanolem, pozostawiano do dalszego postępowania.

Tablica 2. Zawartość kwasu

L. p.	w białku całkowitym		we frakcjach białkowych wysalanych								
			w α -globulinach			w β -globulinach			w γ -globulinach		
	mg/100 ml surowicy	% w białku	mg/100 ml surowicy	% w białku	% całości kwasu neuramin.	mg/100 ml surowicy	% w białku	% całości kwasu neuramin.	mg/100 ml surowicy	% w białku	% całości kwasu neuramin.
1	45	0,6	14	1,6	32	8	0,7	18	5	0,4	12
2	58	0,8	23	1,8	40	11	1,2	19	7	0,5	12
3	48	—	19	—	41	10	—	20	6	—	13
4	56	0,8	18	2,0	31	12	1,5	22	6	0,5	11
5	58	0,8	13	1,2	23	15	1,4	26	8	0,7	13
6	53	—	14	—	25	11	—	20	8	—	14
7	62	—	19	—	32	16	—	24	8	—	12
8	63	0,8	16	1,2	25	13	1,4	21	8	0,6	12
9	61	—	18	—	31	17	—	28	7	—	11
10	63	0,8	18	1,8	29	14	1,4	22	8	0,7	13
11	58	0,8	15	1,1	26	17	1,9	28	6	0,4	10
12	48	—	14	—	30	11	—	22	6	—	13
13	70	—	22	—	31	16	—	23	8	—	12
14	62	0,8	16	1,4	25	20	1,7	31	10	0,7	15
15	58	0,8	16	1,6	27	10	1,1	17	8	0,6	13
16	54	0,8	16	1,8	29	8	1,1	15	7	0,5	13
17	58	0,8	18	2,0	30	12	1,5	21	8	1,0	13
18	57	0,8	16	1,4	28	16	1,5	28	7	0,5	12
19	57	0,8	14	1,1	25	16	2,0	26	5	0,3	9
Srednio	57	0,8	17	1,5	29	13	1,4	23	8	0,6	12
Odchylenie stand.	6,0	0,06	2,7	0,3	4,8	3,3	0,3	4,3	1,4	0,17	1,5

2. HYDROLIZA

Zebrane w próbkach wirowniczych osady frakcji białkowych dopełniano roztworem moderatorowym weronalowym o pH 8,6 (10,30 g medinalu oraz 1,84 weronalu w 1 l wody dest.) do objętości 1 ml i hydrolizowano zgodnie z metodą Ayala i wsp. [1] z 5% kwasem trójchlorooctowym, po zaopatrzeniu próbek wirowniczych chłodniczkami zwrotnymi (rurki długości 30 cm, zakończone kapilarą). Wyjątkowo frakcję γ -globulinową otrzymywaną na drodze wysalania oraz mukoproteino-
wą dopełniano do objętości 0,5 ml i poddawano hydrolizie z 2,5 ml 5% kwasu trójchlorooctowego.

neuraminowego w surowicy krwi

metodą Kibricka i wsp. [14]

w mukoproteinach
otrzymywanych metodą
Winzlera [19]

w albuminach			w globulinach (sumie frakcji)			w mukoproteinach otrzymywanych metodą Winzlera [19]		
mg/100 ml surowicy	% w białku	% całości kwasu neuramin.	mg/100 ml surowicy	% w białku	% całości kwasu neuramin.	mg/100 ml surowicy	% w białku	% całości kwasu neuramin.
10	0,2	23	29	0,9	62	—	—	—
12	0,3	22	41	1,2	71	—	—	—
10	—	22	36	—	74	—	—	—
15	0,3	27	31	1,2	64	—	—	—
16	0,4	28	36	1,1	62	—	—	—
14	—	25	32	—	61	—	—	—
17	—	27	42	—	68	7	—	12
17	0,4	28	37	1,1	58	7	—	11
15	—	23	42	—	70	8	—	11
14	0,3	21	40	1,3	64	9	—	14
16	0,4	27	37	0,9	64	8	—	14
12	—	27	30	—	63	—	—	—
16	—	23	45	—	65	7	8,5	11
17	0,4	28	45	1,3	72	8	8,0	13
15	0,4	27	32	0,9	57	8	8,9	13
15	0,4	28	32	0,9	57	8	8,6	15
12	0,3	23	37	1,3	64	—	—	—
13	0,3	23	38	1,1	68	8	11,6	15
16	0,4	27	35	0,9	60	8	11,3	13
14	0,3	25	36	1,1	64	8	9,5	13
2,3	0,08	2,5	5,0	0,16	5,0	0,7	1,6	1,5

3. OZNACZANIE KWASU NEURAMINOWEGO

Oznaczanie kwasu neuraminowego dokonywano zgodnie z metodą Ayala i wsp., ogrzewając 1 ml odwirowanego od osadu hydrolizatu z 2 ml odczynnika dwufenyloaminowego. Natężenie wytworzonego w wyniku reakcji z dwufenyloaminą (d. f. a.) purpurowo-fioletowego zabarwienia, odczytywano w absorpcjometrze Hilgera typu Spekkera, przy użyciu filtra 5200 Å. Całą serię oznaczeń, dotyczących badanej próby surowicy, dokonywano zawsze przy pomocy jednego i tego samego odczynnika d. f. a. świeżo nastawionego. Do wszystkich przeprowadzanych w całej pracy oznaczeń używano do nastawiania odczynnika d. f. a. stęż.

Tablica 3. Zawartość

L. p.	w białku całkowitym		we frakcjach białkowych rozdzielanych metodą								
			w $\alpha + \beta$ -globulin.			w γ -globulinach			w albuminach		
	mg/100 ml surowicy	% w białku	mg/100 ml surowicy	% w białku	% całości kwasu neuram.	mg/100 ml surowicy	% w białku	% całości kwasu neuram.	mg/100 ml surowicy	% w białku	% całości kwasu neuram.
1	60	—	22	—	38	16	—	26	18	—	26
2	64	—	31	—	50	18	—	32	20	—	32
3	55	—	26	—	47	14	—	31	18	—	31
4	60	—	27	—	44	16	—	26	16	—	26
5	52	—	23	—	44	14	—	30	16	—	30
6	56	0,8	28	2,6	51	13	0,9	24	14	0,3	24
7	62	0,9	27	2,7	43	16	1,1	28	17	0,4	28
8	55	0,7	22	3,0	37	18	0,8	23	13	0,3	23
9	52	0,7	22	1,7	41	15	0,8	23	12	0,3	23
10	59	0,8	27	3,7	46	18	0,8	30	17	0,3	30
11	61	0,8	34	4,2	56	12	0,7	22	13	0,3	22
12	58	0,8	23	1,9	40	16	0,9	27	16	0,3	27
13	63	0,9	27	3,0	43	15	0,8	26	16	0,4	26
14	60	0,8	27	2,1	46	17	0,9	25	15	0,4	25
15	66	0,9	30	2,7	46	17	0,9	23	15	0,3	23
16	59	0,8	27	3,7	45	16	0,7	26	15	0,4	26
17	64	0,8	27	2,2	42	16	0,9	29	19	0,5	29
18	65	0,9	28	2,6	43	16	0,8	27	18	0,5	27
Średnio	59	0,8	26	2,8	44	16	0,8	27	16	0,4	27
Odchylenie śr.	4,2	0,07	3,3	0,7	4,7	1,5	0,11	2,9	2,2	0,08	3,0

kwasu siarkowego cz. d. a., oraz specjalnie oczyszczanego drogą destylacji kolumnowej kwasu octowego lod., w braku cz. d. a. Zawartość kwasu neuraminowego obliczano z krzywej standardowej, wykreślonej na podstawie oznaczeń absorpcji roztworów wzorcowych kwasu neuraminowego o różnym stężeniu¹. Wszystkie dokonywane oznaczenia przeprowadzano w dwu równoległe badanych próbach surowicy. Wyniki oznaczeń kwasu neuraminowego były powtarzalne mimo dużego stosunkowo szeregu przejściowych operacji. Różnice w zawartości kwasu neuraminowego w dwu równoległe przeprowadzanych oznaczeniach we frak-

¹ Preparat wzorcowy kwasu neuraminowego otrzymałam od prof. Dr E. Klénka z Kolonii (N. R. F.), za udzielenie którego składałam tą drogą serdeczne podziękowanie.

kwasu neuraminowego surowicy krwi

Duberta i wsp. [9]			metodą Pillemera i wsp. [15]					
w globulinach (sumie frakcji)			w globulinach			w albuminach		
mg/100 ml surowicy	% w białku	% całości kwasu neuram.	mg/100 ml surowicy	% w białku	% całości kwasu neuram.	mg/100 ml surowicy	% w białku	% całości kwasu neuram.
39	—	65	46	—	76	13	—	21
49	—	78	46	—	73	18	—	27
40	—	73	37	—	68	16	—	29
43	—	70	40	—	65	20	—	33
36	—	70	36	—	70	15	—	32
41	1,6	73	—	—	—	—	—	—
43	1,7	69	—	—	—	—	—	—
38	1,3	69	40	1,2	72	16	0,5	29
36	1,1	70	37	1,2	71	20	0,5	29
45	1,4	77	46	1,3	78	12	0,3	21
46	1,8	76	46	1,5	76	13	0,4	20
39	1,3	69	—	—	—	—	—	—
42	1,4	67	—	—	—	—	—	—
44	1,3	75	46	1,7	79	13	0,3	21
47	1,6	72	—	—	—	—	—	—
42	1,3	72	43	1,3	74	17	0,5	28
44	1,5	68	—	—	—	—	—	—
43	1,3	67	44	1,3	69	17	0,5	26
42	1,4	71	42	1,4	73	16	0,4	26
3,6	0,2	3,7	4,0	0,19	4,5	2,7	0,1	4,6

ciach białkowych nie przekraczały 1,0 mg/100 ml surowicy. Więcej natomiast różniły się między sobą wyniki dla kw. neuraminowego surowicy całkowitej. Różnice w absorpcji dwu równoległych oznaczeń wahały się od 0,4 do 2,5 mg/100 ml surowicy.

4. WYNIKI BADAŃ NAD ZAWARTOŚCIĄ KWASU NEURAMINOWEGO W SUROWICY I JEJ FRAKCJACH BIAŁKOWYCH

Wyniki badań podano w mg kwasu neuraminowego/100 ml surowicy, w odsetkach w białku oraz odsetkach całości kw. neuraminowego. Ze względu na niemożność izolowania oddzielnie frakcji α -globulinowych oraz β -globulinowych metodą wysalania, zawartość kwasu neuraminowego w α -globulinach obliczano z różnicy zawartości kwasu neuramino-

wego we frakcjach „albuminowej + α -globulinowej” i albuminowej, zaś w β -globulinach odejmując zawartość kwasu neuraminowego we frakcji γ -globulinowej od zawartości we frakcji „ γ -glob. + β -globuliny”.

Wyniki przeprowadzonych badań zawarte są w tablicy 2 i 3.

Jak wynika z tablicy 2, we frakcjach białkowych otrzymywanych metodą wysalania, najbogatszą w kwas neuraminowy jest frakcja α -globulinowa (1,5% białka), następnie β -globulinowa (1,4%), znacznie uboższe w kw. neuraminowy są frakcje γ -globulinowa (0,5%) oraz albuminowa (0,3%). Najwyższy odsetek całości kwasu neuraminowego mieści się w α -globulinach (29%), nieco niższy w albuminach oraz β -globulinach (po 23%), najniższy w γ -globulinach (12%).

Suma wartości z poszczególnych frakcji białkowych jest mniejsza od wartości kwasu neuraminowego surowicy całkowitej średnio o 6 mg%. Jak stwierdzono na podstawie szeregu przeprowadzonych doświadczeń, kwas trójchlorooctowy nie strąca całkowicie białek z roztworów po wysoleniu 15 i 19% siarczanem sodu. W roztworze pozostaje sympleks białkowo-wielocukrowy, w którym po wytrąceniu go z roztworu kwasem fosforowolframowym, wartości dla białek i wielocukrów, jak wykazały doświadczenia przeprowadzone w naszej pracowni [11], różnią się niewiele od otrzymywanych dla mukoprotein (frakcji α_2 -glob.) izolowanych wg metody Winzlera [19]. Również i badania zawartości kwasu neuraminowego w tym sympleksie (wytrąconym z roztworu pochodzącego z wyjściowej ilości 3 ml surowicy), przeprowadzane na 4 próbach surowicy wykazały, że wyniki otrzymane różnią się bardzo niewiele od uzyskanych dla mukoproteinów Winzlera. Na tej podstawie oraz na podstawie danych z piśmiennictwa, że 5% kwas trójchlorooctowy nie wytrąca mukoprotein z surowicy (Weimer i wsp. 18), można przyjąć, że sympleks, wytrącony z roztworu po odbiałczeniu kwasem trójchlorooctowym, jest identyczny ze wspomnianym mukoproteinem Winzlera.

Wśród frakcji otrzymywanych przez wytrącenie metanolem wg metody Duberta (Tabl. 3) najwięcej kwasu neuraminowego zawiera frakcja „ $\alpha_1 + \alpha_2 + \beta_1$ -globulinowa” (2,8% białka frakcji), znacznie uboższą jest frakcja „ $\gamma + \beta_2$ -globulinowa” (0,8%), następnie albuminowa (0,4%). Bliżko połowa całości kwasu neuraminowego obecnego w surowicy mieści się we frakcji „ $\alpha_1 + \alpha_2 + \beta_1$ -globulinowej” (44%), znacznie mniej przypada na frakcje: „ $\gamma + \beta_2$ -globulinową” oraz albuminową (po 27% całości).

Kwas neuraminowy we frakcjach rozdzielonych metanolem, wg metody Pillemera i wsp., zachowuje się podobnie: prawie $\frac{3}{4}$ całości kwasu neuraminowego mieści się w globulinach (74%), zaś $\frac{1}{4}$ w albuminach (26%).

Odsetek kwasu neuraminowego w białkach frakcji jest również bardzo zbliżony do wyników otrzymywanych poprzednio.

Dyskusja

Uzyskane wyniki, nie dają prawdziwego obrazu rzeczywistych stosunków fizjologicznych, wskutek niezupełnej jednorodności otrzymywanych frakcji białkowych. Dotyczy to zwłaszcza frakcji globulinowych otrzymywanych metodą Duberta i wsp. oraz wysalanych frakcji α - oraz β -globulinowych, ze względu na niezupełnie dobry rozdział frakcji „ $\gamma + \beta$ -globulinowej” od „albumin + α -globulinowych”. Na podstawie danych z tabl. 1 można przypuszczać, że w istocie wyższą zawartość kwasu neuraminowego winny posiadać α -globuliny. Bardzo natomiast bliskie rzeczywistych zdają się być wartości uzyskiwane dla α -globulin i albumin. Zwłaszcza te ostatnie, niezależnie od sposobu otrzymywania wykazują dużą stosunkowo czystość.

Znaczne podobieństwo w otrzymywanych wynikach dla kwasu neuraminowego w albuminach i globulinach całkowitych uwydatnia się w podanej niżej tablicy

Tablica 4

Względne wartości %/‰ kwasu neuraminowego we frakcjach białkowych surowicy

Metoda funkcjonowania białek wg	F r a k c j e				Suma	Brak
	Album.	α -glob.	β -glob.	γ -glob.		
Kibricka i in.	25	29	23	12	89	11*
		64				
Duberta i in.	27	44		27	98	2
		71		z częścią β -glob.		
Pillemera i in.	26	73			99	1

* Brakująca ilość odpowiada w przybliżeniu nieuwzględnionej zawartości kw. neuraminowego w mukoproteinach.

Zastanawiająca jest zgodność w wynikach otrzymywanych w niniejszej pracy dla kwasu neuraminowego w albuminach z wynikami uzyskanymi przez Boehma i wsp. [4] przy użyciu przez autorów metody frakcjonowania siarczanem amonu. Autorzy, oznaczając w uzyskanych tą drogą frakcjach: albuminowej i globulin całkowitych kwas neuraminowy, stwierdzili, że 25% całości kwasu neuraminowego mieści się we frakcji albuminowej. Tak znaczną jednakże ilość kwasu neuraminowego w tej frakcji przypisują Boehm i wsp. globulinom obecnym w tej frakcji, którą, jak to wykazały badania elektroforetyczne przeprowadza-

ne przez autorów — otrzymywali w 80% czystości. Przypuszczenie swoje popierają wynikami badań oczyszczonej krystalicznej albuminy (Behring-Werke), w której stwierdzili zaledwie 0,03—0,05 kwasu neuraminowego. Autorzy jednakże nie biorą pod uwagę możliwości, że sam proces oczyszczania albuminowej frakcji może spowodować rozluźnienie wiązania między białkiem a grupami prostetycznymi, tym samym utratę znacznej ilości kwasu neuraminowego. Nie wyjaśniona pozostaje zgodność w wynikach otrzymywanych przez autorów oraz w niniejszej pracy, mimo znacznej różnicy w czystości tych frakcji.

Wnioskom Chatagnonów [6], jakoby frakcja albuminowa nie zawierała kwasu neuraminowego w ogóle, a γ -globulinowa ślady, przeczą badania Uzmann a i wsp. [17], którzy przeprowadzając badania również na drodze elektroforezy bibułowej, znajdują we frakcji albuminowej 0,9%, zaś w γ -globulinowej aż 3% kwasu neuraminowego.

Do podobnych wyników jak Uzmann i wsp. dochodzą Boehm i wsp. [5] odnośnie zawartości kwasu neuraminowego we frakcjach globulinowych, jednakże w albuminowej znajdują jedynie ślady nie dające się oznaczyć. Wyniki podane przez Boehma odnośnie odsetek całości kwasu neuraminowego w poszczególnych frakcjach białkowych surowicy na ogół nie są zgodne z otrzymanymi w niniejszej pracy. Jedynie wartości podane przez autorów dla frakcji β -globulinowej (20,4%) oraz γ -globulinowej (9,4%) są zbliżone do uzyskanych przeze mnie: 23% dla β -glob. i 12% dla γ -globulin (p. frakcje Kibricka). Znaczne różnice w wartościach kwasu neuraminowego w pozostałych frakcjach są zrozumiałe, biorąc pod uwagę użycie zupełnie różnych metod rozdzielania białek.

Przy oznaczaniu kwasu neuraminowego w γ -globulinach oraz mukoproteinach z wyjściowej ilości tylko 1 ml surowicy, wytworzone w czasie reakcji z dwufenyloaminą słabe purpurowo-fioletowe zabarwienie zniknęło podczas chłodzenia próby, przy czym pojawiało się jasno zielone. W przypadkach badań w tym kierunku frakcji otrzymywanych z większej ilości surowicy i hydrolizowania w warunkach, jakie podano w niniejszej pracy, zjawisko to nie występowało. Zielonawa barwa przypuszczalnie zostaje maskowana przez intensywniejszą wówczas purpurowo-fioletową, produktu reakcji kwasu neuraminowego z dwufenyloaminą. Możliwe jest, że inne frakcje białkowe posiadają również składnik dający owo zielone zabarwienie, jednakże przy większej zawartości kwasu neuraminowego właściwej tym frakcjom, jest ono niewidoczne. Jakie substancje obecne w sympleksach białkowych surowicy dają to zielone zabarwienie i czy wywiera ono wpływ na wysokość absorpcji, mimo użycia zielonego filtru, wykażą dalsze badania, które są w toku.

Streszczenie

Oznaczano zawartość kwasu neuraminowego we frakcjach białkowych surowicy otrzymanych metodami: wysalania (Kibrick i wsp.) oraz dwiema metodami wytrącania metanolem (Duberta i wsp. oraz Pillemera i wsp.). Niezależnie od użytej metody frakcjonowania stwierdzono, że 75% zawartości kwasu neuraminowego mieści się we frakcji globulinowej, zaś 25% w albuminowej.

Wśród frakcji rozdzielonych metodą Duberta i wsp., najwyższy bogactwami w kwas neuraminowy okazały się α -globuliny (1,5%) i β -globuliny (1,4%); znacznie niższy odsetek znaleziono w γ -globulinach (0,5%) oraz albuminach (0,3%).

Bardzo wysoki odsetek kwasu neuraminowego stwierdzono w sympleksie pozostałym w roztworze po wytrąceniu kwasem trójchlorooctowym frakcji „albuminy + α -globuliny”, prawdopodobnie mukoproteinie. Frakcja mukoproteinowa wyodrębniona metodą Winzlera i wsp. wykazywała podobny odsetek kw. neuraminowego (9,5%).

Wśród frakcji rozdzielonych metodą Duberta i wsp., najwyższy odsetek kwasu neuraminowego zawierała frakcja „ $\alpha + \beta_1$ -glob.” (2,8%), znacznie niższy „ $\gamma + \beta_2$ -globulinowa” (0,8%), najniższy albuminowa (0,4%). Podobnie niski odsetek kwasu neuraminowego we frakcji albuminowej zawierały albuminy wyodrębnione metodą Pillemera i wsp. (0,4%).

LITERATURA

- [1] Ayala W., Moore L. V., Hess E. D., *J. Clin. Invest* **30**, 781, 1951.
- [2] Blix G., *Z. physiol. Chem.* **240**, 43, 1951.
- [3] Blix G., Lindberg E., Odin L., Werner J., *Nature* **175**, 340, 1955.
- [4] Boehm P., Dauber S., Baummeister L., *Kli. Wo.* **32**, 291, 1954.
- [5] Boehm P., Baummeister L., *Z. physiol. Chem.* **305**, 42, 1956.
- [6] Chatagnon C., Chatagnon P., *Presse Med.* **63**, 1154, 1955.
- [7] Chatagnon C., Chatagnon P., *C. R. Soc. Biol.* **148**, 1226, 1954.
- [8] Chatagnon C., Chatagnon P., *Ann. Biol. Clin.* nr 5—6, 393, 1956.
- [9] Dubert J. M., Slizewicz P., Rebeyrotte P., Macheboeuf M., *Ann. Inst. Past.* **84**, 370, 1953.
- [10] Dżułyńska J., Piekarska Z., *Bull. Acad. Polon. Sci., Cl. II*, **4**, 419, 1956.
- [11] Gajzler R., Piekarska Z., (w przygotowaniu do druku).
- [12] Klenk E., *Z. physiol. Chem.* **268**, 50, 1941.
- [13] Klenk E., Faillard H., Weygand F., Schoene H. H., *Z. physiol. Chem.* **304**, 35, 1956.
- [14] Kibrick A. C., Blonstein M., *J. Biol. Chem.* **176**, 983, 1948.
- [15] Pillemer L., Hutchinson M. C., *J. Biol. Chem.* **158**, 299, 1945.
- [16] Trucco R. E., Caputto R., *J. Biol. Chem.* **206**, 901, 1954.
- [17] Uzman L. L., Rosen H., *Science* **120**, 1031, 1954.
- [18] Weimer H. E., Mehl J. W., Winzler R. J., *J. Biol. Chem.* **185**, 561, 1950.
- [19] Winzler J. R., Devor A. W., Smyth J. M., *J. Clin. Invest.* **27**, 609, 1948.
- [20] Werner J., Odin L., *Acta Soc. Med. Ups.* **57**, 230, 1952.

НЕВРАМИНОВАЯ КИСЛОТА В БЕЛКОВЫХ ФРАКЦИЯХ СЫВОРОТКИ, ПОЛУЧАЕМЫХ ПО МЕТОДАМ ВЫСАЛИВАНИЯ И ОСАЖДЕНИЯ МЕТАНОЛОМ

Резюме

Определялось содержание невраминовой кислоты в белковых фракциях сыворотки, получаемых по разным методам: по методу высаливания Кибрика и сотр., а также Пиллемера и сотр. Независимо от примененного метода фракционирования белков констатировано, что 75% содержания всей невраминовой кислоты находится в глобулиновой фракции, а 25% в альбуминовой.

В числе белковых фракций, получаемых по методу высаливания, наиболее богатыми невраминовой кислотой оказались α -глобулины (1,5%) и β -глобулины (1,4%); значительно более низкий процент обнаружен в γ -глобулинах (0,5%), а также в альбуминах (0,3%).

Очень высокий процент содержания невраминовой кислоты констатировали в симплексе, оставшемся в растворе после осаждения трихлоруксусной кислотой фракций „альбумины + α -глобулины”, по всей вероятности, в мукопротеине. Мукопротеиновая фракция, изолированная по методу Винцлера и сотр. проявляла подобное процентное содержание невраминовой кислоты (9,5%).

В числе белковых фракций изолированных по методу Дюбера и сотр., наиболее высокий процент невраминовой кислоты содержала фракция „ $\alpha + \beta_1$ -глобулиновая” (2,8%), значительно более низкий „ $\gamma + \beta_2$ -глобулиновая” (0,8%), наиболее низкий — альбуминовая (0,4%). Почти такой же низкий процент невраминовой кислоты в альбуминовой фракции содержали альбумины, изолированные по методу Пиллемера и сотр. (0,4%).

NEURAMINIC ACID IN SERUM PROTEIN FRACTIONS OBTAINED BY SALTING OUT AND BY ETHANOL FRACTIONATION

Summary

The content of neuraminic acid was determined in serum protein fractions, obtained after salting out (method of Kibrick *et al.*) or methanol fractionation (method of Dubert *et al.*, resp. Pillemer *et al.*). Irrespective of the fractionation method employed it was found that 75% of the content of neuraminic acid was incorporated in the globulin fraction and 25% in the albumin fraction.

Among the protein fractions, obtained after salting out, the highest percentage of neuraminic acid was found in the α -globulin fraction (1.5%) and β -globulin fraction (1.4%) and significantly lower in γ -globulins (0.5%) and in albumins (0.3%).

A large percentage of neuraminic acid was found in a symplex remaining in solution after precipitation with 5% trichloroacetic acid of the fraction "albumin + α -globulin"; the mentioned symplex is probably a mucoprotein. A mucoprotein fraction, isolated according to the technique of Winzler *et al.*, contained a similar percentage of neuraminic acid as the above mentioned symplex (9.5%).

Among the protein fractions obtained by the Dubert's method, the highest percentage of neuraminic acid contains the " $\alpha + \beta_1$ -globulin" fraction (2.8%), significantly lower the " $\gamma + \beta_2$ -globulins" (0.8%), the lowest the albumin (0.4%).

A similar low percentage 0.4% of neuraminic acid was found in the albumin fraction isolated by the technique of Pillemer *et al.*

Otrzymano 30.1.1957 r.

KAZIMIERZ SPETT

**FOTOMETRYCZNA METODA OZNACZANIA STOPNIA
UTLENOWANIA HEMOGLOBINY W KRWI**

*Z Pracowni Toksykologicznej Instytutu Medycyny Pracy w Zabrze-Rokitnicy
Kierownik Pracowni: Doc. dr Stanisław Józkiwicz*

Wstęp

W związku z badaniami prowadzonymi przez Instytut Medycyny Pracy nad wymianą gazową w pewnych schorzeniach zawodowych oraz u pracowników narażonych na brak tlenu i działanie wysokiej temperatury, okazała się konieczność opracowania szybkiej metody oznaczania wzajemnego stosunku oksyhemoglobiny i hemoglobiny w krwi krążącej. Stosowane do tego celu metody analityczne opierają się głównie na pomiarach gazometrycznych, spektrofotometrycznych i wprowadzanych ostatnio polarograficznych. Pierwsze z nich tj. gazometryczne, wykonywane głównie przy pomocy wolumetrycznego i manometrycznego aparatu van Slyke'a, nie mogą znaleźć zastosowania w warunkach, gdzie chodzi o seryjne badanie większej ilości przypadków, z powodu stosunkowo skomplikowanej techniki analitycznej wymagającej dużo czasu. Trudności te omijają metody spektrofotometryczne, które są najdogodniejsze do omawianych oznaczeń. Użyteczność ich jednak, podobnie jak i metod polarograficznych, ograniczona jest do dobrze wyposażonych pracowni dysponujących odpowiednią aparaturą.

Z tego powodu rozpatrzono w niniejszej pracy możliwość oznaczania oksyhemoglobiny wobec hemoglobiny w świetle nieściśle monochromatycznym i wybrano do tego celu zaopatrzone w filtry barwne fotokolorymetr elektryczny „Ersa”.

Część teoretyczna

Przy pomiarach ekstynkcji fotokolorymetrem zaopatrzonym w filtry barwne wynikają często trudności związane z pomiarem w świetle nieściśle monochromatycznym, gdyż filtry przepuszczają stosunkowo duży

odcinek widma ciągłego, dochodzący niekiedy do kilkudziesięciu $m\mu$. Jeżeli w zakresie przepuszczalności filtru zachodzą ostre przegięcia krzywej absorpcji badanego związku, może wystąpić brak proporcjonalności między jego stężeniem a ekstynkcją, czyli pozorna niezgodność z prawem *Lamberta-Beera* [2, 4]. Jeżeli natomiast krzywa absorpcji badanej substancji posiada przebieg zbliżony do linii równoległej w stosunku do osi zakresu długości fal wybranego przez filtr, wówczas wartości ekstynkcji układają się wg prawa *Lamberta-Beera*.

Jak wynika z pomiarów molarnych współczynników ekstynkcji, warunki takie zachodzą dla oksyhemoglobiny, hemoglobiny i methemoglobiny w czerwonym odcinku widma [1]. Poza tym w omawianym zakresie występują największe różnice w absorpcji między hemoglobina i oksyhemoglobina, a fakt, że methemoglobina nie wykazuje tutaj również ostrych przegięć absorpcji, pozwala na określenie ilości oksyhemoglobiny przy równoczesnej methemoglobinemii, co posiada znaczenie przy równoczesnym działaniu na organizm związków methemoglobinotwórczych.

To rozumowanie stanowiło podstawę do opracowania metody fotometrycznej oznaczania oksyhemoglobiny wobec hemoglobiny i methemoglobiny za pomocą fotokolorymetru „Ersza” przy zastosowaniu filtru czerwonego.

Część doświadczalna

Na podstawie 37 pomiarów ekstynkcji krwi ludzkiej pochodzącej od 10 osobników, rozcieńczanej 0,1% amoniakiem i całkowicie utlenowanej, stwierdzono zgodność z prawem *Lamberta-Beera* dla oksyhemoglobiny przy użyciu filtru czerwonego fotokolorymetru „Ersza” w granicach od 2,13—0,29 g⁰/o HbO₂.

Przez całkowitą redukcję podsiarczynem sodowym (Na₂S₂O₄) oksyhemoglobiny do hemoglobiny i pomiar 35 wartości ekstynkcji roztworów tego barwnika przy pomocy filtru czerwonego, stwierdzono zgodność z prawem *Lamberta-Beera* w granicach od 1,42—0,109 g⁰/o Hb.

Przez całkowite utlenienie oksyhemoglobiny kilkoma kroplami 20% żelazicyjanku potasu (K₃Fe/CN/6) do methemoglobiny i pomiar 24 wartości ekstynkcji roztworów tego barwnika w analogicznych warunkach, stwierdzono zgodność z prawem *Lamberta-Beera* w granicach od 0,854—0,184 g⁰/o HbMet.

Stężenie hemoglobiny całkowitej w omawianych pomiarach oznaczano metodą *Heilmeyera-Sundermanna* [3], stosującej światło monochromatyczne lampy rtęciowej ($\lambda = 578 m\mu$ i $\lambda = 546 m\mu$). Pozwoliło to na wyznaczenie współczynników ekstynkcji przy zastosowa-

Tablica 1

Wyniki pomiarów ekstynkcji (E) i współczynnika ekstynkcji (k_{HbO_2}) dla oksyhemoglobiny przy zastosowaniu filtra czerwonego fotokolorymetru „Ersza“ w odniesieniu do próbek pomiarowych spektrofotometru Collemana

L. p.	g% HbO ₂	E	k_{HbO_2}	f	f^2
1	1,42	0,159	0,112	+ 0,010	0,000100
2	1,074	0,120	0,112	+ 0,010	0,000100
3	0,789	0,0908	0,114	+ 0,012	0,000144
4	0,568	0,0704	0,123	+ 0,021	0,000441
5	0,387	0,051	0,131	+ 0,029	0,000841
6	1,064	0,132	0,124	+ 0,022	0,000484
7	0,79	0,099	0,125	+ 0,023	0,000529
8	0,567	0,068	0,119	+ 0,017	0,000289
9	1,175	0,124	0,105	+ 0,003	0,000009
10	0,877	0,099	0,112	+ 0,010	0,000100
11	0,731	0,082	0,112	+ 0,010	0,000100
12	0,585	0,0658	0,112	+ 0,010	0,000100
13	0,438	0,0498	0,113	+ 0,011	0,000121
14	0,292	0,031	0,106	+ 0,004	0,000016
15	1,17	0,113	0,096	- 0,006	0,000036
16	0,98	0,0938	0,095	- 0,007	0,000049
17	0,78	0,0796	0,101	- 0,001	0,000001
18	0,588	0,060	0,102	0,000	0,000000
19	2,13	0,206	0,096	- 0,006	0,000036
20	1,77	0,170	0,096	- 0,006	0,000036
21	1,42	0,133	0,093	- 0,009	0,000081
22	1,06	0,102	0,096	- 0,006	0,000036
23	0,71	0,063	0,088	- 0,014	0,000196
24	1,608	0,146	0,090	- 0,012	0,000144
25	1,206	0,109	0,090	- 0,012	0,000144
26	0,942	0,0794	0,084	- 0,018	0,000324
27	1,709	0,145	0,084	- 0,018	0,000324
28	1,28	0,115	0,089	- 0,013	0,000169
29	0,96	0,083	0,086	- 0,016	0,000256
30	1,381	0,1324	0,095	- 0,007	0,000049
31	0,69	0,073	0,106	+ 0,004	0,000016
32	1,23	0,111	0,090	- 0,012	0,000144
33	0,615	0,0658	0,107	+ 0,005	0,000025
34	1,24	0,1152	0,092	- 0,010	0,000100
35	0,62	0,0594	0,095	- 0,007	0,000049
36	1,41	0,1418	0,100	- 0,002	0,000004
37	0,705	0,0674	0,095	- 0,007	0,000049
			3,786		0,005642

Tablica 2

Wyniki pomiarów ekstynkcji (E) i współczynnika ekstynkcji (k_{Hb}) dla hemoglobiny przy zastosowaniu filtra czerwonego fotokolorymetru „Ersza“ w odniesieniu do próbek pomiarowych spektrofotometru Colemana

L. p.	g % Hb	E	k_{Hb}	f	f^2
1	1,42	1,458	1,022	+ 0,017	0,000289
2	1,074	1,108	1,036	+ 0,031	0,000961
3	0,789	0,788	1,000	- 0,005	0,000025
4	0,568	0,585	1,028	+ 0,023	0,000529
5	0,387	0,415	1,070	+ 0,065	0,004225
6	0,236	0,2478	1,050	+ 0,045	0,002025
7	0,109	0,0916	0,848	- 0,157	0,024649
8	0,064	1,12	1,030	+ 0,025	0,000625
9	0,79	0,88	1,115	+ 0,110	0,012100
10	0,567	0,600	1,025	+ 0,020	0,000400
11	0,338	0,371	1,095	+ 0,090	0,008100
12	1,175	1,256	1,066	+ 0,061	0,003721
13	0,877	0,901	1,026	+ 0,021	0,000441
14	0,731	0,776	1,058	+ 0,053	0,002809
15	0,585	0,615	1,050	+ 0,045	0,002025
16	0,438	0,431	0,988	- 0,017	0,000289
17	0,292	0,304	1,040	+ 0,035	0,001225
18	0,146	0,180	1,232	+ 0,227	0,051529
19	1,17	1,354	1,158	+ 0,153	0,023409
20	0,98	0,976	0,995	- 0,010	0,000100
21	0,78	0,784	1,005	0,000	0,000000
22	0,588	0,593	1,010	+ 0,005	0,000025
23	0,39	0,390	1,000	- 0,005	0,000025
24	0,19	0,211	1,110	+ 0,105	0,011025
25	1,42	1,33	0,935	- 0,070	0,004900
26	1,06	1,106	1,100	+ 0,095	0,009025
27	0,71	0,649	0,912	- 0,093	0,008649
28	0,35	0,31	0,885	- 0,120	0,014400
29	0,706	0,5818	0,826	- 0,179	0,032041
30	0,72	0,613	0,850	- 0,155	0,024025
31	0,69	0,724	1,048	+ 0,043	0,001849
32	0,615	0,643	1,045	+ 0,040	0,001600
33	0,62	0,571	0,923	- 0,082	0,006724
34	1,41	1,3132	0,815	- 0,190	0,036100
35	0,705	0,606	0,858	- 0,147	0,021609
			35,254		0,311473

niu filtra czerwonego dla wymienionych barwników krwi w odniesieniu do próbek pomiarowych spektrofotometru Colemana, którymi posługiwano się w omawianych doświadczeniach

$$k_{\text{HbO}_2} = 0,102 \pm 0,002$$

$$k_{\text{Hb}} = 1,005 \pm 0,0162$$

$$k_{\text{Hb Met}} = 0,477 \pm 0,00593$$

Poniższe rozumowanie doprowadziło do wyprowadzenia wzoru dla obliczenia procentowej zawartości oksyhemoglobiny w wypadku obecności w badanej próbce krwi wyłącznie HbO₂ i Hb.

Tablica 3

Wyniki pomiarów ekstynkcji (E) i współczynnika ekstynkcji (k_{HbMet}) dla methe-moglobiny przy zastosowaniu filtra czerwonego fotokolorymetru „Ersza“ w odniesieniu do próbek pomiarowych spektrofotometru Colemana.

L.p.	g% HbMet	E	k_{HbMet}	f	f^2
1	0,804	0,387	0,480	+ 0,003	0,000009
2	0,854	0,388	0,452	- 0,025	0,000625
3	0,62	0,31	0,500	+ 0,023	0,000529
4	0,615	0,2658	0,432	- 0,045	0,002025
5	0,69	0,3506	0,507	+ 0,030	0,000900
6	0,803	0,392	0,488	+ 0,011	0,000121
7	0,730	0,365	0,500	+ 0,023	0,000529
8	0,714	0,3638	0,508	+ 0,031	0,000961
9	0,601	0,2906	0,483	+ 0,006	0,000036
10	0,480	0,233	0,485	+ 0,008	0,000064
11	0,400	0,1836	0,457	- 0,020	0,000400
12	0,321	0,1506	0,468	- 0,009	0,000081
13	0,300	0,148	0,493	+ 0,016	0,000256
14	0,200	0,0898	0,497	+ 0,020	0,000400
15	0,705	0,314	0,444	- 0,033	0,001089
16	0,739	0,365	0,494	+ 0,017	0,000289
17	0,657	0,344	0,525	+ 0,048	0,002304
18	0,591	0,300	0,506	+ 0,029	0,000841
19	0,554	0,2798	0,502	+ 0,025	0,000625
20	0,440	0,207	0,470	- 0,007	0,000049
21	0,369	0,1728	0,468	- 0,009	0,000081
22	0,290	0,132	0,455	- 0,022	0,000484
23	0,277	0,118	0,426	- 0,051	0,002601
24	0,184	0,076	0,413	- 0,064	0,004096
			11,453		0,019395

Jeżeli przez E_1 oznaczmy ekstynkcję krwi pobranej z naczynia w warunkach beztlenowych, wówczas będzie ona wypadkową ekstynkcji Hb i HbO₂ zawartej w badanej próbce. Jeżeli następnie roztwór krwi całkowicie utlenujemy i zmierzmy ekstynkcję E_2 , wówczas będzie ona za-

leżna wyłącznie od zawartej HbO_2 . W jednym zatem krańcowym przypadku, gdy krew zawiera wyłącznie Hb, a nie zawiera HbO_2 , stosunek $\frac{E_1}{E_2}$ będzie równy stosunkowi $\frac{k_{\text{Hb}}}{k_{\text{HbO}_2}}$, w drugim natomiast, tj. gdy krew nie zawiera zupełnie Hb, lecz tylko HbO_2 , stosunek $\frac{E_1}{E_2} = 1$.

W wypadku obecności w badanej krwi zarówno HbO_2 jak i Hb, wartość ekstynkcji E_1 (krwi pobranej w warunkach beztlenowych) wyraża się równaniem:

$$E_1 = c_{\text{HbO}_2} \cdot k_{\text{HbO}_2} + (c - c_{\text{HbO}_2}) \cdot k_{\text{Hb}} \quad \dots \quad (\text{I}).$$

Wartość ekstynkcji E_2 (po zupełnym utlenowaniu) wyraża się równaniem:

$$E_2 = c \cdot k_{\text{HbO}_2} \quad \dots \quad (\text{II}),$$

gdzie k_{HbO_2} i k_{Hb} oznaczają współczynniki ekstynkcji HbO_2 i Hb,
 c_{HbO_2} stężenie HbO_2 ,

c — stężenie całkowitej hemoglobiny w roztworze.

Przez podzielenie równania pierwszego przez drugie i podstawienie za

$$\frac{k_{\text{Hb}}}{k_{\text{HbO}_2}} = A \text{ (wartość stała)}$$

$$\frac{E_1}{E_2} = Q$$

otrzymuje się wzór dla wyliczenia % HbO_2 w stosunku do całkowitej hemoglobiny:

$$\% \text{HbO}_2 = 100 \cdot \frac{A - Q}{A - 1} \quad \dots \quad (\text{III}).$$

Na podstawie uzyskanych wyników pomiarów współczynników ekstynkcji przy zastosowaniu filtra czerwonego fotokolorymetru „Ersza” wartość A wynosi:

$$A = \frac{k_{\text{Hb}}}{k_{\text{HbO}_2}} = \frac{1,005}{0,102} = 9,85^1.$$

Po podstawieniu jej we wzorze (III) przybiera on postać

$$\% \text{HbO}_2 = \frac{9,85 - Q}{8,85} \cdot 100.$$

¹ Z powodu braku ściślejszej charakterystyki spektralnej filtrów barwnych fotokolorymetru „Ersza” należy przed rozpoczęciem pomiarów wyznaczyć przy zastosowaniu posiadanych filtrów współczynniki ekstynkcji k_{HbO_2} , k_{Hb} , k_{HbMet} i otrzymane wartości podstawić w wyprowadzonych wzorach ogólnych (III, VIII) dla obliczenia % HbO_2 .

W dotychczasowych rozważaniach przyjęto obecność w krwi badanej tylko HbO₂ i Hb. W niektórych jednak przypadkach spotykamy się z równoległym występowaniem HbMet i w związku z tym dla wyznaczenia % HbO₂ dokonać należy w tej mieszaninie trzech różnych pomiarów. Pomiar pierwszy i drugi wykonuje się analogicznie jak w przypadku obecności tylko HbO₂ i Hb, tj. w warunkach beztlenowych i po zupełnym utlenowaniu. Pomiar trzeci przeprowadza się po zupełnym zredukowaniu podsiarczynem sodowym (Na₂S₂O₄), przy czym redukcji do Hb ulega zarówno HbO₂ jak i HbMet. Z powodu jednak wysokich wartości ekstynkcji jakie daje przy użyciu filtru czerwonego Hb w stosunku do HbO₂ i HbMet o tym samym stężeniu, oraz biorąc pod uwagę optymalny zakres pomiaru fotokolorymetru „Ersza“ wynoszący 0,125—0,7 E, próbkę do trzeciego pomiaru rozcieńcza się przed redukcją równą ilością 0,1% amoniaku.

Wartość ekstynkcji E_1 (krwi pobranej z naczynia w warunkach beztlenowych) wyraża równanie:

$$E_1 = c_{\text{HbO}_2} \cdot k_{\text{HbO}_2} + c_{\text{Hb}} \cdot k_{\text{Hb}} + (c - c_{\text{HbO}_2} - c_{\text{Hb}}) \cdot k_{\text{HbMet}} \quad \text{. . . (IV)}$$

Wartość ekstynkcji E_2 (po utlenowaniu krwi, tj. po przejściu Hb w HbO₂) wyraża równanie:

$$E_2 = (c_{\text{Hb}} + c_{\text{HbO}_2}) \cdot k_{\text{HbO}_2} + (c - c_{\text{HbO}_2} - c_{\text{Hb}}) \cdot k_{\text{HbMet}} \quad \text{. . . (V)}$$

Wartość ekstynkcji E_3 (po rozcieńczeniu próbki 1:2 i redukcji podsiarczynem) wyraża równanie:

$$2 E_3 = c \cdot k_{\text{Hb}} \quad \text{. (VI)}$$

gdzie k_{HbO_2} , k_{Hb} i k_{HbMet} oznaczają współczynniki ekstynkcji

HbO₂, Hb i HbMet,

c_{HbO_2} i c_{Hb} stężenie HbO₂ i Hb,

c — stężenie całkowitej hemoglobiny w roztworze.

Z równań tych wyprowadza się wzór ogólny dla obliczenia % HbO₂ w stosunku do całkowitej hemoglobiny.

$$\% \text{ HbO}_2 = 100 \cdot \left(\frac{E_2}{2 E_3} \cdot \frac{k_{\text{Hb}} - k_{\text{HbMet}}}{k_{\text{Hb}} - k_{\text{HbO}_2}} \cdot \frac{k_{\text{Hb}}}{k_{\text{HbO}_2} - k_{\text{HbMet}}} - \frac{E_1}{2 E_3} \cdot \frac{k_{\text{Hb}}}{k_{\text{Hb}} - k_{\text{HbO}_2}} - \frac{k_{\text{HbMet}}}{k_{\text{HbO}_2} - k_{\text{HbMet}}} \right) \quad \text{. (VII)}$$

Po podstawieniu za

$$\frac{k_{\text{Hb}} - k_{\text{HbMet}}}{k_{\text{Hb}} - k_{\text{HbO}_2}} \cdot \frac{k_{\text{Hb}}}{k_{\text{HbO}_2} - k_{\text{HbMet}}} = B \text{ (wartość stała)}$$

$$\frac{k_{\text{HbMet}}}{k_{\text{HbO}_2} - k_{\text{HbMet}}} = C \text{ (wartość stała)}$$

$$- \frac{k_{\text{Hb}}}{k_{\text{Hb}} - k_{\text{HbO}_2}} = D \text{ (wartość stała)}$$

wzór na obliczenie % HbO₂ przybiera postać:

$$\% \text{ HbO}_2 = 100 \cdot \left(\frac{E_2}{2E_3} \cdot B + \frac{E_1}{2E_3} \cdot D - C \right) \dots \dots \dots \text{(VIII)}$$

Na podstawie uzyskanych wyników pomiarów współczynników ekstynkcji przy zastosowaniu filtru czerwonego fotokolorymetru „Ersza” wartości B, C i D wynoszą:

$$B = \frac{k_{\text{Hb}} - k_{\text{HbMet}}}{k_{\text{Hb}} - k_{\text{HbO}_2}} \cdot \frac{k_{\text{Hb}}}{k_{\text{HbO}_2} - k_{\text{HbMet}}} = \frac{(1,005 - 0,477) \cdot 1,005}{(1,005 - 0,102) \cdot (0,102 - 0,477)} = -1,567,$$

$$C = \frac{k_{\text{HbMet}}}{k_{\text{HbO}_2} - k_{\text{HbMet}}} = \frac{0,477}{0,102 - 0,477} = -1,272,$$

$$D = - \frac{k_{\text{Hb}}}{k_{\text{Hb}} - k_{\text{HbO}_2}} = - \frac{1,005}{1,005 - 0,102} = -1,113.$$

Po podstawieniu ich we wzorze VIII przybiera on postać:

$$\% \text{ HbO}_2 = 100 \cdot \left(1,272 - 1,113 \cdot \frac{E_1}{2E_3} - 1,567 \cdot \frac{E_2}{2E_3} \right).$$

Technika wykonania analizy

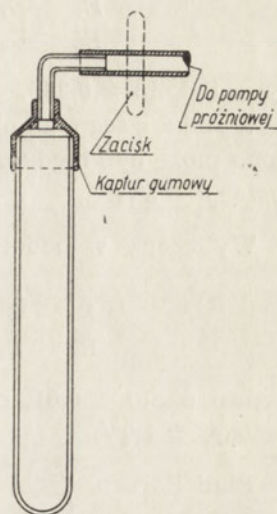
Probówkę pomiarową pojemności około 30 ml napełnia się około 27 ml 0,1% amoniaku, zamyka kapturem gumowym i usuwa powietrze z próbki przez ok. 15—20 min. za pomocą pompy wodnej. Po zamknięciu zacisku i odłączeniu od pompy dokonać można rozcieńczenia krwi. Przy pomocy strzykawki uszczelnionej olejem parafinowym pobiera się około 3 ml krwi z żyły lub tętnicy i natychmiast wstrzykuje się do próbki przygotowanej jw., przebijając igłą kaptur gumowy. Następnie po całkowitej hemolizie dokonuje się pierwszego pomiaru ekstynkcji E_1 przy zastosowaniu filtru czerwonego fotokolorymetru „Ersza”, używając jako odnośnika próbki napełnionej 0,1% amoniakiem. Po dokonaniu pierwszego pomiaru ekstynkcji probówkę otwiera się, część roztworu

krwi odlewa się, a pozostałą wytrząsa się przez 5—7 minut z powietrzem nie zawierającym tlenu węgla. Następnie, po dokonanym w ten sposób utlenowaniu, dokonuje się drugiego pomiaru ekstynkcji E_2 , która to wartość jest niższa od poprzedniej z powodu przejścia Hb w HbO_2 . Pomiar ten można sprawdzić utlenowując jeszcze raz roztwór krwi i jeżeli po tym zabiegu nie spostrzegamy już dalszego spadku ekstynkcji, oznacza to, że Hb jest już w pełni utlenowana. Z użytych wartości ekstynkcji oblicza się iloraz

$$Q = \frac{E_1}{E_2} \quad \text{i po podstawieniu go we wzorze III}$$

wyznacza się % HbO_2 w badanej próbce krwi.

W wypadku możliwości równoległej methemoglobinemii należy dokonać jeszcze jednego pomiaru. W tym celu utlenowaną po drugim pomiarze krew rozcieńcza się dokładnie równą ilością 0,1% amoniaku, a następnie dodaje szczyptę podsiarczynu sodowego ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$), który redukuje HbO_2 i HbMet do Hb. Po redukcji dokonuje się w tej samej co poprzednio próbówce trzeciego pomiaru ekstynkcji E_3 , który można powtórzyć, dodając jeszcze szczyptę podsiarczynu. Jeżeli ekstynkcja po powtórznym dodaniu podsiarczynu nie wzrośnie, oznacza to, że HbO_2 i HbMet uległy całkowicie redukcji do Hb. Po wstawieniu wartości E_1 , E_2 i E_3 do wzoru VIII oblicza się procentową zawartość HbO_2 w badanej krwi.



Rys. 1. Probówka kolorymetryczna z kapturem gumowym i odprowadzeniem do pompy próżniowej

Dyskusja

Analiza błędu omawianej metody uwzględnić musi w przypadku posługiwania się wzorem III błąd powstały przy wyliczeniu $Q = \frac{E_1}{E_2}$. Przy wyznaczaniu % HbO_2 z wzoru VIII błąd pomiaru będzie sumą błędów ilorazów $\frac{E_1}{E_3}$ i $\frac{E_2}{E_3}$.

W celu obliczenia błędów poszczególnych ilorazów ekstynkcji wyznaczono średni błąd wartości średniej odczytu z wzoru

$$F_m = \sqrt{\frac{\Sigma(f^2)}{n \cdot (n-1)}}$$

gdzie $\Sigma(f^2)$ jest sumą kwadratów błędów poszczególnych odczytów, a n ilości odczytów.

Obliczony w ten sposób błąd pomiaru dla fotokolorymetru „Ersza” wynosi około $\pm 0,005$.

Wobec powyższego błąd ilorazu $\frac{E_1}{E_2}$ wyliczony z wzoru

$$\frac{E_1}{E_2} = \frac{E_1}{E_2} \pm \frac{1}{(E_2)^2} \cdot \sqrt{(E_2)^2 \cdot (F_m)^2 + (E_1)^2 \cdot (F_m)^2}$$

wynosi około $\pm 0,255$.

Wynika z tego, że przy posługiwaniu się wzorem (III) wartość Q obarczona może być błędem $\pm 0,255$, co powoduje błąd w ocenie $\%$ HbO₂ wynoszący $\pm 3\%$.

Wyliczony w podobny sposób błąd ilorazu $\frac{E_1}{E_3}$

$$\frac{E_1}{E_3} = \frac{E_1}{E_3} \pm \frac{1}{(E_3)^2} \cdot \sqrt{(E_3)^2 \cdot (F_m)^2 + (E_1)^2 \cdot (F_m)^2}$$

wynosi około $\pm 0,01$, co spowodować może błąd w ocenie $\%$ HbO₂ wynoszący $\pm 1,0\%$.

Błąd ilorazu $\frac{E_2}{E_3}$

$$\frac{E_2}{E_3} = \frac{E_2}{E_3} \pm \frac{1}{(E_3)^2} \cdot \sqrt{(E_3)^2 \cdot (F_m)^2 + (E_2)^2 \cdot (F_m)^2}$$

wynosi około $\pm 0,01$, co spowodować może błąd w ocenie $\%$ HbO₂ wynoszący $\pm 1,5\%$.

Suma ilorazów $\frac{E_1}{E_3} + \frac{E_2}{E_3}$ obarczyć zatem może wyniki metody polegającej na wyznaczaniu trzech ekstynkcji błędem w ocenie $\%$ HbO₂ wyliczonym z wzoru

$$\frac{E_1}{E_3} + \frac{E_2}{E_3} \pm \sqrt{1^2 + 1,5^2} = \pm 1,8\%$$

Jak wynika z powyższego rozumowania, ocena stopnia utlenowania hemoglobiny dokonana może być z błędem $\pm 3\%$ HbO₂ w przypadku wykonywania dwóch pomiarów ekstynkcji. Przez wykonanie jeszcze jednego pomiaru błąd oceny stopnia utlenowania Hb zmniejsza się do około $\pm 2\%$ HbO₂.

Opisaną metodę fotometryczną sprawdzono na próbkach krwi pochodzącej od 11 osobników, wysyczonej tlenem w różnym stopniu. Stopień utlenowania hemoglobiny oznaczano gazometrycznie manometrycznym aparatem van Slyke'a oraz fotometrycznie przy zastosowaniu obydwu podanych modyfikacji. Wyniki pomiarów przedstawia tablica 4.

Tablica 4

Wyniki pomiarów stopnia utlenowania hemoglobiny manometrycznym aparatem Van Slyke'a i metodą fotometryczną przy zastosowaniu filtru czerwonego fotokolorymetru „Ersza”

L. p.	%HbO ₂		
	Van Slyke	Fotometr „Ersza”	
		Modyfikacja I	Modyfikacja II
1	98,3	97,5	98,9
2	93,9	93,3	93,0
3	101,2	98,7	99,1
4	78,3	78,9	78,5
5	65,7	62,4	63,5
6	60,0	58,35	58,1
7	72,0	69,5	68,2
8	51,0	49,4	49,0
9	80,0	76,7	77,9
10	83,6	83,0	84,4
11	68,7	69,5	67,4

Streszczenie

Opracowano metodę fotometryczną oznaczania stopnia utlenowania hemoglobiny w krwi, dostosowaną do fotokolorymetru elektrycznego „Ersza”. W metodzie tej wykorzystano duże różnice w absorpcji między Hb, HbO₂ i HbMet w zakresie przepuszczalności filtru czerwonego. Opracowano dwie modyfikacje metody. Pierwszą z nich stosuje się w przypadku obecności w badanej krwi tylko HbO₂ i Hb, druga pozwala na oznaczenie % HbO₂ przy równoczesnej methemoglobinemii.

Podano wzory ogólne (III, VIII) dla wyznaczenia % HbO₂ w obydwu przypadkach i sposób wyprowadzenia wzorów szczegółowych w zależności od właściwości spektralnych filtru czerwonego.

LITERATURA

- [1] Brugsch J., *Hämoglobin der rote Blutfarbstoff*, Arbeitsgem. Med. Verl. Georg Thieme, Leipzig, 1950.
- [2] Heilmeyer L., *Medizinische Spektrophotometrie*, Verl. Gustav Fischer, Jena, 1933.
- [3] Heilmeyer L., Sundermann A., *Dtsch. Arch. Klin. Med.* **178**, 397, 1936.
- [4] Kortüm G., *Kolorimetrie. Photometrie und Spektrometrie*, Springer Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg 1955.
- [5] Küster F., *Logarytmiczne tablice analityczne*, P. W. T. Warszawa, 1952.

ФОТОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ СТЕПЕНИ НАСЫЩЕНИЯ КИСЛОРОДОМ ГЕМОГЛОБИНА В КРОВИ

Резюме

Разработан фотометрический метод определения степени насыщения кислородом гемоглобина в крови, позволяющий применить электрический фотоколориметр ЭРША. В этом методе были использованы большие разницы в абсорбции между Hb, Hb₂ и Hb Met в пределах пропускания красного фильтра. Разработаны две модификации метода. Первая из них применяется в случаях наличия в крови только HbO₂ и Hb, вторая позволяет определить % HbO₂ при одновременной метгемоглобинемии.

Приводятся общие формулы (III, VIII) для определения % HbO₂ в обоих случаях и способ выведения подробных формул в зависимости от спектральных особенностей красного фильтра.

EINE PHOTOMETRISCHE METHODE ZUR BESTIMMUNG DES VERHÄLTNISSSES DES OXYHÄMOGLOBINS ZUM GESAMTHÄMOGLOBIN IM BLUT

Zusammenfassung

Es wurde eine photometrische Methode zur Bestimmung des prozentuellen Anteils von HbO₂ zum Gesamthämoglobin im Blut mit dem lichtelektrischen Kolorimeter „Ersza“ beschrieben. Die Methode gründet sich an die grossen Absorptionsdifferenzen zwischen Hb, HbO₂ und HbMet im Bereich der Durchlässigkeit des roten Filters. Es wurden zwei Modifikationen bearbeitet. Die erste wird bei der Anwesenheit von HbO₂ und Hb in dem untersuchten Blut angewandt, die zweite erlaubt die Bestimmung % HbO₂ auch bei gleichzeitiger Anwesenheit von HbMet.

Es wurden allgemeine Gleichungen (III, VIII) zur Abrechnung von % HbO₂ in beiden Fällen angegeben so wie der Weg zur Ausführung spezieller Gleichungen je nach den spektralen Eigenschaften des roten Filters.

Otrzymano 31.1.1957 r.

J. W. SZARKOWSKI

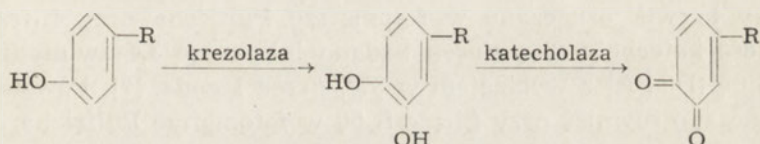
AKTYWOWANIE TYROZYNAZY Z ZIAREN ŻYTA

Z Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie

Zakład Biochemii Ewolucyjnej

Kierownik: Prof. dr I. Mochnacka

W działaniu tyrozynazy można rozróżnić dwa rodzaje aktywności: jedna to utlenianie monofenoli, jak tyrozyna, p-krezol, na odpowiednie 3,4-dwuhydroksypochoodne, oraz druga, to utlenianie o-dwuhydroksyfenoli na chinony. Obie te czynności bada się zwykle na układach modelowych używając najczęściej p-krezolu jako substratu dla aktywności monofenolazowej, a katecholu dla aktywności polifenolazowej. Stąd potocznie nazywa się obie te aktywności tyrozynazy odpowiednio krezolazową i katecholazową.



W badaniach nad oddychaniem cytochromowym i chinonowym u roślin zająłem się tyrozynazą w ziarnach żyta. Zauważyłem przy tym, że wyciągi z ziaren starych — w miesiąc po zbiorze lub więcej, mają obie czynności tyrozynazy, zaś wyciągi z ziaren świeżych (do tygodnia po zbiorze) mają czynność tylko katecholazową a zupełnie nie mają krezolazowej.

Część doświadczalna

Do doświadczeń używałem ziaren żyta (*Secale cereale*, Żyto Włoszankowskie)¹. Jako świeże określam ziarna badane w okresie około tygodnia po zbiorze, jako stare ziarna — leżące co najmniej miesiąc po zbiorze. Ze względu na znaną powszechnie wrażliwość krezolazy na zabiegi prowa-

¹ Żyto otrzymaliśmy z majątku „Sosnowiec” dzięki uprzejmości Administracji.

dzące do oczyszczenia enzymu, używałem nieoczyszczonych wyciągów wodnych z ziaren. 0,5 g ziaren rozcierano z piaskiem i wodą w moździerzu porcelanowym chłodzonym lodem, sączono przez watę szklaną i przesącz wirowano 5 min. przy 6000 obr./min. w temp. 2°. Płyn z nad osadu sączono przez filtr Seitza i przejrzysty przesącz (uzupełniony do 50 ml wodą) o pH 7 używano bezpośrednio do doświadczeń.

Tablica 1

Aktywność krezolazowa i katecholazowa tyrozynazy w ziarnach żyta

Wyciąg wodny z :	Substrat	$E_{1\text{ cm}}$
1) ziaren starych	p-krezol	0,30
	DOPA	0,10
2) ziaren świeżych	p-krezol	0,00
	DOPA	0,10

5 ml wyciągu wodnego ziaren, 1 ml roztworu wodnego p-krezolu (5 mg) lub DOPA (1,5 mg), 2 ml wody. Inkubacja w 37°, 24 godz. dla p-krezolu, oraz 1 godz. dla DOPA. Powstanie barwika mierzono przyrostem ekstynkcji (E).

Jako substrat do badania czynności krezolazowej stosowano p-krezol inkubując go z wyciągiem z ziaren w 37°, przez 24 godz. [7]. Powstały czerwony barwik oznaczano w fotometrze Pulfricha przy filtrze S 50. Aktywność katecholazową ziaren badano inkubując 3,4-dwuhydroksyfeniloalaninę (DOPA) z wyciągiem w 37°, przez 1 godz. [7]. Powstały barwik oznaczano również przy filtrze S 50 w fotometrze Pulfricha. W obydwu przypadkach do drugiego naczynka fotometru dawano wyciąg, do którego zamiast substratu dodawano odpowiednią ilość wody.

W tablicy 1 podano jeden z typowych wyników doświadczeń nad czynnością tyrozynazy w ziarnach żyta świeżych i starych. Widać wyraźnie, że świeże ziarna mają taką samą aktywność katecholazową jak i stare, natomiast nie posiadają zupełnie czynności krezolazowej. Czynność ta pojawia się dopiero przy ich przechowywaniu.

Ponieważ w czasie procesu dojrzewania ziaren zbóż obserwowano znaczny wzrost procesów proteolitycznych [1], nasunęło mi się przypuszczenie, że pojawienie się aktywności krezolazowej w dojrzewającym ziarnie może mieć podobny mechanizm proteolitycznego „odmaskowania“, jaki znamy w zaczynach trawiennych. Dla sprawdzenia tej hipotezy wykonałem szereg doświadczeń wprowadzając trypsynę jako czynnik proteolityczny. Użyta trypsyna była preparatem handlowym B. D. H., jednostki enzymu oznaczyłem według B a u m a n n a w pH 7 [2]. Do wycią-

gów z ziaren inkubowanych z p-krezolem dodawałem trypsynę, jedno z takich doświadczeń podane jest w tablicy 2.

Dodanie trypsyny do wyciągów ze świeżych ziaren żyta powoduje powstanie aktywności krezolazowej takiego rzędu jak w ziarnach starych. Trypsyna zwiększa aktywność krezolazową w starych ziarnach. W próbach kontrolnych, w których inkubowano tylko trypsynę z p-krezo-

Tablica 2

Wpływ trypsyny na aktywność krezolazową ziaren żyta

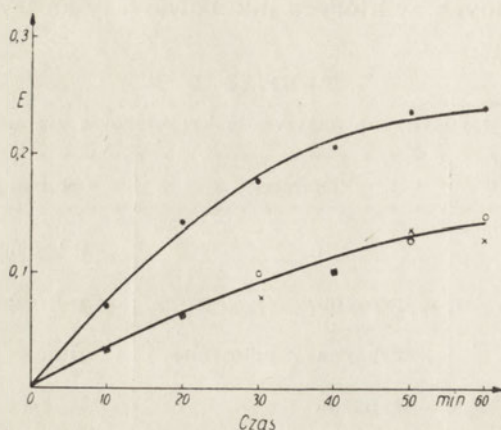
Wyciąg wodny z:	Dodatek	Substrat	$E_{1\text{ cm}}$
ziaren starych	0	p-krezol	0,30
ziaren starych	trypsyna	p-krezol	0,45
ziaren starych	trypsyna zagotowana	p-krezol	0,32
ziaren starych	trypsyna	0	0,00
0	trypsyna	p-krezol	0,00
ziaren świeżych	0	p-krezol	0,00
ziaren świeżych	trypsyna	p-krezol	0,46
ziaren świeżych	trypsyna zagotowana	p-krezol	0,00
ziaren świeżych	trypsyna	0	0,00
0	trypsyna	p-krezol	0,00

5 ml wyciągu z ziaren, 1 ml roztworu p-krezolu (5 mg), 2 ml roztworu trypsyny (50 jedn. B a u m a n n a). Inkubacja w 37°, 24 godz. W próbach kontrolnych odpowiedni roztwór zastąpiony wodą.

lem, nie powstał barwik, nie powstał on również w kontrolach z ziarnami świeżymi, w których trypsynę uprzednio inaktywowano przez ogrzanie. Pojawienie się zatem aktywności krezolazowej w wyciągach ze świeżych ziaren jest następstwem działania enzymatycznego trypsyny.

W dalszym ciągu badałem czy trypsyna ma jakiś wpływ również i na aktywność katecholazową wyciągu. Wykonałem następujące doświadczenia: 5 ml wyciągu wraz z 2 ml roztworu trypsyny (50 jedn.) inkubowano w 37° przez 24 godziny pod toluenem, po czym dodawano 1 ml roztworu DOPA (1,5 mg) i mierzono powstawanie barwika co 10 min. w ciągu 1 godziny. Do porównania służyły dwie próby, jedna składająca się z 5 ml wyciągu świeżo przygotowanego, 1 ml roztworu DOPA i 2 ml wody; i dru-

ga o takim samym składzie, tylko że wyciąg z ziaren trzymany był uprzednio przez 24 godziny w 37°. Szybkość powstawania barwika w takich doświadczeniach podana jest na rys. 1. Jak widać z krzywych, inkubacja samego wyciągu przez 24 godz. w 37° powoduje zmniejszenie aktywności



Rys. 1

- — ● Aktywność katecholazowa wyciągu bezpośrednio po przygotowaniu
- x — x Aktywność katecholazowa wyciągu przetrzymywanego przez 24 godz. w temp. 37°
- — ○ Aktywność katecholazowa wyciągu trawionego trypsyną przez 24 godz. w 37°

Skład doświadczenia w tekście. Absorbencję mierzono w warstwie 5 cm

katecholazowej o około 30% w stosunku do aktywności świeżo sporządzonego wyciągu. Inkubowanie wyciągu z trypsyną przez 24 godz. nie ma wpływu na aktywność katecholazową.

Dyskusja

W przedstawionych badaniach stwierdziłem, że wyciąg z ziaren żyta bezpośrednio po zbiorze wykazuje czynność katecholazową tyrozynazy, przy braku czynności krezolazowej. Czynność krezolazowa w wyciągach z takich ziaren pojawia się pod działaniem trypsyny. Ziarna starsze wykazują od razu obie czynności tyrozynazy. Interpretacja tych faktów zależy od tego, którą z teorii dwoistego działania tyrozynazy weźmiemy za podstawę rozważań.

Teoria dualistyczna o istnieniu dwóch różnych enzymów: monofenolazy czyli tyrozynazy, oraz polifenolazy czyli DOPA-oksydazy [3, 9] została na ogół zarzucona, ponieważ nikomu nie udało się rozdzielić tych czynności między odrębne frakcje białkowe. Chociaż więc ta teoria mogłaby w najprostszy sposób wytłumaczyć zaobserwowane przez nas fakty, nie bierzemy jej pod uwagę.

Więcej zwolenników ma utrzymująca się do dziś teoria unitarna, która obie czynności przypisuje jednemu enzymowi, który zasadniczo ma charakter polifenolazy, zaś monofenole utlenia przy współdziałaniu katalitycznych ilości o-dwuhydroksyfenoli [8]. Podobnie Keilin i Mann [4] przyjmują przy utlenianiu monofenoli działanie katalityczne jakiegoś czynnika dodatkowego, prawdopodobnie o-dwufenolu. Ta teoria, która zresztą ostatnio znalazła licznych przeciwników [6], nie daje nam podstaw do wytłumaczenia obserwowanych faktów.

W obecnym stanie rzeczy najdogodniejszą podstawę dla naszej hipotezy roboczej stanowi koncepcja Kendala [5]. Kendal stoi na stanowisku, że tyrozynaza jest pojedynczym enzymem lub kompleksem enzymatycznym posiadającym dwa niezależne centra aktywności dla monoi dwufenoli. Początkowa nieczynność centrum dla monofenoli w ziarnie tłumaczyłaby się zablokowaniem odpowiednich grup w enzymie. Fakt, że zablokowanie ustępuje pod działaniem trypsyny, wskazywałby na białkowy lub peptydowy charakter inhibitora. Znikanie hamowania przy dojrzewaniu ziarna zbiega się w sugestywny sposób z natężeniem procesów proteolitycznych w tym okresie. Gdybyśmy wyobrazili sobie inhibitor w postaci „maseczki” peptydowej związanej z grupami czynnymi centrum dla aktywności krezolazowej, to byśmy mieli zupełną analogię z uczynnianiem np. chymotrypsynogenu przez trypsynę.

Streszczenie

1. Wyciągi wodne z ziaren żyta w jeden tydzień po zbiorze wykazują jedynie czynność katecholazową (polifenolazową) tyrozynazy, brak zaś czynności krezolazowej (monofenolazowej).

2. W wyciągach z takich ziaren można ujawnić czynność krezolazową działaniem trypsyny.

3. Wyciągi z ziaren starszych (od 4 tygodni i więcej) wykazują obie czynności tyrozynazy, pod wpływem trypsyny czynność krezolazowa zwiększa się.

4. Autor tłumaczy zaobserwowane fakty na podstawie teorii Kendala o dwóch centrach aktywności tyrozynazy, przyjmując, że w świeżych ziarnach centrum krezolazowe jest zablokowane peptydem lub białkiem.

LITERATURA

- [1] Bach A., Oparin A., Wöhner R., *Biochem. Z.* **180**, 363, 1927.
- [2] Bamann E., Myrbäck K., *Die Methoden der Fermentforschung*, Georg. Thieme Verlag, Leipzig 2991, 1941.
- [3] Graubard M., Nelson J. M., *J. Biol. Chem.* **112**, 135, 1935.
- [4] Keilin D., Mann T., *Proc. Roy. Soc. B*, **125**, 187, 1938.
- [5] Kendal L. P., *Biochem. J.* **44**, 442, 1949.
- [6] Mallette M. F., Lewis S., Ames S. R., Nelson J. M., Davson C. R., *Arch. Biochem.* **16**, 288, 1948.
- [7] Mayer A. M., *Enzymologia* **16**, 277, 1954.
- [8] Pugh C. E. M., *Biochem. J.* **23**, 456, 1929.
- [9] Pugh C. E. M., *Biochem. J.* **24**, 1442, 1930.

АКТИВИРОВАНИЕ ТИРОЗИНАЗЫ ИЗ ЗЕРЕН РЖИ

Резюме

1. Водные вытяжки из зерен ржи, спустя неделю после уборки, проявляют лишь катехолазную (полифенолазную) активность тирозиназы, при отсутствии крезолазной (монофенолазной) активности.

2. В вытяжках из таких зерен можно обнаружить крезолазную активность посредством действия трипсина.

3. Вытяжки из старших зерен (4-недельных и более) проявляют обе активности тирозиназы (под влиянием трипсина усиливается крезолазная активность).

4. Автор объясняет обнаруженные факты, опираясь на теории Кендаля с двумя центрами активности тирозиназы и принимая, что в сырых зернах крезолазный центр блокирован пептидом или белком.

THE ACTIVATION OF RYE SEED TYROSINASE

Summary

1. The aqueous extracts of rye seeds, a week after the harvest, exhibit only the catecholase (polyphenolase) activity of the tyrosinase and no cresolase activity.

2. The cresolase activity of such extracts may be demonstrated by treating them with trypsin.

3. The extracts of the seeds, four weeks or more after the harvest, exhibit both activities of tyrosinase, the cresolase activity being increased by trypsin.

4. The observed facts can be explained on the basis of Kendal's theory of two centres of tyrosinase activity. In the fresh seeds the cresolase centre would be masked by a peptide or protein.

Otrzymano 2.2.1957 r.

I. REIFER i D. KLECKOWSKA

**BADANIA NAD BIOSYNTEZĄ ALKALOIDÓW W ŁUBINIE
WĄSKOLISTNYM**
(*LUPINUS ANGUSTIFOLIUS*)

Z Pracowni Biochemii Roślin Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN
Kierownik Pracowni: Prof. dr I. Reifer

Celem naszej pracy było określenie miejsca syntezy lupaniny i hydroksylupaniny w łubinie wąskolistnym oraz przebadanie wpływu takich czynników na wytwarzanie tych alkaloidów jak: różne źródła i poziomy azotu, stężenie sacharozy w pożywce. Te zagadnienia wchodzące w zakres biogenezy alkaloidów usiłowano wyświecić stosując hodowlę zarodków i ich organów, jak korzeni, części podliścieniowych i pączków *in vitro* w warunkach sterylnych.

Mothes i Kretschmer [1] hodując w warunkach sterylnych izolowane wierzchołki korzeni kiełkujących nasion łubinu wąskolistnego zaobserwowali, że kultury korzeniowe syntetyzują alkaloidy. Nasze wstępne doświadczenia z roku 1955 nie potwierdziły jednak tego spostrzeżenia. Mothes w osobistym doniesieniu zakomunikował nam, że i on nie zdołał powtórzyć swoich wyników.

Ponieważ w toku pracy stwierdziliśmy, że obecność liścieni warunkuje syntezę alkaloidów w zarodku, przeprowadzono również doświadczenia z zarodkami, których nie pozbawiono całkowicie liścieni oraz z zarodkami, hodowanymi na pożywce White'a z dodatkiem: a) nie naruszonego liścienia, b) miazgi liścienia oraz c) przegotowanego wyciągu liścienia.

Część doświadczalna

W doświadczeniach stosowano pożywkę White'a [4]. Przy wprowadzaniu dodatkowych związków doprowadzano odczyn pożywki do pH 5,7—6,0. Pożywkę w ilości 15 ml przenoszono do próbek o średnicy 1,2 cm, uprzednio mytych ciepłą wodą z mydłem, popłukanych wodą de-

stylowaną i wysuszonych. Równocześnie umieszczano w probówkach watę szklaną, pełniącą rolę mechanicznej podpory dla kultur. Po zamknięciu probówek korkami z waty wyjąławiano pożywkę w aparacie Kocha w trzech po sobie następujących dniach po 30 minut.

Zarodki i ich organy izolowano z nasion uprzednio sterylizowanych i moczonych. Sterylizację nasion łubinu przeprowadzano przez płukanie ich w nasyconej wodzie bromowej przez 3 minuty. Następnie przemywano je starannie sterylną wodą destylowaną i moczano w wodzie w płytkach Petriego przez 20—48 godzin w temp. 25°. Izolowania zarodków i ich organów dokonywano w specjalnym pomieszczeniu w szafce Hansena w obecności lampy kwarcowej. Sterylnym skalpelem przecinano łupinę nasienia, podważano zarodek (jeżeli jednocześnie miały być usunięte liście), a następnie w całości lub odcięte jego organy przenoszono przy pomocy sterylnej pincety do próbówki z pożywką. Długość izolowanych zarodków wynosiła ok. 10 mm, a poszczególnych organów: korzeni ok. 2 mm, części podliścieniowych ok. 5 mm, pączków ok. 2 mm. Kultury hodowano w temp. 25° i zależnie od wymagań hodowli umieszczano je w ciemności lub na świetle. Po upływie określonego czasu (3—37 dni) oznaczano w nich zawartość alkaloidów.

Materiał roślinny rozcierano dokładnie w moździerzu porcelanowym z piaskiem wydymowym, oczyszczonym stężonym kwasem solnym i wodą, i ekstrahowano alkoholem etylowym 96% (4-krotnie po ok. 5 ml). Wyciąg alkoholowy sączono przez sączek z bibuły filtracyjnej do zlewki i po słabym zakwaszeniu odparowano we wrzącej łaźni wodnej. Pozostałość rozpuszczano w ok. 5 ml wody z dodatkiem 1 ml 0,1 N kwasu siarkowego i przenoszono ilościowo do rozdzielacza. Wyciąg wodny alkalizowano 0,5 ml nasyconego roztworu węgla sodowego i wytrząsano za pomocą 10 ml chloroformu. Ekstrakcję chloroformem powtarzano jeszcze trzykrotnie stosując po 5 ml rozpuszczalnika. Wyciągi chloroformowe przenoszono do drugiego rozdzielacza i wytrząsano trzykrotnie porcjami po ok. 7 ml 0,2 N kwasu siarkowego. Kwaśny wyciąg wodny alkaloidów przenoszono ilościowo do kolby miarowej. W zależności od zawartości alkaloidów w próbie stosowano rozcieńczenia do objętości od 25—1000 ml. Do analizy pobierano 5 ml roztworu. Oznaczenia dokonywano w dwóch powtórzeniach. Alkaloidy oznaczano metodą kolorymetryczną Reifera i Niziołka [2].

Omówienie wyników

Wstępne badania wykonano na izolowanych wierzchołkach korzeni kiełkujących nasion łubinu. Kultury te hodowano na pożywce White'a przez okres od 3—33 dni. Wyniki przedstawiono w tablicy 1 (L. p. 1—6).

W izolowanych korzeniach nie zaobserwowano przyrostu bezwzględnej ilości alkaloidów, jakkolwiek świeża masa kultur po upływie 33 dni wzrosła 9-krotnie. Izolowane wierzchołki korzeniowe nie są zatem w stanie produkować alkaloidów i to bez względu na to, czy źródłem azotu są azotany lub sole amonowe. Dowodzą tego wyniki przedstawione w tablicy 1 (L. p. 7—11).

Tablica 1

Zawartość alkaloidów w kulturach wierzchołków korzeniowych łubinu hodowanych na pożywce White'a w obecności różnych źródeł i poziomów azotu

L.p.	Warunki hodowli*	Wiek kultur w dniach	Ilość badan. kultur	Świeża masa w mg/kult.	Bewzględna zawartość alkaloidów w $\mu\text{g}/\text{kult.}$		
					Hydroksylupaina	Lupanina	Suma alkaloidów
1	K	0	30	5	8,0	5,5	13,5
2	P	3	10	7	1,8	3,0	4,8
3	„	6	10	13	1,8	3,0	4,8
4	„	18	5	43	3,8	2,0	5,8
5	„	27	5	45	5,1	3,8	8,9
6	„	33	7	47	4,4	3,5	7,9
7	K	0	10	8	8,9	12,0	20,9
8	P+KNO ₃ 800 mg/l	14	4	35	0,0	3,5	3,5
9	„ „	38	8	56	3,2	2,3	5,5
10	P+CH ₃ COONH ₄ 150 mg/l	17	6	36	9,3	9,7	19,0
11	„ „	42	6	62	2,2	7,1	9,3

* K — kontrola

P — pożywka White'a

Przebadano również wpływ niektórych aminokwasów, takich jak lizyna, arginina i glicyna na zawartość alkaloidów w wierzchołkach korzeni (tabl. 2). Lizynę, będącą hipotetycznym prekursorem alkaloidów łubinu [3], dodawano do pożywki w postaci chlorowodoru L (+)-lizyny w ilości 50, 100 i 500 mg/l, chlorowodorek L (—)-argininy w ilości 50 mg/l, glicynę 200 mg/l. Jednak i w tych doświadczeniach nie wykazano przyrostu bezwzględnej zawartości alkaloidów. Hodowla w ciemni wierzchołków korzeniowych na pożywce ze zmniejszoną ilością sacharozy dała podobne rezultaty.

W celu określenia miejsca syntezy alkaloidów przeprowadzono z kolei badania na całych zarodkach i ich organach: na korzeniach, częściach podłścieniowych i pączkach (tabl. 3, L. p. 1—9). Po upływie 6 dni nie wykazano syntezy alkaloidów nie tylko w izolowanych korzeniach, lecz rów-

niez w pozostałych izolowanych organach zarodków. Bezwzględna zawartość alkaloidów w korzeniach i częściach podliścieniowych nie odbiega od wartości wyjściowej. Również kultury pączków 20-dniowych nie wy-

Tablica 2

Zawartość alkaloidów w wierzchołkach korzeniowych hodowanych na pożywce White'a w obecności niektórych aminokwasów

L.p.	warunki hodowli*	Wiek kultur w dniach	Ilość badan. kultur	Świeża masa w mg/kult.	Bezwzględna zawartość alkaloidów w μg /kulturę		
					Hydroksylupanina	Lupanina	Suma
1	K	0	10	10	4,5	2,7	7,2
2	P + lizyna 50 mg/l	9	8	66	0,9	6,8	7,2
3	" " "	17	9	122	4,2	2,5	6,7
4	" " 100 mg/l	3	10	8	0,0	2,7	2,7
5	" " "	6	10	15	0,9	2,2	3,1
6	" " 500 mg/l	3	10	7	0,0	2,2	2,2
7	" " "	6	10	20	0,8	3,3	4,1
8	P + arginina	10	6	50	0,0	3,1	3,1
9	K	0	10	5	9,0	12,4	21,4
10	P + glicyna	16	5	30	0,0	3,2	3,2

* K — kontrola

P — pożywka White'a

kazały przyrostu alkaloidów, co pozwoliło nam przypuszczać, że pozbawienie zarodków liścieni uniemożliwia syntezę tych związków. W celu potwierdzenia słuszności takiego wnioskowania założono hodowlę zarodków, których nie pozbawiono całkowicie liścieni. Po upływie 6 i 16 dni analizowano jednak tylko zarodki, liścienie przed analizą usuwano i nie oznaczano w nich zawartości alkaloidów. Wyniki przedstawiono w tablicy 3, L. p. 10—16. Widać z nich, że istotnie obecność liścieni warunkuje przyrost bezwzględnej zawartości alkaloidów w zarodku. Przyrost ten jest proporcjonalny do pozostawionych przy zarodku części liścieni.

Dla wyjaśnienia, czy w danych warunkach zachodzi tylko translokacja alkaloidów z liścieni do zarodka, czy również ich biosynteza, założono hodowlę zarodków z nie oddzieloną połówką liścienia. Tym razem oznaczono oddzielnie zawartość alkaloidów zarówno w zarodkach jak i w połówkach liścieni. Równocześnie przebadano wpływ 4 aminokwasów: DL(—)-metioniny, L(—)-cysteiny i cystyny i L(+)-lizyny, dodanych do pożywki w ilości 330 mg/l. Wyniki przedstawiono w tablicy 4. Jak widać z danych liczbowych, zawartość alkaloidów w zarodkach hodowanych na pożywce White'a przez 13 dni wzrosła prawie 25-krotnie. Pozostaje ona

Tablica 3

Biosynteza alkaloidów w izolowanych zarodkach i ich organach hodowanych na pożywe White'a w ciemności

L.p.	Badany materiał	Wiek kultur w dniach	Ilość badanych kultur	Świeża masa w mg/kult.	Bezwzględna zawartość alkaloidów wyrażona w $\mu\text{g/kulturę}$		
					Hydroksylupanina	Lupanina	Suma
1	Zarodki pozbawione obu liścieni	0	20	17	1,4	20,2	21,6
2	"	6	12	165	3,3	15,3	18,6
3	Korzenie zarodków	0	20	4	1,2	2,1	3,3
4	"	6	15	57	0,0	4,2	4,2
5	Części podliścieniowe zarodków	0	20	8	1,7	6,4	8,1
6	"	6	16	103	0,0	9,0	9,0
7	Pączki zarodków	0	20	4	0,0	6,0	6,0
8	"	6	20	29	0,3	3,0	3,3
9	"	20	7	105	0,0	6,2	6,2
10	Kontrola	0	20	17	6,4	13,0	19,4
11	Zarodki pozbawione obu liścieni	6	10	123	0,0	17,6	17,6
12	"	16	18	126	4,6	12,2	16,8
13	Zarodki pozbawione 1,5 liścienia	6	9	312	0,0	342,2	342,2
14	"	16	10	470	60,4	280,0	340,4
15	Zarodki pozbawione 1 liścienia	6	9	495	79,9	573,3	653,2
16	"	16	7	973	98,7	617,1	715,8

proporcjonalna do przyrostu świeżej masy. W liścieniach zaobserwowano znaczny spadek alkaloidów. Świadczy to o istnieniu translokacji alkaloidów z liścienia do zarodka. Jednak ilość alkaloidów w zarodku jest co najmniej dwukrotnie wyższa od ilości wydzielonej z liścienia. Jest to dowód na to, że w danych warunkach doświadczalnych zachodzi również synteza alkaloidów. Dodanie do pożywki metioniny, cysteiny, cystyny i lizyny pozostaje bez wpływu na zwiększenie intensywności tej syntezy.

Wracając do zagadnienia określenia miejsca syntezy alkaloidów założono hodowlę izolowanych organów zarodków z nie oddzielną połówką liścienia. Jak wynika z danych przedstawionych w tablicy 5, obecność liścienia warunkuje przyrost alkaloidów zarówno w korzeniu i części podliścieniowej jak i w pączku zarodka. Liścień pozostawiony w łączności z pączkiem zarodka syntetyzuje również alkaloidy (tabl. 5, L. p. 6—10).

Na podstawie wyżej omówionych wyników można przypuszczać, że w liścieniach są zlokalizowane prekursorzy alkaloidów. Postanowiono przebadać niektóre własności tych związków. Wykonano doświadczenia z zarodkami, pozbawionymi całkowicie liścienia, które hodowano na pożywce White'a z dodatkiem nie naruszonego lub zmiażdżonego liścienia. Liścienie bądź wyjaławiano wraz z pożywką w aparacie Kocha, bądź po uprzedniej sterylizacji nasyconą wodą bromową przenoszono w warunkach sterylnych do sterylnej pożywki. Jak wynika z tablicy 6, zarodki rozwijające się na pożywce z dodatkiem liścienia syntetyzują alkaloidy. Z liścieni poddanych sterylizacji w aparacie Kocha cała lub prawie cała

Tablica 4

Wpływ niektórych aminokwasów na biosyntezę alkaloidów w zarodkach z nie oddzieloną połówką liścienia, hodowanych na pożywce White'a na świetle

Ilość badanych roślin = 8-10

Wiek kultur — 14 dni

Kontrola (K) — po 0 dniach

L. p.	Warunki hodowli*	Materiał badany*	Świeża masa w mg/kult.	Bezwzględna zawartość alkaloidów w $\mu\text{g}/\text{kul.}$			Synteza alkaloidów w $\mu\text{g}/\text{roślin.}$
				Hydroksylupanina	Lupanina	Suma	
1	K	Z	19	2,9	14,0	16,9	
		$\frac{1}{2}$ L	78	0,0	380,0	380,0	
2	P	Z	440	0,0	460,0	460,0	279,1
		$\frac{1}{2}$ L	75	0,0	216,0	216,0	
3	P+metionina	Z	389	113,0	316,0	429,0	202,5
		$\frac{1}{2}$ L	64	10,4	170,0	180,4	
4	P+cysteina	Z	381	169,0	285,0	454,0	290,7
		$\frac{1}{2}$ L	84	33,0	200,0	233,6	
5	P+cystyna	Z	390	79,7	350,0	429,7	219,9
		$\frac{1}{2}$ L	70	29,6	157,5	187,1	
6	P+lizyna	Z	368	72,0	350,0	422,0	204,1
		$\frac{1}{2}$ L	63	21,5	157,5	179,0	
7	K	Z	28	1,2	12,0	13,2	
		$\frac{1}{2}$ L	81	0,0	272,0	272,0	
8	P	Z	356	143,0	292,0	435,0	311,8
		$\frac{1}{2}$ L	86	56,4	106,0	162,4	
9	P+cysteina	Z	444	110,2	333,0	443,2	346,8
		$\frac{1}{2}$ L	100	59,2	130,0	189,2	

* Z — zarodek

$\frac{1}{2}$ L — połówka liścienia

P — pożywka White'a

Tablica 5

Wpływ obecności nie oddzielonej połówki liścienia na zawartość alkaloidów w izolowanych organach zarodka

L.p.	Materiał badany*	Wiek kultur w dniach	Ilość badanych kultur	Świeża masa w mg	Bezwzględna zawartość alkaloidów w μg			Przyrost alkaloidów w $\mu\text{g}/\text{kult.}$
					Hydroksylupanina	Lupanina	Suma	
1	Z $\frac{1}{2}$ L	0	10	18	1,5	12,0	13,5	0,0
				81	0,0	272,0	272,0	
2	Z $\frac{1}{2}$ L	14	10	350	115,4	292,0	407,4	279,3
				86	51,4	106,0	157,4	
3	K + cz. podl. $\frac{1}{2}$ L	0	10	10	1,8	4,0	5,8	0,0
				81	0,0	272,0	272,0	
4	K + cz. podl. $\frac{1}{2}$ L	14	7	403	50,8	308,6	359,4	235,9
				86	0,0	154,3	154,3	
5	P _a $\frac{1}{2}$ L	0	10	—	1,0	3,8	4,8	0,0
				81	0,0	272,0	272,0	
6	P _a $\frac{1}{2}$ L	14	8	122	18,5	119,0	137,5	163,1
				170	87,2	224,0	311,2	
7	K + cz. podl. $\frac{1}{2}$ L	0	11	11	5,6	3,8	9,4	0,0
				61	104,1	177,1	281,2	
8	K + cz. podl. $\frac{1}{2}$ L	13	9	298	242,2	128,8	371,0	183,7
				58	36,7	66,6	103,3	
9	P _a $\frac{1}{2}$ L	0	20	—	0,0	2,8	2,8	0,0
				61	104,1	177,1	281,2	
10	P _a $\frac{1}{2}$ L	13	9	82	39,3	87,1	126,4	142,5
				125	164,6	135,5	300,1	

* Z — zarodki

K + cz. podl. — korzeń wraz z częścią podliścieniową zarodka

P_a — pączek zarodka

$\frac{1}{2}$ L — $\frac{1}{2}$ liścienia

L.p. 1-6 — I doświadczenie

L.p. 7-10 — II doświadczenie

zawartość alkaloidów przechodzi do pożywki. Jednak ilość alkaloidów w pożywce jest wyższa od ilości alkaloidów zawartej w liścieniach kontrolnych. Można zatem przypuszczać, że biosynteza alkaloidów zachodzi w badanych warunkach niezależnie od tego, czy sterylizowany liścień jest nie naruszony lub zmiądzony. W przypadku liścieni przeniesionych do pożywki w warunkach sterylnych (tabl. 6, L. p. 5—7, 10) alkaloidy przenikają do pożywki jedynie z liścieni zmiądzonych. Oddzielone od

Tablica 6

Biosynteza alkaloidów w obecności oddzielonego liścienia (liścień nie naruszony lub zmiążdżony (L, Lz), liścień nie naruszony lub zmiążdżony sterylizowany w aparacie Kocho (LS, LzS), wyciąg z liścienia (Lw)), dodawanego do hodowli zarodków na pożywce White'a

Wiek kultur — 16 dni

Kontrola (K) — po 0 dniach

L. p.	Warunki hodowli	Materiał badany*	Ilość badan. kultur	Świeża masa w mg/kult.	Średnia zawartość alkaloidów w 1 próbówce w μg			Przyrost alkaloidów w μg
					Hydroksylupanina	Lupanina	Suma	
1	K	Z	20	22	5,6	20,0	25,6	0,0
		L	20	183	72,4	612,0	684,4	
2	P	Z	18	125	9,2	16,4	25,6	0,0
		P			0,0	0,0	0,0	
3	P+LS	Z	10	127	62,4	228,0	290,4	503,6
		LS	5	184	0,0	0,0	0,0	
		P			283,2	640,0	923,2	
4	P+LzS	Z	12	102	43,2	148,0	191,2	470,4
		LzS	6	176	0,0	29,2	29,2	
		P			273,6	686,4	960,0	
5	K	Z	20	22	5,6	20,0	25,6	0,0
		L	20	154	41,0	488,0	529,0	
6	P+L	Z	16	156	27,6	107,0	134,6	614,5
		L	8	826	334,5	700,0	1034,5	
		P			0,0	0,0	0,0	
7	P+Lz	Z	17	140	50,4	200,0	250,4	891,8
		Lz	9		63,4	190,0	253,4	
		P			208,3	734,3	942,6	
8	K	Z	20	13	10,6	12,8	23,4	0,0
		L	22	180	405,0	916,2	1321,2	
		L	22	162	420,2	901,8	1322,0	
9	P+LS	Z	20	85	10,6	132,0	142,6	574,8
		LS	20	177	0,0	7,2	7,2	
		P			790,0	980,0	1770,0	
10	P+L	Z	14	155	19,4	52,0	71,4	449,2
		L	14	365	922,8	800,0	1722,8	
		P			0,0	0,0	0,0	
11	K	Z	20	20	7,2	20,0	27,2	0,0
		Lw			198,6	684,0	882,6	
12	P+Lw	Z	8	115	71,0	220,0	291,0	157,5
		Lw			301,8	571,2	873,0	
13	K	Z	20	13	10,6	12,8	23,4	0,0
		Lw			450,0	840,0	1290,0	
14	P+Lw	Z	15	81	82,8	56,0	138,8	87,4
		Lw			562,0	700,0	1262,0	

* Z — zarodek, P — pożywka White'a

W doświadczeniach L.p. 1—7 w próbówce znajdują się 2 zarodki, 1 liścień i 15 ml pożywki

L.p. 8—10 w próbówce znajdują się 2 zarodki, 2 liścienie i 15 ml pożywki

L.p. 11—14 w próbówce znajdują się 2 zarodki i 15 ml wyciągu z liścieni

reszty rośliny liścienie nie naruszone zanurzone w pożywce na wacie szklanej, syntetyzują również alkaloidy.

Równoległe z powyższymi doświadczeniami założono hodowlę izolowanych zarodków na wyciągu wodnym z liścieni (tabl. 6, L. p. 11—14). Liścienie rozcierano w moździerzu porcelanowym z piaskiem wydmowym i ekstrahowano pożywką White'a. Po zagotowaniu wyciąg odwirowano i przenoszono do probówek, a następnie poddano sterylizacji w aparacie Kocha. Zarodki hodowane na tak sporządzonym wyciągu syntetyzują alkaloidy. Istnieją zatem wskazówki, że prekursorzy alkaloidów zlokalizowane w liścieniu ekstrahują się do pożywki i że są to związki termostabilne. Dalsze badania nad tym zagadnieniem są w toku.

Streszczenie

1. Poszczególne organy zarodków lubinu wąskolistnego, jak korzenie, części podliścieniowe i pączki hodowane na pożywce White'a nie wykazują syntezy alkaloidów.

2. Poszczególne organy zarodków z liścieniem nie oddzielonym hodowane w warunkach identycznych wykazują znaczny przyrost alkaloidów.

3. Stwierdzono translokację alkaloidów z liścieni do zarodka.

4. Zarodki pozbawione liścieni hodowane na pożywce White'a z dodatkiem liścienia nie naruszonego lub zmiażdżonego oraz na wyciągu z liścienia wykazują również syntezę alkaloidów.

5. Istnieją wskazówki, że prekursorzy alkaloidów w pierwszym okresie rozwoju rośliny zlokalizowane są w liścieniach. Byłyby to związki termostabilne, ekstrahujące się do pożywki i umożliwiające syntezę alkaloidów w zarodku.

LITERATURA

- [1] Mothes K., Kretschmer D., *Naturwiss.* 33, 26, 1946.
- [2] Reifer I., Niziołek S., *Acta Biochim. Polon.* 4, nr 3, 1957.
- [3] Schöpf C., *Naturwiss.* 38, 186, 1951.
- [4] White P. R., *A Handbook of Plant Tissue Culture*, The Ronald Press Company, New York 1943.

ИССЛЕДОВАНИЯ БИОСИНТЕЗА АЛКАЛОИДОВ В УЗКОЛИСТНОМ ЛЮПИНЕ *LUPINUS ANGUSTIFOLIUS* L.

Резюме

1. Отдельные органы зародышевой узколистной люпина, как корни, подсемядольные части и почки, культивируемые на питательной среде Уайта, не обнаруживают синтеза алкалоидов.

2. Отдельные органы зародышей с неотизолированной семядолей, культивированные в идентичных условиях, обнаруживают значительный прирост алкалоидов.

3. Констатировано перемещение алкалоидов из семядолей в зародыш.

4. Зародыши лишённые семядолей культивированные на питательной среде Уайта с примесью неповрежденной или сокрушенной семядоли и на вытяжке из семядоли тоже обнаруживают синтез алкалоидов.

5. Имеются указания, что прекурсоры алкалоидов, в первой стадии развития растения, локализируются в семядолях. Эти прекурсоры несомненно термостабильные соединения, экстрагирующиеся в питательную среду Уайта и создающие возможность синтеза алкалоидов в зародыше.

INVESTIGATIONS INTO BIOSYNTHESIS OF ALKALOIDS IN *LUPINUS ANGUSTIFOLIUS*

S u m m a r y

1. Detached organs of the plant embryo of *Lupinus angustifolius* such as roots, connecting tissue between the cotyledon and the root, and the buds cultured in sterile conditions on the White medium do not synthesise alkaloids.

2. Plant organs cultured as above but with the cotyledon attached show a marked increase in the content of the alkaloids.

3. The translocation of alkaloids from the cotyledon to the plant embryo has been established.

4. Plant embryos grown on the White medium with the cotyledon detached, but in the presence of the separated cotyledon either whole, minced or in the form of its boiled and filtered extract also synthesise the alkaloids.

5. There is evidence that the alkaloid precursors in the early stages of plant growths are localised in the cotyledon. These precursors would be thermostable, soluble in the White medium and made available for the various organs of the plant embryo in the biosynthesis of alkaloids.

Otrzymano 12.3.1957 r.