

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

ACTA  
BIOCHIMICA POLONICA

K W A R T A L N I K

T O M   V  
Z e s z y t   2

W A R S Z A W A   1 9 5 8  
P A Ń S T W O W E   W Y D A W N I C T W O   N A U K O W E

## KOMITET REDAKCYJNY

Tadeusz Korzybski, Irena Mochnacka, Włodzimierz Mozołowski

## RADA REDAKCYJNA

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

## ADRES REDAKCJI:

Warszawa, Pałac Kultury i Nauki, XXV piętro, pokój 2512

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE — DZIAŁ CZASOPISM  
Warszawa 1, Młodowa 10

Nakład 824 + 96	Oddano do składania 4.III.58
Ark. wyd. 9,25, ark. druk. 8,625	Podpisano do druku 26.V.58
Papier druk sat. 80 g 70x100 III kl	Druk ukończono w czerwcu 1958
Cena zł 25.—	Zamówienie 99

Warszawska Drukarnia Naukowa, Warszawa, śniadeckich 8

M. WIERZUCHOWSKI \*)

## ZAPOCZĄTKOWANIE WYSYCANIA GLIKOZA SPOCZYWAJĄCEGO PSA A ROZMIARY JEGO CIAŁA

W pierwszych kilkudziesięciu minutach jednostajnego dowozu glikozy przez żyłę, ku-sercowo, stężenie tego cukru we krwi wzmaga się szczególnie gwałtownie, dopóki nie rozwiną się w pełni siły, które doprowadzają do usuwania go ze krwi. W obecnych badaniach za tego rodzaju zapoczątkowujący okres dowozu glikozy uznano jego pierwsze 30 minut.

Mogłoby się zdawać, że odcinek ten ze względu na swą burzliwą dynamikę i brak ustalenia się którejkolwiek z dróg usuwania glikozy nie będzie się nadawał do ujęcia ilościowego. Jednak z wielu powodów należało sprawdzić, jaka łączność istnieje między nim a dalszym przebiegiem zjawisk podczas jednostajnego wysycania glikozą [27—34].

Zastosowano najprostszy sposób badania, a mianowicie oznaczano przyrost stężenia glikozy w tym samym zbiorniku, do którego bezpośrednio ją wprowadzano, to jest we krwi. Jako szczególnego narzędzia pracy, które miało ułatwić rozbiór zjawisk, użyto rozległego widma prędkości dopływu cząsteczek glikozy.

Okazało się, że stosunek między chyżością dowozu podłoża a wywołanym przez nie stężeniem jego we krwi posiada znaczną prawidłowość w zastosowanych warunkach badania i nastrocza wytyczne dla przewidywania losu glikozy podczas dalszych okresów jej dowozu. W ten sposób zapoczątkowujący okres dowozu nabiera znaczenia w rozpatrywaniu całości kształtu zachowania się węglowodanów w ustroju.

### POSTĘPOWANIE DOŚWIADCZALNE

Przygotowanie zwierząt (psów ♀) [29], sposób wprowadzania roztworu glikozy i nastawianie systematyczne jego stężenia w ten sposób, by nie doszło do odwodnienia [31], oraz przyrządy, używane do jednostajnych

\*) Adres prywatny autora: Łódź, ul. Narutowicza 54 m. 3.

wlewań, opisano już poprzednio [31, 33]. Cukier we krwi określano metodą żelazicyjankową [35], cukier w moczu polarymetrycznie z częstą kontrolą przy pomocy metody redukcyjnej Bertranda.

W obecnym doniesieniu wnioski są oparte na pomiarach cukru we krwi szczególnie w dwóch punktach: tuż przed dowozem glikozy oraz dokładnie, albo prawie dokładnie, w połowie pierwszej godziny jej dowozu. Istnieje konieczność bardzo ścisłego przestrzegania czasu tego drugiego oznaczenia, gdyż w pierwszej półgodzinie dowozu prędkość zwiększania się stężenia glikozy we krwi na minutę ciągle się zmienia. Już niekiedy pobranie krwi w 27 minucie, a nawet w 29 minucie podwyższało zmianę minutową stężenia glikozy we krwi, podczas gdy pobranie jej w parę minut po 30 minucie dowozu obniżało ją, szczególnie przy prędkościach dowozu niższych, niż 5—6 g na kg/godz. W paru przypadkach uratowano wynik przy pomocy interpolacji, która wymaga jednak doświadczenia.

Źródłem nieregularności w krzywej cukru we krwi mogły się stać chwile, w których dopełniano roztworem cukru naczynia pomiarowe przyrządu wlewającego. Pobieranie próbek krwi powinno być od takich chwil oddalone.

Wyniki były tym regularniejsze, im bardziej troskliwa, bezustanna i bezpośrednia była opieka badającego nad danym zwierzęciem, im bardziej dbano, by zwierzę spożyło cały wyznaczony posiłek o określonej porze i im bardziej stałe były warunki, w których je trzymano.

Przeważnie nie zbierano oddzielnie moczu dla pierwszej półgodziny dowozu glikozy, lecz tylko dla całej pierwszej godziny. Niemniej uznano za pożyteczne podanie łącznej godzinnej wartości cukromoczu, choć jest ona wyższa, niż dla samej pierwszej półgodziny. Daje jednak pojęcie o czynności nerki w tym okresie doświadczalnym.

Powierzchnię ciała psa ( $P$  w  $m^2$ ) i wskaźnik stanu odżywienia ( $WO$ ) obliczano według wzoru Cowgill'a i Drabkina [5b]. We wzorze  $W$  oznacza wagę ciała w gramach,  $D$  — długość ciała w cm. Pomiar długości ciała wykonywano na zwierzęciu wyprostowanym, leżącym na boku, przy pomocy suwmiarki odpowiedniej wielkości. Oznaczano liniową odległość między końcem nosa a brzegiem otworu odbytowego. Wynik pomnożony przez  $10^{-4}$  dawał powierzchnię ciała w  $m^2$ :

$$P = \left[ 6,67 \cdot W^{0,7} \cdot \frac{0,34}{\sqrt[3]{W}} \right] \cdot 10^{-4}.$$

Wskaźnik stopnia odżywienia jest oparty na zasadzie „pelidisi“ Pirquet'a, jako stosunek wagi ciała w gramach do długości ciała jakby w położeniu siedzącym zwierzęcia:

$$WO = \frac{\sqrt[3]{W}}{D}$$

Według przytoczonych autorów *optimum* wskaźnika dla psa wynosi od 0,29—0,31. Poniżej tego pasa wartości zwierzęta miały w przybliżeniu wagę niższą, niżby to odpowiadało *optimum* dla danej długości nosowo-odbytowej, a więc były wychudzone, zaś powyżej tego pasma wskaźnika posiadały wagę zbyt wysoką, a więc były otyłe. Przy wytyczeniu *optimum* sąd autorów był oparty tylko na wzrokowej ocenie zasobu tkanki tłuszczowej, a nie na sprawdzianach bardziej ścisłych. Nie można więc tego *optimum* przyjąć, jako miary ścisłej, lecz tylko jako wartość przybliżoną, orientacyjną.

Osobniki badane były wszystkie dojrzałymi mieszającami (♀). Nie odznaczały się somatotypową przewagą jakiegoś typu budowy ciała. Były klinicznie prawidłowe. Trzymano je przez szereg miesięcy przed doświadczeniem w klatkach metabolicznych, bez sposobności do większych wysiłków fizycznych. Nie wykazywały nagromadzeń płynu zewnątrzkomórkowego (obrzęków). W tych warunkach, z pewną ostrożnością, można przypisać wybitniejsze obniżenie się wskaźnika odżywienia mniejszej zawartości tkanki tłuszczowej, a wybitniejszy jego przyrost ponad górną granicę *optimum* nagromadzeniu się tejże tkanki [14].

Dawkowanie glikozy powinny się odbywać na jednostkę tkanki, biorącej udział w przetwarzaniu glikozy. Substancje, odkładane zewnątrz lub wewnątrz komórek, nie powinny być brane w rachubę przy dokładnym dawkowaniu glikozy, które bierze pod uwagę tylko jej przetwarzanie. Do tych ciał należą: tkanka kostna zewnątrzkomórkowa, tłuszcz, woda i glikogen. Z tych ciał przede wszystkim wchodzi w rachubę tłuszcz.

Skoro jednak nie można było stosować dawkowania na jednostkę tkanki przetwarzającej, należało z tego wybrnąć ugodowo przez dawkowanie na jednostkę ustroju o pewnej przeciętnej zawartości ciał odkładanych, mieszczącej się w ramach przeciętności somatotypowej, w ramach *optimum* stanu odżywienia, w obrębie wpływu takiej samej diety. Dlatego przy wszystkich prawie wartościach podano wskaźnik odżywienia, który pomoże ocenić każdą wartość z osobna, oprócz tego również wagę, powierzchnię i temperaturę ciała, zmierzoną w odbyticy. Jeżeli w wykresach brak jakiejś danej, oznacza to, że nie wykonano jej pomiaru.

#### STOSOWANE DIETY

Dieta mieszana nr 1 zawierała na kg wagi ciała na dobę 10,9 g skrobi, 4,2 g tłuszczu, 3,2 g białka, łącznie 96,5 kcal. W diecie tej 46,3% ciepła było pokryte przez węglowodany, 40,0% przez tłuszcze, a reszta

przez białko. Tłuszcz zaspokajał więc dość znaczną część potrzeb kalorycznych. U szeregu zwierząt, które otrzymywały tę dietę, oznaczano podstawową spoczynkową wytwórczość cieplną. Dieta pokrywała podstawowy wydatek cieplny w 232<sup>0</sup>/<sub>0</sub>, czyli 132<sup>0</sup>/<sub>0</sub> ponad poziom podstawowy. Dla zwierząt mało ruchliwych mogła być nieco przekarmiająca. Podawano ją w całości, w dawce jednorazowej, o stałej godzinie. Zwierzęta spożywały ją same. Zawierała nieco mniej, niż 1 g soli kuchennej na kg wagi ciała na dobę, czyli więcej, niż się podaje w zwyczajnych, znajdujących się w handlu pokarmach dla psów. W przyszłości zastosuje się w tej diecie mniejszą dawkę NaCl. Skład diety: kaszy jęczmiennej 150 g, marchwi 100 g, pietruszki 50 g, mięsa końskiego 100 g, smalcu wieprzowego 40 g, soli kuchennej 10 g, wysuszonych kości 30 g, na 10 kg wagi ciała na dobę. Pokarm gotowano krótko.

*Dieta mieszaną nr 2* podawano przez zgłębnik żołądkowy jednemu tylko zwierzęciu, Andro. Posiadała ona tę zaletę, że chwila jej całkowitego podania była dokładnie stale ta sama i cały posiłek w ciągu niewielu minut dostawał się do żołądka. Znajdowało się w niej na kg wagi ciała na dobę: 9,7 g skrobi, 2,1 g tłuszczu, 1,5 g białka, łącznie 65,7 kcal. W pokryciu kalorycznych potrzeb węglowodany stanowiły 60,4<sup>0</sup>/<sub>0</sub>, tłuszcze 30,1<sup>0</sup>/<sub>0</sub>, resztę zaś białko. Podstawowa spoczynkowa wytwórczość cieplna tego osobnika, oznaczona pomiarami wymiany gazowej, była zaspokajana przez tę dietę w 161<sup>0</sup>/<sub>0</sub>, czyli zawierała ona 61<sup>0</sup>/<sub>0</sub> nadwyżki ponad potrzeby podstawowe. Nie dodawano do niej NaCl. Dodawano po 2,3 g kości suszonych na kg wagi ciała. Przy prawie tej samej zawartości węglowodanów, co dieta nr 1, zawierała ona tylko połowę zawartości tłuszczów i białek diety nr 1. Przyjęto, że obie diety były wchłaniane w jelicie całkowicie. Skład: kaszy jęczmiennej 250 g, serca wołowego 50 g, smalcu wieprzowego 30 g, na zwierzę o przeciętnej wadze 17,4 kg. Pokarm rozgotowany był w stanie półpłynnym.

#### ZASTOSOWANE SYMBOLE ORAZ OBLICZENIA

Przez  $C$  oznaczano stężenie cukru, przez  $C_k$  — stężenie jego we krwi pełnej, wyrażone w mg/100 ml krwi. Naczynie, z którego pobrano krew, oznaczano początkowymi literami łacińskiej nazwy danego naczynia, umieszczonymi po  $k$  u dołu litery  $C$ , a więc  $C_{k_{vj}}$  oznacza stężenie cukru we krwi *V. jugularis ext.* Czas pobrania próbki krwi zaznaczono u góry  $C$  po prawej stronie. Tam również umieszczano odcinek czasu, w ciągu którego mierzono zmianę stężenia cukru we krwi. Grecką literą  $\Delta$  określano

różnicę między jednym a drugim poziomem cukru we krwi w badanym odcinku czasu. W ten sposób najczęściej używany symbol  $\Delta C_{kvj}^{0'-30'}$  jest zmianą stężenia cukru we krwi żyły jarzmowej zewnętrznej pomiędzy punktem zero doświadczenia, czyli jego początkiem, a końcem 30 minuty jego trwania, połączonego z jednostajnym dowozem glikozy.

Jak poprzednio [29] obliczano prędkość przetwarzania glikozy według wzoru:

$$V_a = \frac{I - E - 2W(C_{k(n+1)} - C_{kn})}{P}$$

$V_a$  jest prędkością przetwarzania glikozy w g/godz. na  $m^2$  powierzchni ciała ( $P$ ),  $I$  oznacza ilość glikozy dostarczanej dożylnie w g/godz. na całe zwierzę,  $E$  — wydalanie glikozy z moczem w danym odcinku doświadczenia w g/godz. na całe zwierzę,  $C_{kn}$  jest stężeniem cukru we krwi w mg/100 ml na początku danej godziny dopływu glikozy, zaś  $C_{k(n+1)}$  — na końcu rozpatrywanej godziny.

Stałe dla równań obliczano metodą najmniejszych kwadratów [17]. Stałą  $b_p$  dla równania prostej, przechodzącej przez skrzyżowanie osi współrzędnych osiągnano z wzoru:

$$b_p = \frac{\sum [(\Delta C_{kvj}^{0'-30'}/t) \cdot (V_i)]}{\sum (V_i)^2}$$

Podobnie obliczano stałe  $b_w$ ,  $b_{w3.4}$  i  $b_{w0.73}$ .

Stałe  $a$  i  $b'_p$  dla równania prostej, nie przechodzącej przez skrzyżowanie współrzędnych, otrzymywano z dwóch wzorów:

$$\sum (\Delta C_{kvj}^{0'-30'}/t) = a \cdot n + b'_p \cdot \sum V_i,$$

$$\sum [(\Delta C_{kvj}^{0'-30'}/t) \cdot (V_i)] = a \cdot \sum V_i + b'_p \cdot \sum (V_i)^2.$$

Znak  $V_i$  wyraża prędkość dowozu glikozy na  $m^2$ /godz.,  $\Delta C_{kvj}^{0'-30'}/t$  — zmianę stężenia cukru we krwi (glikozy) na minutę w mg/100 ml, zaś symbol  $n$  określa liczbę wykonanych doświadczeń.

Dla oceny rozsiewu poszczególnych oznaczeń użyto zwyczajnych sposobów statystycznych [23], a mianowicie odchylenia wzorcowego

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n - 1}}, \text{ oraz współczynnika zmienności } = \frac{100 \cdot \sigma}{\bar{x}},$$

$x$  oznacza poszczególne oznaczenie, zaś  $\bar{x}$  — średnią oznaczeń.

## WYNIKI

## 1. Początkowy przyrost minutowy cukru we krwi u pierwszej grupy psów prawidłowych

## Przykład obliczeń

Przykład obliczenia początkowej zmiany minutowej stężenia cukru we krwi na psie Ordo. podano w tablicy 1. Stężenie cukru we krwi *V. jugularis ext.* tuż przed dowozem glikozy ( $C_{kvj}^{0'}$ ) odejmowano od stężenia cukru we krwi w połowie pierwszej godziny dowozu glikozy z różnymi prędkościami ( $C_{kvj}^{30'}$ ) i dzielono przez liczbę minut ( $t$ ), która upłynęła od chwili rozpoczęcia jednostajnego dowozu. W ten sposób otrzymywano różnicę w poziomach cukru we krwi, przypadającą na jedną minutę dowozu pomiędzy chwilą jego rozpoczęcia a jego 30 minutą:

$$(C_{kvj}^{30'} - C_{kvj}^{0'})/t = \Delta C_{kvj}^{0'-30'}/t.$$

Zasadniczo wartość  $\Delta C_{kvj}^{0'-30'}/t$  nazwano „zmianą” minutową, a nie „przyrostem” minutowym, gdyż tylko w pierwszych 30 minutach dowozu glikozy wartość ta jest zawsze dodatnia, a więc jest przyrostem. Natomiast w dalszych okresach dowozu może się ona stać ujemna i wtedy jest „ubytkiem” (por. rys. 6). Nazwa musi więc zawierać jedną i drugą możliwość. Przyjęto, że różnica między stężeniem wstępnym cukru we krwi, a stężeniem jego w połowie pierwszej godziny dowozu, praktycznie biorąc, oznacza przyrost stężenia czystej glikozy we krwi, co jest tylko tymczasowym założeniem. W obecnych badaniach rozważano niemal wyłącznie tylko 30-minutowy odcinek początkowego okresu dowozu, dlatego prawie równie dobrze można było przyjąć, jako wartość miarodajną, półgodzinny przyrost glikozy we krwi w tym okresie, co też zaznaczono na rysunkach po ich prawej stronie.

Dane w tablicy 1 odznaczają się tym, że badane zwierzę nie tylko znajdowało się w pasie *optimum* wskaźnika odżywienia, ale jeszcze w dodatku niemal dokładnie w połowie tego pasma (przeciętny wskaźnik odżywienia 0,298). Stosownie do omówionego uprzednio punktu widzenia zwierzę to posiadało więc przeciętne stężenie tkanki czynnej przetwórczo oraz przeciętne stężenie ciał odkładanych, prawdopodobnie nieczynnych bezpośrednio przetwórczo. Z tego względu dawkowanie glikozy mogło być uznane umownie za poprawne, a wyniki za wzorcowe.

W miarę wzrostu dowozu glikozy na jednostkę powierzchni, czy też wagi ciała wzmagają się początkowe zmiany minutowe stężenia glikozy we krwi. Gdy je wykreślić w układzie dwóch prostokątnych współrzędnych na osi rzędnych w stosunku do prędkości dowozu,  $V_i$ , wyznaczonej



Tablica 1

Przykład obliczenia stałych dla doświadczeń na osobniku Ordo. (♂). Długość ciała 73,56 cm. Podstawowa wytwórczość ciepła w okresie pobierania krwi wstępnej ( $C_{kvj}^0$ ) 33,92 kcal na  $m^2/godz$ , z wahaniami odsetkowym  $\pm 4,72\%$ . Podstawowy całkowity iloraz oddechowy 0,721, pozabiałkowy iloraz oddechowy 0,707. Tłuszcz zaś pokrywał 87% podstawowej wytwórczości cieplnej, resztę zaś białko. Wlewanie glikozy rozpoczęto w 24 godziny po ostatnim dobowym posiłku. Dieta nr 1

Kolejność doświadczeń	Waga ciała kg	Powierzchnia ciała $m^2$	Wskaźnik odżywienia	Temperatura w odbytnicy	Dowóz glikozy w g na godz na			Cukier we krwi		Różnica $\Delta C_{kvj}^{0'-30'}$ mg/100 ml	Początkowa zmiana minutowa stężenia glikozy we krwi, $\Delta C_{kvj}^{0'-30'}/t$ mg/100 ml na min	Stałe			Glikoza w moczu, pierwsza godzina g na $m^2/godz$
					$\frac{I}{W}$	$\frac{I}{W^{3/4}}$	$\frac{I}{P}$	$C_{kvj}^{0'}$	$C_{kvj}^{30'}$			$b_W$	$b_{W^{3/4}}$	$b_P$	
					kg	$kg^{3/4}$	$m^2$	mg na 100 ml	mg na 100 ml			$\frac{\Delta C_{kvj}^{0'-30'}}{t \cdot \frac{I}{W}}$	$\frac{\Delta C_{kvj}^{0'-30'}}{t \cdot \frac{I}{W^{3/4}}}$	$\frac{\Delta C_{kvj}^{0'-30'}}{t \cdot \frac{I}{P}}$	
7	10,44	0,496	0,297	38,5	1	1,80	21,1	90,0	179,0	89,0	3,0	3,00	1,67	0,142	0
8	10,12	0,491	0,294	38,9	2	3,57	41,2	96,2	272,8	176,6	5,9	2,95	1,65	0,143	1,4
9	10,33	0,494	0,296	38,7	3	5,38	62,7	92,4	388,0	295,6	9,9	3,30	1,84	0,158	7,1
1	10,01	0,491	0,293	38,2	4	7,11	81,6	94,0	495,0	401,0	13,4	3,35	1,88	0,164	12,5
12	10,76	0,502	0,300	39,1	4	7,24	85,7	102,7	539,3	436,6	14,6	3,65	2,02	0,170	12,3
11	10,82	0,503	0,300	38,9	4	7,26	86,1	95,0	437,9	342,9	11,4	2,85	1,57	0,132	15,7
2	10,30	0,494	0,296	38,4	5	8,96	104,2	92,0	561,0	469,0	15,6	3,05	1,74	0,150	21,0
13	10,77	0,502	0,300	38,7	5	9,06	107,3	104,6	596,8	492,2	16,4	3,28	1,81	0,153	21,8
3	10,36	0,495	0,296	38,5	6	10,76	125,6	92,0	787,0	695,0	23,2	3,87	2,16	0,185	24,0
14	10,67	0,500	0,299	38,6	6	10,84	127,9	100,0	637,0	537,0	17,9	2,98	1,65	0,140	28,7
18	10,34	0,495	0,296	38,6	7	12,55	146,3	104,0	837,0	733,0	24,4	2,49	1,94	0,167	41,3
4	10,90	0,504	0,301	38,2	7	12,72	151,3	93,0	810,0	717,0	23,9	3,41	1,88	0,158	27,6
20	10,36	0,495	0,296	38,8	8	14,35	167,4	104,0	809,0	705,0	23,5	2,94	1,64	0,140	49,8
5	10,75	0,502	0,300	38,7	8	14,48	171,4	99,0	973,0	874,0	29,1	3,64	2,01	0,170	40,8
19	10,52	0,498	0,298	38,7	9	16,31	190,2	101,0	970,0	869,0	29,0	3,22	1,79	0,153	54,6
6	10,76	0,501	0,300	38,7	9	16,30	193,0	101,0	1005,0	904,0	30,1	3,55	1,85	0,156	52,1
Średnia	10,51	0,498	0,298	38,6				97,6				3,270	1,818	0,1551	
										$\sigma$ . . . . .		0,295	0,162	0,0138	
										Współczynnik zmienności, % . . . . .		9,05	8,88	8,91	

na osi odciętych, leżą one w przybliżeniu na linii prostej, co widać z rys. 1 (prosta dla psa Ordo.), według równania  $y = bx$ , które w tym przypadku przybiera postać:

$$\Delta C_{kvj}^{0'-30'}/t = b_p \cdot \frac{I}{P}.$$

W równaniu tym  $b_p$  jest stałą, występującą wtedy, gdy dawkę glikozy wyraża się w gramach na  $m^2$  powierzchni ciała na godzinę. Ponieważ  $\frac{I}{P} = V_i$ , więc równanie to przybiera kształt:

$$\Delta C_{kvj}^{0'-30'}/t = b_p \cdot V_i.$$

Prosta ta zdaje się przechodzić przez punkt zerowy układu. Stałą  $b_p$  dla każdego poszczególnego oznaczenia obliczono, dzieląc parametr na osi rzędnych przez parametr na osi odciętych:

$$b_p = \frac{\Delta C_{kvj}^{0'-30'}}{t \cdot V_i} = \operatorname{tg} \alpha.$$

Stała  $b_p$  stanowi więc wartość kierunkową, która oznacza nachylenie prostej w stosunku do osi odciętych, a zatem charakteryzuje dynamikę zmiany stężenia glikozy we krwi w początkowym okresie wlewania (Tabl. 1). Wartość ta waha się u danego osobnika między 0,133 a 0,185. Nie wykazuje szczególnych odchyień w rozmaitych częściach swego przebiegu. Jej przeciętna równa się 0,1551. Stała  $b_p$  oznacza o ile mg/100 ml krwi żyłnej powiększa się przeciętnie stężenie glikozy we krwi na minutę, gdy się wprowadza dożylnie jednostajnie 1 g glikozy na  $m^2$  powierzchni ciała na godzinę, czyli 16,7 mg na  $m^2$  na minutę. Dawka glikozy wahała się od 21,1 do 193,0 g na  $m^2$  na godzinę.

Sposób ten ze względu na swe zalety, które zostaną omówione w rozdziale 4. („Stała  $b_p$  z rozmaitych punktów widzenia”) oraz w „Omówieniu” właściwym, został zastosowany w przeważającej części obecnego sprawozdania.

Ale tu i ówdzie wyłoni się konieczność wprowadzenia także innego rodzaju stałych  $b$ , obliczonych dla inaczej wyrażonej dawki glikozy. Gdy dawkę glikozy podać na wagę ciała podniesioną do potęgi  $3/4$ , czyli 0,75, wtedy ilość glikozy, wprowadzona na jednostkę tak zmniejszonej wagi ciała, wynosi  $\frac{I}{W^{3/4}}$ ; stała  $b$  będzie więc odmienna i posiada dla tego sposobu symbol  $b_{W^{3/4}}$ :

$$\Delta C_{kvj}^{0'-30'}/t = b_{W^{3/4}} \cdot \frac{I}{W^{3/4}}.$$

Z tego stała:

$$b_{W^{3/4}} = \frac{\Delta C_{kvj}^{0'-30'}}{t \cdot \frac{I}{W^{3/4}}}$$

została podana dla przykładu w tablicy 1 dla dawek od 1,80 do 16,30 g na kg<sup>3/4</sup> na godzinę. Dla badanego osobnika stała ta waha się pomiędzy 1,57 a 2,16 mg/100 ml na minutę, czyli o tyle przyrasta na minutę stężenie glikozy w 100 ml krwi, gdy się wprowadza 1 g glikozy na kg<sup>3/4</sup> wagi ciała na godzinę. Średnia stałej wynosi 1,818.

Nieco lepsze wyniki uzyskano, gdy dawkę glikozy wyrażono na wagę ciała, podniesioną do potęgi 0,73. Tak uzyskana stała miała symbol  $b_{W^{0,73}}$ . Czwarty sposób określa dowóz glikozy w gramach wprost, na kg wagi ciała na godzinę, a więc  $\frac{I}{W}$ . Stała ma znak  $b_W$ , a wzór na stałą ma postać:

$$b_W = \frac{\Delta C_{kvj}^{0'-30'}}{t \cdot \frac{I}{W}}$$

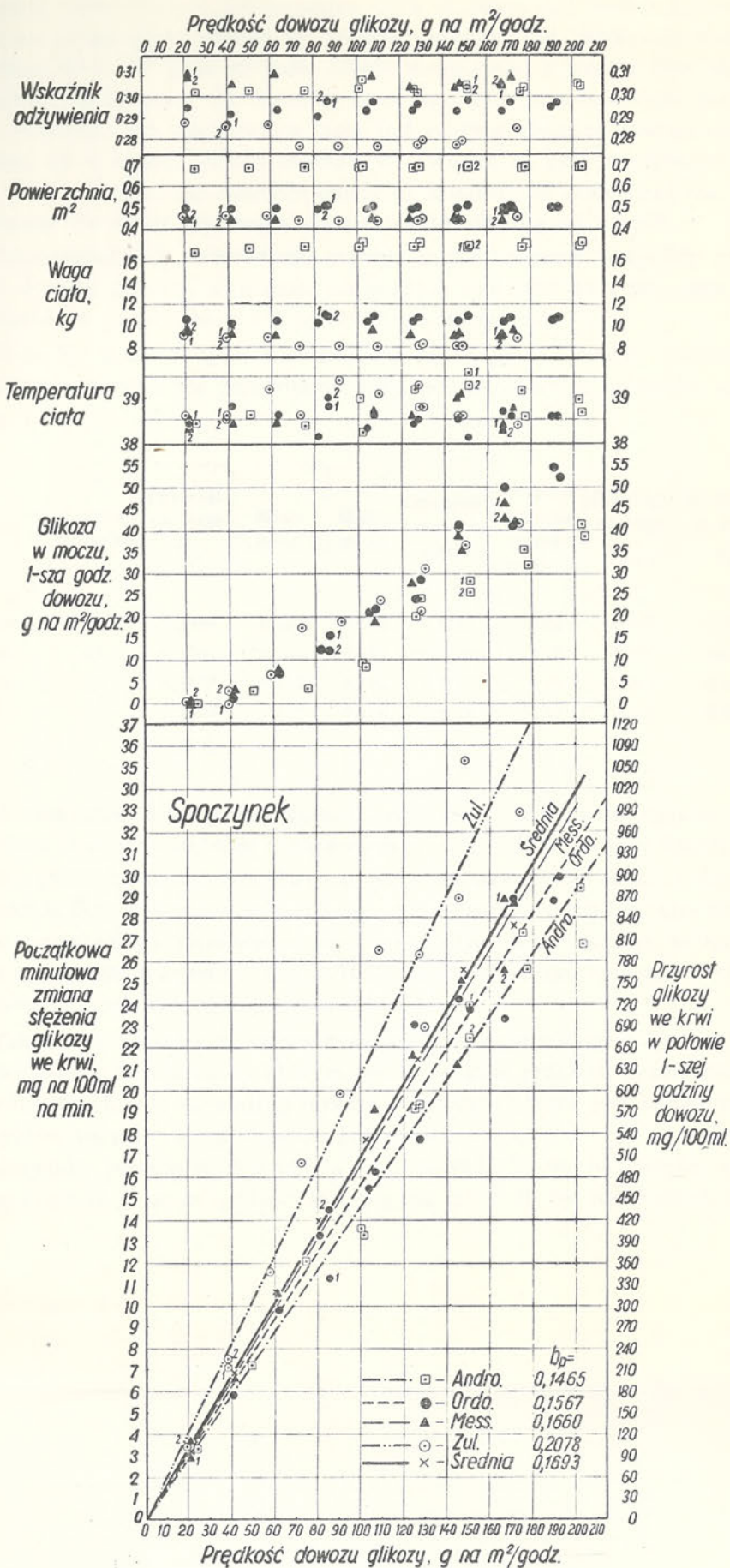
Według tablicy 1 waha się ona dla dawek od 1 do 9 g na kg/godz od 2,49 do 3,87 mg/100 ml na minutę, gdy się dowozi 1 g glikozy na kg wagi ciała na godzinę. Jej wartość przeciętna: 3,270.

Podany w tablicy 1 współczynnik zmienności dla trzech stałych waha się w podobny sposób, pomiędzy 8,88—9,05%. Ponieważ waga ciała nie wykazuje wybitniejszych odchyień, lecz utrzymuje się na stałym poziomie, nie widać przewagi żadnego z trzech sposobów obliczeń. Zalety stałej  $b_p$  wystąpią po wprowadzeniu osobników o rozmaitej wadze ciała.

Być może byłoby lepiej zastosować w mianowniku powyższych wzorów dawki glikozy na minutę, a nie na godzinę, gdyż zmiana stężenia glikozy we krwi zostaje podana na minutę. Nie zmieniłoby to wzajemnego stosunku stałych i ich znaczenia, zwiększyłoby tylko 60-krotnie bezwzględną wartość stałych. Ponieważ jednak w obecnych badaniach podawano zawsze dawkę na godzinę, więc w tej też postaci wniesiono ją we wzory. Na rys. 1 wyznaczono obok danych osobnika z tablicy 1 także jeszcze wartości dla trzech innych osobników.

#### Cztery psy

W rys. 1 należy zwrócić uwagę na to, że u trzech z czterech badanych osobników, a mianowicie u Ordo., Mess. i Andro. waga, powierzchnia,



Rys. 1. Cztery psy (♀) prawidłowe, spoczywające w warunkach wzorcowych, nie-  
 uśpione. Trzy osobniki po diecie nr 1 (Ordo., Mess., Zuli.), jeden po diecie nr 2  
 (Andro.). Jednostajny dowóz glikozy przez żyłę. Początkowa minutowa zmiana  
 stężenia glikozy we krwi we *V. jugularis ext.* w ciągu pierwszej półgodziny dowozu. Gliko-  
 za w moczu z całej pierwszej godziny dowozu. 52 doświadczenia. Jeżeli na tę  
 samą prędkość dowozu przypada szereg doświadczeń, dodawano cyfry od 1 wwyż  
 dla utożsamienia danego doświadczenia poprzez wszystkie poziomy wykresu.

wskaźnik odżywienia i temperatura ciała w przebiegu badań zachowywały się jednostajnie. Natomiast czwarty osobnik, Zul., wykazuje między dowozem 60 a 160 g na m<sup>2</sup>/godz niższą wagę ciała, a wraz z tym niższy wskaźnik odżywienia, niż dolna granica *optimum*, a mianowicie poniżej 0,28. Również jego temperatura ciała jest na tym obszarze dowozu często wyższa, niż u trzech innych osobników. Zwierzę to było wrażliwsze, niż trzy inne osobniki, ale żadnych odchyżeń klinicznych poza tymi nie wykazywało. Te skazy wyodrębniają jednak to zwierzę od innych.

Przeprowadzenie całkowitego szeregu badań, poprzez wszystkie prędkości dowozu glikozy, wymagało na każdym osobniku do 2 lat, czyli odpowiadało w przybliżeniu 1/5 przeciętnego wieku psa.

Stała  $b_p$  miała u tych 4 osobników następującą wartość przeciętną i rozsiew punktów; dla porównania z nią podano również przeciętne stałe  $b_{W^{3/4}}$  i  $b_W$ :

Pies	Liczba punktów	Przeciętna stała $b_p$	Minimum	Maximum	Odchylenie wzorcowe	Współczynnik zmienności, %	Przeciętna stała $b_{W^{3/4}}$	Przeciętna stała $b_W$
Andro.	13	0,1466	0,131	0,162	0,0101	6,89	1,825	3,702
Ordo.	16	0,1551	0,133	0,185	0,0138	8,91	1,818	3,270
Mess.	11	0,1658	0,142	0,181	0,0131	7,89	1,992	3,437
Zul.	12	0,2056	0,177	0,244	0,0228	11,08	2,263	3,859
		0,1692						

W powyższej tablicy szczególnie godne uwagi jest to, że stała  $b_p$  jest najniższa u Andro. (0,1466) a najwyższa u Zul. (0,2056). Mniej więcej podobnie przedstawia się stała  $b_{W^{3/4}}$  u tych obu osobników, niska u Andro., wysoka u Zul. Natomiast w stałej  $b_W$  już nie można odczytać tego biegunowo przeciwnego zachowania się stałej, gdyż Zul. i Andro. wykazują dwie najwyższe wartości (3,859, 3,702). Szczegół ten zostanie naświetlony w dalszych częściach niniejszego rozdziału.

Tak uzyskaną stałą  $b_p$  sprawdzono metodą najmniejszych kwadratów, już to według równania, w którym prosta biegnie przez skrzyżowanie osi współrzędnych, już to według innego, w którym prosta jest oddalona od skrzyżowania osi o stałą  $a$  na osi rzędnych:

Umyślnie podano w stałych  $b_p$  i  $b'_p$  dowóz glikozy na minutę, a nie na godzinę (1 g na m<sup>2</sup>/godz = 16,7 mg na m<sup>2</sup>/min), by uwidocznic, jaka

	Prosta przechodzi przez punkt zerowy osi współrzędnych według wzoru:	Prosta nie biegnie przez punkt zerowy osi współrzędnych, według równania:	
Pies	$\Delta C_{kvj}^{0'-30'}/t = b_p \cdot V_i$	$\Delta C_{kvj}^{0'-30'} t = a + b'_p \cdot V_i$	
	stała $b_p$	stała $a$	stała $b'_p$
	mg na 100 ml/min na 16,7 mg glikozy na m <sup>2</sup> /min	mg/100 ml na min	mg na 100 ml/min na 16,7 mg glikozy na m <sup>2</sup> /min
Andro.	0,1465	0,29	0,1445
Ordo.	0,1567	-0,22	0,1582
Mess.	0,1660	0,12	0,1648
Zul.	0,2078	0,26	0,2056
Przeciętna	0,1693	0,11	0,1683

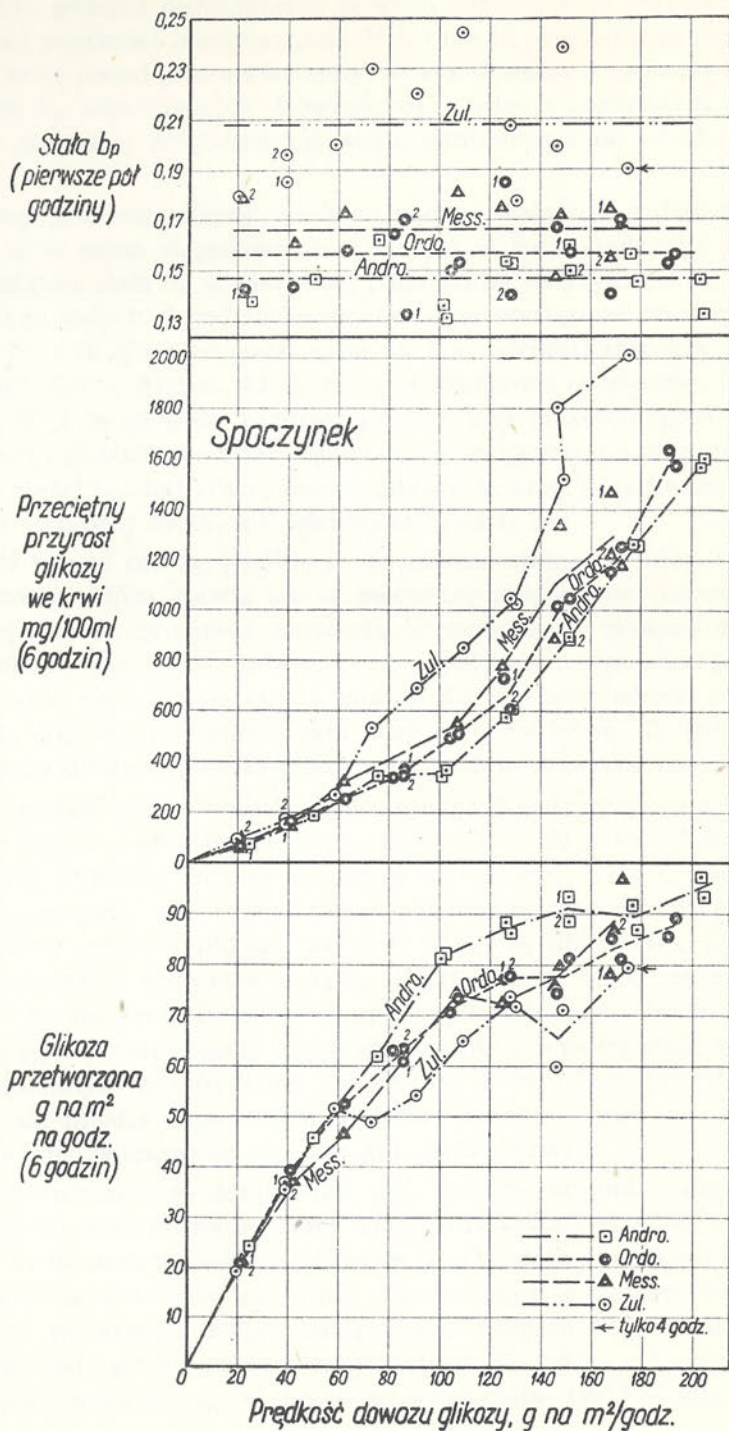
część dowożonego podłoża gromadzi się przeciętnie w 100 ml krwi. Z grubsza 1/100 minutowego dowozu gromadzi się w 100 ml krwi na minutę. Gdy wyznaczyć z wykresu [10] objętość krwi, jaką przypuszczalnie posiadały 4 psy i obliczyć ją na m<sup>2</sup> powierzchni ciała, wynosi ona przeciętnie 1,9 l na m<sup>2</sup>. Zatem z dowożonych na minutę na m<sup>2</sup> każdego 16,7 mg glikozy, przy użyciu stałej  $b_p$ , co najmniej 3,2 mg pozostawały we krwi ( $0,1693 \cdot 19 = 3,22$  mg). Ale objętość krwi powiększa się w miarę wzmagania dowozu glikozy, więc i ta ilość musi wzrastać.

Stała  $a$ , która wskazuje na odchylenie prostej od skrzyżowania osi współrzędnych, jest tak nieznaczną cyfrą, a równocześnie  $b'_p$  jest tak podobne do  $b_p$ , że należy uważać za udowodniony fakt, wyraźnie zresztą widoczny wprost z rys. 1, iż linie przeprowadzone przez wartości początkowej zmiany minutowej stężenia glikozy we krwi są prostymi i w granicach błędu doświadczalnego przechodzą przez punkt wyjścia osi współrzędnych przy wszystkich zastosowanych  $V_i$  w ciągu długich okresów życia psa. Na tym spostrzeżeniu oprą się dalsze rozumowania. Należy jednak zaznaczyć, że wynik taki otrzymuje się przy oznaczeniu licznych punktów na rozległej skali prędkości dowozu glikozy, które sięgały 204 g na m<sup>2</sup>/godz, czyli ponad 1,1 gramocząsteczki na m<sup>2</sup>/godz.

Należało określić, jakie jest znaczenie stałej  $b_p$ , przede wszystkim zaś, jaki ma ona związek ze zdolnościami przetwórczymi ustroju.

#### *Syntetyczna ocena zdolności przetwórczej 4 psów*

Po pierwszej półgodzinie wlewania glikozy następował jeszcze okres 5,5 godzin dalszego jej dowozu z taką samą prędkością. Dla oceny ilościowej



Rys. 2. Dalsze przetwarzanie glikozy podczas sześciu godzin dawozu glikozy u czterech osobników z rys. 1. Wyrażono je w postaci przeciętnego przetwarzania w ciągu sześciu godzin, oraz przeciętnego podniesienia się poziomu glikozy we krwi ponad wartość wstępną. Porównano je z początkowym przyrostem glikozy we krwi w pierwszych 30 minutach dawozu, wyrażonym w postaci stałej  $b_p$ . Wartości przeciętne przetwarzania i przyrostu glikozy dla każdego psa z osobną połączono liniami. Znamienne ułożenie linii wobec siebie: przeciętny przyrost glikozy we krwi dla sześciu godzin i stałe  $b_p$  ustawiają się w tym samym porządku, natomiast krzywe przetwarzania ustawiają się odwrotnie dla 4 osobników.

przetwarzania podczas 6-godzinnej dowozu użyto dwóch sprawdzianów: a) przeciętnej prędkości przetwarzania ( $V_a$ ), oraz b) przeciętnego przyrostu glikozy we krwi ponad poziom wstępny. W rys. 2 zestawiono te dwie wartości ze stałą  $b_p$  odpowiednich doświadczeń, a więc z przyrostem glikozy we krwi w pierwszej półgodzinie dowozu, odniesionym do prędkości dowozu.

Przeciętny przyrost glikozy we krwi podczas całych 6 godzin dowozu wykazuje, że to samo stopniowanie trudności w rozporządzaniu glikozą, jakie przedstawia stała  $b_p$  w pierwszej półgodzinie wstrzykiwania, istnieje nadal w ciągu całych 6 godzin wlewania. Nie występuje ono wyraźnie między  $V_i$  20 a 60 g na  $m^2$ /godz, gdyż na tym odcinku zaznacza się ono tylko między Zul. a Andro., które reagują krańcowo odmiennie. Dopiero powyżej  $V_i$  60 g na  $m^2$ /godz rozsuwają się krzywe przeciętnego 6-godzinnej przyrostu glikozy we krwi. Ujawnia się wzajemny ich stosunek taki sam, jak w stałej  $b_p$ : najłatwiej usuwa glikozę ze krwi pies Andro., mniej łatwo Ordo., trudniej Mess., ale uderzająco trudno Zul.

Choć różnice te nie są wielkie i nie zawsze stałe, nie ulega wątpliwości, że cecha, która zjawia się w pierwszej półgodzinie dowozu przy nieustalanej jeszcze dynamice usuwania, utrzymuje się podczas dalszego kilkugodzinnego wysycania glikozą i, że u jednego i tego samego osobnika trwa albo pojawia się często latami. Szczególnie jednak wyraźnie wynurza się dopiero przy silniejszym nasyceniu podłożem. To jeszcze nie wyjaśnia, jaka droga usuwania glikozy gra w tym zjawisku rolę.

Dopiero można o tym wnosić z przeciętnego 6-godzinnej przetwarzania glikozy (dolna część rys. 2). Pomiędzy  $V_i$  20 a 60 g na  $m^2$ /godz., nie widać jeszcze wyraźnej różnicy między 4 osobnikami. Krzywe rozpościerają się dopiero przy wyższych  $V_i$ , ale w porządku odwrotnym, niż stała  $b_p$  i przeciętny przyrost glikozy we krwi. Krzywa dla Andro. przebiega najwyżej, zgodnie z najniższą stałą  $b_p$  i najniższym 6-godzinnym przyrostem glikozy we krwi, zwierzę to przetwarza najsilniej. Natomiast Zul. objawia na ogół przetwarzanie najniższe zgodnie z wysoką stałą  $b_p$  i wysokim 6-godzinnym przybytkiem glikozy we krwi. Dwa pozostałe psy utrzymują się między powyższymi dwoma, podobnie, jak ich stałe  $b_p$  i ich 6-godzinne zwiększenie stężenia glikozy we krwi.

Zadaniem niniejszego doniesienia jest, między innymi, naświetlenie, która z użytych stałych najwierniej oddaje całokształt zjawisk usuwania glikozy ze krwi. Jest to zadanie niełatwe. Użyte stałe mają zrównać obie strony równania, w którym po jednej stronie znajduje się przyrost minutowy glikozy we krwi, z drugiej zaś prędkość dowozu. Stałe te dadzą się podzielić na dwie grupy, sobie przeciwstawne. W jednej z nich przyrost glikozy zostaje uzależniony od dawki na wagę ciała ( $W^{1,00}$ ), wtedy stała



ma symbol  $b_w$ , w drugiej zaś od dawki na wagę ciała do potęgi wahającej się między 0,7 (czyli powierzchnia według Cowgilla i Drabkina) a  $3/4$  ( $= 0,75$ ) i wtedy stała posiada znak  $b_p$  (lub podobne:  $b_w^{0,73}$  i  $b_w^{3/4}$ ). W toku niniejszej pracy wyłoni się szereg dowodów, przemawiających za  $b_p$  (i podobnymi). Jednym z dość przekonujących jest następujący, zawarty na rys. 2.

Otóż na rys. 2., stała  $b_p$  i „Glikoza przetworzona” są podane na  $m^2$ , lecz przeciętny przyrost glikozy we krwi podczas sześciu godzin dowozu glikozy jest wyznaczony, jako stężenie, a więc cecha niezależna od rozmiarów ciała. A jednak jego wartości układają się w rodzinie krzywych tak samo, jak stała  $b_p$  i oczywiście odwrotnie, niż krzywe glikozy przetworzonej. Jest to dowód, że stała  $b_p$ , a więc na powierzchnię ciała, oddaje wiernie i logicznie także dalsze rozsuniecie krzywych przeciętnego stężenia glikozy we krwi, które panowało podczas dalszych godzin dowozu. (Należy się tu zastrzec, że twierdzenie, iż „stężenie glikozy we krwi jest cechą niezależną od powierzchni ciała”, jest tylko założeniem tymczasowym. Z dalszego wywodu okaże się, że przyrost stężenia glikozy we krwi w istocie rzeczy jest zależny od powierzchni ciała lub funkcji podobnych, i właśnie dlatego biegnie równoległe do stałej  $b_p$ ).

Natomiast stała  $b_w$  nie godzi się z dalszym przebiegiem stężenia glikozy we krwi. Albowiem przeciętna stała  $b_w$  (podana w tablicy, zawartej w ustępie „Cztery psy”) wynosi dla Andro. 3,702, dla Ordo. 3,270, dla Mess. 3,487, zaś dla Zul. 3,859. Z tej stałej wynikałoby, że najtrudniej usuwają glikozę ze krwi Andro. i Zul., zaś łatwiej od nich usuwa Mess., a najłatwiej Ordo. Taki układ początkowych stałych jest zupełnie sprzeczny z rozmieszczeniem rodziny krzywych przeciętnego stężenia glikozy we krwi podczas całych sześciu godzin dowozu. Dlatego stała  $b_w$  nie odpowiada całokształtowi zjawisk usuwania, a w danym przypadku w szczególności przetwórczego usuwania glikozy, w tym zespole danych.

### *Poszukiwania allometryczne*

Ze względu na swą regularność i prostotę kinetyka zapoczątkowującego wysycania glikozą nadawała się do opracowania allometrycznego. Allometria jest sposobem matematycznym ujęcia wzajemnego stosunku dwóch części lub składników ustroju, czy to pod względem wielkości, czy też stężenia [4b]. W obecnych badaniach dwiema częściami porównywanymi są: a) narządy, które usuwają glikozę ze krwi, i b) środowisko, w którym krąży dostępna dla nich glikoza. Należało określić ich wzajemny stosunek. W tym celu zbudowano sposoby obliczeń. Jednym z nich, który zasługuje na podkreślenie, jest podana wyżej zgodność wzajemnego stosunku stałych  $b_p$

dla szeregu osobników z wartościami niezależnymi od powierzchni ciała przeciętnego 6-godzinnego przyrostu glikozy we krwi. Niektóre dalsze sprawdziany zostaną podane w dalszych rozdziałach obecnego doniesienia lub w dalszych pracach.

*Odrębności osobnicze 4 psów w świetle stałej  $b_p$*

a) Pies Andro.

Już to samo, że Andro. otrzymywała dietę nr 2 z mniejszą o połowę zawartością tłuszczu i białka, niż u innych osobników, przy takiej samej ilości węglowodanów, mogło się przyczynić do żywszego przetwarzania glikozy, niż u trzech innych psów (wpływ diet w dalszych doniesieniach). Jej przeciętny wskaźnik odżywienia (0,306) stał dość blisko środka pasa *optimum* i dość blisko wskaźnika psa Ordo. (0,298) i Mess. (0,309), które dostawały dietę nr 1, wobec tego jej zawartość tkanek czynnych przetworczo była podobna, jak u tych dwóch zwierząt.

Niska stała  $b_p$  psa Andro. nie została wywołana zwiększonym przepuszczaniem glikozy przez nerki, gdyż, jak widać z rys. 1, wydalanie glikozy przez Andro. w pierwszej godzinie dowozu jest wybitnie niższe, niż u 3 innych zwierząt, zgodnie z mniejszym gromadzeniem się glikozy we krwi. Ale prócz tego Andro. posiadała pewne cechy osobnicze, które dawały jej ustrojowi lepsze warunki do przekształcania glikozy, a mianowicie:

1) Miała wyższą podstawową wytwórczość cieplną (42,73 kcal na  $m^2$ /godz), niż inne osobniki i niż Ordo. (36,79 kcal na  $m^2$ /godz).

2) Przy obliczeniu sposobem Rubnera, wykazywała wyższe swoistodynamiczne działanie glikozy (10,00%), niż Ordo. (8,60%), poprzez wszystkie  $V_i$  i przy oznaczeniach, które obejmowały zarówno okres wlewania glikozy, jak i następny aż do wystąpienia podstawowych wartości wytwórczości cieplnej.

3) Wobec tego utlenianie glikozy było u Andro. zawsze wyższe, niż u Ordo. Ponieważ zaś Ordo. najłatwiej przetwarzała glikozę spośród trzech pozostałych zwierząt (Rys. 2), należy przypuścić, że Andro. miała najżywsze utlenianie glikozy ze wszystkich 4 badanych osobników.

Nic więc dziwnego, że Andro. bez żadnej szkody znosiła przez 6 godzin  $V_i$  202,9—204,3 g na  $m^2$ /godz. U przeważającej liczby innych psów musiałoby to doprowadzić do zmian nieodwracalnych.

b) Pies Zul.

Wyższą stałą  $b_p$  i trudniejsze usuwanie glikozy ze krwi, oraz mniejszą jednostajność wyników należy przypisać zarówno odchyleniom w czynności nerek, jak i przetwarzania. Istotnie cukromocz tego psa (Rys. 1) jest czasem nieco wyższy, niż u trzech innych osobników, ale nie tak wyraźnie, jakby tego należało oczekiwać z wysokości stałej  $b_p$ . Gdy przy po-

dobnej  $V_i$  u tego osobnika znajdują się 2 doświadczenia, wtedy widać wyraźnie (Rys. 1), że wyższej początkowej zmianie minutowej stężenia glikozy we krwi towarzyszy w całej pierwszej godzinie dowozu niższy cukromocz i odwrotnie:

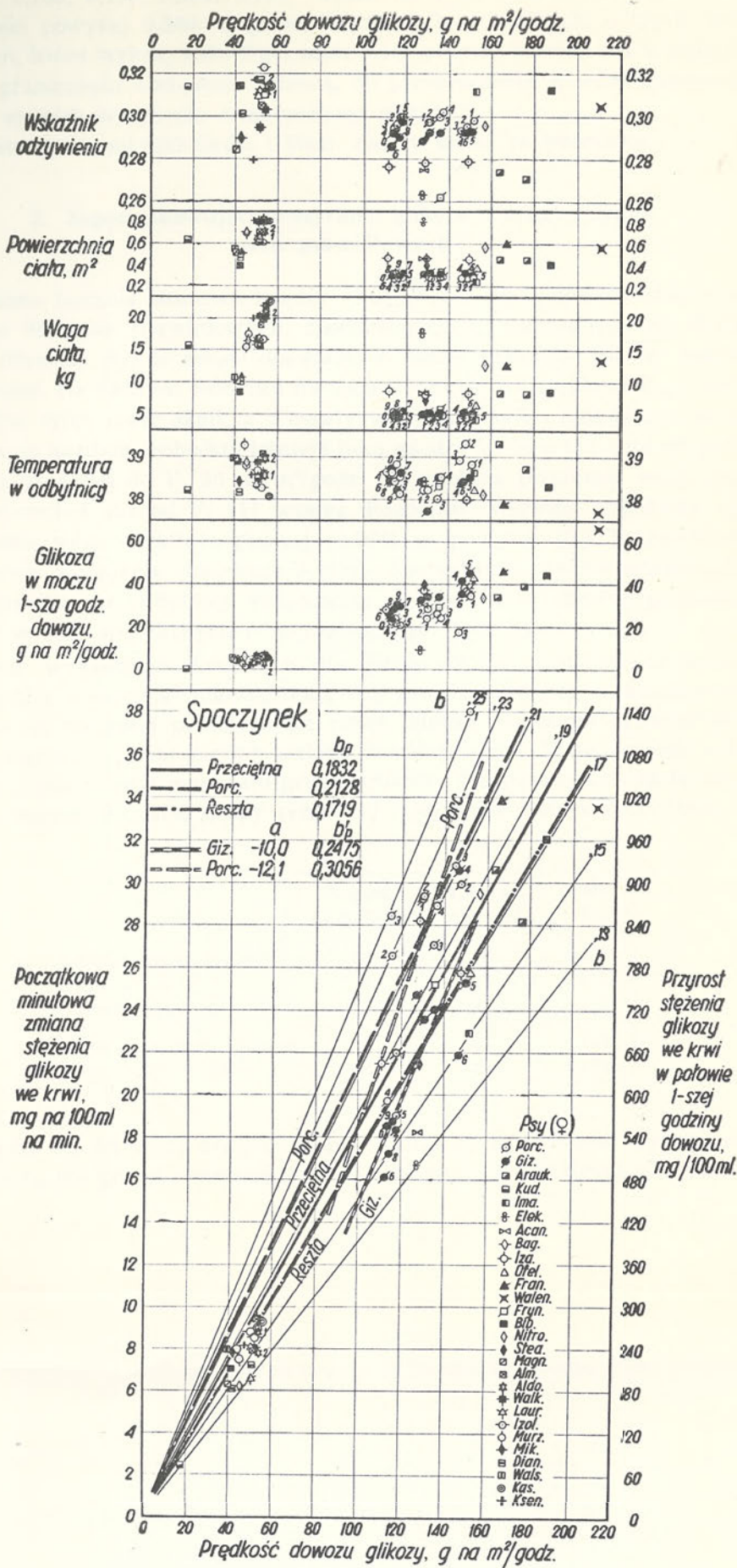
Kolejność doświadczeń	$V_i$ g na m <sup>2</sup> /godz	$\Delta C_{kvv}^{0'-30'}/t$ mg na 100 ml/min	Stała $b_p$	Glikoza w moczu g na m <sup>2</sup> /godz
4	127,9	26,5	0,207	21,4
6	130,2	23,1	0,177	31,2
5	146,2	29,1	0,199	40,7
7	148,7	35,5	0,239	36,7

Wynika stąd, że nerki zwierzęcia były czasem już od pierwszej chwili dowozu mniej sprawne przy wielkim obciążeniu glikozą. Jak widać z zestawienia tych 4 doświadczeń, niewydolność nerkowa była jedną z przyczyn wybitnych wahań stałej  $b_p$ . Kolejność doświadczeń nie odgrywała w tym roli. Nawet, gdy pogorszenie pracy nerek nie wystąpiło od pierwszych minut dowozu, mogło się jednak pojawić w dalszych jego okresach.

Można by oczekiwać, że Zul. mając niższy wskaźnik odżywienia (0,284) będzie uprzywilejowana pod względem przetwórczym, np. wobec Mess. (wskaźnik odżywienia 0,309), gdyż powierzchnia ciała obu jest przy tym jednakowa (0,45 m<sup>2</sup>, 0,44 m<sup>2</sup>), a ilość tkanki czynnej przetwórczo jest większa u Zul. Tymczasem jest przeciwnie. Widocznie niższemu stanowi odżywienia towarzyszy pewne upośledzenie przetwórcze. Sprawa jest więc bardziej złożona.

W następstwie tych wad widocznych i innych cech ustroju, których te upośledzenia były widowym wykładnikiem, zwierzę zginęło przy  $V_i$  174,2 g na m<sup>2</sup>/godz już po czterech godzinach i 43 minutach wlewania. Jest to właśnie graniczna, niebezpieczna  $V_i$ , którą całkowicie prawidłowe osobniki, ze stosunkowo niską stałą  $b_p$ , znosiły w ciągu sześciu godzin bez zaburzeń, wielokrotnie. Należy tu dodać nawiasem, że średnie przetwarzanie w tym doświadczeniu (Rys. 2) zostało obliczone tylko dla czterech godzin dowozu i dlatego jest za wysokie, średnia z całych sześciu godzin (gdyby zwierzę żyło tak długo) byłaby niższa.

Stała  $b_p$  w tym ostatnim doświadczeniu była stosunkowo niezbyt wysoka i nie można było na jej podstawie rokować o groźącym niebezpieczeństwie. Dopiero wzięcie pod uwagę stałych  $b_p$  z poprzedzających doświadczeń, zdobytych przy niższych  $V_i$ , mogło nasunąć podejrzenie. Przebiegały one następująco: 0,230; 0,220; 0,244; 0,207; 0,199; 0,177; 0,239;



Rys. 3. Początkowa minutowa zmiana stężenia glikozy we krwi podczas jednostajnego dozowu glikozy z różnymi prędkościami u drugiej grupy psów. 28 zwierząt (♀) prawidłowych, w spoczynku, w warunkach wzorcowych, bez uspienia, po diecie nr 1. Przeważnie wykonano tylko po jednym doświadczeniu na każdym osobniku, z wyjątkiem psów Parc. i Giz., na których wykonano ich więcej. 61 doświadczeń. Dla wszystkich danych prosta przeciętna, przechodząca przez skrzyżowanie osi współrzędnych. Ze względu na wyjątkowe zachowanie się psa Parc. osobna prosta dla tego osobnika i druga dla reszty doświadczeń, obie przeprowadzone przez punkt zerowy. Wykreślono również dwie proste dla Parc. i Giz., które nie przechodzą przez skrzyżowanie osi (stałe  $a$  i  $b_p$ ). Punkty przypadające na tę samą prędkość dozowu wyróżniono przez dodanie przy nich cyfr od 1 wzwyż.

0,180; 0,185; 0,196; 0,200; 0,190. Tylko do 7 doświadczenia spotyka się wartości powyżej 0,200. U psów, trzymanyh w klatkach, o typie upośledzeń, które wykazywała Zul., może więc przyjść łatwiej, niż u innych, przy granicznym obciążeniu glikozą, do przekroczenia granicy odwracalności zjawisk wysycenia osmotycznego glikozą.

Natomiast osobniki Ordo. i Mess. należy uznać za wzorcowe.

## 2. Zapoczątkowujące wysycanie glikozą u drugiej grupy psów prawidłowych

Dalsze badania stosunku między  $\Delta C_{k_{vj}}^{0'-30'}/t$  a  $V_i$  przeprowadzono na grupie 28 psów prawidłowych, spoczywających, trzymanyh na diecie nr 1 (Rys. 3). Był to zespół doświadczeń mniej jednolity, niż w grupie pierwszej. Na żadnym osobniku nie ogarnięto całej rozciągłości  $V_i$ , u paru zbadano tylko część skali, a u reszty wykonano tylko pojedyncze oznaczenia na każdym osobniku. Istnieje luka między  $V_i$  56 a 111 g na m<sup>2</sup>/godz. Grupa oznaczeń do  $V_i$  56 na m<sup>2</sup>/godz ma większą rozpiętość wagi ciała i powierzchni, niż od  $V_i$  111 wzwyż. Rozpiętość wartości wskaźnika odżywienia sięga wybitnie poniżej (0,264) i powyżej (0,323) optimum. U dwóch osobników stosowano 3 różne temperatury płynów wlewanych. Temperatura w odbytncy znajdowała się jednak w obrębie prawidłowych wahań, spotykanych u dojrzałego psa (Rys. 3).

Przy wykreślaniu krzywych dla grupy drugiej zastosowano przede wszystkim wytyczną, udowodnioną dla grupy pierwszej, a mianowicie, że proste, najlepiej przebiegające przez punkty znalezione doświadczalnie, przecinają punkt zerowy układu współrzędnych. W ten sposób obliczono 3 stałe  $b_p$  dla materiału grupy drugiej i dla porównania zestawiono je ze stałymi  $b_p$  całej grupy pierwszej i jej psów wzorcowych Ordo. + Mess.:

	Liczba osobników	Liczba oznaczeń	stała $b_p$
Druga grupa łącznie	28	60	0,1832
Pies Porc.	1	12	0,2128
Druga grupa bez Porc.	27	48	0,1719
Pierwsza grupa łącznie	4	52	0,1642
Psy Ordo. + Mess.	2	27	0,1602

Stała  $b_p$  dla całej drugiej grupy (0,1832) jest znacznie wyższa, niż łączna  $b_p$  dla grupy pierwszej (0,1642) dlatego, że grupa druga nie posiada

osobnika o niskiej stałej  $b_p$  o typie Andro. na diecie nr 2. Zawiera jednak psa Porc., który zachowuje się w grupie drugiej podobnie, jak Zul. w pierwszej — ma wysoką stałą  $b_p$  (0,2128) i wobec tego podnosi przeciętną całej grupy.

Dlatego na rys. 3 wydzielono wartości psa Porc. w postaci osobnej krzywej, która biegnie powyżej przeciętnej dla całej grupy i przez punkt zerowy. Wobec tego dla pozostałych wartości ( $b_p = 0,1719$ ) krzywa biegnie poniżej przeciętnej i przez zero. Ta pozostałość ma jednak wyższą  $b_p$ , niż psy wzorcowe (0,1602). Z tym zjawiskiem należy się liczyć w materiale bardziej różnorodnym.

O ile stała  $b_p$  miała nabrać znaczenia, należało wyświetlić wszelkie wybitniejsze odstępstwa jej od wartości wzorcowych. Dlatego dane osobnika Porc. porównano z wynikami na psie Giz. z rys. 3. Oba zwierzęta były podobnego wieku, wagi, o podobnym stanie odżywienia. Trzymano je w takich samych warunkach i na takiej samej diecie. Badane były w tym samym czasie, przy pomocy 3 wysokich  $V_i$ , a mianowicie 7, 8 i 9 g na kg/godz, przy czym zmieniano temperaturę rozczynów wlewanych w taki sam sposób. Klinicznie wydawały się prawidłowe, a jednak różniły się stałą  $b_p$ , która była następująca w porównaniu z resztą grupy drugiej:

Pies	Liczba oznaczeń	Stała $b_p$			Odchylenie wzorcowe	Współczynnik zmienności, %	Przeciętna stała $b_{W^{3/4}}$	Przeciętna stała $b_W$
		Przeciętna	Minimum	Maximum				
Giz.	11	0,1686	0,1435	0,2088	0,0202	11,96	1,829	2,771
Porc.	12	0,2109	0,1617	0,2523	0,0276	13,09	2,377	3,496
Inne psy grupy drugiej	37	0,1671	0,1313	0,2198	0,0196	11,74		

Przeciętna stała  $b_p$  psa Giz. stała w pobliżu wartości, uznanych za wzorcowe, natomiast u Porc. była wybitnie wyższa. Nie znaczy to, że punkty Porc. dadzą się odgrodzić od punktów Giz. na rys. 3 jakąś prostą granicą, gdyż zarówno Porc. posiada niekiedy dość niskie wartości stałej  $b_p$ , jak i Giz. dość wysokie. Na pewnej przestrzeni pośredniej przenikają one w zasięg drugiego osobnika. Jednak nigdy u Porc. nie spotyka się wartości tak niskich, jak u Giz., i na odwrót. Z rys. 5 wynika, że różnice w stałych  $b_p$  występują bardzo wyraźnie, dla każdej  $V_i$  z osobna. Dane na tych dwóch osobnikach są pouczające ze względu na przebieg krzywych, które najlepiej odpowiadają ustawieniu punktów. Gdy, mianowicie, dla zespołu danych każdego z tych dwóch osobników oddzielnie obliczyć stałe równania prostej już to przechodzącej, już to nie przebie-

gającej przez skrzyżowanie osi, okazuje się, że krzywe dla ich danych przecinają oś rzędnych znacznie ku dołowi od punktu zerowego, o czym świadczy wysoka ujemna wartość stałej  $a$ :

	Prosta przechodzi przez punkt zerowy osi	Prosta nie przechodzi przez punkt zerowy osi współrzędnych	
	stała $b_p$	stała $a$	stała $b'_p$
Pies	mg na 100 ml/min na 16,7 mg glikozy na m <sup>2</sup> na min,	mg/100 ml na min	mg na 100 ml/min na 16,7 mg glikozy na m <sup>2</sup> na min
Giz.	0,1705	- 10,02	0,2475
Porc.	0,2138	- 12,09	0,3056

Stałe obliczono metodą najmniejszych kwadratów i dlatego stałe  $b_p$  różnią się w obrębie 1% od obliczonych metodą średnich z poszczególnych oznaczeń. Stała  $a$  ma dla obu zwierząt mniej więcej tę samą wartość, a więc u obu zwierząt czynniki, które doprowadzają do odchylenia prostej w dół od punktu zerowego, widocznie są podobne. Na rys. 3 przeciągnięto dodatkowo krzywe obu zwierząt według równania prostej, mijającej punkt zerowy. Istotnie widać z rysunku, że odpowiadają one dobrze rozmieszczeniu punktów odnośnych zwierząt. Podczas, gdy stała  $b_p$  dla Porc. jest wyższa o 0,0423 od stałej  $b_p$  psa Giz., to dla stałej  $b'_p$  różnica ta wynosi 0,0581, a więc i przy tym sposobie ujęcia różnice między obu zwierzętami utrzymują się.

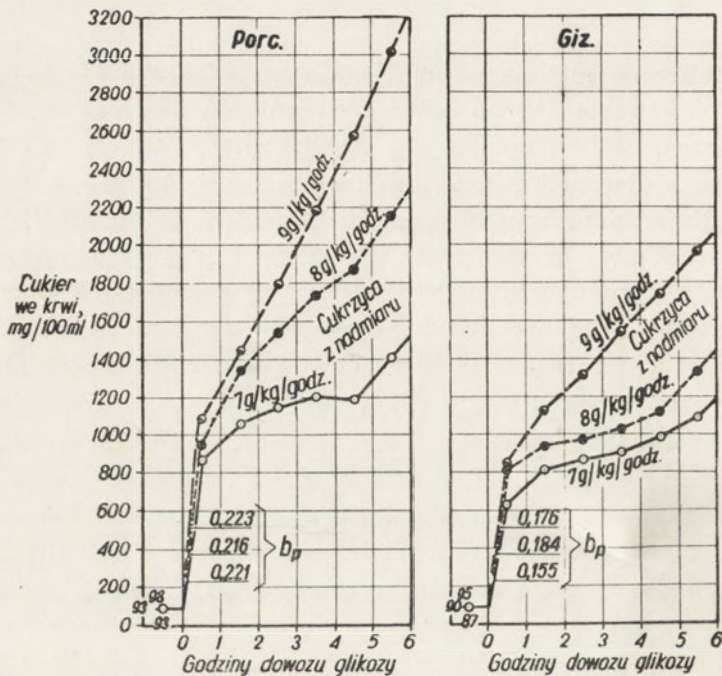
Zboczenie prostych w dół od skrzyżowania osi należy przypisać temu, że dane uzyskano na wąskim odcinku  $V_i$ , że warunki doświadczalne były zmienne (temperatura rozczyńców) i być może jeszcze innym, ale jednakowo u obu psów wpływającym czynnikiem. Wynika stąd wniosek, że stałych nie można oznaczać na podstawie małego wycinka  $V_i$ , przy stosowaniu zmian w metodyce, które mogą być dokuczliwe dla badanych istot (temperatura + 10°, + 38°, obok zwyczajnej 26°, por. [11]).

Odchylenie prostych w dół od skrzyżowania osi, w część ujemną osi rzędnych (nie wyrysowaną na rys. 3), nasuwa podejrzenie, że nawet prosta, która przy niższych  $V_i$  wychodzi z punktu zerowego, może przy wyższych  $V_i$  zmienić kierunek i zacząć biec bardziej stromo ku górze. Mogłoby to świadczyć o coraz bardziej wzrastających trudnościach w usuwaniu glikozy ze krwi przy wysokich  $V_i$ . Wtedy bardziej stromy odcinek krzywej, przedłużony w dół, przeciąłby oś odciętych na prawo od punktu zerowego, a oś rzędnych w dół od jej skrzyżowania z osią odciętych. Jed-

nak podejrzenie to upada, gdy sprawdzić przebieg krzywych na rysunku 1, w doświadczeniach, uznanych za wzorcowe: nie dostrzega się w nich żadnego załamania, jak już stwierdzono uprzednio.

### 3. Przebieg wysycania glikozą dwóch osobników, u których początkowe usuwanie glikozy ze krwi było różne

Chodziło o rozstrzygnięcie, czy niezwykle wysoką stałą  $b_p$  u psa Porc. można uznać za prawidłową i w jakim stosunku stoi ona do dalszego obchodzenia się ustroju z glikozą. Porównanie w tym celu psa Porc. z niewątpliwie prawidłowym osobnikiem Giz. nie było proste. Do rozbioru zja-



Rys. 4. Przeciętne krzywe cukru we krwi dwóch psów (♀): Porc. (przeciętna waga ciała 4,70 kg) i Giz. (waga 5,28 kg). Dowożono jednostajnie od 7—9 g glikozy na kg/godz. w ciągu 6 godzin ( $V_i$ : Porc. 116,4; 133,3; 148,2; Giz. 115,1; 131,3; 148,2). Krew pobierano w połowie odnośnej godziny dowozu. Jakkolwiek stężenie cukru we krwi przed wlewaniem jest prawidłowe i podobne u obu osobników, stała  $b_p$  i przebieg krzywych są wyższe u Porc., niż u Giz.

wisk wysokiego nacukrzenia, słabo dotąd poznanych, użyto zespołu sprawdzianów, które znajdują uzasadnienie w późniejszych doniesieniach. Poniższe wyniki dowodzą, że na jednych i tych samych osobnikach można



przeprowadzić szeregowe spostrzeżenia w obszarze znacznych 6-godzinnych wysyczeń glikozą ( $V_i$  100—150 g na  $m^2$ /godz) bez szkodliwych następstw dla badanych zwierząt. Z wyjątkiem stałej  $b_p$ , wszystkie inne wyniki podano na jednostkę wagi ciała, a nie na jednostkę powierzchni, gdyż oba psy miały podobną wagę ciała. Można było wobec nich uniknąć nieścisłości, związanej z obliczaniem powierzchni ciała.

*Przebieg stężenia cukru we krwi.* Wszystkie krzywe cukru we krwi na rys. 4 mają przebieg wznoszący, zatem dowóz glikozy do krwi jest większy, niż jej odpływ ze krwi. Przy tym jednak wszystkie krzywe Porc. przebiegają wyżej, niż Giz. A więc i tu cechy początkowej prędkości gromadzenia się glikozy we krwi, określone stałą  $b_p$ , wyższą dla Porc. niż dla Giz., stanowią współczynnik nadal i to w podobnej mierze obecny w ciągu dalszego przebiegu dowozu glikozy. Na końcu szóstej godziny dowozu przy  $V_i$  9 g na  $kg$ /godz Porc. osiągała 3200 mg/100 ml, a Giz. przeszło 2 000 mg. Z prędkości początkowego gromadzenia się glikozy we krwi można w przybliżeniu wnosić o stopniu ostatecznego wysycenia.

*Pałapy czynności, przemieszczających glikozę ze krwi przy wysokim nacisku.* Odmienny przebieg krzywych cukru we krwi u obu osobników mógł być wywołany już to przez różnice w usuwaniu glikozy przez nerki, już to przez różną prędkość zużycia glikozy przez tkanki, albo wreszcie przez oba czynniki razem. Ale przy znacznych obciążeniach glikozą obie te czynności dochodzą do najwyższej, nieprzekraczalnej sprawności przy pewnym stężeniu cukru we krwi, po czym, przy dalszym wzroście stężenia, albo dana czynność już się nie powiększa, albo nawet, jak to się dzieje z funkcją nerek, ulega niedomodze [28, 30]:

Cecha	Przeciętna najwyższa sprawność u pałapu	Wystąpienie pałapu przy stężeniu cukru we krwi mg/100 ml
Oczyszczanie krwi z glikozy przez nerki	60 ml na $m^2$ /min	~ 550 — 600
Zużycie przetwórcze	80 g na $m^2$ /godz	~ 900
Wydalenie glikozy przez nerki	85 g na $m^2$ /godz	~ 1700 — 2600
Zwyczajna granica odwracalności		~ 2800

Osiągnięcie pałapu zużycia glikozy lub jej wydalania z moczem oznacza więc, że dalszy wzrost stężenia glikozy we krwi już więcej nie wzmocze usuwania glikozy przez dane ujście, które zostaje ujęte w sztywne ramy

nieprzekraczalnej najwyższej sprawności. Jest to ważny szczegół, który wysoce utrudnia ocenę wysokich nacukrzeń blisko pułapów czynności usuwających glikozę. Nie można już wtedy bowiem porównywać dwóch doświadczeń tylko na tej podstawie, że wprowadza się w nich dokładnie takie same ilości glikozy.

Gdy bowiem w jednym z nich istnieje trwale lub nagle pojawia się jakieś zaburzenie w odpływie glikozy ze krwi, wtedy poczyna się ona szybciej gromadzić we krwi i prędzej dociera do pułapu, po którego przekroczeniu rozpatrywane ujście wymyka się już spod zależności od stężenia glikozy we krwi. Wynik należy wtedy ocenić według wzorców [30], które podają natężenie danej czynności przy ponadpułapowych stężeniach glikozy we krwi, co też uczyniono w następujących rozważaniach.

*Czynność nerek obu osobników.* Rys. 5 streszcza porównawczo zachowanie się obu osobników. Dla każdej cechy znajduje się w nim po 6 grupowych danych (wielkie cyfry, przerywane linie), po 3 na każdym osobniku. Uzyskano je na przestrzeni z górą rocznych badań. W ocenie pracy nerek kierowano się tylko sprawdzianami, związanymi z dowozem glikozy, bez żadnych innych prób czynnościowych. Oba osobniki wykazują już to podobieństwa (A), już to różnice (B):

A. Podobieństwa w pracy nerek uwidoczniają się, gdy wziąć pod uwagę tylko dane moczu, bez danych krwi (Rys. 5):

1) *Przeciętne wydalanie glikozy* dla każdej prędkości dowozu z osobna jest bardzo podobne u obu osobników: u Porc. 15,1, 20,5 i 24,7 g na kg/6 godzin, u Giz. 16,0, 18,3 i 24,9 g na kg/6 godzin.

2) *Najwyższe godzinne wydalanie glikozy* (nie podano na rys. 5) jest także u obu zwierząt podobne: od 80—90 g na m<sup>2</sup>/godz. Zachodzi przy podobnym  $C_{kvj}$ , ale, być może, u Porc. nieco wyższym, niż u Giz., a mianowicie, powyżej 2 000 mg/100 ml. Nerki psa Porc. są wyjątkowo wytrzymałe na wysokie obciążenie osmotyczne, gdyż podtrzymują wydalanie 90 g na m<sup>2</sup>/godz., przez 3 godziny pomiędzy  $C_{kvj}$  2365 a 3144 mg/100 ml i to w jedenastym z kolei doświadczeniu. Wysiłek ten nie pozostawił żadnego śladu, który by się ujawnił w następnych doświadczeniach.

3) *Grupowa objętość moczu* (Rys. 5) przy dowozie 7 g na kg/godz jest dla obu zwierząt taka sama: Porc. 258, Giz. 246 ml na kg/6 godzin. Przy 8 g na kg/6 godzin Porc. wydała 349, a Giz. 297 ml na kg/6 godzin, a więc Porc. wydała więcej. Natomiast podobne wartości u obu osobników przy  $V_i$  9 g na kg/godz (399 i 391 ml na kg/6 godzin) są uzyskane sztucznie, gdyż Porc. przekracza już wtedy znacznie pułap i w końcu przychodzi u niej do nerkowego zatrzymania glikozy i zmniejszenia objętości moczu wśród najwyższego wysiłku nerek. Tymczasem u Giz. pułap wydalania zostaje osiągnięty dopiero przy końcu okresu wlewania, w szóstej godzinie.

4) Stężenie glikozy w moczu (Rys. 5) Porc. jest zawsze nieznacznie niższe (5,83; 5,78; 6,09‰), niż u Giz. (6,57; 6,17; 6,31‰). Utrzymuje się ono jednak u każdego ze zwierząt z osobna na tym samym poziomie przeciętnym (Porc. 5,90‰, Giz. 6,35‰), niezależnie od  $V_i$ , dzięki odpowiedniemu nastawianiu dowozu wody.

5) Wydalanie jednego grama glikozy z moczem (Rys. 5) wymagało od 15,4 do 17,0 ml moczu, niezależnie od  $V_i$ . W przeciętnej grupowej wartości dla Porc. jest albo taka sama, albo nieznacznie wyższa, niż dla Giz. Użyty sposób uzupełniania niedoboru wody nie był schematyczny, lecz podążał za osobniczą objętością moczu. Nie mógł więc zatrzeć różnic osobniczych.

B. R ó ż n i c e między obu osobnikami wychodzą na jaw dopiero wtedy, gdy w rozważania włączyć także dane cukru we krwi, obok danych moczu (Rys. 5):

1) Przeciętne grupowe stężenie cukru we krwi (Rys. 5) jest u Porc. zawsze wyższe (1118, 1562 i 1967 mg/100 ml), niż u Giz. (885, 1000 i 1386 mg/100 ml), w zgodzie z wysokością grupowej stałej  $b_p$  (Rys. 5), która jest u Porc. wyższa, niż u Giz. (por. rys. 4). Przy dowozie takiej samej ilości cząsteczek glikozy Porc. znajduje się w stanie względnego przecukrzenia w stosunku do Giz., czego nie dostrzega się w wartościach cukru we krwi na czczo u tego osobnika.

2) Skoro wydalanie glikozy z moczem jest przy takich samych prędkościach dowozu podobne u obu psów, a  $C_{kvj}$  wyższy u Porc., więc oczyszczanie krwi żyłnej z cukru przez nerki (swego rodzaju "clearance") musi być dla Porc. zawsze niższe (3,76; 3,66 i 3,49 ml na kg/min), niż dla Giz. (5,20; 5,08 i 4,99 ml kg/min). Wartości Giz. wynoszą tyle, co prawidłowa przeciętna [30], zaś wartości Porc. są od niej niższe. Przy powiększaniu się stężenia  $C_{kvj}$  pomiędzy  $V_i$  7 a 9 g na kg/godz opadają lekko (u Porc. z 3,76 na 3,49, zaś u Giz. z 5,20 na 4,99 ml na kg/min zgodnie z [30]).

3) Ponieważ stężenie glikozy w moczu u Porc. jest nieznacznie niższe, niż u Giz., a stężenie cukru we krwi wybitnie wyższe, więc stosunek  $C_m/C_{kvj}$  (Rys. 5) jest u Porc. zawsze wybitnie niższy (5,43; 3,88; 3,48), niż u Giz. (7,97; 6,30; 4,99). Zdolność zagęszczania moczu w stosunku do krwi jest więc u Porc. nieco mniejsza niż u Giz.

Powyższe dane, przełożone na słownictwo czynności nerek, oznaczają, że u psa Porc. istnieje stale względnie mniejsze zagęszczanie stężenia glikozy w moczu (*hyposthenuria* względna) i stale mniejsza zdolność zagęszczania moczu w stosunku do krwi. Wskazuje to na uszkodzenie nerek, ale bez umiejscowienia [22b].

Pojęcie sączenia kłębkowego znajduje swój (nieściśły) odpowiednik w krańcowym oczyszczaniu krwi z glikozy. Jest to wartość mniejsza od całkowitego sączenia kłębkowego o ilość glikozy, wchłanianą zwrotnie,

co wykazano dla obecnej metodyki [30]. Niewątpliwie osobnik Porc. ma wartość oczyszczania zawsze bardzo wyraźnie niższą, niż Giz. Ale znów nie można umiejscowić, co jest upośledzone, czy kłębki przesączają mniej, niż u Giz., czy też, co jest mniej prawdopodobne, cewki kręte wchłaniają więcej. Ostatecznie, by wytworzyć ten sam skutek wydalniczy, ustrój psa Porc. musi użyć większego stężenia glikozy we krwi.

Mimo tych odchyłeń, które występują także wtedy, gdy zestawić ze sobą doświadczenia obu psów o takiej samej stałej  $b_p$  i o takim samym przeciętnym stężeniu cukru we krwi w ciągu 6 godzin dowozu, nerki psa Porc. są niezwykle wytrzymałe na znaczne, wielogodzinne i wielokrotne wysycania glikozą, których inne osobniki nie znosiły w sposób odwracalny.

*Zużycie glikozy u obu osobników.* Nic nie wskazywało przed dowozem glikozy na upośledzenie przetwórczości węglowodanowej u Porc. Jej poziom cukru we krwi na czczo wahał się między 85 a 108 mg/100 ml, zaś u Giz. między 73 a 110. Dopiero podczas dowozu glikozy występowały między obu osobnikami różnice:

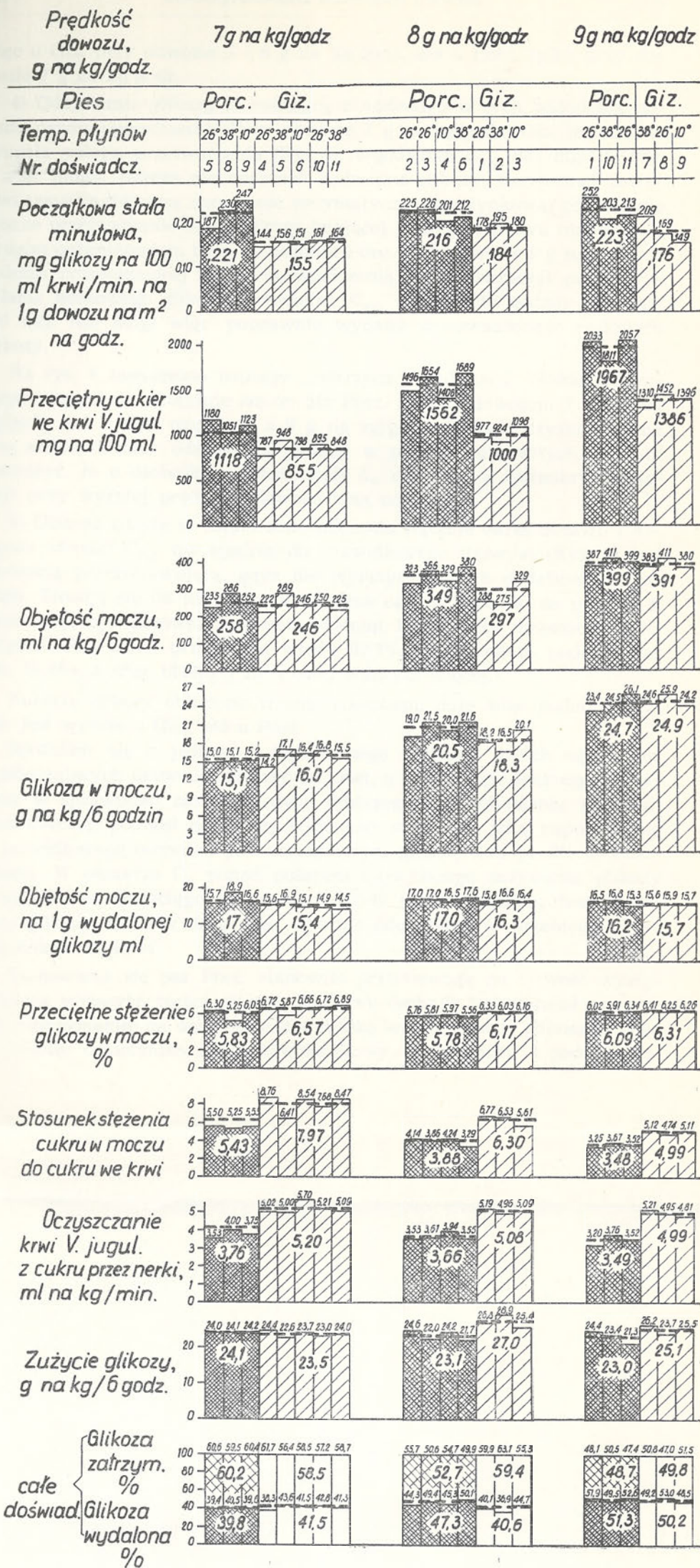
1) *Zużycie 6-godzinne glikozy* (Rys. 5) oznaczano wzorem dla  $V_a$  („Zastosowane symbole i obliczenia”). Jest on jednak poprawny tylko wtedy, gdy  $C_k$  mało zmienia swe stężenie. Tymczasem w rozpatrywanych doświadczeniach  $C_k$  zawsze wzrastał (Rys. 4). Zatem, by ten błąd ominąć wybrano dla porównania takie krzywe dla obu psów, w których wzmaganie się  $C_k$  było podobne (Rys. 4):

Pies	Dowóz	Zużycie	Cukier we krwi
	g na kg/6 godzin	g na kg/6 godzin	mg/100 ml
Porc.	42,0	24,1	1118
Giz.	48,0	27,0	1000
Porc.	48,0	23,1	1562
Giz.	54,0	25,1	1386

Po przekroczeniu przez cukier we krwi pułapu przetwarzania, zużycie jest u Giz. wyraźnie większe, niż u Porc. I w tych danych nie zadowala fakt nieco wyższego  $C_k$  u Porc. Przy tym różnica na korzyść Giz. jest nieduża.

2) *Najwyższe godzinne zużycie glikozy ( $V_a^{max}$ )* jest w poszczególnych godzinach często wyższe u Giz. Nie podano go na rysunku 5.

3) *Faza II zwiększonego zużycia* występuje dopóki  $C_{kvj}$  w połowie pierwszej godziny dowozu nie przekracza 1000 mg/100 ml. Występuje



Rys. 5. Porównanie obrotu glikozy u dwóch psów, które posiadały odmienne stałe  $b_p$ . Glikoza dożylnie: 7—9 g na kg/godz. Dieta nr 1. Każdy prostokąt oznacza przeciętną z sześciu godzin dowozu glikozy, z wyjątkiem początkowej stałej minutowej,  $b_p$ , która odnosi się do pierwszej półgodziny dowozu. Pies Porc. (♀) — prostokąty zakreskowane, Giz. (♀) — prostokąty puste. Średnie dla zespołów doświadczeń: — — — — średnia graficzna; wielkie cyfry na grupach prostokątów — średnie numeryczne. Stosowano 3 rozmaite temperatury płynów wlewanych: 10°, 26°, 38°.

więc u Giz. przy dowozie 7 i 8 g na kg/godz, zaś u Porc. tylko przy dowozie 7 g na kg/godz.

4) *Odzyskanie glikozy w cukrzycy z nadmiaru* w tych badaniach posiada pewne ograniczenia. Przy dowozie 7 g na kg/godz Giz. jeszcze nie osiągała pułapu przetwarzania (Rys. 5; 6-godzinny  $C_{kvj}$  855 mg/100 ml), a więc mogła jeszcze nie odrzucać nadmiaru glikozy, narzuconej ustrojowi ponad najwyższą sprawność enzymatyczną spoczynkową, gdyż ciągle jeszcze przetwarzanie całej glikozy krążącej podlegało prawu mas-stężeń. Drugim ograniczeniem było, że osobnik Porc. przy dowozie 9 g na kg/godz podczas przeważającej części doświadczenia już przekraczał pułap wydalania nerkowego glikozy (przeciętny  $C_{kvj}$  dla sześciu godzin 1967 mg/100 ml). Nie mógł więc poprawnie wydalić wprowadzonego nadmiaru glikozy.

Na rys. 4 zaznaczono napisem „cukrzyca z nadmiaru“ obszar najlepszego odzyskania. Znajduje się on dla Porc. między dowozem 7 a 8 g na kg/godz, zaś u Giz. między 8 a 9 g na kg/godz. Istotnie uzyskiwano na tym skoku dowozu odzyskania glikozy w pobliżu całkowitych. Należy zauważyć, że u osobnika z niższą stałą  $b_p$  cukrzyca z nadmiaru występuje przy wyższej prędkości dowozu i na odwrót.

5) *Glikoza zużyta w całym doświadczeniu* (łącznie okres dowozu i następny, dopóki  $C_{kvj}$  nie spadnie do prawidłowego stężenia) (Rys. 5) jest wartością przekonywującą, gdyż nie wymaga żadnych dodatkowych założeń. Stosują się do niej jednak te same ograniczenia co do punktu 4. Może więc być porównana u obu zwierząt tylko przy dowozie 8 g na kg/godz. Pies Porc. przetwarza wtedy 52,7% dowiezionego podłoża, zaś Giz. 59,4%, a więc blisko o 13% całej wartości więcej.

Zużycie glikozy obliczone trzema sposobami daje więc podobny wynik: jest wyższe u Giz., niż u Porc.

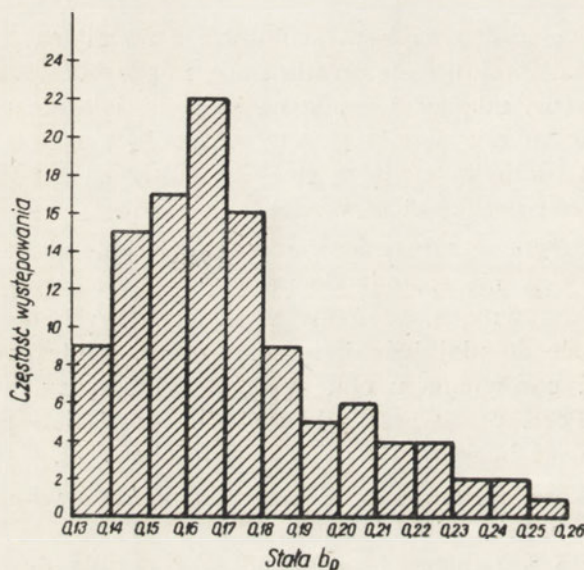
Spotkanie się u jednego i tego samego osobnika dwóch czynników upośledzających usuwanie glikozy ze krwi, a mianowicie lekkiego odchylenia w sprawności nerek i ledwie dostrzegalnego obniżenia zdolności przetwórczej, podnosi do takiej wysokości stałą  $b_p$ , jaką napotyka się u prawidłowego osobnika po wielodniowym głodzie, lub po diecie tłuszczowej. W obszarze  $C_k$  ponad pułapem najwyższego zużywania glikozy nawet lekkie niedociągnięcia sprawności w przemieszczaniu bezpowrotnym glikozy ze krwi dają więc wybitne odchylenia w przebiegu krzywej cukru we krwi.

Zachowanie się psa Porc. stanowiło przeciwagę na łatwość występowania wyższych stężeń glikozy we krwi, osobnik ten posiadał niezwykłą wytrzymałość na wysycanie środowiska wewnętrznego glikozą, a więc na bodziec osmotyczny zewnątrzkomórkowy. Przy końcu 6 godziny do-

wozu glikozy z prędkością 9 g na kg/godz wystąpiło u niego stężenie  $C_k$  3122, 3194 i 3412 mg/100 ml krwi. Klinicznie dochodziło do stadium niepokoju i oczopląsu. U wszystkich innych osobników tak znaczne stężenia doprowadzały do stanu nieodwracalności. U Porc. jednak objawy te przechodziły, nie pozostawiając śladów.

#### 4. Stała $b_p$ z rozmaitych punktów widzenia

Zanim w ostatnim ustępie niniejszego rozdziału zostanie podany materiał ostatecznie przyjęty dla określenia wzorcowej stałej  $b_p$ , należy rozpatrzeć z kilku punktów widzenia cały zespół 112 doświadczeń:



Rys. 6. Rozrzut stałej  $b_p$ , obliczonej na dowóz glikozy według powierzchni ciała dla 112 doświadczeń. Psy spoczywające

1) Najczęściej zjawia się wartość  $b_p$  od 0,16—0,17 (Rys. 6). Spadek na lewo kończy się już na 0,13, natomiast na prawo rozciąga się aż do 0,26, co stanowi szczególne zadanie do rozwiązania.

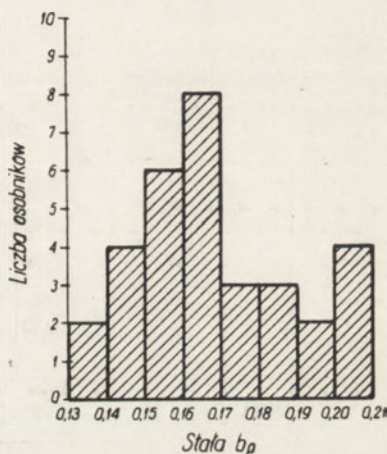
2) Gdy dla każdego psa z osobna przyjąć średnią stałą  $b_p$  ze wszystkich wykonanych na nim oznaczeń, wtedy również największa liczba osobników przypada na stałą  $b_p$  między 0,16 a 0,17 (Rys. 7). Na lewo występuje ponowne podniesienie ich liczby dla wartości 0,20—0,21.

3) Im niższy wskaźnik odżywienia, tym wyższa stała  $b_p$ :

Liczba oznaczeń	Stała $b_p$	Wskaźnik odżywienia
11	0,1967	0,27 — 0,28
12	0,1851	0,28 — 0,29
35	0,1745	0,29 — 0,30
31	0,1603	0,30 — 0,31
14	0,1609	0,31 — 0,32

U osobników dobrze odżywionych, w obrębie pasa *optimum* i nieco powyżej, a więc pomiędzy 0,29 a 0,32 wartość  $b_p$  utrzymuje się pomiędzy 0,1609 a 0,1745.

Rys. 7. Rozrzut stałej  $b_p$  dla różnych osobników. Przyjęto przeciętną stałą  $b_p$  dla każdego osobnika bez względu na liczbę wykonanych na nim doświadczeń. Przeważnie dieta nr 1, oraz dieta nr 2



4) Poziom cukru we krwi tuż przed dowozm glikozy zdaje się nie wpływać na stałą  $b_p$ , w obrębie tych wahań, jakie wykazuje zwierzę prawidłowe na czczo, w 24 godzinę po ostatnim posiłku.

5) Pora roku nie wykazuje żadnego wybitniejszego wpływu na stałą  $b_p$ . W miesiącach letnich oraz w okresie rui nie wykonywano doświadczeń.

6) Szczególnie ważny okazał się związek przyrostu glikozy we krwi w pierwszej półgodzinie dowozu z powierzchnią ciała oraz z pokrewnymi jej funkcjami wagi ciała. Wymaga on szczegółowego omówienia.

*Poszukiwanie najlepszego sposobu wyrażenia dawki glikozy.* Gdy porównano ze sobą stałe, otrzymane czterema sposobami ( $b_p$ ,  $b_{W^{34}}$ ,  $b_{W^{0,73}}$ ,  $b_W$ ), okazało się (Tabl. 2), że obliczone dla całego zespołu 112 doświadczeń, posiadają one podobny współczynnik zmienności (16,21%, 14,22%, 14,16%, 15,00%). Wynik ten wydał się błędny, gdyż przeczył faktom, dostrzeganym w tych i innych badaniach [27—30, 34] na każdym kroku,



a mianowicie, że ocena przyrostu glikozy we krwi w stosunku do dawki, wyrażonej na 1 kg wagi ciała, nie jest miarodajna dla oceny usuwania glikozy ze krwi, jak nie jest nią i dla wielu innych zjawisk w obchodzeniu się ustroju z glikozą, wprowadzaną jednostajnie dożylnie. Natomiast wierniej odpowiada faktom określenie dawki na jednostkę powierzchni ciała, lub na inne pokrewne wartości. Jeden z dowodów na to przedstawiono na rys. 8.

T a b l i c a 2

Całkowity zespół danych: 112 doświadczeń, 32 psy (♀). Jednostajny dowóz glikozy przez żyłę z różnymi prędkościami. Przeciętne stałe początkowej minutowej zmiany stężenia glikozy we krwi, wyrażone w czworaki sposób, według ogólnego wzoru:

$$\text{Stała} = \frac{\Delta C_{kvj}^{0'-30'}}{t \cdot \text{Dowóz glikozy}}$$

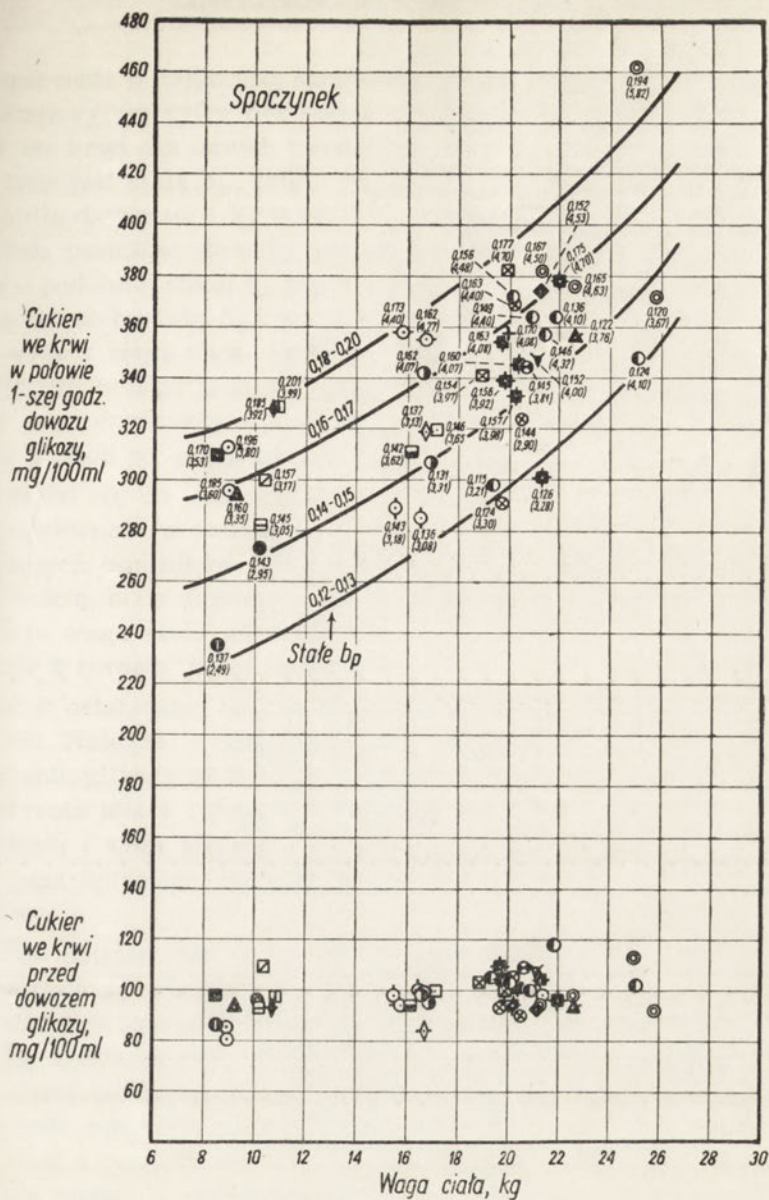
Dawka glikozy obliczona		Stała				Odchylenie wzorcowe, $\sigma$	Współczynnik zmienności, %
według wzoru	na jednostkę	znak	przeciętna	minimum	maximum		
$\frac{I}{P}$	m <sup>2</sup> powierzch.	$b_p$	0,1723	0,1305 — 24,3 %	0,2523 46,8 %	0,0279	16,21
$\frac{I}{W^{3/4}}$	kg <sup>3/4</sup> wagi	$b_{W^{3/4}}$	1,968	1,399 — 28,9 %	2,871 45,9 %	0,280	14,22
$\frac{I}{W^{0,73}}$	kg <sup>0,73</sup> wagi	$b_{W^{0,73}}$	1,894	1,461 — 22,9 %	2,783 46,9 %	0,268	14,16
$\frac{I}{W}$	kg wagi	$b_W$	3,523	2,313 — 34,3 %	4,700 33,5 %	0,528	15,00

I — oznacza całkowitą ilość glikozy wstrzykniętą psu na godzinę,

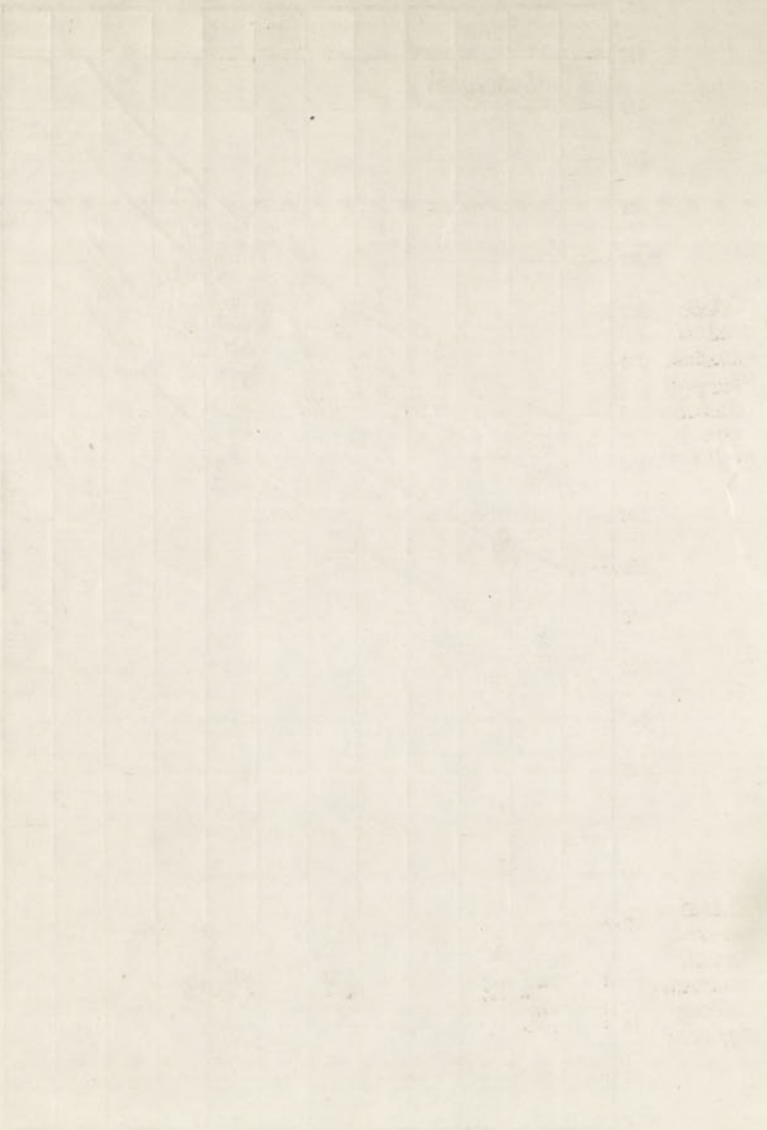
P — powierzchnię ciała, W wagę ciała. Sposób uzyskania stałych w rozdziale 1. „Wyników”  
Odsetki pod minimum i maximum oznaczają odchylenie od przeciętnej.

Gdy psom wprowadzać jednakową ilość glikozy na wagę ciała, a mianowicie 2 g na kg/godz, wywołane dowozem stężenie cukru we krwi w połowie pierwszej godziny dowozu jest coraz wyższe w miarę, jak wzrasta ich waga ciała. Miały one przed dowozem prawidłowe stężenie cukru we krwi (Rys. 8). Wartości w połowie pierwszej godziny występują w postaci pasa, a więc są nieco rozrzucone, co jest w części wywołane tym, że przygotowanie dietetyczne wahało się nieco co do stopnia przewagi węglowodanów w pokarmie od diety zawierającej tylko czystą sacharozę, albo sacharozę z niewielkim dodatkiem mięsa, poprzez dietę nr 2 aż do diety nr 1. Stopień zmienności diety był dość równomierny poprzez całą długość pasa, odpowiadającą rozpiętości wagi ciała.

Jest rzeczą widoczną, że pas wartości zawiera na dolnym brzegu punkty o najlepszej sprawności w usuwaniu glikozy ze krwi, zaś na gór-



Rys. 8. Wpływ rozmiaru osobnika (wagi ciała) na usuwanie glikozy ze krwi, którą dostarczano stale z prędkością 2 g na kg wagi ciała na godz. Stężenie cukru we krwi przed dowozem glikozy i w połowie pierwszej godziny dowozu u 25 psów(♀) 45 doświadczeń. Przy każdym punkcie, otrzymanym podczas dowozu glikozy, podano stałą  $b_p$  bez nawiasu i stałą  $b_w$  w nawiasie. Punkty o podobnej stałej  $b_p$  połączone liniami. Wzdłuż tych linii, przy jednakowej stałej  $b_p$ , stała  $b_w$  wzrasta wraz z wagą ciała. Różne warstwy stałej  $b_p$  zostały wywołane odmiennymi dietami: im niższa warstwa  $b_p$ , tym większa przewaga węglowodanów w diecie. Najwyższa warstwa przy stosowaniu diety nr 1. Włączono 18 doświadczeń na 6 psach, które zachodzą tylko w tym wykresie.



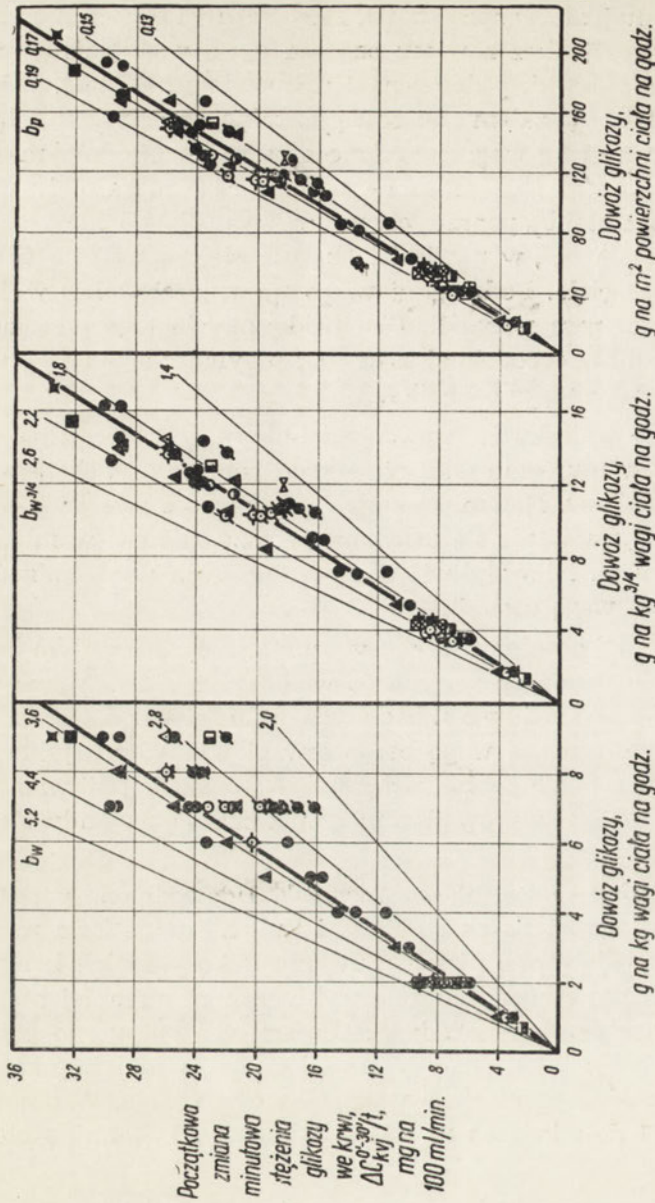
nym oznaczenia o najgorszej sprawności. Przy każdym oznaczeniu umieszczono dwie cyfry: cyfra bez nawiasu oznacza  $b_p$ , a więc stałą przyrostu glikozy we krwi dla dawki, podanej na  $1 \text{ m}^2$  powierzchni ciała, zaś cyfra w nawiasie jest stałą  $b_w$ , zatem odnosi się do takiegoż przyrostu, ale obliczonego dla dawki na  $1 \text{ kg}$  wagi ciała danego osobnika. Na dolnym brzegu strumienia punktów stała  $b_p$  jest przeważnie bardzo niska. Gdy wybrać punkty o podobnej stałej  $b_p$  poprzez cały zakres wag ciała, i odczytać przynależną do nich stałą  $b_w$ , w nawiasie, okazuje się, że wzrasta ona wybitnie wraz z wagą ciała. Podobne zjawisko ujawnia się także w środku i na górnym brzegu pasa wartości. Dla uwidocznienia tego przeciętno krzywe poprzez punkty o podobnej stałej  $b_p$ ; przynależne stałe  $b_w$  wzmagają się w nich wraz z wagą osobnika.

Dochodzi się do wniosku że prawdopodobnie na ogół  $b_p$  jednostajnie oddaje sprawność w usuwaniu glikozy ze krwi poprzez całą skalę wielkości badanych osobników. Natomiast stała  $b_w$  wykazuje swą zwiększającą się wartością, o ile zmniejsza się usuwanie glikozy ze krwi w miarę, jak potężnieje waga ciała. Niewątpliwie stała  $b_p$  pozwala więc ominąć błąd związany z rosnącą wagą osobnika.

Błąd w ostatecznej ocenie, zawartej w tabl. 2, polegał na złym doborze materiału. Należało wymagać w tych doświadczeniach, by: 1) sprawność w usuwaniu glikozy ze krwi była u badanych osobników podobna, 2) badane zwierzęta miały różną wagę bez przewagi wyników uzyskiwanych na jednych i tych samych osobnikach, 3) ich wskaźnik odżywienia stał blisko pasa *optimum*. Po wprowadzeniu tych wskazań wyłoniły się dane wzorcowe.

*Prawo powierzchni w statych wzorcowych.* Udowodniono poprzednio, że większość doświadczeń na psach Porc. i Zul. nie przyniosła wyników prawidłowych: posiadały one niższe usuwanie glikozy ze krwi, niż inne osobniki. Wartości psa Andro. należało wykluczyć co najmniej ze względu na dietę nr 2, którą był karmiony. Oprócz tego odrzucono parę pojedynczych oznaczeń z tych samych powodów, co u dwóch pierwszych psów, oraz z powodu zbyt niskiego wskaźnika odżywienia. W ten sposób pozostała grupa 71 doświadczeń na 25 osobnikach (♀), karmionych dietą nr 1.

Zespół tych danych przedstawiono na rys. 9. Początkową zmianę minutową rozmieszczono w stosunku do dawki glikozy, określonej w trojaki sposób. Rozproszenie punktów jest największe, gdy podać ją na  $\text{kg}$  wagi ciała, znacznie mniejsze, gdy obliczyć ją na  $\text{kg}^{3/4}$  lub na  $\text{kg}^{0.73}$ , a najmniejsze, gdy ją określić na powierzchnię ciała. W tabl. 3 podano współczynnik zmienności dla starych, obliczonych tymi 4-ma sposobami. Wynika z niej, że przeciętna stała  $b_p$  wynosi  $0,1631$  (na  $\text{m}^2$ ), a więc jest niższa, niż



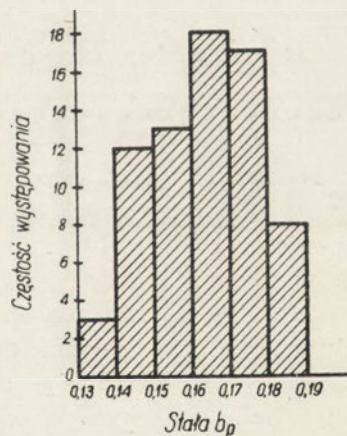
Rys. 9. Zależność usuwania glikozy ze krwi od wagi osobnika, przy wzorcowej sprawności usuwania glikozy. Trzy sposoby wyrażenia dawki glikozy a ułożenie punktów początkowej zmiany minutowej stężenia glikozy we krwi. Wzorcowy zespół danych: 25 psów (♀) 71 doświadczeń. Dieta nr 1. Linie grube: według przeciętnych z tabl. 3. Linie cienkie przebiegają przez punkty o jednakowych stałych.

Tablica 3

71 doświadczeń, uznanych za wzorcowe, na 25 psach (♀) prawidłowych, spoczywających. Przeciętny wskaźnik odżywienia 0,300, przeciętna temperatura w odbytnicy 38,6°. Stałe przyrostu stężenia glikozy we krwi w pierwszej półgodzinie jednostajnego dowozu tego cukru z różnymi chżyściami. Obliczenia dowozu glikozy czterema sposobami, jak w tabl. 2. Według przeciętnych b niniejszej tablicy wykreślono proste na rys. 9

Dowóz glikozy wyrażony na jednostkę	Stała				Odchylenie wzorcowe	Współczyn- nik zmien- ności, %
	znak	przeciętna	minimum	maximum		
m <sup>2</sup> powierzchni	$b_p$	0,1631	0,1324 — 18,8 %	0,1891 16,0 %	0,0140	8,59
kg <sup>3/4</sup> wagi	$b_{W^{3/4}}$	1,910	1,538 — 19,5 %	2,237 17,1 %	0,183	9,55
kg <sup>0,73</sup> wagi	$b_{W^{0,73}}$	1,824	1,497 — 17,9 %	2,126 16,5 %	0,169	9,29
kg wagi	$b_W$	3,421	2,313 — 32,4 %	4,700 37,4 %	0,575	16,80

w tabl. 2 i waha się w granicach od 0,132—0,189, ze współczynnikiem zmienności 8,59%. Podobny wynik daje obliczenie na kg<sup>3/4</sup> ze współczynnikiem 9,55% i na kg<sup>0,73</sup> ze współczynnikiem 9,29%. Natomiast przy obliczeniu na kg wagi ciała współczynnik zmienności jest blisko 2-krotnie



Rys. 10. Częstość występowania rozmaitych wielkości stałej  $b_p$  we wzorcowym zespole danych. Psy spoczywające, dieta nr 1

wiekszy, 16,80%. Przeciętne stałe z tabl. 3 posłużyły do wykreślenia krzywych. Z rozmieszczenia punktów dla dawki na wagę ciała na rys. 9 wcale nie wynika, by krzywa najlepiej przebiegająca przez punkty była prostą, lecz wynika to niedwuznacznie z dwóch innych części wykresu.

Z wyżej postawionych wymagań wynika, że najlepiej dałoby się wyświetlić sprawę zależności stałej od wielkości osobnika wtedy, gdy rozśiew punktów jest największy w związku z różną wielkością osobników. Na rys. 9 jest on najznaczniejszy dla 2 g, 7 g i 9 g na kg/godz. Współczynnik zmienności jest dla tych dawek: na powierzchnię ciała 7,33%, na wagę do 3/4 9,62%, zaś wprost na wagę ciała aż 19,41%.

Rys. 10 wykazuje regularne rozmieszczenie stałej  $b_p$  w grupie doświadczeń wzorcowych.

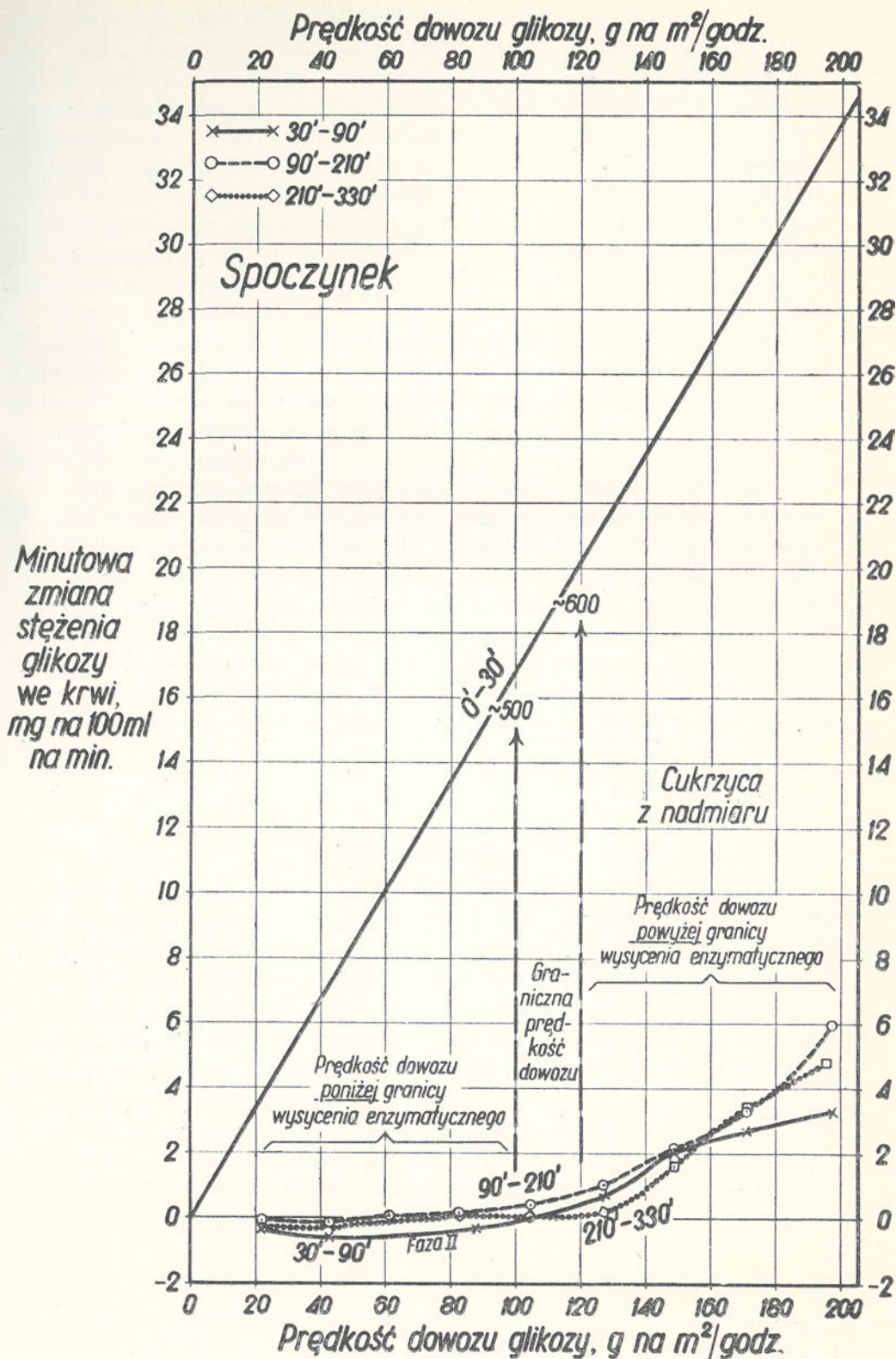
Przeciętna stała na  $\text{kg}^{3/4}$ , w wysokości  $1,910 \pm 0,183$ , oraz przeciętna na  $\text{kg}^{0,73}$   $2,126 \pm 0,169$  może się okazać pożyteczna, gdyż pozwala na obliczenie poprawnej stałej z samej tylko wagi ciała, a więc i na obliczenia międzygatunkowe.

### 5. Zmiany stężenia glikozy we krwi w dalszych okresach dowozu

Osobliwe cechy początkowego wzrostu glikozy we krwi szczególnie uwydatniają się, gdy je porównać ze zmianą minutową w dalszych okresach jednostajnego dowozu, obliczoną w podobny sposób: Od końcowego stężenia cukru we krwi w mg/100 ml odejmowano jego stężenie na początku rozpatrywanego odcinka i dzielono przez czas jego trwania w minutach. Punkty przynależące do tego samego okresu, ale uzyskane przy różnych  $V_i$ , połączono ze sobą krzywymi. W ten sposób otrzymano  $\Delta C_{kwi}/t$  dla trzech dalszych okresów: od 30 do 90, od 90 do 210 i od 210 do 330 minuty dowozu (Rys. 11). Gdy krzywe te zestawimy z krzywą okresu zapoczątkowującego ( $0'$ — $30'$ ), można z wartości otrzymanej w połowie pierwszej godziny dowozu odczytać przypuszczalny przebieg prawidłowych krzywych cukrowych w dalszych godzinach dowozu. Jest to więc punkt zaczepu dla przewidywania dalszego przebiegu doświadczenia.

Na rys. 11 uderza przede wszystkim to, że zmiany stężenia glikozy we krwi w dalszych trzech okresach są podobne do siebie w obrębie każdej z osobna  $V_i$ , tak, że tworzą u dołu wykresu splot krzywych, których zmiana minutowa jest jednak stosunkowo bardzo niewielka w porównaniu z początkową. Początkowa zmiana minutowa posiada szeroko rozpostarte widmo, które pozwala na dość dokładne zróżniczkowanie. Warto porównać na rys. 11 rozmaite pasma tego widma  $\Delta C_{kwi}^{0'-30'}/t$  ze zmianą minutową w dalszych okresach, odniesioną do parametru  $V_i$ :

*Dowóz poniżej granicy wysycenia enzymatycznego.* Przy  $V_i$  20—100 g na  $\text{m}^2/\text{godz}$  krzywe zmiany minutowej dla dalszych trzech okresów dowozu (od  $30'$ — $330'$ ) przebiegają w pobliżu linii zerowej (Rys. 11). Jedyne wyjątek stanowi okres od 30 do 90 minuty, kiedy w związku z wystąpieniem fazy II opada stężenie glikozy we krwi, a zatem zmiana minutowa



Rys. 11. Unaocznienie różnicy między zmianą minutową stężenia glikozy we krwi (V. jugularis ext.) w okresie zapoczątkowania (0'—30' dowozu glikozy), a między dalszymi okresami dowozu: od 30'—90', od 90'—210' i od 210'—330'. Te same 4 psy spożywające, co na rys. 1.



jest ujemna (tu okazuje się korzyść z nazwania jej „zmianą minutową”, gdyż bywa czasem ujemna). Natomiast w dwóch dalszych okresach tego pasa  $V_i$  istnieje tak znaczna równowaga między procesami usuwania glikozy, a jej dowozem, że stężenie glikozy we krwi utrzymuje się niemal na stałym poziomie. Stąd wniosek, że przy  $V_i$ , które nie przekraczają początkowej zmiany minutowej około 16,9 mg na 100 ml/min (= przyrostowi o około 500 mg/100 ml w połowie pierwszej godziny dowozu); dalszy przebieg krzywych cukru we krwi w ciągu pięciu godzin utrzymuje się na tym samym poziomie, do którego został doprowadzony przez początkową zmianę minutową.

*Granica.* Pomiędzy  $V_i$  100 a 120 g na  $m^2$ /godz mniej więcej znajduje się pasmo graniczne, przy którym układy enzymatyczne u osobników prawidłowych zbliżają się do stanu wysycenia podłożem. Odpowiada to początkowej zmianie minutowej pomiędzy 16,9 a 20,3 na 100 ml/min (= przyrostowi glikozy we krwi w połowie pierwszej godziny pomiędzy około 500 a 600 mg/100 ml).

*Dowóz powyżej granicy wysycenia.* Wreszcie powyżej  $V_i$  120 g na  $m^2$ /godz zostaje wyraźnie przekroczony stan równowagi między dowozem a najwyższą sprawnością w usuwaniu glikozy ze krwi (Rys. 11). Być może przyczynia się do tego również przekroczenie pułapu oczyszczania krwi z glikozy przez nerki (por. rozdział 3. „Wyniki”), ale w głównej mierze jest odpowiedzialne wysycenie enzymatyczne, przynajmniej dla tej grupy badań. Przy zwiększaniu się  $V_i$  krzywe bieżącej coraz bardziej stromo ku górze, zbliżając się do kąta nachylenia, jaki posiada początkowa zmiana minutowa. Dalsze części krzywych nie zostaną przedstawione na tym miejscu.

## OMÓWIENIE

### UWAGI OGÓLNE

Pomysł przebadania zapoczątkowującego okresu w przebiegu jednostajnego dowozu glikozy został urzeczywistniony na wykonanym już zbiorze doświadczeń, których nigdy nie prowadzono z tą myślą, że kiedykolwiek ich okres początkowy będzie przedmiotem osobnych badań. Wprost przeciwnie, na okres ten zwracano najmniej uwagi, gdyż uważano, że dopiero po wytworzeniu się równowag w dalszym ciągu dowozu zjawiska stają się miarodajne dla badacza, zwłaszcza, że dowóz glikozy prowadzono przez szereg dalszych godzin.

W miarę jednak, jak przy zgłębianiu zapoznanego okresu poczęły się wynurzać prawidłowości i odstępstwa, wyłoniła się konieczność wyjaśnienia wielu danych przy pomocy nowych doświadczeń, wykonanych bardziej udoskonalonymi sposobami.

Możliwości tej został jednak autor całkowicie pozbawiony.

Wobec tego postanowiono nie uronić żadnego faktu, choćby się wyłamywał z szeregu innych, gdyż każdy z nich mógł rzucić światło na całokształt danych. Stąd przyszło do mozolnej analizy spostrzeżeń na psie Porc., oraz do przytoczenia wszelkich dostępnych cech, które mogły pomóc w ocenie wyników (wskaźnik odżywienia, powierzchnia, waga, temperatura w odbyticy).

Okres zapoczątkowujący będzie tematem szeregu dalszych doniesień, w których zostanie omówiona szerzej jego dynamika. Tymczasem zostaną naświetlone tylko fakty dotąd opisane.

Z technicznego punktu widzenia szczególnym uproszczeniem w obecnie przedstawianych danych jest, że podczas pierwszej półgodziny dowozu wprowadzano wyłącznie około 20% roztwór macierzysty glikozy bez dodatkowego dowozu wody. W ten sposób objętość wprowadzanej glikozy i wody była proporcjonalna do wagi ciała, którą kierowano się przy dawkowaniu początkowym. Zaopatrzenie w wodę w tym okresie będzie omówione w dalszym sprawozdaniu, podobnie, jak i stopień rozcieńczenia osocza oraz wydalanie moczu.

Jak wynika z wielu naszych doświadczeń w ciągu pierwszej półgodziny dowozu glikozy jej stężenie we krwi wzrasta nie linijnie, ale w postaci złożonej krzywej wykładniczej [6], której nachylenie coraz bardziej łagodnieje w miarę upływu czasu, co stosuje się również do  $V_i$  niższych [13, 12], niż użyte w obecnych badaniach. Krzywa ta jest wypadkową nie tylko oporów i potężniejących ułatwień, które nastęrcza każdy narząd przejściu weń obu składników wprowadzanego roztworu, ale także jego osmotycznego działania, które wciąga do krwi wodę w rozmaitym stopniu z różnych narządów [18].

Na pewien szczegół należy położyć nacisk. W obecnych badaniach w danych warunkach przygotowania dietetycznego, nawet u najsilniej przyswajających, spoczywających psów nie zdarzyło się nigdy nawet przy najniższych  $V_i$ , by szczyt krzywej cukru we krwi wystąpił wcześniej, niż w połowie pierwszej godziny dowozu, także i wtedy nie, gdy potem następował bardzo wybitny spadek krzywej, związany z fazą II. Gdyby szczyt krzywej pojawiał się wcześniej, a punkt w połowie pierwszej godziny znajdował się już na ramieniu zstępującym krzywej nie można by w poprawny sposób obliczyć stałej  $b_p$ . Nawet przy bardzo niskich  $V_i$  krzywa cukru we krwi jeszcze wzrasta krócej lub dłużej po 30 minucie dowozu glikozy podczas dalszego wstrzykiwania.

Podobnie, jak w dawniejszych doniesieniach [27—32, 34], oparto się w obliczeniach wyłącznie na przyroście cukru we krwi ponad poziom jego, oznaczony tuż przed dowozem glikozy, jak to się zresztą stosuje również

szeroko w piśmiennictwie. Można przeciw temu wysunąć zastrzeżenia przy tak subtelnym pomiarach, jak stałej  $b_p$ . Albowiem odejmowana wartość cukru we krwi wstępnej to głównie wytwór wątroby, która przestaje wydzielać do krwi glikozę u psa już przy całkowitym stężeniu cukru we krwi 150—200 mg/100 ml, czyli przy  $\Delta C_{kvj}$  około 50—100 mg/100 ml [3]. Wobec tego przy wszystkich zastosowanych  $V_i$ , już w ciągu pierwszej półgodziny dowozu, wątroba przestaje wyrzucać do krwi glikozę. Zdawać by się mogło, że w ten sposób znika powód do brania w rachubę jej czynności w postaci odejmowania cukru wstępnego, skoro ta czynność już nie odbywa się. Okazało się jednak [21], że nawet wtedy, gdy po wstrzyknięciu glikozy, czynność ta zostaje zahamowana, wytworzona uprzednio glikoza pozostaje we krwi ponad godzinę bez zmiany stężenia, widocznie oszczędzana, gdyż w swych działaniach zostaje zastąpiona przez wstrzyknięty z zewnątrz cukier. Prócz tego i ta czynność wątroby jest prawdopodobnie osobniczo zmienna, wobec czego nie byłoby stosowne użycie schematycznych poprawek. Błąd, wywiązujący się ze stosowania przyrostu cukru we krwi ponad poziom wstępny, byłby większy dla niskich  $V_i$  niż dla wysokich. W warunkach fizjologicznych wątroba wydziela do krwi 0,16 g glikozy na kg/godz [3]. Jest to 1/6 najniższej z zastosowanych  $V_i$  (1,00 na kg/godz). Przy najniższych  $V_i$  błąd ten mógł wpływać na obniżenie stałej  $b_p$ , jednakowoż w miarę wzrostu  $V_i$  tracił na znaczeniu.

ZNACZENIE WYKRYTEGO ZWIĄZKU MIĘDZY STĘŻENIEM POCZĄTKOWYM GLIKOZY  
WE KRWI A DAWKĄ TEGO CUKRU

W jakikolwiek sposób wyrazić przyrost glikozy we krwi w ciągu pierwszej półgodziny dowozu, czy jako przyrost na pół godziny,  $\Delta C_{kvj}^{0'-30'}$ , czy też na minutę  $\Delta C_{kvj}^{0'-30'}/t$ , streszcza on zachowanie wprowadzanej glikozy; z jednej strony mówi o jej nagromadzeniu się we krwi i płynach stojących z nią w równowadze, z drugiej zaś o usuwaniu jej ze krwi i faz stojących z nią w związku.

Jeżeli w obecnych badaniach występują przy tym jakieś prawidłowości, należy mieć na względzie, że obejmują one znaczną skalę prędkości dowozu, od takich, jakie zachodzą fizjologicznie, aż do krańcowo wysokich, które po paru godzinach dowozu doprowadzają zwierzę do zgonu. Mogą więc posiadać odpowiednio rozległe znaczenie. W danych z piśmiennictwa stosowano ostatnio przeważnie niskie dawki glikozy wprowadzane dożylnie już to naraz szybko [3, 5a, 8, 12], już to jednostajnie [13, 12] przez nieco dłuższe okresy czasu, które albo nie doprowadzały do cukromoczu, albo tylko do cukromoczu nieznacznego stopnia. Uzupełniają one od dołu użytą w obecnym doniesieniu skalę  $V_i$ .

Przyrost glikozy we krwi w zapoczątkowującym okresie jednostajnego dowozu glikozy posiada następujące właściwości:

### 1. Proporcjonalność do dowozu

Gdy wykreślić przyrosty stężenia glikozy we krwi w stosunku do dowozu glikozy (Rys. 1, 3, 9), umieszczonego na osi odciętych, leżą one w przybliżeniu na linii prostej, pod pewnym nachyleniem do osi odciętych, niezależnie od tego, na jaką jednostkę ustroju dowóz się wyrazi (Rys. 9). Są więc na szerokiej przestrzeni zastosowanych chyżości dowozu proporcjonalne do niego.

Prosta ta nie wykazuje żadnych załamania, gdy ją wyznaczyć wielopunktowo u jednego i tego samego osobnika (Rys. 1). Dowodzi to, że nawet, gdy stężenie glikozy we krwi dojdzie do wartości, przy których mógłby nastąpić stan nasycenia enzymatycznego (pułap przetwarzania), krzywa nie staje się bardziej stroma. Widocznie stężenie glikozy we krwi jeszcze nie dowędrowało do środowiska stykającego się z każdym przyczółkiem enzymatycznym, czynnym przetwórczo, tak, by krańcowe natężenie jego czynności mogło się odbić we krwi bardziej stromym przyrostem stężenia glikozy we krwi. Zatem w tym okresie doświadczenia krew jeszcze nie odzwierciedla stopnia natężenia sprawności mas enzymatycznych.

### 2. Stosunek prostej do punktu zerowego osi współrzędnych

Przy zastosowaniu znacznej rozpiętości szybkości dowozu glikozy punkty przyrostu stężenia wytyczają prostą, która u spoczywającego prawidłowego osobnika przebiega dokładnie lub prawie dokładnie przez skrzyżowanie osi współrzędnych (Rys. 9).

Oznacza to, że w chwili rozpoczęcia wprowadzania nie zostaje uruchomiony żaden czynnik, który by czy to przyspieszał (np. insulina), czy to hamował (np. adrenalina) usuwanie glikozy ze krwi. Być jednak może, że wywiązują się oba rodzaje czynników, ale ich wypadkowa nie odchyła prostej od punktu wyjścia osi, w pierwszej półgodzinie wlewania glikozy. Sam zabieg wstrzykiwania dożylnego i związane z nim urazy nie zdają się doprowadzać do przemieszczenia prostej. Proporcjonalność do dowozu zaczyna się więc u zera.

Szczególne znaczenie tego szczegółu kinetycznego wystąpi w dalszych doniesieniach, w których zostaną uwidocznione działania, przemieszczające prostą. Przykład taki znajduje się i w obecnym doniesieniu na rys. 2 (psy Porc. i Giz.).

### 3. Zależność stosunku stężenie/dawka od wielkości osobnika

Zagadnienie, czy glikoza jest usuwana ze krwi w proporcji wprost do wagi ciała, czy też do czegoś, co wzrasta znacznie powolniej, niż waga

ciała, posiada poważne znaczenie biologiczne. Starano się je wyświetlić w obecnym doniesieniu dla początkowego okresu dowozu, gdyż było to ważne dla ujęć ilościowych.

Dotychczas przede wszystkim dla wchłaniania  $O_2$  i funkcji z nim związanych (wytwórczość ciepła, przetwarzania tlenowe) udało się wykryć na rozmaitych poziomach fizjologicznych zależność nie od wagi ciała, lecz od powierzchni ciała, lub takich funkcji matematycznych wagi ciała, które swą wielkością są bliskie wagi ciała, jak  $W^{3/4}$  ( $=W^{0,75}$ ), lub  $W^{0,73}$  [4a, 15, 16]. W ten sposób zużycie  $O_2$ , oznaczone symbolem  $F$ , w postaci równania

$$F = a \cdot W^{0,73} \quad \text{lub} \quad F = a \cdot W^{0,75}$$

stosuje się poprzez świat dojrzałych ssaków najrozmaitszej wielkości. Gdy obliczyć, ile tlenu zużywa jeden kilogram zwierzęcia, okazuje się, że im zwierzę większe, tym mniej tlenu zużywa 1 kg jego wagi ciała, co się uzyskuje z powyższego równania przez podzielenie obu jego stron przez  $W$ . Wtedy czynność, przypadająca na 1 kg wagi ciała równa się

$$\frac{F}{W} = \frac{a \cdot W^{0,73}}{W} = a \cdot W^{-0,27},$$

a według drugiego równania:  $\frac{F}{W} = a \cdot W^{-0,25}$ . Istotnie wiele sił czynnych, które mają łączność z oddychaniem tlenowym, a zawartych w jednostce wagi ciała, zmniejsza się w miarę, jak wzrasta wielkość osobników różnych gatunków. W ten sposób zmniejszają się na 1 kg wagi narządu: wchłanianie  $O_2$  przez skrawki narządów [26], stężenie cytochromu  $c$  [20] i oksydazy cytochromowej [7], dehydrogenazy kwasu jabłkowego [9], glutationu [19] i ilość mitochondriów w wątrobie [22b]. Lecz są i sprzeciwy [2].

Gdy się chce ująć ilościowo zależność między usuwaniem glikozy ze krwi w początkowym okresie dowozu, a wielkością osobnika, występuje, jako czynnik wikłający, druga niewiadoma, a mianowicie *osobnicza sprawność w usuwaniu glikozy ze krwi*, tylokrotnie uwydatniana powyżej. Starano się od jej wpływu uwolnić przy pomocy dwojakiego rodzaju doświadczeń:

a) W zespole zwierząt bardziej jednostajnie przygotowanych i posiadających bardzo podobny odczyn na dowóz glikozy doszło do bardzo wyraźnego poddania się przyrostu glikozy we krwi jednostajnemu prawu (linii prostej), gdy przyrost ten wyrażono na dawkę glikozy, obliczoną dla  $P$ ,  $W^{3/4}$  i  $W^{0,73}$  (Rys. 9, Tabl. 3). Różnice w usuwaniu glikozy ze krwi, które występują u osobników różnej wagi ciała, znikają, gdy przyrost glikozy

we krwi wyrazić na dawkę, odniesioną do powierzchni ciała lub funkcji pokrewnych. Jest to zjawisko podobne, jak to, które dostrzegli badacze dla wchłaniania  $O_2$  u osobników różnej wielkości (Rubner, Richet i inni), przy końcu ubiegłego stulecia.

b) W drugiej grupie doświadczeń wykazano (Rys. 8), że nawet gdy się u prawidłowych osobników wywoła pewną *rozpiętość nateżenia sprawności* w usuwaniu glikozy ze krwi, można oddzielić sprawność przetwórczą od zależności, sprzężonej z wagą osobnika. W tej grupie dawka glikozy na 1 kg wagi ciała była jednakowa dla wszystkich doświadczeń, natomiast przygotowanie dietetyczne było nieco odmienne, w przeciwieństwie do poprzedniego zespołu danych, w których przygotowanie dietetyczne było jednakowe, a dawki były bardzo rozmaite. Okazuje się, że w miarę jak powiększa się waga ciała, cukier we krwi również wzrasta, i to podobnie dla tych osobników, które otrzymywały prawie czysto węglowodanową dietę i miały niską stałą  $b_p$ , np. od 0,11—0,13, jak i dla tych, które w diecie otrzymywały większy odsetek białka i tłuszczu i posiadały  $b_p$  0,14—0,19.

Wyniki ulegają ujednoczeniu i to zgodnie z podawaną dietą, gdy je wyrazić przy pomocy stałej  $b_p$ , a więc na powierzchnię ciała, a nie na wagę ciała.

Niewłaściwość wyrażania przyrostu glikozy we krwi w stosunku do dawki na wagę ciała występuje szczególnie wyraźnie przy porównaniu ze sobą małych osobników, usuwających (i przyswajających) glikozę gorzej, jak Zul. i Porc., z osobnikami większymi, usuwającymi (i przyswajającymi) glikozę szczególnie sprawnie, jak Andro. Przeciętna stała  $b_w$  jest dla wszystkich trzech podobna: 3,859; 3,496 i 3,702, a więc nic nie mówi o wybitnych różnicach między nimi. Różnice wydobywa dopiero na jaw stała  $b_p$ : Zul. 0,2056, Porc. 0,2128, wobec Andro. 0,1466, oraz stała  $b_{w^{3/4}}$ : Zul. 2,263, Porc. 2,377, wobec Andro. 1,825.

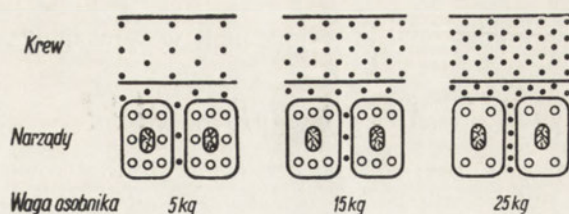
Jakkolwiek pomiędzy powyżej opisanymi zjawiskami dla glikozy a wchłanianiem  $O_2$  istnieje ogniwo łączące w postaci zależności od prawa powierzchni, jednak są i różnice, jak na przykład:

1) Przyrost glikozy we krwi dotyczy czegoś, co gromadzi się w ustroju, a nie czegoś, co w ustroju „znika”. Przyrost glikozy we krwi jest niezużyta resztą i tylko pośrednio wyraża usuwanie ze krwi.

2) Przyrost glikozy we krwi jest oznaczany, jako stężenie. Można by go przełożyć na ilość, gdyby oznaczyć „przestrzeń”, w której przyrost się rozmieszcza.

Przypuszczalne wyjaśnienie, jak przychodzi do gromadzenia się glikozy we krwi w zależności od wagi osobnika, usiłuje dać rys. 12. Siły usuwające glikozę ze krwi, zostały przedstawione w postaci mitochondriów wątroby. Wykazano [22b], że liczba ich w 1 g wątroby zmniejsza się przy

wzroście wagi zwierzęcia (od szczura do wołu) tak samo, jak zużycie  $O_2$ , w proporcji do około  $W^{-0.27}$ . W dwóch stykających się ze sobą układach, krwi i komórkach narządów, krew jest odzwierciedleniem sił komórko-



Rys. 12. Schemat zależności okresu zapoczątkowania od rozmiarów osobnika, gdy jego waga wynosi 5, 15 i 25 kg. Ziarna wewnątrz komórek symbolizują siły usuwające glikozę ze krwi na przykładzie mitochondriów wątroby. Rysunek nie uwzględnia wpływu przepuszczalności, wydalania glikozy z moczem itp. W miarę, jak wzrasta waga ciała, przy wprowadzaniu tej samej dawki glikozy na 1 kg wagi ciała: we krwi stężenie glikozy zwiększa się w proporcji do  $P$  lub  $W^{0.73}$  lub  $W^{0.75}$ , zaś w narządach (komórkach) przypuszczalnie maleje przeciętna ilość sił usuwających glikozę ze krwi na 1 kg wagi, jak  $W^{-0.27}$  lub  $W^{-0.25}$ .

wych, gdy się wprowadza jednakową dawkę glikozy na kg wagi ciała. W miarę, jak powiększa się waga osobników badanych, zmniejsza się ilość sił czynnych w usuwaniu glikozy, przypadająca na jednostkę wagową tkanek, a glikoza we krwi gromadzi się przed ujściami, do których nie ma wstępu.

Gdyby była znana objętość przestrzeni, w jakiej rozmieszcza się dopływająca stale glikoza, można by obliczyć, jaką ilość glikozy odrzuca przeciętnie 1 kg narządów, gdy waga osobników podnosi się. Byłaby to koncepcja pośredniej metody badania allometrycznego czynności narządów u nietkniętych osobników różnej wagi ciała. Metoda bezpośrednia określa wprost czynność wyciętych narządów, lub ich części.

Na podstawie przytoczonych danych niepodobna dokładnie wyodrębnić poszczególnych dróg usuwania glikozy ze krwi i orzec, która z nich i w jakiej mierze może, w danych warunkach, zależeć od wielkości osobnika. Obowiązuje jednak pewna zasada. Gdy nerki są prawidłowo sprawne, niski przyrost glikozy we krwi wywołuje odpowiednio małe wydalanie glikozy z moczem, w myśl zasad diurezy osmotycznej i sprzężonego z nią wydalania ciał rozpuszczonych, podlegających usunięciu. Obniżenie się stałej  $b_p$  oznacza więc w tych okolicznościach wzmożone pobieranie glikozy ze krwi przez tkanki pozanerkowe, zatem wzmożone jej przetwarzanie, co widać na rys. 1 u osobnika Andro. Natomiast przy zjawisku odwrotnym, a mianowicie przy podwyższaniu się stałej  $b_p$ , należy już brać

pod uwagę nie tylko zmniejszenie przetwarzania, ale także upośledzenie czynności nerek.

Niektóre ogólne wytyczne pozwalają na przybliżoną ocenę, w jakim stopniu poszczególne drogi uchodzenia glikozy ze krwi mogą być odpowiedzialne za zależność od rozmiaru ciała i czy istnieją jakieś zasadnicze sprzeczności przeciw udziałowi którejs z nich w tym zjawisku:

#### a) Udział czynności nerek

Niektóre składowe czynności nerek (sączenie kłębkowe, przepływ osocza przez nerkę) wykazują ściślejszą zależność od powierzchni ciała, niż od jego wagi [22a].

Wobec tego, w obecnych badaniach, w przypadkach, odznaczających się wysokim cukromoczem (znaczne prędkości dowozu glikozy), można by przypisać uchodzeniu glikozy przez nerki pewną część zależności od powierzchni ciała. Jednakowoż taka sama zawisłość od powierzchni występuje także wtedy, gdy cukromocz jest niewielki, albo, gdy go prawie wcale nie ma (niskie prędkości dowozu). Jest więc rzeczą wysoce prawdopodobną, że także i druga droga uprzątnięcia glikozy ze krwi, a mianowicie droga przetwórczego zużycia, widocznie stoi w ściślejszej łączności z powierzchnią ciała, niż z jego wagą.

#### b) Udział zależności tlenowych

Na obu głównych drogach usuwania glikozy ze krwi spotyka się zależność od zaopatrzenia tlenowego, a więc zarówno na drodze nerkowej, jak i przetwarzania. W obu przypadkach istnieje możliwość, że udział zależności od przetwarzań tlenowych wniesie ze sobą także zawisłość od powierzchni. Mechanizm nośny wchłaniania zwrotnego glikozy z wnętrza cewek krętych do krwi wymaga podsycania energią, powstającą z utleniania, i zdaje się być proporcjonalny do powierzchni ciała. Jednakowoż dochodzi on do pułapu nasycenia już przy stosunkowo niskim dowozie glikozy, gdy zostaje osiągnięte stężenie cukru w osoczu 200 mg/100 ml („próg”), i od tego stężenia w górę utrzymuje się na szczyblu najwyższego nasycenia, bez objawów „zmęczenia” [22a]). Należy więc przypuścić, że już przy najniższych prędkościach dowozu, tlenowe zużycie glikozy na zaspokojenie tego procesu (o ile ono może w tych warunkach podnieść energię jonu fosforanowego na wyższy poziom) ustala się na pewnym pułapie, który już nie ulega zmianie przy wzrastającym dowozie i stężeniu glikozy we krwi. Jako wartość stała usuwa się spod obecnych rozważań. Co zaś do całkowitego utleniania glikozy, obliczonego przy pomocy sposobów kalorymetrii pośredniej, oznaczenia wykazały, że jest ono nieznaczne w pierwszej pół-



godzinie dowozu w stosunku do całości przetwarzanej glikozy (por. punkt c). Gdyby jednak nawet przetwórczość tlenowa grała wybitniejszą rolę, nie można z góry przesądzić, że zależność zużycia  $O_2$  od powierzchni ciała przyjęta ogólnie dla warunków zwanych podstawowymi (w kilkanaście godzin po ostatnim posiłku, itd.) stosuje się również wtedy, gdy ustrój zostaje obciążony ogromnymi ilościami podłoża. Nie podobna więc przyjąć, że tlenowe przetwarzanie glikozy skupia na sobie wyłącznie, albo nawet w przeważającym stopniu, zależność usuwania glikozy ze krwi od wielkości osobnika, i że inne drogi przetwórczego usuwania od rozmiarów osobniczych nie zależą.

### c) Inne drogi przetwarzania, niż tlenowa

Jak już wykazano [34] pomiędzy drugą a czwartą godziną dowozu glikozy, gdy zjawiska przetwórcze dobiegają do szczytu, pułap najwyższego utleniania glikozy zostaje, praktycznie biorąc, osiągnięty już przy przyroście glikozy we krwi o 300 mg/100 ml ponad poziom podstawowy. Natomiast całkowite przetwarzanie glikozy powiększa się dalej przy dalszym wzroście stężenia glikozy we krwi do 800 mg/100 ml. Do tego więc stężenia powiększa się glikoliza (bezpośrednio oznaczana), odkładanie glikogenu i tłuszczu, mimo braku widocznego potęgowania się utleniania. Wrazem tego zjawiska jest iloraz oksydacyjny, glikoza  $\frac{\text{przetworzona}}{\text{utleniona}}$ , na całym nietkniętym i nieuspionym zwierzęciu, dla tego okresu. Wynosi on od około 2 przy niskich stężeniach cukru we krwi aż do 5,5 powyżej 800 mg/100 ml przyrostu glikozy we krwi. Iloraz ten daje miarę zarówno udziału utleniania w przetwarzaniu całkowitym, jak i zmniejszania się tegoż udziału przy wzroście stężenia cukru we krwi.

Natomiast dla całej pierwszej godziny dowozu glikozy, np. u psa Ordo. (por. dane tabl. 1) iloraz ten jest znacznie wyższy, gdyż najwidoczniej utlenianie rozwija się stosunkowo powolniej, niż inne drogi przetwórczego usuwania glikozy. I tu jednak przy wyższym dowozie i wyższym przeciętnym przyroście glikozy we krwi wykazuje na ogół wyższe wartości, niż przy dowozach niższych, co widać z następującego zestawienia (Tabl. 4).

Udział utleniania jest więc podczas całej pierwszej godziny dowozu wybitnie mniejszy, niż od 2—4 godziny dowozu, a podczas pierwszej połowy pierwszej godziny jest napewno jeszcze mniejszy. Ponieważ prawo powierzchni dla początkowego przyrostu glikozy we krwi stosuje się do wszystkich użytych szybkości wprowadzania, prawdopodobnie obejmuje także przetwarzanie nieutlenianej części glikozy, a więc wszystkie po-

chodne glikozy, które się tworzą w tych warunkach, i to także na tym odcinku prędkości dopływu cząsteczek, na którym coraz bardziej zwiększa się proporcja nietlenowych dróg przetwarzania.

Tablica 4

Udział utleniania glikozy w przetwarzaniu całkowitym. Pierwsza godzina jednostajnego dowozu glikozy przez żyłę z różnymi chyżościami. Pies Ordo. Bliższe dane w tabl. 1

Dowóz glikozy g na m <sup>2</sup> /godz	Przeciętny przyrost glikozy we krwi mg/100 ml	Przetwarzanie g na m <sup>2</sup> /godz	Utlenianie g na m <sup>2</sup> /godz	Iloraz oksydacyjny
21,1	55	17,8	1,7	11
41,2	115	32,9	2,9	12
62,7	186	44,6	3,7	12
85,9	248	56,9	5,0	11
105,8	317	64,5	6,1	12
126,8	410	74,5	4,1	19
148,8	549	61,0	5,5	12
169,4	560	86,4	5,4	16
191,6	632	94,7	6,9	14

Ostatecznie dochodzi się do przekonania, że nie ma drogi uchodzenia glikozy ze krwi, która by nie mogła zależeć od wielkości osobnika w sensie prawa powierzchni. Niniejsze doniesienie wskazuje na prawdopodobieństwo tej zależności u spoczywającego osobnika nie tylko dla stanów najłżejszego obciążenia, ale poprzez wszystkie stany pośrednie aż do takiego obciążenia ( $V_i$ ), które po kilku godzinach trwania kończy się ciężkim wstrząsem i śmiercią zwierzęcia.

Gdy narządy, usuwające glikozę ze krwi, są sprawne, stałe  $b_p$ ,  $b_{w0,75}$  i  $b_{w0,75}$  są niezależnione od dróg usuwania glikozy ze krwi. Są wygodne w użyciu, gdyż w jednej cyfrze charakteryzują sposób obchodzenia się ustroju z glikozą. Nie wymagają osobnego podania: 1) wielkości osobnika, 2) prędkości dostarczania glikozy do krwi, 3) wartości wstępnego stężenia cukru we krwi, oraz 4) stężenia jego po 30 minutach jednostajnego dowozu glikozy.

Jest to bądź co bądź uderzające, że jeszcze po półgodzinnym jednostajnym dowozie roztworu glikozy można we krwi wyśledzić każdy gram glikozy doprowadzonej, gdyż bez względu na to, ile gramów glikozy wprowadza się naraz (w granicach, określonych w obecnym doniesieniu), każdy z osobna gram dowiezionnej glikozy wytwarza taki sam przyrost glikozy we krwi żyłnej, odpływającej z głowy psa (*Vena jugularis ext.*).

#### 4. Kąt nachylenia prostej (stała $b_p$ )

W rozpatrywanym układzie zjawisk kinetycznych okresu zapoczątkowującego kąt nachylenia prostej świadczy o prędkości usuwania glikozy ze krwi i płynów z nią związanych: im większe usuwanie glikozy ze krwi, tym mniejszy kąt nachylenia do osi odciętych, podającej prędkości dowozu. Kąt nachylenia, wyznaczony dla wielu chyżości dowozu u jednego i tego samego osobnika pozwala na subtelne wyodrębnienie poszczególnych osobników nawet, gdy ich wartości znajdują się w obrębie uznanych za wzorcowe (Rys. 1).

Spośród rozległej grupy osobników o wzorcowym nachyleniu prostej, cechującym się przeciętną stałą  $b_p$  równą 0,163, odcina się wyraźnie drobna grupa zwierząt, które mają stałą  $b_p$  przeważnie wyższą, niż 0,190. Są to osobniki klinicznie zdrowe, a nawet czasem niezwykle wytrzymałe (Porc.). Na przykładzie osobnika Porc. opisano szczegółowo ich zachowanie się nie tylko w okresie zapoczątkowującym, ale także w dalszym przebiegu wlewania, a także w długim ciągu doświadczeń na jednym i tym samym osobniku. Przyczyną zwiększenia stałej  $b_p$  zdają się być w tym przypadku zarówno upośledzenie lekkie czynności nerek, jak i ogólnego przetwarzania. Od dawna dostrzeżono takie odczyny u osobników zresztą prawidłowych [36], co zostało potwierdzone przez pracownię K. Thomasa [25]. Nie można na pewno orzec, co doprowadza do takiego stanu.

#### 5. Znaczenie stałej $b_p$ dla przewidywania dalszego przebiegu dowozu glikozy oraz jako sprawdzianu dla porównywania doświadczeń

Krzywa cukru we krwi w pierwszej półgodzinie dowozu stanowi część ramienia wstępującego tego odcinka początkowych krzywych cukrowych, które nazwano niegdyś fazą I [36]. Dopiero po nim rozwiną się zjawiska znamienne dla danej prędkości dowozu. A jednak nie jest to tylko okres wysycania przedpoła tkankowego glikozą, lecz także częściowego zużycia oraz usuwania ze krwi na innej drodze. Stała  $b_p$  zawiera zapowiedź potencjału przetwórczego, jaki będzie panował w dalszej części 6-godzinnego wlewania (Rys. 2, 5) i w znacznej mierze sprawności przetwórczej, która będzie istniała w ciągu znacznej części życia psa (Rys. 1, 2). Ale także i z innych powodów stała  $b_p$  jest użyteczna. Pozwala ona bowiem ocenić, z krótkiego początkowego odcinka dowozu, zdatność danego zwierzęcia do doświadczeń, możliwości dalszego przebiegu dowozu, pozwala przewidzieć, kiedy wystąpią oczekiwane objawy, wysycenie enzymatyczne, pulpy poszczególnych czynności, nieodwracalność itd.

Wysoka stała  $b_p$  stanowi ostrzeżenie, że u danego osobnika krzywa cukru będzie przebiegać wyżej, niż u osobników wzorcowych, że szybciej

przekroczy pułapy usuwania glikozy ze krwi, a wtedy szybciej dojdzie do nieodwracalności u osobnika przeciętnego (Zul.), choć osobnik wyjątkowo odporny (Porc.) może znieść bez szkody nawet stężenia cukru we krwi, wywołujące zwyczajnie nieodwracalność. Wysoka stała  $b_p$  nie musi być właściwością stałą danego osobnika i może się zdarzyć, że opadnie do wielkości wzorcowej. Łatwo sobie bowiem wyobrazić, że stan, który doprowadza do wysokich stałych  $b_p$  może ulegać wahaniom.

Jeszcze z innych względów stała  $b_p$  okazała się cenna, a mianowicie przy ocenie różnorodnego materiału doświadczalnego podczas wlewań dożylnych glikozy. U osobników różnej wielkości dobieranie doświadczeń wykonywanych wśród stosowania różnych  $V_i$ , według wysokości stałej  $b_p$  wprowadza porządek tam, gdzie się zdawało, że się go nie uzyska, i pozwala zaoszczędzić trudu doświadczalnego długotrwałych wlewań dożylnych [24].

### 6. Poprawność oznaczenia stałej $b_p$

Stała  $b_p$ , oznaczona przy pomocy niskich wartości obu parametrów, które się na nią składają, a mianowicie  $\Delta C_{kvj}^{0'-30'}/t$  i  $V_i$  posiada większy błąd doświadczalny, niż przy wysokich wartościach  $V_i$ . Prawdopodobnie należy pokładać większe zaufanie w stałe  $b_p$  oznaczone przy wyższych  $V_i$ , gdy w ustroju dochodzi w dalszym przebiegu dowozu do poziomu glikozy we krwi, który już wywołuje najwyższe przetwarzanie, a jeszcze nie doprowadza do pułapu najwyższej sprawności nerkowej. Stała  $b_p$  powinna być oznaczona w warunkach, stosowanych przy oznaczaniu podstawowej wymiany gazowej. Zwierzę nie powinno wykazywać trwogi, drżenia, ruchów mięśniowych, ziajania itp. Wszelkie stany wzruszeniowe odbijają się przede wszystkim na początkowym okresie dowozu.

### WNIOSKI OGÓLNE

1) Zastosowano sposoby allometryczne do zapoczątkowującego wysycania ustroju glikozą w szczególnych warunkach: przy szybko zmieniającym się składzie nietkniętego prawidłowego ustroju, karmionego w rozmaitym stopniu podłożem łatwo przetwarzalnym. Wykryto wzajemny stosunek między dwiema częściami ustroju: a) z jednej strony zasobem sił, związanych z komórkową częścią ustroju, które zabierają glikozę ze środowiska wewnętrznego, b) z drugiej zaś strony szybkością gromadzenia się glikozy w tymże środowisku. Wykazano, że w miarę, jak wzrasta rozmiar osobnika, pomniejsza się zasób sił, przypadający na jednostkę wagi ciała, wskutek czego glikoza odpowiednio gromadzi się przed ujściami dla niej zamkniętymi.

2) Już zatem w pierwszej półgodzinie jednostajnego dowozu glikozy przyrost jej we krwi jest nie tylko funkcją narzuconych warunków i osobniczej sprawności, ale również oprócz tego wynikiem ładunku sił, którym jest obdarzona jednostka wagi ciała według praw, przywiązanych do rozmiarów osobnika (np.  $W^{-0.25}$  do  $W^{-0.27}$ ), a nie do formuły jego odczynu na wprowadzane podłoże.

3) Z badań powyższych wyłania się szczególny rodzaj więzi tkanek między sobą w stosunku do glikozy. Siły przemieszczające glikozę ze krwi, a i czynne przy jej przetwarzaniu, rozdzielają się pomiędzy tkanki według zasady, która zdaje się w sumie działać podobnie, jak dla zużycia  $O_2$  przez narządy. Porównanie obu tych wielkich czynności w rozmaitych tkankach z punktu widzenia allometrii może stanowić pole do dalszych badań.

Wydanie niniejszej pracy zostało umożliwione wyłącznie przez zasiłek, udzielony przez Polską Akademię Nauk, Wydział VI Nauk Medycznych.

#### STRESZCZENIE

Dowozono glikozę przez żyłę w ciągu sześciu godzin z jednostajną chyżością od 1—9 g na kg/godz, w doświadczeniach na spoczywających prawidłowych psach (♀).

Opracowano kinetykę przyrostu stężenia cukru we krwi pomiędzy początkiem dowozu glikozy a 30 minutą dowozu w stosunku do wywołującej ten przyrost dawki glikozy. W tym odcinku czasu stężenie cukru we krwi bezustannie wzrasta przy każdej dawce.

Posiada on następujące cechy:

1) Zapoczątkowujący półgodzinny przyrost glikozy we krwi (oś rzędnych) powiększa się linijnie proporcjonalnie do szybkości dowozu (oś odciętych) cukru.

2) Prosta ta przechodzi przez punkt zerowy osi współrzędnych.

3) Kąt nachylenia prostej do osi odciętych zmniejsza się wraz ze wzmożeniem usuwania glikozy ze krwi.

4) Przyrost cukru we krwi, przy jednakowej dawce na jednostkę wagi ciała, jest tym większy (glikoza ze krwi jest tym gorzej usuwana), im większy rozmiar ciała ma osobnik. Różnice te ulegają wyrównaniu, gdy dawkę wyrazić na powierzchni ciała lub na wagę do potęgi  $3/4$  lub 0,73 („prawo powierzchni”).

5) Wszystkie wymienione cechy zbiera w jednej wartości stała, której wahanie dla wzorcowej grupy doświadczeń wynosi  $\pm 8,6\%$ .

6) Pomiędzy stałą a wydalaniem glikozy przez prawidłowe nerki istnieje równoległość w tym znaczeniu, że przy niskim przyroście glikozy we krwi (niskiej stałej) cukromocz jest mniejszy.

Stała wykazuje różnice osobnicze w usuwaniu glikozy ze krwi, oraz wybitne odstępstwa, gdy zachodzą upośledzenia wydalania glikozy przez nerki lub przetwarzania. Pozwala ona przewidzieć z grubsza, z krótkiego okresu zapoczątkowującego, przebieg krzywych cukrowych w dalszym ciągu nacukrzania, sprawność przetwórczą w dalszych dłuższych odcinkach życia psa, chwilę wystąpienia groźnych objawów znacznego wysycenia glikozą, itd. Umożliwia także dobór zwierząt doświadczalnych. Ujmuje cyfrowo początkowy stosunek stężenie/dawka dla glikozy u danego gatunku.

Dla osobników, poddawanych wysokim nacukrzeniom, stworzono układ sprawdzianów dla porównania, gdy zwierzęta te mają różne stałe początkowego przyrostu glikozy we krwi.

#### L I T E R A T U R A

- [1] Bastenie P.A., Franckson J.R.M., Conard V., Verdiest M., *Acta Clin. Belg.* 8, 192, 1953.
- [2] Bertalanffy L. von, Pirozyński W.J., *Biol. Bulletin* 105, 240, 1953.
- [3] Bouckaert J.P., de Duve Chr., *Physiol. Rev.* 27, 39, 1947.
- [4a] Brody S., Proctor R. C., *Univ. Missouri Agr. Exp. Sta. Research Bull.* 166, 89, 1932.
- [4b] Brożek J., *Body measurements and human nutrition*, Wayne Univ. Press, 1956, w rozdziale: Hunt E.E. i Giles E., 143.
- [5a] Conrad V., „*Mesure de l'assimilation du glucose*”, *Acta Med. Belg., Bruxelles*, 1955 (La Barre J., Bastenie P.A.).
- [5b] Cowgill G.R., Drabkin D.L., *Am. J. Physiol.* 81, 36, 1927.
- [6] Dost F.H., „*Der Blutspiegel. Kinetik der Konzentrationsabläufe in der Kreislaufflüßigkeit*”, G. Thieme, Leipzig, 1953.
- [7] Drabkin D.L., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 76, 527, 1951.
- [8] Duncan L.J.P., *Quart. J. Exp. Physiol.* 41, 85, 1956.
- [9] Field G.H., Tipton S.R., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 82, 531, 1953.
- [10] Gibson J.B. 2nd., Keely J.L., Pijoan M., *Am. J. Physiol.* 121, 800, 1938.
- [11] Hinkle L.E.Jr., „*The effects of life situations and emotions upon the management of diabetes*,” w dziele *Newer Concepts of the causes and treatment of diabetes mellitus*, The National Vitamin Foundation, New York, 140, 1954.
- [12] Hlad C.J.Jr., Elrick H., Witten T.A., *J. Clin. Invest.* 35, 1139, 1956.
- [13] Jokipii S.G., Turpeinen O., *J. Clin. Invest.* 32, 428, 1954.
- [14] Keys A., Brożek J., *Physiol. Rev.* 33, 245, 1953.
- [15] Kleiber M., *Hilgardia* 6, 315, 1932.
- [16] Kleiber M., *Physiol. Rev.* 27, 511, 1947.
- [17] Lipka J., *Graphical and mechanical computation*, New York-London, 1918.
- [18] Opie E.L., *Harvey Lectures* 50, 292, 1954—1955.

- [19] Patrushev V.J., *C. R. Acad. Sci. U.S.S.R.*, N. S. **14**, 573, 1937.
- [20] Rosenthal O., Drabkin D.L., *J. Biol. Chem.* **150**, 131, 1943.
- [21] Searle G.L., Chaikoff I.L., *Am. J. Physiol.* **170**, 456, 1952.
- [22a] Smith H.W., *The kidney*, Oxford Univ. Press, New York 1951; *Principles of renal physiology*, Oxford Univ. Press, New York, 1956.
- [22b] Smith R.E., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **62**, 403, 1956.
- [23] Snedecor G.W., *Statistical methods*, Iowa State College Press, Ames, Iowa, 1946.
- [24] Thomas K., *Ann. Rev. Biochem.* **23**, 1, 1954.
- [25] Türckheim W., Kühnau W. W., Logaras G., *Ber. math.-phys. Klasse sächs. Akademie d. Wissenschaft. z. Leipzig* **91**, 25, 1939.
- [26] Weymouth F.W., Field J. II, Kleiber M., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **49**, 367, 1942.
- [27] Wierzuchowski M., *Journ. Physiol. (London)* **87**, 311, 1936; **90**, 440, 1937; **91**, 140, 1937.
- [28] Wierzuchowski M., *Acta Biologiae Exp. (Polon.)* **12**, 77, 1938.
- [29] Wierzuchowski M., PAU, *Rozpr. Wydz. Lek.*, **12**, 203, 1952.
- [30] Wierzuchowski M., PAU, *Rozpr. Wydz. Lek.* **12**, 221, 1952.
- [31] Wierzuchowski M., PAU, *Rozpr. Wydz. Lek.* **13**, 177, 1952.
- [32] Wierzuchowski M., PAU, *Rozpr. Wydz. Lek.* **13**, 219, 1952.
- [33] Wierzuchowski M., *Polski Tygodnik Lekarski*, **8**, N. 26, 1953.
- [34] Wierzuchowski M., Chmielewski T., PAU, *Rozpr. Wydz. Lek.* **12**, 243, 1952.
- [35] Wierzuchowski M., Dzisiów F., Sysa J., Borkowski Z., *Hoppe-Seyler's Zeitschr. f. physiol. Chem.* **253**, 231, 1938.
- [36] Wierzuchowski M., Gadomska H., *Biochem. Zeitschr.* **191**, 198, 1927.

PRIMING OF THE SATURATION WITH INTRAVENOUS GLUCOSE  
IN A RESTING DOG AND ITS BODY SIZE

Summary

Glucose was introduced intravenously over 6 hours at a steady rate of 1—9 g per kg/hour, in 131 experiments on 38 resting normal dogs (♀). Kinetics of the rise of blood glucose concentration was explored over the first half hour of glucose supply in relation to dosage. The following features were revealed:

1) Average halfhourly glucose increment in blood (ordinate axis) during priming increases in linear proportion with the rate of glucose supply (axis of abscissae).

2) The straight line of this increment plotted versus large scale of the rates of glucose supply passes through the origin of Cartesian co-ordinates.

3) The angle between the straight line and the axis of abscissae diminishes as the disappearance of glucose from the blood grows.

4) Magnitude of the increment depends upon body size of the individual but not directly upon body weight. Identical dose per unit body

weight is less efficiently removed from the blood in larger sized individuals, than in smaller ones. These differences, however, disappear when the increment is expressed against dosage calculated per body surface area or per body weight raised to the 0.73—0.75-th power ("surface area law").

5) All the features referred to are accounted for by a constant with a coefficient of variation of merely  $\pm 8.6\%$  for the standard group of data.

6) There is a parallelism between the constant and the rate of glucose elimination by kidneys (if these are efficient) in the sense that low blood-glucose increment is attended by more moderate glycosuria.

The constant derived from the short priming period permits to anticipate roughly the further shape of glucose curves, glucose tolerance in the following longer periods of dog's life, moments of dangerous symptoms of extreme saturation with glucose etc. It discloses individual differences in glucose removal from the blood and abnormalities when there are changes in renal elimination or metabolic transformation of glucose or both.

It also makes it possible properly to select individuals for special carbohydrate problems, and to determine the initial value of the concentration/dosage ratio for glucose in the given species for comparison with others.

For individuals highly saturated with glucose and having different constants of the initial blood glucose increment a system of criteria has been built up for the purposes of comparison of the priming constant with the further course of glucose disposal.

Otrzymano 31.12.1957 r.



J. KRAWCZYŃSKI, I. DREWNOWSKA, Z. FLESZYŃSKI, M. RYCAJ

## BADANIA NAD METABOLIZMEM BIAŁKOWYM MÓZGU I MÓZDŻKU PRZY POMOCY TYROZYNY ZNAKOWANEJ $^{14}\text{C}$ \*)

Z Centralnego Laboratorium Klinicznego PSK Nr 1 w Lublinie  
Kierownik: Doc. dr med. Jerzy Krawczyński

### WSTĘP

Białka mózgu stanowią około 8% jego całkowitej wagi, a około 40% wagi w stosunku do innych oprócz wody, składników mózgu (Mc Ilwain [19]).

Białka mózgu można podzielić na szereg frakcji różniących się między sobą rozpuszczalnością w roztworach soli, w rozcieńczonych roztworach zasad i w rozpuszczalnikach organicznych, a także zachowaniem się wobec enzymów proteolitycznych (Pałladin [23], Logan i współpr. [17], Lowry i współpr. [18]).

Stosunki ilościowe, w jakich występują te frakcje, nie są jeszcze ostatecznie ustalone. Mimo szybkiego rozwoju badań cytochemicznych zmierzających do ustalenia lokalizacji poszczególnych enzymów w tkance nerwowej (Haidoo, Pratt [10], Robins i współpr. [28, 29], Pope, Anfinson [27]), nie zdołano dotychczas powiązać z oddzielnymi frakcjami białkowymi różnorodnych własności enzymatycznych, jakimi cechuje się np. homogenat tkanki mózgowej (Mc Ilwain [19]).

W ostatnim czasie przeprowadza się próby zmierzające do rozdzielenia białek mózgu przy pomocy elektroforezy bibułowej. Booi [2] wyodrębnił tą drogą 5 frakcji leżących w obszarze globulin i 2 frakcje nazwane przez niego frakcjami  $x_1$  i  $x_2$  posiadające punkt izoelektryczny (PI), leżący w obszarze bardziej zasadowym niż PI globuliny surowiczej. Kreup [16], Pałladin i Polakowa [24] wyodrębnił 6 frakcji, a Krawczyński i Drew-

\*) Praca subsydiowana przez Komitet Biochemiczny PAN.

nowska [13] — 9 frakcji. Badanie białek mózgu przy pomocy elektroforezy bibułowej ogranicza się na razie do badania białek rozpuszczalnych w roztworach soli po uprzednim rozbiciu ich wiązania z lipidami.

Białka mózgu występują przeważnie w postaci złożonych kompleksów białkowych takich, jak nukleoproteidy, fosfoproteidy, lipoproteidy lub swoiste dla tkanki mózgowej proteolipidy (Folch i współpr. [7]). Znacznego stopnia nietrwałość tych kompleksów utrudnia w dużej mierze prowadzenie badań zmierzających do ustalenia ich struktury i własności. Kompleksy białkowe stanowią prawdopodobnie postać, w jakiej występują białka mózgu w warunkach fizjologicznych. Spośród tych kompleksów szczególne zainteresowanie budzą kompleksy nukleoproteidowe przede wszystkim ze względu na ich szczególną rolę, jaką odgrywają w procesie biosyntezy białek w komórce. Dlatego też przedmiotem naszych badań uczyniliśmy kompleksy nukleoproteidowe wyizolowane z tkanki nerwowej myszek (mózg, mózdzek) (wg Mirsky'ego i Pollistera [21]).

W badaniach nad metabolizmem białek mózgu szczególnie użytecznymi okazały się aminokwasy znakowane radioaktywnymi izotopami. Najczęściej stosowano aminokwasy znakowane radioaktywną siarką  $^{35}\text{S}$  (Gaitonde, Richter [9, 8], Clouet, Richter [3], Cohn, Gaitonde, Richter [4], Paładin, Wertaimer [25], Paładin, Bielik, Kraczo [26], Rozengart, Maśłowa [30], Krawczyński, Silicz [14]), Nieczajewa [22]). Rzadziej posługiwano się aminokwasami znakowanymi radioaktywnym izotopem węgla  $^{14}\text{C}$  (Sadikowa, Skworcowicz [31], Winnick i współpr. [39]).

W badaniach nad metabolizmem kompleksów nukleoproteidowych i fosfoproteidów stosowano szeroko radioaktywny fosfor  $^{32}\text{P}$  (Skwirskaja, Silicz [34, 35], Kreps i współpr. [15], Władimirow [40], Eggelhardt i Lisowskaja [6] i inni).

W naszych badaniach zastosowaliśmy D,L-tyrozynę znakowaną izotopem  $^{14}\text{C}$  w grupie karboksylowej. Wybierając jako indykator aminokwas, nie wchodzący w skład kwasów nukleinowych, położyliśmy tym samym główny nacisk na przebadanie procesu odnowy białkowej części nukleoproteidowego kompleksu. Umożliwiło to nam także przebadanie procesu odnowy innych białek stanowiących pozostałość po przeprowadzeniu frakcjonowania (wg Mirsky'ego i Pollistera [21]).

Analogicznemu frakcjonowaniu poddaliśmy też tkankę wątrobową wychodząc z założenia, że przy dootrzewnowym podaniu znakowanego aminokwasu stanowi ona pierwszy narząd, przez który aminokwas ten przechodzi.

## METODYKA BADAŃ

*A. Materiał doświadczalny*

Badania przeprowadzono na białych myszkach wagi od 20 do 25 g. Przez cały czas doświadczenia zwierzęta znajdowały się na zwykłej diecie.

*B. Wprowadzenie izotopu*

Myszkom wprowadzono dootrzewnowo roztwór wodny D,L-tyrozyny znakowanej w grupie karboksylowej  $^{14}\text{C}$  — w ilości od 1800 do 4600 imp/min. na 1 g wagi. Zwierzęta zabijano przez dekapitację po upływie 3, 6, 12, 24, 36, 48 i 72 godzin od chwili wprowadzenia izotopu. W jednym doświadczeniu zabijano 25 myszek, których narządy łączono i opracowywano razem.

*C. Preparatyka białka całkowitego z mózgu, mózdzku, wątroby i surowicy myszek*

Po zabiciu zwierząt szybko wyjmowano mózg, mózdzek i wątrobę. Po opłukaniu w fizjologicznym roztworze NaCl, osuszeniu bibułą filtracyjną i zważeniu — rozcierano w mózdzierzu do konsystencji kremu (łączna waga narządu z 20—25 myszek wynosiła średnio: wątroba — 11 g, mózg — 6 g, mózdzek — 2 g). 0,5 g rozartego narządu przenoszono do drugiego mózdzierza i rozcierano z 20-krotną objętością 10% roztworu kwasu trójchlorooctowego (TCO) i zostawiano przez 30 minut na lodzie. Po upływie tego czasu zawartość mózdzierza poddawano wirowaniu. Płyn z nad osadu wylewano pozbawiając się w ten sposób tej części znakowanego aminokwasu, która nie weszła w skład białek tkankowych. Następnie osad białkowy płukano jeszcze 3-krotnie 3% roztworem TCO, a następnie kolejno po jednym razie acetonem, alkoholem i eterem. Silniej związanych lipidów pozbawiano się przy pomocy ekstrakcji mieszanką chloroform-metanol (1:1) pod chłodnicą zwrotną w temp.  $65^{\circ}$  przez 2 godziny. Po ekstrakcji osad jeszcze raz suszono eterem; eter odparowywano w cieplarni o  $37^{\circ}$  co najmniej 2 godziny. Z otrzymanego suchego proszku (z 0,5 g narządu otrzymywano średnio 60 mg) odważano 10 mg na aluminiową miseczkę dostosowaną do wymiarów okienka licznika Geigera-Millera i rozprowadzano w możliwie równomiernej warstwie. Poza wymienionymi badaniami przeprowadzono również badania nad surowicą myszek. Do surowicy dodawano 10% roztwór TCO w proporcji 1:10 i po 30 minutach odwirowywano. Dalej postępowano w sposób opisany wyżej. Białek surowicy nie frakcjonowano.

#### D. Frakcjonowanie białek mózgu, mózdzku i wątroby

Roztarty do konsystencji kremu narząd mieszano przy pomocy mieszadła z 5-krotną objętością 0,14 M roztworu NaCl na lodzie w ciągu 1 godziny, wirowano i płyn z nad osadu dekantowano do drugiego naczynia. Osad ekstrahowano ponownie w ciągu 30 minut taką samą objętością 0,14 M NaCl i wirowano. Płyn z nad osadu łączono z poprzednio uzyskanym ekstraktem. Tak postępowano 6 razy. Połączone ekstrakty zakwaszono przy pomocy 10% roztworu kwasu octowego do pH — 4,2 i zostawiano w lodówce na noc. Wytrącone w ten sposób białka (Fracja A) odwirowywano. Płyn z nad osadu wylewano, a osad mieszano z nadmiarem 10% roztworu TCO i postępowano dalej jak z białkami całkowitymi. Pozostałą po ekstrakcji tkankę ekstrahowano w analogiczny sposób 1 M roztworem NaCl. Połączone ekstrakty rozcieńczano 6-krotną objętością wody destylowanej i zostawiano w lodówce na noc, doprowadzając w ten sposób do wytrącenia frakcji B, którą w dalszym ciągu opracowywano analogicznie jak frakcję A.

Pozostałość po ekstrakcji 1 M NaCl zalewano 5-krotną objętością 1 n NaOH i zostawiano na noc. Po upływie tego czasu rozdzielano ekstrakt (Fracja C) od osadu (Fracja D) przy pomocy wirowania. Białka frakcji C wytrącano nadmiarem 10% roztworu TCO, a białka frakcji D zalewano tymże roztworem TCO. Odwirowywano i postępowano dalej w analogiczny sposób jak z innymi frakcjami białkowymi. Suma frakcji A, B, C, D stanowi około 83% białek całkowitych mózgu i mózdzku (Krawczyński i współpr. [13a]).

#### E. Oznaczanie stosunku N/P we frakcjach białkowych

Dla każdej frakcji białkowej wyliczano stosunek N/P (stosunek procentowych zawartości), co umożliwiło stałą jej charakterystykę. Po spaleniu próbki białka ze stężonym kwasem siarkowym zawartość azotu oznaczano przy pomocy odczynnika Nesslera, a zawartość fosforu wg Fiske-Subbarowa (oznaczania przeprowadzano wg metodyki podanej przez Hořejší'ego i Slavika [11]).

#### F. Przygotowanie moczu i kału do oznaczania radioaktywności

Wystarczającą ilość kału i moczu otrzymano w wyniku odruchowej defekacji i odruchowego oddania moczu bezpośrednio po dekapitacji zwierząt. Kał suszono w cieplarni, rozcierano w moździerzu i porcję 10 mg przenoszono do miseczki aluminiowej. Mocz w ilości 0,3 ml наносzono na miseczkę i odparowywano do sucha.

### G. Oznaczanie zawartości związków fenolowych w moczu

W 0,5 ml moczu oznaczano zawartość związków fenolowych za pomocą odczynnika Folina wg metodyki podanej przez Hořejší'ego i Slavíka [11].

### H. Badania chromatograficzne i autoradiograficzne związków wydalanych z moczem

Kontrolne badania chromatograficzne przeprowadzono stosując technikę chromatografii wstępującej i układ rozpuszczalników: butanol-kwas octowy-woda [36] w proporcjach 4 : 1 : 5. Autoradiografię chromatogramu wykonano przy pomocy techniki stykowej. Posługiwano się błoną rentgenowską F-my Ilfordt, którą ekspozowano w kasecie rentgenowskiej w ciągu 72 godzin.

### I. Oznaczanie radioaktywności

Radioaktywność próbek mierzono przy pomocy dzwonekowego licznika GM typ MST—17 prod. radzieckiej z mikowym okienkiem na przeliczniku elektrycznym prod. krajowej. Mierzono zawsze radioaktywność kilku równoległych próbek. Za wiarygodne uważano wyniki przewyższające najmniej w 50% radioaktywność zerową (tło licznika).

## WYNIKI DOŚWIADCZEŃ

Wyniki doświadczeń wyrażano w postaci „względnej aktywności właściwej“ (WAW) badanego preparatu“.

Pod pojęciem WAW rozumiano wyrażenie:

$$WAW^1) = \frac{\text{imp/min/1 mg białka}}{\text{imp/min/1 mg żywej wagi}} \times 100.$$

### A. Białka całkowite

Jak wynika z tabl. 1 — największe nagromadzenie radioaktywności ma miejsce w białkach surowicy. Mniej radioaktywności nagromadza się w białkach wątroby, a jeszcze mniej w białkach mózgu i mózdzku. Naj-

1) Wartość WAW = 100, oznacza przypadek, w którym aktywność danej frakcji równa jest średniej aktywności, która wynikałaby przy równomiernym rozmieszczeniu jej między wszystkie tkanki i płyny żywego ustroju.

większe nagromadzenie radioaktywności następuje w białkach surowicy po 3 godzinach, w białkach wątroby i mózgu po 12 godzinach, a w białkach mózdzku po 24 godzinach od chwili wprowadzenia izotopu. Po upływie 72 godzin w białkach surowicy, wątroby, mózgu i mózdzku można stwierdzić radioaktywność znacznie obniżoną w stosunku do godzin poprzednich.

T a b l i c a 1

Zmiany „względnej aktywności właściwej” (WAW) białek całkowitych w ciągu 3—72 godz od chwili wprowadzenia  $^{14}\text{C}$ -tyrozyny

Białka całkowite	Od chwili wprowadzenia $^{14}\text{C}$ -tyrozyny upłynęło godzin						
	3	6	12	24	36	48	72
	Względna aktywność właściwa (WAW)						
Surowicy	242	209	210	179	150	135	72
Wątroby	70	66	174	112	92	70	50
Mózgu	24	26	98	44	29	32	33
Mózdzku	20	18	27	72	33	41	12

### B. Frakcja A

Najwięcej radioaktywności (Tabl. 2) gromadzi się we frakcji wyizolowanej z wątroby, mniej we frakcji wyizolowanej w mózdzku, a najmniej we frakcji wyizolowanej z mózgu. Maksimum radioaktywności zostaje osiągnięte dla frakcji wyizolowanej z wątroby po 12—24 godz., dla frakcji otrzymanej z mózdzku po 24—36 godz., a dla frakcji otrzymanej z mózgu po 36—48 godzinach.

T a b l i c a 2

Zmiany „względnej aktywności właściwej” (WAW) frakcji A (tj. białek rozpuszczalnych w 0,14 M NaCl) w ciągu 3—72 godz od chwili wprowadzenia  $^{14}\text{C}$ -tyrozyny

Frakcja A	N/P	Od chwili wprowadzenia $^{14}\text{C}$ -tyrozyny upłynęło godzin						
		3	6	12	24	36	48	72
		Względna aktywność właściwa (WAW)						
Wątroby	17	71	87	127	131	100	92	28
Mózgu	23	28	21	24	57	71	70	19
Mózdzku	27	15	57	76	109	125	46	11

## C. Frakcja B

Najwięcej radioaktywności (Tabl. 3) gromadzi się we frakcji otrzymanej z wątroby, mniej we frakcjach otrzymanych z mózgu i mózdzku. Maksimum radioaktywności: frakcja wątrobowa — po 3 godzinach, mózdkowa po 24 godzinach i mózgowa po 36—48 godzinach od chwili wprowadzenia  $^{14}\text{C}$ -tyrozyny.

T a b l i c a 3

Zmiany „względnej aktywności właściwej” (WAW) frakcji B (tj. białek rozpuszczalnych w 1 M. roztworze NaCl) w ciągu 3—72 godzin od chwili wprowadzenia  $^{14}\text{C}$ -tyrozyny

Frakcja B	N/P	Od chwili wprowadzenia $^{14}\text{C}$ -tyrozyny upłynęło godzin						
		3	6	12	24	36	48	72
		Względna aktywność właściwa (WAW)						
Wątroby	14	161	72	62	53	54	57	56
Mózgu	24	21	20	16	19	38	37	11
Mózdzku	20	25	19	18	34	21	17	11

## D. Frakcja C

Z tablicy 4 wynika, że radioaktywność gromadzi się przede wszystkim we frakcji wątrobowej. Mniej radioaktywności gromadzi się we frakcji mózgowej i mózdkowej. Maksimum radioaktywności można zaobserwować dla frakcji C wątroby po 12 godzinach, dla frakcji C mózgu po 36 godzinach, a dla frakcji C mózdzku dopiero po 48 godzinach.

T a b l i c a 4

Zmiany „względnej aktywności właściwej” (WAW) frakcji C (tj. białek rozpuszczalnych w 1 n NaOH) w ciągu 3—72 godzin od chwili wprowadzenia  $^{14}\text{C}$ -tyrozyny

Frakcja C	N/P	Od chwili wprowadzenia $^{14}\text{C}$ -tyrozyny upłynęło godzin						
		3	6	12	24	36	48	72
		Względna aktywność właściwa (WAW)						
Wątroby	152	94	92	143	100	112	87	44
Mózgu	36	15	20	33	25	37	34	29
Mózdzku	41	18	21	14	16	29	34	11

### E. Frakcja D

Z przytoczonych w tabl. 5 danych wynika, że najwięcej radioaktywności gromadzi się we frakcji otrzymanej z wątroby i mniej kolejno we frakcjach otrzymanych z mózgu i mózdzku.

Maksimum radioaktywności osiąga frakcja D wątroby po 36 godzinach, frakcja D mózgu i mózdzku po 24—48 godzinach.

Tablica 5

Zmiany „względnej aktywności właściwej” (WAW) frakcja D (tj. białek nierozpuszczalnych w 1 n NaOH) w ciągu 3—72 godzin od chwili wprowadzenia  $^{14}\text{C}$ -tyrozyny

Frakcja D	N/P	Od chwili wprowadzenia $^{14}\text{C}$ -tyrozyny upłynęło godzin						
		3	6	12	24	36	48	72
Względna aktywność właściwa (WAW)								
Wątroby	126	66	63	102	96	133	61	22
Mózgu	52	6	26	35	32	27	42	17
Mózdzku	50	6	14	8	9	29	32	11

### F. Wydalanie związków radioaktywnych z moczem i kałem

Jak ilustruje tabl. 6 — w ciągu pierwszych 12 godzin wydała się z moczem bardzo dużo związków radioaktywnych. Maksimum wydalania przypada w 3 godziny po podaniu  $^{14}\text{C}$ -tyrozyny. Wydalanie z moczem związków dających zabarwienie z odczynnikiem fenolowym Folina przebiega

Tablica 6

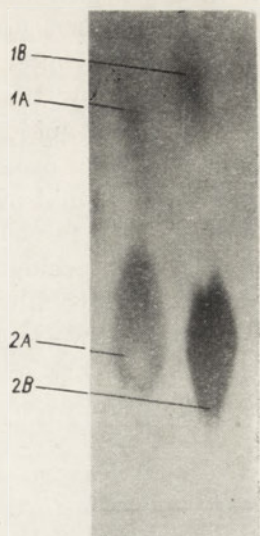
Wydalanie związków radioaktywnych i związków dających zabarwienie z odczynnikiem fenolowym Folina

Wydalono	Od chwili wprowadzenia $^{14}\text{C}$ -tyrozyny upłynęło godzin						
	3	6	12	24	36	48	72
Względna aktywność właściwa (WAW)							
z moczem	3987	1092	741	42	12	26	23
z kałem	91	120	200	60	30	35	28
Ekstynkcja $\times 100$							
z moczem	200	135	74	32	48	46	40

równoległe z wydalaniem radioaktywnych związków z moczem. Z kałem wydają się znacznie mniejsze ilości związków radioaktywnych niż z moczem, z maksimum wydalania przypadającym w 12 godzin po wprowadzeniu  $^{14}\text{C}$ -tyrozyny.



Na radiochromatogramie (Rys. 1) otrzymano plamę 2A odpowiadającą umiejscowieniem plamie 2B, która jest plamą  $^{14}\text{C}$ -tyrozyny. Plamy 1A i 1B pochodzą od niezidentyfikowanych związków radioaktywnych nie dających zabarwienia z ninhydriną, będących prawdopodobnie przypadkowym zanieczyszczeniem preparatu.



Rys. 1. Chromatograficzna identyfikacja związków radioaktywnych wydalanych z moczem

- 1A — Plama związku radioaktywnego występującego w moczu i nie dającego zabarwienia z ninhydriną
- 1B — Plama związku radioaktywnego występującego w preparacie  $^{14}\text{C}$ -tyrozyny nie dającego zabarwienia z ninhydriną
- 2A — Plama związku radioaktywnego występującego w moczu dającego zabarwienie z ninhydriną
- 2B — Plama odpowiadająca  $^{14}\text{C}$ -tyrozyny

#### DYSKUSJA

Na podstawie przytoczonych wyżej wyników można stwierdzić, że przeważająca część podanej  $^{14}\text{C}$ -tyrozyny zostaje wydalona w postaci wolnej z moczem w ciągu pierwszych 12 godzin. Jest to prawdopodobnie forma D-tyrozyny bezużyteczna dla organizmu jako materiał do syntezy białek tkankowych.

L-tyrozyna po dostaniu się do ustroju zostaje częściowo wydalona przez nerki, częściowo ulega utlenieniu prowadzącemu ostatecznie do kwasu fumarowego i kwasu acetoctowego, częściowo stanowi materiał wyjściowy do produkcji adrenaliny, tyraminy i melaninu i wreszcie wchodzi w skład białek tkankowych i białek surowicy.

Zagadnienie syntezy białek tkankowych z wolnych aminokwasów jest problemem o pierwszorzędym znaczeniu dla poznania istoty przemian wewnątrzkomórkowych i wyjaśnienia wielu czynności fizjologicznych poszczególnych tkanek. Przebieg procesu syntezy białek w tkance nerwowej jest dotychczas zagadnieniem niemal nie znanym, chociaż z dużym stopniem prawdopodobieństwa można przypuszczać, że właśnie rozwiązanie tego zagadnienia przyczyni się do ostatecznego wyświeślenia nadzwyczaj złożonego mechanizmu różnorodnych czynności tkanki nerwowej. Jak w każdej tkance w ustroju, tak samo i w tkance nerwowej, szczególna rola w procesie syntezy białek przypada nukleoproteidom występującym w dużej ilości zarówno w jądrze, jak i w protoplazmie komórek nerwowych. W wyodrębnionych przez nas z tkanki mózgu i mózdzku frakcjach białkowych, sądząc po zawartości w nich fosforu, przeważającą większość stanowią nukleoproteidy, wśród których posługując się danymi Biełozierskiego [1], Mamoiłowa, Orłowa [20] i innych, można wyróżnić kompleksy nukleoproteidowe o słabo związanym kwasie nukleinowym (dające się ekstrahować roztworami soli) i kompleksy, w których kwas nukleinowy jest silnie związany z białkiem (nie dające się ekstrahować roztworami soli).

Dotychczasowe badania nad kompleksami nukleoproteidowymi prowadzone przy pomocy radioaktywnego fosforu (Skwirskaja i Silicz [34, 35]), Kreps i współpr. [15]), lub też metodami cytochemicznymi (Hyden [12], Edstrom [5]), ograniczały się właściwie do badania jednej tylko części kompleksu, jakim jest kwas nukleinowy pomijając zupełnie jego część białkową. Dopiero w naszej poprzedniej pracy (Krawczyński, Silicz [14]), w której posługiwaliśmy się  $^{35}\text{S}$ -metioniną, przedmiotem badań była białkowa część kompleksu nukleoproteidowego. Stwierdziliśmy wówczas, że zarówno w substancji białek, jak i substancji szarej mózgu kota po upływie 24 godzin od chwili podskórnego podania  $^{35}\text{S}$ -metioniny największe włączenie  $^{35}\text{S}$  zaobserwowano we frakcjach białkowych dających się ekstrahować roztworami soli, znacznie mniejsze we frakcji rozpuszczalnej w roztworze 1 n NaOH, a najmniejsze we frakcji nierozpuszczalnej w roztworze NaOH. W opublikowanych ostatnio badaniach Clouet i Richter [3] posługując się również  $^{35}\text{S}$ -metioniną i przeprowadzając rozdzielanie poszczególnych białek tworzących frakcję jądrową mitochondrialną i mikrosomalną komórek nerwowych, przy pomocy 1 M roztworu NaCl i 1 n roztworu NaOH stwierdzili, że największym nagromadzeniem radioaktywności cechuje się mikrosomalny nukleoproteid nierozpuszczalny w 1 M NaCl, a rozpuszczalny w 1 n NaOH. Autorzy ci przypuszczają też, że nukleoproteid ten najpierw koncentruje aminokwasy i dopiero później przekazuje je innym białkom. Ta interesująca hipoteza wymaga jednak jeszcze potwierdzenia eksperymentalnego.

Miarą szybkości syntezy białka w ustroju mogą być tzw. krzywe odnowy białka znane od czasów badań przeprowadzonych przez Schoenheimer [32] i jego szkołę. Jeżeli na osi odciętych będziemy odkładać wartości, np. WAW (względnej aktywności właściwej), na osi rzędnych czas w dniach lub godzinach, jaki upłynął od chwili wprowadzenia do ustroju zwierzęcia znakowanego aminokwasu, otrzymamy krzywą o charakterystycznym wyglądzie, będącą ilustracją przebiegu procesu odnowy danego białka. Krzywa taka składa się z dwu ramion: ramienia wstępującego zakończonego maksimum i ramienia zstępującego. Ramię wstępujące odpowiada procesowi gromadzenia się znakowanego aminokwasu białka w wyniku jego wbudowywania w cząsteczki tegoż białka. Ramię zstępujące odpowiada procesowi wydalania znakowanego aminokwasu w wyniku rozpadu cząsteczek białek zawierających ten aminokwas i zamiany ich przez cząsteczki nie znakowane.

Dla białek mózgu tego rodzaju krzywe opracowali Gaitonde i Richter [8, 9], a ostatnio Pałladin, Bielik i Kraczkó [26].

Syntezy białek w tkance mózgu i mózdzku nie można traktować w oderwaniu od całości gospodarki białkowej ustroju. W gospodarce tej centralne miejsce zajmuje wątroba jako narząd produkujący większą część białek surowicy, które wg Whipple i Maddena [38] znajdują się w stanie dynamicznej równowagi z białkami komórkowymi wszystkich tkanek i odgrywają rolę mediatora w wymianie aminokwasów przez białka tkankowe (Tarver, Morse [37]).

Przy dootrzewnowym podaniu aminokwasu, jak już wspomniano wyżej, wątroba stanowi pierwszy narząd, przez który przechodzi wchłonięty z jamy otrzewnowej znakowany aminokwas. Dlatego też otrzymane doświadczalnie dane dotyczące odnowy białek całkowitych wątroby, poszczególnych frakcji wątrobowych, reprezentujących różne kompleksy nukleoproteidowe (Fracje A, B, C) oraz białek surowicy, cechują się wyższymi wartościami WAW niż dane dotyczące odnowy białek mózgu. Świadczy to o dość żywej odnowie tych białek. Wolniejszą odnową cechuje się frakcja D wątroby, którą można uważać za frakcję tzw. białek strukturalnych tworzących nierozpuszczalny „szkielet białkowy” komórki.

Wpływ wątroby na przebieg procesu syntezy białek w mózgu i mózdzku może być znacznie mniejszy niż w przypadku innych tkanek ze względu na istnienie bariery mózgowo-rdzeniowej tworzącej dla centralnego systemu nerwowego wyodrębnione w pewnym stopniu środowisko wewnętrzne. Dlatego też przedyskutowanie przebiegu procesu odnowy białek mózgu i mózdzku wymaga uprzedniego przedyskutowania problemu bariery mózgowo-rdzeniowej. Nieuwzględnianie tego zagadnienia

było przyczyną daleko idących rozbieżności w poglądach poszczególnych badaczy zajmujących się badaniem dynamicznego stanu białek mózgu.

Tarver i Morse [37] oraz Winnick, Friedberg i Greenberg [39] stwierdzili, np., że podane dożylnie, dootrzewnowo lub doustnie znakowane aminokwasy względnie wolno włączają się w białka mózgu. Autorzy ci na podstawie przeprowadzonych badań wyprowadzili wniosek stwierdzający znaczny stopień nieruchliwości białek mózgu.

Tymczasem Gaitonde i Richter [8, 9] oraz Clouet i Richter [3] stwierdzili, że białka mózgu są bardzo ruchliwe i cechują się nadzwyczaj szybkim przebiegiem procesu odnowy. Autorzy ci podawali znakowane aminokwasy dokomorowo, a więc omijając barierę mózgowo-rdzeniową. W nie opublikowanych badaniach własnych stwierdziliśmy również, że ilość  $^{35}\text{S}$  włączonej w białka mózgu i mózdzku królika po upływie 24 godzin jest 60 razy większa wtedy, gdy aminokwas został podany dokomorowo, niż wtedy, gdy został podany podskórnie.

W pewnej sprzeczności z podanymi wyżej faktami stoją wyniki podane przez Nieczajewą [22] oraz Pałladina, Bieliika i Kraczkow [26], którzy już w 2—3 godziny po podskórnym podaniu znakowanego aminokwasu stwierdzili znaczne nagromadzenie radioaktywności w białkach C. S. N. Autorzy ci posługiwali się wprawdzie znacznie większymi od nas dawkami radioaktywnego aminokwasu i być może w tych warunkach już po 2 godzinach ilość włączonego w białka mózgu radioaktywnego izotopu stała się uchwytana eksperymentalnie.

Niemniej jednak wyniki te wydają się podważać powszechnie przyjęte przekonanie o znaczeniu i mechanizmie działania bariery mózgowo-rdzeniowej, potwierdzone eksperymentalnie przez innych badaczy radzieckich (Władimirow [40], Skaczkowa [33]).

Wpływ bariery mózgowo-rdzeniowej na osiągnięte przez nas wyniki dotyczące przebiegu procesu odnowy białek mózgu jest bardzo wyraźny. Wartości WAW z wyjątkiem wartości WAW białek całkowitych mózgu, wznoszą się leniwie do wartości maksymalnej, która zwykle jest dość niska. Spadek wartości WAW również nie jest gwałtowny. Świadczy to o istnieniu stanu pewnej równowagi między procesami syntezy i rozpadu cząsteczek białka zawierających znakowany aminokwas, który w niewielkiej ilości niezmienną się znacznie w przeciągu dłuższego czasu dopływa do miejsca, gdzie odbywa się synteza białek mózgowych. Białka całkowite mózgu okazały się bardziej ruchliwe od białek mózdzku. Z frakcji białkowych największą ruchliwością cechowała się frakcja A, którą uważamy za frakcję nukleoproteidów plazmatycznych. Pozostałe frakcje okazały się mało ruchliwe. Uzyskane wyniki są więc zgodne z wynikami naszych poprzednich badań [13], różnią się natomiast od wy-

ników Clouet i Richtera [3], zwłaszcza w odniesieniu do jego podfrakcji B otrzymanej z mitochondrii odpowiadającej mniej więcej naszej frakcji C. Należy tu jednak zaznaczyć, że warunki doświadczalne, w jakich były wykonywane obydwie prace, dość znacznie różniły się od siebie, co już samo przez się może być chociaż częściowo przyczyną istniejących rozbieżności.

Przy porównywaniu ruchliwości frakcji białkowych mózgu i mózdzku wyjątkową pozycję zajmuje frakcja A otrzymana z mózdzku myszy. Frakcja ta cechuje się większą aktywnością procesu odnowy niż analogiczna frakcja otrzymana z mózgu myszek. Podobne dane dla nukleoproteidów mózdzku królików otrzymali posługując się  $^{32}\text{P}$  (Skwirskaja i Silicz [34] oraz Kreps i współpr. [15]). Ten ostatni porównując te wyniki z wynikami uzyskanymi na nukleoproteidach mózgu i mózdzku psa, gdzie nukleoproteid mózgu jest bardziej ruchliwy niż nukleoproteid mózdzku, próbuje wyjaśnić to zjawisko wyższym poziomem rozwoju ewolucyjnego centralnego systemu nerwowego psa, kiedy następuje wyraźne już dominowanie mózgu nad mózdzkiem. To samo wyjaśnienie można zastosować i w odniesieniu do myszy.

W tabelicy 1 dotyczącej odnowy białek całkowitych mózgu i mózdzku spotykamy maksima nie odpowiadające maksimum żadnej z przebadanych przez nas frakcji białkowych. Zjawisko to można wyjaśnić odrzuceniem w czasie pracy preparatywnej niektórych frakcji białkowych, wśród których mogły znajdować się frakcje zarówno bardziej jak i mniej ruchliwe od frakcji będących przedmiotem naszych obecnych badań.

Po upływie 72 godzin od chwili wprowadzenia myszkom  $^{14}\text{C}$ -tyrozyny, wartości WAW zarówno białek całkowitych jak też i poszczególnych frakcji i to zarówno białek wątroby, mózgu i mózdzku, jak też białek surowicy stają się bardziej zbliżone do siebie. Świadczy to o dążeniu organizmu do osiągnięcia stanu równowagi izotopowej cechującej się średnim (w przybliżeniu) stężeniem izotopu w ustroju („average isotope concentration”).

## STRESZCZENIE

1. Posługując się wartościami WAW, gdzie WAW — względna aktywność właściwa preparatu

$$\text{WAW} = \frac{\text{imp/min/1 mg białka}}{\text{imp/min/1 g wagi}} \times 100,$$

przebadano przebieg procesu odnowy białek całkowitych mózgu i mózdzku jak również białek całkowitych wątroby będącej dla nas narządem

kontrolnym, po podaniu białym myszkom tyrozyny znakowanej  $^{14}\text{C}$  w grupie karboksylowej.  $^{14}\text{C}$ -tyrozynę podawano dootrzewnowo. Przebadano też przebieg procesu odnowy białek surowicy. Stwierdzono, że najszybciej odnowa zachodzi w białkach surowicy, wolniej w białkach wątroby, a jeszcze wolniej w białkach mózgu i mózdzku.

2. Białka mózgu, mózdzku i wątroby rozfrakcjonowano na 4 frakcje, które nazwano frakcjami A, B, C, D. Frakcja A obejmowała białka rozpuszczalne w 0,14 M NaCl, frakcja B — białka rozpuszczalne w 1 M NaCl, frakcja C — białka rozpuszczalne w 1 n NaOH, a frakcja D białka nierozpuszczalne w 1 n NaOH. Najszybciej odnawiającą się frakcją okazała się frakcja A. Natomiast najwolniej odnawiająca się — frakcja D. Ponieważ frakcje A, B, C są kompleksami nukleoproteidowymi, można wyciągnąć pewne wnioski o znaczeniu tych ostatnich w procesie syntezy białka w komórce nerwowej.

3. Omówiono też rolę bariery mózgowo-rdzeniowej podkreślając jej ujemny wpływ na wyniki badań określających ruchliwość białek mózgu przy dootrzewnowym podaniu radioaktywnego indykatora.

#### LITERATURA

- [1] Biełozierskij A., *Dysertacja*, Moskwa, 1944 (cyt. wg Mamoiłowa).
- [2] Booiij J., *Elektroforese in der Neurologie* — w monogr. pod red. Antweilera, str. 190, Berlin, 1957.
- [3] Clouet D. E., Richter D., *Biochem. J.* **65**, 20P, 1957.
- [4] Cohn P., Gaitonde M., Richter D., *J. Physiol.* **126**, 7, 1954.
- [5] Edstrom J., *Biochim. Biophys. Acta* **12**, 361, 1953.
- [6] Eggelhardt W. A., Lisowska A., *Biochimija nierwnoj sistemy*, **77**, 1954.
- [7] Folch J., Lees M., *J. Biol. Chem.* **191**, 807, 1951.
- [8] Gaitonde M., Richter D., *Biochem. J.* **59**, 690, 1955.
- [9] Gaitonde M., Richter D., *Proc. Soc. Roy. (B)* **145**, 83, 1956.
- [10] Haidoo D., Pratt O. E., *Bioch. J.* **65**, 10 P, 1957.
- [11] Hořejší J., Slavik K., *Zaklady Chemickeho vysetrovani v lekarstvi*, Praha, 1953.
- [12] Hyden H., Hartelius H., *Stimulation of the nucleoprotein production in the nerve cells by malononitrile and its effect on psychic functions in metal disorders*, Copenhagen, 1948.
- [13] Krawczyński J., Drewnowska I., (dane nie opublikowane).
- [13a] Krawczyński J. i współpr. (dane nie opublikowane).
- [14] Krawczyński J., Silicz T. P., *Ukr. Bioch. Žurn.* **29**, 25, 1957.
- [15] Kreps E. M., Smirnow A. A., Czetwernikow D. A., *Biochemia nierwnoj sistemy* **152**, 1954.
- [16] Kreup W., *Confinia Neurolog.* **15**, 73, 1955.
- [17] Logan J. E., Mannel W. A., Rossiter R. J., *Biochem. J.* **51**, 470, 1952.

- [18] Lowry O. H., Gilligan D. R., Katersky E. M., *J. Biol. Chem.* **139**, 795, 1941.
- [19] Mc Ilwain H., *Biochemistry and the central nervous system*, London, 1955.
- [20] Mamoiłow S. J., Orłow A. S., *Biochimija* **18**, 456, 1953.
- [21] Mirsky A. E., Pollister A. W., *J. Gen. Physiol.* **30**, 117, 1946.
- [22] Nieczajewa G. A., *Autoreferat Dysertacji*, Leningrad, 1955.
- [23] Pałladin A. W., *Chem. Zentralbl.* **1**, 217, 1949.
- [24] Pałladin A. W., Polakowa N. M., *DAN, ZSRR*, **107**, 568, 1956.
- [25] Pałladin A. W., Wertaimer N., *DAN, ZSRR* **102**, 319, 1955.
- [26] Pałladin A. W., Bielik J. W., Kraczkowski L. I., *Biochimija* **22**, 359, 1957.
- [27] Pope A., Anfinsen Ch. B., *J. Biol. Chem.* **173**, 305, 1948.
- [28] Robins E., Smith D. E., Eydt K. M., McCaman R. E., *J. of Neurochem.* **68**, 1956.
- [29] Robins E., Smith D. E., Eydt K. M., *J. of Neurochem.* **1**, 77, 1956.
- [30] Rozengart W. I., Masłowa M. N., *Trudy Wss, Konf. po Med. Radiochimii*, 1956 (w druku).
- [31] Sadikowa N. W., Skworcowicz, *Wopr. Med. Chimii* (w druku).
- [32] Schoenheimer R., *The dynamic state of body constituents*, Cambridge Mass., 1942.
- [33] Skaczkowa A. S., *Trudy po primienieniju radioaktywnych izotopow w medicinie*, str. 53, 1955.
- [34] Skwirskaja E. B., Silicz T. P., *Biochimia nierwnej sistemy*, **36**, 1954.
- [35] Skwirskaja E. B., Silicz T. P., *Tezisy dokł. V-sjezd Ukr. T-wa Fizjol. Bioch. Farmakol.*, Charkow 282, 1956.
- [36] Slotka K. H., Primosigh J., *Nature* **168**, 696, 1951.
- [37] Tarver H., Morse L., *J. Biol. Chem.* **173**, marzec, 1948.
- [38] Whipple G. H., Madden M. D., *Medicine* **23**, 215, 1944.
- [39] Winnick T., Friedberg F., Greenberg D., *J. Biol. Chem.* **173**, 189, 1948.
- [40] Władimirow G. J., *Biochimija nierwnej sistemy*, **25**, 1954.
- [41] Vladimirov G. E., *Biochemistry of the developing nervous system*, str. 53, 1955.

STUDIES IN PROTEIN METABOLISM OF THE BRAIN CEREBELLUM WITH  
<sup>14</sup>C-LABELED TYROSINE

Summary

1. Analysing the values of RSA (*RSA* — Relative Specific Activity) — the turnover process of the total protein of the brain and cerebellum of white mice as well as the total protein of the liver being the control organ, after intraperitoneal administration of <sup>14</sup>C-labeled tyrosine was studied. The turnover of serum proteins was also studied. It was found that the turnover was most active in serum protein, less active in the protein of the liver and the least active in the protein of the brain and cerebellum.

2. The protein of the brain, cerebellum and liver was fractionated into 4 fractions: *A*, *B*, *C*, *D*.

Fraction *A*: protein dissolving in 0,14 M NaCl

Fraction *B*: protein dissolving in 1 M NaCl

Fraction *C*: protein dissolving in 1 n NaOH

Fraction *D*: protein undissolving in 1 n NaOH.

It was shown that the most active protein was that in fraction *A* and the least active that in fraction *D*. Because fraction *A*, *B*, *C* can be regarded as nucleoprotein complex it is possible to make a few conclusions as to the role of these compounds in the synthesis of protein in nerve cells.

3. Also discussed was the role of the blood-brain barrier as a factor hindering the investigation of the turnover rate and the turnover time of brain protein after intraperitoneal administration of radioactive indicator.

Otrzymano 31.10.1957 r.



K. KLECZKOWSKI

**BIOSYNTeza CYTRULINY W KIEŁKACH ROŚLIN  
MOTYLKOWYCH***Z Zakładu Biochemii Roślin Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN**Kierownik Zakładu: Prof. dr I. Reifer**Dyrektor Instytutu: Prof. dr J. Heller*

Wada [13] w 1930 r. z soku melona wyizolował i zidentyfikował aminokwas, który nazwał cytruliną. Miettinen i Virtanen [11] w 1952 r. w badaniach nad olchą wykryli w niej duże ilości wolnej cytruliny (do 2<sup>0</sup>/o sm). Aminokwas ten występuje również w stosunkowo dużych ilościach w soku ogórka.

Krebs i Eggleston [9] w 1955 r. stwierdzili obecność „fosforylasy cytrulinowej” w podkiełkowanych nasionach grochu i dwu odmianach fasoli. „Fosforylase cytrulinową” wykryto uprzednio w wątrobie zwierzęcej i niektórych mikroorganizmach [9]. Enzym ten zdolny jest w obecności fosforanów lub arsenianów rozkładać cytrulinę do ornityny, amoniaku i dwutlenku węgla.

Ponieważ obecność cytruliny związana jest z cyklem ornitynowym u ssaków, wielu badaczy przypuszcza, że cykl ten istnieje również u roślin. W 1955 r. Kasting i Delwiche [7] w krótkim komunikacie sugerują istnienie takiego cyklu w melonie (Watermelon). Sugestię tę opierają autorzy na badaniach z zastosowaniem <sup>2</sup><sup>14</sup>C-ornityny i <sup>14</sup>C-argininy. W 1957 r. Coleman i Hegarty [3] stosując przy dokarmianiu jęczmienia i białej koniczyny <sup>14</sup>C-ornitynę stwierdzili na autoradiogramach znaczny wzrost zawartości cytruliny, argininy i proliny oraz nieznaczny przyrost aktywności kwasu glutaminowego,  $\gamma$ -aminomasłowego i glutaminy. Ci sami autorzy powołują się na swoją wcześniejszą pracę, gdzie wykazali w jęczmieniu przemianę cytruliny do argininy. Wykryli oni również ślady radioaktywności mocznika. Nie wykryto obecności wolnej ornityny, co wg autorów związane jest z szybką jej przemianą do cytruliny, argininy i proliny.

W 1957 r. Reuter [12] dokarmiając w sterylnych warunkach gałązki leszczyny azotanem amonowym lub mocznikiem stwierdził kilkakrotne

zwiększenie się zawartości cytruliny jak również argininy oraz w mniejszym stopniu asparaginy.

Z badań nad organizmami zwierzęcymi wiadomo, że do syntezy cytruliny z ornityny niezbędna jest obecność karbamyloglutaminianu [2]. W 1955 r. Jones, Spector i Lipman [6] stwierdzili, że niektóre bakterie zdolne są syntetyzować cytrulinę w obecności karbamylofosforanu (CAP). Wykazali oni również, że CAP może zastępować karbamyloglutaminian w syntezie cytruliny przez organizmy ssaków.

Przyjmując za podstawę pracę: Jones, Spector, Lipman [6], postanowiono przebadać możliwość syntezy cytruliny w niektórych roślinach motylkowych.

#### METODYKA

Karbamylofosforan litu (CAP) otrzymywano wg metody Jones, Spectora, Lipmana [6] uzyskując preparaty o czystości około 85—95%.

Do oznaczania zawartości cytruliny przyjęto metodę opartą na známym teście Fearona w modyfikacji Łazarjewa [10]. Łazarjew adsorbował cytrulinę z ekstraktów zwierzęcych na permutycie.

W toku sprawdzania metody stwierdzono, że posiadane przez Pracownię odmiany permutytu nie adsorbują całkowicie cytruliny (wolna zasada) z wodnych roztworów. Sam autor zresztą twierdzi, że aktywność adsorpcji jest różna w różnych permutytach. Przeprowadzono próbę na kationicie, amberlit IR-120 (Standard grade) (produkcji: Rhom and Haas Company, Philadelphia USA) i uzyskano 100% adsorpcji. Ponieważ na amberlicie IR-120 adsorbują się również w różnym stopniu tryptofan, mocznik i allantoina, które podobnie jak cytrulina dają barwne połączenia z dwumetyloglioksymem, przeprowadzono próby usunięcia tych związków z amberlitu. Zarówno allantoina, jak i mocznik adsorbują się na amberlicie słabiej niż cytrulina. Własność tę wykorzystano do ich usunięcia.

Kolumny z amberlitu przygotowywano w sposób następujący: szklaną rurkę zespawaną z dwu części o różnych średnicach (dolna o długości 8 cm i  $\phi$  0,5 cm oraz górna o długości 10 cm i  $\phi$  1 cm) napełniano luźno amberlitem IR-120 do wysokości 5 cm. Regeneracji amberlitu dokonywano wg metody opisanej przez Archibalda [1] dla amberlitu IR-100. Przez każdą kolumnę przepuszczano 10 ml 10% roztworu chlorku sodowego, płukano 5 ml wody destylowanej i następnie przepuszczano 10 ml 10% kwasu solnego (Archibald stosował 36% kwas solny; okazało się jednak, że stężony kwas solny niszczy amberlit). Kolumny płukano 25 ml wody destylowanej, suszono 5 ml alkoholu etylowego i następnie 5 ml eteru etylowego. W końcu suszono kolumny prądem powietrza przez 2—3 minuty. Szybkość przepuszczania płynów przez kolumnę wynosiła 30—40 kropli na minutę.

Wodne roztwory cytruliny (wolna zasada), allantoiny i mocznika w ilości 3—5 ml (w zależności od stężenia) przepuszczano przez kolumnę. W przesączu wykrywano dużo allantoiny i mniej mocznika. Pozostałe ilości mocznika i allantoiny wmywano z kolumny, płuczając pod pompą wodną początkowo 25 ml wody destylowanej, a następnie 50 ml 0,3% roztworu chlorku sodowego. Szybkość wmywania wynosiła 2—3 krople na sekundę. Cytrulinę eluowano z kolumny przy pomocy 6 ml 4% roztworu  $\text{NH}_3$  (dwie porcje po 3 ml) z szybkością 30—40 kropli na minutę. Wymieszany eluat dzielono na dwie równe części, przygotowując w ten sposób dwie równoległe próby do oznaczania. Dalej postępowano zgodnie z metodą Łazarjewa [10]. Intensywność zabarwienia prób porównywano w kolorymetrze Leitza stosując filtr C. Wyniki analiz ilustruje tablica 1.

Tablica 1

Wymywanie z kolumny amberlitowej IR-120 allantoiny i mocznika w roztworach wodnych zawierających cytrulinę

przepuszczono przez kolumnę $\mu\text{g}$			wykryto cytruliny w $\mu\text{g}$
cytruliny	mocznika	allantoiny	
55	0	0	54
0	60	0	0
0	0	60	0
48	60	0	48
48	0	60	47
48	60	60	47
0	60	60	0

Jak wynika z tablicy 1, allantoinę i mocznik można wymyć ilościowo z amberlitu przed eluowaniem cytruliny.

Tryptofan adsorbuje się na amberlicie podobnie jak cytrulina. Można go usunąć z roztworu przez bromowanie przed adsorpcją na kolumnie. W praktyce zaniechano jednak bromowania ze względu na porównawczy, w stosunku do kontroli, charakter oznaczeń.

Obecność cytruliny, ornityny oraz innych aminokwasów wykrywano również chromatograficznie. Chromatogramy wykonywano zarówno metodą krążkową, jak i zstępującą w układzie fenol-nasycony wodą w atmosferze amoniaku. Czas rozwijania wynosił 24—30 godzin, a temperatura 18—20°C, używano bibuły Whatman nr 1. Wyników badań chromatograficznych nie interpretowano ilościowo.

## CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

Doświadczenia przeprowadzano na kiełkach roślin zarówno zielonych, jak i etiolowanych. Materiałem doświadczalnym były następujące rośliny motylkowe: fasola szparagowa odmiany Księżniczka Holenderska, groch Majowy, groch Sześciotygodniowy, łubin biały, słodki, łubin niebieski wąskolistny (*Lupinus angustifolius*) oraz soja Mazowiecka. Nawózki do badań pobierano w postaci wierzchołkowych liści, liścieni lub korzeni.

Badania rozpoczęto na fasoli [8] inkubując różne części roślin z L(+) dwuchlorowodorkiem ornityny (E. Hoffmann-La Roche) i CAP. Sposób wykonania i warunki inkubacji były następujące: dokładnie odważoną masę roślinną w granicach od 2 do 3 gramów umieszczano w moździerzach o średnicy 9 cm. Do przygotowanego w dwu kolbkach buforu tris (2-amino-2-hydroksymetylo-1-3-propandiol) + kwas maleinowy o pH 8,2 [5] dodawano odpowiednie ilości ornityny i CAP. Z pierwszej kolbki pipetowano 3 ml buforu do próby kontrolnej, a do pozostałej reszty buforu dodawano ornityny w substancji w ilości 25  $\mu$ moli na 3 ml buforu. Z kolbki tej pipetowano 3 ml do kombinacji „ornityna”. W dalszym ciągu do obu kolbek dodawano CAP (w substancji) w ilości 40  $\mu$ moli na 3 ml buforu. Po szybkim i dokładnym rozpuszczeniu CAP przez wymieszanie pipetowano z pierwszej kolbki do kombinacji „ornityna + CAP”, z drugiej zaś do kombinacji „CAP”. Próby natychmiast rozcierano lekko w moździerzach, żeby umożliwić przedostanie się substratu do tkanek w czasie inkubacji. Po roztarciu umieszczano natychmiast moździerz w termostacie z przewiewem w temperaturze 26–28°C na 90 minut mieszając dokładnie co 30 minut. Po inkubacji hamowano czynność enzymów przez dodanie alkoholu etylowego do stężenia 70% objętościowych.

Wyciągi przygotowywano wg metody stosowanej przez Miettineną i Virtaneną [11] przez trzykrotne rozcieranie prób w moździerzu z 70% (objęt.) alkoholem etylowym i wirowanie (3 razy po 10 min przy 2–4 tysięcy obrotów/min). Zebrany wyciąg alkoholowy o objętości 75–100 ml odparowywano w łaźni wodnej o temp. 40–50°C pod zmniejszonym ciśnieniem do 2–5 ml i przenoszono ilościowo do kolby miarowej dopełniając wodą do 25 ml. Część wyciągu odbiałczano przy pomocy wodorotlenku kadmowego [4], skąd pobierano próby do oznaczania cytruliny. Wyciąg nieodbiałczony służył do badań chromatograficznych. Wszystkie wyniki z oznaczeń ilościowych przeliczano na mg% świeżej masy roślin.

## WYNIKI

Tablica 2 przedstawia wyniki badań nad wpływem czasu inkubacji na syntezę cytruliny w wierzchołkowych liściach etiolowanych kiełków fasoli. W oparciu o otrzymane wyniki postanowiono utrzymać 90-minutowy czas inkubacji.

Tablica 2

Wpływ czasu inkubacji na syntezę cytruliny przez liście kielków fasoli odmiany Księżniczka Holenderska

czas inkubacji	rośliny 22-dniowe		rośliny 25-dniowe	
	kontrola	ornit. + CAP	kontrola	ornit. + CAP
	zawartość cytruliny w mg % świeżej masy			
15 min	12	92	15	98
30 min	12	110	14	106
45 min	10	138	13	125
90 min	9	113	13	126

Dane dotyczące doświadczeń z pozostałymi roślinami motylkowymi ilustruje tablica 3.

Tablica 3

Biosynteza cytruliny w kielkach roślin motylkowych

Roślina	Wiek w dniach	Zawartość cytruliny w mg % świeżej masy							
		Liście		Liścienie		Liście		Liścienie	
		Zielone				Etiolowane			
		K	O+CAP	K	O+CAP	K	O+CAP	K	O+CAP
Fasola Księżniczka Holenderska	12	—	—	—	—	13	83	6	10
	14	—	—	—	—	25	96	10	17
	20	—	—	—	—	11	75	8	12
Łubin niebieski wąskolistny	12	21	108	16	93	18	99	16	44
	13	18	91	14	82	11	101	13	54
	14	20	100	14	88	11	94	11	44
	15	22	90	17	84	15	108	12	64
Łubin biały słodki	10	5	17	10	30	9	30	6	20
	11	5	14	10	22	9	19	5	14
	15	6	16	8	25	10	29	6	17
Groch Majowy	6	0	185	0	71	—	—	—	—
	12	6	75	11	64	7	70	8	64
	16	10	90	12	61	12	80	10	62
	20	18	133	19	46	14	85	21	46
Soja Mazowiecka	10	0	19	0	13	0	30	0	11
	14	2	23	4	16	5	27	2	11
	16	0	21	3	19	4	25	6	14
	18	3	29	7	13	9	38	6	16

K = kontrola

O+CAP = ornityna + karbamylfosforan

Przebadano również w dwu doświadczeniach syntezę cytruliny w rozciarach podkielkowanych nasion razem z zarodkami po 72 godzinach moczenia w wodzie w temperaturze 25°C.

Tablica 4

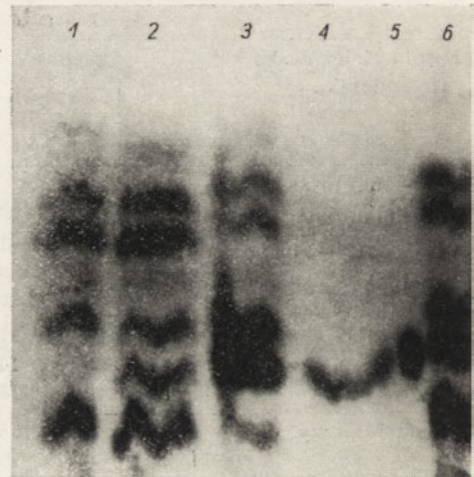
Biosynteza cytruliny w nasionach podkiełkowanych (nasiona moczo no w wodzie przez 72 godziny w temp. 25°C)

Roślina	Zawartość cytruliny w mg % świeżej masy			
	Kontrola	CAP	Ornityna	Ornityna + CAP
Groch Majowy				
doświadczenie I	7	6	5	53
doświadczenie II	8	8	9	62
Soja Mazowiecka				
doświadczenie I	7	8	10	51
doświadczenie II	8	10	8	60

Wyniki badań chromatograficznych wykonanych na ekstraktach z fasoli Księżniczka Holenderska przedstawiają załączone zdjęcia 1 i 2.



Rys. 1. Etiolowane liście 15-dniowych kielków fasoli Księżniczka Holenderska



Rys. 2. Etiolowane liście 12-dniowych kielków fasoli Księżniczka Holenderska

1. Kontrola (bufor tris + kw. malein.)
2. Dodano ornityny + CAP
3. Kontrola + cytrulina (standard)
4. Eluat z kolumny (standard cytrul.)
5. Standard cytruliny (wodny roztwór)
6. Eluat z kolumny odbleńczony (kombinacja ornit. + CAP)

Poza doświadczeniami z inkubacją rozcierów przeprowadzono dwie próby syntezy cytruliny przez proszki acetonowe. Proszki przygotowano

z nasion grochu Sześciotygodniowego w oparciu o metodę opracowaną przez Walkera i Meyersa [14] dla preparatyki argininobursztynazy z mączki *Canavalia ensiformis*. Wyniki tych doświadczeń przedstawia tablica 5,

Tablica 5

Biosynteza cytruliny w proszkach acetonowych z grochu odmiany „Sześciotygodniowy”

Fracje proszku acetonowego	Doświadczenie I		Doświadczenie II	
	Dodano ornit. do inkubacji w $\mu\text{g}$	Wykryto cytruliny w $\mu\text{g}$	Dodano ornit. do inkubacji w $\mu\text{g}$	Wykryto cytruliny w $\mu\text{g}$
Kontrola	0	5,5	0	0
frakcja I				
pH 5,4—5,1	405,0	85,0	243,0	51,0
frakcja II				
pH 5,1—4,6	405,0	10,0	243,0	7,5
frakcja III				
pH 4,6—4,2	405,0	7,5	243,0	6,0

U w a g a: Wszystkie kombinacje poza kontrolą były inkubowane w obecności CAP. Warunki inkubacji podobne jak przy rozcieleniach.

Podane w tablicy ilości ornityny były dodawane do 4 ml inkubatu.

z której wynika, że proszki acetonowe z frakcji I o pH 5,4—5,1 wykazują enzymatyczną katalizę syntezy cytruliny w przeciwieństwie do frakcji II i III, które tej zdolności nie posiadają.

#### DYSKUSJA

Przedstawione wyniki oraz fotografie chromatogramów wskazują, że badane odmiany roślin zdolne są do syntezy cytruliny w obecności CAP i ornityny. Do syntezy cytruliny w warunkach doświadczenia niezbędna jest obecność karbamylofosforanu (CAP). Próby inkubowane tylko z ornityną względnie z CAP nie wykazują syntezy cytruliny. Reakcja syntezy cytruliny z ornityny i CAP jest reakcją katalizowaną enzymatycznie, ponieważ CAP + ornityna dodane do tkanki podgrzanej do 100°C nie wykazują syntezy cytruliny.

Jak można wnioskować z tablicy 3 poszczególne części tych samych roślin oraz rośliny zielone i etiolowane różnią się pod względem zdolności do syntezy cytruliny. I tak na przykład liścienie we wszystkich zbadanych przypadkach (z wyjątkiem łubinu białego słodkiego nieetiolowanego) wykazują zmniejszoną zdolność syntezy cytruliny w porównaniu z liśćmi zarówno etiolowanymi, jak i nieetiolowanymi.

Ponadto wykonano jedno doświadczenie na korzeniach sześciotygodniowych kiełków grochu Majowego. Uzyskany wynik w wysokości 210 mg<sup>0/0</sup> cytruliny wskazuje na dużą enzymatyczną aktywność korzeni.

Intensywność zabarwienia plam chromatogramów wskazuje na to, że w reakcji przemiany ornityny w obecności CAP i miazgi roślinnej obok cytruliny zwiększa się wyraźnie zawartość kwasu glutaminowego, glutaminy i asparaginy. Podobne spostrzeżenia poczynili Kasting i Delwiche [7] w badaniach na melonie, Coleman i Hegarty [3] na jęczmieniu oraz Reuter [12] na drzewach z rodziny *Betulaceae*.

Obok ilościowego oznaczania zawartości cytruliny przeprowadzono również wstępne badania nad zawartością argininy i mocznika w fasoli i grochu Majowym w w/w warunkach doświadczenia. Uzyskane wyniki [8] zdają się pozwalać na przypuszczenie, że u badanych roślin możliwa jest przemiana ornityny poprzez cytrulinę do argininy a nawet i mocznika. Doświadczenia te wymagają jednak dodatkowego rozpracowania.

Za udzielone wskazówki i duże zainteresowanie niniejszą pracą składam serdeczne podziękowanie Prof. dr I. Reiferowi.

#### STRESZCZENIE

Stwierdzono biosyntezę cytruliny z ornityny i karbamylofosforanu (CAP) w miazdze kiełków fasoli odmiany Książniczka Holenderska, grochu Majowym, łubinie białym słodkim, łubinie niebieskim wąskolistnym i soi Mazowieckiej. Zaobserwowano również zdolność enzymatycznej katalizy syntezy cytruliny z ornityny i CAP w proszku acetonowym z nasion grochu Sześciotygodniowego we frakcji pH 5,1—5,4.

Do syntezy cytruliny w w/w warunkach doświadczenia niezbędna jest obecność karbamylofosforanu.

#### LITERATURA

- [1] Archibald R. M., *J. Biol. Chem.* **156**, 121, 1944.
- [2] Cohen P. P., Grisolia S., *J. Biol. Chem.* **182**, 747, 1950.
- [3] Coleman R. G., Hegarty M. P., *Nature* **179**, 376, 1957.
- [4] Fujita A., Iwotake D., *Biochem. Ztschft.* **242**, 43, 1931.
- [5] Gomori G., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **68**, 354, 1948.
- [6] Jones M. E., Spector L., Lipman F. J., *J. Am. Chem. Soc.* **77**, 819, 1955.
- [7] Kasting R., Delwiche C. C., *Plant Physiol. Supplement* **30**, XXVIII, 1955.
- [8] Kleczkowski K., *Bull. Acad. Polon. Sci., Cl. II.*, vol. V, 83, 1957.
- [9] Krebs H. A., Eggleston L. V., *Biochemistry of Nitrogen*, Soumalinen Tiedeacatemia, Helsinki, 1955, str. 496.



- [10] Łazarjew A. F., *Biochimija* **15**, 401, 1950.  
[11] Miettinen J. K., Virtanen A. J., *Physiologia Plantarum* **5**, 540, 1952.  
[12] Reuter G., *Naturwissenschaften* **44**, 45, 1957.  
[13] Wada M., *Biochem. Ztschft.* **224**, 420, 1930.  
[14] Walker J. B., Meyers J., *J. Biol. Chem.* **203**, 143, 1953.

#### BIOSYNTHESIS OF CITRULLINE IN BEAN SEEDLINGS

##### Summary

The synthesis of citrulline from L(+) ornithine and carbamyl phosphate has been confirmed in seedlings of several plants such as beans, peas and lupines.

Aceton powder obtained from pea seeds (pH fraction 5,1—5,4) contains the enzyme, which catalyses the synthesis of citrulline from ornithine and carbamyl phosphate.

The presence of carbamyl phosphate is essential for the synthesis of citrulline.

Otrzymano 26.11.1957 r.



W. MEJBAUM — KATZENELLENBOGEN, W. DOBRYSZYCKA, A. KRÓLICZEK

## ILOŚCIOWE OZNACZANIE TANINĄ FRAKCJI BIAŁKOWYCH SUROWICY ROZDZIELONYCH ZA POMOCĄ ELEKTROFOREZY BIBUŁOWEJ

*Z Zakładu Chemii Fizjologicznej Akademii Medycznej we Wrocławiu  
Kierownik: Prof. dr Tadeusz Baranowski*

W 1950 r. Durrum [3], Turba i Enenkel [10] zastosowali elektroforezę bibułową do frakcjonowania białek surowicy. W tym samym roku Cremer i Tiselius [2] podjęli próbę ilościowego oznaczania rozdzielonych frakcji przez pomiar ilości barwika absorbowanego przez białka krwi. Obecnie zagadnienie ilościowego oznaczania rozdzielonej elektroforetycznie mieszaniny białek opiera się na dwóch metodach: pośredniej (eluowanie zaabsorbowanego barwika z bibuły) i bezpośredniej — densitometrycznej. Obie metody opierają się na tej samej zasadzie: oznaczania względnego, procentowego rozkładu frakcji na podstawie pomiaru gęstości optycznej różnych barwników, absorbowanych przez białko. Ograniczeniem obu tych metod jest brak proporcjonalności pomiędzy ilością białka a ilością absorbowanego barwika i różnice w swoistości wiązania barwników przez poszczególne frakcje białek surowicy, a w szczególności przez frakcje globulinowe [1, 7]. Liczni autorzy dążyli do ustalenia takich warunków postępowania po elektroforezie, które by zapewniły uzyskanie względnego rozkładu frakcji odpowiadającego wynikom wolnej elektroforezy Tiseliusa.

Oznaczanie tych samych elektroforogramów densitometrycznie i kolorymetrycznie po elucji daje różnice w procentowym rozkładzie frakcji. Jencks, Jetton i Durrum w 1955 r. [5] stwierdzili, że w elektroforogramach wybarwionych błękitem bromofenolowym, w ustalonych przez nich optymalnych warunkach i odczytywanych w densitometrze, albuminy nie stosują się do prawa Beera. Dla uzyskania właściwych wyników, zgodnych z oznaczaniem kolorymetrycznym, należy wprowadzać poprawkę dla albumin. Podobne wyniki otrzymali Gross i Wrońska [4] w odczytywaniu paszków z elektroforezy bibułowej w różnych densitometrach. Otrzymywali oni zmniejszone ilości albumin i różnice w rozkładzie frakcji w zależności

od typu używanego aparatu. Z drugiej strony w metodach pośrednich (kolorymetrycznych) istnieją duże rozbieżności pomiędzy danymi, uzyskiwanymi przez poszczególnych autorów [1, 7]. W większości prac autorzy nie wprowadzają żadnych poprawek dla poszczególnych frakcji, niektórzy natomiast uważają za konieczne wprowadzanie współczynników dla poszczególnych frakcji globulinowych [2, 6]. Wartość liczbową współczynnika zależy od techniki postępowania i rodzaju używanego barwika.

Podjęmowano również próby oznaczania stężenia białka we frakcjach surowicy. Durrum [1] proponował oznaczanie azotu białkowego mikrometodą Kjeldahla w pociętych paskach bibuły po elektroforezie i obliczanie stężeń białka po uwzględnieniu obecności azotu w moderatorze i różnej jego zawartości w poszczególnych frakcjach białkowych.

Postawiliśmy sobie za zadanie w tej pracy oznaczyć bezwzględne stężenia białka w poszczególnych frakcjach białek surowicy mikrometodą taninową [8, 9]. Metoda taninowa nadaje się do oznaczania stężenia białka już w 0,5  $\mu$ l surowicy i nie wymaga stosowania żadnych współczynników poprawkowych dla poszczególnych frakcji. Jeżeli uda się uzyskać całkowitą elucję białka z bibuły po elektroforezie, to wówczas będzie można oznaczać z jednakową dokładnością białka surowicy bez elektroforezy jak i poszczególne frakcje, uzyskane po elektroforezie. Zgodność wyników w obu przypadkach będzie dowodem, że obliczony procentowy rozkład frakcji odpowiada ich stężeniu w surowicy.

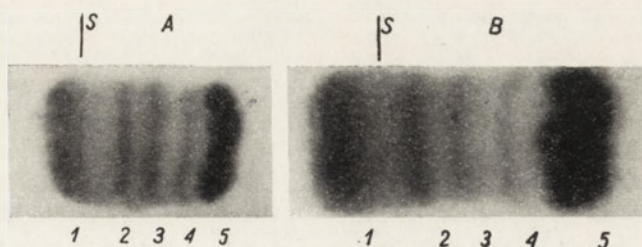
## CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

### 1. Warunki elektroforetycznego rozdziału białek surowicy

Używano aparatu własnej konstrukcji przypominającego poziomy aparat Wielanda i Fischera [11]. Kamera o wymiarach: 30 cm  $\times$  25 cm  $\times$  7 cm mieściła pięć pasków bibuły o wymiarach: 36 cm  $\times$  4 cm. Moderator znajdował się w czterech wanienkach o wymiarach: 25 cm  $\times$  5 cm  $\times$  4 cm, połączonych kluczami. Elektrody węglowe umieszczano w naczyniach zewnętrznych.

Ustalono następujące warunki dla uzyskania dobrego rozdziału elektroforetycznego białek surowicy: na pasek bibuły Whatmana nr 1, zwilżony moderatorem i osuszony pomiędzy dwiema bibułami, наносzono dokładnie 0,02 ml surowicy z pipetki Sahliego w odległości 2 cm od środka w stronę katody. Używano moderatora medinalowo-octanowego o  $pH = 9,0$ , sile jonowej 0,06, o następującym składzie: medinal 7,36 g; octan sodu 3,86 g; woda destylowana 1100 ml. Stosowano prąd stały z sieci o napięciu nominalnym 220 V przez 7 godzin (natężenie 1—2 mA na pasek) lub 440 V przez 4 godziny (natężenie 2—3 mA na pasek).

Rysunek 1 przedstawia uzyskiwany przez nas rozdział frakcji przy 220 V i 440 V. Otrzymywano pięć dobrze oddzielonych frakcji białek surowicy na długości 6—9 cm przy 220 V i na długości 4—5 cm przy 440 V.



Rys. 1. Elektroforogramy surowicy uzyskiwane przy 440 i 220 volt  
Warunki elektroforezy: bibuła Whatman nr 1; 0,02 ml surowicy naniesionej w odległości 2 cm od środka w stronę katody; bufor medinalowo-octanowy o  $pH = 9,0$  i  $\mu = 0,06$ ; wybarwiano błękitem bromofenolowym wg Durruma [3]

A — napięcie = 440 V; czas = 4 godziny; długość rozdziału = 4 cm  
B — napięcie = 220 V; czas = 7 godzin; długość rozdziału = 6 cm

- |                                 |                                 |
|---------------------------------|---------------------------------|
| 1 — gamma globuliny             | 4 — alfa <sub>1</sub> globuliny |
| 2 — beta globuliny              | 5 — albuminy                    |
| 3 — alfa <sub>2</sub> globuliny | S — linia naniesienia surowicy  |

## 2. Warunki elucji

Podstawowym warunkiem dla ilościowego oznaczania stężeń poszczególnych frakcji białkowych surowicy było ustalenie postępowania, zapewniającego całkowite eluowanie mikrogramowych ilości białka z powierzchni bibuły, odpowiadającej wymiarom rozwiniętego elektroforogramu (około 32 cm<sup>2</sup>). Braliśmy pod uwagę rodzaj rozpuszczalnika, czas elucji i wpływ postępowania po ukończeniu elektroforezy.

Wartości uzyskiwane po elucji odnosiliśmy do surowicy rozcieńczonej 0,9% NaCl [9].

Do elucji białka używaliśmy trzech rozpuszczalników: 0,9% NaCl, 0,1 N HCl, 0,1 N NaOH. W próbach kontrolnych stwierdziliśmy, że nie wpływają one na czułość odczynu taninowego i nie eluują z bibuły Whatmana nr 1 żadnych zanieczyszczeń, reagujących z taniną.

Dla zorientowania się, jak przebiega eluowanie białka z bibuły bez elektroforezy, nanoszono 0,02 ml surowicy na bibułę i po wysuszeniu w temperaturze pokojowej wrzucano ją do 20 ml badanego rozpuszczalnika. W odstępach 15-minutowych pobierano próbki do oznaczania białka metodą taninową. W chlorku sodowym i kwasie solnym uzyskiwano wartości zmienne i niższe niż w 0,1 N NaOH.

W 0,1 N NaOH po 15 minutach uzyskiwano około 60% wyjściowej ilości białka, po 30 minutach — 80%, a po godzinie — 100%; w dalszych godzinach stężenie białka w eluacie nie ulegało zmianie. Za wystarczający czas do całkowitej elucji białka przyjęliśmy jedną godzinę.

T a b l i c a 1

*Odnalezienie białka surowicy krwi z bibuły bez elektroforezy i po elektroforezie zależnie od czasu przechowywania pasków*

Postępowanie przed eluowaniem białka z bibuły		% odnalezionego białka po czasie w godzinach: *		
		1	24	48
Bez elektroforezy	Bibuła (32 cm <sup>2</sup> ), przepojona buforem; po naniesieniu surowicy suszona i przechowywana w temperaturze pokojowej	100	80	43
	Bibuła (32 cm <sup>2</sup> ), przepojona buforem; po naniesieniu surowicy suszona 10 minut w temp. 90°, przechowywana w temp. 5°	100	100	100
Po elektroforezie	Elektroforogram suszony i przechowywany w temperaturze pokojowej	100	75	39
	Elektroforogram suszony przez 10 minut w temp. 90° i przechowywany w temp. 5°	100	100	100

Średnie odnalezienie białka wyrażono w procentach wartości próby kontrolnej: 0,02 ml surowicy w 20 ml 0,9% NaCl.

Warunki elektroforezy: 220 V, 7 godzin, moderator medinalowo-octanowy o  $pH = 9,0$ ;  $\mu = 0,06$ , bibuła Whatman nr 1. Ilość surowicy — 0,02 ml. Eluowano 1 godzinę 20 ml 0,1 N NaOH.

\*) Czas liczono od naniesienia surowicy na bibułę (doświadczenia bez elektroforezy) lub od ukończenia elektroforezy.

Do eluowania frakcji z elektroforogramu braliśmy paski po 7-godzinnej elektroforezie w 220 V i dla uniknięcia ewentualnych strat wynikających z denaturacji cieplnej, pozostawialiśmy paski do suszenia w temperaturze pokojowej przez noc. Eluowanie pasków następnego dnia dawało około 75% wyjściowej ilości białka. Dla znalezienia przyczyny tych strat podjęliśmy szereg doświadczeń, których wyniki przedstawia tablica 1.

Paski po elektroforezie suszone i przechowywane w temperaturze pokojowej przez godzinę dawały odnalezienie całkowitej ilości naniesionego białka, natomiast po 24 godzinach — około 75% wyjściowej ilości białka, a po 48 godzinach — poniżej 45%. Analogiczne wyniki uzyskano w przypadku białka nanoszonego na bibułę, ale nie poddanego elektroforezie.

Wzrastająca utrata białka w miarę przedłużania się czasu przechowywania nie jest więc wywołana elektroforezą, a wynika z postępowania po elektroforezie.

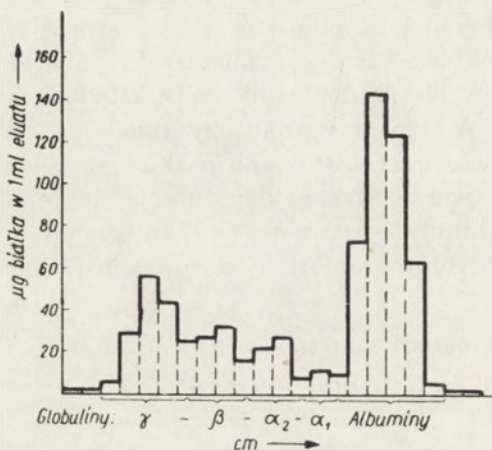
Uważaliśmy, że strata w oznaczanej ilości białka jest wywołana rozwojem flory bakteryjnej na bibule, a nie denaturacją cieplną, względnie powierzchnią białka. Nasze przypuszczenia potwierdziliśmy, poddając białko naniesione na bibułę działaniu temperatury około 90° przez 10—20 minut w suszarce. W tym przypadku uzyskiwaliśmy całą ilość białka, nawet po 48 godzinach przechowywania pasków w lodówce (5°).

Z doświadczeń tych wynika, że denaturacja cieplna nie ogranicza odzyskiwania białka z bibuły i pozwala na uniknięcie strat wywołanych przechowywaniem elektroforogramów w warunkach niesterylnych.

### 3. Dokładność metody taninowej w ilościowym oznaczaniu frakcji białkowych surowicy przy normalnym i patologicznie zmienionym obrazie białek krwi

Ilościowe oznaczanie stężeń frakcji białkowych w 0,02 ml surowicy, rozdzielonych elektroforetycznie przy 220 V, w ciągu 7 godzin przeprowadzano następująco: elektroforogramy suszono natychmiast po wyjęciu z aparatu w suszarce w temperaturze 90°. Jeden z pasków wybarwiano wg Durruma [3] błękitem bromofenolowym (0,1% roztwór w etanolu, nasycony HgCl<sub>2</sub>) przez 5 minut i wymywano pod bieżącą wodą. Pasek ten służył za kontrolę rozdziału frakcji białkowych. Paski nie wybarwione cięto na odcinki 0,5 cm na przestrzeni rozwiniętego elektroforogramu w pasku kontrolnym. Odrzucane części bibuły wybarwiano błękitem bromofenolowym dla kontroli na obecność białka. Odcinki 0,5 cm wrzucano do kolejno numerowanych probówek, zawierających po 2 ml 0,1 N NaOH. Po godzinnej elucji w temperaturze pokojowej, w czasie której kilkakrotnie wstrząsano probówki, pobierano z każdej, bez usuwania bibuły, po 1 ml i oznaczano białko metodą taninową. Zmętnienie mierzono w absorpcjometrze Hilgera, w probówkach przy filtrze czerwonym ROR-2. Oznaczanie białka w eluacie można odłożyć do dnia następnego, natomiast należy unikać przechowywania elektroforogramów przez noc z powodów przytoczonych powyżej. W przypadkach gdy w 1 ml eluatu ilość białka przekracza 80 µg, pobierano dodatkowo mniejszą ilość do oznaczania (0,5 ml) uzupełniając 0,1 N NaOH do 1 ml, ze względu na zakres czułości

metody taniinowej (20—100 mikrogramów białka na ml próby). Szczególnie w zakresie frakcji albuminowej konieczne jest pobieranie mniejszych próbek eluatu do oznaczenia białka albo cięcie węższych odcinków bibuły (2 mm). Stężenie białka odczytywano z krzywej zrobionej na standardzie żelatynowym i przeliczano na zawartość białka w mililitrze eluowanej próbki. Suma stężeń białka uzyskana z wszystkich odcinków elektroforogramu daje ilość białka znajdującą się w 0,01 ml surowicy (1/2 ilości nanesionego białka).



Rys. 2. Graficzne przedstawienie wyników uzyskanych z oznaczenia metodą taniinową frakcji białkowych w 0,01 ml surowicy normalnej po elektroforezie bibułowej  
Stężenie białka

w g/100 ml surowicy:  $1,5 + 0,78 + 0,61 + 0,15 + 4,23 = 7,3\%$

Warunki elektroforezy jak rys. 1B

Paski po elektroforezie suszono przez 10 minut w temp. 90°, cięto na odcinki o długości 0,5 cm (oś rzędnych) i eluowano 2 ml 0,1 N NaOH przez jedną godzinę w temperaturze pokojowej. Białko oznaczano metodą taniinową i przeliczano na jeden ml eluatu.

Na rysunku 2 przedstawiono graficznie wyniki jednego oznaczenia frakcji białkowych surowicy normalnej. Na osi odciętych zaznaczono długość rozwiniętego elektroforogramu w centymetrach, na osi rzędnych mikrogramy białka w mililitrze badanego eluatu. Stężenie białka w danej frakcji uzyskiwano przez sumowanie stężeń białka eluowanego z poszczególnych powierzchni bibuły, przy czym stężenia graniczne (*minima*) dzielono w połowie pomiędzy sąsiadujące frakcje. Całkowite stężenie białka w 100 ml surowicy, uzyskane po elektroforezie przez sumowanie stężeń poszczególnych frakcji, wynosi w przytoczonym przykładzie 7,3 g, a w równoległej próbie kontrolnej (bez elektroforezy) — 7,4 g. Rozkład poszczególnych frakcji w podanym przykładzie odpowiada normalnemu obrazowi białek krwi.



T a b l i c a 2  
Oznaczenie metodą taninową stężeń frakcji białkowych uzyskanych po elektroforezie  
bibułowej 0,02 ml surowicy, pochodzącej od jednego dawcy

nr	Elektroforeza bibułowa												Białko całkowite w g/100 ml	Białko oznaczone bezsređnio w g/100 ml	% odzyskanego białka po elektro- forezie		
	Albuminy			Globuliny						gamma							
	alfa <sub>1</sub>			alfa <sub>2</sub>			beta			gamma							
	E	g/100	%	E	g/100	%	E	g/100	%	E	g/100	%				E	g/100
1	2,26	4,14	59,2	0,08	0,15	2,1	0,29	0,54	7,7	0,52	0,96	13,7	0,61	1,21	17,3	7,0	100
2	2,24	3,76	59,6	0,04	0,07	1,2	0,22	0,39	6,2	0,54	0,99	15,4	0,62	1,12	17,6	6,33	98
3	2,35	4,35	63,7	0,13	0,24	3,5	0,26	0,48	7,1	0,30	0,55	8,0	0,65	1,28	17,7	6,9	100,7
4	2,40	4,70	66,9	0,11	0,21	3,0	0,21	0,39	5,6	0,34	0,64	9,2	0,52	1,07	15,3	7,01	100
5	2,20	4,10	59,0	0,07	0,12	1,7	0,30	0,55	8,0	0,43	0,78	11,3	0,76	1,38	20,0	6,93	99
6	2,20	4,00	59,7	0,10	0,19	2,8	0,33	0,59	8,8	0,49	0,88	13,2	0,57	1,04	15,5	6,7	100
	2,28*	4,18	61,35	0,08	0,16	2,38	0,27	0,49	7,23	0,43	0,80	11,8	0,62	1,18	17,23	6,81	99,6
		±			±			±			±			±		±	
		0,28**			0,06			0,08			0,19			0,13		0,27	

Warunki elektroforezy bibułowej — jak rys. 1B.

Postępowanie po elektroforezie — jak rys. 2.

Podane ekstrakcje dla frakcji przeliczone są na 0,01 ml surowicy.

W kontroli oznaczano stężenie białka metodą taninową w 0,01 ml surowicy, rozcieńczonej dziesięciokrotnie 0,9% chlorkiem sodowym.

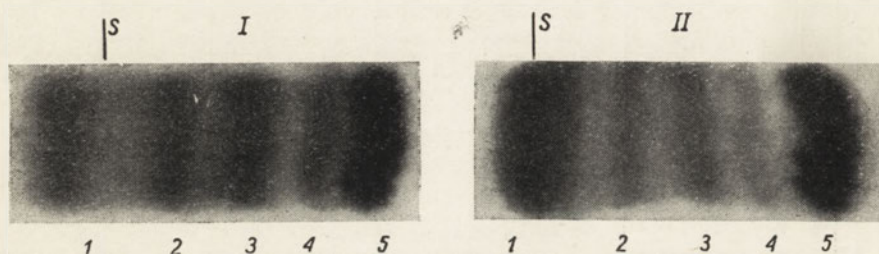
\* Średnia arytmetyczna (A).

\*\* odchylenie standardowe  $\sigma = \pm \sqrt{\frac{(A-x)^2}{(n-1)}}$ .

x — pojedynczy pomiar.

n — ilość oznaczeń.

W tablicy 2 przedstawiliśmy wyniki przeprowadzonych analiz białek surowicy krwi, pobieranych o dowolnej porze kilkakrotnie od jednego dawcy dla ustalenia dokładności metody taninowej w ilościowym oznaczaniu stężeń frakcji białkowych. Podano wartości dla białka całkowitego surowicy, oznaczanego bez elektroforezy (kontrola) i stężenia białka w poszczególnych frakcjach, uzyskane po elektroforezie. Sumowane stężenia białka z poszczególnych frakcji dają średnio 99,6% całkowitej ilości białka. Eluowanie białka z drobnych odcinków bibuły po elektroforezie przebiega ilościowo i nie powiększa błędu metody. Średnie stężenie białka bez elektroforezy wynosi  $6,84\% \pm 0,21$ , a po elektroforezie suma stężeń frakcji daje  $6,81\% \pm 0,27$ . Ponadto wyliczony procentowy rozkład frakcji, oznaczanych metodą taninową, jest zgodny z danymi innych autorów [12].



Rys. 3. Elektroforogramy surowic ze zmienionym obrazem frakcji białkowych  
Warunki elektroforezy jak rys. 1B

I — rozpoznanie: *Erythematodes acutus*  
II — rozpoznanie: *Seminoma testis*

Dla sprawdzenia, czy metoda taninowa znajdzie również zastosowanie w przypadkach patologicznych, przebadaliśmy 10 surowic z wyraźnymi zmianami w obrazie elektroforetycznym białek krwi. We wszystkich przypadkach uzyskiwano metodą taninową sumę stężeń poszczególnych frakcji

Tablica 3

Oznaczanie metodą taninową stężeń frakcji białkowych uzyskanych po elektroforezie bibułowej w surowicach ze zmienionym obrazem białek krwi

Rys.	Rozpoznanie	Elektroforeza bibułowa					Suma stężeń frakcji	Białko całkowite oznaczone bezpośrednio
		albuminy	globuliny			gamma		
			alfa <sub>1</sub>	alfa <sub>2</sub>	beta			
3-I	<i>Erythematodes acutus</i>	3,55*	0,16	0,58	0,42	2,36	7,07	7,1
3-II	<i>Seminoma testis</i>	3,05	0,20	1,90	0,92	1,94	8,01	8,0

Warunki elektroforezy jak rys. 1B, postępowanie jak w tablicy 2.

\* wyrażone w gramach białka na 100 ml surowicy.

równą białku całkowitemu, przy czym procentowy rozkład frakcji odpowiadał obrazowi wybarwionych elektroforogramów. Poniżej przytaczamy dwa przykłady obrazu elektroforetycznego (Rys. 3) i wyniki ilościowego oznaczania frakcji białkowych (Tablica 3). W obu przypadkach stwierdzono zmniejszoną ilość albumin, a w pierwszym przykładzie (rozpoznanie: *erythematodes acutus*) znacznie zwiększoną ilość  $\gamma$ -globulin, w drugim (rozpoznanie: *seminoma testis*)  $\alpha_2$ -globulin.

#### 4. Porównanie oznaczania procentowego rozkładu frakcji białkowych surowicy krwi metodą taniową i kolorymetryczną

Dla bezpośredniego porównania metody taniowej z przyjętą powszechnie metodą kolorymetryczną przebadano 7 surowic od różnych dawców (pracownicy tutejszego Zakładu, subiektywnie zdrowi).

Tablica 4

Porównanie procentowego rozkładu frakcji białkowych w surowicach ludzi zdrowych po elektroforezie 0,02 ml surowicy, uzyskanych metodą taniową i kolorymetryczną

Metoda	n	względne %*				
		albuminy	globuliny			
			alfa <sub>1</sub>	alfa <sub>2</sub>	beta	gamma
taniowa	7	62,77	2,77	7,38	9,74	17,34
		53,8 — 72,9	1,1 — 6,1	3,9 — 13,8	7,0 — 14,5	11,1 — 20,8
kolorymetryczna	7	46,65	2,28	13,1	13,64	24,78
		36,5 — 54,5	1,4 — 3,5	7,0 — 23,2	9,7 — 16,8	12,5 — 38,6
wg Wunderly'ego		61,6	3,9	7,3	10,7	16,5
		55,4 — 72,9	1,4 — 4,4	3,5 — 9,5	8,6 — 12,6	13,6 — 22,2

Warunki elektroforezy jak rys. 1B.

Postępowanie po elektroforezie w metodzie taniowej jak rys. 2, w metodzie kolorymetrycznej jak w tekście str. 173 poniżej.

Przebadano surowice od siedmiu ludzi subiektywnie zdrowych.

\* Podano średnie arytmetyczne z siedmiu surowic wraz z granicami wahań.

Metodą kolorymetryczną oznaczano frakcje, jak następuje: pasek po elektroforezie barwiono błękitem bromofenolowym wg Durruma [3], cięto na odcinki 0,5 cm i eluowano je 4 ml 0,1 N NaOH. Ekstynkcję oznaczano w całości eluatu po 15 minutach w absorpcjometrze Hilgera, używając filtru zielonego ROG-1. Przy przedłużającej się elucji wartości ekstynkcji malały.

Wyniki równolegle przeprowadzonych oznaczeń względnego stosunku frakcji białkowych obiema metodami przedstawia tablica 4, w której podano również normy dla poszczególnych frakcji wg Wunderly'ego [12].

Procentowy rozkład frakcji, otrzymany metodą taninową, odpowiada wartościom podanym przez Wunderly'ego jak również przez Grossa i Wrońską [4], natomiast metodą kolorymetryczną wykazuje niedobór frakcji albuminowej na korzyść frakcji globulinowej.

W metodzie kolorymetrycznej różnica między potencjalnym a aktualnym wiązaniem barwika otwiera szerokie pole dla błędów wynikających z techniki barwienia, suszenia i czasu eluowania elektroforogramów. Uzyskiwany przez nas niedobór frakcji albuminowej w metodzie kolorymetrycznej wynika prawdopodobnie z tych czynników. Przy stosowaniu techniki Cremera i Tiseliusa [2] uzyskiwaliśmy dla albumin wartości wyższe, niemniej jednak niższe niż w oznaczeniach metodą taninową. Metoda taninowa jest wolna od błędów wynikających z techniki barwienia i różnic w wiązaniu barwika przez poszczególne frakcje.

Metoda taninowa zastosowana do ilościowego oznaczania frakcji białkowych surowicy jest pierwszą dogodną metodą oznaczania stężeń poszczególnych frakcji białkowych rozdzielonych przy pomocy elektroforezy bibułowej.

#### STRESZCZENIE

Zastosowano turbidimetryczną mikrometodę taninową do ilościowego oznaczania frakcji białek surowicy krwi, rozdzielonych przy pomocy elektroforezy bibułowej.

Stwierdziliśmy, że poszczególne frakcje białkowe dają się ilościowo eluować z pasków bibuły 0,1 N NaOH i oznaczać metodą taninową w stężeniach nie przekraczających 100 mikrogramów białka na jeden ml eluatu.

Uzyskano wyniki powtarzalne, z dokładnością nie przekraczającą błędów metody tak w surowicach normalnych, jak i patologicznie zmienionych.

Metoda taninowa w porównaniu do metod dotychczas stosowanych pozwala na oznaczanie bezwzględnych ilości białka w danych frakcjach, a nie procentowego, względnego ich rozkładu, już w 0,01 ml surowicy krwi. Jest bardzo prosta w wykonaniu i nadaje się do oznaczeń seryjnych.

#### LITERATURA

- [1] *Ciba Foundation Symposium on Paper Electrophoresis*, London, J. and A. Churchill Ltd., 1956.
- [2] Cremer H. D., Tiselius A., *Biochem. Z.* **320**, 273, 1956.
- [3] Durrum E. L., *J. Amer. Chem. Soc.* **72**, 2943, 1950.
- [4] Gross S., Wrońska T., *Acta Biochim. Polon.* **4**, 3, 1957.
- [5] Jencks W. P., Jetton M. R., Durrum E. L., *Biochem. J.* **60**, 205, 1955.
- [6] Kunkel H., Tiselius A., *J. Gen. Physiol.* **35**, 89, 1951.

- [7] Lederer M., *Introduction to Paper Electrophoresis and Related Methods*, Elsevier Publishing Company, 1955.
- [8] Mejbaum-Katzenellenbogen W., *Acta Biochim. Polon.* **2**, 279, 1955.
- [9] Mejbaum-Katzenellenbogen, W., *Bull. Acad. Polon. Sci. Cl. II*, **3**, 171, 1955.
- [10] Turba F., Enenkel H., *Naturwiss.* **37**, 93, 1950.
- [11] Wieland T., Fischer E., *Naturwiss.* **35**, 29, 1948.
- [12] Wunderly Ch., *Die Papierelektrophorese*, Sauerlaender and Co. Aarau, 1954.

QUANTITATIVE DETERMINATION WITH THE AID OF TANNIN OF SERUM  
PROTEIN FRACTIONS SEPARATED BY PAPER ELECTROPHORESIS

Summary

The tannin turbidimetric micromethod was used for quantitative determination of serum protein fractions separated by paper electrophoresis.

The authors found that the particular protein fractions may be eluted quantitatively with 0.1 N NaOH from paper strips and determined with the aid of the tannin method in concentrations not above 100 micrograms of protein per 1 ml. of eluate.

The results obtained from normal as well as pathologically changed sera were reproducible, the differences not exceeding the error of method.

As compared to other methods currently used, the tannin method makes it possible to determine absolute quantities of protein in the given fractions, and not merely their relative per cent ratio, even in 0.01 ml. of blood serum. It is simple and conveniently used for serial determinations.

Otrzymano 8.12.1957 r.



A. KOJ, J. M. ZGLICZYŃSKI, W. BICZ

## WPLYW ERYTROCYTÓW NA ODDYCHANIE LEUKOCYTÓW LUDZKICH\*)

Z Zakładu Chemii Fizjologicznej A. M. w Krakowie  
Kierownik Zakładu: Prof. dr B. Skarżyński

Dosyć bogate piśmiennictwo dotyczące metabolizmu leukocytów traktuje to zagadnienie głównie na podstawie doświadczeń, przeprowadzanych z prawidłowymi komórkami wyosobnionymi z krwi zwierzęcej lub też z leukocytami ludzkimi, ale pobranymi z krwi chorych na białaczkę. Wyjątkowo tylko przeprowadzono doświadczenia z leukocytami ludzi zdrowych, głównie w celu porównania krwi normalnej i białaczkowej [1, 5, 6], co jest zresztą zrozumiałe ze względu na rozliczne trudności, z jakimi spotyka się otrzymywanie większych ilości tych komórek. Klasyczne metody badania przemiany oddechowej komórek, oparte na zastosowaniu aparatury Warburga, wymagają poważnej ilości leukocytów, którą trudno otrzymać z krwi ludzkiej, szczególnie dla przeprowadzenia doświadczeń wielokrotnych. Trudności te zostały omówione przez nas w osobnej publikacji, zajmującej się metodyką oczyszczania leukocytów [3].

Do zagadnienia badania przemiany oddechowej leukocytów krwi zdrowego człowieka postanowiliśmy więc podejść, stosując znaną metodę nurków Kartezjusza, pozwalającą na przeprowadzanie pomiarów gazometrycznych na tysiącokrotnie mniejszych ilościach materiału biologicznego niż te, które są niezbędne dla badań techniką Warburga. W tym czasie, gdy rozpoczęliśmy nasze badania, nie napotkaliśmy w piśmiennictwie doniesień na temat pomiarów oddychania leukocytów za pomocą nurków Kartezjusza. Dopiero ostatnio zetknęliśmy się z pracą Kielera [6], który oznaczał zużycie tlenu przez leukocyty człowieka, posługując się tą precyzyjną ultramikrometodą. Już w toku naszych pierwszych doświadczeń zauważyliśmy, że zużycie tlenu przez prawidłowe leukocyty przeliczone na pojedyncze komórki wykazuje znaczne wahania, w zależności od domieszki erytrocytów. Podjęliśmy serię systematycznych doświadczeń,

\*) Praca częściowo subwencjonowana przez II Wydział PAN.

z których wynika jednoznacznie, że dodatek zawiesiny erytrocytów, wykazujących zresztą minimalne własne zużycie tlenu, wzmacnia znacznie zużycie tlenu przez leukocyty. Między oddychaniem leukocytów a obecnością erytrocytów zachodzi ścisła korelacja.

Poniższa praca przedstawia dokładniejszy opis zaobserwowanego przez nas zjawiska oraz próbę analizy związku zachodzącego między oddychaniem leukocytów a obecnością erytrocytów.

## CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

### 1. Metodyka

a) *Otrzymywanie leukocytów i erytrocytów.* Leukocyty otrzymywano z 10 ml krwi żyłnej ludzi zdrowych. Dla zapobiegania krzepnięciu dodawano do krwi izotoniczny roztwór cytrynianu (w kilku doświadczeniach używano heparyny). Izolowanie leukocytów przeprowadzano według własnej metody opisanej poprzednio [3].

Metoda ta opiera się na stosowaniu wirowania i frakcjonowanej sedymentacji. Przez ostrożne zebranie pewnych warstw osadu komórkowego po odwirowaniu krwi uzyskuje się dość duże zagęszczenie leukocytów, jednakże znacznie jeszcze zanieczyszczonych krwinkami czerwonymi. Sedymentacja tak uzyskanej zawiesiny komórek w specjalnym naczynku kształtu litery „U” z włosowatym zakończeniem pozwala na usunięcie większości erytrocytów przy dalszej możliwości zagęszczenia leukocytów. Otrzymane w ten sposób ciała białe pozostawały zawieszane w ich własnej cytrynianowej surowicy, a zatem w warunkach zbliżonych do fizjologicznych. W zawieszynie tej obliczano ilość leukocytów przy pomocy komory Thomy-Zeissa, określano obraz morfologiczny wg Schillinga w barwionym panoptycznie preparacie oraz oznaczano zanieczyszczenie krwinkami czerwonymi wyrażone w ‰ ‰ przez obliczenie ich ilości w komorze. Zawiesina zawierała zwykle 50 000 do 100 000 leukocytów/mm<sup>3</sup>, przy czym zanieczyszczenie erytrocytami wynosiło od 15 do 30% ogólnej ilości komórek, to znaczy, że 1 erytrocyt przypadał na 2—6 leukocytów.

Na ogół obraz Schillinga cechował się wyraźnym przesunięciem w kierunku limfocytów. Ilość limfocytów wyrażona w odsetkach wahała się od 40 do 60% ogólnej ilości ciałek białych. Leukocytom tej zawiesiny towarzyszyły zawsze płytki, które mimo swej nietrwałości utrzymywały się długo w surowicy.

Zawiesinę erytrocytów otrzymywano każdorazowo równolegle z leukocytami z tej samej próbki krwi przez odciągnięcie cienką pipetą zawiesiny komórek z dna próbek wirówkowych i ewentualne następne rozcieńczenie bezkomórkową surowicą cytrynianową. Otrzymane zawiesiny



zawierały 3 do 10 milionów erytrocytów/mm<sup>3</sup> przy prawie zupełnym braku leukocytów. Czas upływający od pobrania krwi z żyły do rozpoczęcia odczytów wynosił dla większości doświadczeń 2 godz. 30 min.

b) *Aparatura*. Zużycie tlenu przez zawiesiny komórek krwi oznaczano metodą nurków Kartezjusza. Użycie nurków magnetycznych opisanych przez Bicza [2] umożliwiło mieszanie kropli dennej przed oraz w ciągu oznaczenia. Ponieważ nie było istotnych różnic w wynikach doświadczeń przeprowadzanych z ciągłym mieszaniem lub bez niego, w większości doświadczeń stosowano tylko jednorazowe dokładne wymieszanie kropli dennej przed rozpoczęciem odczytów. Nurki wypełniano w temperaturze pokojowej, a pomiary przeprowadzano w łaźni o temperaturze 37,5°C, co zmuszało do zakładania dodatkowej plomby ujścia [2].

W doświadczeniach posługiwano się serią 10 nurków magnetycznych o stałej wynoszącej 11 do 13 μl. Pozostałe szczegóły techniki nurków nie odbiegały od zasad rozwiniętych przez Linderstoema-Langa i Holtera, a zebranych w podręczniku Glicka [4].

## 2. Schemat i przebieg doświadczeń

Większość naszych eksperymentów przeprowadzana była w specjalnym układzie doświadczalnym, który pozwalał na ocenę i porównanie jednoczesnego zużycia tlenu przez zawiesinę leukocytów (*L*), kontrolnych erytrocytów (*E*) oraz mieszaninę tych dwu zawiesin komórkowych (*L+E*). Typowy schemat wypełnienia nurków wyglądał następująco:

a) *Badanie zużycia tlenu przez leukocyty*; 2—3 nurki zawierające w kropli dennej leukocyty: 0,9 μl *L* + 0,3 μl surowicy.

b) *Badanie zużycia tlenu przez mieszaninę erytrocytów i leukocytów*; 2—3 nurki zawierające w kropli dennej mieszaninę erytrocytów i leukocytów: 0,9 μl *L* + 0,3 μl *E*.

c) *Badanie zużycia tlenu przez erytrocyty*; 2—3 nurki zawierające w kropli dennej kontrolne erytrocyty: 0,9 μl surowicy + 0,3 μl *E*.

Uzyskane dane przeliczano na μl tlenu zużytego przez jedną komórkę w ciągu godziny i wielkość tę dla uproszczenia oznaczano  $CQ_{O_2}$  (*C* = *cellula* = komórka, *Q* = *quantitas* = ilość). Układ doświadczalny pozwalał na bezpośrednie wyciąganie wniosków bez konieczności uciekania się do zbierania średnich współczynników  $CQ_{O_2}$  i ich interpretacji statystycznej. Porównując w danym eksperymencie  $CQ_0$  leukocytów oczyszczonych oraz  $CQ_{O_2}$  leukocytów w mieszaninie *L+E* po odjęciu wartości oddychania erytrocytów kontrolnych można bezpośrednio stwierdzić wzmożenie oddychania leukocytów w układzie *L+E* i przyrost zużycia tlenu wyrazić w ‰ ‰.

Tablica 1  
Wpływ erytrocytów na oddychanie leukocytów

nr dośw.	Ilość leukocytów w mm <sup>3</sup>	Skład zawiesiny leukocytów			Ilość dodanych erytrocytów w zawieszynie E+L na 1 leukocyt	CQ <sub>0</sub>			Wpływ erytrocytów w %
		Ilość erytrocytów w mm <sup>3</sup>	% leukocytów	Ilość erytrocytów na 1 leukocyt		Leukocyty w zawieszynie L	Leukocyty* w zawieszynie E+L	Erytrocyty kontrolne	
1.	102000	21000	82	0,2	49	2,79·10 <sup>-7</sup>	6,24·10 <sup>-7</sup>	3,1·10 <sup>-9</sup>	123
2.	59000	15000	79	0,3	44	3,35·10 <sup>-7</sup>	6,78·10 <sup>-7</sup>	1,0·10 <sup>-9</sup>	102
3.	87000	33000	72	0,4	31	3,84·10 <sup>-7</sup>	4,96·10 <sup>-7</sup>	4,2·10 <sup>-9</sup>	30
4.	54000	14000	79	0,3	45	2,98·10 <sup>-7</sup>	5,43·10 <sup>-7</sup>	2,6·10 <sup>-9</sup>	82
5.	60000	26000	70	0,4	22	4,27·10 <sup>-7</sup>	5,83·10 <sup>-7</sup>	3,0·10 <sup>-9</sup>	36
6.	94000	34000	73	0,4	24	3,85·10 <sup>-7</sup>	6,20·10 <sup>-7</sup>	3,3·10 <sup>-9</sup>	61
7.	108000	41000	72	0,4	35	3,74·10 <sup>-7</sup>	6,88·10 <sup>-7</sup>	3,1·10 <sup>-9</sup>	83
8.	105000	19000	84	0,2	32	4,30·10 <sup>-7</sup>	6,05·10 <sup>-7</sup>	2,9·10 <sup>-9</sup>	40
9.	83000	31000	72	0,4	20	3,11·10 <sup>-7</sup>	4,23·10 <sup>-7</sup>	4,8·10 <sup>-9</sup>	36
10.	116000	29000	80	0,3	40	2,50·10 <sup>-7</sup>	4,79·10 <sup>-7</sup>	1,3·10 <sup>-9</sup>	92
11.	72000	22000	76	0,3	35	3,02·10 <sup>-7</sup>	5,83·10 <sup>-7</sup>	2,0·10 <sup>-9</sup>	92
12.	80000	34000	70	0,4	26	4,39·10 <sup>-7</sup>	7,12·10 <sup>-7</sup>	2,9·10 <sup>-9</sup>	62
13.	95000	31000	75	0,3	49	2,49·10 <sup>-7</sup>	5,77·10 <sup>-7</sup>	1,2·10 <sup>-9</sup>	132
14.	74000	20000	78	0,3	42	3,25·10 <sup>-7</sup>	5,27·10 <sup>-7</sup>	3,3·10 <sup>-9</sup>	62
15.	67000	22000	83	0,2	31	2,62·10 <sup>-7</sup>	4,13·10 <sup>-7</sup>	3,2·10 <sup>-9</sup>	57
16.	138000	30000	82	0,2	43	3,29·10 <sup>-7</sup>	6,76·10 <sup>-7</sup>	0	105
17.h	92000	26000	77	0,3	28	3,30·10 <sup>-7</sup>	5,13·10 <sup>-7</sup>	2,4·10 <sup>-9</sup>	55
18.h	100000	17000	85	0,2	38	2,60·10 <sup>-7</sup>	5,00·10 <sup>-7</sup>	1,6·10 <sup>-9</sup>	92
19.h	60000	16000	79	0,3	21	2,15·10 <sup>-7</sup>	3,00·10 <sup>-7</sup>	3,2·10 <sup>-9</sup>	39
20.h	120000	25000	82	0,2	18	2,00·10 <sup>-7</sup>	2,70·10 <sup>-7</sup>	5,0·10 <sup>-9</sup>	35
21.h	105000	21000	83	0,2	24	2,06·10 <sup>-7</sup>	3,47·10 <sup>-7</sup>	4,1·10 <sup>-9</sup>	68

\*CQ<sub>0</sub>, leukocytów w zawieszynie E + L obliczone po odjęciu w mm si. plynu Brodiego oddychania erytrocytów kontrolnych w danym doświadczeniu.

Odczyty manometryczne przeprowadzano w większości doświadczeń przez cztery godziny, powtarzając je co 30 minut, co pozwalało na dokładne wykreślenie krzywych oddychania. Dane zestawione w tablicy 1 pochodzą z obliczenia średniego zużycia tlenu /godz/ 1 komórkę po czterech godzinach doświadczenia. W kilku eksperymentach odczyty kontynuowano przez 15—18 godzin.

### 3. Wyniki doświadczeń

Postępując według podanych poprzednio zasad, przebadano zużycie tlenu przez leukocyty, erytrocyty oraz mieszaninę tych komórek w 21 doświadczeniach i wyniki podano w tablicy 1. Dane oznaczone literą „h” pochodzą z krwi heparynowej, pozostałe z cytrynianowej.

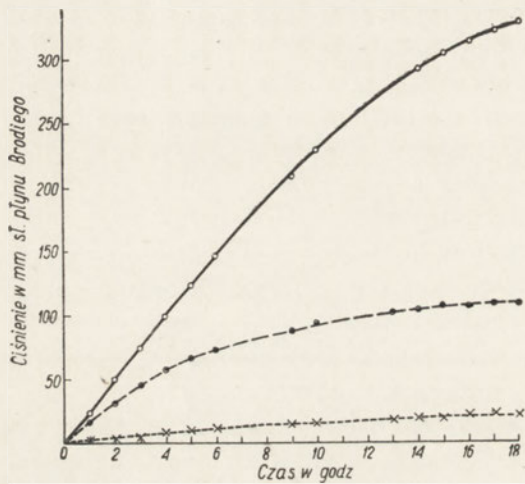
Z eksperymentów zestawionych powyżej wynika, że ilość tlenu zużywanego przez mieszaniny leukocytów i erytrocytów jest znacznie wyższa niż suma oddychania badanych oddzielnie zawiesin tych komórek. W tablicy 1 wyniki oddychania zawiesiny *E+L* podano już po odjęciu oddychania erytrocytów kontrolnych. Dodatni wpływ erytrocytów na oddychanie leukocytów waha się w szerokich granicach.

Współczynniki zużycia tlenu  $CQ_{O_2}$  różnią się dość znacznie w poszczególnych doświadczeniach. Przyczyną tego jest nie tyle błąd metody, ile złożoność i zmienność układu biologicznego, jaki stanowi zawiesina komórek w ich surowicy (różne zanieczyszczenie erytrocytami, obecność płytek, własności osobnicze). Wyniki podane w tablicy 1 wskazują tylko na różnice w zużyciu tlenu po czterech godzinach doświadczenia między zawiesiną leukocytów i ich mieszaniną z erytrocytami, nie mówią natomiast nic o dynamice samego procesu. Pewne światło na to zjawisko rzuca analiza krzywych oddychania i jego nasilenia w doświadczeniach wielogodzinnych. Jako przykład służyć może wykres zużycia tlenu oraz wykres nasilenia oddychania w poszczególnych godzinach w eksperymencie z dnia 14.X.57 r.

Podobnych doświadczeń z przedłużonymi odczytami wykonano 11 wykazując dość wyraźne podobieństwo obu rodzajów krzywych. Z rysunków 1 i 2 wynika, że oddychanie zawiesiny leukocytów obniża się po 3 lub 4 godzinach doświadczenia, aby następnie utrzymać się na mniej więcej stałym poziomie, znacznie niższym od wyjściowego zużycia tlenu. Ta druga faza obniżonego oddychania trwa 10 do 15 godzin, po czym zużycie tlenu zupełnie ustaje.

Odmienne zachowuje się mieszanina leukocytów i erytrocytów. W czasie pierwszych kilku godzin eksperymentu zużycie tlenu utrzymuje się na prawie stałym poziomie, przy czym odczyty w drugiej i trzeciej godzinie doświadczenia są zwykle nieco wyższe niż na początku. Po 5—8 godzi-

nach następuje powolne zmniejszenie zużycia tlenu, ale nawet po 18 godzinach obserwuje się jeszcze wyraźne oddychanie. Średnie  $CQ_{O_2}$  wyliczone dla mieszaniny  $E+L$  po 18 godzinach jest niższe przeciętnie zaledwie o około 30% od  $CQ_{O_2}$  po czterech godzinach odczytów. To późniejsze i powolne wygasanie oddychania mieszaniny  $E+L$  nie doprowadza jednak nigdy do ustania oddychania (w zakresie 18 godzin). Zużycie tlenu przez erytrocyty kontrolne trwa zwykle w nieznacznym stopniu przez całe doświadczenie, przy czym na ogół ulega ono powolnemu zmniejszaniu.



Rys. 1. Zużycie  $O_2$  przez zawiesiny badanych komórek

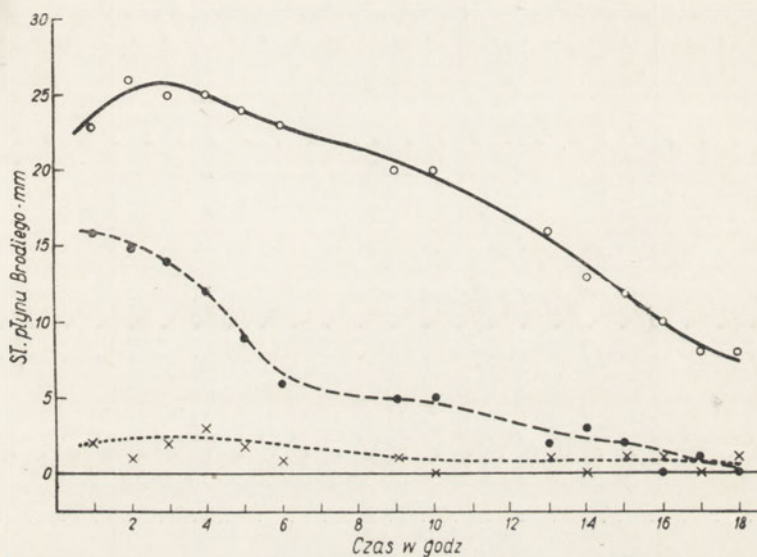
○ — ○ — ○ nurek z ładunkiem  $E+L$ ,  
 ● — ● — ● .. ..  $L$ ,  
 × — × — × .. ..  $E$ .

W niektórych doświadczeniach obserwowano prawie zupełny brak zużycia tlenu przez erytrocyty. Jest rzeczą ciekawą, że wówczas wpływ erytrocytów zaznaczał się wyraźniej. Dzięki opisanemu wyżej zachowaniu się krzywych oddychania ilość tlenu zużytego po 18 godzinach doświadczenia jest bez porównania większa w mieszaninie  $E+L$  niż w zawieszynie leukocytów, a wyliczony sumaryczny wpływ erytrocytów przekracza zwykle 400%. To wyższe zużycie tlenu przez leukocyty wynika przede wszystkim z przedłużenia ich okresu oddychania w obecności erytrocytów.

Jest mało prawdopodobne, aby wyraźne zmniejszenie oddychania zawiesiny  $L$  obserwowane nieraz już po paru godzinach doświadczenia odpowiadało obumarciu leukocytów, gdyż według zgodnych poglądów róż-

ných autorów okres przeżywania krwinek białych *in vitro* wynosi kilkanaście godzin. Przyczyny należy raczej szukać w wyczerpaniu metabolitów, zatruciu produktami przemiany materii lub w innych zmianach środowiska otaczającego leukocyty (np. rozpad płytek towarzyszących). Wobec dużo dłuższego oddychania zawiesiny *E+L* może to rzucić pewne światło na sam mechanizm wpływu erytrocytów.

Porównując pierwsze odcinki krzywych *L* i *E+L* na rysunku 2 można stwierdzić, że już na początku leukocyty oczyszczone zużywają mniej tlenu. Poza tym oddychanie mieszaniny *E+L* ma tendencję wzrastania i daje w drugiej lub trzeciej godzinie doświadczenia wartości nawet wyższe od początkowych. Być może, że dla rozwinięcia pełnego wpływu erytrocytów na leukocyty wymagany jest okres wstępnej inkubacji i dlatego zawiesina *E+L* może dawać najwyższe odczyty dopiero po 2–3 godzi-



Rys. 2. Nasilenie zużycia  $O_2$  w okresach godzinnych w mm sł. płynu Brodiego:

- — ○ — ○ nurek z ładunkiem *E+L*,
- — ● — ● „ „ „ *L*,
- × — × — × „ „ „ *E*.

nach. Bezwzględnie pewnej odpowiedzi na to pytanie można udzielić tylko po przeprowadzeniu doświadczeń w takim układzie, który pozwala na obserwację zmian w oddychaniu natychmiast po zmieszaniu erytrocytów i leukocytów. W naszych doświadczeniach upływał okres około 1 godziny (wypełniania nurków) od momentu zmieszania krwinek czerwonych z leukocytami do rozpoczęcia odczytów.

Różnica między najwyższym zużyciem tlenu w pierwszym okresie godzinnym przez zawiesinę  $L$  oraz  $E+L$ , czyli różnica nasilenia oddychania (Rys. 2) dla danego doświadczenia była dostrzegalna we wszystkich przypadkach, jakkolwiek nie przekraczała 20% (na korzyść zawiesiny  $E+L$ ). Dlatego można stwierdzić, że ogólny wysoki wpływ erytrocytów wyrażony w % wynika raczej z przedłużenia czasu oddychania. Tak więc wpływ

Tablica 2

Zależność wielkości wpływu od ilości dodanych erytrocytów

nr doświad- czenia	Ilość erytro- cytów na 1 leukocyt w za- wiesinie $E+L$	%% wpływu po 4 godz
1. $E_1$	4	12
$E_2$	10	53
2. $E_1$	6	27
$E_2$	10	30
3. $E_1$	4	15
$E_2$	13	28
4. $E_1$	17	47
$E_2$	25	70
5. $E_1$	23	41
$E_2$	32	80
6. $E_1$	31	80
$E_2$	58	69
7. $E_1$	37	89
$E_2$	58	85
8. $E_1$	43	105
$E_2$	62	85
9. $E_1$	55	106
$E_2$	67	80
10. $E_1$	53	92
$E_2$	77	72

erytrocytów na oddychanie leukocytów składa się z dwu faz: fazy początkowej zwiększenia oddychania i następnej polegającej na znacznym przedłużeniu jego trwania. Wobec wyraźnych różnic wartości wpływu erytrocytów w różnych doświadczeniach nasuwa się pytanie, czy jego wielkość zależy od ilości dodanych erytrocytów, a ściślej rzecz biorąc, od stosunku krwinek czerwonych do białych w mieszaninie  $E+L$ .

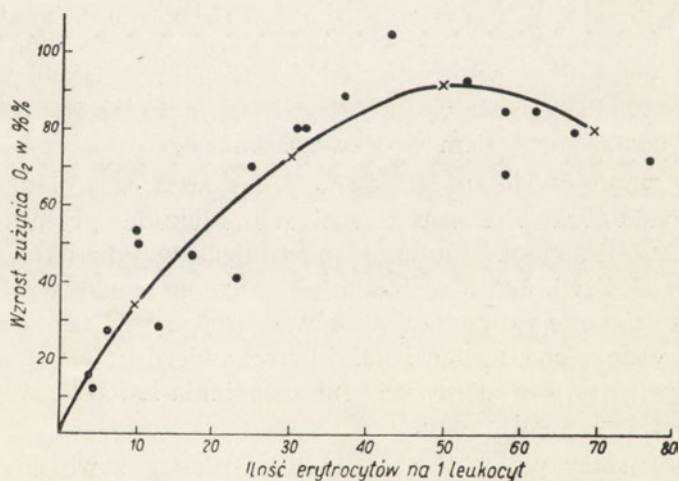
W tym celu wyliczono w każdym doświadczeniu ilość erytrocytów przypadającą na jeden leukocyt w zawieszynie  $E+L$ . Analizując dane z tablicy 1 można dostrzec zależność polegającą na tym, że zwiększenie ilości erytrocytów przypadających na jeden leukocyt powoduje wzrost wpływu erytrocytów. Jednakże w tej grupie doświadczeń stosunek  $E:L$  waha się w dość wąskich granicach, wobec czego nie wiadomo, jak wyrazi się wpływ erytrocytów przy innych proporcjach  $E:L$ . Dlatego też przeprowadzono 10 doświadczeń w układzie podobnym do opisanego poprzednio, ale zawierającym dwa różne stężenia erytrocytów w zawieszynie  $E+L$ .

Układ taki składa się z pięciu par nurków:

1. Zawiesina  $L$ .
2. Zawiesina  $E_1+L$ .
3. Zawiesina  $E_2+L$ .
4. Zawiesina  $E_1$ .
5. Zawiesina  $E_2$ .

Dobierając odpowiednie stężenia krwinek czerwonych w  $E_1$  i  $E_2$  można było określić w obrębie jednego i tego samego doświadczenia, a więc przy identycznych parametrach metodycznych i biologicznych, zależność wpływu erytrocytów na leukocyty od ich wzajemnego ilościowego stosunku.

Wyniki zestawione są w tablicy 2 i w sporządzonym na jej podstawie rysunku 3, ilustrującym korelację opisanego przez nas zjawiska.



Rys. 3. Zależność wielkości wpływu od ilości dodanych erytrocytów

Doświadczenia te wykazują, że przy wzroście ilości dodanych erytrocytów przypadających na jeden leukocyt zwiększa się równolegle ich

wpływ na pobieranie tlenu przez leukocyty. Zależność taka jest dość wyraźna aż do stężenia 50—60 erytrocytów na jeden leukocyt. Po przekroczeniu tej granicy zaobserwowano w kilku doświadczeniach spadek wpływu. Mogłoby to wskazywać na istnienie optymalnego stężenia erytrocytów, przy którym ich wpływ na oddychanie leukocytów jest największy. W takim wypadku optimum to wynosiłoby około 50 E : 1 L. Optimum to byłoby dość niezwykle wzięwszy pod uwagę fakt, iż stosunek E : L u ludzi w warunkach fizjologicznych wynosi około 1000 E : 1 L, i że raczej tutaj należałoby się spodziewać najwybitniejszego wpływu.

#### DYSKUSJA

Powyższe doświadczenia wykazują niewątpliwy udział erytrocytów w pobieraniu tlenu przez ciała białe krwi ludzkiej oraz świadczą o wyraźnej korelacji między ilością erytrocytów towarzyszącym leukocytom a wielkością oddychania. Jednakże sam mechanizm opisanego zjawiska i istota uzyskanej zależności między obydwoma typami elementów morfotycznych krwi pozostaje nie wyjaśniona i wymaga dalszych systematycznych badań.

Teoretycznie możemy rozpatrzeć szereg wchodzących w rachubę możliwości wytłumaczenia opisanego przez nas zjawiska. Przede wszystkim nasuwa się przypuszczenie, że erytrocyty dostarczają ciałkom białym odpowiednich metabolitów. Jakkolwiek tej ewentualności nie można wykluczyć, to jednak charakter doświadczeń raczej przeciw niej przemawia. Metabolity powstające w erytrocytach i wykorzystywane przez ciała białe winny znajdować się w surowicy, która przecież jest stale używanym przez nas środowiskiem w doświadczeniach.

Szybkie zmniejszenie zużycia tlenu przez oczyszczone leukocyty można by tłumaczyć również samozatruciem produktami przemiany materii lub też zatruciem przez substancje powstające w tym układzie w toku rozpadu płytek krwi. Jeżeli weźmiemy pod uwagę wielką wrażliwość leukocytów na działanie różnych czynników zewnętrznych, taka ewentualność winna być wzięta pod uwagę i należałoby stwierdzić, czy krwinki czerwone nie spełniają roli odtruwania lub osłaniania leukocytów przed działaniem szkodliwych substancji.

Wreszcie należy pamiętać o zasadniczej funkcji krwinek czerwonych w ustroju, to jest o przenoszeniu tlenu przez te komórki. Oksyhemoglobina zawarta w erytrocytach jest zbiornikiem tlenu, z którego ewentualnie mogą korzystać leukocyty w równej mierze jak z tlenu rozpuszczonego w surowicy. Nasze dalsze badania wskazują na tę możliwość, jednak nie potrafimy na razie odpowiedzieć jednoznacznie na pytanie, czy istota wpły-



wu erytrocytów na pobieranie tlenu przez leukocyty da się wytłumaczyć wyłącznie tym mechanizmem.

Jakkolwiek zaobserwowane przez nas zjawisko może się wydawać pozornie dziwne, gdyż nie ma dla niego analogii w innych dziedzinach fizjologii komórkowej, to należy jednak pamiętać o tym, że leukocyty, a szczególnie leukocyty ludzi, stanowią typ komórek pod wielu względami różniący się od elementów morfotycznych, najczęściej badanych. Tę biochemiczną odrębność leukocytów podkreśla z naciskiem Beck [1]. Na uwagę zasługują również doświadczenia Kielera [6], w wyniku których stwierdził on specyficzne i niezwykle zachowanie się oddychania leukocytów normalnych inkubowanych przez wiele godzin. Wreszcie należy przypomnieć, że leukocyty białaczkowe dają się hodować *in vitro* tylko w obecności fibroblastów, a wytłumaczenie tej symbiozy pozostaje ciągle w sferze hipotez.

Autorzy wyrażają serdeczne podziękowanie Prof. dr B. Skarżyńskiemu za cenne wskazówki w czasie pracy i pomoc przy jej ukończeniu.

#### STRESZCZENIE

Przy pomocy metody nurków Kartezjusza badano oddychanie oczyszczonych leukocytów ludzkich w obecności rozmaitych stężeń erytrocytów.

Stwierdzono, że zużycie tlenu przez ciała białe wzrasta po dodaniu krwinek czerwonych do zawiesiny komórkowej.

Wykazano, że dodatni wpływ erytrocytów na oddychanie leukocytów charakteryzuje się nieznacznym początkowym wzmożeniem intensywności pochłaniania tlenu i późniejszym wybitnym jego przedłużeniem. Prawdopodobnie istnieje optymalne stężenie erytrocytów, przy którym oddychanie leukocytów jest najwyższe.

Omówiono biochemiczne i biologiczne możliwości interpretacji opisanego zjawiska.

#### LITERATURA

- [1] Beck W. S., Valentine, W. N., *Cancer Res.* **12**, 818, 1952.
- [2] Bicz W., *Acta Bioch. Pol.* **3**, 183, 1956.
- [3] Bicz W., Koj A., Zgliczyński J., *Acta Physiol. Pol.* (w druku).
- [4] Glick D., *Techniques of histo- and cytochemistry*, Interscience Publishers, Inc., N. York, 342, 1949.
- [5] Keibl E., Spitzky K. H., *Arch. Exptl. Path. Pharmac.* **213**, 162, 1951.
- [6] Kieler J., *The leukemias: etiology, patophysiology and treatment*, red. J. W. Rebeck, Academic Press, New York. 215, 1957.

THE EFFECT OF ERYTHROCYTES ON THE RESPIRATION OF HUMAN  
LEUCOCYTES

S u m m a r y

Respiration of purified human leucocytes was investigated with the aid of Cartesian divers in presence of varying concentrations of erythrocytes.

The leucocytes oxygen uptake was found to rise when red cells were added to the suspension.

The positive effect of erythrocytes on leucocyte respiration was shown to be characterized by an insignificant initial rise in oxygen uptake intensity and subsequent pronounced extension of its duration. An optimum concentration of erythrocytes at which leucocyte respiration is most intensive is likely to exist.

Possible biochemical and biological interpretations of the phenomenon are discussed.

Otrzymano 20.12.1957 r.

Z. SZAFRAN, H. HOMAŃSKA-SZAFRANOWA, J. OLEKSY

## ROZMIESZCZENIE ENZYMÓW Z GRUPY ESTERAZ WE FRAKCJACH BIAŁKOWYCH SOKU TRZUSTKOWEGO PSA\*)

*Z Zakładu Chemii Fizjologicznej A. M. w Krakowie*

*Kierownik: Prof. dr B. Skarżyński*

*i z Zakładu Fizjologii A. M. w Krakowie*

*Kierownik: Prof. dr J. Kaulbersz*

Jednym z głównych składników soku trzustkowego jest białko wykazujące wybitną i różnorodną aktywność enzymatyczną, zdolną do hydrolizy wszystkich niemal substancji składowych pożywienia zwierzęcia. Znanne są liczne enzymy wchodzące w skład białek soku trzustkowego, przy czym tylko niektóre z nich, jak np. trypsyna i chymotrypsyna zostały zidentyfikowane jako odrębne substancje chemiczne. Rozdział mieszanin białkowych przy pomocy elektroforezy i lokalizacja aktywności enzymatycznych w uzyskanych frakcjach elektroforetycznych może stanowić poważny krok naprzód w zagadnieniu odrębności poszczególnych enzymów i ich identyfikacji jako indywidualnych substancji białkowych.

Metodę elektroforezy zastosowali po raz pierwszy do rozdzielania białek soku trzustkowego Munro i Thomas [20], uzyskując 4—5 frakcji białkowych, nie przeprowadzając jednak doświadczeń nad lokalizacją aktywności enzymatycznej w tych frakcjach. Byrne i współpracownicy [4] oraz Grossberg i współpracownicy [11] rozdzielali białka soku trzustkowego na 6 frakcji elektroforetycznych, lokalizując w niektórych spośród tych frakcji trzy główne enzymy soku trzustkowego — amylazę, lipazę i proteinazę. Używali oni w swoich doświadczeniach wolnej elektroforezy Tiseliusa, przy której wyosobnienie poszczególnych frakcji białkowych napotyka na dość duże trudności techniczne, toteż zastosowanie znacznie prostszej metodycznie elektroforezy bibułowej umożliwiło dalsze postępy w tej dziedzinie. Posługując się tą metodą, A. i R. Delcourt [6] otrzymywali przy

\*) Praca była częściowo subwencjonowana przez Komitet Biochemiczny Wydziału II PAN.

rozdziale białek soku trzustkowego również 6 frakcji, w których badali rozmieszczenie lipazy, esterazy i esterazy cholinowej.

Autorzy wszystkich cytowanych powyżej prac używali do swoich doświadczeń sok trzustkowy psa. Ostatnio Rotschild i Junqueira [26] rozdzielali, stosując elektroforezę bibułową, sok trzustkowy szczura. Autorzy ci uzyskiwali 7 frakcji białkowych, w których badali zawartość amylazy, lipazy i esterazy, rybonukleazy, trypsyny i chymotrypsyny, jednakże obraz frakcji białkowych na elektroforogramach i rozmieszczenie enzymów we frakcjach były zupełnie odmienne, w porównaniu z wynikami poprzednich prac z użyciem soku trzustkowego psa.

Dalszą kontynuację badań tego typu stanowi poprzednia praca współautorów niniejszych badań [15], w której określono rozmieszczenie amylazy, lipazy i enzymów proteolitycznych we frakcjach białkowych soku trzustkowego psa, rozdzielonych przy pomocy elektroforezy na bibule. W celu otrzymania soku stosowano różne bodźce wydzielnicze i stwierdzono, że wpływają one na stężenie enzymów, nie zmieniając jednak ich rozmieszczenia we frakcjach elektroforetycznych.

W niniejszej pracy przedstawiono wyniki badań nad rozmieszczeniem dalszych enzymów z grupy esteraz, a mianowicie aliesterazy, esterazy cholinowej, esterazy cholesterolowej i zasadowej fosfatazy we frakcjach uzyskanych przy rozdziale elektroforetycznym białek soku trzustkowego psa. Podjęto również próbę przedyskutowania odrębności tych enzymów jako indywidualnych substancji, rozkładających swoiste substraty.

## METODY

Sok trzustkowy otrzymywano w doświadczeniach ostrych przeprowadzanych na psach, u których przy użyciu narkozy morfinowo — eterowej zakładano kaniulę szklaną do przewodu trzustkowego. Wydzielanie soku wywoływano działaniem różnych bodźców — sekretyny lub wyciągu z błony śluzowej jelita, pankreozyminy i pilokarpiny. Dokładną metodykę otrzymywania soku opisano poprzednio [15].

W odróżnieniu od sposobu postępowania stosowanego w pracy poprzedniej przeprowadzano rozdział elektroforetyczny według metody opracowanej przez Ostrowskiego i współpracowników [24]. Na płytki szklane  $10 \times 32$  cm powleczone warstwą żelu agarowego zawierającego 3% hyflo super-cel nakładano pipetą 0,2—0,6 ml soku i umieszczano w komorze w położeniu poziomym, zapewniając kontakt z roztworem buforowym za pomocą pasków bibuły nałożonych na końce płytek. Czas trwania elektroforezy w temperaturze pokojowej przy napięciu 150 V wynosił 14—16 godzin. Używano buforu weronałowego o  $pH$  8,6. Położenie frakcji

białkowych na płytkach ustalano przez przyłożenie do warstwy żelu dwóch pasków bibuły o szerokości 1 cm i długości 32 cm na czas 10—20 minut. Po wysuszeniu pasków wybarwiano je roztworem czerni amidowej 10B według Grassmana i Hanniga [10] i po ustaleniu położenia frakcji białkowych odcinano na płycie warstwy żelu agarowego odpowiadające położeniem i szerokością frakcjom białkowym odbitym na paskach. Zebrane z powierzchni płytki warstwy żelu eluowano w probówkach 6 ml soli fizjologicznej przez 2 godziny i po odwirowaniu adsorbenta oznaczano w otrzymanych roztworach stężenie białka oraz aktywność enzymów.

W większości doświadczeń sok trzustkowy zagęszczano przed przeprowadzeniem rozdziału elektroforetycznego, dializując 1—3 ml soku w woreczku plastikowym względem 50% roztworu gumy arabskiej w temperaturze +4°C przez okres 1—2 godzin. Zagęszczony w ten sposób sok zawierał 2—4-krotnie większe stężenie białka.

Dokładny rozdział frakcji w czasie elektroforezy uzależniony jest od wąskiego nałożenia płynu zawierającego białko na płytkę z żelem agarowym. Używając soku trzustkowy zagęszczony przez dializę otrzymywano znacznie lepszy rozdział frakcji, ponieważ większe stężenie białka i enzymów w takim soku umożliwiającą nakładanie mniejszej objętości, a tym samym nakładanie węższe i bardziej równomierne. Dokładność nałożenia ułatwia poza tym większa lepkość soku dializowanego. Wyższość stosowanej obecnie techniki elektroforezy w porównaniu z poprzednio stosowaną elektroforezą bibułową polega na tym, że 1) można nakładać 3—4-krotnie większe objętości soku, 2) czas trwania elektroforezy jest krótszy, 3) przy takim sposobie postępowania o wiele łatwiej rozdzielić frakcje 2 i 3 na dwie podfrakcje, co przy zastosowaniu elektroforezy bibułowej udaje się tylko wyjątkowo.

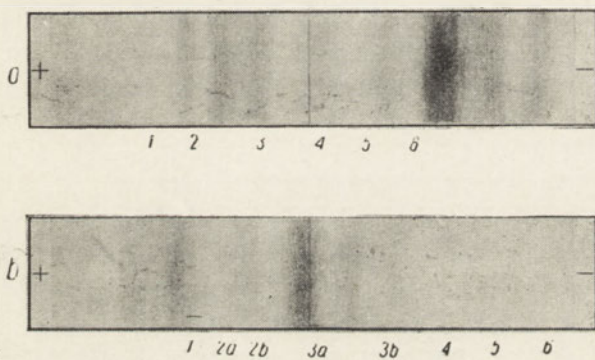
Oznaczanie białka przeprowadzano przy pomocy odczynnika fenolowego Folina-Ciocalteu [9], według procedury opisanej poprzednio [16]. Przy oznaczeniach enzymów stosowano następujące substraty: octan p-nitrofenolu (otrzymany syntetycznie według Hugginsa i Lapidesa [17]) dla ali-esterazy, chlorek acetylocholinylu dla esterazy cholinowej, octan cholesterolu dla esterazy cholesterolowej, fosforan fenolftaleiny dla zasadowej fosfatazy, trójbutyrynę dla lipazy, skrobię dla amylazy i hemoglobinę dla proteaz.

Oznaczenia aktywności enzymatycznej przeprowadzano według następujących metod: ali-esterazę badano według Hugginsa i Lapidesa [17], esterazę cholinową według Hestrina [14], esterazę cholesterolową oznaczano modyfikacją metod Niefta i Deuela [23] oraz Byrona i współpracowników [5], inkubując roztwór enzymu z zawiesiną substratu i roztworem buforowym fosforanowym o *pH* 6,6 przez 2 godziny w temperaturze 37°C.

Cholesterol i nie rozłożony ester ekstrahowano z próbki mieszaniną alkoholu i eteru 3 : 2 i po strąceniu cholesterolu digitoniną oznaczano jego stężenie według metody podanej w zbiorze metod analitycznych H. Fistera [7]. Aktywność fosfatazy oznaczano według Hugginsa i Talalaya [18], amylazy według H. Fistera [7], lipazy metodą Pereza i Willemorta [25]. Enzymy proteolityczne oznaczano metodą hemoglobinową Ansona [3]. Jednostki aktywności enzymów przyjęto według metod analitycznych, bądź też określano jak poprzednio [16].

### WYNIKI

Wykonano doświadczenia na soku trzustkowym uzyskanym z 13 psów, przeprowadzając 24-krotnie rozdział elektroforetyczny białek. Posługując się opisaną wyżej techniką elektroforezy w ośrodku agarowym zawierającym hyflo super-cel otrzymano 6—8 frakcji białkowych w zależności



Rys. 1. Obraz rozdziału frakcji białkowych soku trzustkowego na elektroforogramach  
a) — na bibule, b) — na płytkach agarowych z hyflo super-cel

od psa dostarczającego sok. Porównując rozmieszczenie trzech głównych enzymów soku we frakcjach białkowych, uzyskanych obecnie stosowaną techniką elektroforezy, z wynikami uzyskanymi poprzednio na bibule [15], stwierdzono, że większa ilość frakcji powstaje wskutek dalszego rozdziału frakcji 2 i 3 na frakcje określone obecnie jako 2a, 2b, 3a i 3b (Rys. 1). Frakcje 1, 4, 5 i 6 pozostają w kolejności niezmięnionej.

Względna procentowa zawartość białka w poszczególnych frakcjach wykazuje pewną zmienność w zależności od badanego psa, wartości średnie są jednak zgodne z wynikami podawanymi poprzednio [4, 15] (Tabela 1). Rodzaj bodźca wydzielniczego wpływa tylko na absolutne stężenie białka w soku, a nie na stosunek jego ilości w poszczególnych frakcjach.

Tablica 1  
Średnie wartości rozkładu białka we frakcjach elektroforetycznych

frakcje	1	2a	2b	3a	3b	4	5	6
względny %	6,14	15,20	12,18	7,98	8,35	33,20	9,56	7,33

Wartości średnie obliczono z wyników 24 oznaczeń białka w eluatach frakcji elektroforetycznych

Tablica 2  
Średnie wartości aktywności enzymatycznej we frakcjach białkowych

Enzym	Substrat	I	1	2a	2b	3a	3b	4	5	6	
Ali-esteraza	octan p-nitrofenolu	24	1	38,1	27,3	18,1	6,3	3,4	2,4	2,0	2,4
			2	3,78	1,11	0,90	0,50	0,25	0,04	0,11	0,18
Esteraza cholinowa	chlorek acetylocholinowy	19	1	27,2	11,6	6,4	34,9	17,8	1,5	0,6	0,0
			2	24,95	4,30	2,90	24,50	11,95	0,25	0,34	0,04
Esteraza cholesterolowa	octan cholesterolu	6	1	61,8	12,7	11,0	5,5	0,0	1,8	3,6	0,0
			2	1,74	0,14	0,14	0,11	0,00	0,01	0,06	0,00
Zasadowa fosfataza	fosforan fenolfaleiny	23	1	4,8	21,0	38,3	25,1	6,0	2,4	1,2	1,2
			2	0,41	0,69	1,55	1,55	0,37	0,04	0,08	0,07
Lipaza	trójbutyryna	16	1	4,0	0,8	0,8	0,5	0,5	45,0	47,3	1,1
			2	13,20	1,12	1,38	1,75	1,14	39,80	100,50	2,93
Amylaza	skrobia	10	1	0,1	0,1	0,1	0,3	1,6	92,4	5,0	0,4
			2	0,29	0,23	0,17	1,04	5,49	78,55	14,83	1,59
Proteazy	hemoglobina	11	1	3,2	52,5	38,6	3,6	1,0	0,9	0,1	0,1
			2	4,60	30,55	27,90	4,10	1,07	0,23	0,09	0,08

W rubryce I podane są ilości oznaczeń, z których obliczono wartości średnie. Liczby w szeregu 1 przedstawiają procent całej aktywności enzymu w poszczególnych frakcjach, w szeregu 2 — aktywność właściwą enzymu w jednostkach aktywności na 1 mg białka. Na 24 przeprowadzone rozdziały elektroforetyczne w 17 przypadkach użyto soków wydzielonych po podaniu pilokarpiny, w 6 po sekretynie 1 i w 1 po pankreozyminie. Oznaczenia poszczególnych enzymów wykonano w następujących przypadkach (liczby oznaczają kolejno ilość przypadków po pilokarpinie, sekretynie i pankreozyminie): ali-esteraza 17, 6, 1, esteraza cholinowa 13, 5, 1, esteraza cholesterolowa 3, 3, 0, zasadowa fosfataza 17, 5, 1, lipaza 12, 3, 1, amylaza 8, 2, 0, enzymy proteolityczne 8, 3, 0.

Rozmieszczenie we frakcjach enzymów, których lokalizacja została już określona dawniej, to znaczy amylazy, lipazy i proteaz zgadza się dokładnie z wynikami uzyskanymi poprzednio [15]. Tak więc amylaza znajduje się we frakcji 4, lipaza głównie w 5, a enzymy proteolityczne we frakcjach 2a i 2b.

Aktywność badanych enzymów z grupy esteraz, poza lipazą, związana jest z białkami czterech początkowych frakcji elektroforetycznych, to znaczy 1, 2a, 2b i 3a. Aktywność ali-esterazy określoną przez szybkość hydrolizy octanu p-nitrofenolu wykazuje głównie frakcja 1, a w mniejszym stopniu frakcje 2a i 2b. Frakcja 1 gromadzi 38,1% całej aktywności enzymu, a dwie frakcje sąsiednie odpowiednio 27,3 i 18,1%. Najwyższą aktywność hydrolizy chlorku acetylocholino wykazuje frakcja 3a (34,9%), jakkolwiek w silnym stopniu wykazuje ją również frakcja 1 (27,2%). Niższe aktywności frakcji sąsiednich 2a (11,6%) i 3b (17,8%) można przypisać niedokładnemu rozdzielaniu frakcji. Prawie 2/3 aktywności esterazy cholesterolowej wykazuje frakcja 1 (61,8%). Frakcje następne 2a i 2b rozkładają octan cholesterolu tylko w słabym stopniu (12,7 i 11,0% aktywności). Zasadowa fosfataza znajduje się głównie we frakcji 2b (38,3%), w mniejszych ilościach we frakcjach sąsiadujących (2a—21,0%, 3a—25,1%).

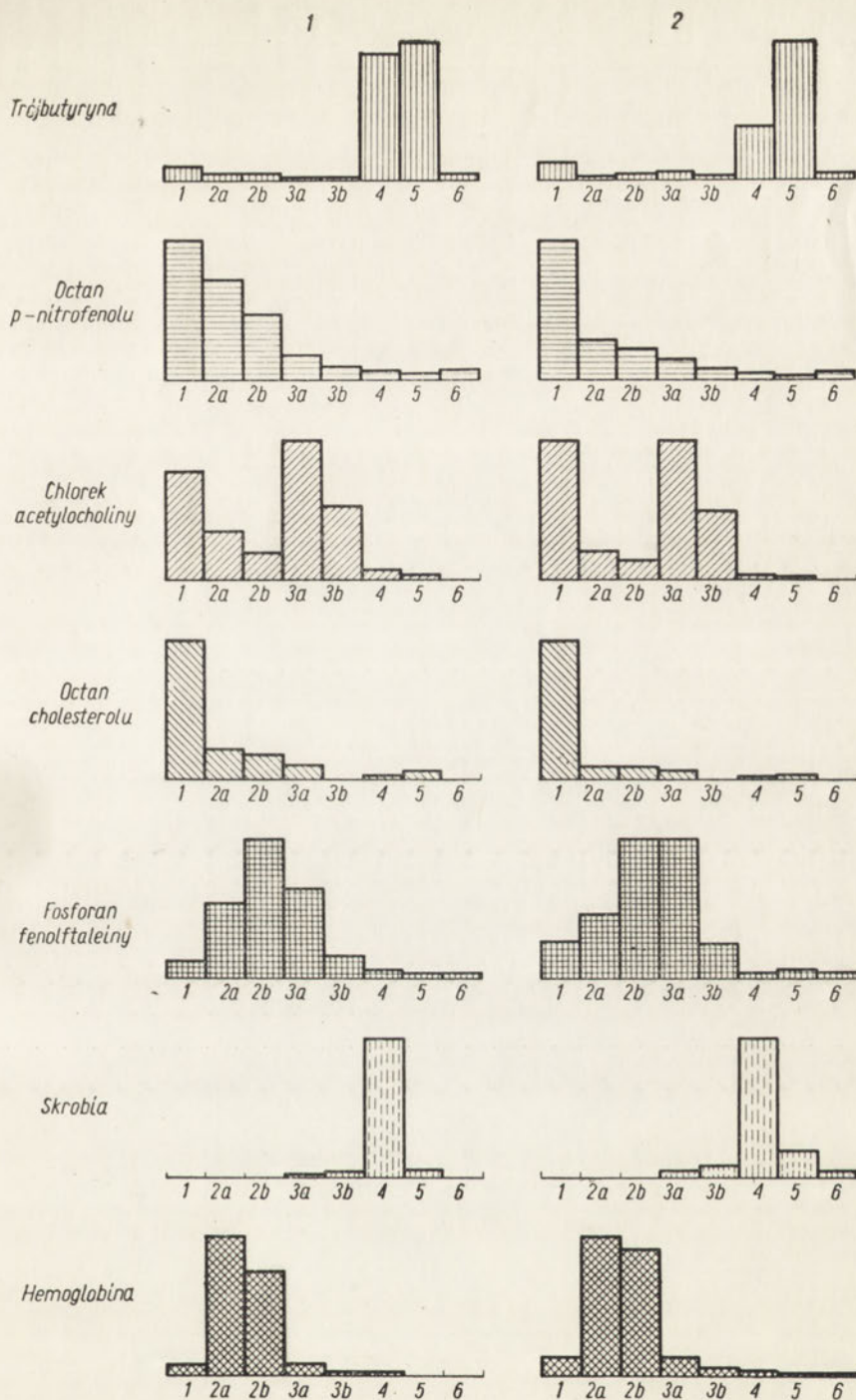
W tabelicy 2 zebrane są średnie wartości rozkładu procentowego poszczególnych rodzajów aktywności enzymatycznej oraz aktywności właściwe enzymów w poszczególnych frakcjach białkowych. Aktywność właściwa enzymu, to znaczy ilość jednostek aktywności przypadająca na 1 mg białka, uwidacznia, w której frakcji białko jest najbardziej aktywne przy rozkładzie danego substratu — jest więc równocześnie miarą efektywności oczyszczenia enzymu od innych białek występujących w soku trzustkowym. Dane tabelicy 2 przedstawione są również na wykresach na rys. 2.

We wszystkich obecnie przeprowadzonych doświadczeniach rodzaj bodźca wydzielniczego nie wpływał na rozmieszczenie badanych enzymów, co potwierdza obserwacje poprzednie [16].

#### DYSKUSJA

Wyniki niniejszej pracy dotyczą lokalizacji w ośmiu frakcjach białkowych soku trzustkowego psa enzymów rozkładających wiązania estrowe octanu p-nitrofenolu, trójbutyryny, octanu cholesterolu, chlorku acetylocholino i fosforanu fenolftaleiny. Rezultaty te łącznie z wynikami pracy poprzedniej [15] dają obraz rozmieszczenia w tych frakcjach siedmiu enzymów.





Rys. 2. Rozmieszczenie aktywności enzymatycznej we frakcjach białkowych soku trzustkowego psa  
 kolumna 1 — względny procent aktywności  
 kolumna 2 — aktywność właściwa we frakcjach



Dotychczasowe piśmiennictwo, poza trzema głównymi enzymami soku, podaje tylko rozmieszczenie esterazy [6, 26] i rybonukleazy [26]. Autorzy obu cytowanych prac oznaczali jednak esterazę i lipazę przy użyciu tego samego substratu. Różnicowali oni oba te enzymy opierając się na hamowaniu esterazy i aktywowaniu lipazy przez taurocholan sodu, co jednak nie daje gwarancji ich odróżnienia [27]. Zupełnie odmienne rozmieszczenie enzymów soku trzustkowego we frakcjach elektroforetycznych i inny obraz elektroforogramów w wynikach Rotschilda i Junqueira [26] można tłumaczyć stosowaniem do badań soku trzustkowego innego gatunku zwierzęcia i odmiennej metodyki.

Badając hydrolizę wymienionych substratów stwierdzono obecność trzech enzymów typu esteraz rozmieszczonych w odrębnych frakcjach elektroforetycznych. Jeden z nich, hydrolizujący trójbutyrynę, znajduje się we frakcjach 4 i 5; jest to enzym, który w piśmiennictwie określa się powszechnie nazwą lipazy lub esterazy A [1, 2, 22]. We frakcji 1 znajduje się esteraza odmienna, która rozkłada słabo trójbutyrynę, natomiast hydrolizuje octan p-nitrofenolu, octan cholesterolu i acetylocholinę. Trzecia esteraza, rozkładająca tylko acetylocholinę, znajduje się we frakcji 3a. Jest ona odmienna od esterazy z frakcji 4 i 5, która nie rozkłada acetylocholinę i od esterazy z frakcji 1. Zdarzają się wypadki zasługujące na specjalną uwagę, że w soku trzustkowym brak zupełnie esterazy we frakcji 1, mimo to w tych wypadkach rozkład acetylocholinę przez frakcję 3a jest zachowany. Należy więc wnioskować, że esteraza zawarta we frakcji 3a jest swoistą esterazą acetylocholinową. Rozkład octanu p-nitrofenolu także przez frakcje 2a i 2b można wytłumaczyć częściowo działaniem obecnych tam enzymów proteolitycznych [13, 19], a częściowo niedokładnym rozdzieleniem tych frakcji.

W omówionych wyżej przypadkach, w których brak esterazy frakcji 1, hydroliza octanu p-nitrofenolu przez frakcje 2a i 2b zachodzi, jednakże w czasie kilkakrotnie dłuższym.

W odniesieniu do esterazy rozkładającej estry cholesterolu istnieją w piśmiennictwie rozbieżności. Według jednych źródeł enzym ten jest swoisty tylko dla estrów cholesterolu [27], inne podają, że esteraza cholesterolowa trzustki jest identyczna z esterazą rozkładającą niższe estry alifatyczne [8, 21]. Wyniki nasze zdają się przemawiać za drugą alternatywą, ponieważ rozkład estrów cholesterolu wykazują te same frakcje, które hydrolizują octan p-nitrofenolu, acetylocholinę i słabo trójbutyrynę. Tak samo brak tej aktywności w tych przypadkach, kiedy sok nie wykazuje zdolności esterolitycznej we frakcji 1.

Fosforan fenolftaleiny rozkładany jest przez białko frakcji 2b. W tej samej frakcji białkowej znajduje się także któryś z enzymów proteoli-

tycznych, jednakże w piśmiennictwie zasadowa fosfataza soku trzustkowego uważana jest za enzym odrębny [12]. W warunkach naszych doświadczeń aktywność proteolityczną wykazują frakcje 2a i 2b. Nie wiadomo, czy działanie to wywiera tylko jeden enzym, czy też różne enzymy proteolityczne rozkładające hemoglobinę, które występują w soku trzustkowym.

Dalsze badania nad dokładniejszym scharakteryzowaniem esteraz soku trzustkowego psa są w toku.

Na tym miejscu pragniemy złożyć podziękowanie Panu Prof. dr Boleśławowi Skarżyńskiemu za pomoc i opiekę.

#### STRESZCZENIE

Autorzy badali występowanie lipazy, ali-esterazy, esterazy cholinowej, esterazy cholesterolowej i zasadowej fosfatazy w poszczególnych frakcjach białkowych soku trzustkowego psa.

Do rozdziału frakcji białkowych zastosowano elektroforezę w ośrodku agarowym zawierającym jako adsorbent hyflo super-cel. Przy takim postępowaniu białko soku trzustkowego rozdzielało się na większą ilość frakcji niż przy posługiwaniu się klasyczną elektroforezą bibułową.

Stwierdzono, że frakcja białkowa rozkładająca estry niższych kwasów tłuszczowych rozkłada również estry cholesterolu i acetylocholinę. Enzym znajdujący się w tej frakcji jest odrębny od lipazy występującej w zupełnie innej frakcji białkowej. Swoista esteraza cholinowa również daje się oddzielić elektroforetycznie od lipazy i ali-esterazy, to samo dotyczy zasadowej fosfatazy.

#### LITERATURA

- [1] Aldridge W. N., *Biochem. J.* **53**, 110, 1953.
- [2] Aldridge W. N., *Biochem. J.* **57**, 692, 1954.
- [3] Anson M. L., *J. Gen. Physiol.* **22**, 79, 1938.
- [4] Byrne G. M., Phinney J. I., Schachter M., Gordon-Young E., *J. Biol. Chem.* **192**, 683, 1951.
- [5] Byron J. E., Wood W. A., Treadwell C. R., *J. Biol. Chem.* **205**, 483, 1953.
- [6] Delcourt A., Delcourt R., *Compt. rend. soc. biol.* **147**, 1104, 1953.
- [7] Fister H., *Manual of Standardized Procedures for Spectrophotometric Chemistry*, New York, 1950.
- [8] Fodor P. J., *Arch. Biochem.* **26**, 331, 1950.
- [9] Folin O., Ciocalteu V., *J. Biol. Chem.* **73**, 627, 1927.
- [10] Grassman W., Hannig K., *Z. physiol. Chem.* **290**, 1, 1952.

- [11] Grossberg A.L., Komarov S.A., Shay H., *Am. J. Physiol.* **105**, 1, 1951.
- [12] Grossman M. I., Wang C. C., Wang K. J., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **78**, 338, 1951.
- [13] Hartley B. S., Kilby B. A., *Biochem. J.* **50**, 672, 1952.
- [14] Hestrin S., *J. Biol. Chem.* **180**, 249, 1945.
- [15] Homańska-Szafranowa H., Oleksy J., *Acta Biochim. Pol.* **3**, 663, 1956.
- [16] Homańska-Szafranowa H., Oleksy J., Szafran Z., *Acta Physiol. Pol.* (w druku).
- [17] Huggins C., Lapidés J., *J. Biol. Chem.* **170**, 467, 1947.
- [18] Huggins C., Talalay P., *J. Biol. Chem.* **159**, 399, 1945.
- [19] Kilby B. A., Youatt G., *Biochem. J.*, **57**, 303, 1954.
- [20] Munro M. P., Thomas J. E., *Am. J. Physiol.* **145**, 140, 1955.
- [21] Myers D. K., *Biochem. J.* **64**, 740, 1956.
- [22] Myers D. K., Schotte A., Boer H., Borsje-Bakker H., *Biochem. J.* **61**, 521, 1955.
- [23] Nieft M. L., Deuel Jr. H. J., *J. Biol. Chem.* **177**, 143, 1949.
- [24] Ostrowski W., Krawczyk A., Galos-Biczowa B., *Acta Biochim. Pol.* **3**, 649, 1956.
- [25] Perez M., Willemort R., *Ann. Pharm. Franc.* **11**, 608, 1953.
- [26] Rotschild H. A., Junqueira L. C. V., *Nature* **178**, 258, 1956.
- [27] Swell L., Dailey R. E., Field H., Treadwell C. R., *Arch. Biochem. Biophys.* **59**, 393, 1955.

DISTRIBUTION OF ENZYMES OF THE ESTERASES GROUP IN PROTEIN  
FRACTIONS OF A DOG'S PANCREATIC JUICE

Summary

The authors investigated occurrence of lipase, ali-esterase, cholinesterase, cholesterol esterase and alkaline phosphatase, in particular, protein fractions of canine pancreatic juice.

For separating the protein fractions the authors used electrophoresis in agar medium containing hyflo-super-cel as adsorbent. By this procedure the protein of the pancreatic juice was partitioned into a greater number of fractions than that obtained by the classical paper electrophoresis.

The protein fraction decomposing esters of lower fatty acids was found to decompose cholesterol esters and acetylcholine as well. The enzyme present in the fraction is distinct from lipase occurring in an altogether different protein fraction. Specific cholinesterase can also be separated by electrophoresis from lipase and ali-esterase; the same applies to alkaline phosphatase.

Otrzymano 13.12.1957 r.



Każdy autor winien dokładnie zapoznać się z treścią „wytycznych dla autorów“ jeszcze przed przystąpieniem do pisania swej pracy i skrupulatnie stosować się do nich. Prace nie odpowiadające pod względem formy postawionym wymogom nie będą mogły być brane pod uwagę i zostaną zwrócone autorom. Fakt przesłania pracy do redakcji uważany jest jako równoznaczny ze zgodą autora na treść „wytycznych“.

### WYTYCZNE DLA AUTORÓW

1. Acta Biochimica Polonica publikują prace biochemiczne i z dziedzin pokrewnych biochemii, zawierające nie ogłoszone dotychczas wyniki badań doświadczalnych. Ogłaszane prace winny zawierać element nowości naukowej. Językiem prac zgłaszanych do publikacji w Acta Biochimica Polonica jest język polski lub jeden z języków kongresowych.

2. Prace powinny być pisane możliwie zwięzłe, ale zwięzłość nie powinna powodować niejasności przedstawienia. Artykuły są przeznaczone przede wszystkim dla czytelnika wyspecjalizowanego w danym temacie, mimo to artykuły powinny być zrozumiałe dla ogółu czytelników. Opis doświadczeń powinien być taki, by mógł je powtórzyć każdy, kto dysponuje odpowiednim materiałem, wyposażeniem i techniczną sprawnością. Należy unikać technicznych neologizmów. Używane skróty należy wyjaśnić w tekście.

3. Układ artykułów. Prace należy przysyłać do redakcji w postaci gotowej do druku, w trzech egzemplarzach pisanych na maszynie jednostronnie, z marginesem szerokości około 4 cm po lewej stronie i około 1 cm po prawej stronie, z podwójną interlinią oraz z numeracją stron. Pierwszy egzemplarz należy pisać na papierze piśmiennym (białym). W tekście maszynopisu nie należy robić żadnych poprawek, przekreśleń lub podkreśleń na maszynie ani atramentem. Dopuszczalna najwyższa ilość poprawek wynosi trzy na jednej stronie. Autor może proponować oznaczenia typograficzne przez odpowiednie określenie (tekst rozspacjowany, złożony kursywą, czcionką grubą itp.), ale wyłącznie ołówkiem. Nie należy stawiać kropek po tytułach i podtytułach, ani po skrótach takich jak: ml, cm, g, kg. Dla wyrażenia mikrograma służy skrót „ $\mu$ g“, a nie „ $\gamma$ “. Na osobnych kartkach poza tekstem pracy należy umieścić: a) streszczenie polskie, b) cytowaną literaturę, c) tablice, d) rysunki lub fotografie wraz z objaśnieniami (patrz pkt. 8 i 9), e) pełne imię i nazwisko autora (ów), adres dla przesłania korekty i honorarium oraz skróconą wersję tytułu nie przekraczającą 60 miejsc literowych, przeznaczoną dla umieszczenia jej nad stronami tekstu pracy. Należy podać nazwisko i adres osoby upoważnionej do przeprowadzenia korekty, w przypadku nieobecności autora. W tekście należy zaznaczyć ołówkiem na marginesie w przybliżeniu miejsca, w których powinny być umieszczone tablice i rysunki. Prace nie odpowiadające wymaganiom zawartym w punk-

cie 3 zostaną przepisane na koszt autora, a odpowiednia kwota zostanie potrącona z honorarium autorskiego.

4. Na pierwszej stronie pracy należy podać: imię i nazwisko autora (-ów), tytuł możliwie zwięzły, ale jasno charakteryzujący treść pracy, zakład naukowy, w którym wykonano pracę i nazwisko kierownika zakładu, odpowiedzialnego za jego działalność. W interesie autora leży, aby *tytuł pracy* zawierał w najkrótszej formie podstawowy wynik pracy, a nie tylko zagadnienie. Należy unikać tytułów w rodzaju: „Badania nad...”. Wskazane jest podawanie już w tytule głównego wniosku wynikającego z pracy, nawet w przypadku, gdy jest on negatywny. Tytuł może wtedy przybrać postać: „Niemożność...”, lub podobnie.

5. Tekst pracy powinien składać się z następujących części: a) zwięzły wstęp wyjaśniający cel i założenie pracy, b) opis metod doświadczalnych, charakterystyka, pochodzenie lub sposób preparatywnego uzyskania używanych chemikaliów oraz opis szczegółów, które są potrzebne dla powtórzenia opisanych doświadczeń i sprawdzenia przeprowadzonych obliczeń, c) opis wyników ujęty możliwie zwięźle, najlepiej w postaci tablic lub wykresów, d) dyskusja o uzyskanych wynikach, e) streszczenie lub wnioski — objętości nie przekraczającej 3% rozmiarów pracy. Streszczenie lub wnioski winny być tak sformułowane, aby zawierały, w postaci możliwie najbardziej zwięzłej, wyniki pracy wraz z głównymi danymi liczbowymi. Wnioski winny wynikać bezpośrednio z doświadczeń. Wnioski pośrednie mogą być zamieszczone w tym punkcie wyłącznie pod warunkiem wyraźnego określenia, że mają one charakter dyskusyjny lub podobny.

6. Metody doświadczalne powinny być przedstawione bardzo starannie. Jeżeli autor posługiwał się znaną metodą publikowaną, wystarczy powołanie się na odnośną pracę, ewentualnie omówienie istoty danej metody. Należy wymienić wszelkie, nawet pozornie niewielkie, odchylenia od pierwotnej metody; stwierdzenie, że posługiwano się odnośną metodą „z niewielkimi modyfikacjami” nie jest dopuszczalne.

7. Stężenie roztworów w pospolitych kwasów i zasad wyraża się pojęciem normalności (N), natomiast dla roztworów soli należy posłużyć się pojęciem molarności (M): 0,25 N HCl, 0,15 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ . Stężenie ułamkowe należy wyrazić systemem dziesiętnym, np. 0,25 N HCl, a nie  $\text{N}/4$  HCl. Pojęcie „procent”, „‰” używa się w ścisłym znaczeniu, tj. w gramach na 100 gramów roztworu. Procenty objętościowe należy wyrażać symbolem „‰ obj./obj.”, a procenty wagowo-objętościowe „‰ wag./obj.”.

8. Poszczególne tablice powinny mieć nagłówek opisujący ich treść. Sens tablic powinien być zrozumiały bez powoływania się na tekst pracy. Nie jest konieczne ogłaszanie wszystkich liczbowych wyników podobnych doświadczeń, jeżeli poda się wartość średnią wraz z jego „średnim odchyleniem”, ew. liczbę indywidualnych rezultatów.

9. Rysunki i fotografie należy wykonywać w postaci nadającej się do reprodukcji lub przerysowania. Każdy rysunek lub fotografia winny być przygotowane na oddzielnej karcie. Na odwrocie każdego rysunku, lub fotografii należy podać ołówkiem: nazwisko autora, pierwsze słowa tytułu pracy, kolejny numer rysunku oraz pierwsze słowa legendy, która ma być umieszczona pod nim. Do rysunków i fotografii należy dołączyć wykaz (na maszynie) zawierający kolejne numery wraz z tytułami i legendą. Należy unikać podawania na rysunkach objaśnień tekstowych. Na fotografiach nie należy dopisywać żadnych oznaczeń. Jeśli fotografie takich oznaczeń wymagają, należy umieścić je na przypiętej do fotografii kalce technicznej. Nadmierna ilość rysunków może być wykonana wyłącznie na koszt autora. Krzywe wyrażające zależności zbadane eksperymentalnie winny mieć wyraźnie zaznaczone punkty, których wartości uzyskano doświadczalnie.



10. Cytowaną literaturę należy wypisać na oddzielnej karcie, wymieniając pozycje w alfabetycznej kolejności autorów. W wykazie podawać kolejno: numer pozycji, nazwisko autora, pierwsze litery imion, skrócony tytuł czasopisma, tom (rocznik), początkową stronę artykułu i rok wydania. Np. [8] Parnas J. K., *Acta Biol. Exp.* 11, 292, 1937. Jeżeli cytowany artykuł ma kilku autorów, należy w wykazie literatury podać nazwiska i początkowe litery imion wszystkich autorów. Dla cytowanych książek (nie czasopism) należy podać także tytuł książki, wydawcę, miejsce oraz rok wydania. Np. [12] Śniadecki J., *O fizycznym wychowaniu dzieci*, Turrowski, *Sanok*, 1855. Wykaz używanych skrótów czasopism podają *Roczniki Chemii* 26, 497, 1952. Prace kilkakrotnie cytowane należy podawać jeden raz, a wszystkie odsyłacze do tej pracy powinny mieć ten sam numer. Powołanie się w tekście na odnośną pozycję cytowanej literatury następuje przez wymienienie numeru pozycji wykazu w nawiasie, np. [13].

11. Autora obowiązuje *korekta autorska*, którą należy zwracać redakcji w ciągu trzech dni. Nieodesłanie przeprowadzonej korekty w oznaczonym przez redakcję terminie oznacza *rezygnację autora* z umieszczenia pracy w bieżącym numerze czasopisma. Zaleca się wykonanie korekty ołówkiem kolorowym, barwy odmiennej od ołówka korektora, ale nie czerwonym. Koszty spowodowane zmianą tekstu, poza poprawą błędów drukarskich, ponosi autor.

12. Autorowi przysługuje bezpłatnie 25 egzemplarzy *odbitek pracy*. Żądanie większej ilości odbitek winno być wyrażone na piśmie, jednocześnie ze złożeniem pracy w redakcji, najpóźniej przy pierwszej korekcie szpaltowej. Koszt za dodatkowe egzemplarze ponosi autor.

13. *Redakcja nie uważa się za uprawnioną do przeprowadzania jakichkolwiek zmian w pracy bez zgody autora*. Dla dokonania zmian uważanych przez redakcję za celowe dwa egzemplarze pracy odsyła się autorowi, trzeci pozostaje w aktach redakcji.



**UCHWAŁA WYDZIAŁU NAUK BIOLOGICZNYCH PAN W SPRAWIE OBCHODU  
ROKU DARWINOWSKIEGO (1959) PODJĘTA NA POSIEDZENIU PLENARNYM  
W DNIU 11.VI.1957 R.**

„Wydział Nauk Biologicznych PAN po wysłuchaniu i przedyskutowaniu referatu przewodniczącego Komisji Ewolucjonizmu PAN prof. dra K. Petruszewicza o projekcie obchodu Roku Darwinowskiego podejmuje następującą uchwałę:

I. Wydział Nauk Biologicznych powierza Komisji Ewolucjonizmu PAN, jako robocznemu komitetowi organizacyjnemu, przygotowanie programu obchodu Roku Darwinowskiego (1959), zorganizowanie poszczególnych imprez związanych z obchodem oraz zobowiązuje Komisję Ewolucjonizmu PAN do przedstawienia w terminie do 31 grudnia 1957 r.: 1) szczegółowego programu obchodu z uwzględnieniem metod propagandy jubileuszu wśród najszerszych kręgów biologów i przedstawicieli innych specjalności, które by nadawały uroczystościom Darwinowskim skalę krajową, 2) wniosków dotyczących składu i zakresu działania Komitetu Obchodu Roku Darwinowskiego przy Prezydium PAN, który obejmie protektorat nad uroczystościami jubileuszowymi.

II. Wydział II akceptuje następujący ramowy program obchodu Roku Darwinowskiego:

1) Jubileuszowe wydanie Dzieł wybranych Darwina. Wykonanie tego zadania powierza się Kolegium Redakcyjnemu Biblioteki Klasyków Biologii przy Komisji Ewolucjonizmu PAN pod przewodnictwem prof. dra T. Wolskiego, które zapoczątkowało już w r. 1956 opracowanie polskiego wydania Dzieł wybranych.

Wydział akceptuje wydanie w serii jubileuszowej następujących dzieł: Autobiografia, Wybór listów, O powstawaniu gatunków, O pochodzeniu człowieka, Dobór płciowy, Wyraz uczuć u człowieka i zwierząt, Zmienność roślin i zwierząt w stanie kultury, Podróż naturalisty, Sprawozdanie z przebiegu posiedzenia Linnean Society w 1858 r., O krzyżowaniu i zapyłaniu u roślin oraz prosi o poinformowanie wydziału o ostatecznym projekcie Dzieł wybranych, jak również o informację bieżącą o postępie prac w tej dziedzinie.

2) Ogłoszenie konkursu na prace dotyczące rozwoju myśli ewolucyjnej w Polsce (1957 - jesień) oraz zorganizowanie w jesieni 1959 r. sesji PAN na temat rozwoju idei ewolucji w Polsce. Zakres i warunki konkursu powinien opracować powołany przez Komisję Ewolucjonizmu PAN zespół w składzie prof. prof. Brzęk, Konopka Makarewicz, Makower, Petruszewicz, Raabe, Skarżyński, Suchodolski. Będzie on również czuwał nad przebiegiem prac konkursowych i zorganizuje sesję problemową PAN w 1959 r., na której oprócz typowego programu jubileuszowego będą referowane ostateczne wyniki konkursu lub jego przebieg. Program konkursu powinien być przedstawiony Wydziałowi do dnia 1.IX.1957 r.

3) Ogłoszenie konkursu na prace badawcze (eksperymentalne lub terenowe) w zakresie ewolucji świata organicznego i zorganizowanie w 1959 r. sesji problemowej PAN poświęconej tym zagadnieniom.

Na sesji oprócz referatów ogólnych referowane będą prace uczestników konkursu. Wydział akceptuje opracowane przez powołany już przez Komisję Ewolucjonizmu zespół w składzie prof. prof. Gajewski, Kaufman, Kozłowski, Kunicki-Goldfinger, Michajłow, Petruszewicz, Raabe, Stefański, Szafer, Szaferowa, Wolski — zakres, problematykę i warunki konkursu oraz powierza wymienionemu zespołowi czuwanie nad przebiegiem prac konkursowych i zorganizowaniem sesji problemowej PAN w 1959 r. Zobowiązuje się zespół konkursu do opracowania szczegółowego regulaminu i przedstawienia go Wydziałowi do dnia 1.II.1958 r.

4) Wydanie szeregu broszur, książek popularnych na różnych poziomach naukowych, odczytów itp. tak, aby szeroko spopularyzować wśród społeczeństwa polskiego postać K. Darwina i jego rolę w nauce.

Zobowiązuje się Komisję Ewolucjonizmu do opracowania i przedstawienia wydziałowi zamierzeń w tym zakresie oraz projektu udziału członków PAN w tym obchodzie.

5) Udział w uroczystościach jubileuszowych organizowanych w innych krajach, a głównie w Anglii. Nawiązanie już w roku 1957 kontaktu z Linnean Society, British Museum, British Association i innymi organizacjami i instytucjami zainteresowanymi obchodem.

6) Propaganda Roku Darwina poprzez wydawnictwa PAN, tak by włączyły się do jego obchodu uczelnie wyższe, towarzystwa, placówki naukowo-badawcze itp.

### **KONKURS NA PRACE BADAWCZE Z ZAKRESU EWOLUCJI ŚWIATA ORGANICZNEGO**

Komisja Ewolucjonizmu PAN za zgodą Wydziału Nauk Biologicznych PAN ogłasza konkurs na pracę badawczą z zakresu ewolucji świata organicznego.

Do konkursu zgłaszane mogą być prace badawcze oparte o jakąkolwiek dyscyplinę biologiczną i prowadzone właściwymi jej metodami, w sposób świadomy i udokumentowany wyjaśniające lub w istotnym stopniu przyczyniające się do wyjaśnienia procesów ewolucji świata organicznego.

Zakres problematyki prac konkursowych obejmuje więc badania nad jednostkami podlegającymi ewolucji oraz procesami (przebieg, prawa i prawidłowości), czynnikami (przyczynami) specjacji i filogenezy.

Konkurs będzie rozstrzygany trzy razy w latach 1959, 1960 i 1961. Prace odpowiadające warunkom konkursu będą referowane i dyskutowane na sesji problemowej Wydziału II, po czym jury konkursu odbędzie posiedzenie rozstrzygające wyniki.

Przedmiotem ostatecznej oceny jury w każdym z trzech terminów mogą być tylko prace zakończone, wydrukowane lub opracowane do druku.

Termin zgłaszania prac na pierwsze (tzn. w 1959 r.) posiedzenie jury upływa z dniem 1.VII.1958 r. Do konkursu mogą być zgłaszane prace podjęte specjalnie na konkurs lub rozpoczęte przed ogłoszeniem konkursu, o ile odpowiadają warunkom konkursu (do udziału w konkursie mogą być zgłaszane prace wydrukowane po ogłoszeniu konkursu).

W każdym z trzech terminów rozstrzygania konkursu przewiduje się: jedną pierwszą nagrodę w wysokości 10.000 zł, dwie drugie nagrody po 5.000 zł, trzy trzecie nagrody po 3.000 zł.

Regulamin konkursu będzie opracowany i ogłoszony do 1.III.1958 r.

## KONKURS NA PRACĘ BADAWCZĄ Z DZIEJÓW MYŚLI EWOLUCYJNEJ W POLSCE

Na rok 1959 przypada jubileusz wydarzenia naukowego, które stało się punktem zwrotnym w dziejach myśli naukowej i filozoficznej. Będzie to setna rocznica opublikowania podstawowego dzieła Karola Darwina — „O powstawaniu gatunków“. W tym samym roku przypada 150 rocznica urodzin Darwina. Również w 1959 r. mija 150 lat od czasu opublikowania „Philosophie Zoologique“, dzieła wielkiego prekursora nowożytnej myśli ewolucyjnej Jana Baptysty Lamarcka.

15 listopada 1909 roku polski przyrodnik i popularyzator Józef Nusbaum-Hilarowicz podpisał przedmowę do pierwszego wydania swego dzieła „Idea ewolucji w biologii“, którym składał hołd pamięci wielkich uczonych w ich 50 i 100 rocznicę. — „Niech w tym pamiętnym roku — pisze on — w którym cały świat cywilizowany te wielkie święci rocznice, będzie dana i naszemu ogółowi wykształconemu sposobność ogarnięcia myśli ewolucyjnej w jej pochodzie dziejowym“.

Komisja Ewolucjonizmu Polskiej Akademii Nauk uważa, że jednym z punktów obchodu jubileuszowego powinno być podjęcie przez polskich przyrodników i historyków nauki zbiorowego wysiłku zmierzającego do naświetlenia dziejów myśli ewolucyjnej w Polsce.

Komisja Ewolucjonizmu PAN z upoważnienia Wydziału Nauk Biologicznych PAN ogłasza konkurs na pracę badawczą dotyczącą rozwoju myśli ewolucyjnej w Polsce.

Zadaniem konkursu jest zapoczątkowanie prac, które pozwolą pogłębić i rozszerzyć znajomość historii polskiego ewolucjonizmu i staną się zaczątkiem systematycznych studiów w tej dziedzinie.

Do konkursu mogą być zgłaszane obok oryginalnych opracowań syntetycznych czy monograficznych również różnego typu prace materiałowe, a mianowicie udokumentowane prace naświetlające zarówno ewolucyjne nurty rozwoju myśli naukowej, jak i zasięg i charakter zainteresowania społeczeństwa polskiego teorią Darwina i jej naukowymi oraz filozoficznymi konsekwencjami. Mogą to być analizy czasopism przyrodniczych lub treści przyrodniczej czasopism ogólnych, programów szkół średnich, roczników towarzystw naukowych, źródłowe opracowania poglądów ewolucyjnych polskich uczonych, ośrodków naukowych, bardziej znamienitych wypadków z zakresu zmagania koncepcji ewolucyjnej z poglądami przeciwnymi itp.

Konkurs zostanie rozstrzygnięty w roku 1959. Przedmiotem ostatecznej oceny jury mogą być tylko prace zakończone (wydrukowane lub przygotowane do druku). Prace odpowiadające warunkom konkursu będą referowane i dyskutowane na Sesji Problemowej PAN, po czym jury konkursu podejmie decyzję w sprawie nagród.

Jury konkursu zostanie powołane przez Wydział Nauk Biologicznych PAN do dnia 1.VII.1958 r.

Termin zgłaszania udziału w konkursie upływa z dniem 1.V.1958 r.

Tokiem prac przygotowawczych do konkursu kieruje Zespół powołany przez Wydział na wniosek Komisji Ewolucjonizmu (Uchwałą podjętą na posiedzeniu plenarnym w dniu 11.VI.1957 r.). Organizacyjną obsługę konkursu będzie wykonywał Ośrodek Dokumentacji Ewolucjonizmu PAN.

Pragnąc uniknąć nieekonomicznego rozpraszania wysiłków lub też dublowania prac, Zespół zastrzega sobie prawo porozumiewania się z uczestnikami konkursu w sprawie tematu prac.

Do konkursu mogą być zgłaszane prace podjęte specjalnie na konkurs lub rozpoczęte przed ogłoszeniem konkursu, o ile odpowiadają warunkom konkursu (do udziału w konkursie mogą być zgłaszane prace wydrukowane po ogłoszeniu konkursu).

Przewiduje się następujące nagrody: jedna pierwsza nagroda — 5 000 zł, dwie drugie nagrody po 3 000 zł, trzy trzecie nagrody po 2 000 zł.

Jury wypowie się również, które prace nadają się do opublikowania. Prace opublikowane zarówno nagrodzone, jak i nie nagrodzone, niezależnie od przyznania nagrody konkursowej, będą płatne z tytułu honorarium autorskiego.

Wszelką korespondencję w sprawie konkursu należy kierować na adres: Ośrodek Dokumentacji Ewolucjonizmu PAN, Warszawa, ul. Nowy Świat 72.

М. ВЕЖУХОВСКИ

ПЕРВОНАЧАЛЬНЫЙ ПЕРИОД НАСЫЩЕНИЯ ГЛЮКОЗОЙ СОБАКИ,  
НАХОДЯЩЕЙСЯ В СОСТОЯНИИ ПОКОЯ, И РАЗМЕРЫ ЕЕ ТЕЛА

Резюме

В 131 опытах проведенных на 38 нормальных собаках, находящихся в состоянии покоя, им вводили внутривенно глюкозу в течение шести часов с равномерной скоростью от 1—9 г/кг/час.

Разработана кинетика прироста концентрации сахара в крови с момента введения глюкозы до истечения 30 мин со времени ее подачи по отношению к дозе, вызывающей этот прирост. В этом отрезке времени концентрация сахара в крови непрерывно возрастает при каждой введенной дозе.

Этот прирост концентрации отличается следующими свойствами:

1) Первоначальный прирост глюкозы в крови (ось ординат) увеличивается линейно пропорционально скорости подачи (ось абсцисс) сахара.

2) Эта прямая проходит через нулевую точку оси координат.

3) Угол наклона прямой к оси абсцисс уменьшается одновременно с ускорением удаления глюкозы из крови.

4) Прирост количества сахара в крови при одинаковой дозе, приходящейся на единицу веса тела, будет тем больше (глюкозу из крови тем труднее удалить), чем большими размерами тела обладает данный индивид. Разницы эти выравниваются, если доза будет выражена по отношению к поверхности или к весу тела в степени  $3/4$  либо  $0,73$  („закон поверхности“).

5) Все упомянутые свойства группирует в одну величину постоянная, колебания которой для образцовой группы исследований составляют  $\pm 8,6\%$ .

6) Между установленной постоянной и нормальным выделением глюкозы почками существует параллельность в таком смысле, что при

низком приросте глюкозы в крови (низкой постоянной) глюкозурия является меньшей.

Постоянная указывает на индивидуальные различия в удалении глюкозы из крови, а также на выдающиеся отклонения в случае не вполне исправного выделения глюкозы почками или ее претворения (преобразования). Эта постоянная дает возможность предвидеть, в общих чертах, на основании короткого первоначального периода: ход сахарных кривых дальнейшего процесса насыщения глюкозой, претворяющую способность в дальнейших более долгих периодах жизни собаки, момент появления опасных признаков значительного насыщения глюкозой и т. д. Кроме того, эта постоянная дает возможность соответственного подбора опытных животных и позволяет определить в цифрах первоначальную зависимость: концентрация/доза, для глюкозы у данного рода животных.

Для индивидов, подвергаемых высокому насыщению глюкозой, создана контрольная система критериев для сопоставления, в случае наличия различных постоянных, первоначального прироста глюкозы в крови.

Ю. КРАВЧИНСКИ, И. ДРЕВНОВСКА, З. ФЛЕШИНСКИ, М. РЫЦАЙ

#### ИССЛЕДОВАНИЯ НАД БЕЛКОВЫМ ОБМЕНОМ МОЗГА И МОЗЖЕЧКА, ПРИ ПОМОЩИ ТИРОЗИНА МЕЧЕНОГО $^{14}\text{C}$

##### Резюме

1. Исследовалось течение процесса обновления общего белка мозга и мозжечка, а также общего белка печени, которая служила в качестве контрольного органа, после введения белым мышам тирозина, меченого  $^{14}\text{C}$  по карбоксилу.

$^{14}\text{C}$  тирозин вводился интраперитонеально. Исследовалось также течение процесса обновления белков сыворотки. Обнаружено, что быстрее всего происходит обновление белков сыворотки, медленнее — белков печени, а еще медленнее — белков мозга и мозжечка.

2. Белки мозга, мозжечка и печени были разделены на 4 фракции, которые обозначались буквами А, В, С, D. Фракция А содержала белки, растворимые в 0,14 М NaCl, фракция В - белки, растворимые в 1 М NaCl, фракция С - белки, растворимые в 1 N NaOH, а фракция D - белки, нерастворимые в 1 N NaOH. Наиболее быстро обновляющейся фракцией оказалась фракция А, а наиболее медленно обновляющейся — фракция D. Так как фракции А, В, С являются нукле-



опротеидными комплексами, можно сделать некоторые выводы о значении последних в процессах синтеза белков в нервной клетке.

3. Обсуждается также роль гемато-энцефалического барьера и подчеркивается его отрицательное влияние на результаты исследований, определяющих подвижность белков мозга при интраперитонеальном введении радиоактивного индикатора.

К. КЛЕЧКОВСКИ

## БИОСИНТЕЗ ЦИТРУЛЛИНА В МЯЗГЕ РОСТКОВ БОБОВЫХ РАСТЕНИЙ

### Резюме

Обнаружен биосинтез цитруллина из *L* (+) орнитина и карбамилфосфата (САР) в мязге ростков фасоли, Майского гороха, белого сладкого люпина, синего узколистного люпина и Мазовецкой сои.

Отмечается также способность к энзиматическому катализу синтеза цитруллина из орнитина и карбамилфосфата (САР) в ацетоновом порошке из семян Шестинедельного гороха (фракция  $pH=5,1-5,4$ ).

Для синтеза цитруллина, в вышеупомянутых условиях опыта, необходимо присутствие карбамилфосфата.

В. МЕЙБАУМ-КАТЦЕНЕЛЛЕНБОГЕН, В. ДОБРЫШИЦКА, А. КРУЛИЧЕК

## КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТАННИНОВЫМ МЕТОДОМ БЕЛКОВЫХ ФРАКЦИЙ СЫВОРОТКИ, РАЗДЕЛЯЕМЫХ ПРИ ПОМОЩИ БУМАЖНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА

### Резюме

Применялся турбидиметрический танниновый микрометод для количественного определения белковых фракций сыворотки крови, разделяемых при помощи бумажного электрофореза.

Обнаружено, что отдельные белковые фракции количественно элюируются из бумажных полос 0,1 N NaOH и могут быть определены танниновым методом в концентрациях, не превышающих 100  $\mu g$  белка на 1 мл элюата.

Получены воспроизводимые результаты с точностью, не превышающей экспериментальной ошибки так для нормальных, как и для патологических сывороток.

Танниновый метод, в отличие от применяемых до сих пор методов, позволяет определить абсолютное количество белка в данных фракциях (а не относительное процентное их содержание) в 0,01 мл сыворотки крови. Метод очень прост и пригоден для серийных определений.

А. КОИ, Я. М. ЗГЛИЧИНСКИ, В. БИЧ

### ВЛИЯНИЕ ЭРИТРОЦИТОВ НА ДЫХАНИЕ ЧЕЛОВЕЧЕСКИХ ЛЕЙКОЦИТОВ

#### Резюме

При помощи метода „картезианских водолазов” исследовалось дыхание изолированных человеческих лейкоцитов в присутствии различных концентраций эритроцитов. Обнаружено, что потребление кислорода белыми кровяными тельцами возрастает при добавлении эритроцитов к клеточной суспензии. Показано, что положительное влияние эритроцитов на дыхание лейкоцитов характеризуется незначительным начальным увеличением интенсивности потребления кислорода и позднейшим значительным продлением дыхания. Повидимому, существует оптимальная концентрация эритроцитов, при которой дыхание лейкоцитов наиболее интенсивно. Обсуждаются биохимические и биологические возможности интерпретации описанного явления.

З. ШАФРАН, Г. ГОМАНСКА-ШАФРАНОВА, Я. ОЛЕКСЫ

### РАЗМЕЩЕНИЕ ФЕРМЕНТОВ ИЗ ГРУППЫ ЭСТЕРАЗ В БЕЛКОВЫХ ФРАКЦИЯХ ПАНКРЕАТИЧЕСКОГО СОКА СОБАКИ

#### Резюме

Авторы исследовали содержание липазы, али-эстеразы, холин-эстеразы, холестериновой эстеразы и щелочной фосфатазы в отдельных белковых фракциях панкреатического сока собаки. Для разделения белковых фракций применялся электрофорез в агаровой среде,

содержащей в качестве адсорбента *hyflo super-cel*. При применении такой методики, белок панкреатического сока разделяется на большее число фракций, чем при классическом бумажном электрофорезе. Обнаружено, что белковая фракция, разлагающая эстеры низших жирных кислот, разлагает также эстеры холестерина и ацетилхолин. Фермент, находящийся в этой фракции отличается от липазы, находящейся в совершенно иной белковой фракции. Специфическая холинэстераза также отделяется электрофоретически от липазы и алиэстеразы, то же относится и к щелочной фосфатазе.

