

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

A C T A
B I O C H I M I C A P O L O N I C A

K W A R T A L N I K

T O M V
Z e s z y t 3

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

<http://rcin.org.pl>

KOMITET REDAKCYJNY

Tadeusz Korzybski, Irena Mochacka, 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, Miodowa 10

| | |
|---------------------------------------|---------------------------------|
| Nakład 805 + 115 | Oddano do składania 29.V.58 |
| Ark. wyd. 7,75, ark. druk. 7,75 | Podpisano do druku 25.VIII.58 |
| Papier druk sat. 80 g 70 × 100 III kl | Druk ukończono we wrześniu 1958 |
| Cena zł 25.— | Zamówienie 218 A-32 |

Warszawska Drukarnia Naukowa, Warszawa, Śniadeckich 8

JACQUELINE KRZEMICKA

17-KETOSTERYDY I 17-HYDROKSYSTERYDY W MOCZU LUDZI, KRÓLIKÓW I SZCZURÓW

II. ROZDZIAŁ CHROMATOGRAFICZNY 17-KETOSTERYDÓW OBOJĘTNYCH

*Z Instytutu Onkologii w Gliwicach
Zakład Biologii Nowotworów
Kierownik: prof. dr K. Dux*

Skład 17-ketosterydów (17-ks) obojętnych występujących w moczu ludzkim jest dobrze znany. Mamy tu do czynienia z mieszaniną metabolitów jądra i kory nadnercza. 50 do 70% substancji dających odczyn barwny w reakcji Zimmermanna [21] stanowi androsteron i jego izomer etiocholanolon; resztę mieszaniny stanowią przede wszystkim ketosterydy utlenione przy C₁₁ i dehydroizoandrosteron.

Jeśli idzie o szczura i królika, to skład chemiczny mieszaniny sterydów dających dodatni odczyn w reakcji Zimmermanna nie został wyjaśniony, wiadomo natomiast, że w moczu tych gatunków występują duże ilości 17-hydroksysterydów, dających się ujawnić testem Wilsona i Fairbanka [12].

Ponieważ oznaczenia 17-ks w moczu gryzoni są rozpowszechnione w pracach badawczych z dziedziny doświadczalnej endokrynologii, wydawało się nam celowe, przebadać chromatograficznie tę klasę sterydów. Sądziliśmy również, że metody chromatograficzne, przyczyniając się z jednej strony do lepszego poznania składu sterydów, pozwoliłyby równocześnie na lepsze ich oczyszczenie.

MATERIAŁ I METODA

12 białych szczurów, samic, w wieku 9 miesięcy i królika samca, w wieku 1 roku umieszczono w klatkach metabolicznych, z których odbierano oddzielnie mocz i kał.

Na okres zbierania moczu, tj. przez 17 godzin na dobę, szczury trzymano na czczo, natomiast karmiono je zwykłą dietą podczas pozostałych

7 godzin. Królika żywiono bez ograniczeń i mocz zbierano przez 24 godziny. Zbieranie moczu, hydrolizę kwasem solnym i ekstrakcję eterem wykonywano sposobem opisanym w poprzedniej pracy [12]. Frakcje ketonowe wydzielano za pomocą odczynnika Girarda (chlorek trójmetylo-acetylo-hydrazyno-amonowy), według metody Pincusa i Pearlmana [14]. Materiał przygotowany do chromatografii suszono i rozpuszczano w małych ilościach czystego bezwodnego benzenu. Stosowano mikrokolumnę wypełnioną tlenkiem glinu, opisaną przez Zygmuntowicza i współpr. [22] i wykonywano chromatografię sposobem opisanym przez Ponda i Camba [16].

Aktywność tlenku glinu oznaczana sposobem podanym przez Gastambibé'a [8] odpowiadała klasie II—III skali Brockmanna. Kolumna o wysokości 100 mm i średnicy 4,5 mm zawierała 1,32 g tlenku glinu. Kolumnę napełniano metodą mokrą. Po przepuszczeniu 5 ml roztworu benzenowego wyciągów z moczu eluowano je, stosując kolejno: 45 ml czystego benzenu, 100 ml benzenu zawierającego 0,05% alkoholu etylowego bezwodnego, 100 ml benzenu zawierającego 0,1% alkoholu ¹⁾, 100 ml benzenu o zawartości 0,5% alkoholu, 50 ml benzenu o zawartości 1% alkoholu i wreszcie 10 ml alkoholu.

Odbierano eluaty porcjami po 10 ml pod ciśnieniem powietrza wynoszącym 460 mm Hg. Kolejne porcje eluatów oznaczono cyframi arabskimi, przelewano je do większych probówek i odparowywano pod przepływem powietrza na łaźni wodnej. Na wysuszonych w ten sposób eluatach wykonywano reakcję Zimmermanna sposobem podanym przez Callowa i współpr. [2], seriami po 15 eluatów, po czym dolewano po 15 ml alkoholu 96% i odczytywano nasilenie barwnego odczynu na spektrofotometrze Coleman Junior model 6, przy $\lambda = 520 \text{ m}\mu$.

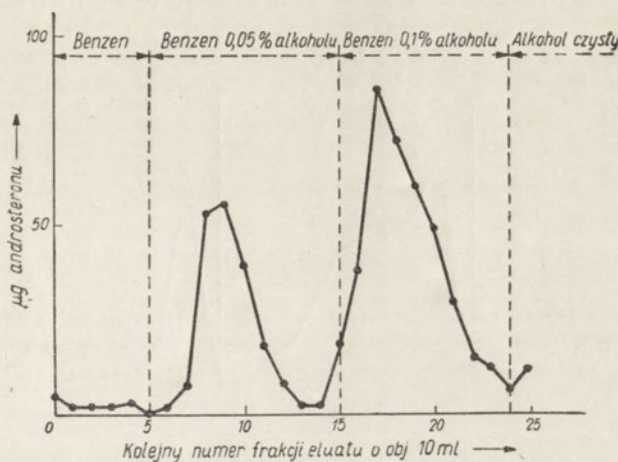
Właściwe badania chromatograficzne wyciągów z moczu królików i szczurów poprzedzono wykonaniem w identycznych warunkach licznych chromatogramów dwóch posiadanych przez nas sterydów wzorcowych, mianowicie: androsteronu i dehydroizoandrosteronu, oraz wyciągów z moczu zdrowej 19-letniej kobiety.

WYNIKI

Rozdzielając chromatograficznie mieszaninę androsteronu i dehydroizoandrosteronu, odnajdywaliśmy ten ostatni w eluatach nr 8, 9, 10, podczas gdy androsteron występował w eluatach nr 17, 18, 19 i 20 (Rys. 1). Taki sposób rozdzielania się wzorcowych sterydów występował z dużą prawi-

¹⁾ Rozpuszczalnik ten używano do eluowania wyciągów 17-ks z moczu królików i szczurów w ilości 100 ml, natomiast do 17-ks z moczu ludzi w ilości 180 ml.

dłowością nawet przy powtórzeniu prób w paromiesięcznych odstępach czasu przy użyciu różnych partii tlenku glinu (zawsze o tej samej aktywności).



Rys. 1. Chromatogram mieszaniny czystego, krystalicznego androsteronu i dehydroizoandrosteronu

Sprawność eluowania wzorcowych sterydów przedstawia tablica 1, z której wynika, że po przepuszczeniu przez kolumnę chromatograficzną po 200 μg wzorca, odzyskiwano przeciętnie 92% dehydroizoandrosteronu (2 próby) oraz 83,5% androsteronu (1 próba).

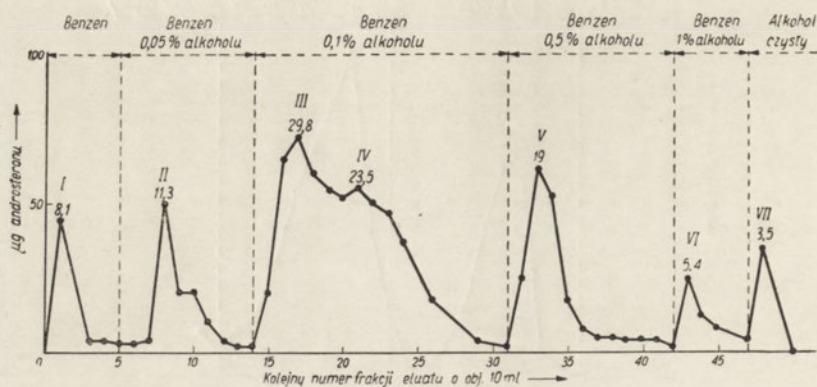
Tablica 1

Kontrola odzyskiwania znanych ilości androsteronu i dehydroizoandrosteronu po adsorpcji na tlenku glinu

| 17-ketosterydy | μg wprowadzone | μg odzyskane | sprawność % |
|-----------------------|---------------------------|-------------------------|-------------|
| dehydroizoandrosteron | 200 | 185 | 92,5 |
| „ | 200 | 183 | 91,5 |
| androsteron | 200 | 167 | 83,5 |

Obojętne 17-ks z moczu kobiety rozdzielają się chromatograficznie na 7 frakcji. Frakcje te, oznaczone cyframi rzymskimi, widoczne są na rys. 2, który przedstawia typowy chromatogram, wybrany dla przykładu spośród liczniejszych badań powtarzanych u tej samej kobiety. W chromatogramie tym, przypominającym żywo chromatogramy uzyskane przez Zygmuntowicza i współpr. [22], frakcja II nie jest wyraźnie odgraniczona od frakcji IV, chociaż na krzywej wyraźnie występują wierzchołki charakterystyczne dla obu frakcji.

Nie dysponując metodami pozwalającymi na bezpośrednią analizę fizyczną i chemiczną każdej z siedmiu frakcji, byliśmy zmuszeni sądzić o ich naturze chemicznej na drodze pośredniej. Wiadomo, mianowicie, że



Rys. 2. Chromatogram 17-ks z moczu zdrowej 19-letniej kobiety. Liczby nad szczytami krzywej przedstawiają procentowe stężenie 17-ks w każdej frakcji w odniesieniu do całkowitej ilości 17-ks. Cyfry rzymskie oznaczają frakcje.

w chromatografii adsorpcyjnej sterydy eluują się zawsze w tej samej kolejności [6] i ich umiejscowienie w chromatogramie wystarcza w zasadzie do ich identyfikacji.

Porównując więc chromatogram mieszaniny dwu wzorcowych sterydów, jakie mieliśmy do dyspozycji (Rys. 1) z chromatogramem obojętnych 17-ks izolowanych z moczu ludzkiego (Rys. 2), możemy twierdzić, że frakcja II (eluaty 8, 9 i 10) zawiera dehydroizoandrosteron, oraz że frakcja III (eluaty 17, 18, 19 i 20) zawiera androsteron.

O naturze pozostałych frakcji sądzimy na podstawie ich charakterystycznego rozmieszczenia na chromatogramie w stosunku do dwu frakcji zidentyfikowanych. Bardzo znaczne podobieństwo między naszymi chromatogramami a analogicznymi chromatogramami innych badaczy [1, 22], którzy mieli możliwość analizowania poszczególnych frakcji, pozwala nam na interpretację, którą przedstawia tablica 2. Oczywiście interpretacja taka jest słuszna tylko w takim stopniu, w jakim prawdziwe są wyniki badaczy, z którymi porównujemy nasze chromatogramy. Dla naszych celów interpretacja taka — choć nie dość pewna — jest wystarczająca, gdyż w obecnych badaniach ograniczamy się do porównania typowego chromatogramu 17-ks ludzkich z analogicznie wykonanymi chromatogramami 17-ks z moczu królika i szczurów.

Wyciągi z moczu królika, przygotowane w taki sam sposób jak wyciągi z moczu ludzkiego, nie nadawały się do analizy chromatograficznej 17-ks. Kilka wstępnych badań wykazało np., że w wyciągach z moczu królika

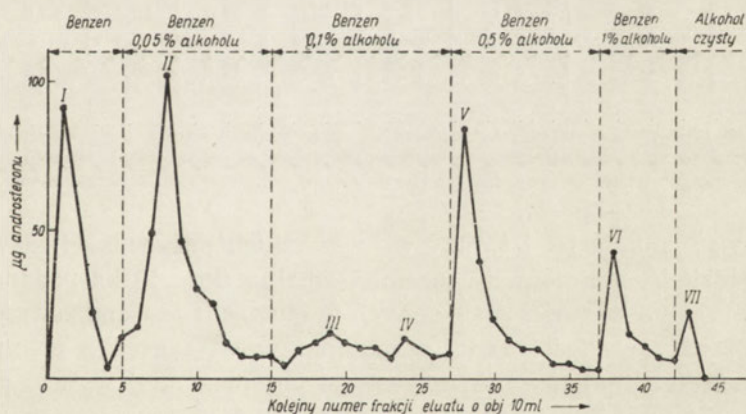
Tablica 2

Kolejność elucji obojętnych 17-ketosterydów z moczu człowieka

| Frakcje | Kolejny nr eluatu | Sterydy *) |
|---------|-------------------|---|
| I | 1 — 5 | Artefakty: $\Delta^{3,5}$ -androstendien-17-on, chlorodehydroizoandrosteron; 17-ketosterydy nie znane |
| II | 6 — 13 | dehydroizoandrosteron, izoandrosteron |
| III | 14 — 20 | androsteron i małe ilości $\Delta^{9,11}$ -androsen-3 (α)-ol-17-on |
| IV | 21 — 30 | etiocholanolon i małe ilości $\Delta^{9,11}$ -etiocholen-3 (α)-ol-17-on |
| V i VI | 31 — 47 | 11-ketoetiocholanolon, 11-hydroksyandrosteron |
| VII | 48 | 17-ketosterydy nie rozpoznane |

*) Uwaga: Spośród wymienionych sterydów mogliśmy zidentyfikować jedynie dehydroizoandrosteron (zawarty w eluatach 8, 9 i 10) oraz androsteron (zawarty w eluatach 17, 18, 19 i 20). O naturze pozostałych frakcji sądzimy na podstawie ich charakterystycznego rozmieszczenia na chromatogramie w stosunku do dwóch frakcji zidentyfikowanych.

występują obficie barwiki i nieswoiste ciała chromogenne, które rozkładają się na całej długości chromatogramu. Ciała te, stanowiąc bogato zróżnicowaną mieszaninę, zaciemniały obraz chromatogramu 17-ks. Okazało się więc konieczne wydzielenie frakcji ketonowej przy pomocy odczynnika Girarda T. Pomimo takiego oczyszczania ekstrakty nadal zawierały różne barwiki, które rozdzielały się natychmiast po wleciu ekstraktu do kolumny. Część z nich, tj. pigmenty najbardziej polarne, pozostają zaadsorbowane na tlenku glinu nawet po przejściu czystego alkoholu.



Rys. 3. Chromatogram obojętnych 17-ks w ekstraktach ketonowych z 48 godz ilości moczu samca królika

Rys. 3. przedstawia chromatogram frakcji ketonowych z moczu królika; wydziela się siedem frakcji, z których najobfitsza jest frakcja mało-polarna, znaleziona w eluatach nr 7, 8 i 9.

Podobnie jak w moczu ludzkim, część ciał dających swoistą reakcję Zimmermanna nie adsorbują się na tlenku glinu i stanowią frakcję (eluaty nr 1 i 2) najmniej zanieczyszczoną nieswoistymi ciałami chromogennymi. Benzen zawierający 0,1% alkoholu eluuje bardzo małe ilości 17-ks; pomiędzy eluatami nr 15 i 25 daje się zaobserwować jeden, niekiedy dwa, mało wyraźne wierzchołki. Następnie występuje bardzo wyraźny wierzchołek w miejscu zajmowanym przez 11-ketosterydy w chromatogramach z moczu ludzkiego. Krzywa absorpcji fotometrycznej produktu barwnego reakcji Zimmermanna eluatów krytycznych nie wykazuje wyraźnie zaznaczonego maksimum. Ostatnia frakcja zawiera znaczne ilości pigmentów brunatnych i daje z odczynnikiem Zimmermanna reakcję nietypową. Sześciokrotnie powtarzane badanie chromatograficzne 17-ks w moczu królika w ciągu 12 kolejnych dni wykazało dobrą zgodność poszczególnych wyników (Tabl. 3).

Tablica 3

Powtarzalność wyników frakcjonowania chromatograficznego 17-ketosterydów w moczu królika zbieranym przez 12 kolejnych dni

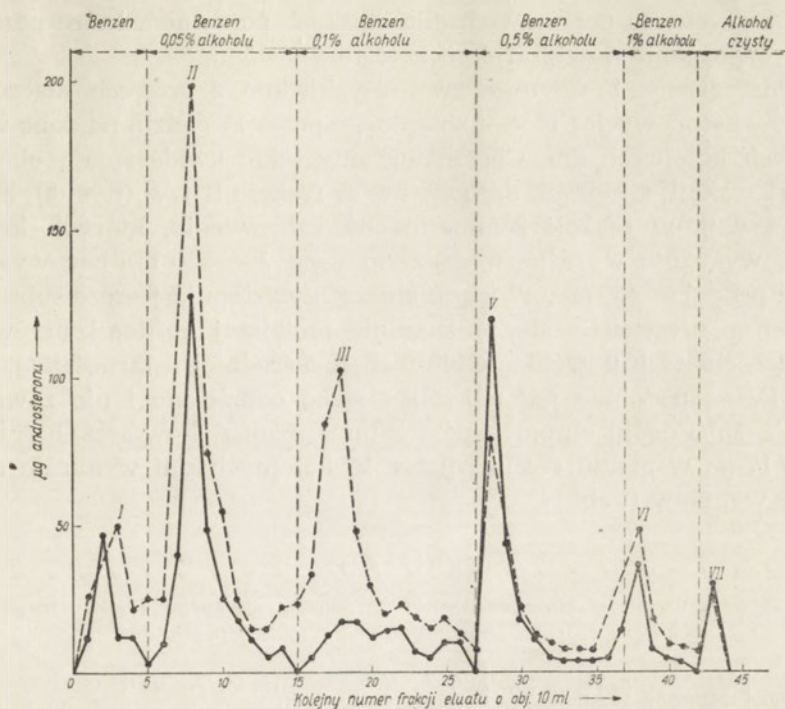
| Chromatogram nr | Objętość moczu w ml (48 godz) | 17-ks* (μ g) | Frakcje**) | | | | | |
|-----------------|-------------------------------|----------------------|------------|------|--------|------|------|------|
| | | | I | II | III+IV | V | VI | VII |
| 1 | 420 | 895 | 19,1 | 33,1 | 12,1 | 22,1 | 9,5 | 4,1 |
| 2 | 490 | 810 | 10,6 | 35,9 | 15,3 | 25,1 | 9,7 | 3,6 |
| 3 | 590 | 753 | 3,2 | 34,0 | 16,7 | 28,1 | 11,8 | 6,3 |
| 4 | 480 | 411 | 7,2 | 33,0 | 11,1 | 26,1 | 12,6 | 10,0 |
| 5 | 520 | 719 | 16,6 | 40,9 | 9,9 | 17,7 | 14,9 | |
| 6 | 445 | 422 | 10,8 | 32,6 | 12,0 | 23,7 | 8,1 | 12,8 |

*) Ilość 17-ks/48 godzin po chromatografii, czyli suma wartości poszczególnych eluatów

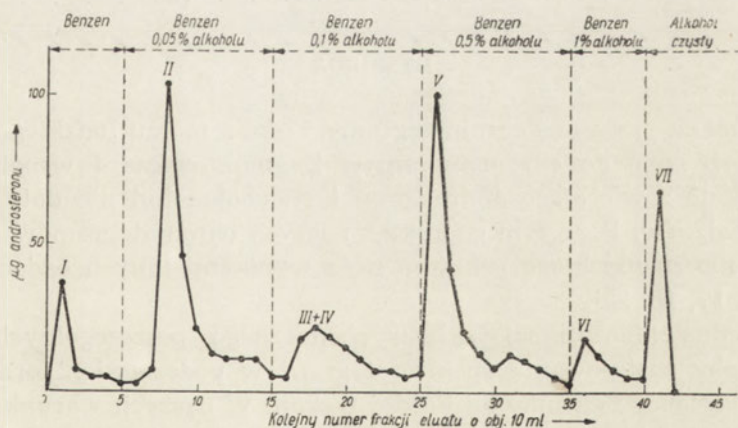
**) Wyrażone w % ogólnej ilości 17-ks przypadających na daną frakcję (minimum depresji między wierzchołkami podzielono przez 2 i każdą połowę odniesiono do sąsiednich wierzchołków).

Ponieważ frakcje III i IV nie we wszystkich przypadkach dawały się dobrze oddzielić, obliczano je razem. Globalna ilość 17-ks podana w tabelicy 3 jest sumą wartości znalezionych w eluatach; jest ona zawsze znacznie niższa od zawartości 17-ks oznaczonej w wyciągach z moczu przed chromatografią. Zmniejszenie aktywności chromogennej wynosi przeciętnie 20%, ale w jednym przypadku osiągnęło 40%.

Po dodaniu do ekstraktów ketonowych z moczu królika mieszanki krystalicznego androsteronu i dehydroizoandrosteronu otrzymaliśmy chromatogram przedstawiony na rys. 4. Widzimy, że frakcja II ma tę samą polarność co dehydroizoandrosteron. Uderza również bardzo skąpa ilość frakcji III, zawierającej androsteron. Nie posiadaliśmy niestety innych



Rys. 4. Linia ciągła przedstawia chromatogram obojętnych 17-ks w wyciągach ketonowych z 48 godz ilości moczu samca królika
Linia przerywana oznacza chromatogram 17-ks z innej porcji 48 godz ilości moczu tego samego królika. Do ekstraktu moczu dodano 200 g czystego, krystalicznego dehydroizoandrosteronu i 370 g androsteronu



Rys. 5. Chromatogram 17-ks w ekstraktach ketonowych moczu samic szczurów

ciał wzorcowych dla przeprowadzenia dalszych porównań, które pozwalałyby na rozpoznanie innych frakcji ketosterydów.

Chromatogramy 17-ks u szczura uzyskiwano z czterech złączonych ekstraktów ketonowych z moczu zbieranego przez 17 godzin na dobę w ciągu czterech kolejnych dni. Chromatogramy takie uwidaczniają obecność VI do VII frakcji, z których najbogatsze są frakcje II i V (Rys. 5). Eluaty krytyczne dają w reakcji Zimmermanna zabarwienie, których krzywa absorpcji wykazuje wyraźne maksimum przy $\lambda = 520 \text{ m}\mu$ bez wysokich absorpcji przy $\lambda = 430 \text{ m}\mu$. W kilku eluatach występują jeszcze substancje chromogenne nieswoiste, ale w znacznie mniejszej obfitości niż w odpowiednich eluatach u królika. Obie frakcje o średniej polarności, tj. frakcja II i IV są podobnie jak u królika słabo oddzielone i nie zawierają więcej niż 15% ogółu chromogenów Zimmermanna. Powtarzane frakcjonowanie 17-ks w moczu szczura przez 16 kolejnych dni wykazało dobrą zgodność wyników (Tabl. 4).

Tablica 4

Powtarzalność wyników frakcjonowania chromatograficznego 17-ketosterydów w moczu szczura zbieranym przez 16 kolejnych dni

| Nr chroma- togramu | Mocz *) (ml) | 17-ks po chromato- grafii (μg) | Frakcje w % | | | | | |
|-----------------------|-----------------|---|-------------|------|--------|------|-----|-----|
| | | | I | II | III+IV | V | VI | VII |
| 7 | 220 | 400 | 6,3 | 44,3 | 14,2 | 19,2 | 6,1 | 9,9 |
| 8 | 360 | 470 | 10,3 | 30,8 | 14,4 | 27,6 | 7,6 | 8,9 |
| 9 | 410 | 545 | 8,9 | 35,3 | 16,2 | 28,3 | 5,5 | 5,8 |
| 10 | 380 | 730 | 7,7 | 32,1 | 14,3 | 30,4 | 5,8 | 9,7 |

*) Mocz z 4 dni zbierany przez 17 godzin na dobę w okresie głodzenia

DYSKUSJA

Otrzymane przez nas chromatogramy 17-ks z moczu ludzkiego są najbardziej zbliżone do chromatogramów Zygmunutowicza i współpr. [22], gdyż frakcje zawierające androsteron i etiocholanolon nie dały się wyraźnie rozdzielić. Poza tym charakter naszych chromatogramów z prawidłowego moczu ludzkiego pokrywa się z wynikami innych badaczy [4, 5, 7, 15, 16, 17, 18, 22].

Bezbłędna identyfikacja składu chemicznego poszczególnych frakcji wymagałaby zastosowania spektrofotografii w podczerwieni oraz pełnej analizy fizycznej i chemicznej każdej frakcji. W naszych warunkach analiza taka była niewykonalna. Zastosowana w obecnej pracy metoda elucji mieszanej, będąca chromatograficznym odpowiednikiem mieszanej punk-

tu topnienia [20], jest niewystarczająca. Toteż o naturze chemicznej frakcji uzyskanych w naszych chromatogramach możemy sądzić jedynie pośrednio, przez porównanie z wynikami innych badaczy, którzy dokonali pełnej analizy [1].

Badania te jednak dotyczą tylko moczu człowieka i skład 17-ks występujących w moczu królika i szczura pozostaje nieznany. Niemniej przedstawione w obecnej pracy wyniki wskazują na pewne istotne różnice zachodzące między składem 17-ks z moczu człowieka a składem 17-ks z moczu gryzoni laboratoryjnych. W chromatogramach królika i szczura można wprawdzie rozpoznać na podstawie umiejscowienia wierzchołków fal takie same frakcje sterydów jak w odpowiednich chromatogramach ludzkich, jednak odsetkowa zawartość sterydów w poszczególnych frakcjach jest całkowicie odmienna.

W moczu ludzkim androsteron i etiocholanolon stanowią 50—70% wszystkich 17-ks. U szczura i u królika największa fala chromatograficzna odpowiada frakcji mało polarnej, którą eluuje benzen zawierający 0,05% alkoholu, i która posiada te same własności absorpcyjne co β -ketosterydy. Frakcja ta zawiera przeciętnie 35% wszystkich 17-ks. Drugą ważną frakcję stanowi frakcja wysoce polarna, posiadająca tę samą zdolność absorpcyjną co 11-oksysterydy: 11-ketoetiocholanolon i 11-hydroksyandrosteron. W środkowej części chromatogramów królika i szczura brak jest wysokich fal androsteronu i jego izomeru, występujących w moczu człowieka.

Hoffman, Sabin i Desbarats (przyt. wg. [19]) wykazali, że u królika redukcja testosteronu zachodzi wybiórczo w pozycji C₄. Badacze ci, po podaniu królikowi testosteronu, wyodrębnili z jego moczu małe ilości etiocholanolonu, nie znaleźli zaś nawet śladów androsteronu. Jest więc prawdopodobne, że eluaty nr 15 do 25 zawierają — przynajmniej u królika — tylko etiocholanolon w niewielkich ilościach. Niestety, w obecnej pracy nie mogliśmy tego wykazać, ponieważ stosowana przez nas metoda nie pozwalała na dobry rozdział obu izomerów.

Rozdzielenie chromatograficzne 17-ks moczowych u szczura i u królika dowodzi, że nie można przypisywać tego samego znaczenia pomiarowi globalnego wydzielania tych sterydów u człowieka i zwierząt laboratoryjnych. Androsteron i etiocholanolon są najbardziej obfite u człowieka, podczas gdy w moczu królika etiocholanolon występuje tylko w bardzo niewielkich ilościach, a androsteron prawdopodobnie nie występuje wcale.

Sądzymy więc, że De Koning i współpr. [3] niesłusznie wnioskują o braku w jajnikach kobiet prekursorów dla 17-ks na podstawie swych badań, przeprowadzonych na królicach normalnych i trzebionych.

Pod względem ilościowym wyniki nasze są niższe od danych w literaturze [9, 11, 10, 13]. Oczyszczanie odczynnikami Girarda, które stosują nie wszyscy autorzy, oraz adsorbacja chromatograficzna poważnie zmniejszają nasilenie barwnej reakcji Zimmermanna.

Zauważyliśmy, że adsorbacja chromatograficzna pozwala dokładniej oczyszczać sterydy, gdyż znaczna ilość ciemnobrunatnych barwików z ekstraktów ketonowych ulega elucji dopiero w ostatniej frakcji, reszta zaś pozostaje na tlenku glinu. Nieswoiste ciała chromogenne rozdzielają się na kilka frakcji, które w reakcji Zimmermanna dają zabarwienie o rozmaitych krzywych absorpcji fotometrycznej. Proporcje tych nieswoistych reakcji są niejednakowe w poszczególnych porcjach moczu. Poprawki kolorymetryczne w postaci wzorów lub nomogramów, jako niepewne dla moczu ludzkiego, nie mają również żadnego zastosowania dla moczu zwierzęcego.

W konkluzji, wyniki rozdziału chromatograficznego 17-ks w moczu królika i u szczura wykazały istotne różnice w porównaniu z moczem człowieka. Niezbędna jest jednak dalsza analiza jakościowa tych sterydów zwierzęcych. Do czasu całkowitego i pewnego rozpoznania składu poszczególnych frakcji sterydów konieczna będzie daleko idąca ostrożność w interpretacji pomiarów globalnego wydzielania obojętnych 17-ks z moczu zwierząt doświadczalnych.

STRESZCZENIE

Obojętne 17-ketosterydy z moczu człowieka, królika i szczura rozdzielono na frakcje metodą chromatografii na kolumnie wypełnionej tlenkiem glinu. Wyniki frakcjonowania są bardzo różne u człowieka i u obu gatunków gryzoni. U tych ostatnich najobficiej występują dwie frakcje, z których pierwsza posiada polarność dehydroizoandrosteronu, druga polarność 11-oksysterydów. Androsteron i etiocholanolon, które u człowieka występują w ilości 50—70% ogółu 17-ks, są praktycznie nieobecne u królika i szczura.

Wyniki nasze wskazują, że globalnemu oznaczeniu 17-ks u zwierząt laboratoryjnych nie można przypisywać tego samego znaczenia fizjologicznego co u człowieka.

LITERATURA

- [1] Birke G., Plantin L. O., *Acta Medica Scandinav. Suppl.* **291**, 1954.
- [2] Callow N. H., Callow R.K., Emmens C. W., *Biochem. J.* **32**, 1312, 1938.
- [3] De Koning J., Krichesky B., Glass S. J., *Proc. Soc. Exp. Med.* **68**, 321, 1948.

- [4] Devis R., *Annales d'Endocrinol.* **12**, 451, 1951.
- [5] Dingemanse E., Huis int. Veld L. G., Hartogh-Katz S. L., *J. Clin. Endocrinol.* **12**, 66, 1952.
- [6] Dobriner K., Lieberman S., *A Symposium on Steroid Hormones*, edited by E. S. Gordon, The Univ. of Wisconsin Press 46, 1950.
- [7] Dobriner K., Lieberman S., Rhoads C. P., *J. Biol. Chem.* **172**, 241, 1948.
- [8] Gastambibe E., *Bull. Soc. Chim. France.* **842**, 1954.
- [9] Kimeldorf D. J., *Am. J. Physiol.* **152**, 615, 1948.
- [10] Koller M., De Giuseppe L., *Bull. Soc. Ital. Biol. Sperm.* **29**, 547, 1952.
- [11] Kowalewski K., Bastenie P. A., *Ann. d'Endocrinol.* **11**, 284, 1950.
- [12] Krzemicka J., *Acta Bioch. Pol.* **4**, 187, 1957.
- [13] Lampton A. K., Miller A. J., *J. Urology* **45**, 552, 1941.
- [14] Pincus G., Pearlman W. H., *Endocrinology* **29**, 413, 1941.
- [15] Pond M. H., *J. Endocrinol.* **10**, 3, 1954.
- [16] Pond M. H., Camb M. A., *Lancet* **161**, 906, 1951.
- [17] Robinson D. M., Goulden F., *Brit. J. Cancer* **3**, 62, 1948.
- [18] Rubin B. L., Rosenkrantz H., Dorfman R. I., Pincus G., *J. Clin. Endocrinol.* **13**, 568, 1953.
- [19] Venning E. H., *Coll. Endocrinol. Ciba Foundation* **2**, 286, 1952.
- [20] Zechmeister L., Cholnoky L., *Die chromatografische Adsorptionsmethode*, Wien, Springer, 1938.
- [21] Zimmermann W., *Z. physiol. Chem.* **233**, 281, 1935.
- [22] Zyguntowicz A. S., Wood M., Christo E., Talbot N. B., *J. Clin. Endocrinol.* **11**, 578, 1951.

LES 17-CÉTOSTÉROÏDES ET 17-HYDROXYSTÉROÏDES URINAIRES CHEZ L'HOMME, LE LAPIN ET LE RAT

II. SÉPARATION CHROMATOGRAPHIQUE DES 17-CÉTOSTÉROÏDES NEUTRES

Résumé

Les 17-cétostéroïdes neutres urinaires chez l'homme, le rat et le lapin ont été séparés par micro-chromatographie sur colonne d'alumine. Les résultats du fractionnement sont très différents chez l'homme et chez les deux rongeurs. Chez ces derniers les deux fractions les plus importantes ont, l'une une polarité semblable à la déhydroisoandrosterone et l'isoandrosterone, l'autre une polarité semblable aux 11-oxystéroïdes. L'androsterone et l'étiocolanolone, qui chez l'homme représentent 50 à 70% des 17-cs globaux, sont pratiquement absentes des urines du rat et du lapin. Nos résultats montrent, qu'on ne peut attribuer à une mesure globale des 17-cs la même signification physiologique chez les animaux et chez l'homme.

Otrzymano 22.6.57 r.

T. BORKOWSKI

BADANIA NAD ODDYCHANIEM TKANKI MÓZGOWEJ IN VITRO

Z Zakładu Chemii Fizjologicznej Akademii Medycznej w Lublinie
Kierownik: prof. dr J. Opieńska-Blauth

Jak wykazały badania Quastela i współpracowników [12], wpływ narkotyków na oddychanie tkanki mózgowej *in vitro* dopiero wtedy wyraźnie ujawnia się, kiedy na metabolizujące skrawki kory mózgowej zadziała się czynnikiem stymulującym procesy oddechowe.

Do stymulacji tkanki mózgowej *in vitro* stosowane są impulsy elektryczne o niskim napięciu [18] przy użyciu odpowiedniej aparatury [4]. Badania licznych autorów wykazały, że przy drażnieniu skrawków kory mózgowej zwiększa się zużycie tlenu i ilość nagromadzonego kwasu mlekowego [19] przy równoczesnym zmniejszeniu zawartości fosfokreatyny i nagromadzeniu nieorganicznego fosforanu [20].

Z innych czynników jony potasowe [21, 22, 3, 8], amonowe [15, 39], 2,4-dwunitrofenol [21, 22] i kwas glutaminowy [15, 39] działają stymulująco na zużycie tlenu przez metabolizujące *in vitro* skrawki kory mózgowej. W poprzedniej pracy w nawiązaniu do nieznanego mechanizmu działania bromu, przeprowadzono badania nad wpływem różnych stężeń bromku sodowego na aktywność układu cytochromowego w homogenizatych tkanki mózgowej myszy [6].

Celem niniejszej pracy jest wykazanie, jaki udział w procesie stymulacji potasowej odgrywają aniony z grupy chlorowców oraz jakie działanie wywierają inne czynniki stymulujące w stosunku do zniszczonej i nie zniszczonej struktury komórkowej tkanki mózgowej.

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

I. Metoda badań

Do badań używano myszek białych wagi 15 do 20 g pozostających na zwykłej diecie mieszanej.

Myszki zabijano przez dekapitację bez uprzedniego stosowania jakichkolwiek środków narkotycznych. Po przecięciu kości czaszki wydobywano mózg i oddzielano półkule od pnia mózgowego.

1. Skrawki mózgowe sporządzano z jednej półkuli mózgowej przez poprzeczne pocięcie kory na płatki grubości 1,0 mm. Średnia waga skrawków mózgowych użytych w pojedynczym oznaczeniu wynosiła od 70 do 100 mg mokrej wagi. Suchą wagę użytej tkanki uzyskiwano przez ogrzewanie skrawków w temp. 100° w ciągu trzech godzin.

2. Homogenizaty tkanki mózgowej sporządzano w sposób następujący: Korę półkul mózgowych po zważeniu umieszczano w dolnej części szklanego homogenizatora zanurzonego w lodzie. Całkowitą homogenizację tkanki uzyskiwano, po 5-minutowym rozcieraniu jej szklanym doszlifowanym walcem w temp. 0°, w wodnym roztworze soli.

W ten sposób przygotowany homogenizat wykazywał w badaniu mikroskopowym całkowity brak elementów tkankowych i komórek. Zawartość mokrej masy tkanki w homogenizatach wynosiła 10 do 12%.

3. Oznaczenia przemiany oddechowej dokonywano metodą manometryczną w aparacie Warburga w atmosferze powietrza. W naczyniu głównym umieszczano każdorazowo skrawek mózgu lub odpowiednią (w przeliczeniu na wagę tkanki) ilość homogenizatu w roztworze soli. W ostatecznym swym składzie mieszanina reagująca zawierała: NaCl — 128 mM, KCl — 5 mM, CaCl₂ — 0,6 mM, MgSO₄ — 1,3 mM, KH₂PO₄ — 0,65 mM, Na₂HPO₄ — 5,0 mM, całość doprowadzono do pH 7,4 za pomocą HCl. Ponadto do układu dodawano glikozę w stężeniu 0,1 M albo kwas glutaminowy w stężeniu 0,1 M. Naczynko centralne zawierało każdorazowo 0,2 ml 20% NaOH. Czynniki stymulujący oddychanie umieszczano bądź w ramieniu bocznym, bądź bezpośrednio w naczyniu głównym. Intensywność procesów oddechowych określano przy pomocy Q_{O₂} (μl O₂/mg suchej masy/godz).

II. Wyniki doświadczeń

Wstępne doświadczenia wykazały, że wartość Q_{O₂} wzrasta w miarę zwiększenia powierzchni metabolizującej tkanki przez zwiększenie stopnia rozdrobnienia tkanki. Q_{O₂} dla pojedynczego płata kory mózgowej wynosi średnio 4,1, a wzrasta do wartości 7,7 przy rozdrobnieniu tkanki na kilka 1 mm skrawków.

Sole potasowe chlorowców w ekwiwalentnych stężeniach dodawano z ramienia bocznego. Pomiarów dokonywano w ciągu 30 min przed dodaniem i po 30 min od momentu dodania soli. Wpływ tych soli na intensywność procesów oddechowych skrawków kory mózgowej w obecności glikozy jako substratu ilustruje tablica 1. W tablicy tej zestawione war-

tości Q_{O_2} są średnimi z kilku analogicznych pomiarów. Błąd poszczególnych pomiarów wahał się w granicach $\pm 5\%$.

Jak wynika z tablicy 1 Q_{O_2} dla poszczególnych układów przed dodaniem soli potasowych waha się w wąskich granicach, natomiast po dodaniu KCl, KBr i KJ stopień zużycia tlenu wyraźnie wzrasta jako wyraz

T a b l i c a 1

Wpływ soli potasowych na zużycie tlenu przez skrawki kory mózgowej. Sole potasowe dodawane po upływie 30 min inkubacji. Warunki inkubacji podane w tekście

| Dodawany związek po 30 min | Q_{O_2} | | Różnica Q_{O_2} | % stymulacji lub hamowania |
|-------------------------------|----------------|------------|----------------------|-------------------------------|
| | przed dodaniem | po dodaniu | | |
| H ₂ O | 8,4 | 8,4 | — | — |
| KCl 0,1 M | 8,7 | 9,7 | +1,0 | 11,5 |
| KBr 0,1 M | 8,5 | 9,9 | +1,4 | 16,5 |
| KJ 0,1 M | 8,2 | 9,6 | +1,4 | 17,0 |
| KF 0,1 M | 8,9 | 6,9 | -2,0 | 22,0 |

pobudzenia procesów oddechowych, przy czym obecność anionów Cl⁻, Br⁻ i J⁻ nie wpływa na wysokość stymulacji. Jedynie po dodaniu fluorku potasowego stymulacja potasowa nie zaznacza się, natomiast stwierdza się znaczny spadek Q_{O_2} .

Następną serię doświadczeń przeprowadzono w ten sposób, że inkubacja skrawków mózgowych odbywała się od początku w obecności badanych soli potasowych tak, że czynnik stymulujący działał w ciągu całego 60-minutowego czasu trwania doświadczenia. Tablica 2 ilustruje wyniki tych doświadczeń, przy czym, jak i w poprzednich doświadczeniach, źródłem węgla w czasie inkubacji była glikoza, a wartości Q_{O_2} są średnimi uzyskanymi z kilku pomiarów.

T a b l i c a 2

Wpływ soli potasowych na zużycie tlenu przez skrawki kory mózgowej. Sole potasowe dodawane od początku inkubacji. Substrat utleniany — glikoza

| Dodawany czynnik | Q_{O_2} | Różnica Q_{O_2} w stosunku do kontroli | % stymulacji lub hamowania |
|------------------|-----------|---|-------------------------------|
| H ₂ O | 7,7 | — | — |
| KCl 0,1 M | 9,5 | +1,8 | 23,3 |
| KBr 0,1 M | 9,9 | +2,2 | 28,5 |
| KJ 0,1 M | 9,6 | +1,9 | 24,6 |
| KF 0,1 M | 3,8 | -3,9 | 50,6 |

Z tablicy 2 wynika, że przy 60-minutowej inkubacji skrawka z dodaniem soli potasowych wzrost zużycia tlenu jest większy niż przy 30-minutowej inkubacji, lecz proporcjonalny do czasu działania dodanej substancji. Również i w tych warunkach rodzaj towarzyszącego kationowi potasowemu anionu nie ma wpływu na wielkość stymulacji procesów oddechowych. Wyjątek stanowi anion fluorkowy, który silnie hamuje szybkość i intensywność procesów oddechowych.

W dalszych doświadczeniach badano wpływ soli potasowych na oddychanie homogenizatów tkanki mózgowej pozbawionych całkowicie elementów komórkowych. W tym celu do poszczególnych naczynek inkubacyjnych dodawano po 0,5 ml homogenizatu, co w przeliczeniu na suchą masę wynosiło około 100 mg tkanki. Środowisko solne było takie samo jak przy oddychaniu skrawków, a substratem dla spalań była glikoza.

T a b l i c a 3

Wpływ soli potasowych na zużycie tlenu przez homogenizaty kory mózgowej. Substrat utleniany — glikoza

| Dodawany czynnik | Q_{O_2} | Różnica Q_{O_2} w stosunku do kontroli | % stymulacji lub hamowania |
|------------------|-----------|---|-------------------------------|
| H ₂ O | 8,2 | — | — |
| KCl 0,1 M | 8,2 | — | — |
| KBr 0,1 M | 7,8 | — 0,4 | 5,2 |
| KJ 0,1 M | 5,5 | — 2,7 | 35,0 |
| KF 0,1 M | 2,9 | — 5,3 | 68,0 |

W tablicy 3 podano zestawienie średnich wartości otrzymanych wyników, które wykazują wyraźnie, że w preparatach bezkomórkowych brak jest jakiegokolwiek stymulacji procesów oddechowych po dodaniu soli potasowych. Sole potasowe zachowują się więc odmiennie w stosunku do preparatów komórkowych i bezkomórkowych kory mózgowej. Zamiast stymulacji obserwuje się spadek aktywności oddechowej homogenizatów w obecności KBr, KJ i KF, przy czym najwyższe zahamowanie oddychania odnosi się do układów z fluorkiem potasowym. Oprócz jonów potasowych również i inne kationy jednowartościowe powodują w tkance mózgowej wzrost oddychania i aerobowej glikolizy. Kationem takim jest między innymi jon amonowy.

Efekt stymulacji oddychania wywołuje również 2, 4-dwunitrofenol oraz kwas glutaminowy. W dalszej serii doświadczeń przebadano porównawczo wpływ tych substancji na procesy oddechowe zarówno skrawków mózgowych, jak i homogenizatów. Wszystkie te związki były dodawane do naczynka głównego od początku inkubacji. Jak wynika z licznych danych,

stężenie kwasu glutaminowego w tkance mózgowej jest 20-krotnie wyższe aniżeli w otaczającym środowisku [34, 35]. W związku z tym, kwas glutaminowy dodawano do układu w stężeniu odpowiadającym jego koncentracji wewnątrzkomórkowej, co wyraża się wartością $4,6 \times 10^{-4}$ M.

Zgodnie z danymi z literatury [21], 2, 4-dwunitrofenol dodawano w stężeniu $2,5 \times 10^{-5}$ M, natomiast chlorék amonowy jako jednowartościowy kation w stężeniu 0,1 M. We wszystkich układach glikoza była substratem utlenianym. Otrzymane w tych warunkach średnie wartości Q_{O_2} dla homogenizatów i skrawków ilustruje tablica 4. Jak widać, DNP (2, 4-dwunitrofenol) działa stymulująco na wzrost zużycia tlenu zarówno przez skrawki kory mózgowej, jak i przez homogenizaty. Podobnie zachowuje

T a b l i c a 4

Wpływ DNP, kwasu glutaminowego i NH_4Cl na oddychanie skrawków i homogenizatów kory mózgowej. Substrat utleniany — glikoza

| Substancja dodawana | Skrawki tkanki | | | Homogenizaty tkanki | | |
|---|----------------|--|----------------------------|---------------------|--|---------------------------|
| | Q_{O_2} | Różnica Q_{O_2} w stosunku do kontroli | % stymulacji lub hamowania | Q_{O_2} | Różnica Q_{O_2} w stosunku do kontroli | % symulacji lub hamowania |
| H ₂ O | 7,7 | — | — | 8,2 | — | — |
| DNP $2,5 \times 10^{-5}$ M | 11,7 | + 4,0 | 52,0 | 12,4 | + 4,2 | 51,0 |
| Kwas glutaminowy $4,6 \times 10^{-4}$ M | 8,4 | + 0,7 | 9,0 | 10,0 | + 1,9 | 23,4 |
| NH_4Cl 0,1 M | 6,7 | — 1,0 | 13,0 | 7,3 | — 0,9 | 10,9 |

się kwas glutaminowy, który w stosowanym stężeniu wywiera jednak nieco silniejszy wpływ stymulujący na zużycie tlenu przez homogenizaty, niż przez skrawki kory mózgowej.

W działaniu jonów amonowych na procesy oddechowe można wyróżnić dwa okresy: pierwszy 30-minutowy, kiedy zużycie tlenu jest wyższe aniżeli w próbie kontrolnej, i następny 30-minutowy okres, kiedy zużycie tlenu jest znacznie obniżone — również w stosunku do próby kontrolnej.

W dalszej serii doświadczeń przeprowadzono badania nad wpływem wyżej stosowanych czynników stymulujących na oddychanie skrawków i homogenizatów w środowisku zawierającym inny substrat do spalań aniżeli glikoza. Jak wynika z prac wielu autorów, w środowisku enzymatycznym tkanki mózgowej przy braku glikozy, kwas glutaminowy jest szybko utleniany do kwasu α -ketoglutazarowego i amoniaku, a dalej do CO_2 i H_2O , przy czym w procesach oddechowych w całości zastępuje glikozę [38, 11, 7]. Inkubację przeprowadzano w tym samym środowisku

solnym z tą różnicą, że zamiast glikozy dodawano kwasu glutaminowego w stężeniu 0,1 M, a całość środowiska doprowadzano do pH 7,4 za pomocą NaOH.

Tablica 5 podaje wyniki przeprowadzonych doświadczeń w warunkach powyżej opisanych. Z danych liczbowych widać, że oddychanie wobec kwasu glutaminowego jako jedyne go źródła węgla odbywa się w sposób

Tablica 5

Wartości Q_{O_2} dla skrawków i homogenizatów kory mózgowej w obecności różnych stymulatorów. Substrat utleniany — kwas glutaminowy

| Dodawana substancja | Skrawki | | | Homogenizaty | | |
|----------------------------|-----------|---|----------------------------|--------------|---|----------------------------|
| | Q_{O_2} | Zmiany Q_{O_2} w stosunku do kontroli | % stymulacji lub hamowania | Q_{O_2} | Zmiany Q_{O_2} w stosunku do kontroli | % stymulacji lub hamowania |
| H ₂ O | 8,1 | — | — | 7,1 | — | — |
| KCl 0,1 M | 10,3 | +2,2 | 27,1 | 7,1 | — | — |
| KBr 0,1 M | 10,1 | +2,0 | 24,7 | 6,6 | -0,5 | 7,0 |
| KJ 0,1 M | 10,3 | +2,2 | 27,7 | 5,6 | -1,7 | 23,9 |
| KF 0,1 M | 5,4 | -2,6 | 32,4 | 4,0 | -3,1 | 43,6 |
| DNP $2,5 \times 10^{-5}$ M | 10,1 | +2,0 | 24,7 | 9,1 | +2,0 | 28,1 |
| NH ₄ Cl 0,1 M | 5,3 | -2,7 | 32,4 | 5,3 | -1,8 | 25,3 |

niemal identyczny jak w obecności glikozy. W obecności glutaminianu sodowego sole potasowe chloru, bromu i jodu wywołują wzrost przemiany oddechowej w skrawkach kory mózgowej, wyrażający się wzrostem Q_{O_2} od 24 do 27%. To samo odnosi się do DNP. Natomiast fluorek potasowy i chlorek amonowy powodują wyraźne zahamowanie zużycia tlenu. W doświadczeniach, w których badano zużycie tlenu przez preparaty ze zniszczoną strukturą komórkową, sole potasowe bądź nie wpływały na szybkość i intensywność zużycia tlenu, bądź wywierały wpływ hamujący — a więc przeciwnie niż w doświadczeniach ze skrawkami. Działanie DNP i chlorku amonowego było takie samo jak w doświadczeniach ze skrawkami.

Tablica 6 przedstawia w zestawieniu udział badanych substancji na przemianę oddechową w różnych warunkach doświadczalnych. Na uwagę zasługuje fakt, że spośród przebadanych substancji jedynie DNP działa stale stymulująco na zużycie tlenu, niezależnie od charakteru badanego preparatu, jak i substancji utlenianej, natomiast działanie soli potasowych jest związane niezmiennie z zachowaną strukturą komórkową. Fluorek jako inhibitor glikolizy działa silnie hamująco na zużycie tlenu

nie tylko w środowisku zawierającym jako substrat glikozę, lecz również i w warunkach, w których substancją utlenianą jest kwas glutaminowy. W stosowanym stężeniu fluorek potasowy jest więc inhibitorem szerszego zespołu enzymów.

T a b l i c a 6

Zestawienie porównawcze wpływu przebadanych substancji na zużycie tlenu przez skrawki i homogenizaty kory mózgowej

| Preparat enzymatyczny | Substrat | C z y n n i k i | | |
|----------------------------|------------------|-------------------------------------|-----------------------------|---------------------------------|
| | | stymulujące zużycie tlenu | bez wpływu na zużycie tlenu | hamujące zużycie tlenu |
| Skrawki kory mózgowej | Glikoza | KCl, KBr, KJ, DNP, Kwas glutaminowy | — | KF, NH ₄ Cl |
| | Kwas glutaminowy | KCl, KBr, KJ, DNP | — | KF, NH ₄ Cl |
| Homogenizaty kory mózgowej | Glikoza | DNP, Kwas glutaminowy | KCl | KBr, KJ, KF, NH ₄ Cl |
| | Kwas glutaminowy | DNP | KCl | KBr, KJ, KF, NH ₄ Cl |

DYSKUSJA

Od dawna czynione są próby wyjaśnienia mechanizmu działania kationów alkalicznych w procesie stymulacji i oddychania tkanki mózgowej. W licznych pracach wykazywano [26, 5, 30, 14, 27, 24, 32, 33], że jony potasowe są aktywatorem znacznej liczby enzymów, szczególnie związanych z reakcjami transfosforylacji. W pracach tych, prowadzonych głównie przy użyciu niewielkich stężeń soli potasowej na wyizolowanych systemach enzymatycznych, starano się wykazać bezpośredni udział kationu w przebiegu wyosobnionej reakcji enzymatycznej [13].

McIlvain [21], na podstawie licznych swych prac, wiąże mechanizm działania wysokich stężeń jonów potasowych z różnicą stężeń potasu w środowisku wewnątrz- i zewnątrzkomórkowym, co z kolei związane jest z nakładem energii niezbędnej dla aktywnego transportu potasu przez błonę komórkową i zachowania właściwego stosunku stężeń po obu stronach błony. Jak wynika z danych niniejszej pracy, wzrost metabolizmu wyrażający się wzrostem Q_{O_2} spowodowany dodatkiem 0,1 M KCl odnosi się tylko do skrawków kory mózgowej, natomiast nie wpływa zupełnie na wzrost metabolizmu w preparatach ze zniszczoną strukturą komórkową (homogenizaty).

Tak więc otrzymane w niniejszej pracy wyniki, jak też i przytoczone wyniki innych autorów przemawiają raczej na korzyść koncepcji wiążącej stymulującą rolę wysokich stężeń jonu potasowego z nie zniszczoną strukturą komórkową.

Wprawdzie Abood i współpr. [1] przeprowadzając badania porównawcze otrzymywali również i w preparatach mitochondrialnych tkanki mózgowej efekt stymulacji oddychania pod wpływem prądu elektrycznego, lecz jak to zostało później wykazane przez McIlvaina [26] efekt ten jest zależny od rodzaju użytej do stymulacji elektrody. Natomiast zostało stwierdzone, że dezintegracja tkanki mózgowej znosi stymulujący efekt jonów potasowych w procesie syntezy acetylocholiny [16, 23, 28].

W badaniach nad mechanizmem działania jonów potasowych stosowany jest we wszystkich pracach chlorek potasowy, natomiast inne sole potasowe nie były brane pod uwagę. Przeprowadzone przez nas doświadczenia wykazały, że spośród 4 anionów grupy chlorowców, tylko anion tzw. „trucizn pasteurowskich“, które hamując anaerobową glikolizę pobudchowę — zarówno w preparatach skrawków kory mózgowej, jak i w homogenizatach.

Fluorek jest znanym inhibitorem glikolizy i hamuje oksydację glikozy przez preparaty tkanki mózgowej, natomiast nie wpływa na utlenianie mleczanu [9]. Fluorek jest więc głównie inhibitorem anaerobowego odcinka spalania glikozy. Jednakże — jak wynika z danych niniejszej pracy — w stosowanym stężeniu fluorek powoduje znaczne zahamowanie zużycia tlenu, niezależnie od tego, czy substratem utlenianym jest glikoza czy kwas glutaminowy. W swym działaniu różni się więc od grupy tzw. „trucizn pasteurowskich“, które hamując anaerobową glikolizę pobudzają zużycie tlenu w preparatach enzymatycznych.

O ile towarzyszące potasowi aniony chloru, bromu i jodu nie wywierają wyraźnego wpływu na stymulację oddychania skrawków kory mózgowej, o tyle w stosunku do homogenizatów aniony bromu i jodu działają hamująco na szybkość zużycia tlenu. Na podstawie przeprowadzonych badań trudno byłoby wyjaśnić mechanizm hamującego działania tych anionów.

Stymulacja oddychania skrawków kory mózgowej przez kwas glutaminowy jest znana od dawna [15, 37], jednakże mechanizm działania stymulującego nie jest do dzisiaj dokładnie wyjaśniony. Wpływ kwasu glutaminowego podobny jest do działania tzw. „trucizn pasteurowskich“ — związków pobudzających wybitnie aerobową glikolizę na gruncie normalnego lub podwyższonego zużycia tlenu.

Głównym przedstawicielem grupy tych związków jest 2,4-dwunitrofenol (DNP). DNP będąc wybitnym aktywatorem apyrazy powoduje

szybki rozpad ATP i obniżenie jego poziomu w środowisku enzymatycznym [17]. Podobnie dodatek kwasu glutaminowego powoduje obniżenie poziomu ATP — związku niezbędnego dla normalnego przebiegu anaerobowej glikolizy [31]. To obniżenie poziomu ATP wiąże się być może z jego wykorzystaniem w procesie syntezy glutaminy [2].

McIlvain przypuszcza natomiast, że stymulacja oddychania pod wpływem kwasu glutaminowego wiąże się z aktywną absorpcją przez komórki mózgowe jonu potasowego. Nasze obserwacje wykazują, że stymulacja oddychania spowodowana kwasem glutaminowym nie jest związana z nie zniszczoną strukturą komórkową, natomiast, podobnie jak DNP, pobudza procesy oddechowe zarówno w preparatach bezkomórkowych, jak też i w skrawkach kory mózgowej.

Już dawno, bo w roku 1932 Quastel i Wheatley [29] wykazali, że kwas glutaminowy jako jedyny substrat obecny w podłożu jest utleniany przez skrawki mózgowe świnki morskiej. Edelbacher i Wiss [10] stwierdzili następnie, że spośród wielu aminokwasów jedynie kwas L-glutaminowy może spełniać tę rolę, a na podstawie badania porównawczego różnych tkanek wykazano [7], że największą aktywność dezaminazy kwasu glutaminowego wykazuje tkanka mózgowa.

Jak wynika z naszych doświadczeń, nasilenie procesów oddechowych zarówno w homogenizatach, jak i w skrawkach kory mózgowej w obecności kwasu glutaminowego, jako jedynego substratu utlenianego — jest takie samo, jak w obecności glikozy. Jony potasowe w obecności kwasu glutaminowego, podobnie jak w obecności glikozy, pobudzają zużycie tlenu tylko przez skrawki mózgowe, nie wywierając wpływu lub powodując nieznaczną inhibicję (w zależności od towarzyszącego anionu) w preparatach bezkomórkowych kory mózgowej.

Fakt ten może świadczyć o tym, że niezależnie od utlenianego substratu, potasowa stymulacja oddychania wiąże się tylko z nie zniszczoną strukturą komórkową. W tym przypadku występuje również odmienne działanie stymulacji potasowej i stymulacji elektrycznej, przy której, jak to wykazał Waelsch [36], w obecności kwasu glutaminowego nie występuje wzrost zużycia tlenu.

Osobnego omówienia wymaga działanie jonu amonowego na procesy oddechowe tkanki mózgowej. Jak wykazał Weil-Malherbe [37], jon amonowy w stężeniu $33 \mu\text{M}$ wywiera wpływ stymulujący na procesy oddechowe podobnie jak jon potasowy. Z naszych doświadczeń wynika, że wpływ jonów amonowych na procesy oddechowe tkanki mózgowej jest nieco odmienny. W obecności glikozy — jako substratu utlenianego — obserwuje się po 30-minutowym podwyższeniu zużycia tlenu powolny spadek nasilenia procesów oddechowych, co w konsekwencji wyraża się spad-

kiem wartości Q_{O_2} w stosunku do prób kontrolnych o około 10%. Fakt ten, na podstawie przeprowadzonych doświadczeń, nie daje się w sposób dostatecznie umotywowany wyjaśnić.

Poza tym w preparatach ze zniszczoną strukturą komórkową działanie jonu amonowego jest analogiczne jak w skrawkach kory mózgowej. Działanie jonu amonowego jest więc niezależne od struktury komórkowej, w przeciwieństwie do działania jonów potasowych.

W obecności kwasu glutaminowego jako jedynego substratu, jon amonowy wywiera wyraźny wpływ hamujący na szybkość i natężenie procesów oddechowych, wyrażający się spadkiem Q_{O_2} od 25 do 35%, niezależnie od tego, czy pomiarów dokonywano w doświadczeniach ze skrawkami czy homogenizatami.

Próby wyjaśnienia mechanizmu działania jonu amonowego w nawiązaniu do obecnie otrzymanych wyników będą tematem następnej pracy.

STRESZCZENIE

Przeprowadzono badania nad wpływem różnych związków stymulujących proces oddychania tkanki mózgowej *in vitro*.

Badania prowadzono porównawczo na skrawkach i homogenizatach kory mózgowej białych myszek, w środowisku solnym, gdzie substancją utlenianą była glikoza lub kwas glutaminowy.

Wykazano, że 0,1 M roztwory KCl, KBr i KJ, z wyjątkiem KF, niezależnie od utlenianego substratu, powodują znaczny wzrost Q_{O_2} jedynie w doświadczeniach ze skrawkami kory mózgowej. Po zniszczeniu struktury komórkowej (homogenizacja) potasowa stymulacja oddychania nie występuje, natomiast towarzyszące potasowi aniony Br', J' i F' powodują zmniejszenie zużycia tlenu, niezależnie od utlenianego substratu. NH_4Cl w stężeniu 0,1 M powoduje zarówno w homogenizatach, jak i skrawkach w pierwszych 30 minutach inkubacji wzrost zużycia tlenu z następowym hamowaniem oddychania, co w sumie wyraża się zmniejszeniem wartości Q_{O_2} . 2,4-dwunitrofenol powoduje znaczny wzrost Q_{O_2} zarówno w skrawkach jak i homogenizatach kory mózgowej.

L I T E R A T U R A

- [1] Abood L. G., Gerard R. W., Ochs S., *Am. J. Physiol.* **171**, 134, 1952.
- [2] Ács G., Balazs R., Straub F. B., *Ukrain. Biochim. Žurn.* **25**, 17, 1953.
- [3] Ashford C. A., Dixon K. C., *Biochem. J.* **29**, 157, 1935.
- [4] Ayres P. J. W., McIlvain H., *Biochem. J.* **55**, 607, 1953.
- [5] Black S., *Arch. Biochem. Biophys.* **34**, 86, 1951.
- [6] Borkowski T., *Acta Physiol. Polon.* **5**, 614, 1954.

- [7] Copenhower J. H., Mc Shan W. H., Meyer R. K., *J. Biol. Chem.* **183** 73, 1950.
- [8] Dickens F., Greville G. D., *Biochem. J.* **29**, 1468, 1935.
- [9] Dickens F., Simer F., *Biochem. J.* **33**, 936, 1929.
- [10] Edlbacher S., Wiss O., *Helv. Chim. Acta* **27**, 1060, 1944.
- [11] Euler H., Adler E., Gunther G., Das N. B., *Hoppe-Seylers Zeitschrift* **254**, 61, 1938.
- [12] Ghosl J. J., Quastel J. H., *Nature* **174**, 28, 1954.
- [13] Hoppold F. C., Beechey R. B., *Biochem. J.* **64**, 33, 1956.
- [14] Kackmar J. F., Bayer P. O., *J. Biol. Chem.* **200**, 669, 1953.
- [15] Krebs H., *Biochem. J.* **29**, 1951, 1935.
- [16] Mann P. J. G., Tennenbaum M., Quastel J. H., *Biochem. J.* **33**, 822, 1939.
- [17] Marayuma K., *Arch. Biochem. Biophys.* **60**, 74, 1956.
- [18] Mc Ilvain H., *Biochem. J.* **50**, 132, 1950.
- [19] Mc Ilvain H., Augiano G., Cherchire J. D., *Biochem. J.* **50**, 12, 1951.
- [20] Mc Ilvain H., Gore M. R. R., *Biochem. J.* **50**, 24, 1951.
- [21] Mc Ilvain H., *Biochem. J.* **52**, 289, 1952.
- [22] Mc Ilvain H., *Biochem. J.* **53**, 403, 1953.
- [23] Mc Lenan H., Elliot K. A. C., *Arch. Biochem. Biophys.* **36**, 89, 1952.
- [24] Muntz J. A., *J. Biol. Chem.* **201**, 221, 1953.
- [25] Nachmanson D., John H. M., *J. Biol. Chem.* **158**, 157, 1945.
- [26] Narayanoswami A., Mc Ilvain H., *Biochem. J.* **57**, 663, 1954.
- [27] Pressman B. C., Lardy H. A., *J. Biol. Chem.* **197**, 547, 1952.
- [28] Quastel J. H., Tennenbaum M., Wheatley A. H. M., *Biochem. J.* **30**, 1668, 1936.
- [29] Quastel J. H., Wheatley A. H. M., *Biochem. J.* **26**, 725, 1932.
- [30] Stadtman E. R., *J. Biol. Chem.* **196**, 527, 1952.
- [31] Stern I. R., Eggleston L. V., Krebs H. A., Hems K., *Biochem. J.* **52**, 289, 1949.
- [32] Von Korff R. W., *J. Biol. Chem.* **203**, 265, 1953.
- [33] Von Korff R. W., Mc Pherson E. H., Gloman G. V., *J. Biol. Chem.* **209**, 151, 1954.
- [34] Waelsh H., *Advanc. Prot. Chem.* **6**, 299, 1951.
- [35] Waelsh H., *Advanc. Enzym.* **13**, 237, 1952.
- [36] Waelsh H. cyt. wg *Neurochemistry the Chemical Dynamics of Brain and Nerve*, Illinois U.S.A., 1955.
- [37] Weil-Malherbe H., *Biochem. J.* **32**, 2257, 1938.
- [38] Weil-Malherbe H., *Biochem. J.* **30**, 665, 1936.
- [39] Weil-Malherbe H., *Biochem. J.* **50**, XXIII, 1952.

RESEARCH ON THE RESPIRATION OF BRAIN TISSUE *IN VITRO*

Summary

The investigations concerned the effects of various compounds stimulating respiration of brain tissue *in vitro*.

The experiments were run, with a view to comparing them, on slices and homogenates of the cerebral cortex of white mice in solutions of

salts, with glucose or glutamic acid the substance oxidized. It was demonstrated that irrespective of the substrate oxidized 0.1 M solutions of KCl, KBr and KJ, but not KF, caused a notable Q_0 rise merely in experiments with slices of cerebral cortex. When the cell structure was destroyed (homogenization), potassium failed to stimulate respiration, while the anions Br' , J' and F' accompanying potassium, caused a considerable reduction in oxygen uptake irrespective of the substrate oxidized. Within the first 30 min. of incubation, 0.1 M concentrations of NH_4Cl caused in homogenates as well as slices an increase in oxygen uptake and a consequent inhibition of respiration which was eventually expressed in a reduction of the Q_{O_2} value. A considerable rise in Q_{O_2} was called forth in both slices and homogenates by 2,4-dinitrophenol.

Otrzymano 9.10.57 r.

Z. LATALLO, A. M. DANCEWICZ, T. MUSIAŁOWICZ

EFFECT OF IONIZING RADIATION ON THE BLOOD CLOTTING *IN VITRO*

*Institute of Nuclear Research, Department of Health Protection and
Institute of Haematology, Laboratory of Clinical Biochemistry, Warszawa,
Chief: doc. dr E. Kowalski*

Haemorrhagic diathesis is one of the main symptoms of ionizing radiation injury. It may sometimes be the immediate cause of death.

The mechanism of this diathesis is not exactly known [26]. Sources of our knowledge concerning the subject are: observations on casualties of atomic explosions, laboratory accidents, and some experimental works performed on laboratory animals [7, 8, 9, 11, 20, 21, 29].

It is generally admitted that the following factors are important in pathogenesis of bleeding: thrombocytopenia, capillary fragility, and production of a heparinlike anticoagulant [1], or antithromboplastin anticoagulant [25]. Decrease of antiplasmin activity as well [14] may play a role in this syndrome.

This work was carried out in order to examine the influence of ionizing radiation on blood clotting factors *in vitro*. Numerous papers on this subject include the papers by Rieser [23] and Rieser and Rutman [24] dealing with the influence of radiation on fibrinogen, and observations of Clifton [5] on inactivation *in vitro* of plasmin by X-rays.

MATERIALS

1. Human blood was taken from donors by venipuncture from the cubital vein, immediately mixed with sodium citrate (1 part of 3.8% sodium citrate + 9 parts of blood), and subsequently centrifuged for 10 min. at 1 000 rpm (platelet-rich plasma) or at 3000 rpm for 20 min. (platelet-poor plasma).

2. The platelets were obtained by differential centrifugation and several rinsings with 0.9% NaCl. Homogenous suspensions containing

between 200 000 and 300 000 plateles per mm.³ were used in investigations.

3. Antihæmophilic globulin (AHG) was prepared from bovine plasma according to the method of Bidwell [3].

4. Christmas factor was obtained from old human serum according to the method of Wagner *et al.* [27].

5. Bovine fibrinogen containing plasminogen was obtained by using the method of Astrup and Müllertz [2].

6. Bovine fibrinogen devoid of plasminogen was obtained according to Kekwick *et al.* [12].

7. Thrombin was prepared by the modified method of Alexander [16].

8. Human plasminogen was obtained according to Kline's modified method from fraction III of Cohn [13].

9. Human plasmin from III₃ Cohn's fraction was purified by precipitation at the isoelectric point.

10. Streptokinase or "Distreptase" — from „Warszawska Wytwórnia Surowic i Szczepionek" — Warsaw.

11. Tissue thromboplastin — suspension of rabbit brain.

12. Veronal buffer, pH 7.3.

13. Solution of 0.025 M CaCl₂.

METHODS

1. Samples of plasma or isolated blood clotting components were irradiated with X-rays in open glass vessels 2.5 cm. in diameter (liquid layer thickness, about 0.5 cm.). The source of radiation was a "Siemens Stabilipan" 250 kV/20 mA apparatus with an X-ray tube of the TR-220 d type. The specimens were irradiated at 180 kV and 20 mA with a 0.5 Cu filter (high voltage generator of Greinahers system). Doses of X-rays in air were estimated by using a "Siemens Universal Dosismesser" dosimeter with a thimble ionization chamber. Specimens were placed at distance of 25 cm., measured from the focus of the X-ray tube to the specimen surface placed on a line parallel to the axis of the central beam. Under the conditions the dose was 222 r/min. The required radiation dose was obtained by changing time of exposure. During exposition of the samples tested, control samples were stored at the same temperature. All coagulation tests were performed as soon as possible after irradiation, using a water bath of 37°C.

2. Plasma recalcification time was measured by adding 0.2 ml. of calcium chloride 0.025 M to 0.2 ml. of plasma.

3. The thromboplastic activity of platelets, AHG, and Christmas factor were determined with the aid of the thromboplastin generation test as modified by Duckert *et al.* [6].

4. Prothrombin time was determined by the one-stage method of Quick [22].

5. Factor V level was determined by the modified one-stage method of Wolf [28].

6. Factor VII level was determined by the method of Koller *et al.* [15].

7. Thrombin time was determined by measuring the clotting time of 0.4 ml. of plasma or 0.25% fibrinogen solution after addition of 0.1 ml. of thrombin (2.5 or 5.0 U/ml.).

8. Fibrinolysis was measured at 25° in 8 mm. diameter test-tubes.

RESULTS

A. Influence of irradiation on the recalcification time was studied in 5 samples of platelet-rich plasma and in 7 samples of platelet-poor plasma. The results are shown in Tables 1 and 2. It will be seen that

Table 1

*Influence of ionizing radiation on the recalcification time of platelet-rich plasma *)*

| Number of sample | Radiation dose (roentgens) | | |
|------------------|----------------------------|-------|--------|
| | 0 | 6 600 | 13 200 |
| 1 | 1.38 | 1.48 | 1.48 |
| 2 | 2.19 | 2.15 | 2.25 |
| 3 | 2.51 | 2.28 | 2.78 |
| 4 | 1.75 | 1.80 | 1.76 |
| 5 | 2.43 | 2.28 | 2.13 |
| Average | 2.05 | 2.00 | 2.08 |

Table 2

*Influence of ionizing radiation on the recalcification time of platelet-poor plasma *)*

| Number of sample | Radiation dose (roentgens) | | |
|------------------|----------------------------|-------|--------|
| | 0 | 6 600 | 13 200 |
| 1 | 2.40 | 2.50 | 3.00 |
| 2 | 3.19 | 3.38 | 4.20 |
| 3 | 3.05 | 3.29 | 3.29 |
| 4 | 2.60 | 2.72 | 3.10 |
| 5 | 2.82 | 3.20 | 3.50 |
| 6 | 2.83 | — | 3.70 |
| 7 | 2.81 | 3.14 | 3.20 |
| Average | 2.84 | 3.04 | 3.43 |

*) These are average results of 3 tests in each plasma sample

*) These are average results of 3 tests in each plasma sample

the recalcification time of platelet-rich plasma is not modified by radiation in doses of 6 600 and 13 200 r. Analogical doses slightly extend recalcification time in platelet-poor plasma.

B. In order to ascertain more accurately the influence of ionizing radiation on the first coagulation stage, purified preparation of AHG, Christmas factor and platelets were exposed to X-rays. The irradiated preparations were subsequently used for assays in thromboplastin genera-

tion tests. The results of assays run with 3 series of preparations are presented in Table 3. It will be seen from the table that thromboplastin generation is slightly impaired by irradiation.

Table 3

Comparison of thromboplastic activity of separately irradiated components of the system

| Irradiated components | | Radiation dose (roentgens) | | |
|-------------------------------|-----------------|-----------------------------------|-------|--------|
| | | 0 | 6 600 | 13 200 |
| Platelets | | 0 | 6 600 | 13 200 |
| Antihæmophilic globulin | | 0 | 6 600 | 13 200 |
| Christmas factor | | 0 | 6 600 | 13 200 |
| No. of series of preparations | Incubation time | Thromboplastic activity (seconds) | | |
| I | 2' | 21.5 | 29.0 | 33.0 |
| | 4' | 15.5 | 20.0 | 21.6 |
| | 6' | 17.0 | 19.0 | 18.0 |
| II | 2' | 15.4 | 16.0 | 19.2 |
| | 4' | 15.8 | 16.4 | 18.4 |
| | 6' | 16.8 | 17.6 | 20.0 |
| III | 2' | 29.0 | 34.0 | 38.0 |
| | 4' | 16.0 | 22.0 | 26.0 |
| | 6' | 16.0 | 18.0 | 20.0 |
| Average | 2' | 22.0 | 26.3 | 30.1 |
| | 4' | 15.8 | 19.4 | 22.0 |
| | 6' | 15.6 | 18.2 | 19.3 |

Table 4

Thromboplastic activity (in seconds) of a system) in which only one component was irradiated*

| Irradiated Components | Radiation dose (roentgens) | | | | | | |
|-------------------------|----------------------------|-------|--------|-------|--------|-------|--------|
| | 0 | 6 600 | 13 200 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Platelets | 0 | 6 600 | 13 200 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Antihæmophilic globulin | 0 | 0 | 0 | 6 600 | 13 200 | 0 | 0 |
| Christmas factor | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6 600 | 13 200 |
| I **) | 15.5 | 20.5 | 21.5 | 17.5 | 18.0 | 20.0 | 20.5 |
| II | 15.8 | 19.0 | 20.5 | 15.0 | 16.4 | 16.0 | 17.0 |
| III | 16.0 | 16.8 | 16.2 | 15.4 | 15.5 | 20.8 | 25.5 |
| Average | 15.8 | 18.7 | 19.4 | 15.9 | 16.6 | 18.9 | 20.7 |

*) after 4 min. incubation

**) No. of series

Analagical experiments in which merely one component was irradiated are presented in Table 4. It will be noted that ionizing radiation diminishes only the Christmas factor and platelet thromboplastic activity, while AHG activity is insignificantly impaired.

C. Effects of ionizing radiation on the second coagulation stage (conversion of prothrombin) were investigated by measuring one-stage and accelerator clotting times. Table 5 presents ranges of the times before and after irradiation of 8 samples of plasma. It is evident that the ionizing radiation does not affect this coagulation stage.

Table 5

Influence of ionizing radiation on the one-stage prothrombin time and levels of factors V and VII

| Quality of determination | Radiation dose (roentgens) | | | | | |
|--------------------------|----------------------------|---------|-----------|---------|-----------|---------|
| | 0 | | 6 600 | | 13 200 | |
| | from-to | average | from-to | average | from-to | average |
| Prothrombin time | 13.5—16.0 | 14.6 | 13.6—18.0 | 14.9 | 12.5—18.0 | 14.8 |
| Factor V | 19.0—32.4 | 23.4 | 18.0—37.8 | 25.1 | 19.8—37.8 | 25.7 |
| Factor VII | 20.0—27.8 | 24.9 | 19.0—34.8 | 25.5 | 21.0—36.0 | 26.2 |

D. Influence of ionizing radiation on the thrombin time of plasma was examined on 8 samples by using two thrombin concentrations. Four samples were tested with 2.5 U/ml. and four with 5 U/ml. (Table 6). The

Table 6

Influence of ionizing radiation on the thrombin time of plasma

| No. | Concentration of thrombin 2.5 U/ml. | | | No. | Concentration of thrombin 5.0 U/ml. | | | | |
|---------|-------------------------------------|-------|--------|------|-------------------------------------|-------|--------|------|------|
| | Radiation dose (roentgens) | | | | Radiation dose (roentgens) | | | | |
| | 0 | 6 600 | 13 200 | | 0 | 6 600 | 13 200 | | |
| | Coagulation time (min.) | | | | Coagulation time (min.) | | | | |
| 1 | 0.44 | 0.49 | 0.54 | 5 | 0.93 | 1.10 | 1.20 | | |
| 2 | 0.50 | 0.54 | 0.67 | 6 | 0.76 | 1.00 | 1.04 | | |
| 3 | 0.42 | 0.52 | 0.61 | 7 | 1.03 | 1.28 | 1.48 | | |
| 4 | 0.44 | 0.50 | 0.54 | 8 | 0.90 | 1.00 | 1.24 | | |
| Average | | 0.45 | 0.51 | 0.60 | Average | | 0.90 | 1.10 | 1.24 |

thrombin time of the irradiated samples of plasma was extended. A similar effect was observed when purified fibrinogen was used instead of plasma.

E. For investigating the fibrinolytic system the two-stage scheme of plasminogen was accepted [17, 18]. The assay was performed at 25° because plasmin is more stable at this temperature [16].

Table 7
Influence of ionizing radiation on
spontaneously active plasmin

| Radiation dose (r) | Time of lysis (min.) |
|--------------------|----------------------|
| 0 | 8.25 |
| 1 100 | 8.25 |
| 3 300 | 8.25 |
| 13 200 | 8.25 |

a) Spontaneously active human plasmin was examined in the system 0.5 ml. plasmin + 0.1 ml. thrombin + 0.4 ml. 0.125% of bovine fibrinogen solution. As is shown in Table 7 plasmin activity does not change after irradiation.

b) Purified plasminogen in different concentrations was irradiated, and fibrinolytic activity was determined, after streptokinase activation. No significant differences in activity were obtained. (Table 8).

Table 8
Influence of ionizing radiation on
plasminogen *)

| Concentration of plasminogen %% | Time of lysis (min.) after radiation dose (roentgens) | |
|---------------------------------------|--|--------|
| | 0 | 13 200 |
| 0.08 | 5.00 | 5.00 |
| 0.04 | 9.25 | 9.25 |
| 0.02 | 23.00 | 22.00 |
| 0.01 | 75.00 | 62.00 |

*) Plasminogen was measured after streptokinase activation. Fibrinogen purified by the method of Kekwick *et al.* [12] (free of plasminogen)

c) Another assay involving the same plasminogen preparation consisted in testing its ability to react with bovine plasminogen. Bovine plasminogen was contained in the unpurified fibrinogen used in assays [2]. The idea of this test is based on the well known experiment

Table 9

Influence of ionizing radiation on proactivator activity of human plasminogen (A) and on crude bovine fibrinogen containing plasminogen (B)

| Irradiated component | 0.005% solution of human plasminogen (A) | Crude bovine fibrinogen containing plasminogen (B) |
|----------------------------|--|--|
| Not irradiated component | Crude bovine fibrinogen containing plasminogen | 0.005% solution of human plasminogen |
| Radiation dose (roentgens) | Time of lysis (min.) | Time of lysis (min.) |
| 0 | 9.50 | 9.30 |
| 1 100 | 9.00 | 9.30 |
| 3 300 | 9.00 | 9.30 |
| 13 200 | 9.00 | 9.30 |

*) Time of lysis measured after activation with streptokinase and addition of thrombin.

of Astrup and Müllertz, who successfully demonstrated that a mixture of human and bovine plasminogen is endowed with more potent fibrinolytic properties than either of the preparations alone. It will be seen from Table 9 that ionizing radiation has no effect on this system. Low concentration of human plasminogen (0.005%) permits of measuring merely the so-called proactivator activity. It was also found, contrary to the statement by Clifton, that irradiation does not destroy bovine plasminogen contained in unpurified fibrinogen and fibrin (Astrup's plates method).

DISCUSSION

It is evident from the above findings that ionizing radiation in doses of up to 13 200 roentgens exerts a rather slight effect on blood clotting components *in vitro*. It involves a decrease of the thromboplastic activity of platelets and Christmas factor, and extension of the thrombin clotting time of fibrinogen. The last finding agrees with the statement of Rieser and Rutman who worked with a 500 r radiation dose. These authors suggest that the effect of irradiation consists in breaking away of low-molecular nitrogen substance from the fibrinogen molecule, with subsequent inhibition of coagulation of fibrinogen by thrombin. This effect may also be explained by the formation of the thrombin inhibitor derived from fibrin as described by Niewiarowski and Kowalski [19]. In this connection, it may be of interest to quote the finding of Burstein [4] who noted H_2O_2 to exert a similar effect.

The negative findings of this work confirm the generally shared view that injurious effects of ionizing radiation on the haemostatic system

may be due to damage suffered by living cells and capillary walls and not to immediate impairment of blood clotting proteins.

It is worth noting that such labile proteins of the clotting system as factor V, AHG, and plasmin, are not sensitive to ionizing radiation.

SUMMARY

The authors investigated *in vitro* the behaviour of the blood clotting system after irradiation of its components with X-rays in doses of up to 13 200 r. Recalcification time proved slightly prolonged in irradiated platelet-poor serum, and irradiation of platelets and Christmas' factor impaired thromboplastic functions.

However, no appreciable effects of X-rays on the second clotting phase were revealed. The longer prothrombin time noted is consistent with Rieser's observations [23] relating to prolonged clotting time of pure fibrinogen. Inactivation of plasminogen noted by Clifton [5] was not confirmed. Neither were differences revealed in the behaviour of the fibrinolytic system as before and after irradiation.

LITERATURA

- [1] Allen J. G., Sanderson A., Milham M., Kirschon A., Jacobson L. O., *J. Exp. Med.*, **87**, 71, 1948.
- [2] Astrup T., Müllertz S., *Arch. Biochem. Biophys.* **40**, 346, 1952.
- [3] Bidwell E., *Brit. J. Haem.* **1**, 35, 1955.
- [4] Burstein M., Lewi S., Guinard A., *Revue d'Hematol.* **11**, 503, 1956.
- [5] Clifton E. C., Grossi C. E., *Cancer* **8**, 1146, 1955.
- [6] Duckert F., Fluckiger P., Isenschmidt H., Matter M., Vogel-Meng J., Koller F., *Acta Haemat.*, **12**, 197, 1954.
- [7] Holden W. D., Cole J. W., Portmann A. F., Storaasli J. P., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **70**, 535, 1949.
- [8] Jacobs G. J., Cronkite E. P., White S. G., *Am. J. Physiol.* **170**, 390, 1952.
- [9] Jackson D. P., Cronkite E. P., Jacobs G. J., Behrens C. F., *Am. J. Physiol.* **169**, 208, 1952.
- [10] Jackson D. P., Cronkite E. P., Le Roy G. W., Halpern B., *J. Lab. Clin. Med.* **39**, 449, 1952.
- [11] Jacobson L. O., in Hollaender A., *Radiation Biology* vol. I. p. 1029—1090, N. Y., 1954.
- [12] Kekwick R. A., Mackay M. E., Nance M. H., Record B. R., *Biochem. J.* **60**, 671, 1955.
- [13] Kline D. L., *J. Biol. Chem.* **204**, 949, 1953.
- [14] Kocholaty W., Ellis W. W., Jensen H., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **80**, 36, 1952.
- [15] Koller F., Loeliger A., Duckert F., *Acta Haemat.* **6**, 1, 1951.
- [16] Kowalski E., Latałło, Z., Niewiarowski S., *Acta Biochim. Polon.* **3**, 87, 1956.

- [17] Latallo Z., *Recent Investigation on the Activation of Plasminogen, Proceedings of the 6th Congress of the European Hematological Society*, Copenhagen, Aug., 1957 (Karger in press).
- [18] Müllertz S., *Biochem. J.* **61**, 424, 1955.
- [19] Niewiarowski S., Kowalski E., *Bull. Acad. Polon. Sci.* **5**, 169, 1957.
- [20] Patt H. M., Brues A. M., in A. Hollaender, *Radiation Biology*, vol. 1, 959—1028, N. Y., 1954.
- [21] Penick G. D., Cronkite E. P., Godwin I. D., Brinkhous K. M., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **78**, 732, 1951.
- [22] Quick A. J., *The Physiology and Pathology of Hemostasis*, Henry Kimpton, London, 1951.
- [23] Rieser P., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **91**, 654, 1956.
- [24] Rieser P., Rutman R. J., *Arch. Bioch. Biophys.* **66**, 247, 1957.
- [25] Tocantins L. M., in Flynn J. E., *Blood Clotting and Allied Problems*, New York, 247—279, 1952.
- [26] Upton A. C., *Blood* **10**, 1156, 1954.
- [27] Wagner R. H., Braunan W. M. jr., Brinkhous K. M., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **89**, 226, 1955.
- [28] Wolf P. Z., *J. Clin. Path.* **6**, 34, 1953.
- [29] Vetter H., Vinazzer H., *Blood* **9**, 163, 1954.

WPLYW PROMIENIOWANIA JONIZUJĄCEGO
NA UKŁAD KRZEPNIĘCIA *IN VITRO*

Streszczenie

Badano zachowanie się układu krzepnięcia *in vitro* po napromienowaniu jego składników dawkami promieniowania rentgenowskiego do 13 200 r. W zakresie stosowanych dawek wykazano niewielkie wydłużenia czasu rekalcynacji w napromienowanym osoczu ubogopłytkowym oraz upośledzenie czynności tromboplastycznej po napromienowaniu płytek i czynnika Christmаса.

Nie wykazano natomiast wyraźnego wpływu promieni X na drugą fazę krzepnięcia. Stwierdzone wydłużenie czasu trombinowego potwierdza obserwację Riesera [23] o przedłużeniu czasu krzepnięcia czystego fibrynogenu.

Nie potwierdzono obserwowanej przez Clifftona [5] inaktywacji plazminogenu.

Nie stwierdzono również różnic w zachowaniu się układu fibrynolitycznego przed i po napromienowaniu.

Otrzymano 24.12.57 r.

J. JANICKI, J. SKUPIN

ROZDZIAŁ CHROMATOGRAFICZNY ELEKTROOBOJĘTNYCH I ELEKTRODODATNICH CZYNNIKÓW WITAMINU B_{12} I B_{12p} PO ELEKTROFOREZIE

*Z Katedry Technologii Rolnej Wyższej Szkoły Rolniczej w Poznaniu
Kierownik Katedry: prof. dr J. Janicki*

Czynniki o aktywności witaminu B_{12} (nukleotydocyjanokobalamina z 5, 6-dwumetylobenzimidazolem) stanowią dużą grupę związków chemicznych. Spotyka się połączenia o strukturze pełnej nukleotydocyjanokobalaminy i strukturze niepełnej, nie zawierające części nukleotydowej. Różnią się one pod względem biologicznym, mikrobiologicznym i fizyko-chemicznym. Związki te mogą częściowo występować w łańcuchu przemian biosyntezy, jak również niektóre z nich stanowią produkty rozpadu.

Według danych w literaturze znany jest szereg związków elektroobojętnych z grupy nukleotydocyjanokobalaminy (Tabl. 1). W witaminie B_{12} zasadą nukleotydową jest 5, 6-dwumetylobenzimidazol. W związkach pokrewnych — innych kobalaminach — stwierdzono obecność szeregu pochodnych purynowych utworzonych na drodze mikrobiologicznej biosyntezy.

Przy identyfikacji tych związków duże usługi oddają metody analityczne, szczególnie zaś technika chromatograficzna na bibule, na kolumnach i metody elektroforetyczne.

Przy chromatografii kolumnowej stosuje się różne adsorbenty. Między innymi Brown i współpracownicy [2] zastosowali ziemię okrzemkową, a w Laboratorium Bernhauer'a proszek celulozowy oraz krzemionkę.

Friedrich i Bernhauer zastosowali chlorofenol i inne pochodne fenolowe do rozdzielania substancji ze ścieków miejskich [13, 14], jak również proszek celulozowy [15].

Już od samego początku chromatografia bibułowa odgrywa doniosłą rolę przy rozdziale i identyfikacji nowych czynników, podobnych do witaminu B_{12} . Najczęściej stosowanym tutaj rozpuszczalnikiem jest II-rz. butanol nasycony wodą. Kon (por. Holdsworth [17]) do rozdziału czynni-

Tablica 1

Kobalaminy elektroobojętne przy pH 2,7 (metodą Holdsworth'a, [18])

| Nazwa witaminu | Zasada nukleotydomowa | U w a g i | Literatura |
|------------------------------------|--------------------------------|--|------------------------------|
| Witamin B_{12} | 5,6-dwumetylobenzimidazol | syntetyzowana przez: <i>P. shermanii</i> , <i>E. coli</i> , <i>C. diphtheriae</i> | [24, 8, 10, 11, 1, 4, 27] |
| Witamin B_{12III} (czynnik I) | 5-hydroksybenzimidazol | wyodrębniony po raz pierwszy w 1953 r. z przefermentowa- nych ścieków miejskich | [12, 2] |
| Czynnik E | nie zbadana | wykryty w 1955 roku | [2] |
| Czynnik F | danych nie publikowano | wykryty przez Holdsworth'a | [2, 28, 6, 3] |
| Czynnik G | hipoksantyna | otrzymany przez deza- minację pseudowita- minu B_{12} | [2, 28, 6, 3] |
| Czynnik H | 2-metylohipoksantyna | otrzymany przez deami- nację czynnika A z 2-metyloadeniną | [2, 28, 6, 3] |
| Nowy czynnik B_{12} | 2-metylmerkaptoadeni- nina | ze szlamów fermenta- cyjnych | [16] |
| Sztuczna kobala- mina | 5,6-dwuchlorobenzimi- dazol | otrzymana przy użyciu <i>E. coli</i> i <i>Strept. griseus</i> | [10, 11, 4, 7] |
| Sztuczna kobala- mina | 2,3-naftimidazol | otrzymana przy użyciu <i>E. coli</i> i <i>Strept. griseus</i> | [7, 5] |

ków podobnych do witaminu B_{12} zastosował następujące układy rozpuszczalników:

II-rz. butanol nasycony wodą z dodatkiem 1% obj/obj. kwasu octowego i z dodatkiem śladów cyjanków,

II-rz. butanol nasycony wodą z dodatkiem 1% obj/obj. 25% amoniaku i z dodatkiem śladów cyjanków na bibule Whatman nr 1.

Friedrich i współpracownicy [15] stosowali jako rozpuszczalniki: nasycony wodą II-rz. butanol wysycony nadchlorańcem potasu z dodatkiem śladów cyjanku sodu oraz nasycony wodą II-rz. butanol z dodatkiem 0,18% trójchlorooctanu sodu. Dodatni wpływ nadchlorańca potasu dodawanego do rozpuszczalnika na rozdział czynnika A, pseudowitaminu B_{12} , witaminu B_{12III} i witaminu B_{12} wykazali Friedrich i Bernhauer [14]. Oprócz nadchlorańca potasu i trójchlorooctanu sodu stosuje się również w tym samym celu sól sodową kwasu kamforowego i czterofenyloboran sodowy [15].

Metodę elektroforetyczną do badań nad związkami kobalaminowymi wprowadził Holdsworth [17]. W zależności od charakteru elektrycznego

cząsteczki kobalaminy rozdzielają się w polu elektrycznym na bibule Whatman nr 3 przy zastosowaniu jako elektrolitu kwasu octowego z dodatkiem cyjanku sodu (pH 2, 7).

Metodą jonoforezy w N-kwasie octowym przy napięciu 8—10 v/cm rozdzielano składniki C_1 i C_2 od obojętnych: E, F, G, H oraz witaminu B_{12} i B_{12III} . Maksymalny rozdział czynników z grupy B_{12} można osiągnąć w elektrolicie o niskiej sile jonowej i niskim pH [9].

Kon rozdzielał kobalaminy jonoforetycznie metodą Holdsworth'a [17] na czynniki zasadowe, kwaśne i obojętne (te ostatnie stanowiły jedną frakcję). Kobalaminy obojętne przeprowadzał w kompleksy dwucyjanowe lub cyjanowe, które rozdzielał chromatograficznie przy użyciu wyżej wspomnianych rozpuszczalników. Elektroobojętne zachowanie się niektórych kobalamin przy pH 2,7 tłumaczy się skompensowaniem dodatniego ładunku kobaltu w tych warunkach ujemną grupą silnego kwasu fosforowego, dysocjującego jeszcze przy tym pH .

Celem identyfikacji czynników w mieszaninie kobalamin, Holdsworth [18, 17] zaleca technikę kombinacyjną — w pierw jonoforezę w 1 N-kwasie octowym z dodatkiem cyjanku potasu przez 16 godzin przy napięciu 8 v/cm, a następnie chromatografię w mieszaninie II-rz. butanolu z kwasem octowym i wodą z dodatkiem cyjanku potasu.

Przy chromatografii do rozpuszczalników, a przy jonoforezie do elektrolitu dodaje się cyjanku potasu w celu całkowitej konwersji kobalamin w formę cyjanową. Pod wpływem bowiem ciepła lub światła oraz przy pH niższym od 6, czynniki z grupy B_{12} tracą grupy cyjanowe tworząc formę hydroksy i dlatego jednorodne indywiduum może dać w tych warunkach dwie plamy odpowiadające tym dwóm formom.

Pawelkiewicz i Zodrow [26] badając mechanizm tworzenia się kobalamin u *Corynebacterium diphtheriae* stwierdzili, że elektroobojętna frakcja otrzymana po rozdziale związków kobalaminowych z biosyntezy, poddana chromatografii bibulowej, rozdziela się na co najmniej cztery substancje z przewagą dwóch kobalamin [27]. Prawdopodobnie kobalaminy tej frakcji są różnymi deznukleotydowymi estrami fosforowymi witaminu B_{12p} (czynnika B).

CZĘŚĆ DOSWIADCZALNA

Założeniem niniejszej pracy było opracowanie warunków chromatograficznego rozdziału frakcji elektroobojętnych i elektrododatnich z grupy witaminu B_{12} . Opracowano metodę rozdziału kobalamin przy pomocy chromatografii bibulowej. Jako materiał doświadczalny stosowano elektroobojętne i elektrododatnie (przy pH 2, 7) kobalaminy — poelektrofo-

retyczne frakcje z grupy witaminu B_{12} z fermentacji metanowej i propionowej, oraz witaminu B_{12p} (deznukleotydocyjanokobalaminy) [22] z bakterii kwasu propionowego (*Propionibacterium shermanii*) [20, 21]. Kobalaminy wydobywano ze środowiska bakteryjnego metodami uprzednio publikowanymi [23]. Elektroforezę przeprowadzano metodą Holdsworth'a [17] przy zastosowaniu buforu o pH 2,7.

W pracy niniejszej, po wysuszeniu rozwiniętego jonoforogramu, badane frakcje eluowano wodą destylowaną i ekstrakty odparowywano na łaźni wodnej pod zmniejszonym ciśnieniem do sucha. Następnie rozpuszczano w określonej ilości wody destylowanej.

W odróżnieniu od spotykanych w literaturze metod, chromatogramy rozwijano przez 3—6 dni w temperaturze 27°. To przedłużenie czasu rozdziału chromatograficznego, jak również zastosowanie wyższej temperatury od pokojowej pozwoliło rozdzielić prostą techniką chromatografii jednokierunkowej i krążkowej badane poelektroforetyczne frakcje witaminu B_{12} na szereg czynników.

W przypadku witaminu B_{12p} eluat po odparowaniu do sucha oczyszczano jeszcze od nukleotydocyjanokobalaminy przepuszczając roztwór kobalamin w 85% acetonie przez kolumnę z tlenkiem glinu i eluując witamin B_{12p} tymże rozpuszczalnikiem [25].

Przy rozdzielach chromatograficznych stosowano technikę wstępującą i spływową, jak również posługiwano się metodą chromatografii krążkowej. Używano bibuły Whatman nr 1 stosując pasma szerokości 5 cm, a przy metodzie krążkowej — krążki bibuły o średnicy 14 cm. Próby nanoszono mikropipetą na linię startową w kształcie wąskich pasm.

Przy chromatografii krążkowej próby nanoszono na okrąg o średnicy 1,5 cm. Krążek bibuły umieszczano między dwoma okrągłymi szklami, przy czym języczek wycięty w bibule chromatograficznej przechodzący przez otwór dolnej płyty zanurzony był w naczyniu z rozpuszczalnikiem, które z kolei umieszczano w większym naczyniu, na którym spoczywały płyty.

Przy metodzie spływowej do końców chromatogramów przyszywano wálki z bibuły wchłaniające rozpuszczalnik. Jako komory chromatograficzne używano cylindry miarowe o pojemności 2l ścięte u góry i przykryte doszlifowanymi krążkami szklanymi.

Stosowano dwa systemy rozpuszczalników opisane przez Brown'a i współpracowników [2]:

A) II-rz. butanol/ $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{H}_2\text{O}/5\%$ roztwór KCN (w stosunkach objętościowych 100 : 1 : 50 : 0,25),

B) II-rz. butanol/amoniak $d = 0,88/\text{H}_2\text{O}/5\%$ roztwór KCN (w stosunkach objętościowych jak wyżej).

Pierwszy z tych rozpuszczalników był również stosowany przez Rabek'a i współpracowników przy identyfikacji nowych faktorów z grupy kobalamin w koncentratkach otrzymanych ze szlamów pofermentacyjnych* [29]. Warstwą wodną wysycano komorę chromatograficzną, w której umieszczano dodatkowo pasmo bibuły koncentrycznie przy ścianie cylindra, w celu lepszego wysycenia komory.

Analizę chromatograficzną wykonano w temperaturze 27° . Uzyskano rozdziały kobalamin na szereg frakcji. Część głównych frakcji witaminu B_{12} i B_{12p} z poszczególnych chromatogramów po rozdziale eluowano wodą, zagęszczano na łaźni wodnej pod zmniejszonym ciśnieniem i ponownie chromatografowano przez 72 godziny w analogicznych warunkach. Nie stwierdzono jednak dalszego rozdziału badanych frakcji.

Optymalne warunki czasowe rozdziału chromatograficznego przy temperaturze 27° , jak również ilości otrzymanych frakcji po rozdziale dla stosowanych poszczególnych technik chromatografowania zawierają tablice 2 i 3.

Metoda chromatografii krążkowej okazała się mniej selektywna w naszych badaniach. Uzyskane wyniki ilustrujemy tylko niektórymi zdjęciami chromatogramów z maksymalnym efektem rozfrakcjonowania w opisanych warunkach.

Tablica 2

Ilość frakcji otrzymanych w wyniku rozdziału chromatograficznego preparatów witaminu B_{12} i B_{12p} po elektroforezie oraz czas rozdziału w dniach metodą wstępującą i spływową

| Rodzaj frakcji witaminu B_{12} i B_{12p} po elektroforezie | Układ kwaśny ¹⁾ | | | | Układ zasadowy ²⁾ | | | |
|--|-----------------------------|------|----------|---|------------------------------|---|----------|---|
| | C h r o m a t o g r a f i a | | | | | | | |
| | wstępująca | | spływowa | | wstępująca | | spływowa | |
| | F*) | C**) | F | C | F | C | F | C |
| B_{12} ze ścieków, miejskich, krystalizowany | 4 | 5 | 4 | 3 | 7 | 6 | 4 | 4 |
| B_{12} ze ścieków miejskich, nie krystalizowany | 5 | 5 | 6 | 3 | 9 | 6 | 4 | 4 |
| B_{12} z fermentacji propionowej, nie krystalizowany | 5 | 5 | 3 | 3 | 8 | 6 | 3 | 4 |
| B_{12p} po elucji z elektro- forogramów | 5 | 5 | 7 | 2 | 7* | 5 | 3 | 2 |

1) II-rz. butanol-kwas octowy-woda-5% roztwór cyjanku potasu

2) II-rz. butanol-amoniak d = 0,88-woda-5% roztw. cyjanku potasu

F*) — ilość frakcji

C**) — czas rozdziału w dniach.

Tablica 3

Ilość frakcji otrzymanych w wyniku rozdziału preparatów witaminu B_{12} i B_{12p} na chromatogramach krążkowych oraz czas rozdziału w dniach

| Rodzaj frakcji witaminu B_{12} i B_{12p} po elektroforezie | Układ kwaśny ¹⁾ | | Układ zasadowy ²⁾ | |
|---|----------------------------|----------|------------------------------|----------|
| | Chromatografia | | Chromatografia | |
| | wstępująca | spływowa | wstępująca | spływowa |
| | F*) | C**) | F | C |
| B_{12} z błota | 5 | 8 | 3 | 8 |
| B_{12} z fermentacji propionowej | nie wykonano | | 5 | 12 |
| B_{12p} | 4 | 4 | 5 | 4 |

1) patrz tablica 2

2) patrz tablica 2

F*) — ilość frakcji

C**) — czas rozdziału w dniach.

Uwaga: Położenie głównej frakcji witaminu B_{12} na poszczególnych chromatogramach (licząc od linii startowej) ilustruje tablica 4.

Tablica 4

Położenie głównej frakcji witaminu B_{12} na chromatogramach

| Rodzaj frakcji witaminu B_{12} po elektroforezie użytej do chromatografii | Nr kolejny głównej frakcji witaminu B_{12} na chromatogramie i odległość głównej frakcji w cm, licząc od linii startowej | | | | | |
|---|--|----------|-----------------|----------|-------------------------|----------|
| | Metoda wstępująca | | Metoda spływowa | | Chromatografia krążkowa | |
| | R o z p u s z c z a l n i k | | | | | |
| | kwaśny | zasadowy | kwaśny | zasadowy | kwaśny | zasadowy |
| B_{12} ze szlamów kanałowych, nie krystalizowany | (5) 20 | (7) 18 | (5) 35 | (4) 33 | (3) 9 | (2) 7 |
| B_{12} z fermentacji propionowej, nie krystalizowany | (4) 17 | (7) 19 | (3) 13 | (3) 26 | nie oznaczono | (4) 5 |
| B_{12p} | (4) 23 | (6) 16 | (6) 25 | (8) 21 | (2) 7,5 | (4) 7 |

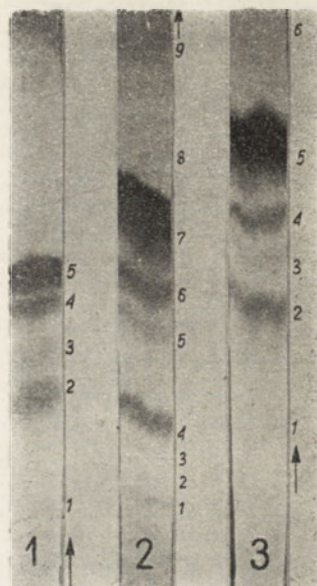
Uwaga: W nawiasach podano nr kolejny głównej frakcji witaminu B_{12} i B_{12p} na chromatogramach.

Główne frakcje witaminu B_{12} wycinano z chromatogramów, eluowano wodą destylowaną i badano spektrofotometrycznie ich widma absorpcyjne (Spektrofotometr Unicam SP·500 przy długości fali $550\text{ m}\mu$ [19]). Widma te okazały się identyczne z widmem czystego preparatu wzorcowego witaminu B_{12} .

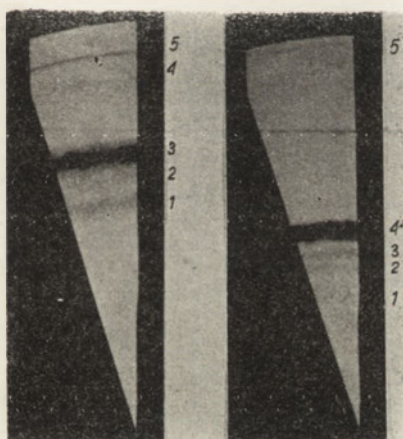
Fot. 1. Rozdział chromatograficzny witaminu B_{12} z fermentacji metanowej, nie krystalizowanego
Rozpuszczalnik z kwasem octowym. Metoda wstępująca (5 frakcji)

Fot. 2. B_{12} z fermentacji metanowej niekrystaliczny
Rozpuszczalnik z amoniakiem. Metoda wstępująca (9 frakcji)

Fot. 3. Rozdział chromatograficzny preparatu witaminu B_{12} z fermentacji metanowej
Rozpuszczalnik z kwasem octowym. Metoda spływowa (6 frakcji)



Fot. 1 Fot. 2 Fot. 3



Fot. 4 Fot. 5

Fot. 4. Rozdział chromatograficzny frakcji witaminu B_{12} z fermentacji metanowej
Rozpuszczalnik z kwasem octowym. Metoda chromatografii krążkowej (5 frakcji)

Fot. 5. Rozdział chromatograficzny preparatu witaminu B_{12} z fermentacji propionowej
Rozpuszczalnik z amoniakiem. Metoda chromatografii krążkowej (5 frakcji)

STRESZCZENIE

Opracowano metodę chromatograficznego rozdzielania witamin grupy B_{12} przy pomocy prostej techniki chromatografii bibułowej wstępującej, spływowej i krążkowej, przez przedłużenie czasu chromatografowania oraz przez zastosowanie wyższej temperatury, przy rozpuszczalniku: II-rz. bu-

tanol/kwas octowy, względnie amoniak/woda/cyjanek potasu. Osiągnięto efekt rozdziału poelektroforetycznych frakcji elektroodjemnych i elektrododatnich (przy pH 2,7) preparatów B_{12} na szereg składników.

Krystaliczny preparat witaminowy otrzymany ze ścieków miejskich po elektroforezie rozdzielał się w czasie 6 dni na 7 frakcji metodą wstępującą z rozpuszczalnikiem amoniakalnym, zaś preparat niekrystaliczny witaminu B_{12} z fermentacji metanowej również po elektroforezie, w ciągu 6-dniowego chromatografowania w analogicznych warunkach, wykazywał 9 składników. Niekrystaliczny preparat poelektroforetyczny witaminu B_{12} z fermentacji propionowej rozdzielał się po 6 dniach na 8 frakcji, przy technice wstępującej z rozpuszczalnikiem amoniakalnym.

Eluowana frakcja poelektroforetyczna tzw. witaminu B_{12p} (czynnik B) okazała się również chromatograficznie heterogeniczna i po 2 dniach chromatografowania metodą spływową z rozpuszczalnikiem amoniakalnym rozdzielała się na 9 składników.

Przez przedłużenie czasu chromatografii krążkowej kobalamin nie osiągnięto takiego efektu jaki występuje przy metodach chromatografii spływowej, względnie wstępującej.

Spektrofotometryczne pomiary widma absorpcyjnego głównych frakcji witaminu B_{12} z chromatogramów wykazały identyczność z widmem czystego preparatu wzorcowego.

Przy ponownym chromatografowaniu głównych frakcji witaminu B_{12} i B_{12p} z poszczególnych chromatogramów nie nastąpiły dalsze rozdziały.

L I T E R A T U R A

- [1] Bernhauer K., Friedrich W., *Angew. Chemie* **66**, 776, 1954.
- [2] Brown F. B., Cain J. C., Gant D. E., Parker L. F. J., Smith E. L., *Biochem. J.* **59**, 82, 1955.
- [3] Brown F. B., Smith E. L., *Biochem. J.* **56**, XXXIV, 1954.
- [4] Dellweg H., Becher E., Bernhauer K., *Biochem. Z.* **327**, 422, 1956.
- [5] Dellweg H., Becher E., Bernhauer K., *Biochem. Z.* **328**, 96, 1956.
- [6] Dion H. W., Calkins D. G., Pfiffner J. J., *J. Am. Chem. Soc.* **76**, 948, 1954.
- [7] Fantes K. H., O'Callaghan C. H., *I. Europejskie Sympozjum na temat witaminu B_{12} i czynnika wewnętrznego*, Hamburg, 1956. *Biochem. J.* **63**, 10p. 1956.
- [8] Ford J. E., Holdsworth E. S., *Biochem. J.* **56**, 1954.
- [9] Ford J. E., Holdsworth E. S., Kon S. K., Porter J. W. G., *Nature*, London, **171**, 148, 1953.
- [10] Ford J. E., Holdsworth E. S., Kon S. K., *Biochem. J.* **58**, XXIV, 1954.
- [11] Ford J. E., Holdsworth E. S., Kon S. K., *Biochem. J.* **59**, 86, 1956.
- [12] Friedrich W., Bernhauer K., *Angew. Chemie* **65**, 627, 1953.
- [13] Friedrich W., Bernhauer K., *Z. Naturforsch.* **9**, 685, 1954.

- [14] Friedrich W., Bernhauer K., *Z. Naturforsch.* **10**, 6, 1955.
- [15] Friedrich W., Gross G., Bernhauer K., *Microchimica Acta* **1—6**, 134, 1956.
- [16] Friedrich W., Bernhauer K., *Chem. Ber.* **90**, 1966—73, 1957. *Angew. Chemie* **69**, 478, 1957.
- [17] Holdsworth E. S., *Nature* **171**, 148, 1953.
- [18] Holdsworth E. S. Doniesienie osobiste.
- [19] Janicki J., Pawełkiewicz J., Stawicki St., Zodrow K., *Przemysł Chem.* **9**, 509, 1953.
- [20] Janicki J., Pawełkiewicz J., *Acta Biochim. Polon.* **1**, 307, 1954.
- [21] Janicki J., Pawełkiewicz J., *Bull. Acad. Polon. Sci., Cl. II.* **3**, 5, 1955.
- [22] Janicki J., Pawełkiewicz J., *Acta Biochim. Polon.* **2**, 329, 1955.
- [23] Janicki J., Pawełkiewicz J., Nowakowska K., *Acta Biochim. Polon.* **3**, 161, 1956.
- [24] Pawełkiewicz J., *Acta Biochim. Polon.* **1**, 313, 1954.
- [25] Pawełkiewicz J., Nowakowska K., *Acta Biochim. Polon.* **2**, 259, 1955.
- [26] Pawełkiewicz J., Zodrow K., *Acta Biochim. Polon.* **4**, 203, 1957.
- [27] Pawełkiewicz J., Zodrow K., *Acta Microbiol. Polon.* (w druku).
- [28] Pfiffner J. J., Calkins D. G., Dion H. W., *Fed. Proc.* **13**, 274, 1954.
- [29] Rábek V. T., Kašik D., Šichová O., Štědrá H., *Biochim. Biophys. Acta* **19**, 191, 1956.

CHROMATOGRAPHIC SEPARATION OF ELECTRONEUTRAL AND
ELECTROPOSITIVE FACTORS OF VITAMINS B_{12} AND B_{12p} AFTER PRIOR
ELECTROPHORESIS

Summary

A method has been developed for the chromatographic separation of vitamins of group B_{12} . The methods: ascending, descending or circular, involve prolonged time of separation and higher temperature, with sec butanol/acetic acid (or ammonia)/water/potassium cyanide as a system of solvents. The method proved effective in separating electroneutral and electropositive fractions of cobalamins, obtained through electrophoresis (at pH 2.7), into several factors.

A crystalline vitamin B_{12} obtained from municipal sewage after electrophoresis, became separated within 6 days by the ascending technique with ammoniacal solvent into seven fractions, whereas an amorphous preparation of vitamin B_{12} , obtained from methane fermentation, yielded under analogical conditions, after prior electrophoresis, nine components. Also the amorphous vitamin B_{12} preparation obtained from propionic acid fermentation after prior electrophoresis, became separated within 6 days into eight fractions by the ascending technique with the ammoniacal solvent.

Fraction obtained from vitamin B_{12p} (Factor B) by electrophoresis proved chromatographically heterogeneous as well and became separated within 2 days by the descending technique, with ammoniacal solvent, into nine fractions.

Extension of separation time in circular chromatography of cobalamins failed to afford results as favourable as those obtained by the descending or ascending techniques.

Absorption spectra of the main fractions of vitamin B_{12} in the chromatograms proved identical with those of pure standard preparations.

Subsequent further chromatographic separation of the main fractions of vitamins B_{12} and B_{12p} proved ineffective.

Otrzymano 30.12.57 r.

W. MAŃSKI, H. KOZDROJ

BADANIA NAD WIELOPOSTACIOWOŚCIĄ SUBSTANCJI GRUPOWYCH KRWI

Z Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie

Substancje grupowo aktywne są związkami złożonymi. Terminy substancje grupowe A, B czy O, traktować należy właściwie jako pojęcia zbiorowe. Za pomocą odpowiednich metod można bowiem wykazać różne odmiany tej samej grupy, zarówno w obrębie tego samego gatunku, jak i między różnymi gatunkami. W tych przypadkach chodzi prawdopodobnie bądź o drobne różnice w strukturze chemicznej haptenu swoistego, bądź w przypadku odmian gatunkowych — o różnice w drobinach związanych z haptenem swoistym w sympleksie substancji grupowej.

Istotnym faktem jest to, że mimo różnic w budowie haptenu swoistego czy drobin związanych z nim w sympleksie, analogia składu chemicznego i zasadniczej budowy sympleksów poszczególnych substancji grupowych decyduje o podobieństwie ich własności fizycznych i chemicznych. W wyniku tego nie ma dotychczas metod preparatywnych, pozwalających na oddzielenie poszczególnych substancji grupowych od siebie. Stwarza to trudność w badaniu tego typu związków, zwłaszcza pochodzenia ludzkiego. Nie występują one bowiem oddzielnie, ale na ogół w zespołach z substancją H i Le^a . Prawdopodobnie nie chodzi tu o związki wieloswoiste, np. typu $A.H.Le^a$, ale o mieszaniny sympleksów grupowych, których nie umiemy dotąd rozdzielić.

To jest tylko część przyczyn, które składają się na to, że do dziś nie udało się ostatecznie wyjaśnić zasadniczego zagadnienia zależności między budową chemiczną różnych grup a ich swoistością, ani tym bardziej podłoża chemicznego subtelniejszych różnic w obrębie tych samych grup. Istotnie, wiemy dziś więcej o tym co poszczególne grupy krwi mają wspólnego chemicznie, niż co je różni [5, 10]. Podobieństwo zasadniczej budowy sympleksów poszczególnych grup nie ogranicza się tylko do jednej formy ich występowania. Właściwością wspólną grup A, B i O,

której dotąd poświęcono mało stosunkowo uwagi — jest możliwość występowania tych substancji w postaci różnoskładnikowych sympleksów.

Mański, Kozdroj i Radola [11] wykazali, że swoistość grupowa nie jest związana z całą cząsteczką, a tylko z pewnym jej fragmentem strukturalnym. Działając bowiem kwasami czy zasadami na mukopolisacharyd grupy można doprowadzić do utraty zdolności hamowania aglutynacji przy zachowaniu zdolności hamowania hemolizy. Przebieg inaktywacji w obu warunkach hydrolizy dowodzi, że swoiste reakcje serologiczne zachodzą ze strukturalnie odmiennymi grupami chemicznymi w drobinie substancji grupowej. Jeśli za swoistość odpowiada tylko określony fragment struktury, to staje się zrozumiałe, że różne chemicznie drobinny mogą być nośnikami tej samej swoistości grupowej.

Już na początku badań nad chemią substancji grupowych stwierdzono fakt, że z płynów ustrojowych wypadają one pod wpływem etanolu, natomiast z tkanek dają się ekstrahować etanolem.

Doprowadziło to do podziału na dwa rodzaje substancji grupowych. Pierwsze występujące przede wszystkim w płynach ustrojowych — rozpuszczalne w wodzie, drugie zaś występujące w tkankach — rozpuszczalne w alkoholu. Większość badań chemicznych wykonano nad tzw. formą rozpuszczalną w wodzie [5, 7, 10]. Według terminologii Stacey'a [16] chodzi w tym przypadku o mukopolisacharyd zawierający około 25% części aminokwasowej.

Substancje grupowe dające się ekstrahować etanolem z tkanek były ostatnio przedmiotem badań Hamasato [3] oraz Masamune i współpracowników [12, 13]. Stwierdzili oni, że mukolipid grupowy związany jest również z częścią peptydową i że w stanie oczyszczonym jest on rozpuszczalny w wodzie i nierozpuszczalny w alkoholu. Kryterium rozpuszczalności w wodzie czy alkoholu ma więc istotne podstawy tylko w odniesieniu do substancji grupowych występujących w materiale tkankowym, a nie do wyizolowanych i oczyszczonych preparatów substancji grupowych.

Mukolipidy nie są jedyną formą w jakiej można otrzymać substancje grupowe z tkanek. Substancje grupowo aktywne dają się wprowadzić tylko w ograniczonym stopniu ekstrahować z tkanek wodą czy roztworami soli, ale można je przeprowadzić do roztworu poddając tkankę uprzedniemu trawieniu peptycznemu.

W dotychczasowych metodach otrzymywania substancji grupowych z materiału tkankowego stosowano w pierwszym etapie hydrolizę enzymami proteolitycznymi. Proces ten prowadzono tak długo, aż hydrolizat nie wykazywał reakcji na wolne białka, a zawartość azotu w wyizolowanym preparacie aktywnym nie ulegała praktycznie dalszej zmianie.

Preparat grupowo aktywny poddawano następnie dalszemu oczyszczaniu przez frakcjonowanie etanolem czy solami. Tak otrzymane sub-

stancje grupowe są mukopolisacharydami, składającymi się w około 25% z części aminokwasowej, co odpowiada około 6% azotu całkowitego.

W preparatyce mukopolisacharydów i mukolipidów grupowych dążono dotąd do możliwie całkowitego oddzielenia wszelkich części nieswoistych, uprzednio z nimi związanych. Postępowanie takie wynikało z dążenia do uchwycenia zależności między budową chemiczną a swoistością tych związków. Jednak prócz tego zasadniczego zagadnienia istnieje jeszcze równie podstawowe i praktycznie nie poruszone dotąd zagadnienie roli substancji grupowych w organizmie. Chodzi tu przecież o związki występujące w całym organizmie, z wyjątkiem centralnego układu nerwowego.

Aby podejść do tego zagadnienia, trzeba otrzymać również substancje grupowo aktywne z tkanek w postaci rodzimej lub w postaci możliwie zbliżonej do niej. W tym kierunku idą obecnie nasze doświadczenia.

W wyniku tych doświadczeń wyizolowaliśmy substancje grupowo aktywne w postaci mukoproteidu o zawartości około 13% azotu całkowitego. Mukoproteid ten jest formą substancji grupowych rozpuszczalną w wodzie, bogatszą od mukopolisacharydu w składniki, które występują w sympleksie rodzimym w tkance.

Badanie różnych form, w których występują substancje grupowe, powinno dać również istotny wgląd w zagadnienie, w jakim stopniu swoistość grupowa i aktywność grupowa zależą od różnic składu chemicznego, a w jakim od różnic struktury cząsteczki. Jest możliwe, że mukopolisacharydy grupowe płynów ustrojowych, nie są oddzielnie syntetyzowane w ustroju, ale powstają właśnie z substancji grupowych rodzimych z tkanek na drodze hydrolizy peptycznej *in vivo*. Szczególnie prawdopodobne jest to w odniesieniu do substancji grupowych występujących jako składnik śluzowy soku żołądkowego. Nie można również wykluczyć, że różnie zhydrolizowane substancje grupowe mogą odgrywać różną rolę w organizmie.

Z tych względów uważaliśmy za ciekawe przebadanie również własności substancji grupowych, jakie można izolować w przebiegu hydrolizy peptycznej oraz poznanie w ten sposób zmian, jakim podlega makrodrobina substancji grupowych przechodząc od formy, w jakiej występuje w tkankach, do formy, w jakiej znajdujemy ją w sokach ustrojowych.

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

1. Metody

Metody fizyczne. Lepkość oznaczano za pomocą wiskozymetru Ostwalda w temperaturze 25° w roztworze 0,85% NaCl.

Absorbpcję światła w zakresie od 2400 Å do 3200 Å oznaczano przy użyciu spektrofotometru Beckmanna (Typ ZSSR-C f 9). Pomiarzy prze-

przewodzą na 0,02% roztworach w 0,85% NaCl w 1 cm naczyniach kwarcowych.

Elektroforetyczne pomiary wykonywano przy użyciu aparatu Fokal B. Do oznaczeń używano roztworów o stężeniu 1—2% substancji badanej w buforze weronalowym o różnym pH.

Test rozpuszczalności przeprowadzano w następujących warunkach: 1 g badanej substancji wytrząsano przez 2 minuty w 20 ml 30% etanolu. Wirowano przez 5 minut. Klarowny roztwór alkoholowy zlewano z osadu i wytrącano z niego substancję przez dodanie 60 ml 96% etanolu. Do pozostałej substancji wyjściowej, po ekstrakcji, dodawano 20 ml 30% etanolu i ponownie wytrząsano i izolowano substancję aktywną jak poprzednio. Czynność tę powtarzano cztery razy. Poszczególne preparaty suszono acetonem. Użyto rozcieńczony etanol jako rozpuszczalnik, gdyż roztwory wodne były zbyt lepkie i stąd nie dawały reprodukowalnych wyników. Określone na podstawie prób wstępnych stężenie 30% etanolu jest stężeniem granicznym, w którym badana substancja jeszcze się rozpuszcza. W wyższych stężeniach etanolu substancja ta jest nierozpuszczalna.

Koagulację obserwowano makroskopowo.

Metody chemiczne. Azot całkowity oznaczano metodą Markhama-Kjeldahla, używając wskaźnika Tashiro i N/70 HCl. Azot peptydowy wyliczano jako różnicę między azotem całkowitym a azotem zawartym w heksozaminach.

Heksozy oznaczano metodą reduktometryczną wg Somogyi [14]. Jako wzorca użyto glikozę firmy Retorte Pharmaceutical USA, w ilości od 0,25 do 1,0 mg do jednego oznaczenia. Do analizy używano 1% roztwór substancji mukoproteidowej i hydrolizowano 6N HCl we wrzącej łaźni wodnej przez 1 godzinę. Hydrolizat zobojętniano 8% Na₂CO₃ (4 ml roztworu Na₂CO₃ na 1 ml hydrolizatu). Do oznaczeń używano 5 ml obojętnego roztworu. Miareczkowano 0,005 N Na₂S₂O₃.

Dla dodatkowego określenia heksoz w badanej substancji użyto metody kolorymetrycznej z α -naftolem według Molischa. Jako wzorec używano galaktozę firmy E. Merck-Darmstadt o stężeniu 10—100 μ g w ml. Do 1 ml roztworu 0,1% mukoproteidu, 0,01% mukopolisacharydu dodawano w czasie chłodzenia 9 ml kwasu siarkowego o $d = 1,81$. Po doprowadzeniu do temperatury pokojowej wstawiono do wrzącej łaźni wodnej na 3 minuty. Oziębiano, dodawano 0,2 ml 5% α -naftolu w etanolu, dokładnie mieszano i po 10 minutach określano absorpcję za pomocą fotokolorymetru Colemana przy 5750 Å. Pomiary wykonywano używając odczynników jako próby kontrolnej.

Aminoheksozy oznaczano zmodyfikowaną metodą Elsona-Morgana, używając jako wzorca chlorowodorku glikozoaminy firmy Hoffman-La

Roche (Szwajcaria) (1,2 mg/ml, co odpowiada 1 mg/ml glikoaminy). Krzywa kolorymetryczna wzorcowa obejmowała zakres zawartości glikoaminy od 100 μg do 500 μg w 1 ml. Wzorzec poddawano działaniu 6 N kwasu solnego, w zatopionych ampułkach, w temperaturze wrzącej łaźni wodnej przez 15 min, badaną zaś substancję hydrolizowano przez 30 min. Do 1 ml hydrolizatu 0,25% w 6 N HCl substancji badanej dodawano 3 ml 2 N Na_2CO_3 w celu dokładnego zobojętnienia i 5 ml 2% acetyloacetonu w 5 N Na_2CO_3 i ogrzewano przez 15 minut we wrzącej łaźni wodnej. Po ochłodzeniu dodano 2 ml odczynnika Ehrlicha i pozostawiono w łaźni wodnej w 37° przez 30 minut. Odczytywano absorpcję przy 5400 Å na fotokolorymetrze Colemana używając odczynników jako próby kontrolnej.

Metylopentozy oznaczano wg metody Dischego i Shettlesa [2]. Jako wzorca użyto fukozy firmy Hoffman-La Roche (Szwajcaria) w zakresie stężeń od 4 μg do 20 μg . Do oznaczeń używano roztworów 0,05% badanej substancji. Pomiar przeprowadzano w spektrofotometrze Beckmanna (Typ ZSRR-C f 9).

Zawartość siarczanów oznaczano metodą wagową jako siarczan baru [6]. 300 mg badanej substancji ogrzewano pod chłodnicą zwrotną z 50 ml 1 N kwasu solnego przez 2 godziny. Hydrolizat oziębiano, przesączano przez szklany filtr Schotta nr 4 i wytrącano siarczan baru.

Odczyny jakościowe wg Millona, Folin-Ciocalteu i inne zestawione w tablicy 3 wykonano wg [4].

Metody serologiczne. Przynależność grupową tkanek oznaczano reakcją zahamowania hemaglutynacji. Do oznaczania używano surowic ludzkich anty A i anty B, w rozcieńczeniu odpowiadającym 100 jednostkom hemaglutynacyjnym w 1 ml [8] oraz 3% zawiesiny krwinek A lub B. Wyciąg z tkanek przygotowywano przez ogrzewanie we wrzącej łaźni wodnej około 10 g tkanki w 10 ml 0,85% NaCl. Do 1 kropli surowicy dodawano po 1 kropli wyciągu tkankowego i pozostawiono w temperaturze 4° przez 1 godzinę. Następnie dodawano po 1 kropli 3% zawiesiny odpowiednich krwinek. Po 15 minutach wirowano przez 1 minutę przy 1000 obrotów/min i odczytywano, które wyciągi tkankowe hamowały hemaglutynację krwinek A.

Ilościowe oznaczanie zdolności hamowania hemaglutynacji przeprowadzano w następujący sposób: Do 0,05 ml roztworu substancji grupowej w spadającym szeregu stężeniowym (zaczynając od 0,1%) dodawano równą ilość surowicy zawierającej 100 jednostek hemaglutynacyjnych w 1 ml, dobrze mieszano i pozostawiono w temperaturze 4° przez 1 godzinę. Po tym czasie dodawano po 1 kropli 3% zawiesiny krwinek, wstrząsano i po 15 minutach wirowano przez 1 minutę przy 1000 obrotów na minutę.

Aktywność substancji grupowej określano minimalną ilością substancji w 1 ml, która całkowicie hamuje 100 jednostek aglutynacyjnych surowicy.

Odczyn zahamowania hemolizy przeprowadzano w następujący sposób: Do 0,5 ml roztworu badanej substancji dodano 0,5 ml amboceptora anty A (2 dawki hemolityczne) i 0,5 ml surowicy świnki morskiej w rozcieńczeniu 1/10. Wstawiono do łaźni wodnej o temperaturze 37° na 1 godzinę. Dodano 0,5 ml 5% zawiesiny krwinek baranich i trzymano w łaźni wodnej w 37° przez 30 minut. Wyliczano jako ilość hamującą całkowicie 1 jednostkę hemolityczną w 1 ml.

Badania własności antygenowych przeprowadzano w następujący sposób: 3 królikom wagi 3-4 kg podawano dożylnie 1 ml 1% roztworu substancji grupowej w 0,85% NaCl. Zabieg ten powtórzono czterokrotnie w odstępach pięciodniowych. Krew do badania na obecność przeciwciał pobierano w tydzień po ostatnim zastrzyku.

2. MATERIAŁY

Materiał wyjściowy stanowiły świeże żołądki świń o aktywności grupowej A oraz tkanka żołądkowa ludzka grupy A.

Otrzymywanie preparatów substancji grupowych na drodze trawienia peptycznego

Substancję grupową A otrzymywano z żołądków świń. Trawienie enzymatyczne prowadzono w temperaturze 50° przy pH 2,0-2,2 w naczyniach o pojemności 20 l. 5 kg starannie zmielonej tkanki żołądkowej zalewano 5 l gorącej wody. W ten sposób szybko osiągnano potrzebną temperaturę 50°. Całość wstawiano do termostatycznej łaźni wodnej, doprowadzono stężonym HCl do pH 2,0, po czym dodano pepsynę. W czasie trawienia kontrolowano pH i korygowano je przez dodanie stężonego HCl. Zmiany pH, początkowo bardzo duże, po około 6 godzinach maleją i dalsza proteoliza odbywa się bez istotnych zmian pH. W tym też czasie tkanka podlega pełnej solubilizacji i daje już jednorodny roztwór. Pierwszą część hydrolizatu peptycznego dla dalszej preparatyki pobrano po około 10 godzinach hydrolizy, następne po 24 i 48 godzinach.

Po ostudzeniu, zebraniu wierzchniej warstwy tłuszczu i przefiltrowaniu przez bibułę wytrącono substancję aktywną trzykrotną objętością etanolu. Osad rozpuszczono w 10 objętościach wody i po oziębieniu w chłodni odwirowano część nierozpuszczalną. Substancję aktywną wytrącono 2-krotną objętością etanolu.

Dalsze oczyszczanie preparatów przeprowadzano już różnymi metodami, opracowanymi na podstawie systematycznej kontroli ich czystości

chemicznej i aktywności serologicznej. Preparat oznaczony przez nas jako mukopolisacharyd, izolowany po 48 godzinach hydrolizy enzymatycznej, oczyszczano za pomocą frakcjonowania siarczanem sodu, w sposób opisany dokładnie w poprzedniej pracy [9].

Preparat, okreśłany jako mukoproteid grupowy, oczyszczano w sposób następujący. Roztwór wodny surowego produktu oznaczonego jako P₁ oziębiano w lodówce i oddzielono od części nierozpuszczalnych przez odwirowanie. Z klarownego roztworu ponownie wytrącano substancję aktywną etanolem. Czynność tę powtarzano trzy razy. Tak oczyszczoną substancję suszono za pomocą acetonu. Oznaczano tę frakcję jako P₂. Dalsze oczyszczanie osiągnięto przy zastosowaniu metody frakcjonowanej ekstrakcji za pomocą 30% etanolu. 20 g substancji P₂ wytrząsano w 1 litrze 30% etanolu. Wirowano na wirówce Sharples przez 30 minut przy 25 tys. obrotów. Z klarownego roztworu alkoholowego wytrącono substancję, doprowadzając stężenie etanolu do 75%. Osad ten zbierano i ponownie ekstrahowano 30% etanolem. Czynność tę powtarzano trzy razy. Suszono za pomocą acetonu. Otrzymano 1,8 g substancji czystej, którą oznaczono jako P₃.

Otrzymanie substancji grupowej z tkanki solubilizowanej alkalicznym mocznikiem

10 g zmielonej ludzkiej tkanki żołądkowej A, zadano 150 ml 30% mocznika w 2% NaOH, wytrząsano przez 10 minut, po czym przez 15 minut ogrzewano w łaźni wodnej w temperaturze 55°. Po oziębieniu odsączono od części nierozpuszczalnych i dializowano w temperaturze 4° wobec wody destylowanej aż do usunięcia mocznika. Osad wypadający w czasie dializy odwirowano i z klarownego roztworu wytrącono substancję aktywną pięcioma objętościami etanolu. Wydajność stanowi 1,5% tkanki wyjściowej. Preparat ten oczyszczono jak P₂ i oznaczono go jako P₄.

Otrzymywanie preparatów substancji grupowych na drodze ekstrakcji 0,85% NaCl

700 g tkanki żołądkowej ludzkiej zmielono, dodano 700 ml 0,85% NaCl i kilka kropli chloroformu i wytrząsano mechanicznie przez 6 godzin. Następnie ogrzewano we wrzącej łaźni wodnej przez 15 minut. Ochłodzono i pozostawiono na noc w temperaturze 4°. Odłączono od części nierozpuszczalnych i z klarownego przesączu wytrącono aktywną substancję 4 objętościami etanolu. Wytrącony osad rozpuszczono w 200 ml wody destylowanej, odwirowano część nierozpuszczalną w wodzie i z klarownego roztworu wytrącono kolejne frakcje etanolem. Po dodaniu jednej obję-

tości 96% etanolu wytrącono frakcję L_1 , po dodaniu dwóch objętości etanolu — frakcję L_2 i po dodaniu pięciu objętości 96% etanolu — frakcję L_3 . Preparaty te suszono acetonem. Otrzymano 1 g preparatu L_1 , 0,6 g preparatu L_2 i 0,9 g preparatu L_3 .

3. WYNIKI

Grupowo aktywne sympleksy wielocukrowo-białkowe otrzymane po solubilizacji tkanek

W niniejszej pracy postawiliśmy sobie za zadanie izolowanie substancji grupowo aktywnej bezpośrednio po solubilizacji materiału tkankowego, a następnie przebadanie jej własności. Substancja grupowa tak otrzymana powinna pozwolić na bliższy wgląd w formę rodzimą substancji grupowych występujących w tkankach.

Podany powyżej sposób preparatyki substancji grupowo aktywnej, na drodze trawienia peptycznego, wynikał z równolegle przeprowadzanych doświadczeń nad jednorodnością i czystością izolowanych substancji.

Tablica 1

Test rozpuszczalności mukoproteidu P_2

| Frakcja | Azot całkowity w % | Suma cukrów metodą Molischa w % (jako galaktoza) | Stosunek sumy cukrów do azotu całkowitego |
|---------|-----------------------|---|--|
| 1 | 13,6 | 3,8 | 0,281 |
| 2 | 12,8 | 4,6 | 0,351 |
| 3 | 12,1 | 5,9 | 0,491 |
| 4 | 11,7 | — | — |

Tablica 2

Test rozpuszczalności mukoproteidu P_3

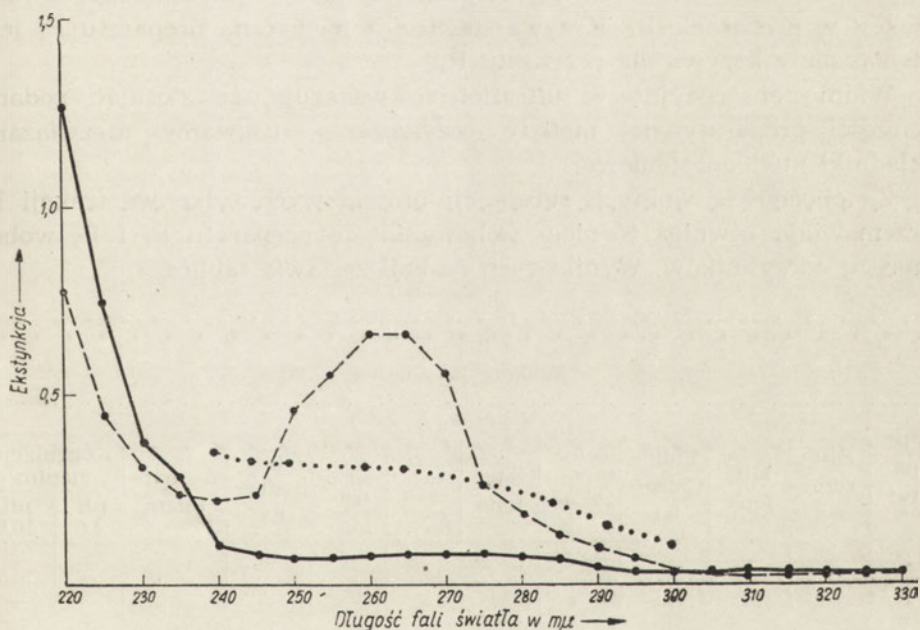
| Frakcja | Azot całkowity w % | Heksozoamina metodą Elsona-Morganiana w % (jako glikozoamina) | Stosunek heksozoaminy do azotu całkowitego |
|---------|-----------------------|---|---|
| 1 | 13,5 | 10,6 | 0,786 |
| 2 | 13,3 | 10,8 | 0,815 |
| 3 | 13,4 | 11,2 | 0,841 |
| 4 | 13,1 | 10,9 | 0,837 |

Tablice 1 i 2 przedstawiają wyniki testu rozpuszczalności dla preparatu P_2 i P_3 .

Jak widać rozrzut zawartości azotu w poszczególnych frakcjach preparatu P_2 sięga jeszcze około 14% różnicy względnej, co wskazuje na jego

niejednorodność. Oznaczenie sumy cukrów metodą Molischa również potwierdza tę niejednorodność i wykazuje rozrzut 35,6%. Przy preparacie P₂ lepkości frakcji I i IV wynosiły dla 0,1% roztworów w 0,85% NaCl odpowiednio 1,077 i 1,088, różnica względna nie przekracza więc 1%. Należy podkreślić większą łatwość ekstrakcji substancji o wyższej zawartości azotu, czyli o wyższej zawartości składnika peptydowego. Być może wiąże się to z większą zdolnością do pęcznienia substancji o wyższej zawartości składnika peptydowego, co w obranych przez nas warunkach doświadczalnych decyduje o kolejności ekstrakcji poszczególnych frakcji. Bowiem użyty przez nas test rozpuszczalności jest również testem na kinetykę ekstrakcji.

Dla preparatu P₃ rozrzuty zawartości azotu dla pierwszych trzech frakcji mieszczą się praktycznie w zakresie błędu oznaczenia azotu. Dopiero frakcja czwarta, która stanowi 11%, wykazuje różnicę około 2,9% różnicy względnej zawartości azotu w stosunku do frakcji poprzednich.



Rys. 1. Krzywe spektrofotometryczne

- - - - ● Preparat P₁
- - - - ● " P₂
- ······ ● Ekstrakt mocznikiem - P₄

Przy badaniu preparatu P₃ zdecydowaliśmy się na oznaczenia aminocukrów, gdyż wartość ich jest wyższa niż zawartość cukrów oznaczana wg Molischa, co zwiększa dokładność oznaczania. Rozrzut zawartości

aminocukrów w poszczególnych frakcjach wynosi 5% różnicy względnej. W tych warunkach preparat P₃ może być uważany jako spełniający warunki jednorodności. Oznaczenia elektroforetyczne potwierdzają powyższe wyniki.

Analizę wykonano w buforze weronalowym o pH 8,6 i $\mu=0,1$. W skład P₂ wchodzi dwa składniki o różnej ruchliwości elektroforetycznej, przy czym składnik o ruchliwości zbliżonej do ruchliwości mukoproteidu grupowego stanowi około 80%. Preparat P₃ jest elektroforetycznie jednorodny i to w buforze weronalowym o pH 7,0, 8,0 i 8,6. Jego ruchliwość w buforze weronalowym o pH 8,0 wynosi — $4,0 \times 10^{-5}$ cm² sek⁻¹ V⁻¹.

Rysunek 1 przedstawia krzywe spektrofotometryczne dla preparatu P₁, P₂ i P₄ w zakresie 2200—3300 Å.

Preparat P₁ posiada wyraźne maksimum przy 2600 Å. Natomiast P₂ i P₄ nie wykazują żadnego maksimum charakterystycznego dla kwasów nukleinowych, ani dla aromatycznych aminokwasów. Jest to o tyle ciekawsze, że oznaczenia elektroforetyczne wskazują na obecność dwóch frakcji w preparacie P₂. Krzywa spektrofotometryczna preparatu P₃ jest identyczna z krzywą dla preparatu P₂.

Widmo absorpcyjne w ultrafiolecie wskazuje, że stosując podane w części preparatywnej metody oczyszczania, usuwamy niezwiązane składniki nukleoproteidowe.

Za obecnością wolnych substancji proteidowych tylko we frakcji P₁ przemawiają również różnice zachowania się preparatu P₁ i P₃ wobec szeregu odczynników. Wyniki tych reakcji zestawia tablica 3.

T a b l i c a 3
Reakcje jakościowe

| Preparat | R e a k c j e | | | | | | | | | | |
|----------------|---------------------|--------------|--------------------------|--------------------------|---------------|---|--|------------------------|---------------------------|-----------------------|------------|
| | Biu- reto- wa | Mil- lona | Folin- Ciocal- teu | Z oc- tanem ołowiu | Z ta- niną | Z kwa- sem trój- chloro- oc- towym | Z kwa- sem sulfo- sali- cyl- owym | Z nin- hydry- ną | Z α -naf- tolem | Koagulacja cieplna | |
| | | | | | | | | | | pH 4,0 | pH 10,0 |
| P ₁ | + | — | + | + | + | + | + | + | + | + | — |
| P ₃ | + | — | + | — | + | + | — | + | + | — | — |

Uwaga: Badano 2% roztwory wodne.

Preparat P₁ daje dodatni odczyn z kwasem sulfosalicylowym, z octanem ołowiu i daje się koagulować w cieple przy pH 4. Wszystkie te odczyny zanikają przy oczyszczaniu i preparat P₃ ich już nie wykazuje.

Preparat otrzymany przez działanie mocznikiem na tkankę był jednorodny elektroforetycznie i posiadał ruchliwość — $3,5 \times 10^{-5}$ cm² sek⁻¹ V⁻¹. Przy solubilizacji tkanki mocznikiem otrzymuje się substancje grupowe

nie zdegradowane, odznaczające się bardzo dużą lepkością. Frakcjonowanie etanolem doprowadza w tym przypadku łatwiej do denaturacji zanieczyszczeń i stąd łatwiej do ich usunięcia. P_4 zawiera 13,6% azotu i wykazuje aktywność 30 $\mu\text{g}/100$ jednostek hemaglutynacyjnych w ml. Preparat ten otrzymany z tkanki ludzkiej ma praktycznie tę samą zawartość azotu i tę samą ruchliwość co mukoproteid P_3 z tkanki wieprzowej poddanej hydrolizie peptycznej. Mniejsza aktywność wiąże się prawdopodobnie z zaobserwowanym przez nas faktem, że aktywność grupowa zależy nie tylko od zawartości azotu w preparacie, ale również od stopnia degradacji preparatu. Aktywność mukoproteidów wzrasta do pewnej granicy wraz ze wzrostem stopnia degradacji, przy czym zawartość azotu nie ulega zmianie. Preparat P_3 , otrzymany drogą hydrolizy peptycznej w środowisku kwaśnym, jest bardziej od P_4 zdegradowany.

T a b l i c a 4

Dane analityczne mukoproteidu P_3

| | |
|--|--|
| Azot całkowity | 13,6% |
| Azot peptydowy | 12,8% |
| Azot heksozoaminowy | 0,8% |
| Suma cukrów metodą Molischa (jako galaktoza) | 5,0% |
| Suma cukrów metodą Somogyi (jako glikoza) | 4,8% |
| Heksozoaminy (jako glikoaminy) | 10,6% |
| Acetyloheksozoaminy | 13,1% |
| Metylopentozy (jako fukoza) | 1,1% |
| Siarczany | nie ma |
| Aktywność | 6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ surowicy zawierającej 100 jednostek hemaglutynacyjnych |
| Ruchliwość elektroforetyczna (Bufor weronalowy, pH 8,0, μ 0,1, temp. 2 $^{\circ}$) | $-4,0 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ sek}^{-1} \text{ V}^{-1}$ |
| Lepkość względna (1% roztw. w 0,85% NaCl) | 1,55 |

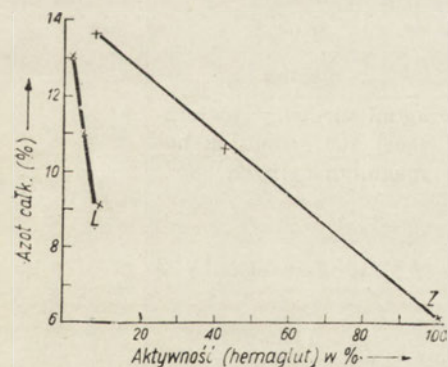
Widmo spektrofotometryczne P_4 wykazuje podobnie jak P_3 brak maksimum charakterystycznego dla aromatycznych aminokwasów. Przesunięcie w przebiegu krzywych P_2 i P_4 , widoczne na rysunku 1, wynika z różnic w rozpraszaniu światła.

Szereg doświadczeń wskazuje, że opisany mukoproteid jest stabilnym sympleksem substancji grupowej. Nie ulega on rozkładowi w czasie elektroforezy. Nie zmienia się przy ogrzaniu w pH 4 i 8, a w szczególności nie dochodzi nigdy do oddzielenia się składnika peptydowego. Również frakcjonowanie siarczanem sodu nie rozbija sympleksu wysokoazotowego na składniki. Poszczególne frakcje, wypadające w stężeniu do 25⁰/₀ i od 25—30⁰/₀ stężenia Na_2SO_4 , różniły się tylko o 4⁰/₀ różnicy względnej w zawartości azotu. Kwas trójchlorooctowy w stężeniu 10⁰/₀ wytrąca cały sympleks aktywny preparatów P_1 , P_2 , P_3 i P_4 , a nie tylko składnik azotowy.

Aktywność preparatów grupowych wzrastała w miarę ich oczyszczania i tak 100 jednostek hemaglutynacyjnych w 1 ml surowicy wymaga dla całkowitego zahamowania 15 μg preparatu P_1 , 7,8 μg P_2 i 6,0 μg P_3 . Preparaty te jak i preparat P_4 nie miały własności antygenowych w doświadczeniu na królikach. Pełną analizę chemiczną przeprowadzono na preparacie o największej czystości, to znaczy na preparacie P_3 . Wyniki oznaczeń w przeliczeniu na suchą masę zestawia tablica 4. Otrzymany przez nas mukoproteid odpowiada wymaganiom czystości i jednorodności chemicznej. Jest on nośnikiem aktywności grupowej i występuje w formie bliższej substancjom rodzimym w komórkach niż szeroko dotąd badany mukopolisacharyd grupowy.

*Grupowo aktywne sympleksy wielocukrowo-białkowe
otrzymane w przebiegu hydrolizy peptycznej lub na drodze ekstrakcji tkanek*

Własności serologiczne, fizyczne i chemiczne różnych sympleksów grupowo aktywnych — mukoproteidów i mukopolisacharydów — przebadaliśmy na preparatach wyizolowanych z materiału zwierzęcego, oznaczonych jako preparaty Z_1 , Z_2 , Z_3 i ludzkiego, oznaczonych jako L_1 , L_2 , L_3 .



Rys. 2. Zależność między aktywnością preparatów a zawartością azotu

W miarę odszczepiania części peptydowej wzrasta aktywność substancji grupowej. Jeżeli przyjąć aktywność mukopolisacharydu grupowego o zawartości 6,1⁰/₀ azotu za 100⁰/₀ to aktywność preparatu o zawartości 10,6⁰/₀ azotu wynosi 42,8⁰/₀, zaś aktywność mukoproteidu grupowego o 13,6⁰/₀ azotu wynosi 9,0⁰/₀. Ta sama proporcja w przebiegu aktyw-

ności jest zachowana przy użyciu testu zahamowania hemolizy. Jak ilustruje to rys. 2, zależność między zdolnością hamowania hemaglutynacji

a zawartością azotu poszczególnych preparatów przebiega liniowo. Można wyliczyć, że odszczepienie 1% azotu powoduje wzrost aktywności o 12%.

Przebieg zmiany aktywności preparatów typu L nie leży na prostej preparatów typu Z. Mamy tu do czynienia z innym materiałem wyjściowym oraz z innym stopniem czystości preparatów. Żaden z preparatów badanych nie był antygenem dla królików.

T a b l i c a 5

Skład chemiczny mukoproteidów i mukopolisacharydów grupowo aktywnych

| Preparat | Suma cukrów metodą Molischa (jako galaktoza) w % | Heksozoamina (jako glikozaamina) w % | Metylopentozy (jako fuukoza) w % | Stosunek cukrów do heksozoaminy | Azot w % | | | Część peptydowa w % (wyliczona) |
|----------------|--|--------------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|-----------|--------------|-----------|---------------------------------|
| | | | | | całkowity | heksozoaminy | peptydowy | |
| Z ₁ | 5,0 | 10,6 | 0,7 | 0,5 | 13,6 | 0,8 | 12,8 | 81,9 |
| Z ₂ | 6,1 | 17,0 | 1,0 | 0,4 | 10,3 | 1,3 | 9,0 | 57,6 |
| Z ₃ | 45,0 | 23,0 | | 1,9 | 6,1 | 1,8 | 4,3 | 27,5 |
| L ₁ | 4,0 | | | | 13,0 | | | |
| L ₂ | 5,2 | | | | 10,9 | | | |
| L ₃ | 8,4 | 20,0 | | 0,4 | 9,4 | 1,6 | 7,8 | 49,9 |

Tablica 5 zestawia dane analityczne preparatu substancji grupowej izolowanego bezpośrednio po solubilizacji materiału tkankowego trawieniem peptycznym, a więc na początku tego procesu i preparatu izolowanego po zakończeniu hydrolizy peptycznej. Zawiera ona również niektóre dane dla preparatu pośredniego oraz preparatów otrzymanych za pomocą ekstrakcji z materiału ludzkiego.

W miarę postępu hydrolizy enzymatycznej i stąd w miarę wzrostu udziału części wielocukrowej w drobinie substancji grupowej wzrasta również lepkość roztworów poszczególnych preparatów. Zależność stężeniowa lepkości specyficznej dla poszczególnych preparatów substancji grupowych, które różnią się proporcją części wielocukrowej i peptydowej w cząsteczce przedstawia tablica 6.

T a b l i c a 6

Lepkość specyficzna mukoproteidów i mukopolisacharydów grupowo aktywnych

| Preparat | Stężenie w 0,85 % NaCl (w %) | | | | | | | |
|----------------|------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|
| | 4,0 | 2,0 | 1,0 | 0,4 | 0,2 | 0,1 | 0,08 | 0,05 |
| Z ₁ | 2,83 | 1,17 | 0,55 | 0,26 | 0,18 | 0,13 | 0,12 | 0,11 |
| Z ₂ | 6,35 | 1,75 | 1,62 | — | — | — | — | — |
| Z ₃ | 7,69 | 3,06 | 1,04 | 0,43 | 0,25 | 0,16 | 0,15 | 0,12 |

Jak widać, wzrost lepkości specyficznej w miarę odszczepiania reszt aminokwasowych jest w początkowej fazie hydrolizy enzymatycznej większy niż w późniejszej. Na przykład, różnica lepkości specyficznej 4⁰/₀ roztworów zawierających 13,6⁰/₀ i 10,6⁰/₀ azotu wynosi 3,52, wtedy gdy różnica ta dla preparatów poddanych dłużej trawieniu choć o większej rozbieżności w zawartości azotu, bo 10,6⁰/₀ i 6,1⁰/₀ azotu — wynosi już tylko 1,34. Różnica ta zmniejsza się ze spadkiem stężenia poszczególnych substancji. Przy stężeniu 1,0⁰/₀ różnica względna lepkości specyficznej preparatów krańcowych wynosi 40,0⁰/₀, natomiast przy stężeniu 4,0⁰/₀ — 60,7⁰/₀. Preparaty te zawierają pierwszy około 20⁰/₀, drugi około 75⁰/₀, części wielocukrowej, a więc stosunek 1 do 3,75. Z odszczepieniem reszt aminokwasowych i stąd zwiększeniem procentowej zawartości części wielocukrowej zwiększa się więc współczynnik stężeniowy lepkości poszczególnych preparatów.

T a b l i c a 7

Fracjonowanie siarczanem sodu mukoproteidów i mukopolisacharydów grupowo aktywnych

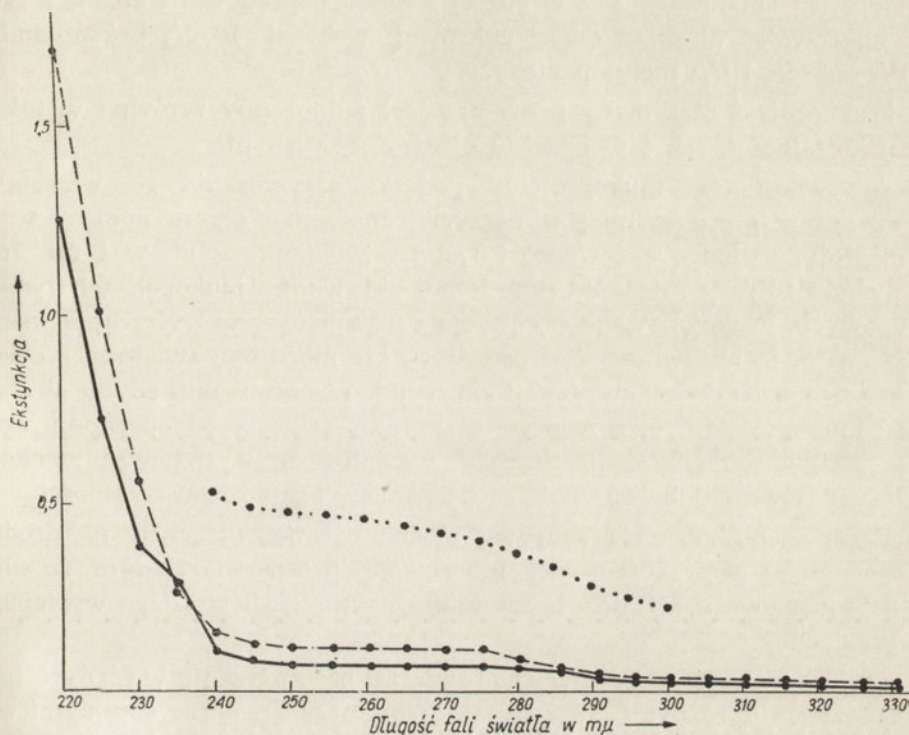
| Czas hydrolizy enzymatycznej (pepsyna) w godz | 20 % Na ₂ SO ₄ | | | | 30 % Na ₂ SO ₄ | | | |
|---|--------------------------------------|--------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| | Wydajność w % | Azot całkowity w % | Aktywność w jedn. hemaglutynacyjnych | Reakcje z 10 % CCl ₃ COOH | Wydajność w % | Azot całkowity w % | Aktywność w jedn. hemaglutynacyjnych | Reakcje z 10 % CCl ₃ COOH |
| 10 | 100 | 12,0 | 6,3 × 10 ⁻⁶ | + | 6,6 | 11,6 | 3,9 × 10 ⁻⁶ | + |
| 24 | 100 | 11,6 | 6,3 × 10 ⁻⁶ | + | 30 | 9,8 | 3,9 × 10 ⁻⁶ | + |
| 48 | 100 | 6,8 | 2,5 × 10 ⁻⁶ | — | 2340 | 6,2 | 0,4 × 10 ⁻⁶ | — |

Równolegle do zmiany drobiny substancji grupowych, przy przejściu od mukoproteidu do mukopolisacharydu, zmienia się ich zachowanie wobec stężonych roztworów Na₂SO₄. Jak widać z tablicy 7, w miarę postępu czasu trawienia zmniejsza się ilość frakcji wypadającej z hydrolizatu przy 20⁰/₀ Na₂SO₄ w stosunku do frakcji wypadającej przy 30⁰/₀ Na₂SO₄. Aktywniejsze są zawsze preparaty o mniejszej zawartości azotu. Preparaty do 9,8⁰/₀ azotu strącają się także pod wpływem 10⁰/₀ CCl₃COOH.

Krzywe spektrofotometryczne w zakresie 2200—3300 Å przedstawia rys. 3. Do pomiaru wybrano dwa preparaty o 13,6⁰/₀ azotu i o 6,1⁰/₀ azotu oraz preparat otrzymany z tkanki ludzkiej drogą ekstrakcji NaCl. Jak widać, żaden z tych preparatów nie wykazuje maksimum charakterystycznego dla aromatycznych aminokwasów i kwasów nukleinowych.

Tablica 8 zestawia ruchliwość elektroforetyczną badanych preparatów w zależności od pH. Ruchliwość zarówno mukoproteidu, jak i mukopoli-

sacharydu zmniejsza się przy niższym pH. Różnica ta jest większa dla mukoproteidu grupowego niż dla mukopolisacharydu, zależy więc od ilości składnika peptydowego zawartego w drobinie.



Rys. 3. Widmo spektrofotometryczne substancji grupowych
(stężenie substancji = 0,02% w 0,85% NaCl)

● — Preparat Z₁
 ● — „ Z₂
 ● — „ Z₃

Tablica 8

Ruchliwości elektroforetyczne mukoproteidów i mukopolisacharydów
grupowo aktywnych

| Preparat | Azot całkowity w % | Ruchliwość elektroforetyczna w buforze weronalowym (o $\mu=0,1$) w $\text{cm}^2 \text{sek}^{-1} \text{V}^{-1}$ | | |
|----------------|--------------------|---|--------|--------|
| | | pH 8,6 | pH 8,0 | pH 7,1 |
| Z ₁ | 13,6 | — 6,5*) | — 4,0 | — 2,1 |
| Z ₂ | 10,3 | — 4,2 | — 3,7 | — 0,9 |
| Z ₃ | 6,1 | — 0,9 | — 0,7 | — 0,5 |

*) Wartości podane w rubrykach 3, 4 i 5 są mniejsze od rzeczywistych 10⁶ razy.

DYSKUSJA

Otrzymaliśmy z materiału tkankowego mukoproteid grupowo aktywny, rozpuszczalny w wodzie, zawierający 13,6% azotu całkowitego. Mukoproteid ten zbudowany jest w 80,0% z części peptydowej i 20,0% z części cukrowej. W skład części cukrowej wchodzi 10,6% heksozamin, 5,0% heksoz, 1,1% metylopentozy.

Mukoproteid otrzymany przez nas jest jednorodny zarówno w teście rozpuszczalności, jak i w badaniu elektroforetycznym.

Aktywność tego mukoproteidu podczas oczyszczania go wzrastała. Oczyszczony preparat miał w naszych oznaczeniach przy pomocy testu hemaglutynacyjnego aktywność 6,0 μg na 100 jedn. aglut. w 1 ml. Jest ona około 10 razy niższa od przeciętnej aktywności mukopolisacharydów grupowych. Frakcjonowana ekstrakcja i frakcjonowane wytrącanie wskazują na to, że aktywność tego preparatu nie może być związana z obecnością tylko domieszki substancji aktywnej. W przypadku, gdyby aktywność mukoproteidu, otrzymanego przez nas, zależała od obecności wolnego aktywnego mukopolisacharydu, musiałby on występować w około 10%, co łatwo dałoby się wykryć za pomocą testu rozpuszczalności.

Fakt, że mukoproteid grupowy można również otrzymać na drodze bezpośredniej ekstrakcji tkanek mocznikiem przemawia za tym, że substancje grupowe w formie właśnie takiego sympleksu trwałego występują w tkankach.

Zachowanie opisanego przez nas związku przy ogrzaniu w różnych pH , przy działaniu różnymi rozpuszczalnikami organicznymi, stężonymi solami czy odczynnikami wytrącającymi białko, wskazuje, że mamy do czynienia z sympleksami bardzo trwałymi. Pozwala to wnioskować, że wiązania między poszczególnymi składnikami mukoproteidu są przeważnie o typie kowalentnym.

Badania nasze nad hydrolizą enzymatyczną tkanki żołądkowej wykazują, że istnieje szereg grupowo aktywnych sympleksów o różnej zawartości aminokwasów i cukrów. Preparat izolowany na początku hydrolizy enzymatycznej zawiera około 80% części aminokwasowej i 20% części cukrowej. Po zakończeniu tego procesu preparat zawiera jeszcze około 25% części aminokwasowej i około 75% części cukrowej. Ta pozostała część aminokwasowa nie poddaje się dalszemu trawieniu peptycznemu. Ubytek części aminokwasowej wynosi więc około 70% jej zawartości w mukoproteidzie. Przyrost poszczególnych składników części cukrowej substancji grupowej nie jest proporcjonalny. Zawartość heksozamin z początkowej wartości 10,6% wzrasta do 23,0%, a więc około 2,2-krotnie wtedy, gdy ilość cukrów reagujących w odczynie Molischa

wzrasta z 5,0% do 45,0%, a więc 9-krotnie po zakończeniu hydrolizy peptycznej.

Zmiany chemiczne, jakim podlegają preparaty substancji grupowych w przebiegu hydrolizy enzymatycznej, nie polegają więc jedynie na odszczepieniu części aminokwasowej, dotyczą one również wyraźnie zmian w części cukrowej. W preparacie izolowanym na początku hydrolizy peptycznej część cukrowa składa się z heksozamin i heksoz w proporcji 2 do 1. Pod koniec hydrolizy stosunek ten się zmienia i wynosi 1 do 2. Tablica 5 zawiera dane dotyczące preparatów, których czystość i jednorodność była szczególnie starannie sprawdzana.

Z nielicznych zresztą oznaczeń preparatów pośrednich wynikałoby, że przemiana taka nie zachodzi w sposób ciągły. Preparaty o azocie peptydowym, wynoszącym około 9,0%, wykazują w części cukrowej stosunek aminocukrów do heksoz jeszcze jak 2 do 1. Z danych naszych wynika więc wniosek, że na pewnym etapie trawienia peptycznego dochodzi również do odszczepienia heksozamin, co pociąga za sobą zmianę stosunku ich do heksoz w części cukrowej mukopolisacharydu.

Zmiana składu części cukrowej w miarę ubywania reszt peptydowych nie jest wynikiem jedynie obranych przez nas warunków doświadczalnych jak niskie *pH* czy ewentualne zanieczyszczenie pepsyny. Zjawisko to potwierdza się również przy zestawieniu danych analitycznych preparatów mukopolisacharydu i mukoproteidu otrzymanych na drodze bezpośredniej ekstrakcji tkanek. Mukoproteid otrzymany przez nas działaniem na tkankę mocznikiem czy roztworem NaCl oraz mukopolisacharyd — otrzymany bezpośrednio z wydzielin normalnych [7] i patologicznych [1] również wykazują taką samą różnicę w proporcji cukrów do aminokwasów.

Przyrost heksoz w miarę trwania hydrolizy peptycznej odpowiada dość dokładnie przyrostowi aktywności, co wskazuje na prawdopodobną korelację między ilością heksozy, konkretnie galaktozy, a aktywnością substancji grupowej. Fakt ten nie wiąże się prawdopodobnie w jakiś prostszy sposób ze swoistością substancji grupowych.

Jest rzeczą ciekawą, że związki Z_1 , Z_3 i L_1 nie wykazują żadnych charakterystycznych różnic w przebiegu krzywych spektrofotometrycznych. Preparat mukoproteidowy i również mukopolisacharydy nie wykazują charakterystycznej dla białek absorpcji w zakresie 2800 Å.

Dodatkowym dowodem, że część aminokwasowa substancji grupowych jest uboga w aminokwasy aromatyczne, jest fakt, że mukopolisacharyd nie reaguje z odczynnikiem Folin-Ciocalteu. Jak mogliśmy stwierdzić, mukoproteid grupowy w stężeniu do 0,01% również nie daje reakcji, dopiero w stężeniu 0,1% reakcja wypadła bardzo słabo dodatnio. Fakty

te świadczą o tym, że peptydy mukopolisacharydu i mukoproteidu nie zawierają aminokwasów aromatycznych w ilościach występujących najczęściej w białkach.

Wyliczona graficznie lepkość graniczna mukoproteidu wynosi 0,318, zaś dla mukopolisacharydu 0,343. Przyjmując, że średnia objętość cząstkowa mukoproteidu wynosi 0,75, zaś mukopolisacharydu 0,635, wyliczamy wartość „viscosity increment“, przy czym dla mukoproteidu wynosi ona 425, a dla mukopolisacharydu 545. Te ostatnie wielkości $[\nu]$ wg Simhy [15] zależą od stopnia asymetrii drobin. Przy elipsoidalnych pałeczkach zależność między stosunkiem osi $J = a/b$ od wartości ν wyraża poniższe równanie:

$$\nu = \frac{J^2}{15 (\log 2J - 3/2)} + \frac{J^2}{5 (\log 2J - 1/2)} + \frac{14}{15}$$

Z tej zależności można wyliczyć, że dla mukopolisacharydu $J = 94$, zaś dla mukoproteidu $J = 82$. Liczba J dla mukopolisacharydu jest większa niż otrzymana przez Morgana [1], tłumaczy się to tym, że Morgan pracował na preparatach z cysty jajnikowej ludzkiej, której ciężar drobinowy wynosi około 270 000, nasz preparat jest z tkanek wieprzowych. Substancje otrzymane z takiego materiału odznaczają się znacznie wyższym ciężarem drobinowym, wynoszącym około 1 000 000.

Na zmianę lepkości z postępowaniem hydrolizy enzymatycznej substancji grupowych wpływają dwa przeciwstawne procesy. Zależnie od czasu trwania i warunków proteolizy może zachodzić pewna degradacja, która zmniejsza lepkość. Z drugiej zaś strony zmianom chemicznym, polegającym na przejściu od przewagi udziału części peptydowej do przewagi udziału części wielocukrowej w drobinie substancji grupowej, towarzyszy zwiększenie stopnia asymetrii i ewentualnej hydratacji drobin, a stąd zwiększenie lepkości. Jak widać z naszych doświadczeń, wpływ zwiększenia asymetrii ewentualnej hydratacji znacznie przeważa nad wpływem ewentualnej degradacji w hydrolizie substancji grupowych i stąd tak znaczny wzrost lepkości preparatów.

Badania elektroforetyczne wykazały, że w tym samym pH ruchliwość zmniejsza się ze zmniejszeniem się zawartości peptydu. Różnice te wrażliwość elektroforetyczną. Przyjmując, że ruchliwość elektroforetyczna mukoproteidu i mukopolisacharydu jest wypadkową wpływu składnika peptydowego i wielocukrowego, można wyliczyć przybliżoną ruchliwość obu składników z danych tablicy 8. Opierając się na danych zawartości proteidu i polisacharydu w mukoproteidzie i mukopolisacharydzie (Tabl. 5) oraz na oznaczonej wartości ruchliwości elektroforetycznej (Tabl. 8) wyliczono ruchliwość elektroforetyczną składników na podstawie układu

równań z dwiema niewiadomymi. Ruchliwość elektroforetyczna przy pH 8,6 dla składnika peptydowego wynosi $-8,53 \times 10^{-5}$, zaś dla wielocukrowego $+1,64 \times 10^{-5}$, analogicznie wartości te przy pH 7,1 wynoszą $-2,68 \times 10^{-5}$ i $+0,22 \times 10^{-5}$. Na ruchliwość elektroforetyczną obu sympleksów ma więc decydujący wpływ część peptydowa.

Ze świeżej tkanki żołądkowej ludzkiej udało się przez ekstrakcję roztworem soli także otrzymać mukoproteidy grupowo aktywne. Frakcjonowanie alkoholem pozwoliło rozdzielić te mukoproteidy na związki o zawartości od 13% do 9,4% azotu całkowitego. Wskazuje to, że mukopolisacharydy grupowe wydzielane z sokiem żołądkowym pochodzą prawdopodobnie z substancji grupowo aktywnych tkankowych, a nie są formą oddzielnie wytwarzaną przez ustrój.

Jak wykazali Mański, Kozdroj i Radola [11], swoistość grupowa związana jest tylko z elementem strukturalnym, a nie z całą cząsteczką grupowo aktywną. Termin substancje grupowe obejmuje więc różne ugrupowania chemiczne o aktywności grupowej. Obecne nasze doświadczenia wykazują, że drobina aktywna grupowo występująca w tkankach jest mukoproteidem o około 80% części peptydowej. Zmiany aktywności, składu chemicznego i własności fizycznych, jakie opisaliśmy wyżej, dotyczą drobin substancji aktywnej grupowo, w miarę odszczepiania od niej składnika peptydowego przy zachowaniu w pozostałej części drobin elementu strukturalnego, grupowo swoistego.

Trawienie pepsyną lub trypsyną nie pozwala na całkowite usunięcie części aminokwasowej z sympleksu grupowego. Proces trawienia zatrzymuje się przy zawartości około 25% części aminokwasowej. W ten sposób otrzymana substancja z tkanek ma analogiczny skład co mukopolisacharyd grupowy izolowany z soków ustrojowych.

Należy więc przyjąć, że w sympleksach grupowych, przez nas izolowanych, część aminokwasowa występuje jakby w dwóch frakcjach — poddającej się łatwo trawieniu peptycznemu i nie poddającej się.

Z naszych doświadczeń wynika więc, że rodzimy sympleks grupowy w komórkach występuje jako co najmniej trójskładnikowe połączenie: (nietrawiony) peptyd-wielocukier-peptyd (trawiony) w odróżnieniu od substancji grupowych o niższej zawartości azotu, jakie izoluje się z soków ustrojowych w postaci sympleksu dwuskładnikowego: wielocukier-peptyd (nietrawiony).

W organizmie substancje grupowe rozpuszczalne w wodzie występują w wielu postaciach o różnej zawartości peptydu. Rodzimy mukoproteid grupowy może być w komórce połączony jeszcze z innym składnikiem peptydowym czy z większą ilością tego samego składnika peptydowego, jaki występuje w mukoproteidzie i jaki poddaje się działaniu enzymów pro-

teolitycznych. Może on również występować jako rodzimy w luźnym związku z innymi połączeniami, tworząc sympleksy mieszane, nierozpuszczalne, a rozpadające się w czasie proteolizy. Nie wiadomo też dotychczas, jaki jest stosunek mukoproteidu grupowego do opisanego przez Masamune i współpr. trójskładnikowego mukolipidu grupowego z tkanek. Być może, że występują one oddzielnie, albo tworzą jakiś makrosympleks o typie peptyd-wielocukier-peptyd $\frac{1}{2}$ -peptyd-wielocukier-tłuszcz lub podobny, który w warunkach preparatywnych rozpada się w miejscu zaznaczonym linią pionową. Metody preparatywne zastosowane przez Masamune i współpr. wskazywałyby na to, że sam mukolipid grupowy jest sympleksem również silnie związanym i trwałym.

STRESZCZENIE

Otrzymano z żołądków świń bezpośrednio po solubilizacji tkanki na drodze trawienia peptycznego mukoproteid o aktywności grupowej A. Substancja ta wędruje w polu elektrycznym jako pojedynczy składnik. Ruchliwość jej w pH 8,0 wynosiła $-4 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ sek}^{-1} \text{ V}^{-1}$. Substancja ta była jednorodna w teście rozpuszczalności. Aktywność jej wynosiła 6,0 μg na ml surowicy zawierającej 100 jednostek hemaglutynacyjnych.

Mukoproteid grupowy zawiera 80% części peptydowej i 20% części wielocukrowej. W skład części cukrowej wchodzi 5,0% heksozy, 10,6% heksozaminy i 1,1% metylopentozy. Pomiar spektrofotometryczny w ultrafiolecie wskazuje na nieobecność aromatycznych aminokwasów. Taki sam mukoproteid otrzymano na drodze solubilizacji świeżej tkanki żołądkowej ludzkiej mocznikiem.

Badania nasze wykazały, że opisany mukoproteid jest sympleksem bliższym sympleksowi grupowemu występującemu w komórkach niż mukopolisacharyd.

Zbadano własności preparatów substancji grupowych izolowanych w przebiegu hydrolizy peptycznej tkanki żołądkowej świń. W miarę odszczepiania reszt peptydowych wzrasta aktywność i lepkość, natomiast maleje ruchliwość elektroforetyczna. Zmienia się również stosunek aminocukrów do cukrów. W preparatach o 13,6% N, więc o przewodze części peptydowej, wynosi on 2:1, w preparatach mukopolisacharydowych o 6,1% N — 1:2. Zmiana składu części cukrowej nie zachodzi w sposób ciągły. W preparatach o 10,3% N stosunek ten wynosi jeszcze 2:1. Zjawisko to nie zależy od postępowania preparatywnego. Żaden z preparatów otrzymanych nie wykazuje maksimum absorpcji przy 2800 Å.

Tylko 70% części peptydowej mukoproteidu grupowego poddaje się trawieniu peptycznemu. Należy więc przyjąć, że jest to trójskładnikowy

sympleks: (nieprawiony) peptyd-wielocukier-peptyd (prawiony), wtedy gdy mukopolisacharyd grupowy jest sympleksem dwuskładnikowym: wielocukier-peptyd (nieprawiony).

Ze świeżo przemytej tkanki żołądkowej ludzkiej można wyekstrahować roztworem NaCl substancje grupowe o zawartości od około 13% do 9% N. Przemawia to za tym, że substancje grupowe występujące w soku żołądkowym nie są formą oddzielnie syntetyzowaną, ale powstałą w ustroju w czasie hydrolizy enzymatycznej *in vivo* tkankowych substancji grupowych.

L I T E R A T U R A

- [1] Aminoff D., Morgan W. T. J., Watkins W. M., *Biochem. J.* **46**, 438, 1950.
- [2] Dische Z., Shettles L. B., *J. biol. Chem.* **175**, 595, 1948.
- [3] Hamasato J., *Tohoku Jour. Exp. Med.* **52**, 17, 1950.
- [4] Hawk Th., *Practical Physiological Chemistry*, Philadelphia, 1949.
- [5] Kabat E., *Blood Group Substances, Their chemistry and immunochemistry*, Academic Press, N. Y., 1956.
- [6] Lugg J. L. L., *Biochem. J.* **32**, 2114, 1938.
- [7] Mański W., *Chemia Substancji Grupowych*, Wrocławskie Tow. Nauk., Serbia B, nr 60, 1952.
- [8] Mański W., *Arch. Immunol. Terapii Dośw.* **1**, 289, 1953.
- [9] Mański W., Kozdroj H., *Bull. Acad. Polon. Sci., Cl. II*, **4**, 219, 1956.
- [10] Mański W., Kozdroj H., *Biochemia substancji grupowych krwi w monografii L. Hirszfelda; Grupy Krwi*, P.Z.W.L., 1957.
- [11] Mański W., Kozdroj H., Radola M., *Bull. Acad. Polon. Sci., Cl. II*, **4**, 225, 1956.
- [12] Masamune H., Maehara T., Hakomori S., *Tohoku Jour. Exp. Med.* **59**, 225, 1954.
- [13] Masamune H., Tokura M., Satoh R., *Tohoku Jour. Exp. Med.* **57**, 21, 1952.
- [14] Somogyi M., *J. Biol. Chem.* **70**, 599, 1926.
- [15] Simha R., *J. Physical. Chem.* **44**, 25, 1940.
- [16] Stacey M., *Advances in Carbohydrate Chemistry* **2**, 162, 1946.

RESEARCH ON THE POLYMORPHISM OF BLOOD GROUP-SUBSTANCES

S u m m a r y

An A-group active mucoproteid was obtained from pig stomachs immediately after solubilization of the tissue by peptic digestion. The substance migrated in an electric field as a single component. Its mobility at pH 8.0 was— 4×10^{-5} cm.² sec.⁻¹ V⁻¹. The substance was homogeneous in solubility tests. Its activity was 6.0 μg/100 haemagglutination units ml. of serum.

The group mucoproteid comprised 80 and 20 per cent of peptide and saccharide fractions, respectively. The saccharide fraction included 5.0 per cent of hexose, 10.6 per cent of hexosamine and 1.1 per cent of methylpentose. Spectrophotometric measurements in ultraviolet indicated absence of aromatic amino acids.

An identical mucoproteid was obtained from fresh human stomach tissue after solubilization with urea.

The mucoproteid described is a form more closely allied to the group symplex of cells than the mucopolysaccharide investigated so far.

The authors examined the properties of the preparations of group substances isolated in peptic hydrolysis of the stomach tissue of pigs. Amino acid residues were split off, activity and viscosity grew, whereas the electrophoretic mobility decreased. Also the ratio of amino sugars to sugars was noted to change. It was 2 : 1 in preparations containing 13.6 per cent of N, i.e. in those in which the peptide part predominated, being 1 : 2 in mucopolysaccharide preparations containing 6.1% of N. The change in the composition of the sugar part did not occur in a continual manner. In preparations containing 10.3 per cent of N the ratio was still 2 : 1. The phenomenon did not depend upon methods of preparation. None of preparations showed maximum absorption at 2800 Å.

Only 70 per cent of the peptide part of the group mucoproteid was amenable to peptic digestion. Consequently, it has to be assumed that it represents a triple symplex: (indigestible) peptide-polysaccharide-(digestible) peptide, while the group mucopolysaccharide is a double symplex: polysaccharide- (indigestible) peptide.

Group substances containing between 13 and 9 per cent of N can be extracted with the aid of NaCl solution from fresh washed tissue of a human stomach. This indicates that the group substances found in the gastric juice are not separately synthesized, but that they are produced in the organism in the course of *in vivo* enzymatic hydrolysis of tissue group substances.

Otrzymano 15.1.58 r.

A. M. DANCEWICZ, B. LIPiŃSKI

WPLYW PROMIENIOWANIA RENTGENOWSKIEGO NA DEHYDRAZĘ KWASU δ -AMINOLEWULINOWEGO *IN VITRO*

Z Zakładu Ochrony Zdrowia Instytutu Badań Jądrowych w Warszawie
Kierownik: doc. dr E. Kowalski

Badania nad biosyntezą hemu doprowadziły do stwierdzenia, że jednym z wczesnych prekursorów hemu jest kwas δ -aminolewulinowy (ALA), którego konwersję do porfobilinogenu (PBG) katalizuje enzym [18] zwany dehidrazą kwasu δ -aminolewulinowego (ALAD) oczyszczony i opisany w 1955 r. przez Gibsona i współpr. [12]. Zachowanie się tego enzymu pod działaniem promieniowania jonizującego nie było dotychczas badane. Z licznych prac dotyczących wpływu promieniowania jonizującego na enzymy [1, 2, 3, 5, 9, 10, 16, 17] wiadomo, że pomimo dość istotnej różnicy w skutkach działania promieniowania *in vitro* i *in vivo* wyniki badań *in vitro* okazują się pomocne w wyjaśnieniu niektórych zagadnień mechanizmu działania energii jonizującej.

Jednym z istotnych skutków działania tej energii na ustrój zwierzęcy jest zaburzenie procesów krwiotwórczych, między innymi biosyntezy hemu [8, 15, 19]. Przedstawione w niniejszej pracy wyniki badania aktywności dehidrazy kwasu δ -aminolewulinowego poddanej działaniu promieniowania rentgenowskiego *in vitro* przyczynić się mogą do poznania pośrednich przyczyn i mechanizmu popromiennych zakłóceń hemopoezy.

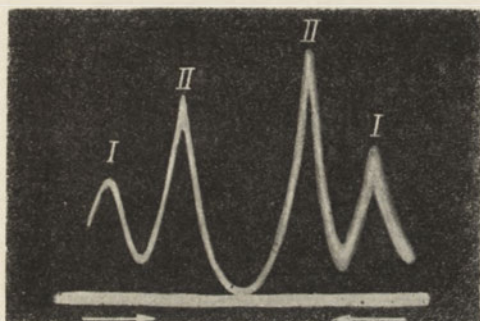
CZĘŚĆ DOSWIADCZALNA

A. Materiały

Homogenat wątroby wołowej — świeżą wątrobę homogenizowano w przeciągu 3 min z dwukrotną wagowo ilością 0,15 M roztworu KCl oziębionego uprzednio do 0°.

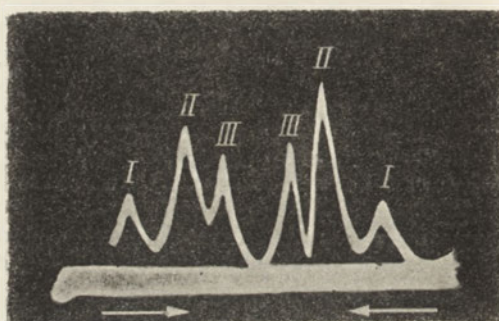
Ekstrakt wątrobowy — otrzymano przez 10-minutowe odwirowanie homogenatu przy 25 000 g.

Roztwór oczyszczonego enzymu — oczyszczoną ALAD otrzymywano wg metody Gibsona i współpr. [12]. Jako materiału wyjściowego używano homogenat świeżej wątroby. Na każdym etapie oczyszczania enzymu oznaczano równolegle czynność enzymatyczną i zawartość azotu białkowego. Ponadto sprawdzono elektroforetycznie jednorodność białka. Maksymalnie oczyszczona ALAD dawała obraz elektroforetyczny typowy dla białka jednorodnego (pojedyncze maksimum) (Rys. 1). W porównawczo podanym rys. 2 obraz elektroforetyczny z trzeciego etapu oczyszczania ALAD wykazuje niejednorodność składu białkowego. Oprócz maksimum typowego dla białka enzymu stwierdza się maksimum, które należy przypisać obecności białka balastowego.



Rys. 1. Obraz elektroforetyczny ALAD oczyszczonej 90-krotnie w stosunku do ekstraktu z osadu acetonowego

Aktywność = $5,0 \mu\text{M}$ PBG/ml/godz
Zawartość białka $4,5 \text{ mg/ml}$
Krzywa zstępująca \rightarrow i wstępująca \leftarrow
Czas 1540 sek
I — gradient
II — frakcja białkowa enzymu



Rys. 2. Obraz elektroforetyczny ALAD oczyszczonej 15-krotnie w stosunku do ekstraktu z osadu acetonowego

Aktywność = $0,15 \mu\text{M}$ PBG/ml/godz
Zawartość białka $4,9 \text{ mg/ml}$
Krzywa zstępująca \rightarrow i wstępująca \leftarrow
Czas 1580 sek
I — gradient
II — frakcja białkowa enzymu
III — frakcja białka balastowego

Kwas δ -aminolewulinowy — otrzymywano wg Neubergera i Scotta [14]. Oczyszczony chlorowodorek ALA wykazywał temp. topnienia $149\text{--}151^\circ$. Do badań używano $0,2 \text{ M}$ roztwór chlorowodoru przechowywany w 0° , który przed użyciem zobojętniano $0,2 \text{ M}$ NaOH.

Odczynnik Ehrlicha — 2% roztwór *p*-dwumetyloaminobenzaldehydu cz. prod. f-my „Mikrochemia“ w 5 N HCl.

Glutation — $0,03 \text{ M}$ roztwór zredukowanego glutationu w wodzie redestylowanej.

B. Metody

Aktywność ALAD oznaczano wg Gibsona i współpr. [12] wyrażając ją w μM utworzonego porfobilinogenu na 1 ml roztworu enzymu w ciągu 1 godz . Oznaczenie wykonywano następująco:

Próbkę zawierającą enzym mieszano z 1 ml 0,03 M roztworu glutationu (w niektórych oznaczeniach, w celu sprawdzenia odwracalnego zmniejszenia aktywności, glutationu nie dodawano) oraz z 1 ml lub więcej 0,07 M buforu fosforanowego o pH 6,8 (całkowita objętość wynosiła 3 ml) i inkubowano w probówce Thunberga w próżni w ciągu 1 godz w temp. 38° . Po tym czasie dodawano 0,33 ml 0,1 M roztworu zobojętnionego chlorowodoru ALA, doprowadzono pH mieszaniny do 6,8 za pomocą 0,2 M NaOH, usuwano powietrze i inkubowano w ciągu 1 godz w temp. 38° . Następnie dodawano koloidowego tlenku żelaza oraz 2 krople nasyconego roztworu $CuSO_4$, wstrząsano przez 10 sek i wirowano 2—3 min. Ilość utworzonego PBG oznaczano spektrofotometrycznie po zmieszaniu warstwy z nad osadu z inkubowanej próbki z odczynnikiem Ehrlicha w stosunku 1 : 1 (obj./obj.). Pomiaru współczynnika ekstynkcji dokonywano po 3 min od chwili zmieszania, w fali $555 m\mu$ wobec ślepej próbki zawierającej odczynnik Ehrlicha i warstwę z nad osadu z próbki inkubowanej bez dodatku ALA. Dla obliczenia ilości PBG z uzyskanych wartości absorpcji świetlnej zastosowano molarny współczynnik ekstynkcji $E = 3,6 \cdot 10^4$ [13].

Wyniki analiz cytowane w tablicach stanowią średnie z dwu lub trzech równoległych oznaczeń. Różnice pomiędzy poszczególnymi oznaczeniami nie przekraczały 5% wartości średniej.

Białko oznaczano metodą Folina i Ciocalteu [11], a dla dokładnego obliczenia zawartości białka, oznaczano azot metodą Kjeldahla.

Jednorodność białka enzymu w toku oczyszczania sprawdzono elektroforetycznie, stosując metodę wolnej elektroforezy w aparacie Tiseliusa typu Fokal-F w buforze weronalowym o pH 8,6 i $\mu = 0,1$ przy prądzie 10 mA i temp. $2,5^{\circ}$.

Pomiary widma absorpcyjnego dokonywano na spektrofotometrze typu Unicam SP-500 w 1 cm kiwetach kwarcowych w temp. 22° . Pomiary spektrofotometryczne produktu reakcji PBG z odczynnikiem Ehrlicha wykonywano na aparacie typu Unicam SP-400.

Warunki napromieniania. Próbkę zawierającą enzym napromieniano promieniami X w naczyniach szklanych o średnicy 2,5 cm, z aparatu rentgenowskiego „Stabilipan“ f-my Siemens (250 kV, 20 mA). Stosowano napięcie 180 kV, a prąd 20 mA, filtry 0,5 mm Cu lub 2 mm Al. Odległość próbek od środka lampy — 25 cm. Dawkę wyznaczano za pomocą dozimetru Siemens Universal Dosismesser z komorą naparstkową. Próbki kontrolne, nie napromieniane, przechowywane były w tych samych warunkach co napromieniane (temp. 20°), a aktywność ich oznaczano równolegle.

C. Wyniki

W celu poznania wpływu promieniowania jonizującego na ALAD *in vitro*, zbadano aktywność tego enzymu w homogenatach i ekstraktach wątrobowych oraz w roztworach oczyszczonego enzymu, po napromienianiu ich promieniami X w zakresie dawek od 0 do 82 000 rentgenów (r.).

1. *Napromienianie homogenatów wątrobowych.* Wpływ promieniowania jonizującego na aktywność ALAD w homogenacie jest nieznaczny. W tabelicy 1 podano wyniki oznaczeń aktywności ALAD z trzech różnych doświadczeń, które w pierwszej serii wykonywano z dodatkiem glutationu, a w drugiej bez glutationu.

Tablica 1

Aktywność dehydroazy kwasu δ -aminolewulinowego w homogenatach wątroby wołu, napromienianych różnymi dawkami promieniowania rentgenowskiego

| Napromieniany materiał | Dawka w rentgenach | Aktywność ALAD w μ M PBG/ml/godz | | | Strata aktywności w % | | | |
|--|--------------------|--------------------------------------|-------|--------|-----------------------|-----|------|---------|
| | | I | II | III | I | II | III | średnio |
| Homogenat wątrobowy (aktywność oznaczana bez glutationu) | 0 | 0,112 | 0,106 | 0,0758 | — | — | — | — |
| | 35 400 | 0,112 | 0,106 | 0,0746 | 0 | 0 | 1,6 | 0,5 |
| | 70 800 | 0,107 | 0,104 | 0,0680 | 4,4 | 1,8 | 10,1 | 5,4 |
| Homogenat wątrobowy (aktywność oznaczana z glutationem) | 0 | 0,112 | 0,112 | 0,0746 | — | — | — | — |
| | 35 400 | 0,112 | 0,112 | 0,0746 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 70 800 | 0,109 | 0,110 | 0,0746 | 2,6 | 1,7 | 0 | 2,1 |

Otrzymane wyniki wskazują na nieznaczny stopień inaktywacji odwracalnej (oznaczanie bez glutationu) i nieodwracalnej (oznaczanie z glutationem), jakiej uległ enzym po napromienianiu homogenatu wątrobowego.

2. *Napromienianie ekstraktów wątrobowych.* W celu stwierdzenia, w jakim stopniu obecność nierozpuszczalnych składników w homogenatach wątroby wpływa ochronnie na czynność ALAD, poddano napromienianiu ekstrakty wątrobowe pozbawione cząstek stałych. Wyniki oznaczeń aktywności ALAD w napromienianych ekstraktach podano w tabelicy 2. Zmniejszenie aktywności ALAD oznaczanej bez dodawania glutationu jest większe aniżeli w przypadku oznaczania po dodaniu glutationu. Wyniki te wskazują, że odwracalne zmniejszenie aktywności enzymatycznej w ekstrakcie jest większe aniżeli w homogenacie. Nieodwracalne zmniejszenie aktywności, (oznaczanie z dodatkiem glutationu) zbliżone jest natomiast do wartości otrzymywanych po napromienianiu pełnych homogenatów.

T a b l i c a 2

Aktywność dehydrazy kwasu δ -aminolewulinowego w ekstraktach wątrobowych napromienianych różnymi dawkami promieniowania rentgenowskiego

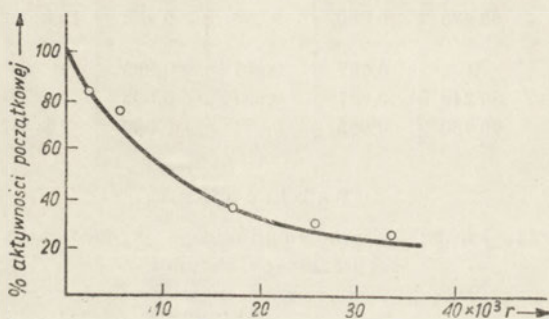
| Napromieniany materiał | Dawka w rentgenach | Aktywność ALAD w μ M PBG/ml/godz | | | Strata aktywności w % | | | |
|---|--------------------|--------------------------------------|-------|-------|-----------------------|------|------|---------|
| | | I | II | III | I | II | III | średnio |
| Ekstrakt wątrobowy (aktywność oznaczana bez glutationu) | 0 | 0,107 | 0,115 | 0,157 | — | — | — | — |
| | 30 240 | 0,102 | 0,102 | 0,140 | 4,6 | 11,3 | 10,8 | 8,9 |
| | 60 480 | 0,090 | 0,095 | 0,135 | 15,8 | 17,4 | 14,0 | 15,7 |
| Ekstrakt wątrobowy (aktywność oznaczana z glutationem) | 0 | 0,087 | 0,087 | 0,095 | — | — | — | — |
| | 30 240 | 0,087 | 0,087 | 0,095 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 60 480 | 0,085 | 0,081 | 0,090 | 2,3 | 6,9 | 5,2 | 4,8 |

T a b l i c a 3

Aktywność dehydrazy kwasu δ -aminolewulinowego w napromienianych roztworach oczyszczonego enzymu

| Napromieniany materiał | Dawka w rentgenach | Aktywność ALAD w μ M PBG/ml/godz | | Strata aktywności w % | | |
|---|--------------------|--------------------------------------|--------|-----------------------|------|---------|
| | | I | II | I | II | średnio |
| Roztwór ALAD oczyszczonej 85 \times aktywność = 0,61 białko = 3,6 mg/ml A/B = 0,17. Do napromieniania rozcieńczono wodą redest. w stosunku 1 : 20 | 0 | 0,0315 | 0,030 | — | — | — |
| | 2 800 | 0,0265 | 0,0275 | 15,8 | 15,0 | 15,4 |
| | 5 600 | 0,0245 | 0,0245 | 22,2 | 18,3 | 20,5 |
| | 16 800 | 0,0115 | 0,0115 | 63,5 | 61,6 | 62,5 |
| | 25 200 | 0,010 | 0,0095 | 68,2 | 68,3 | 68,2 |
| | 33 600 | 0,009 | 0,0090 | 71,4 | 70,0 | 70,7 |
| Roztwór ALAD oczyszczonej 100 \times A = 2,0 μ M PBG/ml/godz B = 4,0 mg/ml A/B = 0,50. Do napromieniania rozcieńczono wodą redest. w stosunku 1 : 1 | 0 | 1,02 | 1,175 | — | — | — |
| | 3 000 | 1,00 | 1,160 | 2,0 | 0,5 | 1,2 |
| | 6 000 | 1,00 | 1,155 | 2,0 | 1,7 | 1,8 |
| | 12 000 | 0,95 | 1,100 | 6,8 | 6,4 | 6,6 |
| | 18 000 | 0,92 | 1,020 | 9,7 | 13,1 | 11,4 |
| | 25 000 | 0,88 | 0,970 | 13,5 | 17,2 | 15,4 |
| Roztwór ALAD oczyszczonej 90 \times A = 5,6 μ M PBG/ml/godz B = 6,3 mg/ml A/B = 0,90. Do napromieniania rozcieńczono wodą redest. w stosunku 1 : 2 | 0 | 1,40 | 1,29 | — | — | — |
| | 9 400 | 1,40 | 1,26 | 0 | 2,4 | 1,2 |
| | 26 400 | 1,29 | 1,15 | 7,7 | 10,8 | 9,3 |
| | 81 400 | 0,83 | 0,76 | 40 | 42 | 41 |
| Preparat jak powyżej. Do napromieniania rozcieńczono wodą redest. w stosunku 1 : 60 | 0 | 0,063 | 0,057 | — | — | — |
| | 26 400 | 0,028 | 0,028 | 55 | 50 | 52,5 |
| | 81 400 | 0,0025 | 0,0028 | 95 | 95 | 95 |

3. *Napromienianie roztworów oczyszczonego enzymu.* Wyniki napromieniania roztworów oczyszczonego enzymu o różnych zawartościach białka i różnych aktywnościach, przedstawiono w tabelicy 3. Oznaczenia wykonywano z dodatkiem glutationu, ponieważ enzym już w procesie oczyszczania, wskutek łatwego utleniania jego grup SH, ulega inaktywacji. Stopień nieodwracalnej inaktywacji ALAD w roztworach oczyszczonego enzymu, jak wynika z tego zestawienia, zależy od dawki. Funkcję tę graficznie obrazuje krzywa wykładnicza (Rys. 3). Zmniejsze-



Rys. 3. Zależność aktywności dehidrazy kwasu δ -aminolewulinowego od dawki promieniowania. Enzym oczyszczony 85-krotnie, aktywność specyficzna 0,17

Tablica 4

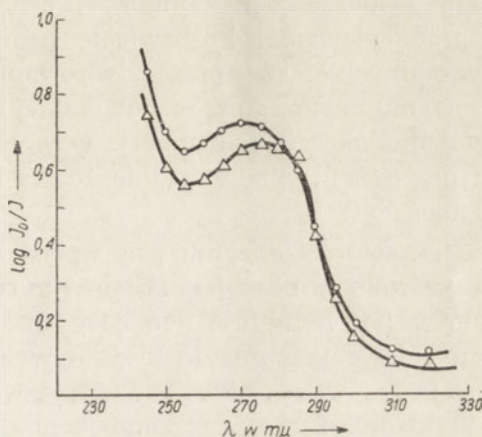
Aktywność ALAD w napromienianych roztworach oczyszczonego (80—100-krotnie) enzymu w zależności od jego aktywności początkowej (przed napromienianiem)

| Dawka w rentgenach | Aktywność początkowa w μ M PBG/ml/godz | Straty aktywności w %% |
|--------------------|--|------------------------|
| 25 000 | 0,03 | 68,2 |
| 26 000 | 0,09 | 52,5 |
| 25 000 | 1,00 | 15,4 |
| 26 000 | 1,86 | 7,9 |

nie aktywności w napromienianych roztworach oczyszczonego (80—100-krotnie) enzymu jest również wyraźnie zależne, jak wynika z tabelicy 3, od początkowego stężenia enzymu. Zestawione porównawczo w tabelicy 4 aktywności ALAD przed i po napromienianiu dawką 25—26 tys. r. roztworów oczyszczonego enzymu wskazują, że przy wzrastającym stężeniu (aktywności) enzymu straty aktywności są mniejsze.

Spektrofotometryczne badanie widma absorpcyjnego napromienianych roztworów oczyszczonej ALAD w nadfiolecie wykazało wzrost absorpcji w zakresie 240—280 $m\mu$ roztworów napromienianych w porównaniu z nie napromienianymi. Równocześnie stwierdza się przesunięcie maksimum

absorpcji z 280 do 270 $m\mu$ i niezmienione minimum przy 255 $m\mu$. Krzywe absorpcji roztworu napromienianego i nie napromienianego jednego z oznaczeń przedstawiono na rys. 4.



Rys. 4. Krzywa absorpcji w nadfioletcie roztworów dehydrazy kwasu δ -aminolewulinowego przed (Δ) i po (\circ) napromienianiu dawką 81 400 r. Aktywność przed napr. 0,7 μ M PBG/ml/godz, po napromienianiu 0,35 μ M PBG/ml/godz. Zawartość białka 1,5 mg/ml, pH 6,8.

OMÓWIENIE WYNIKÓW I WNIOSKI

Działanie promieniowania na enzymy, których czynność uzależniona jest od obecności wolnej grupy SH, polega, jak wiadomo, na utlenianiu tej grupy do formy dwusiarczkowej $-S-S-$, nie wykazującej biologicznej aktywności [3, 5, 7]. Inaktywowane w wodnych roztworach *in vitro* enzymy można częściowo lub całkowicie reaktywować działaniem substancji zawierających wolne grupy SH takich, jak np. cysteina lub glutation [3]. W przypadku niepełnej reaktywacji, nieodwracalna inaktywacja enzymu pod wpływem energii jonizującej polegać może [6, 15] na trwałych zmianach strukturalnych cząsteczki i utlenieniu innych grup funkcjonalnych białka, jak np. NH_2 lub OH. Zmiany te występują na ogół po napromienianiu dawkami rzędu dziesiątków i setek tysięcy rentgenów. Objawiają się one nie tylko zmniejszeniem aktywności, ale również zmianą pewnych cech fizykochemicznych białka [6].

Dehydraza kwasu δ -aminolewulinowego, której czynność enzymatyczna związana jest z obecnością wolnej grupy SH, bardzo łatwo ulega odwracalnej inaktywacji. Już w toku oczyszczania enzymu jego grupy SH ulegają utlenianiu tak, że czynność dehydrazową w roztworach oczyszczonego enzymu można wykazać dopiero po reaktywacji glutationem utlenionych grup SH [12]. Należałoby zatem oczekiwać łatwej inaktywacji

tego enzymu pod wpływem promieniowania jonizującego. Tymczasem napromieniane homogenaty wątroby wykazują stosunkowo dużą odporność na promieniowanie w odniesieniu do aktywności ALAD. Wskazuje to na obecność w pełnych homogenatach czynników ochraniających ALAD przed działaniem promieniowania. Pozbawienie pełnych homogenatów zawiesiny nierozpuszczalnych cząstek przez odwirowanie powoduje zwiększenie wrażliwości enzymu zawartego w rozpuszczalnej frakcji homogenatu (ekstrakcie) na działanie energii jonizującej. Odwracalne zmniejszenie aktywności w tym przypadku wynosi średnio 15,7% przy 2,1% inaktywacji w pełnych homogenatach.

Zmniejszanie się aktywności enzymu pod wpływem promieniowania jonizującego na ich roztwory *in vitro* jest zjawiskiem charakterystycznym u wszystkich enzymów [9]. Zależność pomiędzy zmniejszeniem aktywności a dawką promieniowania obrazuje krzywa wykładnicza. Przebieg inaktywacji zgodny z tą krzywą obserwowano przy dawkach dochodzących do 680 000 r. [15]. Wykładniczą zależność zmniejszenia aktywności ALAD od dawki zaabsorbowanej energii wykazały również nasze badania aktywności enzymu. Równolegle wykazaliśmy zależność pomiędzy zmniejszeniem aktywności enzymu a jego stężeniem. Fakty te są zgodne z teorią pośredniego działania promieniowania jonizującego. Wg tej teorii działanie promieniowania jonizującego na substancje rozpuszczone w wodzie zależy od ich reakcji z produktami radiolizy wody (H , OH , HO_2 , H_2O_2). Dla nie zmienionej dawki promieniowania stopień radiolizy, a tym samym ilość zmienionych cząsteczek substancji rozpuszczonej, pozostaje stały. Zwiększenie stężenia prowadzi do zmniejszenia procentu zmienionych cząsteczek rozpuszczonych. W przypadku ALAD wyraźnie ilustrują tę zależność dane zawarte w tablicy 4.

Badanie widma absorpcyjnego w nadfiolecie roztworu napromienianej oczyszczonej ALAD wykazały, że nieodwracalnej inaktywacji towarzyszą zmiany w aminokwasach białka enzymu. Dowodem tego jest zmiana przebiegu krzywej i wzrost absorpcji w zakresie 240—320 $m\mu$. Zwiększenie absorpcji w fali 280 $m\mu$ z jednoczesnym przesunięciem maksimum do 270 $m\mu$ świadczy, iż w białku tego enzymu stosunek aromatycznych aminokwasów tyrozyna/tryptofan jest większy od 1. Barron i Finkelstein [6] przypisują wzrost absorpcji roztworów napromienianych aminokwasów utlenianiu grup OH tyrozyny. Ponadto Barron i współpr. [4] stwierdzili, że wzrost absorpcji po napromienianiu występuje w tych białkach, w których stosunek aminokwasów tyrozyna/tryptofan jest większy od 1, a zmniejszenie absorpcji wówczas, gdy stosunek ten jest mniejszy od 1. Autorzy ci udowodnili to przez napromienianie i badanie widma czystej tyrozyny i tryptofanu.

Przedstawione wyniki badań wskazują, że dehydraza kwasu δ -aminolewulinowego jest stosunkowo odporna na działanie promieniowania rentgenowskiego *in vitro*. Zachowanie się tego enzymu po napromienianiu *in vivo* jest przedmiotem dalszych badań.

STRESZCZENIE

Badano wpływ promieni X na czynność enzymatyczną dehydrazy kwasu δ -aminolewulinowego *in vitro* w zakresie dawek od 0 do 80 000 r. Odwracalna inaktywacja tego enzymu w napromienianych, pełnych homogenatach wątroby wołu jest nieznaczna; natomiast w ekstraktach, pozabawionych nierozpuszczalnych białek balastowych wynosi ona ok. 16% przy dawce 60 500 r. Roztwory oczyszczonej dehydrazy wykazują zmniejszenie aktywności w stopniu zależnym od dawki promieniowania i stężenia enzymu.

Wzrost absorpcji świetlnej w zakresie 240—280 $m\mu$ stwierdzony w roztworze oczyszczonego enzymu po napromienianiu dawką ok. 80 000 r. wskazuje, że stosunek aromatycznych aminokwasów tyrozyna/tryptofan w białku tego enzymu jest większy od 1.

LITERATURA

- [1] Alexander P., *Radiation Research* 6, 653, 1957.
- [2] Aronson D. L., Fraser M. J., Smith C. L., *Radiation Research* 5, 225, 1956.
- [3] Barron E. S. G., *J. Gen. Physiol.* 32, 537, 1949.
- [4] Barron E. S. G., Ambroze J., Johnson P. H., *Radiation Research* 2, 145, 1956.
- [5] Barron E. S. G., Dickman S., *J. Gen. Physiol.* 32, 595, 1949.
- [6] Barron E. S. G., Finkelstein P., *Arch. Biochem. Biophys.* 41, 212, 1952.
- [7] Barron E. S. G., Seki L., Johnson P., *Arch. Biochem. Biophys.* 41, 188, 1952.
- [8] Bonnichsen R., Hevesy G., *Acta Chem. Scand.* 9, 509, 1955.
- [9] Dale W. M., *Ionizing Radiations and Cell Metabolism, a Ciba Foundation Symposium*, London, str. 34, 1956.
- [10] Dale W. M., Russel C., *Biochem. J.* 62, 50, 1956.
- [11] Folin O., Ciocalteu V., *J. Biol. Chem.* 73, 627, 1927.
- [12] Gibson K. D., Neuberger A., Scott J., *Biochem. J.* 61, 618, 1955.
- [13] Mauzerall D., Granick S., *J. Biol. Chem.* 219, 435, 1956.
- [14] Neuberger A., Scott J., *J. Chem. Soc.* 1820, 1954.
- [15] Okada S., Gehrman G., *Biochim. Biophys. Acta* 25, 179, 1957.
- [16] Pollard E., w Bacq Z. M., Alexander P., *Radiobiology Symposium*, Butterworth Scientific Publications, London, str. 115, 1955.

- [17] Powell W. F., *Progr. Bioph. Biol. Chem.* 5, 72, 1955.
[18] Shemin D., Abramsky T., Russel S. C., *J. Amer. Chem. Soc.* 76, 1204, 1954.
[19] Stohlman F., Cronkite E.P., Brecher G., *Proc. Soc. exper. Biol. Med.* 88, 402, 1955.

THE EFFECT OF X-RAYS ON δ -AMINOLEVULINIC ACID DEHYDRASE *IN VITRO*

Summary

The effect of X-rays up to 80 000 r. on δ -aminolevulinic acid dehydrase *in vitro* was investigated. Reversible inactivation of the enzyme in irradiated homogenized ox liver is insignificant; however, in extracts devoid of insoluble ballast protein, activity was decreased by about 16% at a dose of 60 500 r. Solutions of purified dehydrase showed a decrease of activity dependent on radiation dose and enzyme concentration.

An increase of ultraviolet absorption in the 240—280 m μ wave length was found in purified enzyme solutions after irradiation with 80 000 r., which indicates that the ratio of aromatic aminoacids tyrosine/tryptophan in protein molecules of this enzyme is greater than 1.

Otrzymano 3.2.58 r.

I. REIFER, M. SOLECKA

OKSYDAZY KOŃCOWE KIEŁKÓW PSZENICY*Z Zakładu Biochemii Roślin Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN, Warszawa**Kierownik Zakładu: prof. dr I. Reifer*

Ilość oksydaz końcowych występujących w kielkach pszenicy nie jest ustalona. Z pewnością można tylko stwierdzić występowanie w kielkach oksydazy cytochromowej, której obecność wykazano zarówno manometrycznie [3, 10, 12], jak i spektrofotometrycznie [1, 3, 11]. Obecności oksydazy polifenolowej nie wykazano ani w zarodkach [1], ani w młodych kilkudniowych kielkach [10, 12]. Natomiast występowanie oksydazy askorbinowej jest dotychczas kwestią sporną, gdyż substrat dla tej oksydazy jakim jest kwas askorbinowy może być utleniany również przez inne systemy enzymatyczne, tak miedziowe jak i żelazowe [8, 9].

Celem niniejszej pracy było wykazanie, jakie oksydazy końcowe biorą udział w oddychaniu kielków pszenicy w określonym dniu rozwoju i ewentualne stwierdzenie procentowego udziału tych enzymów.

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA*Material i metody*

Materiałem doświadczalnym była pszenica jara, Ostka Chłopiccka, otrzymana z Reguł — majątku doświadczalnego Instytutu Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa. Ziarno przeznaczone na doświadczenie wyjaławiano powierzchniowo 0,1% roztworem sublimatu przez 5 minut, następnie moczono przez dobę w temperaturze pokojowej, po czym wysiewano do płytek Petri'ego wypełnionych wilgotną watą przykrytą bibułą filtracyjną. Podkiełkowanie odbywało się w termostacie w temp. 29°, w ciemności [3]. Części nadziemne siedmiodniowych kielków¹⁾ pobierano do oznaczeń, gdyż według danych z literatury w tym okresie rozwoju występuje w pszenicy oksydaza cytochromowa [3] i askorbinowa [12].

¹⁾ W dalszej pracy skrócono „nadziemne części kielków“ do „kielki“.

Oznaczano aktywność enzymów zarówno w skrawkach, jak i w rozciarach z kielków. Reakcje przeprowadzano w środowisku odpowiednio zbuforowanym. Bufory przygotowano na wodzie redestylowanej.

Kielki pszenicy osuszano między bibułą filtracyjną i odważano 10 g do analizy. Dla oznaczenia oksydazy cytochromowej (O. C.) materiał roślinny rozcierano w moździerz z 5 ml zamrożonego sodowego buforu fosforanowego²⁾ 0,1 M o pH 7,7 [3]. Próbę rozcierano aż do zniknięcia lodu, następnie szybko wyciskano ręcznie ekstrakt, przez potrójną warstwę gazy, do cylindra umieszczonego w potłuczonym lodzie. pH ekstraktu roślinnego wynosiło około 7. Substraty i inhibitory doprowadzano sodowym buforem fosforanowym do pH 7,4. Do oznaczenia używano 1 ml ekstraktu enzymatycznego o pH 7.

Dla oznaczenia oksydazy polifenolowej ekstrakt z 10 g naważki otrzymano identycznie jak wyżej, z tą różnicą, że rozcierano materiał roślinny z 2,5 ml 0,1 M zamrożonego sodowego buforu fosforanowego o pH 6,0 [10]. Substraty rozpuszczano również w 0,1 M buforze fosforanowym o pH 6,0. Do oznaczenia pobierano 1,5 ml ekstraktu.

Ekstrakty dla oznaczenia oksydazy askorbinowej otrzymano z 10 g kielków pszenicy utartych z lodem odpowiadającym 2,5 ml wody. Inhibitory doprowadzano do pH 5,7 [4] przy pomocy mieszaniny złożonej z Tris i kwasu maleinowego, następnie buforowano roztwory buforem Tris-maleinowym o pH 5,7 [2]. Kwas askorbinowy neutralizowano 0,2 M NaOH i buforowano jak wyżej buforem Tris-maleinowym³⁾ o pH 5,7. Do oznaczenia pobierano 1,5 ml ekstraktu o pH 6,0.

Oznaczenia wykonano w aparacie Warburga w temp. 25° przy czym fazą gazową było powietrze. Aktywność enzymatyczną wyrażano $\mu\text{l O}_2$ na 30 minut po uprzednim wyrównaniu temperatury w łaźni wodnej przez 20 minut. Na dno naczynka Warburga wprowadzano ekstrakt enzymatyczny względnie ekstrakt enzymatyczny z inhibitorem, a do bocznego ramienia substrat. Przy oznaczaniu oksydazy cytochromowej ekstrakt enzymatyczny i substrat znajdowały się w naczynku środkowym, natomiast czynnik redukujący (PPD) — w ramieniu bocznym. W studziencie umieszczono 0,1 ml 30% KOH razem ze zwiniętym i ponacinanym paskiem bibuły o wymiarach 2 cm \times 1 cm dla zwiększenia powierzchni pochłaniania dwutlenku węgla.

²⁾ NaH_2PO_4 i Na_2HPO_4 .

³⁾ W pracy skrócono: bufor Tris-maleinowy na Tris o pH 5,7, $\mu\text{l O}_2/30$ minut w temp. 25° = Q_{O_2} , p-fenylenodwuamina = PPD, dwuetylodwuotiokarbaminian sodu = DDC, oksydaza cytochromowa = O. C., oksydaza polifenolowa = O. P., oksydaza askorbinowa = O. A., kwas askorbinowy = K. A., cytochrom c = cyt. c, ekstrakt = ekstr., gotowany = got.

Tablica 1

Pobieranie tlenu przez 2 mm skrawki kielków pszenicy. Wpływ inhibitorów
Oxygen uptake by 2 mm wheat shoots segments. Effect of inhibitors

| Doświadczenie 1 | M inhibito- ra | P r ó b y | | | | | | | | | | | | | |
|---------------------------|----------------------|----------------------------|-----------------------|----------------------------|-----------------------|----------------------------|-----------------------|----------------------------|-----------------------|----------------------------|-----------------------|----------------------------|-----------------------|----------------------------|-----------------------|
| | | 1 | | 2 | | 3 | | 4 | | 5 | | 6 | | 7 | |
| | | Q _{O₂} | % zahamo- wanie | Q _{O₂} | % zahamo- wanie | Q _{O₂} | % zahamo- wanie | Q _{O₂} | % zahamo- wanie | Q _{O₂} | % zahamo- wanie | Q _{O₂} | % zahamo- wanie | Q _{O₂} | % zahamo- wanie |
| kielki | | -81 | | -92 | | -83 | | | | | | | | | |
| kielki + NaN ₃ | 0,01 | - | | -43 | 53 | -40 | 52 | - | | - | | - | | - | |
| kielki + NaN ₃ | 0,005 | -48 | 41 | -49 | 47 | -44 | 47 | - | | - | | - | | - | |
| kielki + KCN | 0,005 | -53 | 35 | -49 | 47 | -41 | 51 | - | | - | | - | | - | |
| KCN | 0,005 | -2 | | - | | | | | | | | | | | |
| Doświadczenie 2 | | | | | | | | | | | | | | | |
| kielki | | -87 | | -67 | | -79 | | -92 | | -78 | | -87 | | -73 | |
| kielki + DDC | 0,01 | -60 | 31 | -58 | 13 | -60 | 24 | -66 | 28 | -57 | 27 | -64 | 26 | -55 | 25 |
| kielki + DDC | 0,005 | -71 | 18 | -70 | | -70 | 11 | -76 | 17 | -64 | 18 | -69 | 21 | -67 | |
| DDC | 0,01 | +1 | | -2 | | +1 | | -1 | | +5 | | +9 | | +3 | |
| DDC | 0,005 | -3 | | -9 | | +5 | | -3 | | +2 | | +3 | | +3 | |

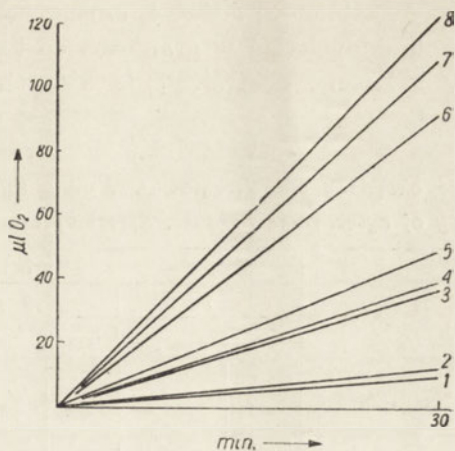
Wyniki

Wstępne badania nad oksydazami końcowymi przeprowadzono na skrawkach kielków celem wykazania ewentualnego występowania oksydaz żelazowych i miedziowych. Badania na skrawkach przeprowadzono w sodowym buforze fosforanowym 0,1 M o pH 7,0 [7]. 1 g kielków, pociętych żyłką na skrawki około 2 mm długości, umieszczono na dnie naczynka Warburga dodając 2 ml buforu względnie 2 ml buforu z inhibitorem. Do studzienki naczynka Warburga pipetowano 0,1 ml 30% KOH, w którym zanurzono bibułę filtracyjną.

W tabelicy 1 podane są wyniki inhibicji przy pomocy KCN, NaN₃, DDC. Inhibicja przy pomocy azydku i cyjanku wykazała około 50% obniżenie współczynnika pobierania tlenu w porównaniu z próbą kontrolną nie zawierającą inhibitora, co wskazywałoby na to, że oddychanie 7-dniowych kielków pszenicy zależy w 50% od enzymów końcowych zawierających żelazo i miedź w grupie prostetycznej. W celu wykazania miedziowych systemów enzymatycznych stosowano DDC. Jak wynika z tabelicy 1 nie otrzymano wyników jednoznacznych. Przy stosowaniu inhibitora o stężeniu 0,01 M uzyskano bowiem inhibicję jedynie w granicach od 13% do 31%, natomiast stosując DDC o stężeniu 0,005 M na siedem analiz w dwóch przypadkach nie zdołano wykazać inhibicji. Dalsze badania oksydaz końcowych wykonano na wyciągach.

Oksydaza cytochromowa. Dodatek PPD do ekstraktu enzymatycznego powoduje wzrost współczynnika pochłaniania tlenu. Dalszą znaczną stymulację obserwuje się po dodaniu cytochromu c (Rys. 1). Z rys. 1 wynika, że współczynnik pobierania tlenu zależy w pewnych granicach od ilości egzogenego cyt. c i stymulacja ta wskazuje na obecność O. C. w ekstrakcie. Większe stężenia cyt. c w ilości $0,4 \times 10^{-7}$ mola nie wpływa zasadniczo na współczynnik pobierania tlenu, co oznacza, że cyt. c przestaje być czynnikiem ograniczającym, ponieważ w odniesieniu do ilości O. C. w ekstrakcie znajduje się on w ilościach nieskończenie wysokich, w których czynnikiem ograniczającym szybkość reakcji jest koncentracja enzymu. Należy zaznaczyć, że niskie stężenie PPD jako czynnika redukującego ogranicza współczynnik reakcji. Dla otrzymania maksymalnego pochłaniania tlenu należy utrzymać stężenie czynnika redukującego 0,05 M. Jak wynika z tabelicy 2 wzrost stężenia PPD do 0,1 M nie wpływa na zwiększenie współczynnika pochłaniania tlenu, natomiast obniżenie do 0,01 M zmniejsza ten współczynnik. Wyniki tej tabelicy pokrywają się z obserwacją Fritza i Beeversa [3], którzy jednakże stosowali PPD o stężeniu 0,1 M.

Obecność O. C. jest udowodniona działaniem inhibitorów — cyjanku potasowego i azydku sodowego, które obniżają pochłanianie tlenu w obec-



- Rys. 1. 1. ekstrakt
 2. PPD 0,05 M*)
 3. ekstrakt got. + PPD 0,05 M
 4. ekstrakt got. + PPD 0,05 M + cyt. c $1,6 \times 10^{-5}$ M
 5. ekstrakt + PPD 0,05 M
 6. ekstrakt + PPD 0,05 M + cyt. c $0,8 \times 10^{-5}$ M
 7. ekstrakt + PPD 0,05 M + cyt. c $1,6 \times 10^{-5}$ M
 8. ekstrakt + PPD 0,05 M + cyt. c $2,4 \times 10^{-5}$ M

*) końcowe stężenie w 2,5 ml

Tablica 2

Wpływ stężenia PPD na współczynnik pochłaniania tlenu
 Effect of PPD concentration on the rate of oxygen uptake

| PPD | P r ó b y | | |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| | 1 | 2 | 3 |
| | Q_{O_2} | Q_{O_2} | Q_{O_2} |
| 0,1 M | - 157 | - 148 | - 125 |
| 0,05 M | - 154 | - 149 | - 118 |
| 0,01 M | - | - 123 | - 95 |

Naczyńko Warburga zawierało:

- 1 ml ekstraktu
 0,4 ml cyt. c $1,0 \times 10^{-4}$ M (wg Kellina, Hartree)
 0,5 ml PPD 0,5 M, pH 7,4
 0,6 ml buf. fosf. 0,1 M, pH 7,4
 0,1 ml 30% KOH
 2,6 ml

ności dodanego cyt. c. W tablicy 3, dośw. 4, umieszczone są wyniki wskazujące na zahamowanie oddychania w granicach od 83% do 100%. Próbę kontrolną stanowiły gotowane ekstrakty, do których następnie dodano

Tablica 3
Aktywność oksydazy cytochromowej. Wpływ inhibitorów
Activity of cytochrome oxidase. Effect of inhibitors

| Doświadczenie 1 | P r ó b y | | | | | |
|--|----------------------------|-----------------------|----------------------------|-----------------------|----------------------------|-----------------------|
| | 1 | | 2 | | 3 | |
| | Q _{O₂} | | Q _{O₂} | | Q _{O₂} | |
| ekstr. + PPD | -- 59 | | -- 73 | | -- 56 | |
| ekstr. | -- 11 | | -- 20 | | -- 8 | |
| PPD | -- 11 | | -- 14 | | -- 12 | |
| Doświadczenie 2 | | % stymu- lacji | | % stymu- lacji | | % stymu- lacji |
| ekstr. + PPD | -- 60 | | -- 56 | | -- 49 | |
| ekstr. + PPD + cyt. c | --117 | 95 | --115 | 105 | --109 | 122 |
| Doświadczenie 3 | | | | | | |
| ekstr. got. + PPD | -- 45 | | -- 53 | | -- 37 | |
| ekstr. got. + PPD + cyt. c | -- 50 | — | -- 56 | — | -- 39 | — |
| Doświadczenie 4 | | % zahamo- wania | | % zahamo- wania | | % zahamo- wania |
| ekstr. got. + PPD | -- 48 | | -- 49 | | -- 44 | |
| ekstr. + PPD + cyt. c | --123 | | --102 | | --134 | |
| ekstr. + PPD + cyt. c + KCN | — | — | -- 47 | 100 | -- 52 | 91 |
| ekstr. + PPD + cyt. c + NaN ₃ | -- 61 | 83 | -- 43 | 100. | -- 52 | 91 |

Naczyńko Warburga zawierało:

1 ml ekstraktu

0,5 ml PPD 0,25 M, pH 7,4

0,4 ml cyt. c $1,0 \times 10^{-4}$ M (f-my Boehringera und Soehne)

0,6 ml buforu fosf. 0,1 M, pH 7,4 albo 0,6 ml KCN lub NaN₃ 0,021 M

0,1 ml 30% KOH

2,6 ml

PPD i cyt. c. Ponieważ dodatek cyt. c do zagotowanego ekstraktu i PPD nie wpływał na pochłanianie tlenu (dośw. 3), przeto w doświadczeniach dalszych kontrolną próbą był zawsze gotowany ekstrakt + PPD.

Fritz i Beevers [3] podają, że w ekstraktach z 7-dniowych korzeni pszenicznych inhibicja pobierania tlenu w obecności KCN wynosiła 55%, a w obecności NaN₃ 50%. Autorzy ci obliczają nieenzymatyczne utlenianie PPD poprzez pomiary współczynnika pochłaniania tlenu przy stałym stężeniu cyt. c i zmiennych stężenia enzymu ekstrapolowanego do zero-

wego stężenia. W tablicy 4 podane są wyniki w odniesieniu do kontroli otrzymanej na drodze ekstrapolacji, z których wynika, że przy takim obliczeniu otrzymuje się inhibicję azydkiem w granicach od 51% do 59%.

Tablica 4

Zahamowanie oksydazy cytochromowej 0,005 M NaN_3
Inhibition of cytochrome oxidase with 0.005 M NaN_3

| | P r ó b y | | | | | | | |
|---------------------------------|-----------|--------------------|--------------|-----------------------|-----------|--------------------|--------------|-----------------------|
| | 1 | | | | 2 | | | |
| | Q_{O_2} | Q_{O_2} na ml | śred- nio | % zahamo- wania | Q_{O_2} | Q_{O_2} na ml | śred- nio | % zahamo- wania |
| 0,5 ml ekstr. | -40 | -80 | } -81 | | -34 | -68 | } -69 | |
| 0,75 ml ekstr. | -62 | -83 | | | | | | |
| 1,0 ml ekstr. | -80 | -80 | | | | | | |
| 0,5 ml ekstr. + NaN_3 | -17 | -34 | } -33 | 59 | -17 | -34 | } -34 | 51 |
| 0,75 ml ekstr. + NaN_3 | -23 | -31 | | | | | | |
| 1,0 ml ekstr. + NaN_3 | -34 | -34 | | | | | | |

Nienenzymatyczne utlenianie PPD obliczone metodą ekstrapolacji.

Non enzymatic oxidation of PPD calculated by extrapolation.

Oznaczenie wykonano na ekstraktach z 11,10-dniowych kielków nieznaney odmiany pszenicy.

Naczyńko Warburga zawierało:

0,5 ml PPD 0,25 M, pH 7,4

0,5–1,0 ml ekstraktu

0,5 ml NaN_3 0,025 M, pH 7,4

0,4 ml cyt. c $1,0 \times 10^{-4}$ M (wg Kellina, Hartree)

0,6–0,1 ml buforu fosf. 0,1 M, pH 7,4

0,1 ml 30% KOH

2,6 ml

Tablica 5

Aktywność oksydazy polifenolowej w ekstraktach z pszenicy
Polyphenoloxidase activity

| | P r ó b y | | |
|------------------------|-----------|-----------|-----------|
| | 1 | 2 | 3 |
| | Q_{O_2} | Q_{O_2} | Q_{O_2} |
| ekstrakt + hydrochinon | -5 | -8 | -12 |
| hydrochinon | -4 | +4 | -1 |
| ekstrakt | -9 | -11 | -18 |
| ekstrakt + p-krezol | -5 | -9 | -11 |
| p-krezol | -2 | -5 | +1 |

Naczyńko Warburga zawierało:

1,5 ml ekstraktu

0,5 ml p-krezolu 0,06 M lub hydrochinonu 0,06 M

1 ml buforu fosforanowego 0,1 M o pH 6

0,1 ml 30% KOH

3,1 ml

Oksydaza polifenolowa. Aktywność oksydazy polifenolowej badano przez dodanie do ekstraktu enzymatycznego hydrochinonu względnie p-krezolu. Jak wynika z tablicy 5 żaden z wymienionych substratów nie podwyższał współczynnika pochłaniania tlenu i zgodnie z danymi z literatury obecności oksydazy polifenolowej nie stwierdzono.

Tablica 6

Aktywność oksydazy askorbinowej i wpływ inhibitorów
Ascorbic acid oxidase activity and influence of inhibitors

| Doświadczenie 1 | M inhibi- tora | P r ó b y | | | | | |
|----------------------------------|----------------------|----------------------------|-----------------------|----------------------------|-----------------------|----------------------------|-----------------------|
| | | 1 | | 2 | | 3 | |
| | | Q _{O₂} | % zahamo- wania | Q _{O₂} | % zahamo- wania | Q _{O₂} | % zahamo- wania |
| ekstr. | — | — 7 | | — 12 | | —18 | |
| K.A. | | — | | — 2 | | — 1 | |
| ekstr. + K.A. | | —66 | | — 56 | | —58 | |
| Doświadczenie 2 | | | | | | | |
| ekstr. + K.A. | | —46 | | — 51 | | —52 | |
| ekstr. + K.A. + NaN ₃ | 0,005 | —75 | — | — 96 | — | —91 | — |
| ekstr. + K.A. + NaN ₃ | 0,01 | —92 | — | —108 | — | —95 | — |
| K.A. + NaN ₃ | 0,01 | — | | — 3 | | — 2 | |
| Doświadczenie 3 | | | | | | | |
| ekstr. + K.A. | | —51 | | — 40 | | —44 | |
| ekstr. + K.A. + KCN | 0,005 | —28 | 45 | — 18 | 55 | — | — |
| ekstr. + K.A. + KCN | 0,01 | —24 | 53 | — 19 | 53 | —22 | 50 |
| K.A. + KCN | 0,01 | — 3 | — | — 2 | — | — | — |
| Doświadczenie 4 | | | | | | | |
| ekstr. + K.A. | | —66 | | — 72 | | —67 | |
| ekstr. + K.A. + DDC | 0,005 | — 58 | 12 | — 75 | — | —59 | 12 |
| K.A. + DDC | 0,005 | + 5 | | — | | + 3 | |

Naczyńko Warburga zawierało:

1,5 ml ekstraktu

0,25 ml K. A. 0,12 M, pH 5,7

0,5—1,0 ml NaN₃, KCN lub DDC 0,03 M, pH 5,7

0,75—0,25 ml Tris, pH 5,7

0,1 ml 30% KOH

3,1 ml

Oksydaza askorbinowa. W celu wykazania obecności oksydazy askorbinowej (O. A.) przebadano wpływ kwasu askorbinowego na przyrost pochłaniania tlenu w warunkach standardowych oznaczania O. A. [4]. Jak wynika z tablicy 6 dodatek K. A. istotnie wpływa na współczynnik po-

bierania tlenu. Wyniki umieszczone w tablicy wskazują na hamowanie reakcji w obecności cyjanku potasu o stężeniu 0,01 M i 0,005 M w granicach od 45% do 55%. Próba kontrolna K. A. i KCN 0,01 M nie pobiera tlenu.

Zastosowanie azydku sodowego o stężeniu 0,01 M i 0,005 M jako inhibitora enzymów żelazowych i miedziowych dały nieoczekiwane wyniki (Tabl. 6). Mianowicie, zamiast inhibicji — jak w przypadku stosowania cyjanku potasu — otrzymano znaczną stymulację pochłaniania tlenu. Ta stymulacja łącznie z faktem, że cyjanek potasu nie hamował reakcji w stu procentach, nasunęła przypuszczenie, że pochłanianie tlenu w obecności K. A. w warunkach oznaczania O. A. może być utlenianiem nieenzymatycznym. W czasie termostatycznego wytrząsania mieszaniny w tempera-

Tablica 7

Utlenienie kwasu askorbinowego przez gotowany ekstrakt. Wpływ KCN i pH
Oxidation of ascorbic acid by heated extract. Effect of KCN and pH

| Doświadczenie 1 | P r ó b y | | | | | | | |
|------------------------|----------------------------|------------------|----------------------------|------------------|----------------------------|------------------|----------------------------|------------------|
| | 1 | | 2 | | 3 | | 4 | |
| | Q _{O₂} | % zahamowania | Q _{O₂} | % zahamowania | Q _{O₂} | % zahamowania | Q _{O₂} | % zahamowania |
| ekstr.*)+K.A. | — | | —60 | | —51 | | —54 | |
| ekstr.*)+K.A.+KCN | — | | —36 | 40 | —26 | 49 | —26 | 52 |
| ekstr.*) got.+K.A. | —59 | | —76 | | —66 | | —63 | |
| ekstr.*) got.+K.A.+KCN | —65 | | —73 | | —66 | | — | |
| ekstr.*) got. | + 1 | | — 9 | | 0 | | 0 | |
| Doświadczenie 2 | | | | | | | | |
| ekstr. got.+K.A. | —69 | | —72 | | —92 | | — | |
| (ekstr.+KCN) got.+K.A. | —27 | 61 | —36 | 50 | —37 | 60 | — | |
| Doświadczenie 3 | | pH reakcji | | | | | | |
| ekstr.+K.A. | 5,7 | —70 | | —63 | | — | | — |
| ekstr.+K.A. | 4,0 | — 6 | | — 1 | | — | | — |
| ekstr. got.+K.A. | 5,7 | —73 | | —59 | | — | | — |
| ekstr. got.+K.A. | 4,0 | —16 | | — 5 | | | | |

*) ekstrakt z 6-dniowych kiełków

Naczynko Warburga zawierało:

W doświadczeniach 1 i 2
1,5 ml ekstraktu
0,25 ml K. A. 0,12 M, pH 5,7
1,0 ml KCN 0,03 M, pH 5,7
0,25 ml Tris, pH 5,7
0,1 ml 30% KOH
3,1 ml

W doświadczeniu 3
1,5 ml ekstraktu
0,25 ml K. A. 0,12 M, pH 5,7
1,25 ml Tris, pH 5,7 lub Tris z
0,06 ml 1 N H₂SO₄
0,1 ml 30% KOH
3,1 ml

turze 25° stwierdzono stopniowe powstawanie czerwonego barwika w ekstrakcie z kielków pszenicy, natomiast ekstrakty z dodatkiem cyjanku potasu barwiły się znacznie słabiej. Należy zaznaczyć, że barwik powstaje również przy gotowaniu ekstraktu. Jak wynika z tablicy 7 dośw. 1, utlenianie K. A. przez gotowany ekstrakt jest nawet wyższe niż przez ekstrakt nie gotowany. Dodatek cyjanku potasu do gotowanego ekstraktu nie obniża ilości pochłanianego tlenu. Jeżeli natomiast ekstrakt doprowadzono do wrzenia w obecności cyjanku potasu, wówczas pobieranie tlenu opadało w granicach od 50% do 61% podobnie jak w tkance nie gotowanej (dośw. 2).

Na podstawie wyników z gotowanym ekstraktem należy przyjąć, że pochłanianie tlenu podane w tablicy 6 jest wynikiem reakcji nieenzymatycznej i że obniżenie współczynnika pochłaniania tlenu wywołane jest obecnością cyjanku potasu zapobiegającego wytworzeniu się barwika nie zaś hamującego reakcję enzymatyczną.

Tablica 8

Aktywność oksydazy askorbinowej w ekstraktach z kielków) jęczmienia.*

Wpływ NaN_3

Ascorbic acid oxidase activity in extracts of barley shoots. Effect of NaN_3

| | P r ó b y | |
|--------------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | 1 | 2 |
| | Q_{O_2} | Q_{O_2} |
| ekstr. + K.A. | -32 | -33 |
| ekstr. got. + K.A. | -12 | -7 |
| ekstr. + K.A. + NaN_3 | -10 | -11 |
| K.A. | — | -7 |

*) kielki ośmioldniowe

Naczyńko Warburga zawierało:

1,0 ml ekstraktu

0,5 ml K. A. 0,125 M o *pH* 5,7

1,0 ml Tris o *pH* 5,7 lub 1,0 ml NaN_3

0,0125 M rozpuszczonego w Tris o *pH* 5,7

0,1 ml 30% KOH

2,6 ml

Dla kontroli wykonano oznaczenia O. A. w ekstraktach z kielków jęczmienia przygotowanych w sposób identyczny do ekstraktów z kielków pszenicy. Jak wynika z tablicy 8, gotowany ekstrakt z kielków jęczmienia nie pochłania tlenu, a dodatek azydki sodowego nie wpływa stymulująco

jak w przypadku ekstraktów z kielków pszenicy. Należy zaznaczyć, że ekstrakty z kielków jęczmienia nie wytwarzają czerwonego barwika.

Brak inhibicji albo tylko bardzo nieznaczna inhibicja przy pomocy DDC w znacznej mierze potwierdza, że O. A. nie może być enzymem końcowym (Tabl. 6, dośw. 4).

Dodatkowe pomiary manometryczne utleniania K. A. przez gotowane i nie gotowane ekstrakty w pH 5,7 i pH 4 również wskazują na nieenzymatyczny charakter pochłaniania tlenu. Jak wynika z tablicy 7 dośw. 3, nie gotowany ekstrakt w pH 5,7 jak zwykle pochłania znaczne ilości tlenu, natomiast prawie nie pochłania w pH 4,0. Gotowana tkanka zachowuje się identycznie, co wskazuje na to, że w pH 4,0 K. A. nie redukuje substancji barwnej.

Podejrzewając, że powstające substancje barwne mogą być pochodnymi chinonu postanowiono przebadac reakcję K. A. z p-chinonem w pH 5,7, tzn. w warunkach standardowego oznaczania O. A., jak również w pH 4,5 i pH 2,0. Jak wynika z tablicy 9, sam p-chinon w pH 5,7 jak również

Tablica 9

Utlenienie kwasu askorbinowego przez p-chinon.

Wpływ pH

Oxydation of ascorbic acid by p-quinon.

Effect of pH

| | pH reakcji | Próby | |
|-----------------|-----------------|-----------|-----------|
| | | 1 | 2 |
| | | Q_{O_2} | Q_{O_2} |
| K.A. + p-chinon | 5,7 | -49 | -67 |
| K.A. | 5,7 | — | -1 |
| p-chinon | 5,7 | -9 | -2 |
| K.A. + p-chinon | 4,5 | -6 | -1 |
| K.A. + p-chinon | 2,0 | 0 | +1 |

Naczyńko Warburga zawierało:

0,5 ml K. A. 0,05 M o pH 5,7

0,5 ml p-chinonu 0,05 M o pH 5,7

1,5 ml Tris o pH 5,7 lub 1,5 ml Tris z dodatkiem 1 N

H_2SO_4 , pH 4,5 albo pH 2

0,1 ml 30% KOH

2,6 ml

p-chinon z K. A. w pH 4,5 i pH 2,0 nie pochłania tlenu, natomiast p-chinon z K. A. w pH 5,7 zachowuje się identycznie jak substancja barwna powstająca w ekstraktach z kielków pszenicy.

W dalszych próbach usunięto z ekstraktów czerwony barwik poprzez dializę przez 18 godzin w temperaturze 0° wobec wody destylowanej. W dializowanych ekstraktach nie zaobserwowano barwika przy wytrzą-

Tablica 10

Pochłanianie tlenu przez dializowany ekstrakt. Wpływ inhibitorów
 Oxygen uptake by dialysed extract. Effect of inhibitors

| Doświadczenie 1 | P r ó b y | | | | | | | |
|---------------------|-----------|-----------------------|-----------|-----------------------|-----------|-----------------------|-----------|--|
| | 1 | | 2 | | 3 | | 4 | |
| | Q_{O_2} | | Q_{O_2} | | Q_{O_2} | | Q_{O_2} | |
| ekstr. + K.A. | - 24 | | - 27 | | - 30 | | - 26 | |
| ekstr. got. + K.A. | - 3 | | - 9 | | - 7 | | - | |
| K.A. | - 2 | | - 7 | | + 3 | | - 2 | |
| ekstr. | - | | - 4 | | 0 | | + 5 | |
| Doświadczenie 2 | | % zahamo- wania | | % zahamo- wania | | % zahamo- wania | | |
| ekstr. + K.A. | - 23 | | - 25 | | - 25 | | - | |
| ekstr. got. + K.A. | - 7 | | - 3 | | - 10 | | - | |
| ekstr. + K.A. + KCN | - 12 | 69 | - 14 | 50 | - 17 | 53 | - | |
| ekstr. + K.A. + DDC | - 18 | 31 | - 16 | 41 | - 23 | 13 | - | |

Naczynko Warburga zawierało:

1,5 ml ekstraktu

0,25 ml K. A. 0,12 M o pH 5,7

1,25 ml Tris o pH 5,7 lub KCN albo DDC 0,12 M, pH 5,7

0,1 ml 30% KOH

3,1 ml

saniu ani przy podgrzewaniu do temperatury wrzenia. W tablicy 10 umieszczone są wyniki pochłaniania tlenu przez dializowany ekstrakt. Zgodnie z oczekiwaniem gotowany, dializowany ekstrakt, do którego następnie dodano K. A., nie pochłaniał tlenu. Natomiast dodatek kwasu askorbinoowego do nie gotowanej tkanki stymulował pochłanianie tlenu, aczkolwiek w porównaniu z wynikami tablicy 6 pochłanianie tlenu opadło prawie do 50%. W tablicy 10 umieszczone są wyniki ilustrujące wpływ KCN 0,005 M i DDC 0,005 M na hamowanie pobierania tlenu przez dializowany ekstrakt. Cyjanek potasu hamuje pobieranie tlenu od 50—69%, natomiast hamujący wpływ DDC jest dużo niższy i wynosi 13—41%.

DYSKUSJA

Większość prac nad końcowymi oksydazami prowadzona była na skrawkach i na ekstraktach z kielków jęczmienia. Prace na kielkach pszenicy są bardzo nieliczne i wyniki badań są często sprzeczne. Waygood [12] nie zdołał wykryć O. C. w kielkach starszych ponad 3 dni, Boutler⁴⁾ podaje,

⁴⁾ Cytują Fritz i Beevers.

że w korzeniach pszenicy nie znajduje O. C. po upływie 5 dnia, dopiero Fritz i Beevers [3] wykazali jej obecność w kielkach pszenicy nawet do 12 dnia wzrostu. W niniejszej pracy oznaczano aktywność oksydaz końcowych w kielkach siedmiodniowych ze względu na to, że w kielkach starszych, które czerpią azot wyłącznie z zapasów endospermy, po upływie 7 dni można stwierdzić pierwsze symptomy niedoboru azotu [13]. W naszych doświadczeniach potwierdzono obserwacje Fritza i Beeversa [3] i wykazano obecność O. C. w ekstraktach z 7-dniowych kielków pszenicznych. PPD dodany do wyciągów z 7-dniowych kielków stymulował znacznie przyrost pochłaniania tlenu. Wprowadzenie egzogennej cyt. c do układu powodowało dodatkową stymulację w granicach 95—122%, natomiast w termicznie inaktywowanym ekstrakcie dodatek cyt. c nie wywoływał stymulacji. Współczynnik stymulacji w naszych doświadczeniach pokrywa się z wynikami Fritza i Beeversa [3], aczkolwiek w liczbach absolutnych ilość pobranego tlenu w μl wynosi tylko 50% pochłaniania tlenu w pracy wspomnianych autorów, co wiąże się prawdopodobnie z różnymi odmianami pszenicy użytej w obu wypadkach.

Stymulacja w obecności PPD wskazuje na obecność endogennego cyt. c w wyciągach z kielków pszenicy, a dodatkowa stymulacja egzogennym cyt. c potwierdza, że czynnikiem ograniczającym szybkość reakcji enzymatycznej jest niedobór substratu w ekstraktach. Stymulacja pochłaniania tlenu w obecności egzogennej cyt. c wynosiła 95—122%, a Fritz i Beevers [3] wykazali w korzeniach pszenicy stymulację 20%, a w częściach nadziemnych stymulację w wysokości 90%. Również inhibicja cyjankiem i azydkiem wskazuje na obecność O. C. ponieważ O. P. nie wykryto, a obecność O. A. jest wątpliwa. Cyjanek potasowy i azydek sodowy hamują pobieranie tlenu w granicach 83% do 100%. W cytowanej pracy Fritz i Beevers [3] stwierdzają 55% inhibicję cyjankiem i 50% inhibicję azydkiem, obliczając swoje wyniki na drodze ekstrapolacji. Inhibicja cyjankiem i azydkiem w niniejszej pracy obliczona jest w odniesieniu do pochłaniania tlenu w systemach zawierających gotowany ekstrakt. Obliczając wyniki metodą ekstrapolacji otrzymano inhibicję azydkiem 51—50%.

Należy stwierdzić, że gotowany ekstrakt również utlenia PPD proporcjonalnie do swojej ilości w badanej próbce (Tabl. 11), wskazując, że obok enzymatycznego utleniania ekstrakty pobierają tlen na drodze nieenzymatycznej, co oczywiście wpływa na obniżenie procentowości inhibicji. Już Waygood [12] wykazał, że zagotowane próby kontrolne z PPD wykazują przyrost pochłaniania tlenu w wysokości 28 μl O₂ na 1 godzinę w 37°, podczas gdy nie gotowane pobierały w tych samych warunkach 120 μl . Waygood przytacza pracę Marsha i Goddarda, którzy również zaobserwowali temostabilne, nieenzymatyczne utlenianie w korzeniach marchwi.

Przytaczamy przykładowo, że w naszym doświadczeniu ekstrakt gotowany + PPD + cyt. c pochłania na 30 minut w 25° 48 μ l O₂ a ekstrakt nie gotowany + PPD + cyt. c pochłania w tym samym czasie 123 μ l O₂.

Tablica 11

Utlenianie PPD przez gotowany ekstrakt
Oxidation of PPD by heated extract

| | Q _{O₂} | Q _{O₂} /ml |
|----------------------|----------------------------|--------------------------------|
| 0,5 ml ekstr. + PPD | -22 | -44 |
| 0,75 ml ekstr. + PPD | -35 | -47 |
| 1,0 ml ekstr. + PPD | -39 | -39 |

Naczynko Warburga zawierało:

0,5—1,0 ml ekstraktu

0,5 ml PPD 0,25 M o pH 7,4

2,0—1,5 ml buforu fosforanowego 0,1 M o pH 7,4

0,1 ml 30% KOH

3,1 ml

Z literatury wynika, że jedynie Waygood [12] stwierdził obecność O. A. w 3-dniowych i starszych kielkach pszenicy i wniosek swój opierał głównie na termostabilności reakcji enzymatycznej hamowanej specyficznymi inhibitorami dla enzymów zawierających metale w grupie prostetycznej. Waygood nie zdołał wykazać O. P. i O. C., przeto wnioskował, że O. A. jest końcową oksydazą w badanych przez niego kielkach pszenicy.

W doświadczeniach opisanych powyżej na wyciągach z 7-dniowych kielków pszenicy stwierdzono, że obniżenie pochłaniania tlenu wywołane cyjankiem w obecności K. A. nie wynika z inhibicji reakcji enzymatycznej, ponieważ gotowane ekstrakty pochłaniały tlen w stopniu nawet nieco większym aniżeli ekstrakty nie gotowane. Stwierdzono, że w trakcie wytrząsania ekstraktu w aparacie Warburga w pH 5,7 daje się zauważyć stopniowe powstawanie czerwonego barwika, który, reagując z K. A., powoduje pochłanianie tlenu. James [6], w podręczniku „Plant respiration“, zwrócił uwagę na czerwone barwinki chinoidowe, które mogą być akceptorami wodoru w reakcjach nieenzymatycznych.

KCN wyraźnie hamuje produkcję barwika i tym samym obniża pochłanianie tlenu. Natomiast dodatek cyjanku do ekstraktów gotowanych pozostaje bez wpływu, ponieważ barwik wytworzył się jeszcze przed dodaniem cyjanku.

Wiadomo wprawdzie, że jon miedziowy po termicznym zniszczeniu białka enzymatycznego może również katalizować utlenianie K. A. Jednak, jak wykazują James i Boulter [7] na wyciągach z 7-dniowych kiel-

ków jęczmienia, utlenianie nieenzymatyczne w tych warunkach wynosi zaledwie 15% enzymatycznego utleniania K. A.

Związek między barwikiem i nieenzymatycznym utlenianiem K. A. wykazują dalsze dwa doświadczenia: 1) ograniczenie powstawania barwika, 2) usunięcie barwika z reagującego systemu przy pomocy dializy.

1. Ekstrakty z 7-dniowych kielków pszenicy podzielono na dwie części: jedną ogrzewano do wrzenia w obecności KCN, a drugą ogrzewano do wrzenia bez KCN. KCN dodano dopiero po ostudzeniu próby do temperatury pokojowej. Następnie wprowadzono K. A. do obu ekstraktów i wykonano pomiary manometryczne w aparacie Warburga. Okazało się, że ciemniejszy ekstrakt, do którego dodano KCN po zagotowaniu, pochłaniał dwa razy więcej tlenu aniżeli znacznie mniej zabarwiony ekstrakt gotowany w obecności KCN, co wskazuje na to, że cyjanek zapobiega powstawaniu barwika w identyczny sposób na wyciągach gotowanych i nie gotowanych.

2. Ekstrakt poddany 18-godzinnej dializie w temp 0° nie tworzy barwika podczas wytrząsania ani podczas podgrzewania i, zgodnie z założeniem, pochłanianie tlenu jest znacznie obniżone; wynosi ono około 50% w porównaniu z ekstraktami zawierającymi barwną substancję. W dializowanym ekstrakcie cyjanek hamuje pochłanianie tlenu od 50% do 69%, a DDC od 13% do 41%. Nieznaczna inhibicja DDC nie stanowi dowodu na obecność O. A., ponieważ inhibitory kompleksujące miedź nie są specyficzne dla końcowych oksydaz. Tak np. DDC hamuje dehydrogenazę kwasu bursztynowego i tworzy kompleksy z enzymami miedziowymi systemu oddechowego, którego końcowym ogniwem jest O. C. [5]. Ponadto DDC hamuje również w pewnym stopniu aktywność O. C.; inhibicja ta w przypadku preparatów tej oksydazy z 7-dniowych kielków jęczmienia wynosi 17%, co w szerokich granicach pokrywa się z wynikami naszych doświadczeń na ekstraktach z kielków pszenicy.

Na podstawie wyników inhibicji z KCN i DDC aktywność dializowanych wyciągów z kielków pszenicy należy w części przypisać O. C. utleniającej endogennej cyt. c. Znaczne obniżenie pochłaniania tlenu można przypisać częściowo wymyciu cyt. c w czasie 18-godzinnej dializy i nieodpowiedniemu pH dla optimum działania O. C., które wynosi 7,4.

Nieoczekiwane działanie azydku wywołujące stymulację zamiast inhibicji nie jest odosobnionym zjawiskiem, ponieważ już James i Boulter [7] podaje, że na preparatach oksydazy askorbinowej z 7-dniowych kielków jęczmienia w pH 6 azydek wywołuje stymulację w wysokości 12%, a w pH 7 stymulację w wysokości 23%. Również Waygood [12] podaje przykłady stymulacji utleniania K. A. w obecności KCN i cytuję prace Greena, który tłumaczy, że stymulacja cyjankiem wynika z wiązania kwa-

su szczawiooctowego w postaci cyjanohydryny, usuwając w ten sposób ketokwas, który jest inhibitorem dehydrogenazy kwasu jabłkowego. Waygood przyjmuje, że w kielkach pszenicy cyjanek może wiązać ketokwas lub usuwa inny inhibitor utleniania kwasu askorbinowego.

STRESZCZENIE

Ekstrakty z 7-dniowych kielków pszenicy zawierają oksydazę cytochromową, natomiast nie zawierają oksydazy polifenolowej.

Ekstrakty z 7-dniowych kielków pszenicy barwią się na powietrzu i wytworzony czerwony barwik w obecności kwasu askorbinowego pochłania znaczne ilości tlenu. KCN obniża pochłanianie tlenu o 50%. Reakcja ta nie jest jednak reakcją enzymatyczną ponieważ barwik powstaje również podczas gotowania ekstraktów, przy czym dodatek KCN do gotowanych ekstraktów nie wpływa hamująco na pochłanianie tlenu. Rola cyjanku polega na częściowym zahamowaniu powstawania barwika, nie zaś na hamowaniu reakcji enzymatycznej.

Ekstrakty dializowane przez 18 godzin w temperaturze 0° nie wytwarzają substancji barwnej, a ilość pochłanianego tlenu opada znacznie. Dializowane ekstrakty wykazują 50% inhibicję w obecności KCN i nieznaczną inhibicję w obecności DDC, co jednak nie jest wystarczającym dowodem na obecność oksydazy askorbinowej w kielkach pszenicy.

LITERATURA

- [1] Bhagvat K., Hill R., *The New Phytologist* **50**, 112, 1951.
- [2] Colowick O. P., Kaplan N. O., *Methods in enzymology*, vol. 1, s. 143, Academic Press Inc., New York, 1955.
- [3] Fritz G., Beevers H., *Plant Physiol.* **30**, 300, 1955.
- [4] Honda S. J., *Plant Physiol.* **30**, 174, 1955.
- [5] Honda S. J., *Plant Physiol.* **32**, 23, 1957.
- [6] James W. O., *Plant respiration*, s. 196, Clarendon Press, Oxford, 1953.
- [7] James W. O., Boulter D., *The New Phytologist* **54**, 1, 1955.
- [8] Mandels G. R., *Arch. Biochem. Biophys.* **42**, 164, 1953.
- [9] Michlin D. M., *Uspjechi Sowljennoj Biologii*, XXXIII, **1**, 7, 1951.
- [10] Oparin J. A., Gelmann N. S., *Biochimija Zjerna* **1**, 7, 1951.
- [11] Rubin B. A., Czernawina I. A., Miszczejewa A. W., *Dokłady Akademii Nauk S.S.S.R.* **105**, 1039, 1955.
- [12] Waygood E. R., *Canad. J. Research*, **28C**, 7, 1950.
- [13] Willis A. J., Yemm E. W., *The New Phytologist*. **54**, 163, 1955.

TERMINAL OXIDASES IN WHEAT SEEDLINGS

Summary

1. Extracts prepared from shoots of etiolated 7-days wheat seedlings were found to contain cytochrome oxidase, which was shown by stimulation of oxygen uptake in presence of added cytochrome c and by full inhibition of oxygen uptake in presence of metal enzyme inhibitors such as KCN and NaN_3 .

2. No poliphenol oxidase activity could be detected.

3. Shoots from wheat seedlings contain a substance which on shaking with air is converted into a red pigment. In presence of ascorbic acid the pigment causes considerable uptake of oxygen. Addition of KCN inhibits the production of the pigment to a considerable degree and, consequently, the uptake of oxygen is reduced to 50% of the untreated sample.

The reaction is non-enzymatic in nature, since the pigment appears also on heating of the sample which, thus treated, no more shows inhibition of oxygen uptake on addition of KCN. Cyanide prevents the formation of the pigment also on heating, as was shown by the considerably lower oxygen uptake of the sample heated after addition of KCN as compared with the sample to which KCN was added after heating.

Homogenates dialysed for 18 hours in the cold fail to produce the pigment on shaking with air or heating and the apparent ascorbic acid oxidase activity is evidently greatly reduced. However, a certain residual activity remains in the dialysed samples, showing 50% KCN inhibition as well as some inhibition in the presence of DDC.

4. The retention of some activity in the dialysed extracts combined with the inhibitory effect of KCN may be due to cytochrome oxidase acting upon endogenous cytochrome c. In spite of the appearance of some inhibition by DDC of oxygen uptake in presence of ascorbic acid, no unequivocal evidence was found to suggest that this activity was due to ascorbic acid oxidase.

Otrzymano 8.2.58 r.

J. JANICKI, F. PĘDZIWIŁK

WYSTĘPOWANIE WITAMINU B_{12} W NASIONACH ROŚLIN MOTYLKOWYCH*)

Z Katedry Technologii Rolnej W.S.R. w Poznaniu
Kierownik Katedry: prof. dr J. Janicki

Według dotychczasowego stanu badań, zdolność syntezy witaminów z grupy B_{12} posiadają wyłącznie drobnoustroje. Zdolności tej nie stwierdzono u organizmów wyższych tak roślinnych jak i zwierzęcych, jeśli oczywiście nie wspomnieć pracy Browna i innych [3], którzy wykazują tę zdolność u kilku alg morskich. Niektórzy autorzy znajdowali wprawdzie pewne nieznaczne ilości od 0,004 μg do 0,010 $\mu\text{g/g}$ świeżej masy witaminu B_{12} w materiale roślinnym, najwięcej w korzeniach, mniej w łodygach, a wcale lub tylko ślady w liściach [9, 4], uważano jednak, że występowanie to jest zjawiskiem wtórnym, i że witamin B_{12} pochodzi z syntezy przeprowadzanej przez drobnoustroje glebowe. W nasionach tych roślin na ogół nie stwierdzano obecności witaminu B_{12} .

Na tle takiego stanu badań, bardzo ciekawą okazała się praca autorów hinduskich, opublikowana w 1955 roku [8], na temat wpływu kiełkowania na poziom witaminu B_{12} w nasionach roślin strączkowych. Autorzy ci oznaczając mikrobiologicznie za pomocą *Lactobacillus leichmanii* NRRL — B. 735 W, znajdowali stosunkowo duże ilości witaminu B_{12} w nasionach fasoli (*Phaseolus radiatus*), grochu (*Pisum sativum*), soczewicy (*Lens esculenta*) i lędźwianu (*Lathyrus sativus*). Ilości te znacznie wzrastały po dwudniowym a zwłaszcza po czterodniowym kiełkowaniu.

Autorzy z wyników tych wysnuwają daleko idące wnioski, a mianowicie uważają, że słabe rozpowszechnienie anemii złośliwej w Indiach, mimo wegetariańskiego sposobu odżywiania się większości Hindusów, należy przypisać spożywaniu znacznych ilości wyżej wymienionych nasion roślin strączkowych, które z kolei dostarczają organizmowi wystarczające ilości witaminu B_{12} . Autorzy zalecają również z żywieniowego punktu widzenia, kiełkowanie wyżej wymienionych nasion.

*) Praca subwencjonowana przez Komitet Biochemiczny II Wydziału P. A. N.

Tablica 1

Witamin B_{12} w nasionach roślin motylkowych [8]

| Nasiona roślin | nie kielkowane | kielkowanie w ciągu | |
|--------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| | | 2 dni | 4 dni |
| Fasola (<i>Phaseolus radiatus</i>) | 0,61 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ | 0,81 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ | 1,53 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ |
| Soczewica (<i>Lens esculenta</i>) | 0,43 „ | 0,47 „ | 2,37 „ |
| Groch (<i>Pisum sativum</i>) | 0,36 „ | 1,27 „ | 2,36 „ |
| Lędzian (<i>Lathyrus sativus</i>) | 0,37 „ | 0,75 „ | 0,86 „ |

W pracy naszej postanowiliśmy przebadać na zawartość witaminu B_{12} dwie odmiany fasoli (białej i żółtej), groch *Victoria* i łubin pastewny (żółty).

Do czterech serii przeprowadzonych mikrobiologicznych oznaczeń zastosowaliśmy metodę z *Euglena gracilis* [7], ponieważ organizm ten bardzo jest przydatny do oznaczeń witaminu B_{12} w materiale roślinnym, gdzie są małe jego ilości. Poza tym *Euglena gracilis* jest organizmem bardziej specyficznym (niereagującym na obecność czynników ubocznych) niż *Lactobacillus leichmanii* używany przez autorów hinduskich. Równolegle z *Euglena gracilis* do oznaczeń witaminu B_{12} stosowaliśmy również metodę z mutantem *Escherichia coli*, a to ze względu na bardziej prostą technikę i szybkość pomiarów [6, 2].

Witamin B_{12} oznaczano w nasionach nie kielkowanych, kielkowanych po uprzednim jałowieniu [1] i kielkowanych nie jałowo. Ekstrakcję — uwalnianie witaminu B_{12} z połączeń organicznych — przeprowadzano dwiema metodami. Pierwsza, to zalecana przez w/wymienionych autorów hinduskich, polegała na enzymatycznym trawieniu nasion trypsyną przy pH 7 w 0,8% NaHCO_3 przez 24 godziny i następnym autoklawowaniu z NaCN w buforze octanowym o pH 4,5 (1 atm. 30 minut) [8].

Druga metoda, prostsza, dająca również dobre wyniki stosowana w naszych pracach przy ekstrakcji kobalaminy z hodowli bakteryjnych, polegała na autoklawowaniu rozartego z piaskiem materiału z dodatkiem 5 μg NaCN/ml badanego płynu przy pH 6 w temp. 110° przez 10 minut. Wzrost *Euglena gracilis* trwał 14 dni, po czym ekstrahowano z odwirowanych komórek chlorofil. W acetonowym ekstrakcie oznaczano jego stężenie na kolorymetrze Leitza.

Przy oznaczaniu za pomocą *Escherichia coli* stosowano krążki bibuły chromatograficznej (Whatman nr 1) o średnicy 1 cm. Krążki te po zanurzeniu na kilkadziesiąt sekund w badanym płynie i wysuszeniu nakładano na płytę szklaną (25×25 cm) z pożywką agarową zaszczeploną, odwirowa-

ną i przemytą 24-godziną hodowlą *E. coli*. Po 18 godzinach inkubacji odczytywano wyniki.

Wzrost organizmów testowych na roztworach standardowych (dla *Euglena gracilis*: 50 $\mu\text{g/ml}$ do 0,1 $\mu\text{g/ml}$; dla *E. coli*: 1 $\mu\text{g/ml}$ do 0,03125 $\mu\text{g/ml}$) układał się prawidłowo.

Roztwory z ekstraktów badanego materiału (nasion) nie dawały wzrostu. We wszystkich czterech seriach przeprowadzonych doświadczeń wyniki były negatywne. Nie potwierdziły się więc na naszym materiale i w naszych badaniach wyniki autorów hinduskich. Natomiast podobne do naszych negatywne wyniki uzyskali Embden i Jaffe [5]. Autorzy ci, znając wyżej wymienioną pracę hinduską, oznaczali również witamin B_{12} w materiale roślinnym i zwierzęcym ze pomocą *Lactobacillus leichmanii*. W żadnej z 13 prób żywności pochodzenia roślinnego (groch, fasola, soczewica, ziemniaki itp.) nie znaleźli oni witaminu B_{12} poza małymi ilościami (0,05 μg do 0,08 $\mu\text{g}/100\text{ g}$) w nasionach soczewicy.

STRESZCZENIE

Oznaczano zawartość witaminu B_{12} w nasionach grochu (*Pisum sativum*), fasoli (*Phaseolus vulgaris*) i łubinu pastewnego (*Lupinus luteus*). Do oznaczeń pobierano nasiona nie kiełkowane i kiełkowane po uprzednim jałowieniu oraz kiełkowane bez jałowienia. Do oznaczeń użyto metod mikrobiologicznych z *Euglena gracilis* i mutantem *Escherichia coli*.

We wszystkich badanych próbach nie stwierdzono występowania witaminu B_{12} .

LITERATURA

- [1] Alen O. N., *Experiments in Soil Bacteriology* 69, 1953. Burgess Publishing Co. Minneapolis 15 — Minnesota.
- [2] Bogucka J., Iwanowska I., Kąkol H., *Przem. Chem.* 9, 14, 1953.
- [3] Brown F., Cuthbertson W. F. J., i Foog G. E., *Nature* 177, 188, 1956.
- [4] Duda J., Pędziwilk Z., Zodrow K., *Acta Microbiol. Polon.* 1957 (w druku).
- [5] Embden C., Jaffe G. W., *Archivos Venezolanos de Nutrition* 6, 121, 1955.
- [6] Harrison E., Lees K. A., Wood F., *Analyst.* 76, 696, 1951.
- [7] Heinrich H. C., Lahann H., *Z. Naturforschung.* 8b, 589, 1953.
- [8] Krishnasudha Rohatgi, Maya Banerjee i Sachchidananda Banerjee, *J. Nutrition* 56, 403, 1955.
- [9] Robbins, A. Hervey i Stebbins, *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 77, 423, 1950.

VITAMIN B₁₂ IN THE SEEDS OF LEGUMINOUS PLANTS

S u m m a r y

Seeds of peas (*Pisum sativum*), beans (*Phaseolus vulgaris*) and lupine (*Lupinus luteus*) were assayed for vitamin B₁₂. The assays involved sterilized and subsequently germinated or non-germinated seeds, as well as seeds germinated without prior sterilization. The microbiological methods with *Euglena gracilis* and an *Escherichia coli* mutant were used.

All the assays were negative, which disagree with the results obtained by Indian workers [8] who reported the presence of vitamin B₁₂ in pulses.

Otrzymano 10.2.58 r.

J. JANICKI, FR. PĘDZIWIŁK

WPŁYW SULFATIAZOLU NA BIOSYNTEZĘ WITAMINÓW Z GRUPY B_{12} PRZEZ *PROPIONIBACTERIUM SHERMANII**)

Z Katedry Technologii Rolnej W. S. R. w Poznaniu
Kierownik Katedry: prof. dr J. Janicki

Badania nad tzw. „czynnikiem białka zwierzęcego“ (Animal Protein Factor) niezbędnym dla normalnego wylęgu i wzrostu kurcząt doprowadziły do jego identyfikacji z witaminem B_{12} [7, 21, 26].

Stokstadt i inni [30] stosując w żywieniu kurcząt jako źródło witaminu B_{12} pozostałą po przemysłowej produkcji aureomycyny nie oczyszczoną grzybnię *Streptomyces aureofaciens* uzyskali lepsze wyniki niż te, które osiągnęto przy odpowiedniej dawce czystego witaminu B_{12} .

W 1950 roku Stokstadt i Jukes [31, 32] oraz Jukes i inni [15] stwierdzili, że to właśnie ślady aureomycyny znajdujące się w odpadkowej grzybni przyspieszają wzrost młodych kurcząt, indyków i świń. Od tego też czasu datuje się ogromny wzrost zainteresowania antybiotykami jako dodatkami do paszy zwierząt, a zwłaszcza do paszy dla kur i świń.

Wyrazem tego zainteresowania są bardzo liczne badania, publikacje i zjazdy naukowe poświęcone temu teoretycznie ciekawemu, a gospodarczo bardzo ważnemu problemowi. Poza aureomycyną, której działanie jest szczególnie wyraźne, stosuje się w żywieniu zwierząt jeszcze cały szereg innych antybiotyków, takich jak penicylina, terramycyna, bacitracyna itd.

Okazało się, że oprócz antybiotyków jeszcze wiele innych substancji antibakteryjnych może stymulować wzrost młodych zwierząt. Podobne do antybiotyków działanie w żywieniu zwierząt wykazywały np. kwasy arsenowe [19, 1, 3, 4] lub substancje antibakteryjne zawarte w niektórych roślinach [9, 10].

Moor i inni [18] stwierdzili, że sulfamidy podawane kurczętom, podobnie jak antybiotyki, stymulują ich wzrost. Nie znajdując wówczas wyjaśnienia tego zjawiska, na fakt ten nie zwracano większej uwagi aż do czasu prac Stokstadta i Jukesa [31, 32].

*) Praca subwencionowana przez Komitet Biochemiczny Wydz. II. P. A. N.

Istnieje wiele różnych poglądów na sposób działania antybiotyków jako czynników przyspieszających wzrost młodych zwierząt, jednakże mechanizm ten do dziś nie został w pełni wyjaśniony. Większość teorii przypisuje antybiotynom działanie pośrednie poprzez zmianę układu normalnej mikroflory przewodu pokarmowego gospodarza. Teorie te opierają się na wielu doświadczalnie stwierdzonych faktach ilościowych zmian poszczególnych grup drobnoustrojów w przewodzie pokarmowym względnie w kale zwierząt, otrzymujących antybiotyki z paszą [25]. Stwierdzono między innymi zmniejszanie się liczby lub całkowitą eliminację drobnoustrojów chorobotwórczych, jak np. *Clostridium perfringens* [29]. Według innych poglądów cząsteczka antybiotyków, względnie jej fragmenty mogą włączać się w metabolizm organizmu zwierzęcego, wywołując korzystne w nim zmiany. Za poglądem tym mają przemawiać efekty wzrostowe, uzyskiwane również przy podawaniu zwierzętom inaktywowanych antybiotyków, i to niezależnie od tego, czy były one wprowadzone z paszą, czy dootrzewnowo [6, 34].

Ustosunkowując się krytycznie do wyżej wymienionych teorii, mamy na uwadze fakt, że efektywne dawki żywieniowe antybiotyków są bardzo niskie, często 200-krotnie niższe od dawek terapeutycznych i mieszczą się zwykle w granicach od 2—50 mg/kg paszy.

Można więc mieć wątpliwości, czy takie ilości substancji antybiotycznych ograniczają rozwój mikroflory jelitowej. Poza tym były prace wykazujące brak stymulacji przez aureomycynę wzrostu rozwijającego się embrionu kurzego, co miałoby z kolei świadczyć przeciw możliwości bezpośredniego udziału antybiotyków w metabolizmie zwierzęcym [17].

Istnieje jeszcze ciekawy pogląd, że antybiotyki wywierają, nie całkowicie dotąd zbadany, wpływ na korzystną dla organizmu gospodarza zmianę metabolizmu bakteryjnego. Za poglądem tym przemawia szereg faktów, między innymi to, że w żywieniu zwierząt podobne do działania antybiotyków aktywnych, wykazują również produkty ich rozpadu [6, 34, 16]. Ponadto stwierdzono, że aureomycyna dodawana do hodowli kwasu propionowego powodowała zmianę stosunku stężeń poszczególnych syntetyzowanych przez te bakterie kobalaminy [22]. Zmiana ta szła w kierunku wzrostu ilości witaminu B_{12} aktywnego w żywieniu zwierząt, przy równoczesnym spadku biosyntezy nieczynnego dla zwierząt witaminu B_{12p} .

Ostatnio, Nojahr [20], dodając antybiotyki, aureomycynę, terramycynę, penicylinę i neomycynę do fermentowanych ścieków miejskich, stwierdziła, że stymulują one syntezę cyjanokobalaminy, przy czym inaktywowana penicylina wykazywała silniejszą stymulację od penicyliny aktywnej.

Wyniki wyżej wymienionych prac znajdują potwierdzenie w znanym zjawisku wzrostu ilości witaminu B_{12} w jelitach, względnie w kale kurcząt

otrzymujących antybiotyki z paszą [14, 33]. Zjawisko to dotychczas najczęściej tłumaczono tylko wzrostem rozwoju mikroflory syntetyzującej witamin B_{12} .

Odnośnie działania sulfamidów na metabolizm bakteryjny, należy wspomnieć o ciekawym zjawisku pewnego rodzaju antagonizmu między sulfamidami a witaminem B_{12} i metioniną. Mianowicie, Shive [27] stwierdził, że witamin B_{12} i metionina przeciwdziałają antybakteryjnej aktywności sulfamidów u niektórych szczepów *Escherichia coli*. Davis i Mingioli [5] wykazali, że w obecności witaminu B_{12} , względnie metioniny, minimalna hamująca wzrost *E. coli* dawka sulfatiazolu wzrasta około 20-krotnie. Powyżej opisane zjawiska zostały nawet wykorzystane do opracowania jednej z metod mikrobiologicznego oznaczania witaminu B_{12} za pomocą *E. coli* [28].

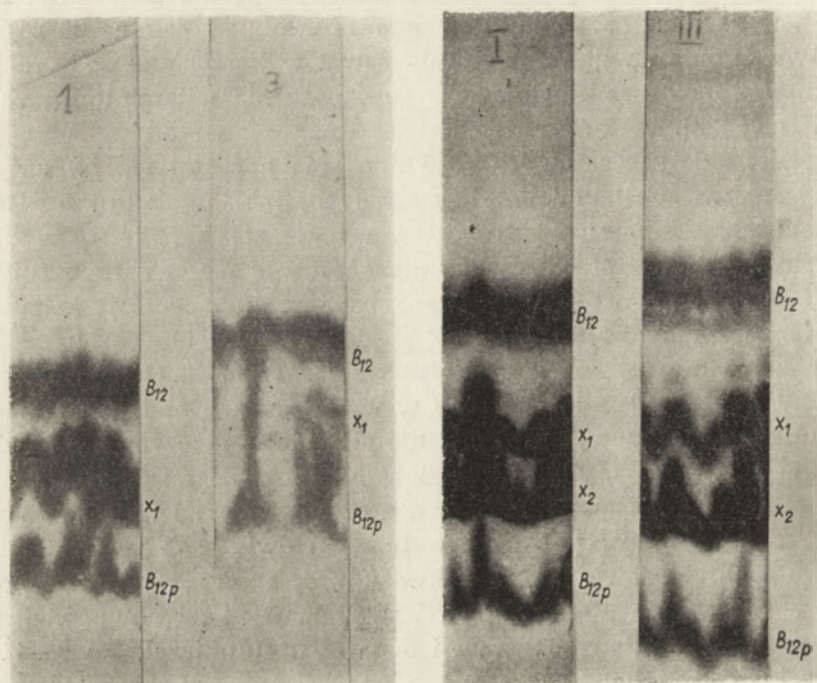
W świetle dotychczasowych rozważań rola a raczej wpływ antybiotyków i innych substancji antybakteryjnych, takich jak np. sulfamidy, na biosyntezę witaminu z grupy B_{12} , wydaje się bardzo interesujący. Szczególnie ciekawie przedstawia się zagadnienie wpływu tych substancji na jakościowy obraz syntetyzowanych przez drobnoustroje kobalamin.

W naszej pracy postanowiliśmy zbadać wpływ sulfatiazolu na biosyntezę kobalamin przez *Propionibacterium shermanii*. Organizm ten — względny beztlenowiec — używany w wielu pracach nad kobalaminami, w warunkach beztlenowych syntetyzuje głównie — nieczynny w żywieniu zwierząt — witamin B_{12p} [13] (czynnik B [8], etiokobalamina [2]) i w znacznie mniejszych ilościach witamin B_{12} , a często jeszcze i inne kobalaminy [12]. Przeprowadzono (w różnych terminach) dwie serie fermentacji doświadczalnych. Hodowlę bakterii kwasu propionowego prowadzono zarówno w warunkach względnie beztlenowych, jak i przy napowietrzaniu na trzęsawce. Do młodych hodowli dodawano sulfatiazol. Po 9—11 dni trwającej fermentacji z odwirowanych komórek bakterii ekstrahowano kobalaminy, które następnie rozdzielano elektroforetycznie i oznaczano ich stężenie na spektrofotometrze kwarcowym Unicam Cambridge — model SP 500.

CZĘŚĆ DOSWIADCZALNA

Bakterie kwasu propionowego (*P. shermanii*), w pierwszej serii doświadczeń, hodowano na pożywce zawierającej kwasowy hydrolizat kazeiny, fosforany, sole mineralne ($MgCl_2$, $CoSO_4$ i $FeSO_4$), ekstrakt drożdżowy i glikozę [12, 23]. W drugiej serii przeprowadzanych fermentacji doświadczalnych w skład pożywki, poza kwasowym hydrolizatem kazeiny, dodawano enzymatyczny hydrolizat kazeiny, a zamiast ekstraktu drożdżowego roztwory witaminów: biotyny i pantotenianu wapnia.

Przy fermentacji w warunkach tlenowych, bakterie hodowano w 750-mililitrowych kolbach Erlenmeyera z 300 ml pożywki. Kolby z zaszczeploną pożywką umieszczano na trzęsawce zapewniającej silne napowietrzanie podłoża. Fermentację prowadzono 9—11 dni w temp. 30°. Równocześnie z posiewem bakterii, do kolb doświadczalnych dodawano sulfatiazol w ilości po 0,5—0,8 mg na 1 ml pożywki. Fermentację w warunkach względnie beztlenowych prowadzono w 1-litrowych kolbach Erlenmeyera z 900 ml pożywki. Kolby umieszczano w termostacie w temp. 30°.



Fot. 1, 3, I, III. Elektroforogramy kobalaminy wyodrębnionych z komórek *P. shermanii*

Warunki elektroforetycznego rozdziału według Holdsworth'a [11]

- Fot. 3 — tlenowa hodowla kontrolna
 .. III — beztlenowa hodowla kontrolna
 .. 1 — tlenowa hodowla z sulfatiazolem (0,8 mg/ml)
 .. I — beztlenowa hodowla z sulfatiazolem (0,5 mg/ml)

Hodowlę prowadzono 9 dni, przy czym raz tylko korygowano pH hodowli (dodając nasycony roztwór sody) i wzbogacano pożywkę glikozą (12 g/l).

Sulfatiazol (0,5 mg/ml pożywki) dodawano na początku fermentacji (równocześnie z posiewem bakteryjnym), a w jednym z doświadczeń na 3 dni przed zakończeniem fermentacji. Obok hodowli z dodatkiem sulfatiazolu zawsze prowadzono hodowlę kontrolną bez sulfatiazolu.

Wyekstrahowane z uprzednio odwirowanych komórek bakteryjnych kobalaminy rozdzielano elektroforetycznie na bibule Whatman nr 3 w 2N CH_3COOH z dodatkiem 0,01% NaCN [11]. Obok witaminu B_{12} i witaminu B_{12p} uzyskiwano zwykle jeszcze jedną lub dwie kobalaminy prawdopodobnie pseudowitamin B_{12} [24] i czynnik A Forda [8].

W pracy naszej, którą traktujemy jako wstępną na tym odcinku badań, interesowaliśmy się tylko witaminem B_{12} i witaminem B_{12p} jako głównymi i typowymi dla *P. shermanii* produktami biosyntezy.

Z wysuszonej bibuły po elektroforetycznym rozdzieleniu kobalaminy, wycinano plamy odpowiadające położeniu na elektroforogramie witaminowi B_{12} (grupa elektrobojętna) i witaminowi B_{12p} (zasadowa). Kobalaminy z plam eluowano określonymi objętościami 2% roztworu NaCN. Stężenie witaminów w eluatach oznaczano mierząc spektrofotometryczne pochłanianie dla fali o długości 580 m μ .

Na zdjęciach przedstawiono elektroforogramy z drugiej serii przeprowadzonych badań. Na zdjęciach tych wyraźnie uwidoczniają się różnice w ogólnej ilości kobalaminy między próbami fermentowanymi w wa-

T a b l i c a 1

Wpływ sulfatiazolu na biosyntezę witaminów z grupy B_{12} przez *Propionibacterium shermanii* *) (Ilość witaminu B_{12} , witaminu B_{12p} i ich suma podana w $\mu\text{g}/100$ ml hodowli bakteryjnej)

| Sulfatiazol w próbach doświadczalnych po 0,5 mg/100 ml pożywki dodawany na początku fermentacji i na 3 dni przed zakończeniem fermentacji (kolumna 6) | | | | | |
|---|--------------------------------|-----------------------|------------------|---------------------|---------------------|
| | Witamin | F e r m e n t a c j a | | | |
| | | tlenowa 11 dni | tlenowa 9 dni | beztlenowa 9 dni | beztlenowa 9 dni |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| Próby kontrolne (bez sulfatiazolu) | B_{12} | 2,50 | 1,17 | 10,61 | |
| | B_{12p} | 5,09 | 3,38 | 54,44 | |
| | suma ($B_{12} + B_{12p}$) | 7,59 | 4,55 | 65,05 | |
| | stosun. ($B_{12} : B_{12p}$) | 0,51 | 0,33 | 0,19 | |
| Próby z sulfatiazolem | B_{12} | 9,60 | 35,72 | 21,44 | 12,77 |
| | B_{12p} | 1,30 | 5,61 | 35,77 | 53,11 |
| | suma ($B_{12} + B_{12p}$) | 10,90 | 41,33 | 57,21 | 65,88 |
| | stosun. ($B_{12} : B_{12p}$) | 7,16 | 6,42 | 0,58 | 0,24 |

*) Podłoże fermentacyjne: kwaśny hydrolizat kazeiny, fosforany, sole mineralne (MgCl_2 , CoSO_4 i FeSO_4), ekstrakt drożdżowy i glikoza [12, 23].

runkach tlenowych (por. fot. 1 i 3) a próbami w warunkach beztlenowych (por. fot. I i III). W tych ostatnich ogólna ilość kobalaminy zarówno oznaczanych (witamin B_{12} i B_{12p}), jak i nie oznaczanych (prawdopodobnie pseudowitamin B_{12-X_1} i czynnik $A-X_2$) jest znacznie wyższa. Natomiast różnice dotyczące ilości poszczególnych kobalaminy w próbach z sulfatiazolem (por. fot. 1 i fot. I) i w odpowiadających im próbach kontrolnych bez sulfatiazolu (3 i III) są znacznie większe przy próbach fermentowanych w warunkach tlenowych. Ponadto na elektroforogramach z prób beztlenowej fermentacji uwidoczniły się dwie kobalaminy (X_1 i X_2), gdy

T a b l i c a 2

Wpływ sulfatiazolu na biosyntezę witaminów z grupy B_{12} przez *Propionibacterium shermanii* (ilość witaminu B_{12} , witaminu B_{12p} i ich suma podana w $\mu\text{g}/100$ ml hodowli bakteryjnej *)

| Sulfatiazol w próbach fermentowanych w warunkach tlenowych po 0,8 mg/ml, a w warunkach beztlenowych po 0,5 mg/ml pożywki | | | |
|--|--------------------------------|------------------|---------------------|
| | Witamin | Fermentacja | |
| | | tlenowa 9 dni | beztlenowa 9 dni |
| Próby kontrolne (bez sulfatiazolu) | B_{12} | 10,30 | 11,30 |
| | B_{12p} | 9,10 | 75,20 |
| | suma ($B_{12} + B_{12p}$) | 19,40 | 86,50 |
| | stosunek $B_{12}:B_{12p}$ | 1,13 | 0,15 |
| Próby badane (z sulfatiazolem) | B_{12} | 16,00 | 49,00 |
| | B_{12p} | 7,50 | 53,90 |
| | suma ($B_{12} + B_{12p}$) | 23,50 | 102,90 |
| | stosunek $B_{12}:B_{12p}$ | 2,13 | 0,91 |

*) Podłoże fermentacyjne: kwaśny hydrolizat kazeiny, enzymatyczny hydrolizat kazeiny, fosforany, sole mineralne (MgCl_2 , CoSO_4 i FeSO_4), pantotenian wapnia, biotyna oraz glikoza [23].

w próbach w tlenowych warunkach wystąpiła tylko jedna kobalamina (X_1) poza witaminem B_{12} i witaminem B_{12p} .

W tablicy 1 i 2 przedstawiono dane liczbowe (średnie) z omówionych wyżej badań przeprowadzonych w dwóch seriach fermentacji doświadczalnych.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Przedstawione wyniki badań wykazują bardzo wyraźnie, że sulfatiazol poza jednym przypadkiem (Tabl. 1 — fermentacja beztlenowa) wywierał silny wpływ na ogólny wzrost syntezy kobalamin (a zwłaszcza witaminu B_{12}) przez *Propionibacterium shermanii*. Szczególnie wybitnie wpływa on na zmianę stosunku poszczególnych kobalamin w tej syntezie. W próbach z sulfatiazolem zwiększała się znacznie synteza witaminu B_{12} na niekorzyść witaminu B_{12p} , którego ilość zawsze wyraźnie zmniejszała się. W warunkach fermentacji tlenowej zaznaczył się silniejszy wpływ sulfatiazolu na wzrost syntezy witaminu B_{12} . Większa ogólna ilość kobalamin (witamin B_{12} i witamin B_{12p}) w próbach z fermentacji beztlenowej tłumaczy się lepszym wzrostem bakterii kwasu propionowego (względnych beztlenowców), a zatem większą ich masą. Ponadto — jak już wspomniano — w hodowlach względnie beztlenowych w połowie okresu fermentacyjnego korygowano pH do optymalnej wartości 6,8 przy równoczesnym dodawaniu glikozy (12 g/l).

Natomiast w hodowlach na trzęsawce (napowietrzanych), ze względu na bardzo łatwe zakażenie się prowadzonych w tych warunkach hodowli bakterii kwasu propionowego, nie zmieniano pH i nie dodawano glikozy. Fakt ten przy dłuższej trwającej hodowli (spadek pH) mógł się ujemnie odbić na wzroście bakterii i ilości kobalamin. Tym też można tłumaczyć mniejszą ilość kobalamin w tlenowej fermentacji przy 11 dni trwającej hodowli w stosunku do ilości w próbach przy 9-dniowej hodowli (Tabl. 1).

Sulfatiazol dodawany na początku fermentacji w warunkach beztlenowych powodował znacznie większy wzrost syntezy witaminu B_{12} niż sulfatiazol dodawany na 3 dni przed zakończeniem tej fermentacji (Tabl. 1).

W drugiej serii doświadczeń (Tabl. 2) w próbach kontrolnych i w próbach z dodatkiem sulfatiazolu przy fermentacji beztlenowej stwierdzono większe niż w pierwszej serii doświadczeń ilości kobalamin. Wzrost ten związany jest ze zmianą pożywki, natomiast spadek ilości kobalamin w hodowli tlenowej z dodatkiem sulfatiazolu w stosunku do analogicznej próby z pierwszej serii doświadczeń (Tabl. 1) nastąpił być może w wyniku zbyt wysokiej dawki sulfatiazolu (0,8 mg/ml pożywki).

STRESZCZENIE

Badano wpływ sulfatiazolu na biosyntezę kobalamin przez *Propionibacterium shermanii*. Do młodych hodowli bakterii kwasu propionowego dodawano po 0,5 względnie 0,8 mg sulfatiazolu na 1 ml pożywki.

Hodowlę prowadzono w warunkach tlenowych na trzęsawce i w warunkach względnie beztlenowych.

Stwierdzono, że niezależnie od warunków hodowli (tlenowych czy względnie beztlenowych) sulfatiazol powodował zmianę stosunku stężeń syntetyzowanych przez te bakterie kobalamin.

Wzrastała mianowicie bardzo wyraźnie ilość witaminu B_{12} przy równoczesnym względnym spadku koncentracji witaminu B_{12p} . W warunkach tlenowych wzrost ilości syntetyzowanego witaminu B_{12} na niekorzyść witaminu B_{12p} był jeszcze bardziej wyraźny.

Poza witaminem B_{12} i witaminem B_{12p} w hodowlach tlenowych stwierdzano biosyntezę jeszcze jednej, a w warunkach względnie beztlenowych dwóch innych nie oznaczanych w tej pracy kobalamin (prawdopodobnie adeninopochodny pseudowitamin B_{12} i czynnik A). Ogólna ilość syntetyzowanych kobalamin (witaminu B_{12} , witaminu B_{12p} jak i nie oznaczanych kobalamin) wzrastała w próbach z dodatkiem sulfatiazolu, przy czym wzrost ten był wyższy w warunkach tlenowych.

L I T E R A T U R A

- [1] Becker D., Terril S. i inni, *Antibiot. and Chemother* 2, 421, 1952.
- [2] Bernhauer K., Friedrich W., *Angew. Chem.* 66, 776, 1954.
- [3] Bird H., Groschke A. i inni, *J. Nutr.* 37, 215, 1949.
- [4] Carpenter L., *Arch. Biochem. and Biophys.* 32, 181, 1951.
- [5] Davis B. D., Mingioli E. S., *J. Bact.* 60, 17, 1950.
- [6] Elam J. F., Gee L. L., Couch J. R., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 78, 832, 1951.
- [7] Emerson G. A., *Gordon Research Conference (1948)*, cyt. Zucker T. F. i Zucker L. M. *Vitamins and Hormones*, Vol. VIII, 1, 1950.
- [8] Ford J. E., Porter J. W. G., *Biochem. J.* 51, V., 1952.
- [9] Freeksen E., *Kurzer Bericht über das Symposium „Antibiotica in der Tierernährung“* 9—11 September, München, 1954.
- [10] Graefe Gerd, *Gordian Zeitschr. für Nahrungsmittel und Genussmittel*, Hamburg, LVI — 1341, 20, 1956.
- [11] Holdsworth E. S., *Nature* 171, 148, 1953.
- [12] Janicki J., Pawełkiewicz J., *Acta Biochim. Polon.* 1, 307, 1954.
- [13] Janicki J., Pawełkiewicz J., *Acta Biochim. Polon.* 2, 329, 1955.
- [14] Jenkins K. J., Bell J. M., O'Neil J. B., Spinks J. W. T., *Can. J. Biochem. Physiol.* 32, 628, 1954.
- [15] Jukes T., Stokstadt E. L. R., Taylor R. R., Cunha T. J., Edwards M. H., Meadows G. B., *Arch. Biochem.* 26, 324, 1950.
- [16] Kon S. K., doniesienie osobiste, 1956.
- [17] Luckey T. D., *Proc. Colloquium*, Univ. Notre Dame, June, 1952, cyt. Stokstadt E.L.R. — *Rapports 3-ème Congrès Intern. de Biochimie*, Bruxelles, 1955.
- [18] Moore P., Evenson A. i inni, *J. Biol. Chem.* 165, 437, 1946.
- [19] Morehouse N., Mayfield O., *J. Parasit.* 32, 20, 1946.
- [20] Neujahr H. Y., *Acta Chemica Scandinavica* 11, 1191, 1957.
- [21] Ott W. H., Rickes E. L., Wood T. R., *J. Biol. Chem.* 174, 1047, 1948.
- [22] Pawełkiewicz J., *Acta Biochim. Polon.* 2, 321, 1955.
- [23] Pawełkiewicz J., Zodrow K., *Acta Biochim. Polon.* 3, 225, 1956.

- [24] Pfiff J. J., Calkins D. G., Peterson R. C., Bird O. D., McGlendon V., Stipek R. W., *Abstr. pap. Am. Chem. Soc. 120th Meeting*, 22c, 1951.
- [25] Quinn L. Y., *3-ème Congrès International de Biochimie*, Bruxelles, 1955. *Rapports* (volume provisoire).
- [26] Rickes E. L., Wood T. R., *Vitamin B₁₂ U. S. Patent* 2, 563, 794, 1951.
- [27] Shive W., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1949, cyt Davis B. D., i Mingioli E. S., *J. Bact.* 60, 17, 1950.
- [28] Shive W. (dane nie opublikowane), cyt. Wright L. D., Skeggs H. R., Rubin S. H. i De Ritter E., *Vitamins Methods* 2, 683, 1951.
- [29] Sieburth J. M., Gutierrez J., McGinnis J., Stern J. R., Schneider B. H., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 76, 15, 1951.
- [30] Stokstadt E. L. R., Jukes T. H., Pirce J. V., Page A. C., jr i Franklin A. L., *J. Biol. Chem.* 180, 647, 1949.
- [31] Stokstadt E. L. R., Jukes T. H., *Poultry Sci.* 29, 611, 1950.
- [32] Stokstadt E. L. R., Jukes T. H., *Proc. Soc. Exp. Med. Biol. Med.* 73, 523, 1950.
- [33] Stokstadt E. L. R., *Rapports 3-ème Congrès International de Biochimie*, Bruxelles, 1955.
- [34] Taylor J. H., Gordon W. S., *Nature* 176, 312, 1955.

EFFECT OF SULPHATHIAZOLE ON THE BIOSYNTHESIS OF B_{12} VITAMINS
BY *PROPIONIBACTERIUM SHERMANII*

Summary

The influence of sulphathiazole on the biosynthesis of cobalamins by *Propionibacterium shermanii* was investigated.

Amounts of 0.5 or 0.8 mg./ml. sulphathiazole were added to young cultures of *Propionibacterium shermanii*.

The growth was carried out both in aerobic (by shaking) and relatively anaerobic conditions.

In either case we found that the addition of sulphathiazole induced a change in the proportions between the different forms of B_{12} , synthesized by *Propionibacteria*, i. e. the amount of B_{12} (cyanocobalamin-neutral) increased and that of B_{12p} (cyanocobalamin-desnucleotide-factor B) decreased.

Under aerobic conditions the increasing of B_{12} and decreasing of B_{12p} (factor B) was greater than in anaerobic conditions.

Under aerobic conditions we found besides B_{12} and B_{12p} another form of B_{12} , and under relatively anaerobic conditions, 2 other forms of B_{12} (probably — pseudovitamin B_{12} and the factor A).

The entire amount of the cobalamins synthesized not determined (vitamin B_{12} , B_{12p} and other cobalamins) was higher in the media with sulphathiazole addition, especially under aerobic conditions.

Otrzymano 10.2.58 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 zwięźle, ale zwięźłość 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 „ μ g“, a nie „ γ “. 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 pospolitych kwasów i zasad wyraża się pojęciem normalności (N), natomiast dla roztworów soli należy posłużyć się pojęciem molarowości (M): 0,25 N HCl, 0,15 M NaH₂PO₄. Stężenie ułamkowe należy wyrazić systemem dziesiętnym, np. 0,25 N HCl, a nie 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 kartce. 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 odmiernej 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.

Faint, illegible text at the top of the page, possibly bleed-through from the reverse side.

Main body of faint, illegible text, appearing as ghosting from the reverse side of the document.

Redakcja Acta Biochimica Polonica przychylając się do prośby Wydawnictwa, podaje do wiadomości Czytelników, że ukazało się nowe czasopismo biochemiczne:

B I O T I C A — ARCHIVES OF BIOCHEMICAL PHARMACOLOGY
published by PERGAMON PRESS London, New York, Paris, Los Angeles.

Chairman: Professor A. Haddow, London.

Vice-Chairmen: Dr. S. Farber, Boston.
Professor Z. M. Bacq, Liege.

Supported by an International Honorary Editorial Advisory Board Regional Editors:

United Kingdom: Sir Rudolph Peters, Cambridge.
Dr. P. Alexander (Executive Editor, U.K.), London.

Continental Europe: Professor M. Welsch, Liege.

United States: Professor A. D. Welch, Yale University.

Canada: Professor H. Cullumbine, University of Toronto.

This new international journal will be devoted to research into the development of biologically active substances and their mode of action at the biochemical and sub-cellular level.

Full length papers will be published approximately three months, and short communications in six to eight weeks, after final acceptance.

In addition to original research papers, the journal will offer immediate publication for Preliminary Communications. Letters to the Editors, offering comment on previous articles, will also be accepted, when the contribution is considered warranted by the Editors.

The journal will include reports on all types of cells (plant, micro-organism and animal) but particular emphasis will be given to cancer chemotherapy and related studies. It is hoped that research will be stimulated as a result of collecting together in one publication investigations from different fields having as a common link the same fundamental problems.

The new journal will provide a forum for the publication of all phases of pure and applied cellular pharmacology including organochemical, physicochemical, biochemical and cytological studies. By including all aspects of research involved in the development of biologically active materials (chemotherapeutic agents as well as insecticides, fungicides, plant growth regulators, etc.), it is hoped that a better appreciation of the problems involved will be attained. In the past the different research approaches which make up these investigations have almost invariably been reported in a number of widespread publications and the interplay of different types of investigations towards solving the main problem has thereby been available only with difficulty to workers in neighbouring fields. The ARCHIVES OF BIOCHEMICAL PHARMACOLOGY is intended to remedy this defect and to provide a means of viewing the entire field in its proper perspective.

A diary of events and meetings of interest to readers will be provided, and books in the field will be reviewed.

The journal will be issued in parts, each volume consisting of four parts, and monthly publication is anticipated.

Fifty free reprints of each paper will be given to contributors and additional reprints may be obtained at reasonable cost.

Я. КШЕМИЦКА

17-КЕТОСТЕРОИДЫ И 17-ГИДРОКСИСТЕРОИДЫ В МОЧЕ ЛЮДЕЙ,
КРОЛИКОВ И КРЫС

II. ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ РАЗДЕЛЕНИЕ НЕЙТРАЛЬНЫХ 17-КЕТОСТЕРОИДОВ

Резюме

Нейтральные 17-кетостероиды из мочи человека, кролика и крысы разделялись на фракции методом хроматографии на колонне, заполненной окисью алюминия. Результаты фракционирования весьма различны у человека и у обоих видов грызунов. У последних наиболее обильны две фракции, из которых первая обладает полярностью дегидроизоандростерона, вторая — полярностью 11-оксистероидов. Андростерон и этиохоланолон, которые у человека присутствуют в количестве 50—70% общего количества 17-кетостероидов, практически отсутствуют у кроликов и крыс. Наши результаты показывают, что глобальному определению 17-кетостероидов у лабораторных животных нельзя приписывать такого же физиологического значения как у человека.

Т. БОРКОВСКИ

ИССЛЕДОВАНИЯ НАД ДЫХАНИЕМ МОЗГОВОЙ ТКАНИ *IN VITRO*

Резюме

Производились исследования над влиянием различных соединений, стимулирующих процесс дыхания мозговой ткани *in vitro*.

Производились сравнительные исследования на срезах и гомогенатах коры головного мозга белых мышей, в солевой среде, в которой окисляемым веществом была глюкоза или глютаминовая ки-

слота. Показано, что, независимо от окисляемого субстрата 0,1 М растворы КСl, КВг и КJ, но не KF, значительно увеличивает Q_{O_2} лишь в опытах на срезах мозговой коры. При разрушении клеточной структуры (гомогенизация), ионы калия не стимулируют дыхания, тогда как сопровождающие калий анионы Br' , J' и F' вызывают уменьшение потребления кислорода, независимо от окисляемого субстрата. NH_4Cl в концентрации 0,1 М вызывает, как в гомогенатах, так и в тканевых срезах, в течение первых 30 минут инкубации, увеличение потребления кислорода с последующим торможением дыхания, что проявляется суммарно уменьшением Q_{O_2} . 2,4-динитрофенол вызывает значительное увеличение Q_{O_2} так в срезах, как и в гомогенатах мозговой коры.

З. ЛЯТАЛЛО, А. М. ДАНЦЕВИЧ и Т. МУСЯЛОВИЧ

ВЛИЯНИЕ ИОНИЗИРУЮЩЕЙ РАДИАЦИИ НА СИСТЕМУ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ *IN VITRO*

Резюме

Исследовалось поведение системы свертывания крови *in vitro* после облучения ее факторов дозами рентгеновского излучения до 13 200 г.

В пределе применяемых доз, обнаружено небольшое удлинение времени рекальцинирования в облученной плазме с убогим содержанием пластинок, а также недостаток тромбопластической деятельности после облучения пластинок и фактора Христмаса. Однако, не обнаружено отчетливого влияния лучей X на вторую фазу свертывания.

Констатированное удлинение тромбинового времени подтверждает наблюдения Ризера [23], касающиеся удлинения времени свертывания чистого фибриногена. Не подтверждено наблюдаемой Клиффтеном [5] инактивации плазминогена. Не подтверждено, равным образом, разниц в поведении фибринолитической системы до и после облучения.

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ РАЗДЕЛЕНИЕ ЭЛЕКТРОНЕЙТРАЛЬНЫХ
И ЭЛЕКТРОПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ ФАКТОРОВ ВИТАМИНА B_{12} И B_{12p}
ПОСЛЕ ЭЛЕКТРОФОРЕЗА

Резюме

Разработан метод хроматографического разделения витаминов B_{12} при помощи простой техники бумажной хроматографии: восходящей, нисходящей и круговой; применялось более продолжительное время развертки и более высокая температура при растворителях: вторичный бутанол (уксусная кислота или аммиак, вода) цианистый калий. Достигнуто эффективное разделение электронейтральных и электроположительных (при pH 2,7) электрофоретических фракций препаратов витамина B_{12} на ряд составных частей.

Кристаллический препарат витамина, полученный из городских сточных вод, после электрофореза разделялся в течение шести дней на семь фракций при применении восходящего метода с аммиачным растворителем; некристаллический препарат, полученный при метановом брожении также после электрофореза разделялся в течение шестидневной хроматографии в аналогичных условиях на девять составных частей. Некристаллический препарат витамина B_{12} , полученный при пропионовокислом брожении после электрофореза разделялся в течение шести дней на восемь фракций при восходящей технике с аммиачным растворителем.

Элюированная фракция после электрофореза так называемого витамина B_{12p} (фактор B) оказалась также хроматографически гетерогенной и в течение двухдневного хроматографирования с аммиачным растворителем разделилась на девять составных частей.

При увеличении продолжительности круговой хроматографии кобаламинов не удалось достигнуть такого же эффекта, как при восходящем или нисходящем хроматографическом методе.

Спектрофотометрические определения спектра поглощения главных фракций витамина B_{12} из хроматограмм показали их идентичность со спектром чистого стандартного препарата.

При повторной хроматографии главных фракций витамина B_{12} и B_{12p} из отдельных хроматограмм не произошло дальнейшее разделение.

ИССЛЕДОВАНИЯ НАД ПОЛИМОРФИЗМОМ ГРУППОВЫХ ВЕЩЕСТВ КРОВИ

Резюме

Из свиных желудков, непосредственно после растворения ткани путем переваривания пепсином, получен мукопротеид с групповой активностью А. Этот препарат передвигается в электрическом поле как однородное вещество. Электрофоретическая подвижность его при рН 8,0 составляет $4,10^{-5} \text{ см}^2 \text{ сек}^{-1} \text{ В}^{-1}$. Это вещество было однородно с точки зрения растворимости. Его активность составляла $6,0 \mu\text{г}/100$ гемоглобутинационных единиц на 1 мл сыворотки.

Групповой мукопротеид содержит 80% пептидной части и 20% полисахаридной части. Полисахаридная часть состоит из 5,0% гексозы, 10,6% гексозамина и 1,1% метилпентозы. Спектрофотометрические измерения в ультрафиолетовой области указывают на отсутствие ароматических аминокислот.

Такой же мукопротеид получен путем солиubilизации свежей ткани человеческого желудка мочевиной.

Описанный мукопротеид является формой более близкой к групповому симплексу в клетках, чем исследованный до сих пор мукополисахарид.

Исследовались свойства препаратов групповых веществ, выделенных при гидролизе пепсином желудочной ткани свиней. По мере отделения пептидных остатков возрастает активность и вязкость и уменьшается электрофоретическая подвижность. Изменяется также отношение аминокислот к сахарам. В препаратах, содержащих 13,6%N, т.е. с преобладанием пептидной части, это соотношение составляет 2:1, в мукополисахаридных препаратах, содержащих 6,1%N 1:2. Изменение состава сахаридной части не происходит непрерывно. В препаратах, содержащих 10,3%N это соотношение составляет еще 2:1. Это явление не зависит от способа препарирования. Ни один из полученных препаратов не обладал максимумом абсорбции при 2800Å.

Лишь 70% пептидной части группового мукопротеида поддается перевариванию пепсином. Поэтому, можно считать, что он является тройным симплексом: неперевариваемый пептид - полисахарид - перевариваемый пептид, тогда как групповой мукополисахарид является двойным симплексом: полисахарид-перевариваемый пептид.

Из свежее отмытой желудочной ткани человека можно экстрагировать раствором NaCl групповые вещества с содержанием от приблизительно 13% до 9% N. Это говорит в пользу того, что групповые вещества, находящиеся в желудочном соку, не являются отдельно синтезированной формой, а возникают в организме путем энзиматического гидролиза *in vivo* тканевых групповых веществ.

А. М. ДАНЦЕВИЧ и Б. ЛИПИНСКИ

ВЛИЯНИЕ РЕНТГЕНОВСКОГО ИЗЛУЧЕНИЯ
НА ДЕГИДРАЗУ δ -АМИНОЛЕВУЛИНОВОЙ КИСЛОТЫ

Резюме

Исследовалось влияние рентгеновских лучей на энзиматическую активность дегидразы δ -аминолевулиновой кислоты *in vitro* в дозах от 0 до 80 000 г. Обратимая инактивация этого фермента в облученных полных гомогенатах бычьей печени незначительна. В экстрактах, очищенных от нерастворимых балластных белков, инактивация составляет приблизительно 16% при дозе 60 500 г. В растворах очищенной дегидразы наблюдается уменьшение активности, степень которой зависит от дозы облучения и концентрации фермента.

Увеличение абсорбции света в интервале 240—280 м μ , наблюдаемое в растворах очищенного фермента после облучения дозой приблизительно 80 000 г указывает, что соотношение ароматических аминокислот тирозин/триптофан в белке этого фермента — больше 1.

И. РЕЙФЕР и М. СОЛЕЦКА

ТЕРМИНАЛЬНЫЕ ОКСИДАЗЫ ПРОРОСТКОВ ПШЕНИЦЫ

Резюме

Экстракты из семидневных проростков пшеницы содержат цитохром-оксидазу, но не содержат полифенол-оксидазы.

Экстракты из семидневных проростков пшеницы окрашиваются на воздухе и образовавшийся красный пигмент в присутствии аскорбиновой кислоты поглощает значительные количества кислорода, KCN снижает поглощение кислорода на 50%. Эта реакция не являет-

ся, однако, энзиматической реакцией, так как пигмент образуется также при кипячении экстрактов, причем добавление KCN к кипяченным экстрактам не подавляет поглощения кислорода. Роль цианида состоит в частичном торможении образования пигмента, а не в торможении энзиматической реакции.

Экстракты, диализированные 18 часов при температуре 0°, не образуют окрашенного вещества, а количество поглощаемого кислорода значительно снижается. В диализированных экстрактах наблюдается торможение поглощения кислорода на 50% в присутствии KCN и незначительное торможение в присутствии диэтилдитиокарбамата, что однако не может считаться достаточным доказательством присутствия аскорбин-оксидазы.

Я. ЯНИЦКИ и Ф. ПЕНДЗИВИЛЬК

СОДЕРЖАНИЕ ВИТАМИНОВ B_{12} В СЕМЕНАХ МОТЫЛЬКОВЫХ РАСТЕНИЙ

Резюме

Определялось содержание витамина B_{12} в семенах гороха (*Pisum sativum*), фасоли (*Phaseolus vulgaris*) и люпина (*Lupinus luteus*). Для определений брали проросшие и непроросшие семена после предварительной стерилизации, а также семена проросшие без стерилизации.

Для определений применялись микробиологические методы с *Euglena gracilis* и с мутантом *Escherichia coli*. В исследованных образцах не обнаружено содержание витамина B_{12} .

Я. ЯНИЦКИ и Ф. ПЕНДЗИВИЛЬК

ВЛИЯНИЕ СУЛЬФАТИЗОЛА НА БИОСИНТЕЗ ВИТАМИНОВ ГРУППЫ B_{12} У *PROPIONIBACTERIUM SHERMANII*

Резюме

Исследовалось влияние сульфатиазола на биосинтез кобаламинов у *Propionibacterium shermanii*. К молодым культурам пропионовокислых бактерий добавляли по 0,5 или 0,8 мг сульфатиазола на 1 мл среды.

Культивация проводилась в аэробных условиях на шюттель-аппарате и в относительно анаэробных условиях.

Обнаружено, что независимо от условий культивации (аэробная или относительно-анаэробная культура), сульфатиазол вызывал изменение отношения концентраций кобаламинов, синтезируемых этими бактериями. Увеличивалось значительно количество витамина B_{12} при одновременном относительном уменьшении концентрации витамина B_{12p} . В аэробных условиях увеличение количества синтезирующего витамина B_{12} было еще более заметно.

Кроме витамина B_{12} и витамина B_{12p} в аэробных культурах обнаружен биосинтез еще одного, а в относительно анаэробной культуре еще двух не определенных в этой работе кобаламинов (повидимому аденинопроизводная псевдовитамина B_{12} и фактор А.).

Общее количество синтезируемых кобаламинов (витамина B_{12} , витамина B_{12p} , а также неидентифицированных кобаламинов) увеличивалось в культурах с добавлением сульфатиазола, причем увеличение было более значительным в аэробных условиях.

