

POLSKA AKADEMIA NAUK
KOMITET BIOCHEMICZNY

ACTA
BIOCHIMICA POLONICA

KWARTALNIK

TOM V
Zeszyt 4

WARSZAWA 1958
PANSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE

KOMITET REDAKCYJNY

Tadeusz Korzybski, Irena Mochnacka, Włodzimierz Mozołowski

RADA REDAKCYJNA

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

ADRES REDAKCJI:

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

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE — DZIAŁ CZASOPISM
Warszawa 1, Miodowa 10

Nakład 778+112	Oddano do składania 19.IX.58
Ark. wyd. 10,0, ark. druk. 10,375	Podpisano do druku 10.XII.58
Papier druk sat. 80 g 70 × 100 III kl	Druk ukończ. w grudniu 1958
Cena zł 25.—	Zamówienie 340 A-16

Warszawska Drukarnia Naukowa, Warszawa, Śniadeckich 8

M. ZDYB-GUMIŃSKA i H. DROŹDŹ

**ROZMIESZCZENIE NIEKTÓRYCH WITAMINÓW B W MÓZGU
LUDZKIM***Zakład Chemii Fizjologicznej A. M. w Krakowie**Kierownik: prof. dr B. Skarżyński*

O bogactwie materiału doświadczalnego z zakresu biochemii centralnego systemu nerwowego świadczą najwymowniej wielka monografia McIlwaina oraz zbiorowe monografie pod red. Eliotta i współpr., Koreya i Nurnbergera, N. Pałladina [15, 3, 8, 21], ale przegląd zawartych w tych dziełach danych wskazuje na to, jak mało wiemy o chemizmie mózgu ludzkiego. Przyczyny tego stanu rzeczy wynikają stąd, że metabolizm tkanki nerwowej szybko zmienia się poza ustrojem, a uzyskanie świeżego materiału ludzkiego w toku zabiegów operacyjnych możliwe jest tylko w wyjątkowych wypadkach. Wnioski dotyczące procesów metabolicznych toczących się w mózgu z reguły bywają oparte na badaniu mózgu zwierząt doświadczalnych, którego małe rozmiary uniemożliwiają znowu eksperymentowanie z poszczególnymi wycinkami tego narządu. Toteż olbrzymia większość prac tego typu obejmuje chemizm mózgu jako całość, albo też w najlepszym wypadku wyróżnia jedynie między substancją szarą a substancją białą. Do wyjątków należą badania, w których zajmowano się chemizmem wyodrębnionych jąder podkorowych, mózdzku lub rdzenia. A przecież funkcjonalne zróżnicowanie mózgu zwierząt wyższych i człowieka musiało nasuwać przypuszczenie, że to zróżnicowanie powinno znaleźć odpowiednik biochemiczny.

Ten brak bliższych danych dotyczących ewentualnych różnic w chemizmie poszczególnych odcinków mózgu, a specjalnie mózgu człowieka, skłonił nas do próby podejścia do tego zagadnienia drogą pośrednią.

Wiadomo, że wszystkie witaminy grupy B biorą udział w podstawowych metabolicznych reakcjach i że występują w tkankach przeważnie jako składniki odpowiednich koenzymów. Można więc założyć, że stężenie poszczególnych witaminów grupy B w różnych tkankach pozostaje w związku z intensywnością procesów metabolicznych, w których biorą

udział odpowiednie koenzymy. Wychodząc z tego założenia oznaczaliśmy stężenia tiaminy, ryboflawiny, niacyny i kwasu pantotenowego w różnych odcinkach centralnego systemu nerwowego człowieka w przekonaniu, że porównanie ze sobą uzyskanych wartości może wskazać na pewne różnice w charakterze i w nasileniu metabolizmu tych partii mózgu. Badania te podjęliśmy znajdując w literaturze tylko skąpe dane z tego zakresu, albo też nie znajdując żadnych.

Stosunkowo najwięcej uwagi skupiła na sobie dotychczas tiamina. Pojawienie się wyraźnych objawów neurologicznych w przypadku niedoboru tego witaminu i znana rola tiaminy jako niezbędnego elementu w prawidłowym przebiegu procesów dekarboksylacji kwasu pirogronowego były niewątpliwie przyczyną tego zainteresowania. Najdawniejszymi badaniami zawartości tiaminy w mózgu są dociekania Leonga [10] a także Ochoa i Petersa [19], przeprowadzane na szczurach oraz późniejsze badania Taylora, Pollacka i Williamsa [28] dotyczące również mózgu szczura i mózgu ludzkiego. Badania te nie uwzględniały jednak różnic pomiędzy funkcjonalnie odrębnymi odcinkami centralnego systemu nerwowego. Z mniej odległego okresu pochodzą badania Muralta i współpr. [17] na królikach, Willeli i współpr. [30] na mózgach psich (wyróżniające substancję szarą kory, substancję białą i jądro ogoniaste), prace Lissaka i Martina [11] nad zawartością tiaminy w zwojach nerwowych szczurów i wreszcie prace Zaprudskiej [35] przeprowadzane na różnych częściach centralnego systemu nerwowego królików i kotów. Jakkolwiek więc badania nad rozmieszczeniem tiaminy w mózgu zwierząt doświadczalnych są względnie liczne, brak jest danych dotyczących zawartości tego witaminu w różnych odcinkach mózgu ludzkiego. Jedyną pracą tego rodzaju była publikacja Ferree i współpr. [4], dla nas niedostępna w oryginale.

O wiele bardziej skąpe dane zawarte są w literaturze odnośnie występowania w mózgu niacyny, znajdującej się przecież w każdej komórce jako DPN i TPN. Sprawą tą zajmowali się jedynie Taylor i współpr. [28] oraz Gore i współpr. [5] badając mózgi zwierząt doświadczalnych i człowieka, ale uzyskane przez nich wartości odnoszą się tylko do całości tego narządu. Brak jakichkolwiek danych o rozmieszczeniu tego witaminu w poszczególnych partiach centralnego systemu nerwowego. Ta sama sytuacja dotyczy ryboflawiny, której występowaniem w mózgu królika zajmował się Lowry i współpr. [12] stosując metody histochemiczne.

O zawartości kwasu pantotenowego w tkance nerwowej mówią prace Melampy i Northropa [16], dotyczące mózgu myszy, Williamsa i współpr. [34], traktujące o mózgu szczura, oraz Novelliego, Kaplana i Lipmanna [18], którzy badając zawartość tego witaminu w różnych narządach królika uwzględniali również mózg. O występowaniu kwasu pantotenowego

w różnych częściach mózgu zwierzęcego nie ma żadnych informacji, tak jak również brak badań nad zawartością kwasu pantotenowego w mózgu człowieka.

METODY

Badania nasze przeprowadzaliśmy na mózgach ludzkich osobników skądinąd zdrowych, którzy zmarli nagle, z reguły na skutek urazów. Materiału takiego dostarczały nam sekcje przeprowadzane w Zakładzie Medycyny Sądowej A. M., którego pracownikom składamy podziękowanie za udzielaną nam pomoc. Okres czasu, jaki upływał od chwili zgonu do chwili pobrania próbek do badania, wynosił średnio 24 godziny. Dla oznaczania zawartości tiaminy, ryboflawiny, niacyny i kwasu pantotenowego pobieraliśmy wycinki zawsze z tych samych części prawej i lewej półkuli mózgu. Z kory mózgowej pobieraliśmy wycinki z: 1) *Lobus frontalis — gyrus centralis ant.*, 2) *Lobus parietalis — gyrus centralis post.*, 3) *Lobus temporalis — gyrus temporalis sup.*, 4) *Lobus occipitalis — kora z okolic fissura calcarina.*

W jądrach podkorowych badaliśmy wycinki: 1) *Nucleus caudatus*, 2) *Nucleus lentiformis*, 3) *Thalamus*.

Jako reprezentacyjny materiał substancji białej mózgu używaliśmy wycinków z *centrum semiovale*.

Wszystkie wyżej wymienione witaminy grupy B oznaczaliśmy metodami mikrobiologicznymi. Próbkę tkanki mózgowej po zważeniu i zhomogenizowaniu traktowano odpowiednio do stosowanej metody i po rozcieńczeniu dodawano do pożywek.

Oznaczanie tiaminy. Licząc się z możliwością rozkładu tiaminy na jej obydwa pierścieniowe komponenty w okresie poprzedzającym rozpoczęcie badań, stosowaliśmy metodę mikrobiologiczną polegającą na użyciu *Phycomyces blakesleeanus*, ponieważ drobnoustrój ten nawet w tych warunkach daje dodatni odczyn. Materiał badany po zhomogenizowaniu rozcieńczano odpowiednio wodą podwójnie destylowaną. Zawiesinę tę dodawano w ilości 1 ml do kolbek szklanych zawierających 12,5 ml pożywki wg Hamnera i współpr. [6], po czym dopełniano wodą podwójnie destylowaną do objętości 25 ml. Równocześnie przygotowywano serię wzorcową dodając do kolbek z pożywką tiaminę w ilościach: 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5 i 0,6 μg oraz przygotowywano próbę ślepą, będącą sprawdzianem stopnia zanieczyszczenia pożywki oznaczanym witaminem.

Wyjałowioną pożywkę szczepiono zawiesiną zarodników *Phycomyces* w soli fizjologicznej. Po 14 dniach wzrostu w temp. 20° grzybnie prze-mywano, suszono i ważono. Średnią wagi 3 równoległych pomiarów prze-

liczano na zawartość tiaminy w oparciu o krzywą wzorcową wykreśloną oddzielnie dla każdej serii oznaczeń. Znalezioną ilość μg witaminu w próbie przeliczano na 1 g tkanki świeżej i suchej.

Oznaczanie ryboflawiny. Stosowano *Lactobacillus casei* i wolną od ryboflawiny pożywkę Roberts'a i Snella [23, 26] zmodyfikowaną: 1) dodaniem do każdego 100 ml pożywki, zamiast 20 mg cystyny, 7,5 mg cystyny i 7,5 mg tryptofanu, 2) dodaniem, zamiast 4 g kazeinu hydrolizowanego kwasem, 2,5 g kazeinu trawionego enzymatycznie, 3) przez dodanie 2 mg ksantyny.

Przygotowanie materiału do badania przeprowadzano wg Wegnera i współpr. [31]. Klarowny przesącz wytrząsano z eterem celem uwolnienia roztworu od substancji tłuszczowych pobudzających wzrost *Lactobacillus casei*. Odpowiednio rozcieńczone próbki dodawano w objętości 1 ml do probówek zawierających 5 ml pożywki i uzupełniano wodą podwójnie destylowaną do objętości 10 ml. Równocześnie przygotowywano próbę ślepą oraz szereg próbek wzorcowych zawierających ryboflawinę w ilościach: 0,05, 0,1, 0,15, 0,2 i 0,25 μg . Wszystkie zabiegi, w toku których ryboflawina mogłaby być narażona na rozkład pod wpływem światła, przeprowadzano w ciemności. Po wyjałowieniu pożywki szczepiono zawiesiną bakterii *L. casei* w soli fizjologicznej. Inkubacja przeprowadzona w 37° trwała 72 godz. Wyprodukowany przez bakterie kwas mlekowy oznaczano miareczkując potencjometrycznie 0,1 N NaOH. Z trzech równoległych pomiarów wyciągano średnią ilość zużytych ml NaOH i na krzywej wzorcowej odczytywano zawartość ryboflawiny w próbkach.

Oznaczanie niacyny. Kwas nikotynowy oznaczano przy pomocy *Lactobacillus arabinosus*, stosując wolną od niacyny pożywkę Roberts'a i Snella [25, 23], zmodyfikowaną w sposób, jaki opisano w związku z oznaczaniem ryboflawiny. Badanego materiału nie poddawano żadnym specjalnym zabiegom, zmierzającym do odszczepienia amidu kwasu nikotynowego z jego połączeń w kodehydrogenazach, gdyż wg McIlwaine'a [14] kodehydrogenazy ulegają w izolowanej tkance nerwowej rozkładowi enzymatycznemu bardzo szybko. Wstępne próby przeprowadzane przez nas wykazały, że stężenie wolnej niacyny względnie jej amidu w tkance nerwowej już w kilka godzin po śmierci osiąga wartości maksymalne. Zaznaczyć należy, że *L. arabinosus* reaguje jednakowo zarówno na obecność kwasu nikotynowego, jak i jego amidu; niemniej niejednokrotnie stosowaliśmy postępowanie Krehla i współpr. [9], zamieniające amid niacyny na niacynę. Postępowanie to nie zmieniało uzyskanych wyników.

Podobnie jak w poprzednio opisanych metodach dodawano 1 ml roztworu zawierającego materiał badany do probówek z 5 ml pożywki. Równolegle przygotowywano próbę ślepą oraz szereg próbek standardo-

wych zawierających: 0,05, 0,1, 0,15, 0,2, 0,25, 0,3, 0,35, 0,4, 0,45 i 0,5 μg kwasu nikotynowego. Wyjałowioną pożywkę szczepiono przemytą w soli fizjologicznej zawiesiną bakterii *L. arabinosus*. Inkubacja przeprowadzana w temp. 30° trwała 72 godziny. Ilość wytworzonego kwasu mlekowego oznaczano podobnie jak przy badaniu ryboflawiny.

Oznaczanie kwasu pantotenowego. Dla oznaczenia tego witaminu posługiwaliśmy się *Lactobacillus arabinosus*, hodowanym na zmodyfikowanej syntetycznej pożywce Barton-Wrighta [2]. Modyfikacja polegała na: 1) zastąpieniu 1 g peptonu i 0,4 g kazeinu w 100 ml pożywki przez 2,5 g kazeinu trawionego enzymatycznie, 2) dodaniu, zamiast 40 mg cystyny, 7,5 mg cystyny i 7,5 mg tryptofanu na 100 ml pożywki, 3) dodaniu 1 mg kwasu foliowego, 4) pominięciu ksylozy.

Materiał badany musiał być pierwotnie poddany zabiegom uwalniającym kwas pantotenowy z koenzymu A. Początkowo stosowaliśmy metodę Novelliego, Kaplana i Lipmanna [18], używając do uwolnienia kwasu pantotenowego z jego połączeń enzymu uzyskanego z wątroby kurczęcia [7] i fosfatazy jelitowej [24]. Zabieg ten okazał się jednak żmudnym z powodu wybitnej nietrwałości stosowanych enzymów. Zwróciliśmy więc uwagę na opisane przez Novelliego i współpr. [18] uwalnianie się kwasu pantotenowego w toku autolizy komórki. Porównując zawartość kwasu pantotenowego w tkance mózgowej poddanej rozkładowi enzymatycznemu i autolizie, stwierdziliśmy tylko minimalne różnice. Do tego samego wyniku doszedł Marnay [13], wykazując zgodność ilości kwasu pantotenowego wątroby uwolnionego przez działanie enzymów i przez autolizę. Próby te skłoniły nas do użycia niżej podanego postępowania.

Zhomogenizowane próbki tkanki mózgowej pozostawiono na okres 24 godz. w temp. 37° w naczyniach zamkniętych z dodatkiem kilku kropel toluenu. Po odpowiednim rozcieńczeniu zautolizowanych próbek materiał badany dodawano w ilości 1 ml do 5 ml pożywki uzupełniając wodą podwójnie destylowaną do objętości 10 ml. Równocześnie przygotowywano próbę ślepą i serię próbek wzorcowych, zawierających kwas pantotenowy w ilościach: 0,005, 0,01, 0,02, 0,04, 0,06, 0,08 i 0,1 μg . Po wyjałowieniu szczepiono pożywkę zawiesiną przemytych bakterii *L. arabinosus*. Inkubacja przeprowadzana była w temp. 30° w ciągu 72 godz. Produkcję kwasu mlekowego, będącą wyrazem wzrostu hodowli bakterii, oznaczano w ten sam sposób jak przy badaniu zawartości ryboflawiny i niacyny.

Uzyskane wyniki zawartości witaminów w badanych próbkach przeliczano na 1 g wilgotnej tkanki nerwowej oraz na 1 g suchej tkanki, przyjmując dane dotyczące zawartości wody w centralnym systemie nerwowym z pracy Tupikowej i Gerarda [29].

WYNIKI

Z tablicy 1, podającej rozmieszczenie tiaminy w różnych odcinkach mózgu ludzkiego, wynika, że nie ma, dającej się wykazać statystycznie, różnicy w stężeniu tiaminy w substancji szarej kory mózgu, zarówno

T a b l i c a 1

Rozmieszczenie tiaminy w mózgu człowieka

Materiał badany	Pół- kula	Ilość móz- gów	B ₁ μg/g świeżej tkanki	Średnie odchyle- nie	Średni błąd	B ₁ μg/g suchej tkanki	Średni błąd
<i>Lobus frontalis-gyrus cen- tralis anterior</i>	<i>sin.</i>	12	2,2	± 0,62	± 0,18	11,0	± 0,9
	<i>dex.</i>	13	2,2	± 0,92	± 0,25	11,0	± 1,2
<i>Lobus parietalis-gyrus centralis posterior</i>	<i>sin.</i>	13	2,4	± 0,71	± 0,19	12,0	± 0,9
	<i>dex.</i>	12	2,4	± 0,90	± 0,25	12,0	± 1,2
<i>Lobus temporalis-gyrus temporalis superior</i>	<i>sin.</i>	13	2,5	± 0,62	± 0,17	12,5	± 0,8
	<i>dex.</i>	14	2,2	± 0,67	± 0,18	11,5	± 0,9
<i>Lobus occipitalis okolicie fissura calcarina</i>	<i>sin.</i>	14	2,1	± 0,81	± 0,22	10,5	± 1,0
	<i>dex.</i>	13	2,3	± 0,84	± 0,23	11,5	± 1,1
<i>Nucleus caudatus</i>	<i>sin.</i>	13	3,4	± 0,94	± 0,26	14,7	± 1,1
	<i>dex.</i>	13	2,9	± 0,61	± 0,17	12,6	± 0,7
<i>Nucleus lentiformis</i>	<i>sin.</i>	13	3,5	± 0,90	± 0,25	15,2	± 1,0
	<i>dex.</i>	12	3,3	± 0,92	± 0,26	14,3	± 1,1
<i>Thalamus</i>	<i>sin.</i>	11	3,7	± 0,78	± 0,23	14,8	± 0,9
	<i>dex.</i>	11	3,5	± 0,73	± 0,28	15,2	± 1,2
<i>Substantia alba</i>	<i>sin.</i>	14	1,5	± 0,54	± 0,14	5,0	± 0,4
	<i>dex.</i>	14	1,5	± 0,52	± 0,14	5,0	± 0,4

między obiema półkulami, jak i między czterema różnymi odcinkami kory. Średnia zawartość tiaminy w substancji szarej kory odpowiada w przybliżeniu 2,3 μg/1 g świeżej tkanki, tzn. około 11 μg/1 g tkanki suchej. Znacznie większe wartości, bo około 3,3 μg/1 g świeżej masy (w przybliżeniu 15 μg/1 g suchej masy) wykazują jądra podkorowe, przy czym nie ma również żadnej różnicy między tymi wartościami dla *N. caudatus*, *N. lentiformis* i *Thalamus*. Zawartość tiaminy w substancji białej jest niższa niż w substancji szarej i wynosi 1,5 μg/1 g świeżej tkanki.

Powyższe wyniki pokrywają się na ogół z wartościami podanymi przez Ferrebee i współpr. [4], którzy stwierdzili najwyższą zawartość tego witaminu w mózgu ludzkim w jądrach podkorowych, najniższą w substancji białej. Różnice tkwią tylko w wartościach absolutnych, które u autorów

amerykańskich są przeciętnie o 50% niższe od wartości naszych. Nie mając dostępu do oryginalnej publikacji nie wiemy, jakimi metodami posługiwali się ci autorzy i nie możemy określić, czy różnice absolutnych wartości dla stężenia tiaminy w mózgu ludzkim, występujące w naszej pracy, polegają na odmiennym sposobie postępowania analitycznego. Przymierzalnie nie wchodzi tu w rachubę zmiany zawartości tiaminy w mózgu, zależne od sposobu odżywiania, gdyż jak wynika z pracy Solcedo [27], zawartość tiaminy w mózgu zwierząt doświadczalnych spada dopiero po długim okresie czasu karmienia dietą zawierającą niedostateczne ilości witaminu B₁.

T a b l i c a 2

Rozmieszczenie niacyny w mózgu człowieka

Materiał badany	Półkula	Ilość mózgów	Niacyna $\mu\text{g/g}$ świeżej tkanki	Średnie odchylenie	Średni błąd	Niacyna $\mu\text{g/g}$ suchej tkanki	Średni błąd
<i>Lobus frontalis-gyrus centralis anterior</i>	<i>sin.</i>	14	27,5	$\pm 4,8$	$\pm 1,2$	137,5	$\pm 6,0$
	<i>dex.</i>	14	28,4	$\pm 5,2$	$\pm 1,4$	142,0	$\pm 7,0$
<i>Lobus parietalis-gyrus centralis posterior</i>	<i>sin.</i>	14	28,5	$\pm 6,3$	$\pm 1,7$	142,5	$\pm 8,0$
	<i>dex.</i>	14	29,2	$\pm 5,5$	$\pm 1,4$	146,0	$\pm 7,0$
<i>Lobus temporalis-gyrus temporalis superior</i>	<i>sin.</i>	14	25,7	$\pm 4,3$	$\pm 1,1$	128,5	$\pm 5,5$
	<i>dex.</i>	15	25,5	$\pm 4,8$	$\pm 1,2$	127,5	$\pm 6,0$
<i>Lobus occipitalis okolice fissura calcarina</i>	<i>sin.</i>	15	30,2	$\pm 6,1$	$\pm 1,6$	151,0	$\pm 8,0$
	<i>dex.</i>	14	30,5	$\pm 5,9$	$\pm 1,6$	152,5	$\pm 8,0$
<i>Nucleus caudatus</i>	<i>sin.</i>	13	26,5	$\pm 6,7$	$\pm 1,9$	115,2	$\pm 8,3$
	<i>dex.</i>	14	24,8	$\pm 4,6$	$\pm 1,2$	107,8	$\pm 5,2$
<i>Nucleus lentiformis</i>	<i>sin.</i>	12	29,4	$\pm 7,0$	$\pm 2,0$	123,0	$\pm 8,7$
	<i>dex.</i>	14	28,5	$\pm 6,6$	$\pm 1,7$	123,0	$\pm 7,4$
<i>Substantia alba</i>	<i>sin.</i>	15	25,2	$\pm 5,4$	$\pm 1,4$	84,0	$\pm 4,7$
	<i>dex.</i>	15	25,7	$\pm 5,9$	$\pm 1,4$	85,0	$\pm 4,7$

Analogiczne wyniki spotykamy w literaturze odnośnie rozmieszczenia tiaminy w poszczególnych odcinkach mózgu zwierząt doświadczalnych. Villela i współpr. [30] badali mózgi psów, a Zaprudskaja [35] królików i kotów. Z badań Villeli wynika, że największym stężeniem tiaminy cechują się jądra podkorowe ($2,0 \mu\text{g}/1 \text{ g}$ tkanki świeżej), najniższym — substancja biała ($1,2 \mu\text{g}/1 \text{ g}$ tkanki świeżej). Według Zaprudskiej zarówno u królików, jak i u kotów zawartość tiaminy w jądrze ogoniastym jest znacznie wyższa niż w substancji szarej kory.

Tablica 2 podaje zawartość kwasu nikotynowego w tych samych odcinkach mózgu ludzkiego, w których była oznaczana tiamina. Widzimy,

że szczególnie znamienne różnica ujawnia się w zawartości niacyny między substancją szarą i substancją białą, co najbardziej wyraziście występuje przy przeliczeniu na suchą wagę tkanki. W odróżnieniu od rozmieszczenia tiaminy, której największe stężenia spotykamy w jądrach podkorowych, te właśnie odcinki mózgu zawierają mniej niacyny (110—

T a b l i c a 3

Rozmieszczenie ryboflawiny w mózgu człowieka

Materiał badany	Półkula	Ilość móz-gów	B ₂ μ g/g świeżej tkanki	Srednie odchylenie	Sredni błąd	B ₂ μ g/g suchej tkanki	Sredni błąd
<i>Lobus frontalis-gyrus centralis anterior</i>	sin.	13	2,25	$\pm 0,65$	$\pm 0,17$	11,2	$\pm 0,85$
	dex.	14	2,17	$\pm 0,60$	$\pm 0,16$	10,8	$\pm 0,8$
<i>Lobus parietalis-gyrus centralis posterior</i>	sin.	14	2,40	$\pm 0,64$	$\pm 0,17$	12,0	$\pm 0,85$
	dex.	14	2,57	$\pm 0,82$	$\pm 0,22$	12,8	$\pm 1,1$
<i>Lobus temporalis-gyrus temporalis superior</i>	sin.	13	2,02	$\pm 0,52$	$\pm 0,14$	10,1	$\pm 0,7$
	dex.	14	2,14	$\pm 0,60$	$\pm 0,16$	10,7	$\pm 0,8$
<i>Lobus occipitalis okolice fissura calcarina</i>	sin.	12	2,61	$\pm 0,54$	$\pm 0,15$	13,5	$\pm 0,75$
	dex.	14	2,73	$\pm 0,67$	$\pm 0,18$	13,6	$\pm 0,90$
<i>Nucleus caudatus</i>	sin.	13	2,52	$\pm 0,66$	$\pm 0,18$	10,9	$\pm 0,78$
	dex.	12	2,59	$\pm 0,70$	$\pm 0,20$	11,2	$\pm 0,87$
<i>Nucleus lentiformis</i>	sin.	14	2,66	$\pm 0,56$	$\pm 0,15$	11,5	$\pm 0,65$
	dex.	12	2,29	$\pm 0,60$	$\pm 0,17$	9,9	$\pm 0,74$
<i>Substantia alba</i>	sin.	14	0,66	$\pm 0,26$	$\pm 0,07$	2,2	$\pm 0,2$
	dex.	14	0,61	$\pm 0,23$	$\pm 0,06$	2,0	$\pm 0,2$

125 μ g/1 g suchej substancji) niż szara substancja kory (127—146 μ g/1 g suchej substancji). Pewien wyjątek stanowią okolice *fissura calcarina* w płacie potylicznym, w których zawartość niacyny jest wyraźnie wyższa niż w innych odcinkach substancji szarej.

W dostępnej nam literaturze znaleźliśmy jedynie w pracy Taylora i współpr. dane dotyczące zawartości niacyny w mózgu ludzkim [28]. Według tych autorów zawartość niacyny w mózgu jako całości wynosi 19,6 μ g/1 g wilgotnej tkanki, a więc jest nieco mniejsza niż w naszych badaniach. Zresztą oznaczenia niacyny w mózgu zwierząt doświadczalnych przeprowadzane były bez uwzględniania rozmieszczenia tej substancji w różnych częściach mózgu.

Według Gore i współpr. [5] odpowiednie cyfry dla całego mózgu przedstawiają się następująco: mysz 72 μ g/1 g, szczur 31 μ g/1 g, świnka morska 31 μ g/1 g, królik 24 μ g/1 g.

Tablica 3 podaje rozmieszczenie ryboflawiny w mózgu ludzkim. Bardzo wyraźne różnice w stężeniu ryboflawiny dostrzegamy jedynie między substancją szarą kory i jąder (2,2–2,6 $\mu\text{g}/1\text{ g}$) a substancją białą (0,6 $\mu\text{g}/1\text{ g}$). Również i w tym przypadku zaznacza się większa zawartość tego witaminu w substancji szarej płatu potylicznego w porównaniu z substancją szarą innych odcinków kory. McIlwain [15] przyjmuje w swej monografii zawartość ryboflawiny w mózgu myszy, szczura i królika leżącą w rzęździe wielkości 2,5–5 $\mu\text{g}/1\text{ g}$, nie podając zresztą źródła, z którego zaczerpnął te wartości. Dostępna nam była jedynie praca Lowry i wspóln. [12], którzy posługując się opracowaną przez nich metodą fluorometryczną podają stężenie ryboflawiny w homogenacie całego mózgu królika, wynosi ono 3,6 $\mu\text{g}/1\text{ g}$ świeżej tkanki.

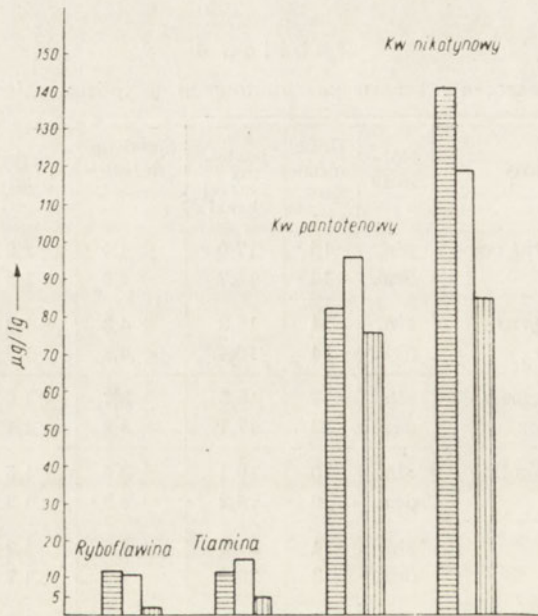
T a b l i c a 4

Rozmieszczenie kwasu pantotenowego w mózgu człowieka




Materiał badany	Pół- kula	Ilość móz- gów	kw. pantot. $\mu\text{g g}$ świeżej tkanki	Średnie odchy- lenie	Średni błąd	kw. pantot. $\mu\text{g g}$ suchej tkanki	Średni błąd
<i>Lobus frontalis-gyrus cen- tralis anterior</i>	<i>sin.</i>	15	17,0	$\pm 4,4$	$\pm 1,2$	85,0	$\pm 6,0$
	<i>dex.</i>	14	15,7	$\pm 4,8$	$\pm 1,3$	78,5	$\pm 6,4$
<i>Lobus parietalis-gyrus centralis posterior</i>	<i>sin.</i>	14	16,3	$\pm 4,3$	$\pm 1,2$	81,5	$\pm 6,0$
	<i>dex.</i>	14	16,4	$\pm 4,3$	$\pm 1,2$	82,0	$\pm 6,0$
<i>Lobus temporalis-gyrus temporalis superior</i>	<i>sin.</i>	13	16,5	$\pm 3,7$	$\pm 1,0$	82,5	$\pm 5,0$
	<i>dex.</i>	13	17,1	$\pm 3,8$	$\pm 1,1$	85,5	$\pm 5,5$
<i>Lobus occipitalis okolicy fissura calcarina</i>	<i>sin.</i>	10	16,1	$\pm 3,6$	$\pm 1,5$	80,5	$\pm 7,4$
	<i>dex.</i>	9	16,2	$\pm 3,9$	$\pm 1,3$	81,0	$\pm 6,5$
<i>Nucleus caudatus</i>	<i>sin.</i>	14	21,6	$\pm 4,6$	$\pm 1,3$	93,9	$\pm 5,6$
	<i>dex.</i>	13	20,4	$\pm 4,4$	$\pm 1,2$	88,6	$\pm 6,2$
<i>Nucleus lentiformis</i>	<i>sin.</i>	14	23,4	$\pm 5,8$	$\pm 1,6$	101,3	$\pm 6,9$
	<i>dex.</i>	13	24,0	$\pm 4,7$	$\pm 1,2$	104,3	$\pm 5,6$
<i>Thalamus</i>	<i>sin.</i>	13	23,4	$\pm 5,8$	$\pm 1,6$	93,6	$\pm 6,4$
	<i>dex.</i>	13	22,8	$\pm 5,5$	$\pm 1,5$	91,6	$\pm 5,5$
<i>Substantia alba</i>	<i>sin.</i>	12	22,7	$\pm 4,9$	$\pm 1,4$	75,6	$\pm 4,6$
	<i>dex.</i>	12	22,8	$\pm 5,9$	$\pm 1,7$	76,0	$\pm 5,6$

Rozmieszczenie kwasu pantotenowego w mózgu ludzkim podaje tablica 4. Podobnie jak w przypadku witaminów poprzednio omawianych, zawartość kwasu pantotenowego w jądrach podkorowych jest znacznie wyższa (20–24 $\mu\text{g}/1\text{ g}$) niż zawartość w różnych częściach substancji sz-

rej kory (15,7—17,1 $\mu\text{g}/1\text{ g}$). Natomiast w odróżnieniu od omówionych powyżej trzech witaminów z grupy B, kwas pantotenowy występuje w substancji białej w stężeniu leżącym zasadniczo w tym samym rzędzie wielkości, jakiemu odpowiada stężenie tego witaminu w substancji szarej kory. Brak jest w dotychczasowej literaturze jakichkolwiek danych nie tylko o rozmieszczeniu kwasu pantotenowego w mózgu ludzkim, ale nawet o jego zawartości w mózgu jako całości. Melampy i Northrop [16] znaleźli u myszy 14—44 μg kwasu pantotenowego na 1 g świeżej tkanki; analogiczne wartości u szczurów wynoszą według R. J. Williamsa i współpr. [34] 57—83 $\mu\text{g}/1\text{ g}$ suchej tkanki. Wahania zawartości kwasu pantotenowego opisane przez tych autorów są następstwem karmienia dietą zawierającą różne ilości kwasu pantotenowego.



Rys. 1. Zestawienie zawartości badanych witaminów w korze, jądrach podkorowych i substancji białej mózgu człowieka w $\mu\text{g}/1\text{ g}$ suchej tkanki

-  — kora mózgowa
-  — jądra podkorowe
-  — substancja biała

Jako zestawienie uzyskanych przez nas wartości dla stężenia tiaminy, niacyny, ryboflawiny i kwasu pantotenowego w trzech zasadniczych odcinkach mózgu ludzkiego podajemy wykres przedstawiony na rys. 1. W wykresie tym zawartość poszczególnych witaminów wyrażona jest w μg na 1 g suchej tkanki nerwowej.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Materiał analityczny przedstawiony w części doświadczalnej naszej pracy doprowadza do wniosku, że rozmieszczenie czterech badanych przez nas witaminów *B* w substancji szarej kory mózgowej nie wiąże się z czynnościowym zróżnicowaniem tej tkanki. Zawartość tiaminy i kwasu pantotenowego w czterech odcinkach kory mózgowej, zarówno lewej jak i prawej półkuli, leży w tym samym rzędzie wielkości i jedynie ryboflawina i kwas nikotynowy zdają się być nagromadzone w substancji szarej płatu potylicznego, w okolicy *fissura calcarina* w stężeniu większym niż w innych zwojach. Wniosek ten wypowiadamy jednak z pewnym zastrzeżeniem, gdyż nie wiadomo, czy ilość badanych przez nas mózgów pozwala na dostatecznie ugruntowaną analizę statystyczną.

Zawartość tych witaminów w korze mózgowej leży w tych granicach stężeń, jakie nieliczni, zajmujący się tym zagadnieniem, badacze [30, 35], analizujący całość kory mózgowej (bez zróżnicowania poszczególnych odcinków) znajdują u zwierząt doświadczalnych. Wyraźne natomiast różnice stężenia czterech badanych witaminów *B* stwierdzamy między substancją szarą kory a substancją szarą jąder podkorowych. Jądra podkorowe zawierają więcej tiaminy i kwasu pantotenowego niż substancja szara kory. Dane te pokrywają się zresztą z wynikami analiz tiaminy Ferrebee i współpr. [4] przeprowadzanymi na mózgach ludzkich i z analogicznymi wynikami Villeli i współpr. [30] uzyskanymi na psach oraz Zaprudskiej [35] na królikach i kotach. Jeszcze raz musimy zaznaczyć, że brak jest tego rodzaju porównawczych danych z zakresu zawartości innych poza tiaminą witamin *B* u zwierząt doświadczalnych.

Odrębnie przedstawia się sytuacja z niacyną, której największe ilości spotyka się w substancji szarej kory, natomiast znacznie mniejsze — w jądrach podkorowych. Te różnice w stężeniu różnych biokatalizatorów typu witaminów *B* występują szczególnie wyraźnie przy graficznym ujęciu naszych wartości, jakie podaje rys. 1.

Powyższe dane usprawiedliwiają wniosek, że zespół enzymów biorących udział w utlenianiu, występujący w szarej substancji jąder podkorowych, ma inny charakter niż analogiczny zespół w substancji szarej kory. W metabolizmie jąder podkorowych prawdopodobnie bardziej doniosłą rolę odgrywają koenzymy flawinowe oraz dwufosfotiamina niż nukleotydy pirydynowe.

Zgodnie z licznymi doświadczalnymi danymi mówiącymi o tym, że nasilenie metabolizmu w substancji białej centralnego systemu nerwowego jest znacznie niższe niż w substancji szarej, spotykamy w substancji białej znacznie mniejszą zawartość wszystkich badanych witaminów. Szczególnie wyraźnie zaznacza się to w wynikach dotyczących rybofla-

winy, tiaminy i kwasu nikotynowego. Natomiast stosunkowo małe różnice zaznaczają się między substancją szarą i substancją białą, jeśli chodzi o zawartość kwasu pantotenowego. Być może, że pozostaje to w związku z intensywną przemianą kwasów tłuszczowych, jaka zachodzi niewątpliwie w osłonkach włókien nerwowych.

Wyniki nasze wykazują pewną korelację między stężeniem poszczególnych witaminów B w różnych odcinkach centralnego systemu nerwowego a intensywnością procesów metabolicznych stwierdzanych w tych odcinkach przez nielicznych, niestety, badaczy. Według Opitza [20] zużycie tlenu przez jądra podkorowe jest znacznie wyższe niż przez substancję szarą kory, a niemal 10-krotnie wyższe niż przez substancję białą. Podobnie przedstawia się sprawa z rozmieszczeniem oksydazy cytochromowej (Wierzbinska [32]). Paralelizm taki nie jest jednak bezwzględny, gdyż według Pałladina [22] aktywność przemiany białkowej oznaczana metodą izotopową jest najwyższa w substancji szarej kory, a wyraźnie niższa we wzgórzu.

Jeżeli pominiemy różnice między substancją białą mózgu oraz korą i zawartość witaminów w obu tych tkankach porównamy z zawartością tych samych witaminów w innych narządach człowieka, to okaże się, że mózg zawiera tych witaminów o wiele więcej niż wiele innych organów. Substancja szara mózgu cechuje się zawartością tiaminy leżącą w tym samym rzędzie wielkości, co zawartość tego witaminu w sercu, w wątrobie i nerce (według Williamsa serce 3,6 $\mu\text{g}/1$ g wilgotnej tkanki, nerka 2,8 $\mu\text{g}/1$ g [33]). Zawartość niacyny jest stosunkowo niska, niższa od tej, jaka cechuje wątrobę, nerkę i mięsień sercowy, natomiast zawartość kwasu pantotenowego w szarej substancji mózgu niższa jest jedynie od wątroby. W porównaniu z mięśniem sercowym, wątrobą i nerką zawartość ryboflawiny w mózgu jest mała.

Brak jest jakichkolwiek statystycznie uchwytanych różnic w stężeniu poszczególnych witaminów z grupy B w substancji szarej obu półkul mózgowych i w różnych odcinkach kory jednej i tej samej półkuli. Jedynie zwiększona zawartość ryboflawiny i kwasu nikotynowego w korze z okolic *fissura calcarina* wyróżnia ten odcinek od reszty substancji szarej kory. Należy stąd wnioskować, że powszechnie znane zróżnicowanie czynnościowe kory mózgowej nie odzwierciedla się w zawartości podstawowych biokatalizatorów. Różnice metabolizmu związane z różnicami czynnościowymi są najwidoczniej zbyt małe, aby mogły być uchwycone statystycznie, albo też różnic takich brak.

Przy tej sposobności pragniemy zwrócić uwagę na pracę Ashby [1], który w sposób zasadniczo analogiczny do naszego sposobu postępowania oznaczał anhydryzę węglanową w różnych odcinkach szarej substancji

kory. Również i ten autor stwierdził, że nie ma różnicy w zawartości badanego przez niego enzymu w różnych odcinkach zarówno prawej jak i lewej półkuli mózgu. Jedynie w płacie potylicznym stwierdził wyraźnie większą aktywność enzymów, a więc w tym samym odcinku, w którym stwierdziliśmy zwiększone stężenie ryboflawiny i niacyny.

Autorzy składają serdeczne podziękowanie Kierownikowi Zakładu Prof. Dr B. Skarżyńskiemu za wiele cennych uwag podczas wykonywania pracy i przy jej redagowaniu.

STRESZCZENIE

Przebadano za pomocą metod mikrobiologicznych zawartość tiaminy, ryboflawiny, niacyny i kwasu pantotenowego w różnych odcinkach mózgu ludzkiego, mianowicie: w substancji szarej kory (*gyr. centralis ant.*, *gyr. centralis post.*, *gyr. temporalis sup.*, okolica *fissura calcarina*), w jądrach podkorowych (*n. caudatus*, *n. lentiformis*, *thalamus*) oraz w substancji białej (*centrum semiovale*).

1. W korze mózgowej znaleziono średnio, w przeliczeniu na 1 g suchej tkanki: 11,4 μg tiaminy, 11,8 μg ryboflawiny, 140,9 μg kwasu nikotynowego oraz 82 μg kwasu pantotenowego. Zawartość tych witaminów w czterech różnych okolicach prawej i lewej półkuli mózgu nie wykazuje statystycznie uchwytnych różnic. Wyjątek stanowi substancja szara płatu potylicznego o nieco zwiększonej zawartości ryboflawiny (13,6 μg) oraz niacyny (152 μg).

2. Dla jąder podkorowych o intensywniejszym metabolizmie znaleziono, w przeliczeniu na 1 g suchej tkanki, wyższą niż w korze zawartość tiaminy (14,7 μg) oraz kwasu pantotenowego (95,6 μg), taką samą zawartość ryboflawiny (10,9 μg), natomiast niższą niż w korze zawartość kwasu nikotynowego (118,5 μg).

3. Mniej aktywna pod względem metabolicznym substancja biała wykazuje, w przeliczeniu na 1 g suchej tkanki, najniższą zawartość tiaminy (5 μg), ryboflawiny (2,1 μg) oraz kwasu nikotynowego (84,5 μg). Ilość kwasu pantotenowego w substancji białej nie odbiega od wartości otrzymanych dla kory i wynosi 75,5 μg na 1 g suchej tkanki.

LITERATURA

- [1] Ashby W., *J. Nervous Mental Disease* 105, 107, 1947.
- [2] Barton-Wright E. C., *Practical Methods for the Microbiological Assay of the Vitamin B Complex and Essential Amino Acids*, Ashe Laboratories, LTD, London, 1949.

- [3] Elliott K. A. C., Page I. H., Quastel J. H., *Neurochemistry*, publ. Thomas Ch. C., Springfield, Illinois U.S.A., 1955.
- [4] Ferrebee, Weissman, Parker, Owen, Symposium 1943, cyt. wg poz. 15, str. 128.
- [5] Gore M., Ibbott F., McIlwain H., *Biochem. J.* **47**, 121, 1950.
- [6] Hamner K. C., Stewart W. S., Matrone G., *Food Res.* **8**, 444, 1943, cyt. wg poz. 25 str. 186.
- [7] Kaplan N. O., Lipmann F., *J. Biol. Chem.* **174**, 37, 1948.
- [8] Korey S. R., Nurnberger J. I., *Neurochemistry*, publ. Hoeber P. B., New York, 1956.
- [9] Krehl W. A., Huerga J., Elvehjem C. A., *J. Biol. Chem.* **166**, 53, 1946.
- [10] Leong P. Ch., *Biochem. J.* **31**, 371, 1937.
- [11] Lissak K., Martin C., *Z. Vitam. Horm. Ferm. Forsch.* **3**, 497, 1950.
- [12] Lowry O. H., Roberts N. R., Leiner K. Y., Wu M. L., Farr A. L., *J. Biol. Chem.* **207**, 1, 1954.
- [13] Marnay C., *C. R. Acad. Sci., Paris* **234**, 2491, 1952.
- [14] McIlwain H., *Biochem. J.* **45**, 337, 1949.
- [15] McIlwain H., *Biochemistry and the Central Nervous System*, Churchill J. A., London, 1955.
- [16] Melampy R. M., Northrop L. C., *Arch. Biochem.* **30**, 180, 1951.
- [17] Muralt G., Muralt A., *Vitamines and Hormones* **5**, 93, 1947.
- [18] Novelli G. D., Kaplan N. O., Lipmann F., *J. Biol. Chem.* **177**, 97, 1949.
- [19] Ochoa S., Peters R. A., *Biochem. J.* **32**, 1501, 1938.
- [20] Opitz E., *Die Chemie und der Stoffwechsel des Nervengewebes*, 3-Colloq. d. G. f. Ph. Ch., Springer-Verlag, Berlin, 1952.
- [21] Palladin A. W. (red.), *Biochimija Nerwnoj Sistemy*, Wyd. Akademii Nauk USRR, Kijów, 1954.
- [22] Palladin A. W., *3-ème Congrès Intern. de Biochimie, Conférences et Rapports.*, Lièges, 1956, str. 375.
- [23] Roberts E. C., Snell E. E., *J. Biol. Chem.* **163**, 499, 1946.
- [24] Schmidt G., Thannhauser S. J., *J. Biol. Chem.* **149**, 369, 1943.
- [25] Snell E. E., *Vitamin Methods*, tłumaczenie rosyjskie *Mikrobiologiczeskije Metody Opredelenia Witaminów i Aminokislot*, Izd. Inostr. Lit., Moskwa, 1954, str. 48.
- [26] Ibid str. 24.
- [27] Solcedo J., *J. Nutr.* **36**, 307, 1948.
- [28] Taylor A., Pollack M. A., Williams R. J., *Studies of the Vitamin Content of Tissues*, Univ. Texas Publ. 4237, 1942, cyt. wg poz. 15.
- [29] Tupikowa N., Gerard R. W., *Am. J. Physiol.* **119**, 414, 1937.
- [30] Villela G. G., Dias M. V., Queiroga L. T., *Arch. Biochem.* **23**, 81, 1949.
- [31] Wegner M. I., Kemmerer A. R., Fraps G. S., *J. Biol. Chem.* **146**, 547, 1942.
- [32] Wierzbinska H. A., cyt. wg poz. 20, str. 193.
- [33] Williams R. J., Eakin R. E., Beerstecher E., Shive W., *The Biochemistry of B Vitamins*, New York, 1950, Reinhold Publ. Corp.
- [34] Williams R. J., Eppright M. A., Cunningham E., Mills C. A., *Arch. Biochem.* **5**, 299, 1944.
- [35] Zaprudskaja D. C., *Biochimija* **16**, 280, 1951.

DISTRIBUTION OF SOME VITAMINS B IN THE HUMAN BRAIN

Summary

Investigations involving microbiological methods concerned the contents of thiamine, riboflavin, niacin, and pantothenic acid in different sections of the human brain, viz., grey substance of the cortex (*gyr. centralis ant.*, *gyr. centralis post.*, *gyr. temporalis sup.*, and the region of the *fissura calcarina*), subcortical nuclei (*n. caudatus*, *n. lentiformis*, *thalamus*), and white substance (*centrum semiovale*).

1. The amounts found in the cerebral cortex averaged 11.4 μg . of thiamine, 11.8 μg . of riboflavin, 140.9 μg . of nicotinic acid, and 82 μg . of pantothenic acid, per 1 g. of dry tissue. No statistically significant differences between the contents of the four vitamins in the four different regions of the right and left hemispheres were revealed. The only exception was the grey substance of the occipital lobe, which showed slightly higher amounts of riboflavin (13.6 μg .) and niacin (152 μg .)

2. In comparison to the cortex, the metabolically more active subcortical nuclei were shown to contain more thiamine (14.7 μg .), and pantothenic acid (95.6 μg .), analogical amounts of riboflavin (10.9 μg), but less nicotinic acid (118.5 μg .), per 1 g. of dry tissue.

3. The metabolically less active white substance was found to contain the least amounts of thiamine (5 μg .), riboflavin (2.1 μg), and nicotinic acid (84.5 μg .), per 1 g. of dry tissue). The amount of pantothenic acid did not differ from the values obtained from the cortex and was 75.5 μg . per 1 g. of dry tissue.

Otrzymano 1.3.1958 r.

J. PAWEŁKIEWICZ i W. WALERYCH

**IZOLACJA PSEUDOWITAMINU B_{12} Z KULTUR
*PROPIONIBACTERIUM SHERMANII**)**

*Katedra Biochemii, Wyższa Szkoła Rolnicza w Poznaniu
Kierownik: doc. dr J. Pawełekiewicz*

Pseudowitamin B_{12} izolowali po raz pierwszy w postaci krystalicznej Pfiffner i współpracownicy [18] z nie zidentyfikowanego bliżej, beztlenowego mikroorganizmu, pochodzącego z żwacza cieląt. Krystaliczny związek posiadał widmo absorpcyjne bardzo zbliżone do widma absorpcyjnego witaminu B_{12} , lecz nie posiadał jego własności biologicznych. Nie wykazywał, mianowicie, ani aktywności przeciwanemicznej w badaniach klinicznych, ani wzrostowych w badaniach żywieniowych. Badania Pfiffnera i współpr. [3, 4] wykazały dalej, że pseudowitamin B_{12} nie zawiera w cząsteczce 5,6-dwumetylobenzimidazolu jak witamin B_{12} , lecz jego miejsce zajmuje związek purynowy — adenina.

W ten sposób pseudowitamin B_{12} zidentyfikowano jako adeninocyjanokobalaminę. Dalszych postępów w badaniu struktury pseudowitaminu B_{12} dokonali Friedrich i Bernhauer [8, 9]. Ponieważ cząsteczka adeniny jest niesymetryczna w odróżnieniu od cząsteczki 5,6-dwumetylobenzimidazolu, istniała możliwość wiązania reszty cukrowej w nukleotydzie adeninowym w pozycji 7 lub 9. Friedrich i Bernhauer udowodnili, że w cząsteczce pseudowitaminu B_{12} występuje 7-ribozyd, co już uprzednio postulowała Hodgkin na podstawie swych badań krystalograficznych [12].

Od czasu odkrycia Pfiffnera pseudowitamin B_{12} izolowano z różnych materiałów. Związek ten występuje w przefermentowanych ściekach miejskich [1, 15, 19], w algach morskich [2, 5]. Izolowano go również z kultur *Corynebacterium diphtheriae* [16, 17]. Adeninocyjanokobalamina jest substancją wzrostową dla szeregu drobnoustrojów i działa analogicznie jak witamin B_{12} . Niektóre z tych mikroorganizmów reagują jednak słabiej na ten związek niż na witamin B_{12} . Na przykład, posiada on tylko

*) Koszty związane z przeprowadzeniem powyższej pracy zostały pokryte z dotacji Komitetu Biochemicznego Wydz. II Polskiej Akademii Nauk.

70—80% aktywności wzrostowej dla szczepu testowego *Euglena gracilis* [7], a jest zupełnie nieaktywny dla *Ochromonas malhamensis* [6].

Prowadzone od dłuższego czasu w naszej pracowni badania nad związkami kobalaminowymi wytwarzanymi przez *Propionibacterium shermanii* wykazywały, że drobnoustrój ten, obok znacznych ilości witaminu B_{12p} (czynnika B) i mniejszych ilości elektroobojętnych nukleotydocyjano-kobalamin (witaminu B_{12}), wytwarza stale w ilościach małych lub śladowych i inne kobalaminy. Jedną z nich posiadała cechy adeninocyjano-kobalaminy. Przedmiotem niniejszego doniesienia jest identyfikacja pseudowitaminu B_{12} w kulturach *Propionibacterium shermanii*.

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

Hodowlę *Propionibacterium shermanii* przeprowadzono w trzech 10-litrowych kolbach, według metody Zodrowa i Pawełkiewicza [20], na pożywce zawierającej kwasowy i trypsynowy hydrolizat kazeiny.

Otrzymywanie koncentratu kobalamin. Po 22 dniach hodowli płyn z kolb odwirowywano na laboratoryjnej wirówce typu Sharples, przy szybkości około 25 000 obr./min. Osad bakteryjny zawieszono w około 14 l wody, dodano 0,5 g NaCN, doprowadzono pH do 6,0 i ogrzewano $1/2$ godziny w temperaturze 110° w autoklawie. Po ostudzeniu ciecz ponownie wirowano na wirówce Sharplesa, by usunąć wytrącone białka, po czym z klarownego płynu adsorbowano kobalaminy na 80 g węgla aktywnego Carbolpol H2. Na następny dzień węgiel odsączano i kobalaminy eluowano z węgla 75% acetonem (około 2,5 l). Dla pełnej elucji ostatnie porcje rozpuszczalnika eluującego alkalizowano amoniakiem (2 ml stężonego amoniaku/100 ml).

Z eluatu odpędzono aceton pod zmniejszonym ciśnieniem i po zobojętnieniu wodnego koncentratu kwasem solnym (1 : 1) kobalaminy ekstrahowano roztworem fenolu w chloroformie (1 : 1 v/v). Stwierdzono przy tym, że mała część kobalamin nie przechodziła do fazy fenolowej. Również i 50% roztwór *p*-chlorofenolu w chloroformie nie ekstrahował tych kobalamin. Można je było natomiast ponownie zaadsorbować na węglu aktywnym i wyelucować z niego 75% acetonem. Połączone ekstrakty fenolowe sączono przez bibułę zwilżoną roztworem ekstrahującym, rozcieńczano $1/2$ obj. chloroformu i taką samą ilością *n*-butanolu, po czym kobalaminy reekstrahowano małymi porcjami wody. Otrzymano około 400 ml silnie zabarwionego koncentratu, który zagęszczano w próżni do małej objętości.

Izolowanie pseudowitaminu B_{12} . Ponieważ metoda elektroforezy bibulowej według Holdswortha [11] jest bardzo wygodna do przeprowadzenia

rozdziału kobalamin, metodę tę zastosowano do izolowania pseudowitaminu B_{12} . W tym celu czysty koncentrat nanoszono w formie pasów na kilkanaście arkuszy bibuły Schleicher-Schüllla nr 2315, odpowiadającej bibule Whatman nr 3. Stwierdzono przy tym doświadczalnie, że ilość naniesionych kobalamin nie może być zbyt duża, wtedy bowiem powstają nie rozdzielające się zacieki. Rozdział elektroforetyczny dał 5 frakcji: I — niewielka ilościowo frakcja elektroujemna o charakterze beznukleotydowym, II — elektroobojętna o barwie typowej dla witaminu B_{12} , III — słabo elektrododatnia o barwie typowej dla witaminu B_{12} , IV — słabodowa, elektrododatnia, o barwie charakterystycznej dla witaminu B_{12} i V — najbogatsza, najsilniej elektrododatnia, typowa dla witaminu B_{12p} .

Frakcja III swym położeniem na elektroforogramie oraz swymi właściwościami najbardziej przypominała pseudowitamin B_{12} . Z tego też powodu frakcje te wycinano z poszczególnych arkuszy rozwiniętych elektroforogramów i eluowano wodą. Elucję przeprowadzano w sposób analogiczny jak przeprowadza się rozwijanie chromatogramu w metodach zstępujących, używając wody jako cieczy rozwijającej. Eluaty frakcji III ściekały do podstawionych zlewek wraz z frontem cieczy. Ponieważ na skutek adsorpcji kobalamin na bibule nie były one ilościowo wypłukiwane, pasek taki suszono i ponownie poddawano analogicznej elucji. Dwu lub co najwyżej trzykrotna elucja ilościowo wymywała kobalaminy z bibuły. Inne stosowane metody elucji, jak cięcie paska na małe fragmenty i zalewanie nadmiarem wody, nie dawały ilościowego wypłukiwania.

Uzyskany eluat frakcji III oczyszczano przez ponowną elektroforezę bibułą, eluowano, jak podano wyżej, i roztwór odparowywano w próżni do sucha. Suchą pozostałość rozpuszczano w 1 ml bezwodnego metanolu i chromatografowano na małej kolumnie, z tlenkiem glinu, o średnicy 10 mm i wysokości 31 mm, stosując metanol do rozwijania chromatogramu. Użyty tlenek glinowy miał pH 6; przygotowano go z handlowego tlenku glinowego do chromatografii według metody Lensa i współpr. [14]. Ponieważ tlenek glinu dosyć silnie adsorbował kobalaminy frakcji III po elucji metanolem dalszą porcję kobalaminy uzyskano przemywając kolumnę 95% metanolem.

Połączone wyciągi metanolowe zagęszczano w próżni do zupełnego wysuszenia, rozpuszczano w małej ilości wody i krystalizowano po dodaniu acetonu. Produkt rekrystalizowano dwukrotnie. W rezultacie z 30 litrów hodowli bakterii propionowych izolowano w formie krystalicznej około 1 mg krystalicznego produktu (frakcji III).

Identyfikacja krystalicznej kobalaminy. Identyfikacji krystalicznej kobalaminy dokonano metodami fizykochemicznymi i mikrobiologicznymi. Jako standardu używano oryginalnego, krystalicznego preparatu pseudowitaminu B_{12} , otrzymanego od prof. Bernhauera.

Elektroforezę bibułąwą przeprowadzono według Holdswortha [11] w 0,8 N CH_3COOH z dodatkiem 0,015% KCN. Chromatografię na bibule przeprowadzono stosując dwa układy jednofazowych rozpuszczalników [13]: *n*-butanol-propanol-2-woda-kwas octowy (10 : 6,5 : 10 : 0,1), rozpuszczalnik wysycano KClO_4 i dodawano ślady NaCN. W drugim przypadku do rozpuszczalnika w miejsce kwasu octowego dodawano tę samą ilość 25% amoniaku.

W testach mikrobiologicznych posługiwano się *Euglena gracilis* [10] i *Ochromonas malhamensis* [6]. Badania mikrobiologiczne wykonywały w Katedrze Mikrobiologii Rolnej W. S. R. mgr Z. Pędziwiłk i mgr M. Malińska.

Metodami fizykochemicznymi nie można było oddzielić badanej kobalaminy od pseudowitaminu B_{12} . Testy mikrobiologiczne wykazały, że izolowana kobalamina posiada tylko około 70% aktywności witaminu B_{12} wobec *Euglena gracilis*, i że jest nieczynną dla *Ochromonas malhamensis*.

Na tej podstawie zidentyfikowano badaną kobalaminę jako adeninocyjanokobalaminę (pseudowitamin B_{12}).

Autorzy składają serdeczne podziękowanie Doc. Dr Józefowi Dudzie i Doc. Dr Karolowi Zdrorowi za umożliwienie korzystania z urządzeń Katedry Mikrobiologii Rolnej W. S. R. w Poznaniu i Prof. K. Bernhauerowi za użyczenie czystego preparatu pseudowitaminu B_{12} oraz Mgr. Mgr. Z. Pędziwiłkowej i M. Malińskiej za wykonanie badań mikrobiologicznych.

STRESZCZENIE

Stwierdzono, że szczep bakterii kwasu propionowego — *Propionibacterium shermanii* — syntetyzuje obok znaczniejszych ilości witaminu B_{12p} (czynnika B) i małych ilości witaminu B_{12} , również śladowe ilości pseudowitaminu B_{12} (adeninocyjanokobalaminy).

Z 30-litrowej hodowli izolowano około 1 mg pseudowitaminu B_{12} w postaci krystalicznej.

LITERATURA

- [1] Bernhauer K., Friedrich W., *Angew. Chem.* **66**, 776, 1954.
- [2] Brown F., Cuthberston W. F. J., Fogg G. E., *Nature* **177**, 188, 1956.
- [3] Dion H. W., Calkins D. G., Pfiffner J. J., *J. Am. Chem. Soc.* **74**, 1108, 1952.
- [4] Dion H. W., Calkins D. G., Pfiffner J. J., *Federation Proc.* **11**, 269, 1952.

- [5] Ericson L. E., Lewis L., *Ark. Kemi* **6**, 427, 1953.
[6] Ford J. E., *Brit. J. Nutrit.* **7**, 299, 1953.
[7] Ford J. E., Porter J. W. G., *Brit. J. Nutrit.* **7**, 326, 1953.
[8] Friedrich W., Bernhauer K., *Angew. Chem.* **68**, 580, 1956.
[9] Friedrich W., Bernhauer K., *Chem. Ber.* **89**, 2507, 1956.
[10] Heinrich H. C., Lahann H., *Z. Naturforsch.* **76**, 417, 1952.
[11] Holdsworth E. S., *Nature* **171**, 148, 1953.
[12] Cit. op. Kon S. K., *Biochem. Symp.*, No. 13, 17, 1955.
[13] Kurnatowski R., Szymkowiak A., Wiśniewski W., Pawełkiewicz J., *Acta Biochim. Polon.* **5**, 19, 1958.
[14] Lens J., Wijmenga H. G., Wolff R., Karlin R., Winkler K. C., De Haan P. G., *Biochem. Biophys. Acta* **8**, 56, 1952.
[15] Neujahr H. Y., *Acta Chem. Scand.* **9**, 622, 1955.
[16] Pawełkiewicz J., Zodrow K., *Acta Microbiol. Polon.* **5**, 319, 1956.
[17] Pawełkiewicz J., Zodrow K., *Acta Microbiol. Polon.*, **6**, 219, 1957.
[18] Pfiffner J. J., Calkins D. G., Peterson R. O., Bird O. D., McGlohon V., Stipek R. W., *Abstr. Pap. Am. Chem. Soc., 120-th Meeting*, 22c, 1951.
[19] Sjöström A. G. M., Neujahr H. Y., Lundin H., *Acta Chem. Scand.* **7**, 1036, 1953.
[20] Zodrow K., Pawełkiewicz J., *Pat. Pol.* 84431, 1956.

THE ISOLATION OF PSEUDOWITAMIN B₁₂
FROM *PROPIONIBACTERIUM SHERMANII* CULTURES

Summary

It has been found that the strain of *Propionibacterium shermanii* synthesises the trace quantities of the pseudovitamin B₁₂ besides important ones of vitamin B_{12p} (factor B) and little of vitamin B₁₂.

It has been isolated a few miligrams of crystalline cobalamin from 30 l of the bacteria culture.

Otrzymano 3.3.1958 r.

E. GAŚSIOR, M. PIETRUSIEWICZ, H. KOWALSKA i J. OPIENSKA-BLAUTH

ZASTOSOWANIE WĘGLA SULFONOWANEGO ESCARBO ORAZ SYNTETYCZNYCH ŻYWIC JONOWYMIENNYCH DO ODSALANIA PŁYNÓW BIOLOGICZNYCH*)

*Zakład Chemii Fizjologicznej A. M. w Lublinie
Kierownik: prof. dr J. Opieńska-Blauth*

Analiza chromatograficzna aminokwasów w moczu, surowicy, płynie mózgowo-rdzeniowym daje dobre wyniki dopiero po usunięciu soli z badanego płynu. Szczególne znaczenie ma tu zastosowanie żywic jonowymiennych, gdyż różne znane dotychczas sposoby odsalania przy pomocy dializy i elektrodializy mogą budzić zastrzeżenie z powodu strat niektórych aminokwasów, zwłaszcza zasadowych. Podobnie, stosowanie rozpuszczalników organicznych do ekstrakcji aminokwasów z roztworów bogatych w sole nie było wystarczające do celów demineralizacji. Zastosowanie jonitów w celu odsalania pozwoliło w większości przypadków na uzyskanie bardzo dobrych wyników, chociaż nie z wszystkich rodzajów żywic odzyskuje się wszystkie aminokwasy. I tak Partridge [9, 10], Westall [17, 18] stwierdzali, że przy eluowaniu amoniakiem nie odzyskuje się argininy z kationitów zawierających dwie grupy funkcyjne: fenolową i sulfonową, natomiast z kationitów polistyrenowych z jedną grupą funkcyjną -SO₃H eluują się amoniakiem wszystkie aminokwasy. Stein i Moore [15] stosowali żywice polistyrenowe, a w szczególności Dowex 50 do frakcjonowanej analizy ilościowej aminokwasów, a Prior i Whiteheade [12], Boulanger i Biserte [2, 3] oraz Noworytko i Sarnecka-Keller [7] stosowali je do odsalania płynów biologicznych.

Celem naszej pracy było: 1. opracowanie warunków adsorpcji i elucji dla różnych gatunków kationitów, a w szczególności dobranie swoistych eluentów dla kationitów niepolistyrenowych, 2. wypróbowanie sulfonowanego węgla Escarbo polskiej produkcji dla celów odsalania.

*) Praca była dotowana przez Komitet Biochem. Wydz. II PAN.

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

I. Rodzaje stosowanych jonowymienników i ich charakterystyka. Do badań porównawczych wykorzystano następujące jonowymienniki: a) kationity polistyrenowe: Dowex 50 (USA), SDW 3 (ZSRR), b) kationit sulfonolowy Amberlit IR 100 (Anglia), c) kationit ortofosforanowy RF (ZSRR), d) węgiel sulfonowany Escarbo (produkcji polskiej), e) kationit karboksylowy KI 4 (produkcji polskiej), f) anionit o nieznanym charakterystyce (Anglia).

T a b l i c a 1

Charakterystyka kationitów stosowanych do odsalania moczu

Nazwa	Typ i grupy funkcyjne	Pojemność w mval/g	Własności pęcznienia	Trwałość mechaniczna	Odporność chemiczna
Dowex 50	polistyrenowy -SO ₃ H	4,2*)	pęcznieje nieznacznie	trwały	niewrażliwy na kwasy i zasady
SDW 3	polistyrenowy -SO ₃ H	3,8 — 4,0*)	pęcznieje**) analogicznie do SDW 1 i SDW 2	"	"
Amberlit IR 100	sulfonolowy -SO ₃ H, -OH	3,0	"	"	"
RF	ortofosforanowy -PO ₄ H ₂	3,6*)	"	"	wrażliwy na alkalia
Escarbo	węgiel sulfonowany -SO ₃ H, -COOH, -OH	2,2	"	ziarna kruche, ulegają roztarciu	wrażliwy na alkalia ***)
KI 4	karboksylowy -COOH	—	pęcznieje w roztworach alkalicznych, wzrost pojemności 200%	trwały	niewrażliwy na kwasy i zasady

* Trostianskaja i współpr. [16].

** Riabczikow i współpr. [13].

*** Jurkiewicz i współpr. [5, 6].

Charakterystyka anionitu za pomocą krzywej potencjometrycznego miareczkowania wykazała, że jest to anionit słabo zasadowy. W charakterystyce stosowanych jonowymienników uwzględniono w zestawieniu z grupami funkcyjnymi ich cechy fizyczne i chemiczne.

II. *Przygotowanie kolumn jonitowych.* Do wypełnienia kolumny używano ziarn o średnicy 0,06—0,075 mm. Ziarna żywic polistyrenowych miały średnicę nieco większą niż 0,2 do 0,8 mm. W celu usunięcia zanieczyszczeń przemywano jonity kolejno 2 N HCl, wodą, 2 N NaOH, znowu wodą, aż do osiągnięcia pH 7. Ilości użytego HCl były różne w zależności od rodzaju kationitu. Najmniej kwasu zużywano dla przemycia żywicy Dowex 50 (200 ml), a najwięcej dla węgla Escarbo — aż 500 ml. Kationity RF i Escarbo przemywano dodatkowo roztworem eluentu aminokwasowego w celu usunięcia substancji barwnych. Po dokładnym przemyciu wprowadzano kationity do kolumn. Jako kolumny stosowano zwykle biurety laboratoryjne o średnicy 1 cm i pojemności 50 ml. Na dnie biurety umieszczano warstwę waty, biurety wypełniano wodą i wprowadzano 15 g kationitu suszonego uprzednio przez 24 godziny na powietrzu. Kationity przeprowadzano w formę wodorową przepuszczając 150 ml 2 N HCl z szybkością 8—10 kropli na minutę, a potem przemywając wodą aż do zaniku reakcji na kwas solny. Analogicznie anionit przeprowadzano w formę wodorotlenową stosując 150 ml 2 N NaOH i przemywanie wodą.

III. *Odsalanie płynów biologicznych.* Na kationit będący w formie wodorowej wprowadzano 5 ml moczu lub 3 ml odbiałzonej (trzema obj. absolutnego etanolu) surowicy i przepuszczano przez kolumny z szybkością kilku kropli na minutę. Następnie przepuszczano około 40 ml wody destylowanej w celu usunięcia anionów.

W wycieku wykrywano obok anionów taurynę. W celu odzyskania tauryny, wyciek wodny z kationitu przepuszczano przez kolumnę z anionitem w formie wodorotlenowej. Aniony zatrzymywały się na kolumnie, a tauryna przechodziła do wycieku.

W następnych doświadczeniach przeprowadzano próby eluowania aminokwasów z kationitów. Już próbne doświadczenia wykazały, że dla każdego typu kationitu trzeba dobierać swoiste eluenty. Przebadano, oprócz amoniaku, pirydynę i piperydynę, etyloaminę, dwuetyloaminę oraz propyloaminę. Dobór eluentów dla różnych kationitów zestawiono w tablicy 2.

Pierwszą porcję wycieku w ilości 20—25 ml odrzucano jako niezawierającą aminokwasów. Z dalszego wycieku zbierano z wszystkich kationitów po 40 ml, a z Escarbo 50 ml. Dalsze frakcje praktycznie nie zawierały już aminokwasów. Eluaty z kationitów łączono z eluatami z anionitu zawierającymi taurynę. Połączone roztwory odparowywano do sucha przy użyciu promienników podczerwieni. Po odparowaniu dodawano kilka mililitrów wody w celu usunięcia amoniaku i odparowywano ponownie. Pozostałość rozpuszczano w wodzie w objętości 1—2 ml i наносzono na bibułę objętości odpowiednio przeliczone na mocz pierwotny. Po każdej

serii doświadczeń wymiennicze przemywano wodą, kationity regenerowano 2 N HCl, a anionit 2 N NaOH.

Tablica 2
Eluenty aminokwasów z kationitów

Kationit	Eluent	Uwagi
Dowex 50	2 N NH ₃	
SDW 3	2 N NH ₃	
Amberlit IR 100	2 N NH ₃ 90 ml + aminy alifatyczne 5 ml [4]	
RF	2 N NH ₃ 90 ml + pirydyna 5 ml	
Escarbo	2 N NH ₃ 90 ml + pirydyna 5 ml	
KI 4	a) 2 N NH ₃ b) 2 N NH ₃ + aminy alifatyczne c) 2 N NH ₃ + pirydyna	eluują się tylko aminokwasy obojętne

W toku pracy stwierdzono, że przy użyciu kationitu Dowex 50, mocznik eluuje się łącznie z aminokwasami. Obecność jego przeszkadza w rozwijaniu prawidłowego chromatogramu aminokwasowego. W celu usunięcia mocznika traktowano mocz jeszcze przed odsoleniem ureazą. Na 5 ml moczu dodawano jedną tabletkę ureazy, preparatu angielskiego BDH i wstawiano do termostatu na kilka godzin. Dodawano kwasu solnego w celu zobojętnienia amoniaku i strącenia białek ureazy.

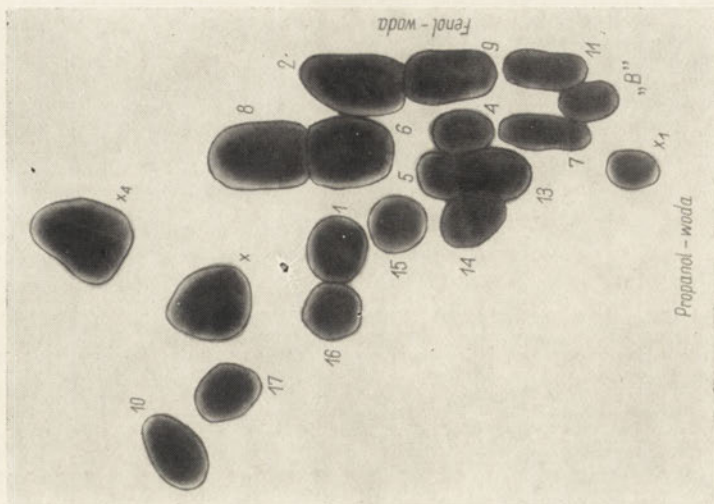
Mocze alkaliczne zawierające węglany należy przed wprowadzeniem na kolumny zakwaszić i usunąć CO₂, ponieważ pęcherzyki dwutlenku węglowego wydzielające się w trakcie przepuszczania próbki przez kolumnę niszczą strukturę kationitu.

W celu wykazania ewentualnego wpływu zakwaszenia moczu na proces odsalania, na żywicach przeprowadzono badania porównawcze z próbkami moczu o różnych pH. Obrazy chromatograficzne aminokwasów otrzymywane z moczów zakwaszonych i obojętnych były jednakowe.

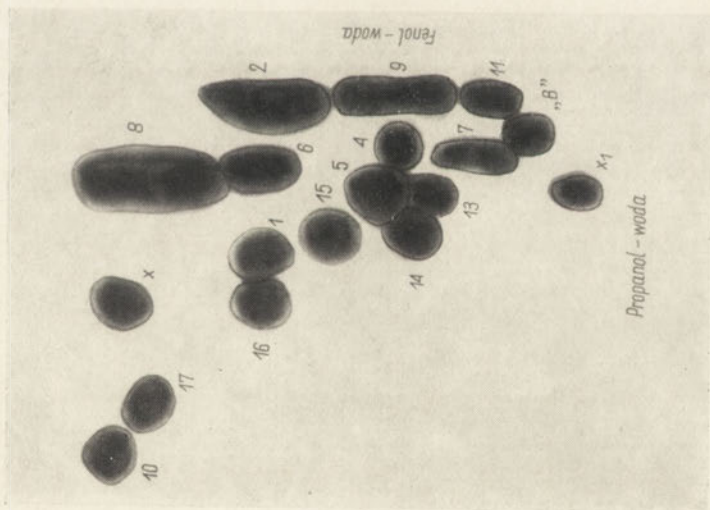
IV. *Oznaczanie azotu aminowego.* Celem porównania strat azotu aminowego podczas odsalania na różnych jonowymiennikach przeprowadzono jego oznaczenie w moczu dwukrotnie, według metody Pope i Stevensa [11] przed wprowadzeniem moczu do kolumny i po odsoleniu. Straty azotu aminowego na użytych do doświadczeń kationitach wykazane na podstawie kilkakrotnych oznaczeń podano w tablicy 3.

V. *Analiza jakościowa aminokwasów w moczu i surowicy po odsoleniu na żywicach.* Przeprowadzono doświadczenia porównawcze na tym

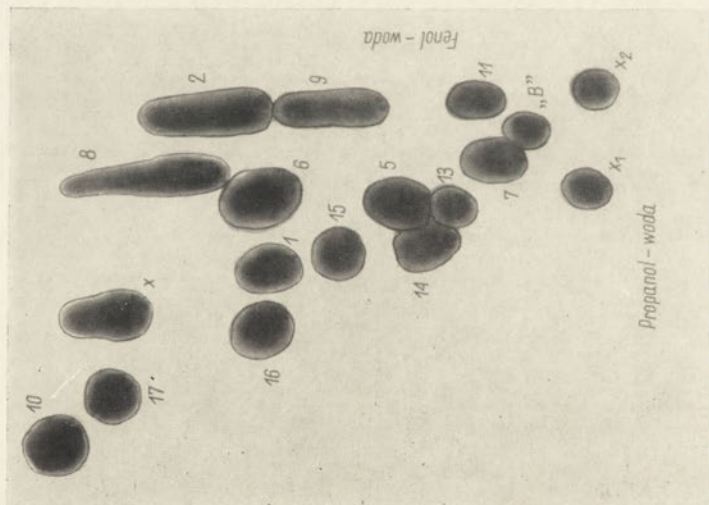
Chromatogramy aminokwasów moczu fizjologicznego z dodatkiem argininy, lizyny i ornityny oraz surowicy
 1 alanina; 2 arginina; 3 kwas asparaginy; 4 asparagina; 5 glicyna; 6 glutamina; 7 kwas glutaminowy; 8 histydyna;
 9 lizyna; 10 leucyna + izoleucyna + feniloalanina; 11 ornityna; 12 prolina; 13 seryna; 14 tauryna; 15 treonina; 16 tyro-
 zyna; 17 walina + metionina + tryptofan. „B”, x, x₁, x₂, x₃, x₄, x₅ — plamy niezidentyfikowane



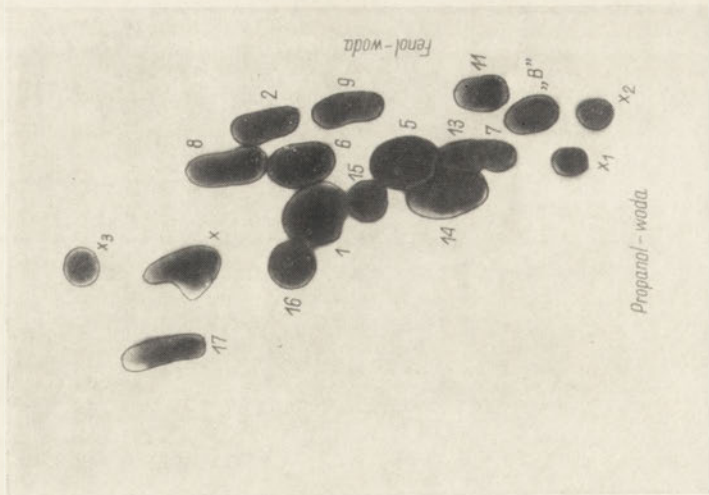
Fot. 2. Mocz odsalany na żywicy SDW 3



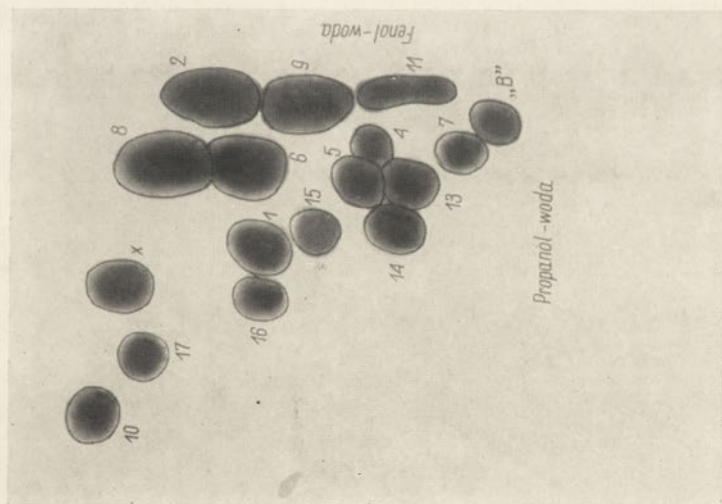
Fot. 1. Mocz odsalany na Dowex 50



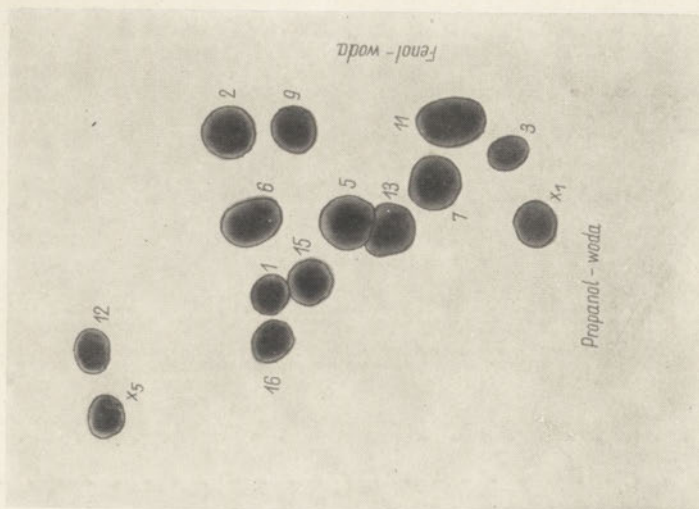
Fot. 3. Mocz odsalany na Amberlicie IR 100



Fot. 4. Mocz odsalany na Escharbo



Fot. 5. Mocz odsalany na żywicy RF



Fot. 6. Surowica fizjologiczna odsolona na SDW 3

samym moczu fizjologicznym przepuszczanym przez kolumny z żywiciami: Dowex 50, Amberlit IR 100, kationit RF, kationit SDW 3, węgiel sulfonowany Escarbo. Dowex 50 stosowano w postaci preparatu gruboziarnistego i drobnoziarnistego. Stwierdzono, że zarówno pod względem zdolności odsalania, jak i pod względem składu aminokwasowego w eluatach obydwie gatunki żywic nie różniły się między sobą.

T a b l i c a 3

Straty N_{NH_3} podczas procesu odsalania na żywicach jonowymiennych

Rodzaj jonowymiennika	% odzyskanych aminokwasów
Dowex 50	85 — 90
Sulfofenol	80 — 85
SDW 3	90 — 93
RF	ponad 90
Escarbo	ponad 90

Przy stosowaniu żywic karboksylowych odzyskiwano jedynie aminokwasy obojętne.

Ponieważ zawartość aminokwasów zasadowych, a w szczególności argininy jest nieznaczna, dlatego zastosowano do badań porównawczych dla różnych gatunków żywic mocz fizjologiczny; użyto go z dodatkiem aminokwasów zasadowych, argininy, lizyny i ornityny, w ilościach odpowiadających średniej zawartości innych aminokwasów w moczu fizjologicznym.

Próby po 5 ml tego samego moczu fizjologicznego i po 3 ml odbiałzonej surowicy poddawano demineralizacji za pomocą pięciu wyżej podanych gatunków żywic według sposobu poprzednio opisanego, stosując eluenty swoiście dobrane do każdego typu żywicy (wg tabl. 2). Z eluatów doprowadzonych do objętości 1,5 ml nanoszono na arkusze bibuły Whatman nr 1 po 75 μ l, co odpowiadało około 250 μ l moczu pierwotnego. Chromatogramy rozwijano techniką dwukierunkową, wstępującą, w układach — I. propanol : woda, II. fenol : woda i wywoływano 0,1% roztworem acetonowym ninhydryny, w temperaturze pokojowej.

Umieszczone fotografie przedstawiają obrazy chromatogramów moczu odsolonego na różnych gatunkach kationitów. (Fotografie: 1, 2, 3, 4, 5 — chromatogramy aminokwasów z moczu, 6 — chromatogram aminokwasów surowicy).

Porównanie chromatogramów z tego samego moczu przy zastosowaniu różnych żywic jonowymiennych nasuwa następujące spostrzeżenia:

- 1) chromatogramy pod względem liczby i jakości wykrywanych aminokwasów są prawie jednakowe;
- 2) dodane do moczu fizjologicznego aminokwasy zasadowe: arginę, lizynę, ornitynę wykrywa się na wszystkich chromatogramach;
- 3) plamy aminokwasów zasadowych (argininy, lizyny, ornityny) na chromatogramach z moczu odsolonego na węglu sulfonowanym Escarbo są nieco słabsze w porównaniu do analogicznych plam na chromatogramach pochodzących z innych żywic, ale tylko dlatego, że do tej próbki moczu dodano mniejsze ilości tych aminokwasów;
- 4) zidentyfikowano większość aminokwasów;
- 5) plamy zespołowe „Leu“ i „Val“ nie były poddawane rechromatografii („Leu“ = leucyna + izoleucyna + feniloalanina, „Val“ = walina + metionina + tryptofan);
- 6) na wszystkich chromatogramach występują dwie nie znane nam plamy: „B“ w obszarze kwasu glutaminowego, „P“ w obszarze między walina a histydyną;
- 7) na niektórych chromatogramach pojawiają się jeszcze dodatkowe plamy w obszarze kwasu asparaginowego, których nie zidentyfikowano;
- 8) plamy tauryny odzyskiwanej z anionitu otrzymuje się na wszystkich chromatogramach;
- 9) mimo braku widocznych plam asparaginy na fotografiach chromatogramów pochodzących z żywic Amberlitu i Escarbo, plamy te są zupełnie wyraźne na chromatogramach oryginalnych;
- 10) plamy dla kwasu asparaginowego są niewyraźne i niepewne;
- 11) rozmieszczenie niektórych plam nie jest zupełnie jednakowe na wszystkich chromatogramach. W szczególności zmienia się położenie „Leu“ i „Val“. Być może, że przesunięcia plam są wywoływane zmieniającymi się warunkami w czasie rozwijania chromatogramu. Wpływ ten jest najwyraźniejszy dla aminokwasów najdalej migrujących w obu układach, zarówno w fenolu, jak i propanolu;
- 12) chromatogram aminokwasowy z surowicy po odsoleniu na żywicy jonowymiennej jest znacznie lepszy zarówno pod względem liczby wykrywanych aminokwasów, jak i ich rozdziału od chromatogramu tej samej surowicy odsolonej za pomocą rozpuszczalników organicznych, mimo tego nawet, że zawartość soli w surowicy jest mniejsza niż w moczu.

DYSKUSJA

Sprawa demineralizacji moczu przed analizą chromatograficzną aminokwasów na bibule nastęrcza jeszcze obecnie wiele wątpliwości. Obok nielicznych już dzisiaj zwolenników rozwijania chromatogramów na nieodsolonych moczach naniesionych bezpośrednio na bibułę, większość

autorów wypowiedziała się za odsalaniem. Niektórzy zalecają metodę dializy lub elektrodializy, obecnie stosuje się najczęściej dla tych celów żywice jonowymiennne. Dotychczas stosowano prawie wyłącznie kationity polistyrenowe, a w szczególności Dowex 50. Trudności w nabywaniu tego produktu spowodowały nasze poszukiwania za innymi, bardziej dla nas dostępnymi jonowymiennnikami.

Badania porównawcze przeprowadzane na kationitach z różnymi grupami funkcyjnymi wykazały, że większość z nich nadaje się dla celów odsalania moczu pod warunkiem doboru swoistych eluentów. Dla kationitów o silnie kwaśnych grupach funkcyjnych proces odsalania jest niezależny od pH środowiska w zakresie pH od 1 do 8. Natomiast dla kationitów z grupami funkcyjnymi słabo kwaśnymi, jak $-\text{COOH}$, $-\text{AsO}_3\text{H}$, $-\text{SH}$, pH środowiska odgrywa doniosłą rolę. Przy stosowaniu żywic nie polistyrenowych trudności nastęrczała jedynie tylko sprawa elucji argininy.

Próby dostosowania swoistych eluentów do żywic dały wyniki niezupełnie zgodne z teorią. Trudno jest wyjaśnić, dlaczego arginina nie daje się eluować z kationitu sulfofenolowego za pomocą pirydyny, eluuje się zaś przy pomocy etyloaminy i dwuetyloaminy — zasad silniejszych od amoniaku i pirydyny, natomiast z żywic takich jak Escarbo i żywica RF same aminy alifatyczne nie eluują argininy, elucja zachodzi tylko po dodaniu pirydyny.

Sprawa ta nie jest jeszcze wyjaśniona i wydaje się, że stała dysocjacji K_B eluentu zasadowego nie odgrywa tu decydującej roli. O korzystnym wpływie pirydyny na rozdział aminokwasów na kolumnach jonitowych donosili Sołowiew i współpr. [14]. Tauryna, związek występujący stale i to w znacznej ilości w moczu fizjologicznym, nie zatrzymuje się na żadnym ze znanych dotychczas kationitów, jak to stwierdzili inni autorzy. Zastosowanie do odsolenia jednej próby moczu najpierw kationitu, a następnie anionitu, pozwala odzyskać taurynę w mieszaninach eluatów z kationitu i pierwszego eluatu z anionitu.

Wydaje się ciekawe zachowanie się mocznika na kationicie polistyrenowym Dowex 50. Inne kationity polistyrenowe, jak SDW 3 (ZSRR) i Zeokarb 225 [7] nie wykazywały tego ujemnego efektu. Prawdopodobnie istnieją pewne różnice w strukturze polistyrenowej, które mogą spowodować, że żywice zachowują się niejednakowo w stosunku do niektórych związków apolarnych.

Na specjalne podkreślenie zasługuje możliwość stosowania dla celów odsalania produktu krajowego — węgla sulfonowanego Escarbo. Mimo pewnych niesprzyjających cech, jak słaba wytrzymałość mechaniczna i większa od innych wrażliwość na alkalia, nadaje się ona na podstawie

naszych doświadczeń do odsalania w analizie chromatograficznej aminokwasów.

Nasze badania porównawcze z surowicami fizjologicznymi odsalonymi przy pomocy ekstrakcji rozpuszczalnikami organicznymi wykazały, że demineralizacja na żywicach jonowymiennych daje lepsze wyniki. Zastosowanie techniki dwukierunkowej, wstępującej, w układach: I. propano : woda i II. fenol : woda, pozwala uzyskać na chromatogramach tę samą liczbę aminokwasów, którą się uzyskuje w technice spływowej na większych arkuszach, według której czas rozwijania chromatogramu jest dłuższy.

W porównaniu z techniką jednokierunkową stosowaną przez wielu autorów, liczba aminokwasów, wykrywanych techniką dwuwymiarową w odpowiadających sobie objętościach moczu fizjologicznego, jest większa.

Technika zimnego wywoływania ninhydryną [8] pozwala identyfikować i te aminokwasy, których plamy na skutek zbliżonych do siebie współczynników R_F zlewają się.

Identyfikacja aminokwasów wchodzących w skład zespołowych plam „Leu“ i „Val“ w naszych warunkach rozwijania chromatogramów będzie możliwa jedynie tylko przy pomocy rechromatografii plam. Zainteresowanie mogą budzić nie zidentyfikowane i nie cytowane w literaturze plamy „B“ i „P“ i inne jeszcze występujące sporadycznie. Wyniki badań w celu ich identyfikacji będą przedmiotem oddzielnej publikacji. Oznaczenia podane w tabelicy 3 wykazują, że straty azotu aminowego nie przewyższają 15%, co znacznie podnosi wartość metody demineralizacji za pomocą jonitów.

Autorzy składają tą drogą Prof. Lewandowskiemu z Uniwersytetu Poznańskiego, Doc. Błaszkwskiej z Instytutu Chemii Ogólnej w Warszawie, Doc. Krawczyńskiemu z Centralnego Laboratorium Klinicznego w Lublinie i Mgr Iskierce z Zakładu Chemii Ogólnej AM w Lublinie podziękowanie za udzielenie jonowymienników.

STRESZCZENIE

Do odsalania moczu i surowicy zastosowano różne kationity: Dowex 50, SDW 3, Amberlit IR 100, kationit o grupach funkcyjnych ortofosforanowych RF, kationit karboksylowy, węgiel sulfonowany produkcji polskiej Escarbo.

Stwierdzono, że warunkiem uzyskania jednakowych obrazów chromatogramów aminokwasów jest wybór swoistego eluenta dla poszczególnych kationitów. Dla SDW 3 i Dowex 50 do elucji aminokwasów za-

stosowano 2 N amoniak, dla Escarbo i RF — mieszaninę amoniaku i pirydyny, a dla Amberlitu IR 100 — roztwory amin alifatycznych. Taurynę odzyskiwano przy zastosowaniu słabo zasadowego anionitu.

W 250 μ l moczu wykryto przy zastosowaniu techniki dwuwymiarowej, wstępującej, w układach — propanol : woda i fenol : woda, 18—20 aminokwasów, z których kilku nie zidentyfikowano.

Przedyskutowano otrzymane wyniki.

LITERATURA

- [1] Awapara J., Sato Y., *Clin. Chim. Acta* **1**, 75, 1956.
- [2] Boulanger P., Biserte G., *Bull. Soc. Chim. Biol.* **33**, 1930, 1951.
- [3] Boulanger P., Biserte G., Courtot F., *Bull. Soc. Chim. Biol.* **34**, 366, 1952.
- [4] Gąsior E., *Acta Biochim. Polon.* **4**, 181, 1957.
- [5] Jurkiewicz J., Zieliński H., *Prace Bad. Główn. Inst. Górniczo-Komun.* **94**, 1952.
- [6] Jurkiewicz J., Zieliński H., Laskowska H., *Prace Bad. Główn. Inst. Górniczo-Komun.* **151**, 1954.
- [7] Noworytko J., Sarnecka-Keller M., *Acta Biochim. Polon.* **3**, 309, 1956.
- [8] Opieńska-Blauth J., Kowalska H., Pietrusiewicz M., *Acta Biochim. Polon.* **3**, 557, 1956.
- [9] Partridge S. M., Westall R. G., *Biochem. J.* **44**, 418, 1949.
- [10] Partridge S. M., *Biochem. J.* **44**, 521, 1949.
- [11] Pope C. G., Stevens M. F., *Biochem. J.* **33**, 1070, 1939.
- [12] Prior A. P., Whitehead T. P., *Nature* **172**, 358, 1953.
- [13] Riabczyk D. I., Sieniawin M. M., Filippowa K. W., *Żurn. Anal. Chimii* **7**, 135, 1952.
- [14] Sołowiew Ł. T., Sałazkina S. S., Juriew W. A., Oficerowa W. N., Łopatina N. I., Krymskaja B. M., Uszakowa M. C., *Mat. A. N. ZSRR* **135**, 1955, cyt. wg Refer. Żurn., *Biól. Chimii* **2**, 1133, 1957.
- [15] Stein W. H., Moore S., *J. Biol. Chem.* **192**, 663, 1951.
- [16] Trostianskaja E. B., Łosiew I. P., Tiewlina A. S., *Usp. Chim.* **24**, 61, 1955.
- [17] Westall R. G., *Biochem. J.* **52**, 638, 1952.
- [18] Westall R. G., *Biochem. J.*, **60**, 247, 1955.

THE USE OF ESCARBO, SULPHONATED CARBON, AND SYNTHETIC ION EXCHANGE RESINS FOR DESALTING BIOLOGICAL FLUIDS

Summary

In desalting urine and serum use was made of a variety of cation exchangers: Dowex-50, SDW 3, Amberlit IR-100, the RF cation exchanger with orthophosphate functional groups, a carboxyl cation exchanger, and sulphonated carbon of Polish production Escarbo.

Uniform chromatograms of aminoacids were found to require the selection of a specific eluent for particular cation exchangers. The following were the eluents for aminoacids applied: for SDW 3 and Dowex-50, 2 N ammonia; for Escarbo and RF, a mixture of ammonia and pyridine; for Amberlit IR-100, solutions of aliphatic amines.

Taurine was recovered with the aid of a weakly alkaline anion exchanger.

By using the two-dimensional ascending technique and the systems propanol:water, and phenol:water, 18—20 aminoacids were revealed in 250 μ l. of urine; some of the aminoacids have not been identified. The results obtained are discussed.

Otrzymano 15.4.1958 r.

J. HELLER, M. J. PIECHOWSKA and T. CHOJNACKI

INORGANIC POLYPHOSPHATES IN THE HAWK-MOTH (*CELERIO EUPHORBIAE* L.)

Zakład Biochemii Ewolucyjnej, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Warszawa

In 1936, [4] we found male Hawk-moths to contain twice the amount of total acid-soluble phosphorus present in females, most of the difference being accounted for by the fraction hydrolysed in 1N HCl at 100° within 7 minutes. We assumed this fraction to represent adenosine triphosphate (ATP). In 1950, Heller, Karpiak and Zubikowa [9] showed the fraction to consist largely of pyrophosphates present exclusively in the ejaculatory duct. In a subsequent paper, Heller, Świechowska and Karpiak [12] demonstrated on evidence from an ample experimental material that the male Hawk-moth contains roughly 380 mg⁰/₀ of acid-soluble phosphorus, as compared to 170 mg⁰/₀ in females, the 7-minute fraction attaining in males the value of 180 mg⁰/₀.

In 1956, we demonstrated [16] that the pyrophosphate is transferred during mating into the genital pouch of the female. Recently we have used the isotope ³²P in further investigations intended to identify definitively the pyrophosphate, to explore the mechanism, the site and time of its production as well as its further fate, and to explain from the biological viewpoint the extraordinary phenomenon of accumulation of inorganic pyrophosphate in the body of the animal. Some of the results were published in the Bulletin de l'Académie Polonaise des Sciences [5, 6, 11].

ENZYMATIC IDENTIFICATION OF THE PYROPHOSPHATE

Until recently, we based identification of pyrophosphate on the following properties of the compound in question: 1) hydrolysis after 7 minutes in 1N HCl at 100°, 2) precipitation in the form of manganese salt after Jones [9], 3) R_F in chromatography corresponding to that of standard pyrophosphate.

In the investigations now under report we made use of the enzymatic method, since Kunitz's crystalline pyrophosphatase is believed to be absolutely specific for inorganic pyrophosphate. Male and female Hawk-moths were dried, before and after mating, respectively, their genital organs were removed, weighed, and extracted with trichloroacetic acid, and the extracts neutralized to pH 7.2. Pyrophosphatase was dissolved in 0.02 M veronal buffer, and enzymatic hydrolysis was carried out after the method published by Kunitz [15]. Samples of the incubate were used for chemical and chromatographic determinations. The samples were inactivated with an equal volume of 4% trichloroacetic acid, and phosphate — free and liberated after 7 min. hydrolysis in 1 N HCl at 100° — was determined in filtrates by the method of Fiske and Subbarow [2]. The results are given in Table 1, and it will be noted that the labile phosphorus compound under investigation is entirely decomposed within 15 to 25 min. of incubation with the enzyme.

Table 1

The action of crystalline pyrophosphatase on extracts from the male and female genitalia of the Hawk-moth (Celerio euphorbiae L.)

Ejaculatory duct (before mating)			Genital pouch (after mating)		
Incubation time (min.)	In 100 mg. of the dry organ		Incubation time (min.)	In 100 mg. of the dry organ	
	Orthophosphate (mg. P)	Pyrophosphate (mg. P)		Orthophosphate (mg. P)	Pyrophosphate (mg. P)
0	0.00	8.00	0	0.80	10.45
5	1.44	6.08	5	2.78	8.80
8	3.44	4.88	10	7.60	3.80
11	5.00	3.36	15	10.12	1.30
14	7.20	1.12	20	11.86	0.00
17	8.36	0.00			

Chromatographic determinations were run parallel with the chemical ones, with the aid of Ebel's acid solvent [1], and the developer quoted by Hanes and Isherwood [3]. The results obtained are shown in Figs. 1 and 2.

Analogically to chemical determinations, chromatography shows that the compound decomposing after 7 minutes and showing the pyrophosphate R_F represents the substrate specific for Kunitz's pyrophosphatase and is therefore indeed pyrophosphate.

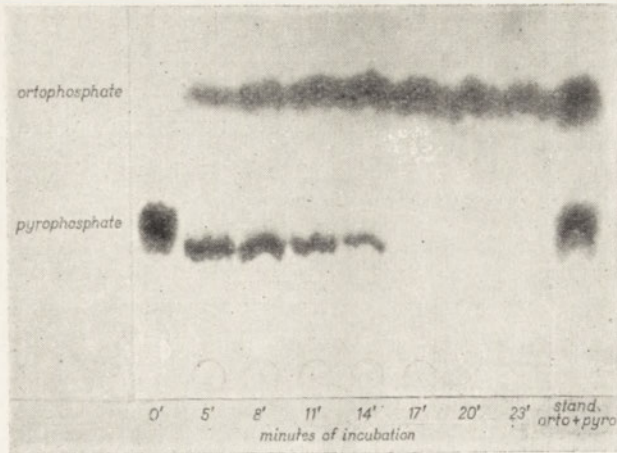


Fig. 1. Enzymatic hydrolysis of pyrophosphate from the ejaculatory duct of a Hawk-moth

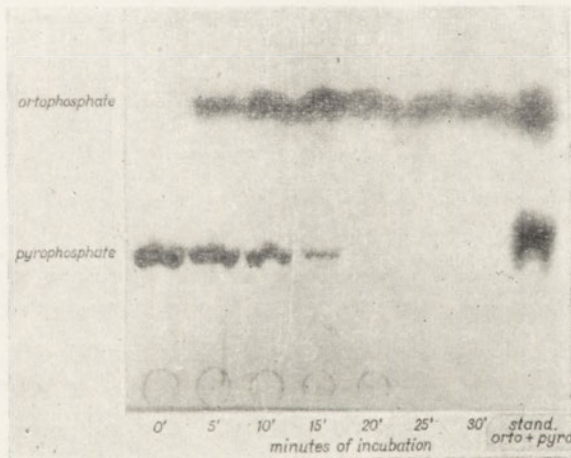


Fig. 2. Enzymatic hydrolysis of the pyrophosphate transferred during mating into the genital pouch of a Hawk-moth

EXPERIMENTS WITH ^{32}P

The abdomen of recently hatched male Hawk-moths was injected with a solution of orthophosphate containing $2 \mu\text{c}$ of ^{32}P in $50 \mu\text{l}$.; the composition of the solution was as follows: P-orthophosphate $150 \text{ mg}^0/\text{o}$, Cl^- $35 \text{ mg}^0/\text{o}$, Na^+ $100 \text{ mg}^0/\text{o}$, K^+ $200 \text{ mg}^0/\text{o}$; pH was 7. The moths were killed

5, 10, 30, etc. minutes after the injection, and their ejaculatory ducts were removed and ground in a Potter-Elvehjem homogenizer with 0.5 ml. of chilled trichloroacetic acid, whereupon chromatograms were prepared. The chromatograms, run and developed as above, were passed under a Geiger-counter and the number of impulses was counted at 1 cm. intervals. The results are shown in Fig. 3.

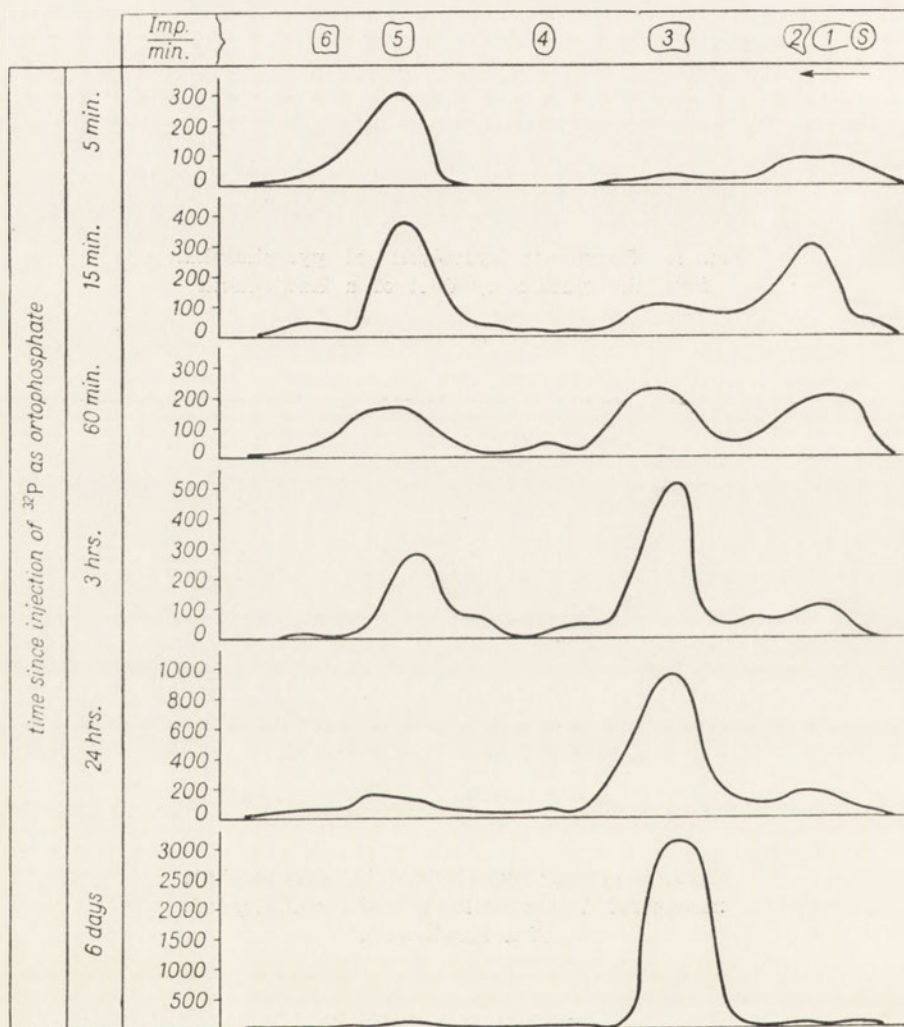


Fig. 3. Distribution of ³²P activity in the phosphorus compounds contained in the ejaculatory duct of the Hawk-moth after different intervals since the injection of radioactive orthophosphate. Chromatograms of trichloroacetic extracts
 S = starting spot; 1 and 2 = nucleotides; 3 = pyrophosphate; 4 = phosphocholine;
 5 = orthophosphate; 6 = spot not identified

Already 5 minutes after the injection, conspicuous radioactivity was evident in the orthophosphate spot, and a lesser one in the spot corresponding to nucleotides. With the interval between the injection and the dissection of the moth, there grew the activity of the nucleotide spot, there appeared and grew radioactivity of the pyrophosphate spot, and the activity of the orthophosphate spot diminished after an initial rise.

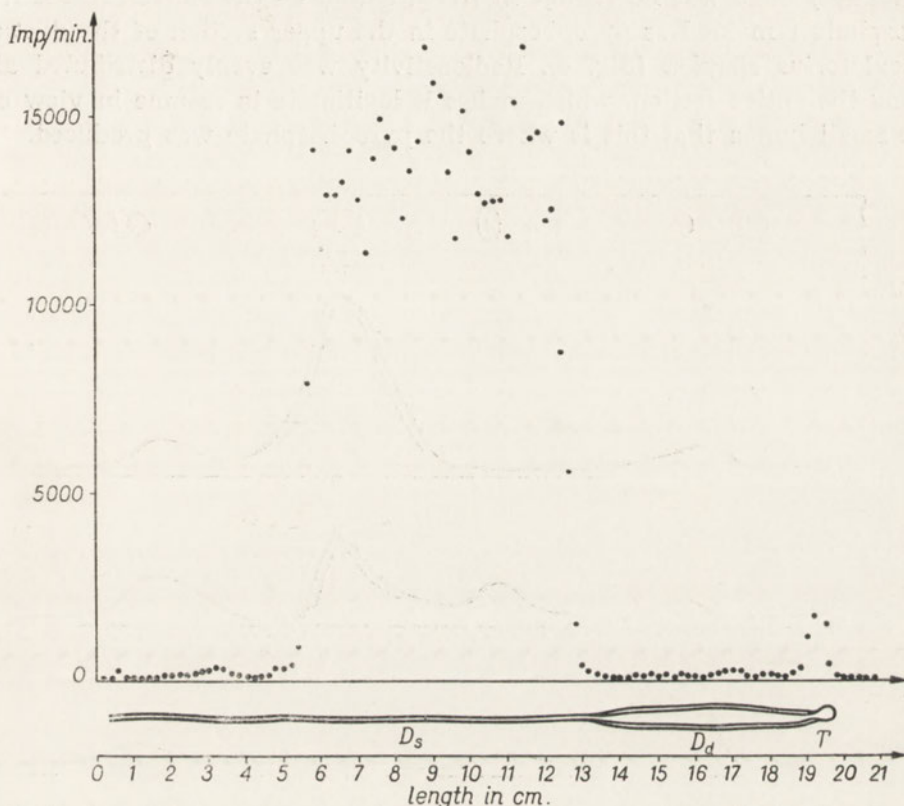


Fig. 4. Distribution of ^{32}P in the genital organ of a male Hawk-moth. Injection of the radioactive orthophosphate was given immediately upon metamorphosis, monitored after 24 hours. Beneath the axis of abscissae is a diagram of the organ. T = testis; D_d = ductus ejaculatorius duplex; D_s = ductus ejaculatorius simplex. Radioactivity measurements were carried out by passing the entire length of the ejaculatory duct by 0.2 cm. sections under the window of a Geiger-counter (mica window 4 mg./cm.²).

After a few hours, the pyrophosphate spot showed the highest activity, and represented after 2 or 3 days the only radioactive component of the chromatogram.

From the results it will be seen that as soon as 5 min. after the injection, the labelled orthophosphate penetrates in substantial propor-

tions into the ejaculatory duct where it becomes incorporated into the compound whose position in the chromatogram corresponds to ATP. This compound gives rise to the inorganic pyrophosphate which subsequently becomes accumulated. Within 24 hours, the entire phosphorus isotope follows this path.

Throughout the subsequent days (our investigations covered a span of 6 days) there was no change in the situation — the entire radioactive phosphate remained as pyrophosphate in the upper section of the *ductus ejaculatorius simplex* (Fig. 4). Radioactivity was evenly distributed all along the entire section, which makes it legitimate to assume in view of the small lumen that this is where the pyrophosphate was produced.

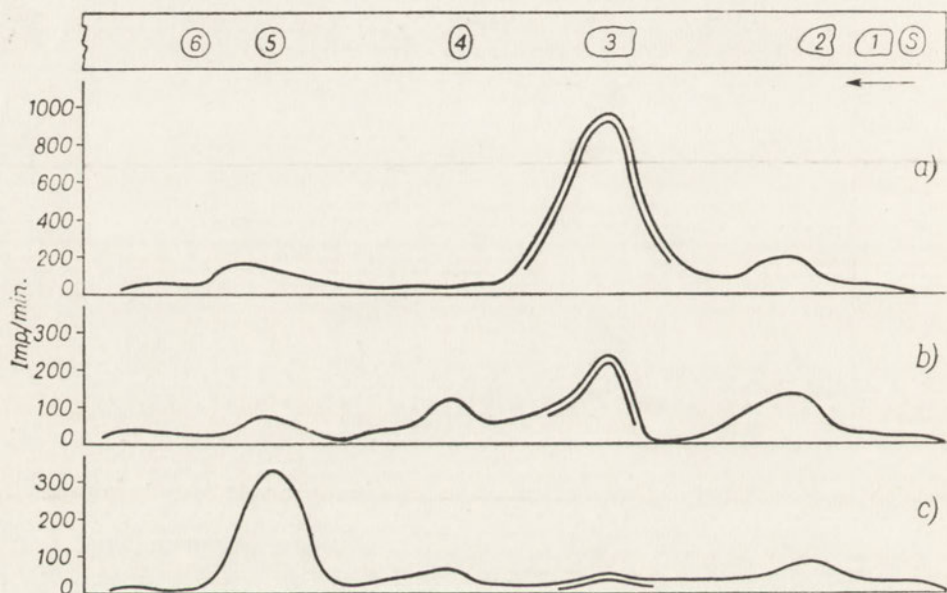


Fig. 5. Distribution of radioactivity between the phosphorus compounds in the ejaculatory duct in relation to the age of the moth at the time of injection of the ^{32}P labelled orthophosphate. The injection was made: a — 2 hours, b — 18 hours, and c — 72 hours after metamorphosis.

S = starting spot; 1 and 2 = nucleotides; 3 = pyrophosphate; 4 = phosphocholine; 5 = orthophosphate; 6 = spot not identified. The part corresponding to pyrophosphates is doubly outlined. All chromatograms were made 24 hours after the injection.

In order to determine the time when the pyrophosphate is produced, injections of labelled phosphate were given to insects of different age groups, beginning three days before metamorphosis. The pattern of radioactivity referred to before was found to apply to all moths from injected pupae, and to moths which were injected with the labelled phos-

phate up to 6 hours after final ecdysis. When the injection was given 18 hours, or later, after metamorphosis, the radioisotope was found in equal concentrations in all three fractions (Fig. 5). Consequently, the reaction responsible for the production of pyrophosphate ceases between 6 and 18 hours after metamorphosis.

In further experiments involving the tracer technique, pyrophosphate was shown to be transferred during mating into the female, where it was demonstrated in the genital pouch [16]. Of the males in which production of the radioactive pyrophosphate has been induced, 8 mated with non-treated females. In each case, mating was found to be attended

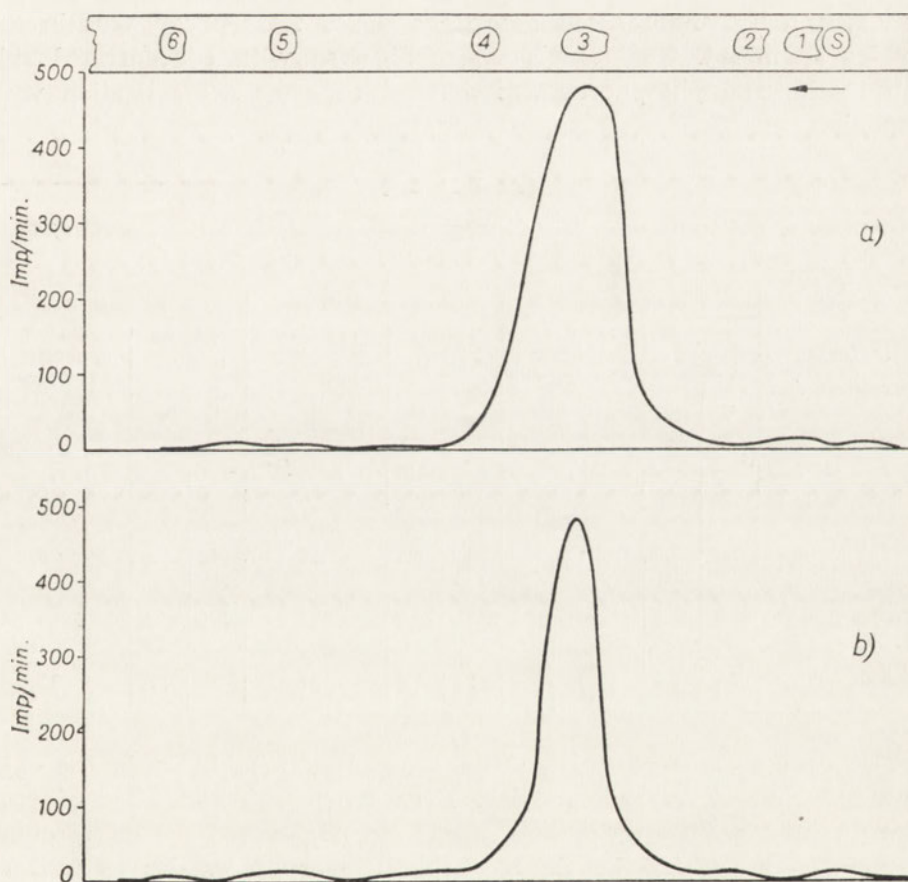


Fig. 6. Distribution of ^{32}P in chromatograms of phosphorus compounds from: a) sperm, 48 hours after injection of $2\ \mu\text{c.}$ of ^{32}P given 2 hours after metamorphosis, b) genital pouch, 3 days after mating with a male treated as above. S = starting spot; 1 and 2 = nucleotides; 3 = pyrophosphate; 4 = phosphocholine; 5 = orthophosphate; 6 = spot not identified.

by a transfer of radioactivity into the body of the female, which was demonstrated by surveys with the aid of a Geiger-counter. Between 3 and 4 days after mating, the eggs deposited, the genital pouch, and other parts of the females body, were checked for radioactivity. Fig. 6 shows the results of surveys of radioactivity of extracts from the genital pouch and ejaculatory duct, after and before mating, respectively.

In three cases, the relative specific radioactivity of phosphorus compounds was determined in the eggs deposited and in various parts of the body of females which received labelled pyrophosphate from males during mating. Relative specific activity was determined with the aid of a BOT 20/1 counter for liquids with a background count of 29—44 per minute, and by simultaneous determination of total phosphorus in the samples examined. The samples were digested with concentrated sulphuric acid, and phosphorus was determined after neutralization with ammonia.

Table 2

Distribution of radioactivity in the phosphorus compounds in various parts of body and eggs of Hawk-moth females (Celerio euphorbiae L.)

Material examined	Female 1			Female 2			Female 3		
	radio-activity		relative specific activity (counts per min. per μ mole)	radio-activity		relative specific activity (counts per min. per μ mole)	radio-activity		relative specific activity (counts per min. per μ mole)
	counts	%		counts	%		counts	%	
eggs deposited	0		0	0		0		0	
eggs not deposited	36	7.0	23	15	0.7	18	42	0.9	6
genital pouch	440	88.0	488	2110	98.0	624	4370	98.0	1945
rest of body	24	5.0	12	27	1.3	24	54	1.1	12

The results are recorded in Table 2, and as will be seen the eggs deposited showed no radioactivity. Even when entire batches of eggs were put under the counter, the counts did not exceed the background. Except for the genital pouch, the other tissues of females as well as non-fertilized eggs removed from the females showed such insignificant radioactivity that this must be attributed to contaminations. The contaminations may have resulted in life time from contact with the males which eliminated radioactive urine, or from contact with the *bursa* during preparation. Almost the entire radioactivity of the female, viz., 88—98

per cent., is accounted for by the genital pouch. These experiments fully confirm the conclusion drawn earlier from chemical analyses which suggested that the pyrophosphate transferred during mating together with the sperm into the genital pouch remains there unchanged until the death of the female.

PHOSPHOCHOLINE

Chromatograms of the *ductus ejaculatorius simplex* show between the pyrophosphate and orthophosphate spots an additional weak spot of a phosphorus compound. We have now been successful in identifying it as phosphocholine. Chromatograms of the upper section of genitalia, i.e. *testis*, *ampullae*, and *ductus ejaculatorius duplex*, show a very conspicuous phosphocholine spot and absence of pyrophosphate. This suggests a reaction in the *ductus ejaculatorius simplex* in the course of which phosphocholine disappears and free pyrophosphate is produced. Here we have in mind synthesis of lecithin involving cytidyltriphosphoric acid, described in more detail by Kennedy [14]. Investigations intended to check this working hypothesis are now in progress.

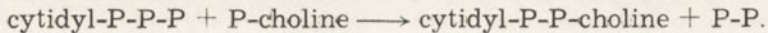
DISCUSSION

Our investigations have unequivocally demonstrated that the pyrophosphate produced in the ejaculatory duct serves the moths neither as a source of energy nor as a source of orthophosphate. Consequently, the question of the biological purpose served by the accumulation of the compound has ceased to be relevant. The question involved is rather that of the reason for this phenomenon, which constitutes a form of waste of energy not encountered elsewhere.

Stability of the pyrophosphate in the male's ejaculatory duct and subsequently in the female's genital pouch reveals absence of pyrophosphatase activity in these organs. This may be due to either absence of the enzyme or inertness of the enzyme, if present. The latter case may involve inhibition by some inhibitor, absence of an activator (Mg^{2+}), or spatial separation of the enzyme from the substrate. In the latter case, the barrier may be represented by the spermatheca enclosing the spermatozoa of the semen. As yet our experiments have failed to confirm or to exclude either possibility.

Subject to further experimentation is also our working hypothesis which assumes pyrophosphate to represent a by-product of lecithin synthesis. According to Kennedy, the intermediate product is represented in

this synthesis by cytidyldiphosphocholine which is produced in the course of a reaction proceeding according to the following equation:



The intermediate product reacts in turn with phosphatidic acid and affords lecithin and cytidylic acid, the latter reacting with ATP and reproducing cytidyltriphosphate. This scheme accounts for the disappearance of phosphocholine as well as for the production of pyrophosphate, and explains why we have failed to detect any appreciable amounts of pentose in extracts from the ejaculatory duct, because pyrimidine nucleotides, i.e. cytidyl derivatives, are known to give no reaction for pentoses, and ATP is here necessary only in catalytic continuously regenerated amounts.

Kennedy's reaction was demonstrated in the seminal vesicle of rats by Williams-Ashman and Banks [17]. These authors also revealed in the seminal vesicle a very active enzyme which hydrolyses the intermediate product. The action of such an enzyme could account for the unusual accumulation of pyrophosphate, since the production of one molecule of lecithin calls for the formation of several molecules of cytidyldiphosphocholine in order to make up for losses due to hydrolysis. But production of every molecule of the intermediate product affords as a by-product one molecule of pyrophosphate. This mechanism is generally characteristic for the semen. The peculiarity of *Sphingidae* resides in the absence of pyrophosphatase activity, which makes possible accumulation of the pyrophosphate produced, whereas in other animals it is hydrolysed to orthophosphate. Production of pyrophosphate from ATP, and presence of pyrophosphatase, in the semen of bulls were demonstrated by Heppel and Hilmoe [13].

With over 30% of the total P trapped in the form of pyrophosphate the entire pattern of phosphorus distribution in the Hawk-moth is distorted. We have recently published [7] the results of investigations on phosphorus distribution in the course of metamorphosis of the Chinese Tussur-moth (*Antheraea pernyi*). We may take these results to be typical for moths accumulating no pyrophosphate. When comparing the data obtained with those for the Hawk-moth, we find enormous differences. However, if we correct the values for the Hawk-moth by subtracting the figures for pyrophosphate, the differences become insignificant [8].

A counterpart to these differences will be found by considering the figures for the phosphorus eliminated with the urine voided by the moth immediately upon eclosion. In the urine of a male Tussur moth we find

4.1 mg. P, which accounts for 61.2% of the phosphorus contained in the pupa. A female excretes 3.4 mg. P, i.e. 34.7% of the phosphorus present in the pupa. This difference between the two sexes is quite understandable in view of the high phosphorus content in the eggs. The female Hawk-moth excretes 1.3 mg. P, losing 27.4% of the entire P present in the pupa, wherein it differs little from female Tussur-moths. The male Hawk-moth, on the other hand, excretes only 0.43 mg. P, a bare 9.15% of the pupa's phosphorus, which is a glaring contrast to the 61.2% eliminated by Tussur-moth males.

SUMMARY

1. The pyrophosphate present in the ejaculatory duct and genital pouch of Hawk-moths was identified with the aid of enzymatic hydrolysis by pure Kunitz's pyrophosphatase.

2. The abdomen of recently hatched males was injected with a solution of orthophosphate with ^{32}P in amounts of $2\ \mu\text{c}$. A major proportion of the radioactive phosphate penetrated 5 minutes after the injection into the ejaculatory duct and became incorporated in the nucleotide fraction from which the inorganic pyrophosphate is subsequently produced. Within 24 hours the entire amount of the radioactive phosphorus was utilized in this manner and remained in the form of pyrophosphate in the upper section of the *ductus ejaculatorius simplex*.

3. When the radioactive phosphorus was introduced 3 days before or up to 6 hours after metamorphosis, the pattern of radioactivity distribution referred to before was obtained. Introduction of the radioisotope 18 hours after metamorphosis gave rise to insignificant radioactivity of the pyrophosphate, and when the labelled orthophosphate was introduced 72 hours after metamorphosis, no signs of incorporation of the radioisotope into the pyrophosphate were noted.

4. The transfer of pyrophosphate during mating was confirmed by the tracer technique. The isotope has not been revealed in the eggs deposited or tissues and other organs of females, except in the genital pouch. Consequently, the pyrophosphate is not utilized and represents a final by-product.

5. Chromatographic methods revealed phosphocholine in the genital tract of male Hawk-moths.

The authors are greatly indebted to Professor Dr. M. Kunitz of the Rockefeller Institute for the pyrophosphatase preparation.

REFERENCES

- [1] Ebel J. P., *Bull. Soc. Chim. Biol.* **34**, 321, 1952.
- [2] Fiske C. H., Subbarow Y., *J. Biol. Chem.* **66**, 375, 1925.
- [3] Hanes C. S., Isherwood F. A., *Nature* **164**, 1107, 1949.
- [4] Heller J., *C. R. Soc. Biol., Paris* **131**, 314, 1936.
- [5] Heller J., Chojnacki T., *Bull. Acad. Polon. Sci., Sér. Biol.*, **5**, 277, 1957.
- [6] Heller J., Chojnacki T., Piechowska M., *Bull. Acad. Polon. Sci., Sér. Biol.*, **6**, 7, 1958.
- [7] Heller J., Jeżewska M., *Acta Biochim. Polon.* **5**, 3, 1958.
- [8] Heller J., Jeżewska M., *Bull. Acad. Polon. Sci., Sér. Biol.*, **6**, 51, 1958.
- [9] Heller J., Karpiak St., Zubikowa I., *Nature* **166**, 187, 1950.
- [10] Heller J., Piechowska M., *Acta Physiol. Polon.* **8**, 353, 1957.
- [11] Heller J., Piechowska M., *Bull. Acad. Polon. Sci., Sér. Biol.*, **6**, 1937, 1958.
- [12] Heller J., Świechowska W., Karpiak St., *Acta Physiol. Polon.* **3**, 295, 1952.
- [13] Heppel L. A., Hilmoe R. J., *J. Biol. Chem.* **202**, 217, 1953.
- [14] Kennedy E. P., Weiss S. B., *J. Biol. Chem.* **222**, 193, 1956.
- [15] Kunitz M., *J. Gen. Physiol.* **35**, 423, 1952.
- [16] Piechowska M., *Acta Biochim. Polon.* **3**, 547, 1956.
- [17] Williams-Ashman H. G., Banks J., *J. Biol. Chem.* **223**, 509, 1956.

POLIFOSFORANY NIEORGANICZNE U MOTYLA WILCZOMLECZKA
(*CELERIO EUPHORBIAE* L.)

Streszczenie

1. Identyfikację pirofosforanu występującego w *ductus ejaculatorius* samca i w *bursa copulatrix* samicy wilczomleczka przeprowadzono drogą enzymatycznej hydrolizy czystą pirofosfatazą Kunitza.

2. Wstrzykiwano do odwłoka świeżo wylęglým samccm roztwór ortofosforanu z ^{32}P , w ilości 2 μc . W 5 minut po zastrzyku radioaktywny fosforan w znacznej ilości przenika do *ductus ejaculatorius* i zostaje wbudowany do ATP, z którego dopiero powstaje nieorganiczny pirofosforan. W ciągu 24 godz. cały izotopowy P przechodzi tę drogę i znajduje się w postaci pirofosforanu w górnym odcinku *ductus ejaculatorius simplex*.

3. Wprowadzenie radioaktywnego fosforu na 3 dni przed wylęgiem i do 6 godzin po wylęgu daje rozmieszczenie radioaktywności takie jak opisano wyżej. Wprowadzenie w 18 godz. po wylęgu samca daje nieznaczne znakowanie pirofosforanu; po 72 godz. nie obserwowano już włączania ^{32}P w pirofosforan.

4. Przenoszenie pirofosforanu podczas kopulacji potwierdzono badaniami izotopowymi. Nie stwierdzono obecności izotopu w złożonych jajach, jak również w innych tkankach i narządach samicy poza *bursa copulatrix*. Pirofosforan zatem nie jest użytkowany i stanowi uboczny produkt końcowy.

5. Wykazano chromatograficznie obecność fosfocholinę w narządach płciowych samca.

Otrzymano 27.3.1958 r.

I. REIFER i K. TOCZKO

O ROZKŁADZIE NIKOTYNY W KORZENIACH MACHORKI

Zakład Biochemii Roślin Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN, Warszawa
Kierownik: prof. dr I. Reifer

Znaczenie alkaloidów w wytwarzających je roślinach pozostaje do tej pory zagadnieniem otwartym. Krańcowe poglądy przypisują alkaloidom z jednej strony rolę czynnego metabolitu i substancji o specyficznym znaczeniu fizjologicznym, z drugiej strony dopatrują się w alkaloidach produktów końcowych przemiany związków białkowych, nie biorących dalszego udziału w przemianie materii. Wiele prac w tej dziedzinie wykonano nad nikotyną, alkaloidem roślin rodzaju *Nicotiana*, mimo to dane dotyczące możliwości rozkładu nikotyny przez tkanki syntetyzujących ją roślin są niekompletne.

Mothes [7] obserwował nieznaczne ubytki nikotyny w odciętych, dojrziałych liściach tytoniu. Vickery i Meiss [10] wykazali, że w liściach tytoniu w czasie suszenia następuje tylko nieznaczne obniżenie zawartości nikotyny. Frankenburg [3] przytacza podobne wyniki. Nie wiadomo jednak, czy obserwowane ubytki wynikają z rozkładu nikotyny przez tkanki roślinne, czy też spowodowane są działalnością drobnoustrojów względnie występują wskutek ulatniania się nikotyny z badanego materiału.

Odbiegające od reszty literatury wyniki ogłosili, w roku 1954, Maszkowcew, Capkowa i Moisiejewa [5] oraz w 1956 r. Maszkowcew i Siro-tienko [6]. Stwierdzili oni, że w izolowanych korzeniach tytoniu i machorki, w czasie przemiany głodowej, następuje energiczny rozkład nikotyny. W niektórych przypadkach już po 21 godzinie rozkład wynosił powyżej 80% początkowej zawartości. Jednocześnie wykazali oni, że następuje ubytek nikotyny w roztworach, do których zanurzono korzenie tytoniu.

Celem niniejszej pracy było zbadanie czynników wpływających na rozkład nikotyny w izolowanych korzeniach machorki podczas przemiany głodowej.

MATERIAŁ I METODY

Do badań użyto bocznych pędów korzeni roślin polowych Machorki Pomorskiej lub korzeni wyhodowanych *in vitro* w warunkach jałowych. W tym przypadku korzonki ze sterylne skielkowanych nasion machorki przenoszono do kolbek stożkowych zawierających 50 ml płynnej pożywki White'a [12]. Do doświadczeń używano około jednomiesięczne kultury, uprzednio kilkakrotnie przeszczepiane.

Korzenie roślin polowych, celem wzbogacenia w nikotyne, infiltrowano 0,2% obojętnym, wodnym roztworem siarczanu nikotyny wg zmodyfikowanej metody Kursanowa [8]. We wszystkich doświadczeniach korzenie przechowywano na szkiełkach zegarkowych w eksykatorach lub sterylnych szalkach Petriego, w obecności wody, w ciemni, w temperaturze pokojowej (18—20°). Nikotyne oznaczano spektrofotometryczną metodą Willits i współprac. [13].

Wyniki podano w mg⁰% w przeliczeniu na świeżą masę. Tylko w doświadczeniu podanym w tablicy 3 wyniki przeliczono na suchą masę. Dla oznaczenia suchej masy korzenie suszono do stałej wagi w temp. 70 ± 2° [9].

CZĘŚĆ DOSWIADCZALNA

Boczne pędy korzeni roślin machorki, w stadium przed kwitnieniem, wyhodowanych na poletku, po przepłukaniu wodą bieżącą, wzbogaceni w nikotyne i doprowadzeniu do wagi wyjściowej, dzielono na 3 serie próbek. Jedną serię stanowiły korzenie przechowywane w eksykatorach,

T a b l i c a 1

Zawartość nikotyny w mg⁰% świeżej masy w korzeniach roślin polowych Machorki Pomorskiej w czasie przemiany głodowej

Warunki przechowywania korzeni	Czas w godz.						
	0	18	24	48	66	72	92
—	150	138	95	—	23	—	20
W obecności toluenu	156	156	155	—	158	—	148
Sterylizowane HgCl ₂	142	—	128	139	—	134	143

w których dla utrzymania wilgotności umieszczono zlewkę z wodą. Drugą serię przechowywano w identycznych warunkach, wstawiając dodatkowo naczynko z toluenem w celu zapobieżenia rozwojowi drobnoustrojów, trzecią zaś sterylizowano przez 10 min 0,1% wodnym roztworem chlorku rtęciowego i przechowywano w sterylnych naczyniach tylko w obecności wody. Zawartość nikotyny w korzeniach wszystkich trzech serii badano w czasie od 0 do 92 godz. Jak wynika z danych tablicy 1 ubytek nikotyny następuje wyłącznie w korzeniach niesterylnych. W korzeniach przechodo-

wywanych w obecności toluenu, jak i sterylizowanych chlorkiem rtęciowym nie następował rozkład nikotyny.

Toluen jak i chlorek rtęciowy mogły jednak inaktywować systemy enzymatyczne korzeni katalizujące rozkład nikotyny. Dalsze doświadczenia wykonywano zatem na korzeniach ze sterylnych kultur. W tym celu korzenie po kilkakrotnym przemyciu sterylną wodą destylowaną przechowywano w jałowych naczyniach w ciemni. Wyniki tych doświad-

T a b l i c a 2

Zawartość nikotyny w mg% świeżej masy w sterylnych korzeniach Machorki Pomorskiej w czasie przemiany głodowej

	Czas w godz.				
	0	24	48	72	96
Doświadczenie 1	53,1	69,2	79,4	54,5	
Doświadczenie 2	39,2	43,4	47,0	—	46,5

czeń podane są w tablicy 2. Jak widać z tych danych, w pierwszych dwóch dniach w korzeniach następuje przyrost zawartości nikotyny, której zawartość w następnych dwóch dniach ulega stopniowemu obniżeniu.

T a b l i c a 3

Zawartość nikotyny w sterylnych i zakażonych bakteriami glebowymi korzeniach Machorki Pomorskiej w czasie przemiany głodowej

Czas (godz.)	Zawartość nikotyny w mg% suchej masy korzeni			
	Korzenie sterylne		Korzenie zakażone	
	Powtórzenia	Średnio	Powtórzenia	Średnio
0	836	796	836	796
	757		757	
22	864	917	527	481
	970		435	
43	1257	1117	398	411
	978		424	
90	726	733	211	226
	740		242	

Celem wyjaśnienia, czy obserwowane obniżenie zawartości nikotyny w korzeniach niesterylnych było spowodowane działalnością drobnoustrojów, przeprowadzono doświadczenie, w którym część sterylnych próbek korzeni zakażono bakteriami rozkładającymi nikotyne. Bakterie te wydzielono z wodnego roztworu siarczanu nikotyny, do którego zanurzono korzenie machorki wyhodowanej na poletku.

Jak wynika z danych tablicy 3, zawartość nikotyny w sterylnych korzeniach kształtowała się podobnie jak w doświadczeniach poprzednich, natomiast w korzeniach zakażonych nastąpił spadek nikotyny o około 70% jej pierwotnej zawartości.

DYSKUSJA

Maszkowcew i współpr. [5, 6], opierając się na uzyskanych wynikach, wyrażają pogląd, że korzenie, będące jedynym organem rośliny zdolnym do syntezy nikotyny, mogą ją również w warunkach przemiany głodowej energicznie rozkładać.

Wyniki niniejszej pracy sugerują raczej, że obserwowany rozkład nikotyny w korzeniach jest spowodowany w dużej mierze przez mikroorganizmy glebowe. Jak wynika z danych literatury [1, 2, 4, 11], bakterie zdolne do rozkładu nikotyny są szeroko rozpowszechnione w glebie.

W korzeniach ze sterylnych kultur zaobserwowano, w pierwszych dwóch dniach przemiany głodowej, przyrost zawartości nikotyny. W ciągu następnych dwóch dni zawartość nikotyny stopniowo spadała. Należy więc przyjąć, że korzenie machorki posiadają w pewnym stopniu zdolność rozkładu nikotyny.

Uzyskane wyniki pokrywają się z badaniami innych autorów nad przemianą nikotyny w liściach tytoniu. Wydaje się więc, że udział tego alkaloidu w przemianie azotowej, tak w liściach jak i w korzeniach, jest podobny i że aktywna rola nikotyny w tym procesie jest mało prawdopodobna.

STRESZCZENIE

Badano zawartość nikotyny w korzeniach Machorki Pomorskiej w czasie przemiany głodowej. Stwierdzono, że w warunkach sterylnych zawartość nikotyny w korzeniach ulega nieznacznym zmianom. Wykazano, że energiczny rozkład nikotyny, obserwowany w niesterylnych korzeniach machorki, może być wywołany działalnością drobnoustrojów glebowych.

LITERATURA

- [1] Bucherer H., *Zentralblatt Bakt.*, Abt. II, 105, 166, 1942.
- [2] Bucherer H., *Zentralblatt Bakt.*, Abt. II, 105, 445, 1942.
- [3] Frankenburg W. G., *Adv. Enzymol.* 6, 309, 1946.
- [4] Frankenburg W. G., Vaitekunas A. A., *Arch. Biochem. Biophys.* 58, 509, 1955.
- [5] Maszkowcew M. F., Capkowa N. A., Moisiejewa M. E., D. A. N. S.S.S.R., 98, 491, 1954.
- [6] Maszkowcew M. F., Sirotienko A. A., *Fizjol. Rast.* 3, 79, 1956.

- [7] Mothes K., *Planta* 5, 563, 1928.
- [8] Reifer I., Kleczkowska D., Solecka M., *Acta Biochim. Polon.* 3, 41, 1956.
- [9] Solt M. L., *Plant Physiol.* 32, 480, 1957.
- [10] Vickery H. B., Meiss A. N., *Connecticut Agr. Exper. Sta. Bull.* No 569, 1954.
- [11] Wada E., Yamasaki K. J., *Am. Chem. Soc.* 76, 115, 1954.
- [12] White P. R., *A Handbook of Plant Tissue Culture*, The Ronald Press Company, New York, 1943.
- [13] Willits C. O., Swain M. L., Connelly J. A., Brice B. A., *Analytical Chemistry* 22, 430, 1950.

ON THE DISTRIBUTION OF NICOTINE IN THE ROOTS
OF A *NICOTIANA RUSTICA*

Summary

Roots of *Nicotiana rustica*, variety Machorka Pomorska, decompose nicotine very rapidly. The same roots, after sterilisation, decompose nicotine only to a very small degree.

Similarly, sterile root cultures utilize nicotine very sparingly, whereas after infection with soil bacteria isolated from tobacco roots, the content of nicotine falls rapidly.

Contrary to the findings of Mashkovtsev *et al.*, we observed a temporary rise in the content of nicotine in sterile roots, which after 2 days falls back to about the initial level.

Our observations confirm similar experiments on tobacco leaves reported in literature, therefore an active participation of nicotine in the nitrogen metabolism of tobacco plants does not appear to be probable.

Otrzymano 28.3.1958 r.

I. REIFER and L. BURACZEWSKA

THE ORNITHINE CYCLE IN PEA SEEDLINGS*Zakład Biochemii Roślin, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Warszawa*

In recent years the evidence is growing fast that the ornithine cycle known to operate in mammals may be extended to microorganisms such as *Neurospora crassa* [13] as well as to higher plants. Thus far research on higher plants is mainly concentrated on the occurrence of ornithine, citrulline and arginine in various representatives of the plant kingdom, on the mutual interchange of the above named aminoacids, and finally, on investigations into the presence of enzymes of the ornithine cycle in various organs of the plant organism.

Virtanen and Miettinen [16] have shown the presence of the aminoacids of the ornithine cycle in the alder, and later Kasting and Delwiche [9] have proved the occurrence of ornithine, citrulline and arginine in young seedlings of barley, wheat and watermelon. Coleman [2] reported the accumulation of ornithine and citrulline in sulphur deficient flax. Kasting and Delwiche [8] suggested that the ornithine cycle is operating in the watermelon. Plants fed with ^{14}C -ornithine and ^{14}C -arginine contained isotopic carbon in citrulline and glutamic acid. Coleman and Hegarty [3] proved rapid metabolism of isotopic ornithine in barley and white clover. They found considerable radioactivity in arginine, citrulline and proline, rather less in glutamic acid and α -aminobutyric acid. Plants grown with the addition of ^{14}C -citrulline have shown high accumulations of the label in arginine and some traces of radioactivity in urea. ^{14}C -arginine caused the appearance of radioactivity in citrulline and proline. In potassium deficient plants ornithine was decarboxylated to putrescine.

Fries [6] and Street [14] have also suggested the operation of the ornithine cycle in higher plants. Etiolated shoots of the green pea, grown under sterile conditions were able to utilize ornithine and citrulline in place of the essential arginine without ill effects on the growth of the plant. Thomas and Krauss [15] have shown increased content of arginine

in *Scenedesmus* cultures growing on a medium containing ornithine. Walker and Meyers [17] proved the synthesis of argininosuccinic acid in *Chlorella* and in the bean, from arginine and fumaric acid, as well as the conversion of citrulline from arginine in the presence of acetone powder prepared from *Chlorella*. The synthesis of argininosuccinic acid was also shown by Davidson and Elliott [5] in the green pea. Krebs and Eggleston [11] demonstrated citrulline phosphorylase in the green pea and the bean which in the presence of phosphate or arsenate catalyzes the decomposition of citrulline to ornithine, ammonia and carbon dioxide. This enzyme was shown to be identical with ornithine carbamylotransferase. In our laboratory Kleczkowski [10] has shown that homogenates of various leguminous plants contain carbamylotransferase of very high activity, and later the authors of this paper found that the enzyme is present in the supernatant of centrifuged plant homogenates. Its activity decreases slowly when kept for 7 days at 0 to 2°C. This supernatant does not contain any enzymes which would catalyze the conversion of citrulline into arginine in the presence of aspartic acid, ATP and Mg.

This paper reports some quantitative studies on the interconversion of the aminoacids of the ornithine cycle in shoots of the green pea, with the cotyledons removed. The shoots were grown under sterile conditions on a medium containing ornithine, citrulline and arginine, respectively. Sterile growth was maintained throughout for two reasons. Firstly, in order to prevent any influence of microorganisms upon the nitrogen metabolism of the plant, and secondly in order to reduce the endogenous supply of aminoacids from the cotyledon, and thus increase the utilisation of the particular aminoacid added to the medium.

MATERIAL AND METHODS

Shoots of the green pea, variety „Sześciotygodniowy“, were grown on the White medium [18] with the addition of the following aminoacids: ornithine monohydrochloride, citrulline and arginine monohydrochloride, respectively. 7 to 10 ml. of the White medium with the addition of the desired aminoacid were introduced into 50 ml. Erlenmeyer flasks. The control growth was prepared as above, with the omission of the aminoacid. A circular piece of filterpaper was placed in the flask, the paper resting on a little glass wool which served as mechanical support for the growing shoots, preventing their submersion in the medium. The flasks with their content were sterilised with saturated bromine water for 4 minutes in a shaking funnel, stoppered with a cotton wool plug. The seeds were then washed 10 times with sterile distilled water and finally

soaked in the same funnel for about 20 hours at room temperature. The isolation of the embryos from the seeds and their introduction into the Erlenmayer flasks were carried out in the Hansen box that had previously been sterilised by radiation from a quartz lamp. 10 or 20 embryos were introduced into each flask, each shoot weighing about 10 mg. Growth was maintained without light or temperature control. After 2 to 15 days the washed seedlings were dried between two layers of tissue paper, weighed, boiled for 5 minutes with a little distilled water and homogenised in the MSE homogeniser. When more concentrated extracts were required, the solid particles were carefully disintegrated in a small porcelain mortar and then made up to 10 ml. including the debris. The extracts were then filtered through a little cotton wool, and urea was directly determined in the filtrate. An aliquot of the filtrate was deproteinised with cadmium hydroxide [7], and citrulline (5 to 60 $\mu\text{g.}$) and arginine (5 to 30 $\mu\text{g.}$) were determined colorimetrically.

Citrulline was determined by means of the Fearon test, as modified by Lazariiev [12] and adapted for plant material by Kleczkowski [10a]. The color was read in the Leitz photolorimeter, using filter C. Arginine was determined by the method of Ceriotti and Spandrio [1], using 0.3% of hypobromide solution. The diffusion method of Conway [4] was used for the determination of urea, Jack bean seeds being the source of urease. The liberated ammonia bound with boric acid was titrated with 0.01 N-HCl from a 0.2 ml. Rehberg biurette. Ammonia was determined in the same way as urea, but without the addition of urease. The aminoacids in the extracts were identified on Whatman No. 1 by means of circular and ascending paper chromatography, using phenol saturated with water as the phase, in the presence of 0.3% of ammonia.

RESULTS

Results were calculated in $\mu\text{g.}$ per 10 shoots. The figures quoted represent averages of 4 determinations from 2 parallel estimations. For the determination of citrulline and arginine composite samples from 20 shoots were taken; ammonia and urea, owing to their low concentrations were determined in extracts from 50 shoots.

I. Cultures with the addition of ornithine to the medium

Cultures containing 10 shoots in 7 ml. of the White medium with the addition of 5 mg. of ornithine monohydrochloride were determined for their content of citrulline and arginine after 2, 4 and 6 days of growth.

The results are shown in table 1. The increase of citrulline compared with the control growth in cultures with added ornithine amounted to 65—100%, the increase of arginine 55 to 100%.

Table 1

Influence of ornithine added to the medium on the synthesis of citrulline and arginine in shoots of green pea

Age of shoots (days)	Wt. of shoots (mg.)		Citrulline ($\mu\text{g.}$)		Arginine ($\mu\text{g.}$)	
	control	added ornithine	control	added ornithine	control	added ornithine
2	200	210	19	38	350	563
2	220	230	20	33	360	550
2	215	215	18	30	344	526
3	235	237	29	48	375	615
4	304	305	25	42	343	650
6	317	301	42	75	353	725
6	400	397	38	66	344	660

In order to determine the influence of compounds containing energy-rich bond, additional experiments were carried out as above, but in the presence of carbamyl phosphate (CAP), or ATP. 20 shoots were grown in 7 ml. of the White medium with the addition of 5 mg. of ornithine-HCl. After 3 days 15 μmoles of CAP (Lithium salt), or 15 μmoles of ATP in 1 ml. of water were added. After additional 16 hours the samples were

Table 2

Influence of added carbamyl phosphate (CAP) or adenosinetriphosphate (ATP) on the synthesis of citrulline and arginine in shoots of green pea (after 16 hours)

Added to the medium	Wt. of shoots (mg.)	Citrulline ($\mu\text{g.}$)	Arginine ($\mu\text{g.}$)
—	303	26	381
ornithine	305	50	627
ornithine+CAP	311	53	661
ornithine+ATP	312	57	687

determined for citrulline and arginine (Table 2). The addition of CAP and ATP caused a slight but measurable increase of both aminoacids. The insignificant increases may be explained by the short incubation period, by instability of ATP and particularly CAP in solution, as well as by a sufficient endogenous supply of high energy bonds in the healthy growing shoots.

II. Cultures with the addition of citrulline to the medium

Preparatory work was carried out exactly in the same manner as in the case of added ornithine. After 3 to 7 days the residual citrulline in the medium and citrulline and arginine in the shoots were determined. 10 shoots were grown on the White medium with the addition of 5 mg. of citrulline. As can be seen from table 3, the shoots rapidly absorbed

Table 3

*Influence of citrulline (5 mg.) added to the medium on the synthesis of arginine in shoots of green pea *)*

Age of cultures (days)	Wt. of shoots (mg.)		Citrulline ($\mu\text{g.}$)			Arginine ($\mu\text{g.}$)	
	control	added citrulline	control	added citrulline	medium	control	added citrulline
3	262	245	25	260	3050	289	440
5	315	340	30	380	1925	257	557
7	370	375	37	421	1600	268	546

*) A different batch of peas of the same variety was used in the experiments from table 3 onwards.

citrulline from the medium. The level of citrulline increased 10 times over and above the control, yet the content amounted only to about 1/10 of the total of absorbed citrulline. The increase of arginine varied from 55 to 116%.

The difference between the absolute quantities of citrulline absorbed and the quantities of citrulline and arginine actually found in the tissue can be explained only on the basis of rapid metabolism of both amino-acids in the plant. In other words, if citrulline would be supplied to the plant in concentrations below or equal to the rate at which the seedlings can deal with this particular aminoacid, then no increase of citrulline and only a very small increase of arginine should be found in the tissue grown with the addition of limited amounts of citrulline. Conversely the more citrulline added to the medium, the more citrulline and arginine should be found in the tissue. This was actually the case as can be seen in table 4. 400 $\mu\text{g.}$ of citrulline in 10 ml. of the medium per 10 shoots seems to be just the amount of substrate which the enzymes of the nitrogen metabolism can adequately deal with, because citrulline and arginine are nearly as quickly metabolised as citrulline is supplied. The higher the initial concentration of citrulline in the medium, the bigger the accumulation of citrulline and arginine in the shoots.

Table 4

Influence of concentration of added citrulline to the medium on the amount of citrulline and arginine found in the medium and in the shoots of green pea

Added citrulline to 10 ml. of medium ($\mu\text{g.}$)	Age of cultures (days)											
	2				4				6			
	Wt. of 10 shoots (mg.)	Citrulline in medium ($\mu\text{g.}$)	In shoots		Wt. of 10 shoots (mg.)	Citrulline in medium ($\mu\text{g.}$)	In shoots		Wt. of 10 shoots (mg.)	Citrulline in medium ($\mu\text{g.}$)	In shoots	
			Citrulline ($\mu\text{g.}$)	Arginine ($\mu\text{g.}$)			Citrulline ($\mu\text{g.}$)	Arginine ($\mu\text{g.}$)			Citrulline ($\mu\text{g.}$)	Arginine ($\mu\text{g.}$)
none	176	0	25	247	295	0	33	261	413	0	35	247
400	180	325	26	254	265	116	35	282	415	93	42	261
1600	195	1500	50	350	283	1035	123	350	410	800	245	393
5000	192	4500	90	371	288	3300	307	391	460	2425	725	523

In table 5 results are reported for arginine as well as for urea and ammonia in cultures grown with the addition of 5 mg. of citrulline in 7 ml. of the White medium per 20 shoots. In 2 and 4 day-old cultures no increases in urea were found, however, there was a noticeable increase after 6 days. It is interesting to note that the amount of ammonia is always higher in cultures grown on the medium containing anyone of the aminoacids of the ornithine cycle. This point is illustrated by the experiments compiled in table 6. Shoots were growing for 15 days with the addition of one of the 3 aminoacids of the ornithine cycle. In all cultures considerable increases of urea and ammonia were observed, as well as traces of citrulline and arginine in the medium itself. The increases of ammonia in cultures growing on either of the aminoacids are not surprising, as it is well known that all leguminous plants contain urease which catalyzes the hydrolysis of urea.

Table 5

Influence of citrulline added to the medium on the synthesis of arginine, urea and ammonia in shoots of green pea

Age of cultures (days)	Wt. of 10 shoots (mg.)		Arginine ($\mu\text{g.}$)		Ammonia-N ($\mu\text{g.}$)		Urea-N ($\mu\text{g.}$)	
	control	added citrull.	control	added citrull.	control	added citrull.	control	added citrull.
2	244	245	270	370	7.7	8.1	4.7	4.4
4	344	344	275	412	10.0	12.4	5.2	5.2
6	400	395	290	625	13.0	15.0	5.6	7.7

Table 6

Influence of added ornithine, citrulline and arginine on the content of urea and ammonia in 15 day old seedlings. (20 shoots were grown in 10 ml. of the White medium with the addition of 5 mg. of the respective aminoacids)

Added to the medium	Wt. of 20 shoots (mg.)	Arginine (μ g.)	Ammonia-N (μ g.)	Urea-N (μ g.)
—	494	225	9.7	8.1
ornithine	481	379	14.1	14.1
citrulline	505	371	11.8	11.8
arginine	530	387	22.5	13.1

The increases of citrulline and arginine reported above were confirmed chromatographically and marked increases of glutamic acid, glutamine and particularly asparagine were also observed.

III. Cultures with the addition of arginine to the medium

Arginine, urea and ammonia were determined in shoots grown on the White medium with the addition of arginine. Some of the cultures were growing in the dark, some others in the light. Each flask contained 20 shoots in 7 ml. of the medium with the addition of 5 mg. of arginine. Results in table 7 show that arginine was rapidly metabolised. After 3

Table 7

Influence of arginine (5 mg.) added to the medium on the synthesis of urea and ammonia in shoots of green pea

Age of cultures (days)	Grown in	Wt. of 20 shoots (mg.)		Arginine (μ g.)			Ammonia-N (μ g.)		Urea-N (μ g.)	
		control	added arginine	control	added arginine	Me- dium	control	added arginine	control	added arginine
3	light	270	272	296	822	2100	7.7	8.5	3.1	6.9
3	light	261	272	275	800	—	6.9	9.8	3.3	6.1
3	dark	314	323	260	810	—	6.9	8.9	3.1	4.2
6	light	431	447	287	1013	—	8.7	13.9	5.7	9.2
6	light	371	383	299	985	950	8.1	12.2	5.2	8.7
6	3 days light then 3 d. dark	310	322	318	1240	525	7.1	11.1	7.1	16.2
6	dark	490	480	275	937	600	12.0	14.4	4.8	8.0
8	dark	527	527	261	766	350	16.6	26.4	7.9	11.3

days the shoots have absorbed 60% of the arginine from the medium, after 6 days 80 to 90% of the arginine was absorbed, and after 8 days only 7% of the initial arginine was left in the medium. The increase of urea amounted to 50—125%, and the increase of ammonia varied from 11 to 60%. Chromatographically it was possible to detect only an intense spot corresponding to asparagine.

DISCUSSION

It is evident from the experiments reported that the addition of ornithine to the medium caused the synthesis of citrulline and arginine. Similarly, arginine was synthesised from citrulline, and an adequate supply of arginine caused the appearance of increased quantities of urea and ammonia in the plant tissue. The interconversion of the aminoacids of the ornithine cycle as well as the disappearance of ornithine, citrulline and arginine in the green pea proceeds at a high rate, suggesting the presence of a very active system of enzymes catalyzing the metabolism of these aminoacids. The results in table 3 show that after 7 days 3400 μg . of citrulline were absorbed from the medium, whereas the quantities of citrulline and arginine actually found in the shoots amounted only to 662 μg . (increase above endogenous citrulline and arginine). This suggests that about 80% of the absorbed citrulline has been metabolised through the ornithine cycle and through some other metabolic paths.

The important, if not the dominant role of the ornithine cycle in the green pea may be illustrated in the following manner. It is seen from table 3 that at least 278 μg . of arginine was synthesised after 6 days in 10 shoots from 3400 μg . of citrulline absorbed from the medium. This amounts to a conversion of over 8%. Actually the synthesis of arginine must be very much higher than that, because, as can be seen from table 7, the disappearance of arginine from the tissue is very rapid indeed. After 6 days of growth the shoots have absorbed 4050 μg . of arginine and the amount of arginine found in the tissue over and above the endogenous arginine amounted only to 686 μg . This suggests a "loss" of 83%. Should this rate of arginine metabolism be applied to the 278 μg . arginine increase in table 3, then the total synthesis from 3400 μg . of citrulline would amount to 1632 μg . of arginine. In other words, 48% of the initial citrulline would have been metabolised by means of the ornithine cycle path. Unfortunately inadequate methods for the determination of ornithine and the rapid metabolism of urea and ammonia in the plant do not permit as yet the drawing of a complete balance sheet for the ornithine cycle in the plant.

The concentration of arginine in the shoots of the green pea is about 15 times as high as the concentration of citrulline. It is interesting to note that the accumulation of citrulline in the shoots is relatively low despite the uninterrupted absorption of ornithine from the medium (Table 1). After 6 days of incubation the increase of citrulline amounted to 30 μg . and the corresponding increase of arginine to 340 μg . The low level of citrulline in the shoots despite continuous feeding with ornithine suggests that citrulline is a very active metabolite and that the plant contains active enzymes as well as abundance of energy for its metabolism. The addition of ATP caused only insignificant increases in the concentration of citrulline and arginine from ornithine, suggesting an ample supply of high energy bonds for the synthesis of CAP and argininosuccinic acid.

It can be seen from table 3 and 4 that in no case was it possible to find in the tissue more than 10 to 25% of the absorbed citrulline from the medium. Furthermore when the concentration of citrulline reached a certain level, further increases had no effect upon the concentration of arginine in the shoots. After 6 to 7 days of incubation the accumulation of citrulline in the shoots increased 10 fold (Table 3) and 20 fold (Table 4) and yet the increase of arginine was the same in both cases, amounting to about 100%. This would seem to suggest that citrulline may be metabolised on a path other than the ornithine cycle.

The operation of the full ornithine cycle is shown in table 6, where irrespective of the aminoacid fed, be it ornithine, citrulline or arginine, the level of arginine was equally high and in all cases it was possible to prove a considerable increase of urea and of ammonia. On the other hand, no ornithine could be detected chromatographically which, however may not be surprising if its metabolism proceeds at a rate similar to that of citrulline and arginine.

More intense and larger chromatographic spots were observed for citrulline and arginine in extracts prepared from cultures grown on any of the 3 aminoacids. Intense spots were also detected corresponding to asparagine, glutamine and glutamic acid from cultures grown on ornithine and citrulline and increases in asparagine only, in cultures which were fed with arginine. Similar observations were made by Kasting and Delwiche [8], Coleman and Hegarty [3] and Kleczkowski [10].

On the basis of the presented evidence it is concluded that young shoots of the green pea contain a complete and very active enzyme system catalyzing all the links of the ornithine cycle, from ornithine through citrulline and arginine to urea. Owing to the presence of urease,

urea may be rapidly hydrolysed to ammonia, which itself is incorporated into the nitrogen metabolism of the plant in the usual manner. Coleman [2] suggested that the ornithine cycle in green plants terminates on arginine, resembling the cycle in microorganisms which do not possess arginase. However, the results presented above, in conjunction with the fact that leguminous plants contain active arginase and urease would suggest that the complete ornithine cycle operates in young shoots of the green pea.

SUMMARY

Sterile cultures of shoots of the green pea with removed cotyledons were grown on the White medium with the addition of ornithine, citrulline and arginine, respectively. The young shoots absorbed large amounts of the aminoacids from the medium. It was shown that the growing tissue was able to catalyze the whole process of the ornithine cycle. By means of paper chromatography it was confirmed that cultures grown on ornithine and citrulline caused also the synthesis of asparagine, glutamine and glutamic acid, while grown on arginine it caused the synthesis of asparagine only. Quantitative observations on the metabolism of ornithine, citrulline and arginine lead to the conclusion that young shoots of the green pea possess the complete enzyme system for the catalysis of the ornithine cycle.

REFERENCES

- [1] Ceriotti G., Spandrio L., *Biochem. J.* **66**, 603, 1957.
- [2] Coleman R. G., *Nature* **181**, 776, 1958.
- [3] Coleman R. G., Hegarty M. P., *Nature* **179**, 376, 1957.
- [4] Conway E. J., *Microdiffusion Analysis and Volumetric Error*, Crosby Lockwood & Son. Ltd., London, 1947.
- [5] Davidson D. C., Elliott W. W., *Nature* **169**, 313, 1952.
- [6] Fries N., *Symbolae Bot. Upsalienses* **13**, 83, 1954.
- [7] Fujita A., Iwatake D., *Biochem. Z.* **242**, 43, 1931.
- [8] Kasting R., Delwiche C. C., *Plant Physiol.* **30**, Supl. XXVIII, 1955.
- [9] Kasting R., Delwiche C. C., *Plant Physiol.* **32**, 471, 1957.
- [10] Kleczkowski K., *Bull. Acad. Polon. Sci., Cl. II*, **5**, 83, 1957.
- [10a] Kleczkowski K., *Acta Bioch. Polon.* **5**, 155, 1958.
- [11] Krebs H. A., Eggleston L. V., *Annal. Acad. Scient. Fennica Seria A II Chemica* **60**, Helsinki **496**, 1955.
- [12] Lazarev A. F., *Biokhimiya* **15**, 401, 1950.
- [13] Srb A.M., Horowitz N.H., *J. Biol. Chem.* **154**, 129, 1944.
- [14] Street H. E., *Biological Reviews* **32**, 117, 1957.
- [15] Thomas W. H., Krauss R. W., *Plant Physiol.* **30**, 113, 1955.

- [16] Virtanen A. J., Miettinen J. K., *Nature* **170**, 283, 1952.
[17] Walker J. B., Meyers J., *J. Biol. Chem.* **203**, 143, 1953.
[18] White P. R., *A Handbook of Plant Tissue Culture*, The Ronald Press Co, New York, 1943.

CYKL ORNITYNOWY W KIELKACH GROCHU

Streszczenie

Sterylny zarodek grochu po usunięciu liścieni hodowano na pożywce White'a z dodatkiem ornityny, cytruliny względnie argininy. Młode kielki absorbują duże ilości aminokwasów z pożywki. Wykazano, że rosnąca tkanka może katalizować przemianę aminokwasów po torze cyklu ornitynowego. Potwierdzono przy pomocy chromatografii bibułowej, że hodowle rosnące na pożywce z dodatkiem ornityny i cytruliny syntetyzują ponadto asparaginę, glutaminę i kwas glutaminowy, zaś z dodatkiem argininy syntetyzują jedynie asparaginę. Ilościowe badania przemiany ornityny, cytruliny i argininy przemawiają za tym, że młode kielki grochu posiadają komplet enzymów cyklu ornitynowego.

Otrzymano 2.5.1958 r.

K. TOCZKO

MIKROBIOLOGICZNY ROZKŁAD NIKOTYNY

Zakład Biochemii Roślin, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie
Kierownik: prof. dr I. Reifer

W ostatnich latach dokonano znacznego postępu w badaniach nad wyjaśnieniem mechanizmu mikrobiologicznego rozkładu nikotyny. W 1954 r. Wada i Yamasaki [10] wśród produktów utlenienia nikotyny przez bakterie glebowe zidentyfikowali pseudooksynikotyne i kwas γ -keto- γ (3-pirydylo) masłowy, a Tabuchi 3-bursztynylo-6-hydroksypirydynę [7]. W 1955 r. Frankenburg [2] oraz Frankenburg i Vaitekunas [3] wykryli dodatkowo 6-hydroksynikotyne, 3-pirydylopropyloketon, 3-pirydylometyloketon, kwas nikotynowy i 6-hydroksynikotynowy. W naszym laboratorium zauważono, że w wyniku rozkładu nikotyny przez wydzielony szczep bakterii glebowych powstaje m. in. większa, aniżeli dotychczas wykryto, ilość pochodnych pirydynowych. W niniejszej pracy opisano niektóre własności tych związków.

CZĘŚĆ DOSWIADCZALNA

Hodowla drobnoustrojów. Z korzeni roślin polowych Machorki Pomorskiej wyizolowano szczep bakterii zdolnych do korzystania z azotu i węgla nikotyny. Bakterie te wg Bergey'a [1] należą do *Pseudomonas*. Mikroorganizmy hodowano na pożywce o następującym składzie: 0,03% K_2HPO_4 , 0,03% KH_2PO_4 , 0,05% $MgSO_4$, 0,05% $NaCl$, ślad $FeCl_2$ oraz 0,2% nikotyny; pH 6,8.

Pożywkę po 500 ml w litrowych kolbach sterylizowano w aparacie Kocha trzykrotnie po pół godziny. Każdą kolbę szczepiono 1 ml zawiesiny bakteryjnej w wodzie destylowanej i przetrzymywano w ciemni w termostacie o temp. 27°.

Rozdział produktów rozkładu nikotyny. 1,5 l pięciodniowej hodowli mieszano z celitem i sączono przez bibułę. Przesącz zagęszczano pod zmniejszonym ciśnieniem piętnastokrotnie, dodawano tlenku magnezowego

i destylowano z parą wodną. Destylację kończono, gdy w 5 ml destylatu nie stwierdzano zmętnienia po dodaniu kwasu krzemowo-wolfrامowego. Destylat (około 1,5 l), po zakwaszeniu kwasem solnym, zagęszczano na łaźni wodnej do 50 ml, alkalizowano ługiem sodowym do pH powyżej 10 i ekstrahowano eterem naftowym. Wyciąg eterowy mieszano z 20 ml 0,1 N-kwasu solnego, eter oddestylowywano, a pozostały kwaśny roztwór wodny, po uzupełnieniu do 25 ml, stanowił frakcję I.

Roztwór wodny, po ekstrakcji eterem, ekstrahowano chloroformem. Ekstrakcję przerywano, kiedy w roztworze wodnym nie było już związków pochłaniających światło o długości fali 260 m μ . Zawarte w chloroformie związki pirydynowe przenoszono do 25 ml 0,1 N-kwasu solnego ekstrahując porcjami po 5 ml — frakcja II.

Pozostałość po destylacji z parą wodną zagęszczono na łaźni wodnej do 50 ml, przesączono i ekstrahowano chloroformem, a następnie chloroform 0,1 N-kwasem solnym jak wyżej. W ten sposób do kwasu przeszły wszystkie zawarte w chloroformie związki tworzące barwne połączenia z kwasem p-aminobenzoesowym i bromocyjankiem — frakcja III.

Roztwór wodny, po ekstrakcji chloroformem, odparowano do sucha i pozostałe na dnie naczynia związki pirydynowe rozpuszczano w bezwodnym etanolu — frakcja IV. Każdą frakcję badano chromatograficznie i spektrofotometrycznie w nadfiolecie.

Badania chromatograficzne. Do badań chromatograficznych pobierano część roztworów frakcji I, II lub III, alkalizowano ługiem sodowym i ekstrahowano chloroformem. Wyciągi chloroformowe zagęszczano pod zmniejszonym ciśnieniem do małych objętości i nakraplano na bibułę Whatman nr 1. Do chromatografii związków frakcji IV pobierano bezpośrednio roztwór alkoholowy. Stosowano jednokierunkową, wstępującą technikę wg metody opisanej przez Tso i Jeffery [8].

Do rozwijania chromatogramów stosowano następujące układy rozpuszczalników: 1. n-butanol : etanol : 0,2 M bufor octanowy o pH 5,6 (50 : 10 : 40) [4]; 2. III-rzędowy alkohol amyłowy : 0,2 M bufor octanowy o pH 5,6 (50 : 50) [8]; 3. octan butylowy : metanol : 0,25% NH₄OH (95 : 5 : 25) [6], w niektórych przypadkach; 4. benzen : metanol : 0,2 M bufor octanowy o pH 5,6 (60 : 15 : 25) [4].

Rozwinięte i wysuszone na powietrzu chromatogramy wywoływano za pomocą spryskania odczynnikiem Dragendorfa w modyfikacji Muniera i współpr. [5] względnie przez opryskanie 1% etanolowym roztworem kwasu p-aminobenzoesowego i po wysuszeniu przez zanurzenie do par bromocyjanku. W tym wypadku najintensywniejsze zabarwienie plam następuje po 25—30 minutach [8].

Dla uzyskania czystych związków w ilościach dostatecznych do badań w nadfiolecie, na arkusz bibuły Whatman nr 3 o wymiarach 29×46 cm nanoszono roztwory poszczególnych frakcji linią ciągłą w odległości 3 cm od krótszej krawędzi. Po rozwinięciu i wysuszeniu, wycinano po obydwu stronach arkusza, równoległe do kierunku ruchu rozpuszczalnika, dwa paski o szerokości około 3 cm. Paski wywoływano i w oparciu o uzyskane plamy, wycinano z reszty arkusza odpowiednie odcinki. Zawarte w nich związki eluowano wodą lub 0,01 N kwasem solnym. Uzyskane w ten sposób surowe eluaty badano chromatograficznie w innych układach rozpuszczalników i dalej oczyszczano w tym układzie, w którym uzyskano najkorzystniejszy podział. Za czyste uznawano te związki, które badane w różnych rozpuszczalnikach dawały pojedyncze plamy o jednolitym zabarwieniu z kwasem *p*-aminobenzoesowym i bromocyjankiem. Czyste chromatograficznie związki pierwszych trzech frakcji wytrącano kwasem krzemowo-wolframowym, natomiast związki frakcji IV, po odparowaniu wody, rozpuszczano w etanolu.

Badania widm absorpcyjnych w nadfiolecie. Do badań w nadfiolecie, wytrącone kwasem krzemowo-wolframowym związki pierwszych trzech frakcji, rozpuszczano w 2—3 ml 1 N ługu sodowego i ekstrahowano chloroformem. Chloroform oddestylowywano do sucha *in vacuo* i osad rozpuszczano w wodzie redestylowanej. Związki frakcji IV rozpuszczano w wodzie bezpośrednio po odparowaniu etanolu.

Do badań pobierano dokładnie 3 ml roztworu wodnego. Widma absorpcyjne oznaczano w jednej próbce w następującej kolejności: 1) w wodzie, 2) po zakwaszeniu przez dodanie 0,03 ml 1,0 N kwasu solnego, 3) po zobojętnieniu za pomocą 0,03 ml 1,0 N ługu sodowego, 4) po zalkalizowaniu za pomocą dodania dalszych 0,03 ml ługu i wreszcie 5) po zobojętnieniu. Oznaczenia wykonywano wobec wody redestylowanej, którą również odpowiednio zakwaszano, zobojętniano i alkalizowano. Pomiaru wykonywano w spektrofotometrze Jobin i Yvon.

WYNIKI

W pożywce, zawierającej nikotynę jako jedyne źródło azotu i węgla, po zaszczepieniu bakteriami, stwierdzono stopniowy ubytek jej zawartości i równocześnie chromatograficznie wykryto powstanie nowych związków pirydynowych. Z pięciodniowej hodowli wydzielono w stanie czystym 10 tych związków. W tablicy 1 zestawione są ich współczynniki R_F w trzech układach rozpuszczalników oraz podane jest zabarwienie z kwasem *p*-aminobenzoesowym i bromocyjankiem.

T a b l i c a 1

Współczynniki R_F oraz zabarwienie z kwasem *p*-aminobenzoesowym i bromocyjan-kiem produktów rozkładu nikotyny wydzielonych z pięciodniowej hodowli *Pseudomonas*

Frak- cja	Zwią- zek	Zabarwienie z kwasem <i>p</i> -aminobenzoesowym i bromocyjan-kiem	Współczynniki R_F w układach		
			1*	2*	3*
I	1	żółto-pomarańczowe	0,38	0,23	0,00
II	2	czerwono-pomarańczowe	0,82	0,75	0,80
III	3	pomarańczowe	0,29	0,15	0,00
	4	czerwono-pomarańczowe	0,37	0,19	0,00
	5	czerwono-różowe	0,74	0,72	0,62
	6	czerwono-wiśniowe	0,76	0,82	0,85
	7	pomarańczowo-czerwone	0,77	0,81	0,93
IV	8	karminowe	0,42	0,45	0,74
	9	żółto-pomarańczowe	0,43	0,49	0,88
	10	czerwono pomarańczowe	0,66	0,68	0,96

1* *n*-butanol-etanol-0,2 M bufor octanowy pH 5,6 (50 : 10 : 40)

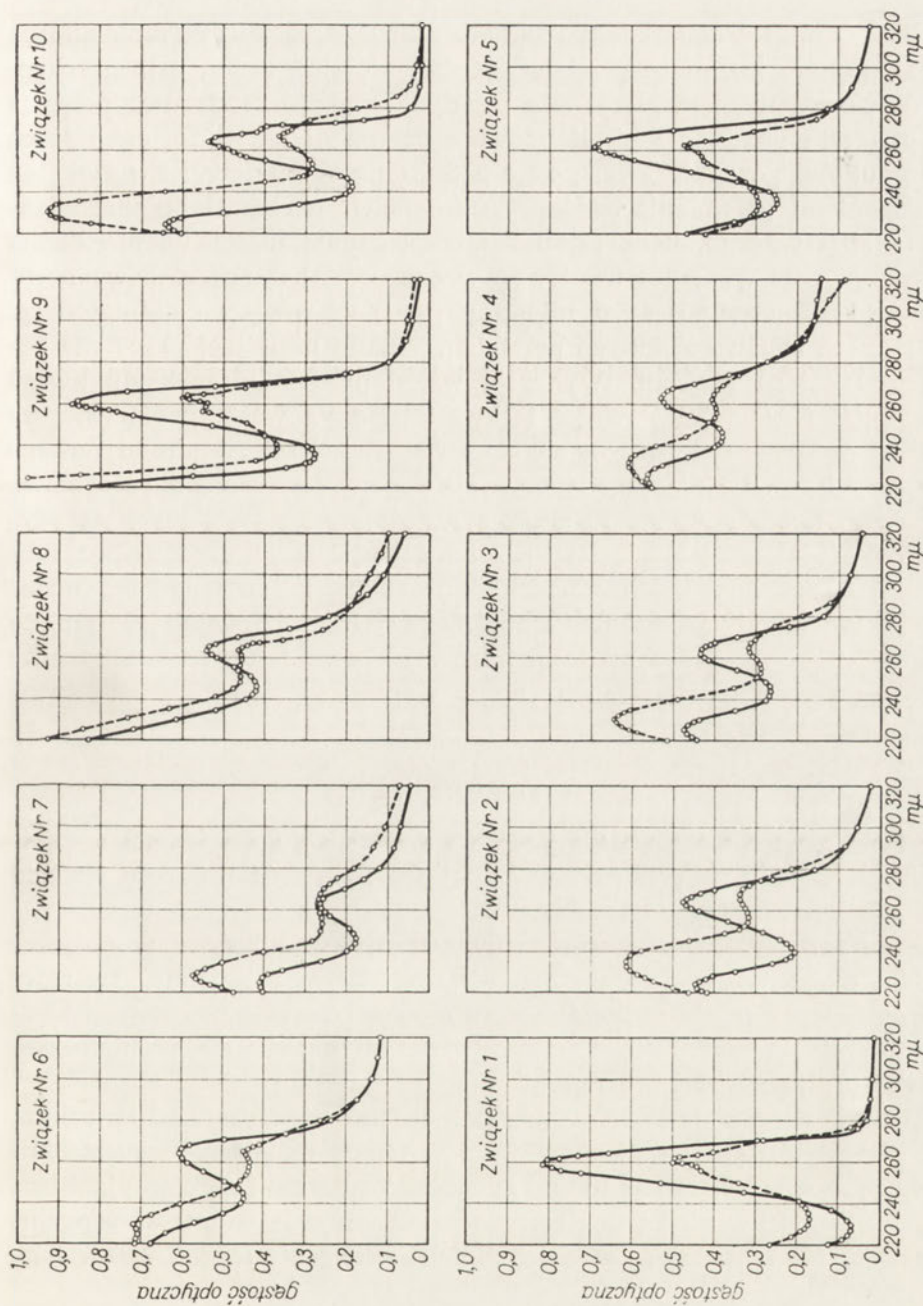
2* III-rz. alkohol amyłowy - 0,2 M bufor octanowy pH 5,6 (50 : 50)

3* octan butylowy - metanol - 0,25% NH_4OH (95 : 5 : 25).

Związki pierwszych trzech frakcji łatwo ekstrahują się z alkalicznego roztworu wodnego do chloroformu i z chloroformu do rozcieńczonego kwasu solnego. Są to więc związki o charakterze zasadowym. Związki frakcji I i II są lotne z parą wodną. Związki wydzielone z frakcji IV nie ekstrahują się z alkalicznego roztworu wodnego do chloroformu, eteru etylowego i benzenu, jak również nie rozpuszczają się w tych rozpuszczalnikach po odparowaniu wody ze środowiska alkalicznego. Barwne połączenia z odczynnikiem Dragendorfa tworzą związki oznaczone numerem od 1 do 5 włącznie.

Na rys. 1 przedstawione są krzywe absorpcyjne tych związków w nadfiolecie w wodnych roztworach 0,01 N kwasu solnego i 0,01 N ługu sodowego. Jak widać wszystkie związki posiadają charakterystyczne dla pochodnych pirydyny maksimum pochłaniania przy ok. 260 m μ .

Z wydzielonych związków zidentyfikowano chromatograficznie i spektroskopowo nikotyne — związek nr 1 (czysty standard nikotyny otrzymano przez frakcjonowaną destylację handlowego preparatu), kwas nikotynowy — związek nr 9 (standard kwasu nikotynowego Firmy Struers) oraz kwas γ -keto- γ (3-pirydylo) masłowy — związek nr 10 (kryształiczny standard otrzymano wg metody Wada i Yamasaki [10]). Praca nad identyfikacją pozostałych związków jest w toku.



Rys. 1. Absorpcja w ultrafiolecie produktów rozkładu nikotyny wydzielonych z pięciodniowej hodowli *Pseudomonas*

— w 0,01 N-HCl
 - - - w 0,01 N-NaOH

DYSKUSJA

Proces mikrobiologicznego rozkładu nikotyny, zdaniem Frankenberga i Vaitekunasasa [3], może przebiegać trzema torami. Jeden z nich rozpoczyna się utlenieniem pierścienia pirydynowego, pozostałe dwa polegają na otwarciu pierścienia pirolidynowego cząsteczki alkaloidu. Jako jeden z produktów powstaje kwas γ -keto- γ (3-pirydylo) masłowy. Związek ten ulega dalszej przemianie bądź przez stopniowe skracanie bocznego łańcucha alifatycznego, bądź też przez bezpośrednie utlenienie pierścienia pirydynowego. Wada [9] uważa, że w obecności bakterii glebowych rodzaju *Pseudomonas* rozkład nikotyny przebiega wg tej ostatniej drogi i wyklucza możliwość innych przemian. Wyniki niniejszej pracy nie potwierdzają tego poglądu. Wykrycie wśród produktów rozkładu kwasu γ -keto- γ (3-pirydylo)masłowego i kwasu nikotynowego przemawia za tym, że proces ten rozpoczyna się rozerwaniem pierścienia pirolidynowego nikotyny i powstały boczny łańcuch alifatyczny jest następnie stopniowo skracany. Ponadto wykrycie przez nas dużej ilości pochodnych pirydynowych (poza opisanymi, stwierdzono dodatkowo obecność kilku substancji, o podobnych własnościach, które z uwagi na trudności metodyczne nie zostały wydzielone i opisane) przemawia również za tym, że rozkład nikotyny przez mikroorganizmy glebowe jest procesem o charakterze bardziej złożonym, niż by to wynikało z danych przedstawionych przez Wada [9].

STRESZCZENIE

Wyizolowano szczep bakterii glebowych rodzaju *Pseudomonas* zdolnych do rozwoju na pożywce, w której jedynym źródłem azotu i węgla jest nikotyna.

Stwierdzono, że w czasie hodowli zawartość nikotyny w pożywce szybko spada i równocześnie pojawiają się nowe substancje, tworzące charakterystyczne dla związków pirydynowych barwne połączenia z kwasem *p*-aminobenzoesowym i bromocyjankiem oraz silnie pochłaniające światło o długości fali 260 $m\mu$.

Z pięciodniowej hodowli wydzielono chromatograficznie 10 związków, dla których podano współczynniki R_F w trzech układach rozpuszczalników, zabarwienie z kwasem *p*-aminobenzoesowym i bromocyjankiem, rozpuszczalność w niektórych rozpuszczalnikach oraz widma absorpcyjne w nadfiolecie w roztworach wodnych 0,01 N kwasu solnego i 0,01 N ługu sodowego.

Wśród wydzielonych związków, spektrofotometrycznie i chromatograficznie, poza nikotyną, zidentyfikowano kwas γ -keto- γ (3-pirydylo) masłowy i kwas nikotynowy.

L I T E R A T U R A

- [1] Bergeys *Manual of Determinative Bacteriology*, London, 1948.
- [2] Frankenburg W. G., *Nature* **175**, 945, 1955.
- [3] Frankenburg W. G., Vaitekunas A. A., *Arch. Biochem. Biophys.* **58**, 509, 1955.
- [4] Frankenburg W. G., Gottscha A. M., *J. Am. Chem. Soc.* **77**, 5728, 1955.
- [5] Munnier R., Macheboeuf M., Cherrier N., *Bull. Soc. chim. biol.* **34**, 204, 1952.
- [6] Porter W. L., Naghski J., Eisner J. A., *Arch. Biochem.* **24**, 461, 1949.
- [7] Tabuchi T. J., *J. Agr. Chem. Soc. Japan* **29**, 222, 1955.
- [8] Tso T. C., Jefferey R. N., *Arch. Biochem. Biophys.* **43**, 269, 1953.
- [9] Wada E., *Arch. Biochem. Biophys.* **72**, 145, 1957.
- [10] Wada E., Yamasaki K., *J. Am. Chem. Soc.* **76**, 155, 1954.

MICROBIOLOGICAL DEGRADATION OF NICOTINE

S u m m a r y

A strain of soil bacteria of the genus *Pseudomonas*, able to grow on a medium with nicotine as the sole source of nitrogen and carbon, was isolated.

The content of nicotine in the culture was found to diminish rapidly during growth, and simultaneously there were noted to appear new substances which gave with *p*-aminobenzoic acid and cyanogen bromide the colour compounds typical for pyridine compounds, and strongly absorbing 260 m μ . waves.

10 compounds were isolated chromatographically from the 5 days old culture. R_F values in 3 solvent systems are given, as well as colour tests with *p*-aminobenzoic acid and cyanogen bromide, absorption spectra in UV light and solubility in some organic solvents are also supplied.

In addition to nicotine, also γ -keto- γ (3-pyridyl) butyric acid and nicotinic acids were identified with the aid of spectrophotometric and chromatographic methods among the compounds isolated.

Otrzymano 19.5.1958 r.

A. M. DANCEWICZ, B. LIPIŃSKI i O. ROSIEK

WPLYW PROMIENIOWANIA RENTGENOWSKIEGO NA DEHYDRAZĘ KWASU δ -AMINOLEWULINOWEGO *IN VIVO* U SZCZURÓW

Zakład Ochrony Zdrowia — Instytut Badań Jądrowych PAN, Warszawa
Kierownik: doc. dr E. Kowalski

Jedną z wczesnych faz biosyntezy hemu jest konwersja kwasu δ -aminolewulinowego (ALA) na porfobilinogen (PBG), bezpośredni monopirolowy prekursor porfiryń. Reakcję tę katalizuje dehydrazą kwasu δ -aminolewulinowego (ALAD).

Wyniki badań zachowania się tego enzymu po napromienianiu *in vitro* promieniami X przedstawiliśmy w poprzednim doniesieniu [2]. Tematem niniejszego doniesienia są badania, dotyczące wpływu promieniowania jonizującego *in vivo* na rolę ALAD w biosyntezie hemu u zwierząt napromienianych na całe ciało.

Wpływ promieniowania jonizującego na poszczególne etapy biosyntezy hemu, jak wynika z dostępnej literatury, nie był dotychczas badany. Nizet i współpracownicy [4], Richmond i współpracownicy [6], Bonnichsen i Hevesy [1] badali jedynie wpływ promieniowania na globalną biosyntezę hemu lub hemoglobiny. Autorzy ci stwierdzili wzrost zdolności hemopoetycznych w tkankach narządów krwiotwórczych bezpośrednio po napromienieniu zwierzęcia oraz w kilkanaście dni później, w okresie regeneracyjnym.

CZĘŚĆ DOSWIADCZALNA

A. Materiały i metody

Badania prowadzono na białych szczurach, płci męskiej, o ciężarze 160—230 g, karmionych standardowym pokarmem. Aktywność ALAD oznaczano w wątrobie, nerce, śledzionie i szpiku kostnym. Narządy te izolowano natychmiast po zabiciu zwierzęcia i homogenizowano z dwukrotną wagowo ilością 0,15 M KCl oziębionego uprzednio do 0°. Jako ho-

mogenatu szpiku kostnego używano przesączoną przez gazę zawieszoną uzyskaną po zmiążdżeniu i roztarciu w moździerzu porcelanowym pełnej kości udowej z dwukrotną ilością oziębionego 0,15 M roztworu KCl. Zwierzęta zabijano w narkozie eterowej przez przecięcie żył szyjnych i wykrwawienie. Metodę oznaczania ALAD opisano szczegółowo w poprzednim doniesieniu [2]. Aktywność ALAD w badanych narządach przeliczano na ilość μ moli PBG utworzonego w ciągu godziny na gram mokrej tkanki, na cały narząd i na mg azotu białkowego. Zawartość azotu białkowego ze względu na brak dostatecznej ilości materiału oznaczano (metodą Kjeldahla) jedynie w niektórych próbach.

Zwierzęta napromieniano promieniami X z aparatu rentgenowskiego typu „Stabilipan 250“ f-my Siemens przy napięciu 160 kV i prądzie 15 mA, filtry 0,5 mm Cu. Jednocześnie napromieniano 8 zwierząt umieszczonych w kolistej klatce drewnianej podzielonej na 8 segmentów o rozmiarach i kształcie dopasowanym do wielkości zwierzęcia, nie pozwalającym na zmianę przez nie pozycji. Klatkę ustawiano współosiowo w odległości 90 cm od środka lampy rentgenowskiej, co pozwoliło na równomierne napromienianie wszystkich zwierząt. Natężenie dawki mierzono za pomocą uniwersalnego dozymetru z komorą napastkową. Dla powyższych warunków natężenie dawki mierzone w fantomie drewnianym wynosiło $10 \pm 0,3$ r/min. Wielkość aplikowanej dawki regulowano długością czasu ekspozycji zwierząt.

B. Wyniki

Jako prawidłowe aktywności ALAD w badanych narządach przyjęto średnie wartości uzyskane z 10 zdrowych szczurów, przebadanych w sposób identyczny jak i szczury napromieniane. Dane te przedstawiono w tabelicy 1.

Tablica 1

Aktywność dehydrazy kwasu δ -aminolewulinowego w narządach szczurów kontrolnych (nie napromienianych)

	Aktywność ALAD w μ molach PBG/godz. w przeliczeniu na cały narząd (a) i na g tkanki (b)								
	nerka		wątroba		szpik kostny		śledziona		
	a	b	a	b	a	b	a	b	
Wartość średnia z 10 oznaczeń	0,36	0,17	4,13	0,40	0,09	0,07	0,06	0,08	
Wartości graniczne	maksimum	0,50	0,22	5,33	0,49	0,20	0,12	0,17	0,14
	minimum	0,19	0,13	2,59	0,29	0,04	0,02	0,04	0,04
Średnie odchylenie δ	0,12	0,04	1,25	0,07	0,045	0,03	0,02	0,03	

T a b l i c a 2

Aktywność dehidrazy kwasu δ -aminolewulinowego w niektórych narządach szczurów napromienianych jednorazowo różnymi dawkami promieni X na całe ciało

L.p.	Czas po ekspozycji	Liczba badanych zwierząt	Średnia aktywność ALAD wyrażona jako ilość μ moli PBG/godz. w całym narządzie (a) i gramie tkanki (b)							
			nerka		wątroba		szpik kostny		śledziona	
			a	b	a	b	a	b	a	b
Dawka 25 rentgenów										
1	1 dni	2	0,24	0,13	3,06	0,34	0,09	0,04	0,09	0,08
2	2 „	2	0,22	0,13	2,25	0,32	0,11	0,08	0,08	0,10
3	3 „	2	0,23	0,12	2,41	0,28	0,08	0,04	0,05	0,04
4	5 „	2	0,25	0,13	2,72	0,31	0,09	0,05	0,11	0,10
5	6 „	2	0,26	0,16	4,31	0,41	0,11	0,07	0,12	0,12
6	7 „	2	0,25	0,14	3,55	0,39	0,11	0,08	0,12	0,12
Dawka 50 rentgenów										
7	1 dni	4	0,27	0,15	3,79	0,40	0,08	0,05	0,04	0,05
8	2 „	2	0,26	0,14	3,80	0,42	0,10	0,06	0,29	0,21
9	3 „	2	0,18	0,15	2,82	0,40	0,11	0,11	0,10	0,15
10	5 „	2	0,22	0,17	3,21	0,44	0,15	0,15	0,13	0,17
11	6 „	1	0,13	0,13	2,81	0,38	0,07	0,07	0,20	0,22
12	7 „	4	0,20	0,15	3,20	0,39	0,13	0,11	0,07	0,13
13	9 „	2	0,19	0,13	3,09	0,40	0,10	0,08	0,15	0,15
14	13 „	2	0,19	0,14	2,80	0,34	0,13	0,08	0,09	0,10
15	18 „	3	0,20	0,13	3,41	0,39	0,08	0,07	0,09	0,10
16	21 „	2	0,23	0,17	3,32	0,40	0,09	0,08	0,04	0,05
17	24 „	3	0,18	0,15	3,31	0,39	0,09	0,06	0,05	0,06
18	27 „	3	0,17	0,17	3,39	0,44	0,08	0,05	0,05	0,06
19	30 „	2	0,30	0,16	4,81	0,42	0,05	0,03	0,08	0,09
Dawka 100 rentgenów										
20	1 dni	2	0,29	0,16	4,42	0,47	0,09	0,07	0,007	0,02
21	3 „	2	0,29	0,16	3,48	0,37	0,18	0,13	0,04	0,06
22	5 „	2	0,27	0,16	3,84	0,47	0,13	0,09	0,02	0,03
23	11 „	2	0,22	0,13	3,88	0,40	0,08	0,06	0,07	0,08
24	15 „	1	0,19	0,12	3,52	0,40	0,10	0,06	0,04	0,04
Dawka 200 rentgenów										
25	1 dni	2	0,31	0,17	4,44	0,38	0,01	0,01	0,005	0,01
26	3 „	3	0,27	0,13	3,41	0,48	0,07	0,07	0,02	0,04
27	5 „	2	0,20	0,13	4,00	0,44	0,10	0,08	0,03	0,05
28	7 „	2	0,24	0,17	3,08	0,45	0,13	0,12	0,12	0,12

ciąg dalszy tablicy 2

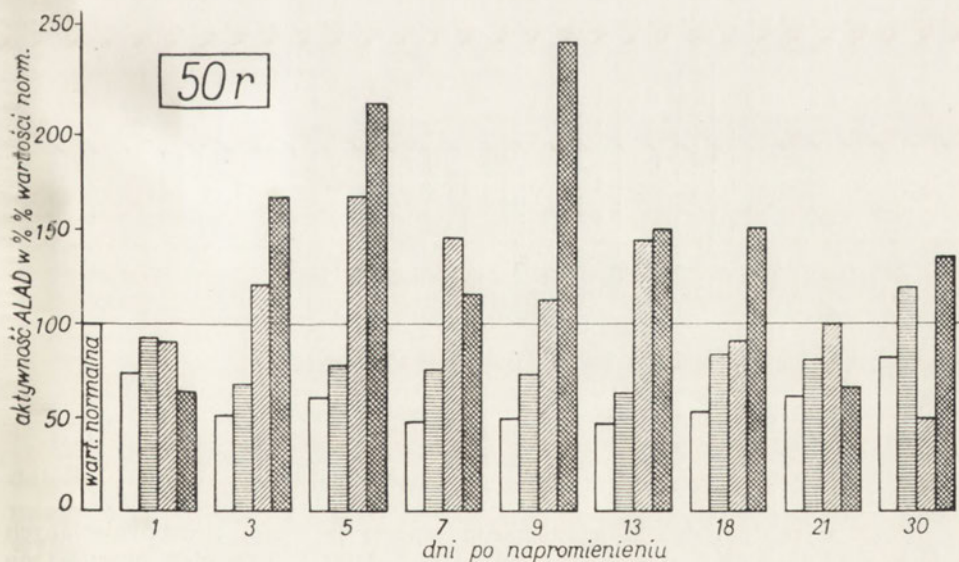
L.p.	Czas po ekspozycji	Liczba badanych zwierząt	Średnia aktywność ALAD wyrażona jako ilość μ moli PBG/godz. w całym narządzie (a) i gramie tkanki (b)							
			nerka		wątroba		szpik kostny		śledziona	
			a	b	a	b	a	b	a	b
Dawka 400 rentgenów										
29	1 dni	3	0,21	0,15	3,89	0,37	0,03	0,03	0,015	0,02
30	2 „	1	0,20	0,16	2,34	0,45	0,02	0,02	0,02	0,03
31	3 „	2	0,22	0,12	3,97	0,42	0,01	0,01	0,003	0,007
32	4 „	1	0,23	0,13	4,40	0,40	0,01	0,007	0,01	0,02
33	5 „	2	0,22	0,12	3,12	0,33	0,04	0,02	0,007	0,01
34	6 „	1	0,22	0,13	2,54	0,33	0,05	0,06	0,01	0,02
35	8 „	2	0,16	0,12	2,90	0,33	0,11	0,09	0,05	0,09
36	10 „	2	0,16	0,15	3,16	0,40	0,08	0,08	0,06	0,12
37	13 „	3	0,26	0,15	3,52	0,37	0,13	0,11	0,07	0,11
38	18 „	3	0,27	0,15	4,52	0,39	0,14	0,08	0,25	0,20
39	21 „	3	0,26	0,17	4,63	0,45	0,18	0,12	0,36	0,28
40	24 „	4	0,29	0,16	3,95	0,39	0,12	0,09	0,21	0,19
41	27 „	4	0,24	0,16	4,95	0,44	0,13	0,09	0,18	0,17
42	30 „	2	0,28	0,13	3,75	0,35	0,07	0,04	0,08	0,05
43	35 „	2	0,21	0,13	3,45	0,35	0,20	0,12	0,23	0,14
44	40 „	2	0,22	0,14	3,57	0,37	0,15	0,09	0,07	0,06
45	42 „	2	0,23	0,13	3,12	0,24	0,08	0,04	0,05	0,04
46	44 „	2	0,24	0,13	3,09	0,34	0,06	0,05	0,03	0,04
47	48 „	2	0,22	0,14	3,19	0,34	0,12	0,09	0,05	0,05
48	60 „	2	0,23	0,12	3,74	0,34	0,10	0,07	0,07	0,05
Dawka 650 rentgenów										
49	3 godz.	2	0,42	0,17	5,59	0,43	0,09	0,06	0,07	0,05
50	6 „	1	0,37	0,15	4,96	0,40	0,04	0,02	0,09	0,10
51	12 „	3	0,40	0,20	3,77	0,41	0,03	0,02	0,02	0,03
52	1 dni	4	0,36	0,17	4,31	0,37	0,04	0,02	0,015	0,02
53	2 „	3	0,36	0,16	5,02	0,43	0,01	0,01	0,01	0,01
54	3 „	2	0,30	0,18	3,19	0,37	0,01	0,01	0,01	0,02
55	5 „	3	0,13	0,14	2,73	0,42	0,01	0,01	0,02	0,03
56	7 „	2	0,22	0,14	3,48	0,38	0,02	0,04	0,01	0,03
57	9 „	1	0,13	0,13	2,38	0,34	0,02	0,02	0,01	0,01
58	9 „	2	0,19	0,14	3,60	0,30	0,03	0,02	0,01	0,015
59	10 „	1	0,14	0,12	1,59	0,30	0,02	0,02	0,005	0,01
60	13 „	2	0,13	0,11	3,50	0,43	0,01	0,02	0,025	0,07
61	30 „	5	0,25	0,13	4,00	0,40	0,12	0,07	0,11	0,11
Dawka 1000 rentgenów										
62	3 godz.	1	0,10	0,07	1,67	0,25	0,05	0,04	0,03	0,05
63	6 „	1	0,09	0,06	1,43	0,22	0,03	0,02	0,02	0,02
64	1 dni	1	0,34	0,19	4,70	0,47	0,02	0,01	0,01	0,02
65	3 „	3	0,29	0,14	4,15	0,37	0,01	0,003	0,003	0,005
66	5 „	1	0,14	0,06	2,20	0,25	0,01	0,003	0,005	0,01

W celu ustalenia aktywności ALAD w narządach zwierząt napromienianych przebadano ogółem 170 szczurów. Zwierzęta napromieniano dawkami 25, 50, 100, 200, 400, 650 i 1000 r, przy czym największą ilość oznaczeń wykonano dla dawek 50, 400 i 650 r. Celem prześledzenia zmian aktywności ALAD w toku rozwoju choroby popromiennej, zwierzęta zabijano w odstępach czasu podanych w tablicach.

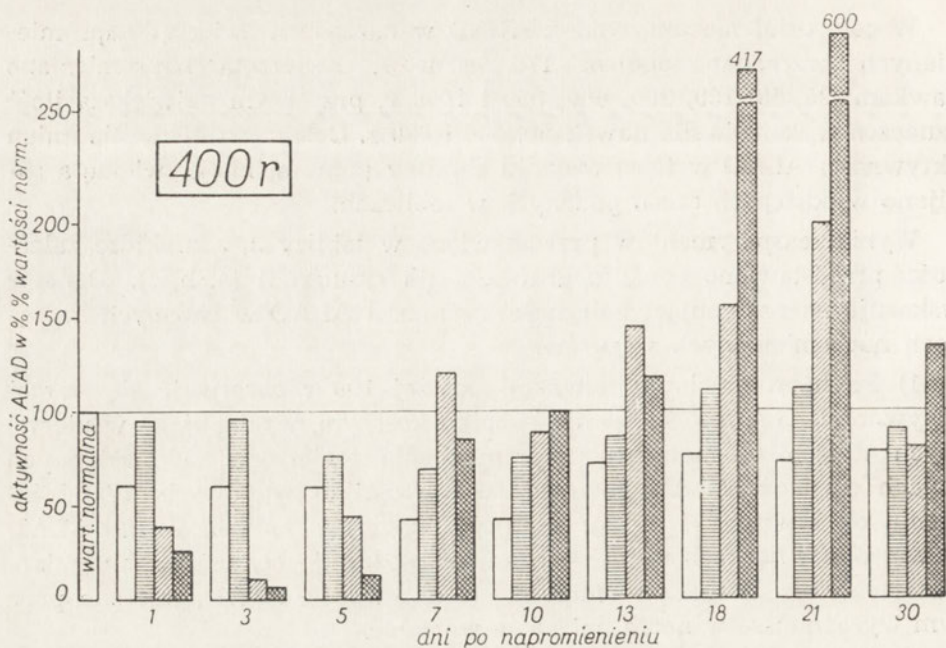
Wyniki eksperymentów przedstawiono w tablicy 2, a niektóre zależności przedstawiono ponadto graficznie na rysunku 1 (a, b, c). Dane te wskazują na następujące zależności czynności ALAD w badanych narządach napromienianych szczurów.

1) Po napromienianiu dawkami poniżej 100 r obserwuje się wzrost aktywności ALAD w śledzionie i szpiku kostnym, występujący w pierwszych dniach od momentu napromienienia zwierzęcia. W następnych dniach czynność ALAD powraca do wartości prawidłowych. W odróżnieniu od śledziony i szpiku kostnego czynność enzymatyczna ALAD w wątrobie i nerkach w tych warunkach pozostaje bez większych zmian. Obserwuje się nieznaczne zmniejszenie aktywności ALAD, jest ono przy tym wyraźniejsze w nerce aniżeli w wątrobie.

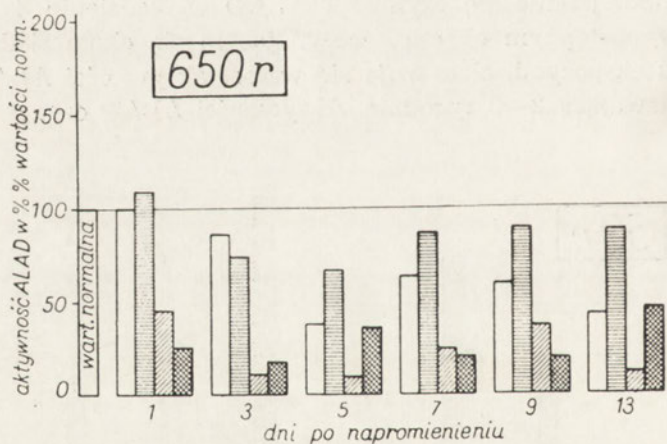
2) Dawki wyższe (400 r) powodują w pierwszych dniach po napromienieniu zmniejszenie się czynności ALAD w śledzionie i w szpiku kostnym. W następnym okresie, zaczynającym się około siódmego dnia od momentu ekspozycji, obserwuje się wzrost aktywności ALAD w tych narządach, trwający 2—3 tygodnie. Aktywności ALAD oznaczane w tym



Rys. 1a

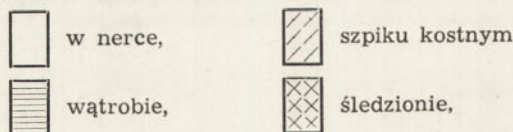


Rys. 1b



Rys. 1c

Rys. 1. Aktywność dehidrazy kwasu δ -aminolewulinowego

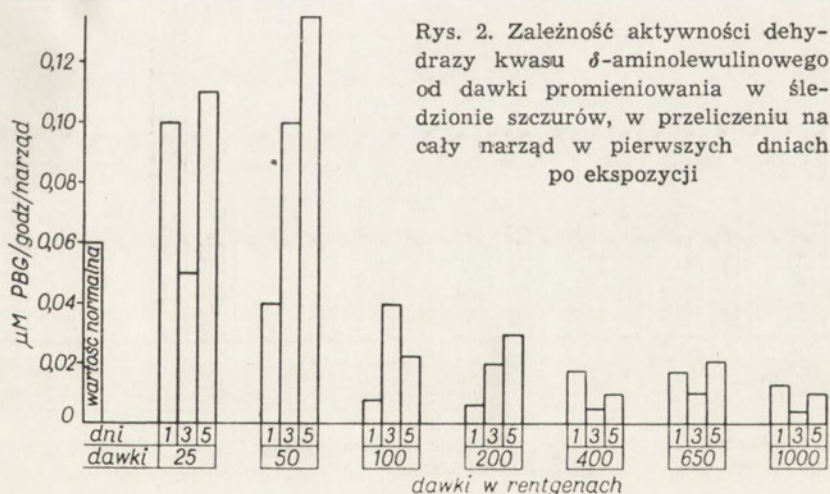


oznaczana w różnych dniach od momentu ekspozycji szczurów napromienianych jednorazowo dawką 50 (a), 400 (b) i 650 (c) rentgenów na całe ciało (wartości na cały narząd)

okresie znacznie przekraczały wartości prawidłowe, niekiedy kilkakrotnie. Po tym okresie wzmożonej czynności ALAD następował stopniowy powrót do wartości prawidłowych.

Zachowanie się ALAD w nerce i wątrobie po dawce 400 r było podobne jak w przypadku dawki 50 r. Zmniejszenie aktywności w przypadku wątroby nie przekraczało 95% przedziału ufności wartości prawidłowych. W nerce zmniejszenie czynności ALAD było wyraźniejsze.

3) Dawka 650 r, która praktycznie w okresie 30 dni w 90% prowadzi do śmierci szczura, powodowała podobnie jak dawka 400 r zmniejszenie aktywności ALAD w śledzionie i szpiku kostnym. Zmniejszenie to osiągało poziom minimalny w przeciągu dwóch dni po napromienieniu i utrzymywało się przez następny okres 7—11 dni, czyli praktycznie do śmierci zwierzęcia. Aktywność ALAD oznaczona u pojedynczych osobników, które przeżyły ten okres i powróciły do zdrowia, nie odbiegała od wartości prawidłowych. Zmniejszenie aktywności ALAD w nerce i wątrobie również i przy tej dawce promieniowania nie było duże i niewiele wykroczało poza 95% przedział ufności wartości prawidłowych. W porównaniu z wartościami uzyskanymi dla dawek 50 i 400 r aktywność w nerce dla 650 r jest nieco niższa, tak że pogłębienie się reakcji spowodowanej wzrostem dawki promieniowania jest widoczne. Zależności tej nie można zaobserwować w przypadku wątroby.



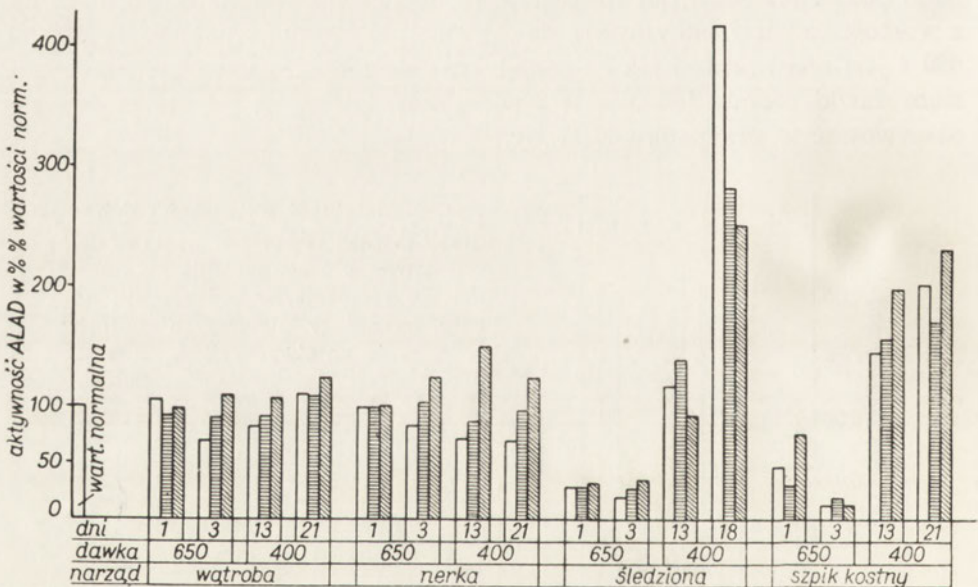
Rys. 2. Zależność aktywności dehidrazy kwasu δ -aminolewulinowego od dawki promieniowania w śledzionie szczurów, w przeliczeniu na cały narząd w pierwszych dniach po ekspozycji

4) W celu dokładniejszego poznania zależności aktywności ALAD od dawki promieniowania przebadaliśmy dodatkowo zwierzęta po napromienieniu ich dawkami: 25, 100, 200, 1000 r. Oznaczenie aktywności wykonano 1, 3, 5 i 7 dnia od momentu ekspozycji. Przedstawione w tabelicy 2 oraz na rys. 2 wyniki wskazują, iż wzrost aktywności ALAD w śle-

T a b l i c a 3

Porównanie aktywności ALAD oznaczonych w narządach napromienianych szczurów w zależności od sposobu przeliczenia wyników

Dawka w r	Dni po na- promienio- waniu	Aktywność wyrażona w μ molach PBG/godz. w przeliczeniu na:											
		ciężar całego narządu				gram mokrej tkanki				mg azotu białkowego			
		wą- troba	nerka	śledz.	szpik	wą- troba	nerka	śledz.	szpik	wą- troba	nerka	śledz.	szpik
0	0	4,13	0,36	0,06	0,09	0,40	0,17	0,08	0,07	13,2	6,1	4,0	14,4
650	1	4,31	0,36	0,02	0,04	0,37	0,17	0,02	0,02	13,0	6,3	1,1	10,0
650	2	5,02	0,36	0,01	0,01	0,43	0,16	0,01	0,01	16,4	7,6	0,9	0,9
650	3	3,19	0,30	0,01	0,01	0,37	0,18	0,02	0,01	14,7	7,8	1,3	1,3
650	7	3,48	0,22	0,01	0,02	0,38	0,14	0,03	0,04	16,1	7,8	2,1	8,5
650	9	3,60	0,19	0,01	0,03	0,30	0,14	0,01	0,02	14,1	6,0	0,9	2,2
400	13	3,52	0,26	0,07	0,13	0,37	0,15	0,11	0,11	14,4	9,0	3,7	28,5
400	18	4,52	0,27	0,25	0,14	0,39	0,15	0,20	0,08	17,6	6,9	8,8	16,5
400	21	4,62	0,26	0,36	0,18	0,45	0,17	0,28	0,12	16,6	7,7	17,6	33,3



Rys. 3. Porównanie aktywności dehydrazy kwasu δ -aminolewulinowego w narządach napromienianych szczurów w zależności od sposobu obliczania:

- na cały narząd (aktywność globalna),
- na gram mokrej tkanki,
- na mg azotu białkowego

dzienie i szpiku kostnym bezpośrednio po napromieniowaniu spowodowany jest jedynie dawkami niższymi od 100 r. Dawki większe prowadzą do zmniejszenia się czynności ALAD, przy czym zmniejszenie to występuje tym szybciej i osiąga tym niższy poziom, im większa jest dawka. Zależność tę zaobserwowano również dla nerki, z tym jednak, że obniżenie aktywności, choć nieznaczne, obserwuje się począwszy od dawek najniższych. W przypadku nerki i wątroby nie obserwuje się wzrostu aktywności ALAD, typowego dla śledziony i szpiku kostnego w pierwszych dniach po napromieniowaniu małymi dawkami promieniowania. Nie stwierdzono również nawet dla dawek 1000 r istotnych zmian aktywności ALAD w wątrobie, która, jak z powyższego wynika, jest najbardziej odporna na działanie promieniowania spośród badanych narządów, w odniesieniu do czynności ALAD.

5) Podane porównawczo w tablicy 3 aktywności ALAD w przeliczeniu na cały narząd oraz na gram mokrej tkanki, jak też na mg azotu białkowego wskazują, że stwierdzone zależności: wzrost i zmniejszenie się aktywności nie są pozorne. Występują one niezależnie od sposobu obliczenia. Obrazuje to również rys. 3, w którym podano procentowe zmiany aktywności ALAD w zależności od dawek i sposobu obliczenia.

OMÓWIENIE WYNIKÓW I WNIOSKI

Zachowanie się *in vivo* układów enzymatycznych pod wpływem promieniowania jonizującego nie jest jednolite [5]. Niektóre (jak np. deoksyrybonukleaza w śledzionie, transaminaza glutaminowo-alaninowa w wątrobie szczura) wykazują wzrost aktywności, inne (jak np. dehydrogenaza kwasu bursztynowego, oksydaza cholinowa oraz koenzym A i koenzym dwufosfopirydynoadeninowy) nie ulegają zmianie, jeszcze inne (jak np. lipaza, enzymy kwasów trójkarboksylowych, fosfataza alkaliczna) wykazują znaczne zmniejszenie aktywności.

W wielu przypadkach zwiększenie aktywności może być tylko pozorne, spowodowane sposobem obliczania wyników. Na tę możliwość zwrócił uwagę w 1956 r. Feinstein [3], który stwierdził, że jeśli przeliczy się aktywność na cały narząd, wówczas w szeregu przypadków, szczególnie w odniesieniu do badań przeprowadzonych na śledzionie, nie ma istotnych różnic pomiędzy napromienianymi a kontrolnymi zwierzętami. Obserwowany w naszych eksperymentach wzrost ALAD nie był zależny od sposobu przeliczenia. Wzrost aktywności obliczonej na gram tkanki mokrej, cały narząd lub na mg azotu białkowego, jak widać na rys. 3, był jednoznaczny. Był to zatem istotny wzrost czynności enzymatycznej.

Drugim faktem stwierdzonym w naszych eksperymentach było odmiennie zachowanie się enzymu w zależności od narządu, z którego po-

chodził. Bardziej czule na promieniowanie pod tym względem okazały się narządy krwiotwórcze szczura: śledziona i szpik kostny. Zmiany czynności ALAD w wątrobie i nerce nie były duże. Na podstawie danych przytoczonych w tablicach można sądzić, że zmiany te, szczególnie w odniesieniu do wątroby, nie są istotne; w nerce obserwuje się zmniejszenie aktywności, ale również niewiele wykraczające poza 95% przedział ufności.

Trzecim z kolei faktem jest zależność czynności ALAD w śledzionie i szpiku kostnym od dawki promieniowania. Wystąpił wzrost przy małych dawkach, zmniejszenie przy większych i wzrost w okresie regeneracyjnym choroby popromiennej.

Ten ostatni fakt jest pod pewnym względem zgodny z wynikami badań Richmonda i współautorów [6] nad totalną biosyntezą hemu i globiny w homogenatach szpiku kostnego, pobranego w różnych odstępach czasu u napromienianych zwierząt (królików). Autorzy ci obserwowali duży wzrost tworzenia się hemu mierzony inkorporacją ^{14}C glicyny bezpośrednio po napromienieniu zwierzęcia, następnie zmniejszenie, z kolei w okresie 3—4 tygodni od momentu ekspozycji zwiększenie i powrót do wartości normalnych.

Zaburzenia totalnej biosyntezy hemu w narządach krwiotwórczych pod działaniem promieniowania jonizującego mogą zatem być spowodowane, jak wynika z naszych badań, zaburzeniami enzymatycznej konwersji kwasu δ -aminolewulinowego do porfobilinogenu. W wątrobie lub nerce nie obserwuje się ani takich wyraźnych zmian, ani tego charakteru zmian. Fakt ten jest trudny do zinterpretowania. Możliwość istnienia enzymów o różnej czułości na promieniowanie w zależności od badanego narządu, wydaje się mało prawdopodobna. Bardziej przekonujące mogłyby być przypuszczenie, że w narządach tych w środowisku komórkowym istnieją aktywatory lub inhibitory tego enzymu o specyficznej wrażliwości na promieniowanie jonizujące. Pewne znaczenie może mieć również fakt, że biosynteza hemów wchodzących w skład innych aniżeli hemoglobina hemoproteidów jest bardziej odporna na działanie promieniowania jonizującego. Obserwacje takie poczynili Bonnichsen i Hevesy [1], badając inkorporację ^{59}Fe do hemów różnych hemoproteidów.

Jeśli drogi tworzenia się różnych hemoproteidów różnią się czułością na promieniowanie jonizujące, to wydaje się, że różnice te nie powinny uwidocznić się w fazie tworzenia porfobilinogenu, który jest wczesnym i — jak się wydaje — wspólnym prekursorem hemu różnych hemoproteidów. Bardziej zrozumiałe byłyby różnice w zachowaniu się dalszych faz biosyntezy różnych hemoproteidów — między innymi inkorporacja żelaza — co było właśnie przedmiotem badań Bonnichsena i Hevesy'ego.

Tak więc dla wytłumaczenia małej czułości na promieniowanie jonizujące ALAD wątroby w porównaniu z ALAD śledziony lub szpiku kostnego nie mamy zadowalającego wyjaśnienia. Zmiany aktywności ALAD w toku choroby popromiennej wskazują, że zjawisko to jest raczej wtórnym skutkiem działania promieniowania, zależnym od ogólnej reakcji ustroju i narządów.

Wiadomo powszechnie, że narządy krwiotwórcze są wrażliwe na działanie promieniowania jonizującego i mają dużą zdolność regeneracji. A zatem wzrost aktywności ALAD w okresie regeneracyjnym w śledzionie i szpiku kostnym wynikać może z ogólnie wzmożonej czynności tych narządów w tym okresie choroby. Trudno jest jednak powiedzieć obecnie, czy ulega wzmożeniu synteza ALAD, czy też powodem wzmożonej aktywności enzymu są procesy zmieniające jej inhibitory lub aktywatory.

Pani Wandzie Trojanowskiej, asystentce technicznej, dziękujemy za wydatną pomoc w wykonywaniu seryjnych analiz.

STRESZCZENIE

Badano aktywność dehydrazy kwasu δ -aminolewulinowego (ALAD) w homogenatach wątroby, nerki, śledziony i szpiku kostnego szczurów napromienianych jednorazowo na całe ciało dawkami 25—1000 r promieni X. Oznaczenia wykonywano w różnych odstępach czasu od momentu ekspozycji (od kilku godzin do 60 dni). W śledzionie i szpiku kostnym dawki niższe od 100 rentgenów powodowały wzrost aktywności ALAD w pierwszych dniach po ekspozycji. Dawki średnie (400 r) powodowały początkowo zmniejszenie, a następnie w okresie regeneracyjnym choroby popromiennej — zwiększenie. Dawki 650 i 1000 r powodowały szybkie zmniejszenie się aktywności ALAD w tych narządach i utrzymanie na tym poziomie praktycznie do śmierci zwierzęcia. Aktywność ALAD w nerce i wątrobie w powyższych warunkach nie ulegała istotnym zmianom. Obserwowano jedynie nieznaczne jej zmniejszenie.

L I T E R A T U R A

- [1] Bonnichsen R., Hevesy G., *Acta Chem. Scand.* 9, 509, 1955.
- [2] Danczewicz A. M., Lipiński B., *Acta Biochim. Polon.* 5, 267, 1958.
- [3] Feinstein R. N., *Radiation Research* 4, 217, 1956.
- [4] Nizet A., Lambert S., Bacq Z. M., *Arch. Internat. Physiol.* 62, 129, 1954.
- [5] Pirie A., w: *Ionizing Radiation and Cell Metabolism*, Ciba Foundation Symposium, I. A. Churchill, 1956, str. 38.
- [6] Richmond I. E., Altman K. J., Salomon K., *J. Biol. Chem.* 190, 817, 1951.

THE EFFECT IN VIVO OF X-IRRADIATION ON δ -AMINOLAEVULIC
ACID DEHYDRASE IN RATS

Summary

The activity of δ -aminolaevulic acid dehydrase (ALAD) was studied in liver, kidney, spleen and bone marrow homogenates of rats exposed to a single whole-body X-irradiation with the doses 25—1000 r. Determinations were made at different intervals of time after exposure (from several hours to 60 days).

With the doses of below 100 r ALAD activity increased during the first few days after exposure. With middle doses (400 r) ALAD activity decreased and then increased again in the regeneration phase of the radiation disease. With the doses of 650 and 1000 roentgens ALAD activity rapidly dropped in these organs and remained on this level till the animal's death. ALAD activity in kidney and liver, under the same conditions of irradiation underwent no essential changes. Only a slight decrease was observed.

Otrzymano 31.5.1958 r.

S. NIEWIAROWSKI i A. CZUPRYNA

NOTATKA W SPRAWIE STANDARYZACJI I JEDNOSTKOWANIA TRANSAMINAZY KWASU SZCZAWIOOCTOWEGO I PIROGRONOWEGO W SUROWICY KRWI

Pracownia Biochemii, I Klinika Chorób Zakaźnych A. M. w Warszawie
Kierownik Kliniki: doc. dr K. Rachoń

Oznaczanie transaminazy kwasu pirogronowego (GPT)¹⁾ i transaminazy kwasu szczawiooctowego (GOT)²⁾ posiada coraz to większe znaczenie w biochemii klinicznej, a zwłaszcza w diagnostyce chorób wątroby i zawału mięśnia sercowego [2, 5, 7]. Najdogodniejsze do zastosowania w pracowni klinicznej są metody kolorymetryczne oznaczania transaminaz, oparte na pracy Tonhazy'ego i współprac. [8].

Podczas transaminacji powstaje kwas pirogronowy lub szczawiooctowy. Ten ostatni ulega dekarboksylacji na pirogronowy po dodaniu cytrynianu aniliny. Ilość utworzonego kwasu pirogronowego, oznaczonego kolorymetrycznie, jest miarą czynności transaminazy. Jednak podane w literaturze przepisy nie uwzględniają sposobu sporządzania krzywej standardowej kwasu pirogronowego.

Jak wynika z podanych poniżej badań, sposób sporządzania krzywej standardowej jest bardzo istotny dla ilościowej oceny uzyskanych wyników.

METODA

Stosowana przez nas metoda opiera się na przepisach podanych w literaturze [3, 7, 8, 9], z uwzględnieniem kilku modyfikacji polegających na wprowadzeniu dodatkowych krzywych standardowych i odczynnika do próbek kontrolnych.

Kwas pirogronowy reaguje z dwunitrofenylohydrazyną, a powstający hydrazon dwunitrofenylowy ekstrahuje się toluenem. Toluen ekstrahuje 93% dwunitrofenylohydrazonu kwasu pirogronowego i 29% dwunitro-

¹⁾ GPT = glutamic-pyruvic transaminase.

²⁾ GOT = glutamic-oxalacetic transaminase.

fenylohydrazonu kwasu α -ketoglutazarowego [4]. Kwas α -ketoglutazarowy reaguje wolniej z dwunitrofenylohydrazyną niż kwas pirogronowy. (Reakcja z kwasem pirogronowym zakończona jest już po 5 min., a z kwasem α -ketoglutazarowym po 20 min.). Przeprowadzając 5-minutową reakcję z dwunitrofenylohydrazyną i stosując ekstrakcję z tolueniem, można częściowo oddzielić hydrazon kwasu pirogronowego od hydrazonu kwasu α -ketoglutazarowego. Dwunitrofenylohydrazon kwasu pirogronowego daje charakterystyczne zabarwienie w środowisku alkalicznym.

Odczynniki

1. Substrat do GOT. Rozpuścić w wodzie 2,66 g kwasu asparaginowego, 2 g K_2HPO_4 , 0,6 g kwasu α -ketoglutazarowego, doprowadzić do pH 7,4 i uzupełnić wodą do 100 ml. Sporządzony substrat można przechowywać w temp. -5° przez kilka tygodni.
2. Substrat do GPT. Rozpuścić w wodzie 1,78 g DL- α -alaniny, 2 g K_2HPO_4 , 0,6 g kwasu α -ketoglutazarowego, doprowadzić do pH 7,4 i uzupełnić do 100 ml wodą. Przechowywać jak substrat do GOT.
3. Odczynnik do próbek kontrolnych. Sporządzić jak substrat do GOT lub GPT, ale bez dodatku aminokwasu.
4. Kwas trójchlorooctowy. 80 g kwasu trójchlorooctowego + woda do 100 ml.
5. Cytrynian aniliny. 10 g kwasu cytrynowego rozpuścić w 10 ml wody. Przed użyciem należy zmieszać 1 objętość kwasu cytrynowego i 1 objętość aniliny.
6. 2,4-dwunitrofenylohydrazyna. 100 mg dwunitrofenylohydrazyny rozpuścić w 20 ml stężonego HCl i dopełnić do 100 ml wodą. Trwałość odczynnika do 1 miesiąca przy przechowywaniu w temp. pokojowej.
7. Toluen.
8. Alkoholowy roztwór KOH. 2,5 g KOH rozpuścić w 100 ml 95% alkoholu etylowego. Chronić przed dostępem CO_2 z powietrza.

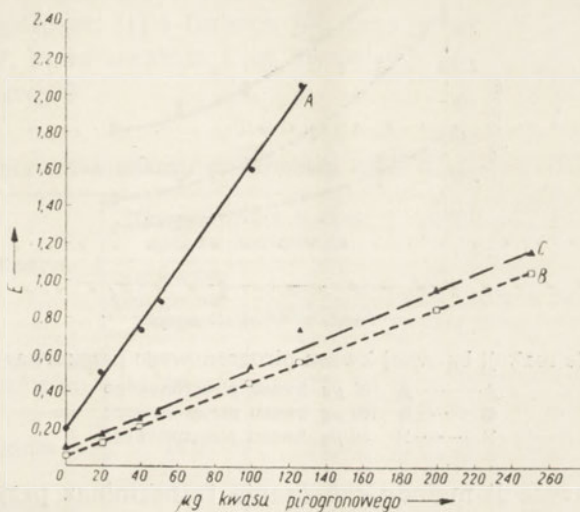
Postępowanie

Do 3 próbek wirowniczych nalać po 0,5 ml surowicy i 0,5 ml wody. Ogrzać na łaźni wodnej do 37° . Do próbki drugiej dodać 0,5 ml substratu do GOT. Do próbki trzeciej 0,5 ml substratu do GPT, inkubować 10 min. w temp. 37° . Następnie do wszystkich próbek dodać po 2 krople kwasu trójchlorooctowego, do próbki pierwszej 0,5 ml odczynnika do próbek kontrolnych, potem dodać po 2 krople cytrynianu aniliny i odstawić na 20 min. (w tym punkcie analizę można przerwać). Dodać 0,5 ml dwunitrofenylohydrazyny, wytrząsnąć, odstawić na 5 minut. Dodać po 2 ml toluenu, silnie wytrząsnąć aż do powstania emulsji. Odwirować. Po-

brać po 1 ml z górnej warstwy toluenowej i przenieść do 3 ml alkoholowego roztworu KOH. Odczytywać w kolorymetrze przy długości fali 500 m μ (dla fotometru Pulfricha — filtr S 50).

Sposób sporządzania krzywej standardowej

Do standaryzacji użyto pirogronianu sodu (BDH). Krzywą standardową sporządzano w sposób trojaki: 1) Do próbek zawierających różne

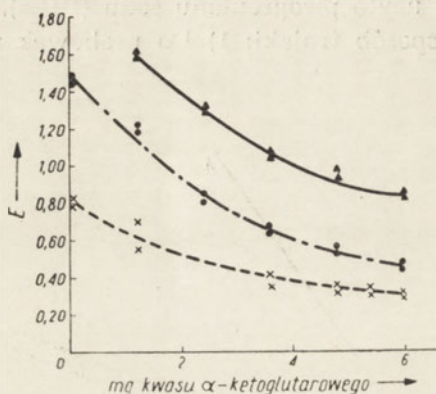


Rys. 1. Zależność między stężeniem kwasu pirogronowego i ekstynkcją (objaśnienia w tekście)

- — ● A kwas pirogronowy + H₂O
- — □ B kwas pirogronowy + 3 mg kwasu α -ketoglutarynowego
- ▲ — ▲ C kwas pirogronowy + malejące ilości kwasu α -ketoglutarynowego

stężenia kwasu pirogronowego, rozpuszczonego w wodzie, dodano dwunitrofenylohydrazyny; dalszy ciąg postępowania był identyczny jak w opisie metody. Otrzymaną zależność między stężeniem kwasu pirogronowego a ekstynkcją (E) — przedstawia krzywa A na rysunku 1. 2) Postępowanie różniło się od podanego poprzednio tym, że dodawano do roztworu pirogronianu sodu po 0,5 ml odczynnika do próbek kontrolnych lub substratu do GOT albo GPT. Następnie wlewano dwunitrofenylohydrazynę i postępowano dalej jak w opisie metody. Krzywa B na rysunku 1 odpowiada temu doświadczeniu. Przekonano się, że na wielkość ekstynkcji wpływa, spośród różnych odczynników, głównie kwas α -ketoglutarynowy. Im wyższe jest jego stężenie, tym uzyskana barwa jest mniej intensywna. 3) Ponieważ w toku reakcji przeaminowania ilość substratu w próbce zmniejsza się, wydawało się nam konieczne sporządzić trzecią krzywą standardową (Rys. 1, krzywa C), która uwzględniałaby stopniowy ubytek

kwasy α -ketoglutarynowego, w miarę przyrostu kwasu pirogronowego. Do probówek, zawierających różne stężenia pirogronianu sodu, dodawano kwas α -ketoglutarynowy w takich ilościach, jakie powinny pozostać w inkubatach w wypadku uwolnienia mierzonej ilości kwasu pirogronowego. Te ilości kwasu α -ketoglutarynowego obliczano zakładając, że powstaniu 1 mola kwasu pirogronowego odpowiada ubytek 1 mola kwasu α -ketoglutarynowego.



Rys. 2. Hamowanie reakcji barwnej kwasu pirogronowego przez kwas α -ketoglutarynowy

▲ ——— ▲ 200 μ g kwasu pirogronowego
 ● — ··· ··· ● 100 μ g kwasu pirogronowego
 × — — — — × 50 μ g kwasu pirogronowego

Przy standaryzacji metody oznaczania transaminaz przyjęliśmy krzywą C jako najbardziej miarodajną. Należy jednak zaznaczyć, że dla celów klinicznych zupełnie wystarczy posługiwać się krzywą B. Np. przy przyrostach kwasu pirogronowego do 40 μ g użycie krzywej B zamiast C jest bez znaczenia. Przy wyższych przyrostach (200—250 μ g kwasu pirogronowego) różnice między odczytami z krzywej B lub C są rzędu 10%. Różnice te byłyby niewątpliwie większe przy użyciu, np. w badaniach kinetycznych — mniejszych stężeń substratu. Krzywa A w żadnym przypadku nie nadaje się do zastosowania, tym bardziej że odczyty przy ekstynkcji powyżej 1,0 są bardzo niedokładne.

Uzyskane wyniki wskazują, że obecność kwasu α -ketoglutarynowego, względnie jego dwunitrofenylohydrazonu, hamuje barwną reakcję, którą daje dwunitrofenylohydrazon kwasu pirogronowego rozpuszczony w toluenie, reakcję, na której opiera się oznaczanie transaminazy. Dodając nadmiar dwunitrofenylohydrazyny nie można zniweczyć działania kwasu α -ketoglutarynowego. Przekonaliśmy się również, że dodatek kwasu α -ketoglutarynowego do toluenu, zawierającego hydrazon pirogronianu, hamuje powstawanie reakcji barwnej w środowisku alkalicznym. Rysunek 2 ilustruje zależność między stężeniem kwasu α -ketoglutarynowego a odczytem barwnym dla kwasu pirogronowego.

Sprawdzenie metody i jednostkowanie

Wyniki oznaczania transaminazy wyrażaliśmy w μg kwasu pirogronowego i w jednostkach wg Umbreita i współprac. [9]. 1 jednostka transaminazy uwalnia $0,475 \mu\text{g}$ kwasu pirogronowego w ciągu 10 min. w temp. 37° , w przeliczeniu na 1 ml surowicy. Przeliczenie to opiera się na porównaniu wyników uzyskanych metodą kolorymetryczną z jednostkami Karmena [6], które wprowadzono na podstawie pomiarów spektrofotometrycznych w nadfiolecie. Należy jednak zaznaczyć, że inni autorzy, np. Cabaud i współprac. [1] i Dubach [3], przyjmują za jednostkę taką ilość transaminazy, która uwalnia $1 \mu\text{g}$ kwasu pirogronowego w ciągu 20 min. w temperaturze 26° .

Tablica 1

Poziom transaminazy w surowicy krwi u zdrowych osobników

Enzym	Transaminaza kwasu szczawiooctowego		Transaminaza kwasu pirogronowego	
	μg kwasu pirogronowego	Jedn. wg Umbreita	μg kwasu pirogronowego	Jedn. wg Umbreita
Liczba osobników (n)	35	35	30	30
Średnia	16,5	34,8	20,5	43
Standardowe odchylenie	$\pm 9,0$	$\pm 19,3$	$\pm 9,1$	$\pm 19,7$
Średni błąd arytmetyczny	$\pm 3,4$	$\pm 7,2$	$\pm 3,7$	$\pm 7,8$

Aktywność transaminazy kwasu szczawiooctowego w surowicy krwi przebadaliśmy u 35 zdrowych osobników, a transaminazy kwasu pirogronowego u 30 osobników. Wyniki przedstawia tablica 1. Widzimy, że czynność transaminazy kwasu pirogronowego i kwasu szczawiooctowego u badanych przez nas osobników była tego samego rzędu. Jako patologiczne można uważać wyniki przekraczające $40 \mu\text{g}$ kwasu pirogronowego lub 80 jednostek wg Umbreita. Normy uzyskane przez nas i obliczone wg Umbreita są nieco większe od norm podanych w literaturze. Według zestawienia Chinsky'ego i Sherry'ego poziom transaminazy w surowicy krwi zdrowych osobników waha się od 5 do 40 jednostek, zaś średnie wartości wynoszą od 20 do 25 jedn. Karmena [6]. Celem uzyskania wartości odpowiadających jednostkom Karmena proponujemy, aby przyjąć za jednostkę transaminazy taką ilość enzymu, która uwalnia $1 \mu\text{g}$ kwasu pirogronowego w temp. 37° w ciągu 10 min. w warunkach powyższej metody.

Dodając kwas pirogronowy do próbek, w których poprzednio przeprowadzono reakcję transaminacji, wykazano, że można go odnaleźć z dokładnością 92% (Tabl. 2).

T a b l i c a 2

Odnalezienie kwasu pirogronowego dodanego do próbki, w której uprzednio przeprowadzono reakcję transaminacji. Przyrost kwasu pirogronowego przy transaminacji 16,5 μg .

Ilość kwasu pirogronowego		% odnalezienia
dodanego (μg)	odnalezionego (μg)	
12,5	10,5	84
25,0	22,5	90
50,0	48,0	96
75,0	74,0	98
100,0	92,0	92
Średnio: 92		

Podany przez nas sposób standaryzacji uniezależnia uzyskiwane wyniki od stężenia kwasu α -ketoglutazarowego i tym samym umożliwia ilościowe oznaczanie transaminazy oraz badanie kinetyki działania tego enzymu metodą kolorymetryczną.

STRESZCZENIE

Stwierdzono, że w kolorymetrycznej metodzie oznaczania transaminaz wg Umbreita obecność w próbce kwasu α -ketoglutazarowego (względnie jego dwunitrofenylohydrazonu) hamuje barwną reakcję dwunitrofenylohydrazonu kwasu pirogronowego rozpuszczonego w toluenie, po dodaniu alkoholowego roztworu KOH. Przy sporządzaniu krzywej standardowej kwasu pirogronowego dla jednostkowania transaminazy należy uwzględnić stężenie kwasu α -ketoglutazarowego w badanych próbkach i zmiany jego stężenia zachodzące w czasie transaminacji.

Jako jednostkę transaminazy przyjęto taką ilość enzymu, która powoduje przyrost 1 μg kwasu pirogronowego w ciągu 10 minut w temperaturze 37° w warunkach metody. Obliczone normy u 35 zdrowych osób są zgodne z przyjętymi w literaturze, mianowicie: średni poziom w surowicy GPT wynosi 20,5 j/ml \pm 9,5, GOT 16,5 j/ml \pm 9,0.

L I T E R A T U R A

- [1] Cabaud P., Leeper R., Wróblewski F., *Amer. Journ. Clin. Patholog.* 26, 1101, 1956.
- [2] Chinsky M., Sherry S., *Arch. of Internal. Medicine* 99, 556, 1957.
- [3] Dubach V. C., *Schweiz, Mediz. Wochschr.* 87, 185, 1957.
- [4] Friedeman E., Haugen G. E., *J. Biol. Chem.* 147, 415, 1943.
- [5] Gibiński K., Kokot F., *Pol. Tyg. Lek.* 12, 1841, 1957.
- [6] Karmen A., Wróblewski F., La Due J. S., *J. Clin. Invest.* 34, 126, 1955.
- [7] De Ritis F., Coltorti M., Giusti G., *Annali della Sanita Publica* 18, 637, 1957.
- [8] Tonhazy N. E., White N. G., Umbreit W. W., *Arch. Biochem. Biophys.* 28, 36, 1950.
- [9] Umbreit W. W., Kingsley G. R., Schaffert R. R., Siple H., *J. Lab. Clin. Med.* 49, 455, 1957.

NOTE ON THE STANDARIZATION AND CALIBRATION OF SERUM
GLUTAMIC-OXALACETIC AND GLUTAMIC-PYRUVIC TRANSAMINASE

S u m m a r y

In colorimetric determination of transaminases (after Umbreit), α -ketoglutaric acid (or its dinitrophenylhydrazone) was found to interfere with the colour reaction between a toluene extract of pyruvic dinitrophenylhydrazone and a KOH in alcohol solution. In preparing the pyruvic acid standard curve for calibrating transaminases, allowance must be made for the concentration of the α -ketoglutaric acid in the samples involved as well as for concentration changes attending transamination.

The unit of transaminase activity was defined as that amount of the enzyme which affords an increment of 1 μ g. of pyruvic acid over 10 minutes at a temperature of 37°, in the conditions of the method. Average values calculated from the serum of 35 healthy subjects agreed with literature and were as follows: glutamic-pyruvic transaminase 20,5 u./ml \pm 9.5; glutamic-oxalacetic transaminase 16.5 u./ml. \pm 9.0.

Otrzymano 14.6.1958 r.

APPENDIX

1. The first part of the report deals with the general situation in the country at the time of the conference. It points out that the country was in a state of economic depression and that the people were suffering from unemployment and poverty. It also mentions that the government was facing a serious budget deficit and that the people were demanding reform.

2. The second part of the report deals with the work of the conference. It describes the various sessions and the papers presented. It also mentions the names of the speakers and the topics they discussed. The conference was held in a large hall and was attended by a large number of people. The papers were read and discussed in a series of sessions. The speakers were given the opportunity to answer questions and to engage in a discussion with the audience.

3. The third part of the report deals with the conclusions of the conference. It points out that the conference was a success and that it was a valuable contribution to the history of the United States. It also mentions that the conference was a model for future conferences and that it was a good example of how to conduct a conference. The conference was held in a large hall and was attended by a large number of people. The papers were read and discussed in a series of sessions. The speakers were given the opportunity to answer questions and to engage in a discussion with the audience.

CONFERENCE ON THE HISTORY OF THE UNITED STATES
 REPORT OF THE CONFERENCE

The conference was held in a large hall and was attended by a large number of people. The papers were read and discussed in a series of sessions. The speakers were given the opportunity to answer questions and to engage in a discussion with the audience. The conference was a success and it was a valuable contribution to the history of the United States. It was a model for future conferences and it was a good example of how to conduct a conference.

The conference was held in a large hall and was attended by a large number of people. The papers were read and discussed in a series of sessions. The speakers were given the opportunity to answer questions and to engage in a discussion with the audience. The conference was a success and it was a valuable contribution to the history of the United States. It was a model for future conferences and it was a good example of how to conduct a conference.

The conference was held in a large hall and was attended by a large number of people. The papers were read and discussed in a series of sessions. The speakers were given the opportunity to answer questions and to engage in a discussion with the audience. The conference was a success and it was a valuable contribution to the history of the United States. It was a model for future conferences and it was a good example of how to conduct a conference.

CONFERENCE ON THE HISTORY OF THE UNITED STATES

P. MASŁOWSKI, H. MASŁOWSKA i W. MINAKOWSKI

ZMODYFIKOWANA METODA ANALIZY RETENCYJNEJ AMINOKWASÓW

*Zakład Biochemii W. S. R. w Olsztynie-Kortowo
Kierownik: z-ca prof. dr Wacław Minakowski*

Wprowadzona przez Wielanda i Fischera [4] metoda analizy retencyjnej aminokwasów polega na tym, że pasek bibuły chromatograficznej z aminokwasami rozdzielonymi techniką jednokierunkową umieszcza się po wysuszeniu do roztworu retencyjnego (0,1% roztwór octanu miedziowego w 10% wodnym roztworze tetrahydrofuranu). Roztwór ten przenika do bibuły i wędruje pionowo w górę. Znajdujące się na bibule aminokwasy reagują z jonami Cu^{2+} i na skutek tworzenia się kompleksów miedziowych przesuwanie się roztworu zostaje zatrzymane. Ponieważ z obu stron aminokwasów roztwór może swobodnie wędrować, tworzą się wnęki, których rozmiary są proporcjonalne do stężeń poszczególnych aminokwasów.

Metoda ta, której zasady i praktyczne zastosowanie podane są w wielu pracach [4, 5, 6, 7, 8], mimo łatwości stosowania jej w zwykłych warunkach laboratoryjnych, okazała się w praktyce mało dokładna. Badania nasze wykazały, że główny błąd tej metody tkwi w tym, że kompleksy miedziowe aminokwasów rozpuszczają się częściowo w tetrahydrofuranie, w związku z czym wnęki retencyjne, szczególnie szybko wędrujących aminokwasów, są rozmyte, kontury tych wnęk postrzępione, a front Cu^{2+} — pofalowany, co uniemożliwia przeprowadzenie dokładnego pomiaru powierzchni wnęk. Zastosowanie zamiast tetrahydrofuranu — dioksanu, według Dose i Caputo [1], pozwala, jak stwierdziliśmy, na uzyskanie znacznie lepszych wyników. Celem pracy było przebadanie wszystkich warunków umożliwiających otrzymanie jak najdokładniejszych wyników analizy. Okazało się, że stosowanie samego dioksanu jako rozpuszczalnika nie dawało zadowolających wyników. Lepsze wyniki uzyskiwano po zastosowaniu mieszaniny dioksanu, wody i kwasu octowego. Stwierdzono przy tym, że gdy ilość wody była zbyt mała, rozpuszczalnik i jony miedziowe rozdzielały się na bibule, wskutek czego front miedziowy był bardzo

pofałdowany. Przy nadmiarze wody czoło Cu^{2+} pozostawało daleko za czołem rozpuszczalnika. To samo zjawisko zachodziło, gdy do analizy retencyjnej używano bibuły zbyt wilgotnej.

Badania nasze wykazały, że najlepsze wyniki uzyskuje się, jeśli zawartość wody w roztworze retencyjnym wynosi 1—2%, a zawartość kwasu octowego od 0,6 do 0,9%, ponieważ przy wyższej zawartości kwasu wneki retencyjne tworzą się za wysoko, co wpływa ujemnie na dokładność oznaczeń ilościowych. Dużą rolę odgrywa również nasycenie bibuły. Okazało się bowiem, że w całkowicie suchej bibule analiza retencyjna nie zachodzi. Natomiast dobre wyniki dało „kondycjonowanie“ retencjogramów w ciągu 5 minut w parach buforu pirydynowego (pH 6,5).

Stwierdzono poza tym, że forma i kształt wnek retencyjnych zależna jest od rozdziału aminokwasów na chromatogramie. Aminokwasy wędrujące dalej od linii startu posiadały wneki szerokie, lecz płytkie, natomiast wolno wędrujące — głębokie i ostre. Planimetryczny pomiar powierzchni tych wnek nie dawał zadowalających wyników, gdyż wielkość tych powierzchni nie jest wprost proporcjonalna do stężenia aminokwasów. Celem oznaczenia ilościowego należało krzywe tych wnek przedstawić graficznie [6]. Odnosi się to głównie do aminokwasów o małych wartościach R_F , gdzie wytworzone kompleksy miedziowe nie odpowiadają rzeczywistemu stężeniu aminokwasów. Przypuszczalnie cząsteczki tych aminokwasów, z powodu krótkiego odcinka wędrówki, leżą zbyt blisko siebie i dlatego liczba wędrujących jonów Cu^{2+} nie wystarcza do reakcji.

Błędów tych możemy uniknąć eluując rozdzielone aminokwasy, a następnie nanosząc eluaty na bibułę chromatograficzną równolegle z aminokwasami o znanych stężeniach, co pozwala na bezpośrednie planimetryczne oznaczanie powierzchni wnek retencyjnych.

Opracowano sposób oczyszczania dioksanu oraz bibuły chromatograficznej. Stosowanie bowiem dioksanu, znajdującego się w handlu, wpływa ujemnie zarówno na wartości wyników, jak też i na ich powtarzalność.

Bibuła chromatograficzna zawiera często jony metali, głównie Fe^{3+} , które wiążą się z aminokwasami, w wyniku czego wielkość wnek retencyjnych nie odpowiada rzeczywistemu stężeniu aminokwasów. Stosowano płukanie bibuły kwasem octowym, kwasem winowym i 8-oksychinoliną. Ten ostatni związek okazał się najlepszy ze względu na łatwość tworzenia kompleksów.

CZĘŚĆ DOSWIADCZALNA

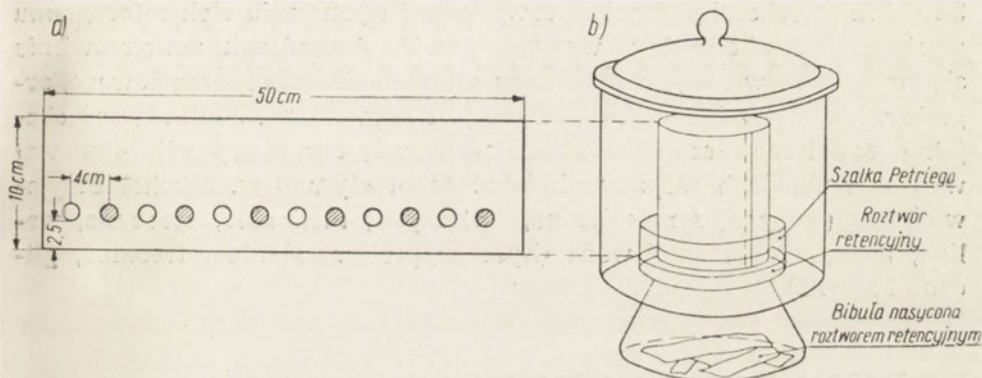
Odczynniki p. a. f-my „Merck“: 1. Dioksan, 2. Kwas octowy lodowaty, 3. Kwas winowy, 4. 8-oksychinolina; 5. Wodorotlenek potasu, 6. Kwas rubeanowodorowy.

Bufory: 100 ml pirydyny, 10 ml kwasu octowego lodowatego, 890 ml wody; pH 6,5.

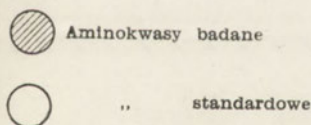
Rozpuszczalniki: 1. Ester etylowy kwasu octowego-II-rz. alkohol butylowy-woda (14 : 12 : 4); 2. Fenol - woda (80 : 20).

1. *Oczyszczanie dioksanu.* Dioksan znajdujący się w handlu wyklócaro 24 godziny z wodorotlenkiem potasowym. Brązową pozostałość sączono. Przesącz destylowano znad sodu metalicznego. Jednakowy dla wszystkich doświadczeń sposób przygotowania dioksanu zapewniał stale ten sam skład rozpuszczalnika.

2. *Przygotowanie mieszaniny retencyjnej.* Do 100 ml oczyszczonego dioksanu dodawano 1,6 ml wody redestylowanej, a następnie 0,7 ml lodowatego kwasu octowego. Roztwór nasycano jonami miedziowymi w ciągu 24 godzin przez wymieszanie z nadmiarem octanu miedziowego. Nerozpuszczony osad octanu odsączano.



Rys. 1. a) — przygotowanie retencjogramów; b) — komora do analizy retencyjnej



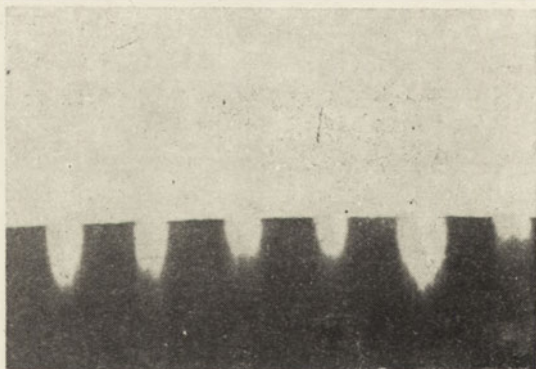
3. *Komora do analizy retencyjnej.* Jako komorę do analizy retencyjnej (Rys. 1b) stosowano eksykator o średnicy 50 cm z dobrze uszczelnioną pokrywą, nasycony parami mieszaniny retencyjnej. Roztwór właściwy, o grubości warstwy cieczy 0,5 cm, umieszczano na dnie eksykatora w szalce Petriego o średnicy 30 cm.

4. *Bibuła.* Z przebadanych różnych gatunków bibuły, jak: Whatman nr 1, 2, 3, 4, Macherey Nagel 61, 214, najlepsze wyniki osiągnięto na bibule Schleicher-Schüll 2043b. Z bibuły tej wycinano pasek o wymiarach 50×10 cm, który przed użyciem zanurzano do naczynia szklanego z roz-

tworem 8-oksychinoliny na przeciąg 10 min. Następnie płukano dokładnie w metanolu i suszono w temperaturze 60°. Po wysuszeniu nasycano go parą wodną, znajdującą się w powietrzu przez zawieszenie w temperaturze pokojowej na przeciąg 10 godzin, a następnie po naniesieniu aminokwasów „kondycjonowano“ przez 5 min w eksykatorze w parach buforu pirydynowego (pH 6,5).

5. *Wywoływacz*. Jako wywoływacz retencjogramów stosowano 0,1% roztwór kwasu rubeanowodorowego w acetonie zawierającym 10% wody [4].

6. *Sposób postępowania*. Badaną mieszaninę aminokwasów w ilości 3×10^{-7} M poszczególnych składników rozwijano elektroforetycznie 90 min. równoległe z próbką kontrolną. Stosowano elektroforezę wysokonapięciową wg metody Masłowskiego [3] w buforze pirydynowym (pH 6,5) przy użyciu prądu stałego o napięciu 40 V/cm długości paska i natężeniu 2 mA/cm szerokości paska. Po rozwinięciu i wysuszeniu elektroforogramu wycinano pasek kontrolny i wywoływano. Po stwierdzeniu umiejscowienia się aminokwasów obojętnych, kwasu glutaminowego, asparaginowego, argininy, histydyny i lizyny, eluowano je i zagęszczano. Aminokwasy obojętne rozwijano techniką jednokierunkowej chromatografii bibułowej w dwóch układach rozpuszczalników: octan etylu-II-rz. alkohol butylowy-woda (leucyna, fenyloalanina, izoleucyna, metionina, tyrozyna, walina, prolina) oraz fenol-woda (hydroksyprolina, alanina, treonina, glicyna i seryna).



Rys. 2. Przykład analizy retencyjnej aminokwasów

Rozdzielone aminokwasy eluowano wodą redestylowaną, zagęszczano do sucha, a suchą pozostałość rozpuszczano w 0,06 ml wody. Z tego pobierano 0,03 ml poszczególnych aminokwasów i nanoszono na pasek retencyjny w odległości 2,5 cm od dolnego brzegu bibuły. Badane aminokwasy nanoszono na przemian ze wzorcowymi o ściśle określonym stężeniu

w odstępach 4 cm (Rys. 1a). Nanoszone plamki suszono w temperaturze pokojowej. Po wysuszeniu bibułę zwijano w kształt cylindra, brzegi spinano klamrami biurowymi i „kondycjonowano“ 5 minut w parach buforu pirydynowego (pH 6,5). Po „kondycjonowaniu“ zanurzano bibułę do roztworu retencyjnego na głębokość 0,5 cm. Po około 20 minutach, gdy roztwór retencyjny znajdował się w odległości 3 cm od górnego brzegu bibuły, retencjogram wyjmowano, suszono w temperaturze pokojowej, a następnie wywoływano przez spryskiwanie 0,1% roztworem kwasu rubeanowodorowego. Powstawały białe wnęki na brunatnozielonym tle (Rys. 2).

Powierzchnie plam retencyjnych aminokwasów badanych i standardowych mierzono planimetrem i z zależności tych powierzchni oraz ze znanego stężenia aminokwasów wzorcowych obliczano stężenie aminokwasów badanych. Wyniki pomiarów podano w tablicy 1.

T a b l i c a 1

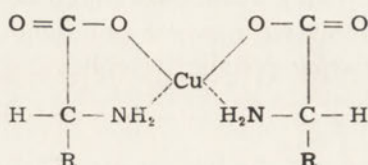
Wyniki analizy retencyjnej mieszaniny 17 aminokwasów

Aminokwasy	Sposób rozwijania	Ilość nanie-sionych amino-kwasów (μg)	Ilość odzyska-nych amino-kwasów (μg)	Błąd		
				bez-względ-ny	względ-ny	względ-ny w %
Kwas asparagino-wy	Elektrofore-tycznie pH 6,5	39,9	40,6	+ 0,7	+ 0,017	+ 1,7
„ glutaminowy	„	44,1	41,6	- 2,5	- 0,056	- 5,0
Arginina	„	63,2	64,3	+ 1,1	+ 0,017	+ 1,7
Histydyna	„	46,5	47,8	+ 1,3	+ 0,028	+ 2,8
Lizyna	„	55,9	52,1	- 3,8	- 0,068	- 6,8
Seryna	Fenol-woda	30,9	28,3	- 2,6	- 0,084	- 8,4
Glicyna	„	22,5	21,2	- 1,3	- 0,057	- 5,7
Treonina	„	35,7	33,9	- 1,8	- 0,050	- 5,0
Alanina	„	26,7	24,8	- 1,9	- 0,071	- 7,1
Oksyprolina	„	36,9	34,8	- 2,1	- 0,057	- 5,7
Metionina	Octan etylu-II-rz. buta-nol-woda	44,7	45,8	+ 1,1	+ 0,024	+ 2,4
Tyrozyna	„	65,2	62,1	- 3,1	- 0,047	- 4,7
Walina	„	35,2	32,7	- 2,5	- 0,070	- 7,0
Leucyna	„	39,3	37,5	- 1,8	- 0,045	- 4,5
Izoleucyna	„	39,3	38,2	- 1,1	- 0,029	- 2,9
Feniloalanina	„	49,5	50,45	+ 0,95	+ 0,019	+ 1,9
Prolina	„	34,0	32,30	- 1,7	- 0,050	- 5,0
				Średnio: - - 3,6		

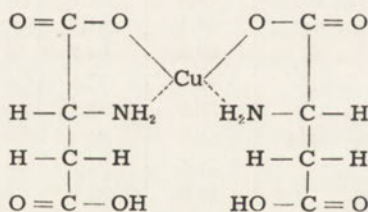
DYSKUSJA

Zmodyfikowana przez nas metoda analizy retencyjnej aminokwasów pozwala w krótkim czasie i za pomocą bardzo prostych i dostępnych środków laboratoryjnych otrzymać zadowalające wyniki. Względny błąd pomiaru waha się, jak wynika z tablicy 1, w granicach + 0,028 do -0,084, zaś średni błąd względny w % wynosi -3,6 i jest on spowodowany głównie stratami w czasie elucji.

Wszystkie badane aminokwasy miały w stosowanym przez nas rozpuszczalniku w stosunku do Cu — wartościowość 1, tzn. 2 cząsteczki jednego aminokwasu wiązały jeden jon Cu^{2+} .



Nie potwierdzono więc znalezionej przez Kobera i Sugiura [2] stosunku dla histydyny w środowisku alkalicznym. $\text{Hist.} - (\text{Cu})_2$. To samo dotyczyło kwasu asparaginowego i glutaminowego, gdzie należałoby przypuszczać, że na dwie cząsteczki tych aminokwasów w grupie karboksylowej zostanie związany jeden dodatkowy jon Cu^{2+} na wytworzenie soli miedziowej. Tymczasem okazało się, że w naszym roztworze retencyjnym nie wytwarza się sól miedziowa, lecz jedynie kompleks miedziowy o wzorze:



STRESZCZENIE

Podano metodę analizy retencyjnej aminokwasów przy zastosowaniu dioksanu jako roztworu retencyjnego.

Rozdzielone elektroforetycznie aminokwasy eluowano, nanoszono na bibułę Schleicher-Schüll 2043b i rozwijano w roztworze retencyjnym: dioksan-woda-kwas octowy lodowaty (100 : 1,6 : 0,7) nasyconym octanem miedziowym. Wnęki retencyjne uwidacziano przez spryskiwanie 0,1% roztworem kwasu rubeanowodorowego w 90% wodnym roztworze acetonu.

L I T E R A T U R A

- [1] Dose K., Caputo A., *Biochem. Z.* **328**, 376, 1956.
- [2] Kober P. A., Sugiura K., *J. Biol. Chem.* **13**, 1, 1952.
- [3] Masłowski P., *Postępy Bioch.* **III**, 335, 1957.
- [4] Wieland Th., Fischer E., *Naturwiss.* **35**, 29, 1948.
- [5] Wieland Th., *Angew. Chemie* **60**, 313, 1948.
- [6] Wieland Th., Wirth L., *Angew. Chem.* **62**, 473, 1950.
- [7] Wieland Th., Wirth L., *Angew. Chem.* **63**, 171, 1951.
- [8] Wieland Th., Feld U., *Angew. Chem.* **63**, 258, 1951.

A MODIFIED METHOD FOR RETENTION ANALYSIS OF AMINOACIDS

S u m m a r y

Aminoacids were separated electrophoretically, eluted, placed on Schleicher-Schüll 2043b paper, and developed with a retention solution of dioxane, water, glacial acetic acid (100 : 1.6 : 0.7) saturated with copper acetate. Retention sinuses were made visible by spraying with 0.1% hydrorubeanic acid in a 90% aqueous solution of acetone.

Otrzymano dnia 17.6.58 r.

W. OSTROWSKI i A. KRAWCZYK

**BIOCHEMIA SAMOŻYWNYCH BAKTERII SIARKOWYCH
V. BIOSYNTeza WITAMINU B_{12} ZNACZONEGO
RÓWNOMIERNIE ^{14}C**

Zakład Chemii Fizjologicznej A. M. w Krakowie
Kierownik: prof. dr B. Skarżyński

Podczas naszych badań nad metabolizmem samożywnych bakterii siarkowych *Thiobacillus thiooxydans* i *Thiobacillus thioparus* [9], [11], [14], [15] stwierdzono, że zwłaszcza ten ostatni szczep zawiera substancję wzrostową dla glonu *Euglena gracilis* [11]. Ponieważ był to dotychczas odosobniony przypadek występowania witaminu B_{12} w ustrojach bezwzględnie samożywnych [3], interesującym było stwierdzić, czy produkowany czynnik przez *Th. thioparus* jest właściwym witaminem B_{12} , czy też tylko jakimś jego analogonem. Z uwagi na to postanowiono czynnik wyosobnić możliwie w czystym stanie i zbadać jego własności.

METODY

Bakterie hodowano na zupełnie nieorganicznym podłożu w warunkach opisanych w jednej z poprzednich naszych prac [9]. Oznaczenia mikrobiologiczne przeprowadzano przy pomocy następujących szczepów glonów lub bakterii: 1) *Euglena gracilis* wg postępowania Rossa [13] zmodyfikowanego przez nas [12]; 2) *Ochromonas malhamensis* wg metody Forda [5]; 3) *Escherichia coli mutant* 113 — 3 metodą opisaną przez Davisa i Mingioli [4] dostosowaną do wykonywania bioautogramów przez Cresseri i Spelę [2].

Rozdział chromatograficzny przeprowadzano na bibule Whatman nr 1 techniką wstępującą, stosując następujące rozpuszczalniki: 1) *n*-butanol nasycony wodą [16]; 2) 0,1 M roztwór sacharozy z dodatkiem 40% obj. izopropanolu [8]; 3) II-rzędowy butanol z dodatkiem 2% obj. kwasu octowego [1].

Rozdział elektroforetyczny przeprowadzano w aparaturze do ciągłej elektroforezy bibułowej skonstruowanej w tutejszym Zakładzie [10], stosując ten sam gatunek bibuły co i w badaniach chromatograficznych.

Preparaty izotopowe użyte w naszych doświadczeniach, tj. ^{14}C -węglan oraz $^{60}\text{Co Cl}_2$, były otrzymane z IBJ w Warszawie. Pomiar radioaktywności przeprowadzano przy pomocy okienkowego licznika G-M o grubości okna 2 mg/cm^2 , produkcji II Zakładu Fizyki AGH w Krakowie i przelicznika binarnego produkcji krajowej.

WYNIKI

W celu określenia stężenia czynnika wzrostowego dla *E. gracilis* w komórkach *Th. thioparus*, bakterie po 3—7 dni wzrostu na stosownej pożywce [9] odwirowywano, oddzielano od siarki i przemywano trzykrotnie wodą. Następnie autoklawowano zawiesinę komórek w wodzie w 110° przez 1 godz., osad odwirowywano i płyn powierzchniowy po odpowiednim rozcieńczeniu brano do oznaczenia mikrobiologicznego. Aktywność czynnika wobec *E. gracilis* i *O. malhamensis* obliczano na 1 g suchej masy bakterii. Kilka seryjnych oznaczeń próbek pobranych z odrębnych hodowli *Th. thioparus* zawiera tablica 1.

Tablica 1

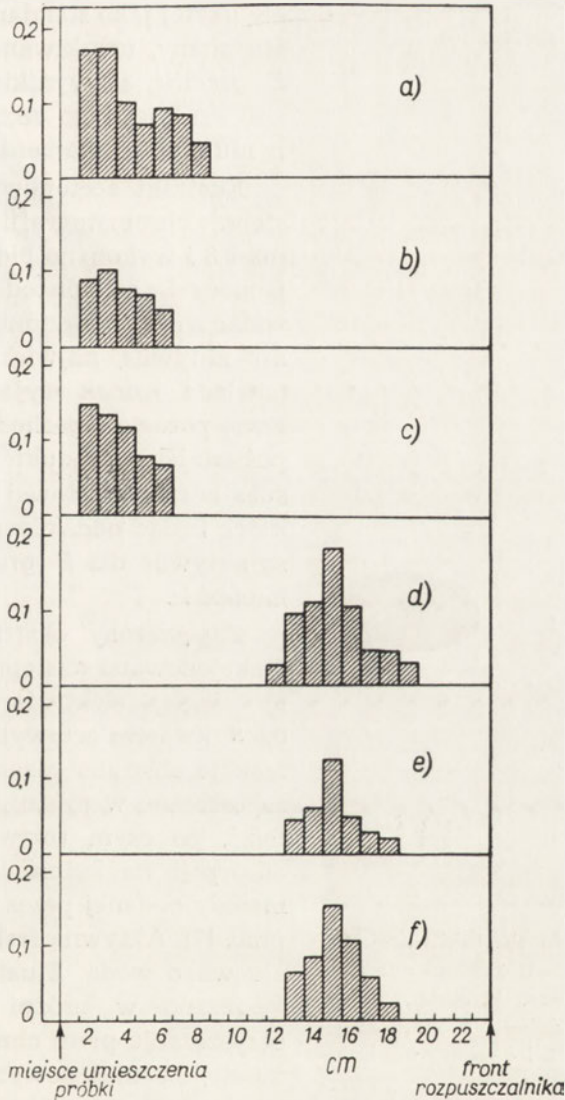
Aktywność czynnika wobec *Euglena gracilis* i *Ochromonas malhamensis* w przeliczeniu na witamin B_{12}

Próbka	<i>E. gracilis</i>	<i>O. malhamensis</i>	Stosunek aktywności E/O
	$\mu\text{g/g}$ suchej masy bakterii		
1	350	80	4,3
2	570	—	—
3	1200	220	5,4
4	140	60	2,3
5	490	—	—
6	180	80	2,2
7	220	90	2,4
średnia	450	107	3,3

Stężenie czynnika w przeliczeniu na witamin B_{12} waha się średnio ok. $450 \mu\text{g/g}$ suchej masy wobec *E. gracilis* i około $100 \mu\text{g/g}$ dla *O. malhamensis*. Stosunek aktywności otrzymanej przy pomocy *Euglena* i *Ochromonas*, czyli E/O, wynosi około 3,3. Różnice w aktywności wobec obu szczepów glonów będą omawiane również w dalszym ciągu tej pracy.

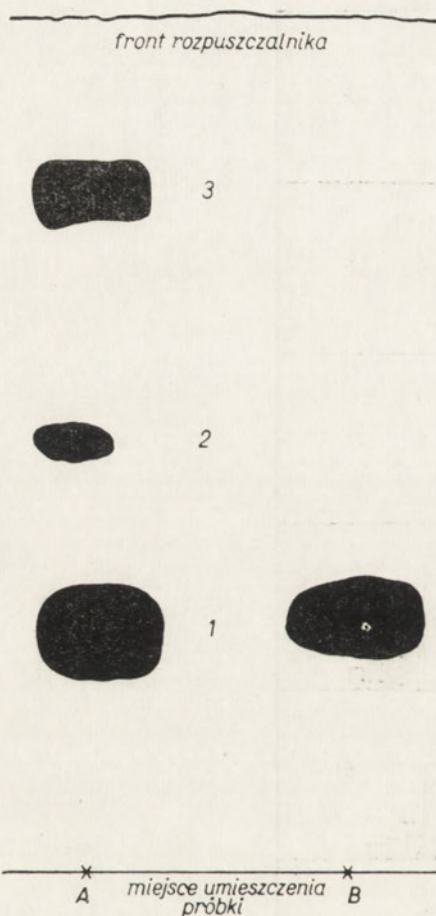
W dalszym postępowaniu komórki *Th. thioparus* ekstrahowano 75% wodnym roztworem acetonu, ogrzewając mieszaninę do wrzenia pod

chłodnicą zwrotną przez 30 min., następnie ekstrakt zagęszczano w próżni i wytrącone substancje tłuszczowe odwirowano. Tak przygotowany ekstrakt poddawano chromatografii bibulowej w rozpuszczalnikach 1 i 2, przy czym aktywne plamy na bibule wykazywano przy pomocy *E. gracilis*



Rys. 1. Schemat chromatograficznego rozdzielania ekstraktu acetonowego komórek *Th. thioparus*. Rozpuszczalniki: a, b, c — *n*-butanol nasyc. wodą; d, e, f — roztwór sacharoza-izopropanol. Aktywność mikrobiologiczną oznaczano przy pomocy *E. gracilis* (a, c, d, f) i *O. malhamensis* (b, c). Standard wit. B₁₂: c i f. Liczby na rzędnej oznaczają ekstynkcję chlorofilu wyekstrahowanego z komórek alg.

i *O. malhamensis* po uprzednim wyeluowaniu aktywnej substancji z poszczególnych odcinków paska. Rys. 1 przedstawia wyniki tego rozdziału. W obu rozpuszczalnikach zastosowanych do rozdziału chromatograficznego i przy pomocy obu szczepów glonów otrzymano tylko jedną smugę odpowiadającą położeniu cyjanokobalaminy



Rys. 2. Bioautogram ekstraktu acetonowego, rozdzielonego uprzednio chromatograficznie w II-rz. butanolu + kw. octowy + woda. A — próbka, B — standard wit. B_{12} ; 2 i 3 — czynniki niezidentyfikowane. Bioautogram wykonano przy pomocy *E. coli*.

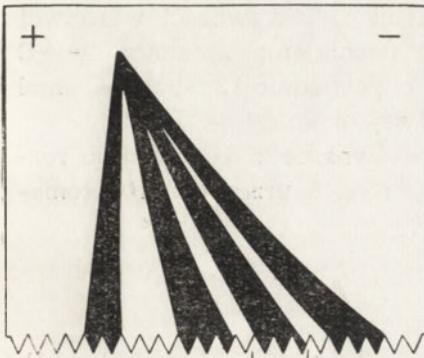
Nieco szersze plamy, uzyskiwane przy pomocy *E. gracilis*, są wynikiem tylko wyższej czułości tego szczepu w porównaniu z *O. malhamensis*.

Ekstrakt acetonowy poddano następnie chromatografii w rozpuszczalniku 3 i wykonano bioautogram przy pomocy *E. coli* metodą agarową. Jak widać z rys. 2, otrzymuje się trzy plamy aktywne, największa plama odpowiada jednak cyjanokobalamini. Dwie pozostałe pochodzą zapewne od pośrednich produktów biosyntezy substancji wzrostowej dla *E. gracilis*, które będąc oddzielone od siebie nie są aktywne dla *E. gracilis* i *O. malhamensis*.

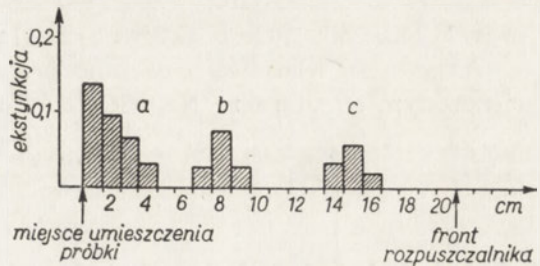
Zagęszczony ekstrakt acetonowy frakcjonowano następnie przy pomocy ciągłej elektroforezy bibułowej 0,5 N kwasem octowym [6]. Aktywne frakcje zbierano razem (por. rys. 3), zagęszczano w próżni do małej objętości, po czym roztwór poddawano adsorpcji na kolumnie z Al_2O_3 wg metody podanej przez Lensa i współprac. [7]. Aktywną frakcję z kolumny eluowano wodą. Eluat ponownie zagęszczano w próżni i poddawano oczyszczaniu przez chromatografię na bibule, stosując powyżej wymienione rozpuszczalniki. Opierając się na wynikach chromatografii i elektroforezy

bibułowej oraz na badaniu aktywności mikrobiologicznej przy pomocy trzech różnych szczepów testowych stwierdzono, iż syntetyzowany czynnik przez *Th. thioparus* jest właściwym witaminem B_{12} .

Witamin B₁₂ w komórkach *Th. thioparus* występuje po większej części związany z białkiem lub polipeptydem. Przez ekstrakcję rozciuru komórek 0,01 M roztworem NaCl i przy pomocy chromatografii bibułowej wykazano co najmniej dwa typy tych połączeń (por. rys. 4). Nie jest to zjawie-



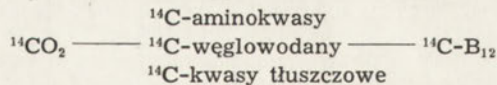
Rys. 3. Rozdział ekstraktu acetonowego przy pomocy ciągłej elektroforezy bibułowej w 0,5 N kw. octowym. Frakcje zawierające substancję wzrostową dla *E. gracilis* objęte są klamrą. Czarne pasma odpowiadają substancjom barwiącym się ninhydriną. Napięcie 350 V, natężenie 3,5 mA.



Rys. 4. Chromatograficzne rozdzielanie połączeń witaminu B₁₂ w roztworze: sacharozazizopropanol, a, b — połączenia, c — wolny witamin. Aktywność mikrobiologiczną oznaczano przy pomocy *E. gracilis*.

sko odosobnione, gdyż witamin B₁₂ występujący w mikroorganizmach i wyższych ustrojach w większości znajduje się w postaci połączeń, które prawdopodobnie są czynnymi formami tegoż witaminu.

Witamin B₁₂ znaczony ¹⁴C i ⁶⁰Co. Jedynym źródłem węgla dla *Th. thioparus* jest nieorganiczny węgiel, wszystkie zatem atomy węgla w cząsteczce B₁₂ muszą pochodzić z tej substancji, poprzez pośrednie produkty chemosyntezy. Jeżeli więc do pożywki doda się ¹⁴C-węglanu, wszystkie atomy węgla w witaminie będą równomiernie nacechowane tym izotopem:

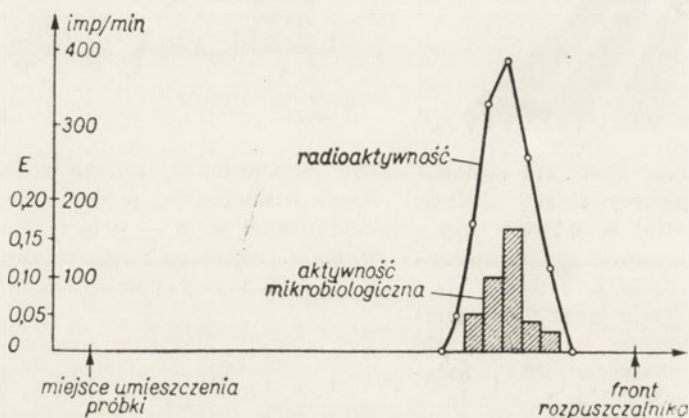


Fakt ten postanowiono wykorzystać do biosyntezy witaminu B₁₂ znaczonego równomiernie ¹⁴C, co dotychczas nie było omawiane w literaturze.

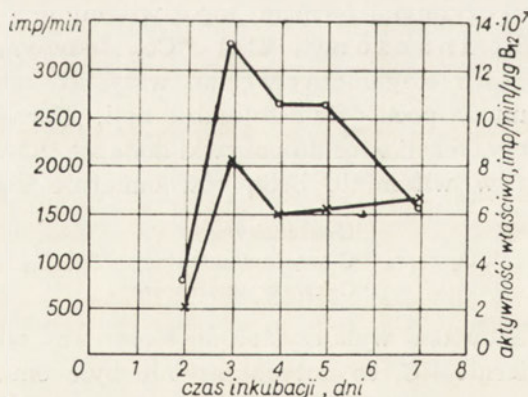
Do 10 l pożywki dodawano około 1,1 mC Na₂¹⁴CO₃ o aktywności właściwej 30 μC/mg, a następnie po 3—4 dniach inkubacji bakterii wyosabniano witamin sposobem podanym w metodach. Przy końcu procesu

oczyszczania, mianowicie do eluatu z kolumny z tlenkiem glinu, dodawano 50 μg krystalicznego B_{12} dla ułatwienia procesu oczyszczania metodą chromatograficzną. Dodając do pożywki oprócz ^{14}C również ^{60}Co o aktywności właściwej około 3 mC/mg otrzymano w analogiczny sposób witamin B_{12} znaczonej równocześnie ^{14}C i ^{60}Co . Otrzymano: 1) witamin B_{12} znaczonej równomiernie ^{14}C w każdej pozycji o aktywności właściwej około 12,5 $\mu\text{C}/\mu\text{mol}$, jeśli nie rozcieńczony nośnikiem; 2) znaczonej ^{14}C i ^{60}Co równocześnie o aktywności właściwej odpowiednio 12,5 i 80 $\mu\text{C}/\mu\text{mol}$ oraz 3) znaczonej ^{60}Co o aktywności właściwej około 80 $\mu\text{C}/\mu\text{mol}$.

Aktywność właściwą oznaczano przez porównanie z odpowiednio rozcieńczonym standardem $\text{Na}_2^{14}\text{CO}_3$ i $^{60}\text{CoCl}_2$. Rys. 5 przedstawia chroma-



Rys. 5. $^{14}\text{C}-B_{12}$ po chromatograficznym rozdzielaniu w roztworze sacharoza-izopropanolu.



Rys. 6. Biosynteza witaminu B_{12} podczas okresu wzrostu komórek *Th. thioparus*. ○—○ aktywność właściwa, +—+ całkowita radioaktywność B_{12} wyosobnionego z komórek w różnym czasie wzrostu hodowli. Bakterie rosły na pożywce zawierającej ^{60}Co .

togram ^{14}C — B_{12} z rozmieszczeniem aktywności mikrobiologicznej oraz radioaktywności na bibule, mierzonej licznikiem G-M. Aktywność mikrobiologiczna oraz radioaktywność płamy pokrywają się zupełnie, co dowodzi czystości otrzymanego preparatu.

Już podczas wstępnych badań nad występowaniem witaminu B_{12} w komórkach *Th. thioparus* stwierdzono, że uzyskuje się różną aktywność wobec *E. gracilis* w różnym okresie wzrostu bakterii. W celu ustalenia optymalnego czasu dla uzyskania najwyższej wydajności biosyntezy witaminu B_{12} , do pożywki dodano $100 \mu C$ $^{60}CoCl_2$ i codziennie pobierano 2-litrowe porcje hodowli, komórki odwirowywano, wyosabniano witamin oraz oznaczano aktywność ogólną i właściwą. Wyniki tego doświadczenia ilustruje rys. 6. Najwyższą aktywność właściwą, jak również najwyższą wydajność B_{12} uzyskuje się w trzecim dniu rozwoju hodowli, co jest związane z charakterem wzrostu komórek *Th. thioparus*.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Jak wiadomo, rośliny nie posiadają zdolności syntezy witaminu B_{12} , nie zawierają go i nie potrzebują do swych procesów metabolicznych. Zwierzęta natomiast zawierają ten czynnik, wymagają go do swych przemian, lecz nie posiadają zdolności syntetyzowania go.

Zdolność biosyntezy witaminu B_{12} przez *Th. thioparus* jest zagadnieniem interesującym z ogólnobiologicznego punktu widzenia, gdyż wynika z tego, iż tylko autotrofy fotosyntetyczne nie syntetyzują i nie wymagają tego czynnika w ich metabolizmie. Synteza witaminu B_{12} w komórkach *Th. thioparus* przebiega od samego początku od najprostszych związków nieorganicznych (dwutlenek węgla, chlorek amonowy, fosforan i chlorek kobaltu) w obecności tiosiarczanu jako źródła energii dla chemosyntezy. Jak można wnosić z danych w literaturze, jest to pierwszy znany fakt biosyntezy witaminu B_{12} (cyjanokobalaminy) przez bezwzględnie samożywny ustrój.

Różnice aktywności ekstraktu acetonowego *Th. thioparus* wobec dwu glonów *E. gracilis* i *O. malhamensis* są najprawdopodobniej wynikiem obecności w ekstrakcie produktów pośrednich biosyntezy, które wystarczają dla wzrostu mniej specyficznego szczepu, jakim jest *E. gracilis*, natomiast nie są aktywne dla *O. malhamensis*, który rośnie tylko wobec cyjanokobalaminy lub hydroksokobalaminy.

Zawartość witaminu B_{12} w komórkach *Th. thioparus* jest stosunkowo niska w porównaniu z zawartością w grzybkach lub bakteriach cudzożywnych syntetyzujących ten witamin. Tym niemniej, są to ilości uchwytne i wystarczające dla wyizolowania cechowanego witaminu.

Otrzymany preparat witaminu B_{12} znaczonego równomiernie ^{14}C i równocześnie ^{60}Co ma szczególną wartość dla badań nad mechanizmem biosyntezy, degradacji cząsteczki witaminu B_{12} oraz jego mechanizmu działania w procesach biologicznych.

STRESZCZENIE

Na podstawie oznaczeń mikrobiologicznych przy pomocy *Euglena gracilis* i *Ochromonas malhamensis* oraz badań chromatograficznych i elektroforetycznych wykazano, iż syntetyzowany czynnik wzrostowy dla *E. gracilis* przez *Thiobacillus thioparus* jest witaminem B_{12} .

Witamin B_{12} jest syntetyzowany przez *Th. thioparus* z nieorganicznych soli, jak węglan, chlorek amonu, fosforan w obecności tiosiarczanu jako źródła energii. Powyższy fakt wykorzystano dla biosyntezy witaminu B_{12} znaczonego równomiernie ^{14}C oraz ^{14}C i ^{60}Co równocześnie.

L I T E R A T U R A

- [1] Armitage J. B., Cannon J. R., Johnson A. W., Parker L. F. J., Lester Smith E., Stafford W. H. and Todd A. R., *J. Chem. Soc.* 3849, 1953.
- [2] Cresseri A. and Spelta A., *Experientia* 13, 47, 1957.
- [3] Darken M. A., *Botan. Rev.* 19, 99, 1953.
- [4] Davis B. D. and Mingoli E. S., *J. Bact.* 60, 17, 1950.
- [5] Ford J. E., *Brit. J. Nutrit.* 7, 299, 1953.
- [6] Holdsworth E. S., *Nature* 171, 148, 1953.
- [7] Lens J., Wijmenga H. G., Wolf R., Karlin R., Winkler K. C. and de Haan P. G., *Biochim. Biophys. Acta* 8, 56, 1952.
- [8] Ostrowski W., *Acta Biochim. Polon.* 2, 297, 1955.
- [9] Ostrowski W. i Krawczyk A., *Acta Biochim. Polon.* 4, 249, 1957.
- [10] Ostrowski W. i Niewiarowska-Pawlus A., *Acta Biochim. Polon.* 3, 171, 1956.
- [11] Ostrowski W., Skarżyński B. i Szczepkowski T. W., *Acta Microbiol. Polon.* 3, 351, 1954.
- [12] Ostrowski W., Skarżyński B. i Żak Z., *Acta Biochim. Polon.* 1, 13, 1954.
- [13] Ross G. I. M., *J. Clin. Pathol.* 5, 250, 1952.
- [14] Skarżyński B., Klimek R. and Szczepkowski T. W., *Bull. Acad. Pol. Sci., Cl. II.*, 4, 299, 1956.
- [15] Szczepkowski T. W. i Skarżyński B., *Acta Microbiol. Polon.* 1, 93, 1952.
- [16] Winsten W. A. and Eigen E., *J. Biol. Chem.* 181, 109, 1949.

THE BIOCHEMISTRY OF AUTOTROPHIC SULPHUR BACTERIA.
V. BIOSYNTHESIS OF VITAMIN B_{12} UNIFORMLY LABELLED WITH ^{14}C

S u m m a r y

Microbiological assays by using *Euglena gracilis* and *Ochromonas malhamensis*, as well as chromatographic and electrophoretic analyses, revealed the growth factor for *Euglena gracilis* synthesized by *Thiobacillus thioparus* to be identical with vitamin B_{12} . The vitamin is synthesized by *Th. thioparus* on medium containing inorganic salts, such as carbonate, ammonium chloride, and phosphate, in the presence of thiosulphate as a source of energy.

Use was made of this fact for the biosynthesis of vitamin B_{12} uniformly labelled with either ^{14}C or ^{14}C and ^{60}Co .

Otrzymano 21.6.1958 r.

Faint, illegible text, likely bleed-through from the reverse side of the page.

I. CHMIELEWSKA, K. BEŁŻECKA, K. RACZYŃSKA-BOJANOWSKA i J. MANICKI

WPŁYW GLIKOZY NA WYKORZYSTANIE PRZEZ ORGANIZM LUDZKI PODANEGO DOŻYLNIE HYDROLIZATU BIAŁKA KRWI BYDŁĘCEJ. II*)

*Zakład Chemii Organicznej Uniwersytetu Warszawskiego
oraz Zakład Chemii Fizjologicznej i II Klinika Chirurgiczna A. M. w Warszawie*

W poprzedniej pracy w badaniu na ludziach zdrowych (18 przypadków), dla których podany dożylnie hydrolizat enzymatyczny białka pełnej krwi bydłęcej bez glikozy lub wzbogacony w glikozę był jedynym źródłem azotu, nie stwierdzono oszczędzającego aminokwasu wpływu glikozy [2]. Badania wykazały, że przeciętna dawka minimalna 8,5 g N-całkowitego (57,4 g aminokwasów i peptydów) na człowieka na dobę i dawka gwarantująca utrzymanie dodatniego bilansu azotowego 10,4 g N-całkowitego na człowieka na dobę (70 g aminokwasów i peptydów) jest taka sama w przypadku podania hydrolizatu bez glikozy, jak i hydrolizatu wzbogaconego w glikozę.

Wzrost ilości wydalonego N-aminowego, oznaczonego metodą miedziową w modyfikacji Albanese'a i Irby, dostosowanej do analizy moczu [1], był jednak trzykrotnie większy w przypadku podania hydrolizatu z glikozą w porównaniu z ilością wydaloną po dodaniu hydrolizatu bez glikozy. W stosunku do ilości wprowadzonej w hydrolizacie wzrost ten wynosił po podaniu hydrolizatu z glikozą od 10,8% do 17,9% (średnio 15,4%), po podaniu hydrolizatu bez glikozy — od 2,1% do 6,8% (średnio 4,9%) [2].

Wyniki te nasunęły przypuszczenie, że w czasie autoklawowania hydrolizatu z glikozą powstają nieprzyswajalne przez organizm, przy podaniu dożylnym, połączenia glikozy z grupą lub grupami funkcyjnymi reszt specyficznych aminokwasów. W związku z tym zwrócono przede wszystkim uwagę na możliwość powstawania połączeń glikozy z aminokwasami zasadowymi. Dalsze badania wykazały jednak, że jakkolwiek

*) Praca była częściowo subsydiowana przez Komitet Biochemiczny PAN.

w czasie ogrzewania poszczególnych aminokwasów zwłaszcza zasadowych z glikozą powstają połączenia między tymi związkami, jednak ilość ich wytwarzana w warunkach sterylizacji hydrolizatu nie może być wyłączną przyczyną obserwowanej różnicy w wydalaniu N-aminowego po podaniu hydrolizatu z glikozą i bez glikozy [4].

Wobec tego zajęto się sprawdzeniem, czy wyniki oznaczenia N-aminowego w moczu metodą miedziową w przypadku podania hydrolizatu z glikozą odpowiadają rzeczywiście wartości N-aminowego, czy też są zwiększone obecnością substancji interferujących, których brak w moczu normalnym i w moczu po podaniu hydrolizatu bez glikozy.

W tym celu przeprowadzono równoległe oznaczenia: 1) N-wolnych grup aminowych metodą miedziową i 2) N-aminowego wolnych aminokwasów metodą van Slyke'a i Hamiltona [7] w moczu (względnie w hydrolizacie kwaśnym moczu) ludzi, którzy otrzymali dożylnie: a) hydrolizat bez glikozy, b) hydrolizat z glikozą i c) glikozę. Z różnicy oznaczonego metodą 2) N-aminowego przed i po hydrolizie kwaśnej moczu wyliczono N-aminowy aminokwasów związanych. Oznaczono również metodą Folina [3] zawartość amoniaku w moczu po podaniu hydrolizatu z glikozą.

CHARAKTERYSTYKA STOSOWANYCH HYDROLIZATÓW

Podawane hydrolizaty przygotowane były opracowaną przez nas metodą z białka pełnej krwi bydłowej trawionego mieszaniną enzymów trzustki [5]; zawierały one wszystkie aminokwasy egzogenne w ilości wystarczającej do utrzymania dodatniego bilansu azotowego po dożylnym podaniu 850 ml hydrolizatu dobowo [6]. 1000 ml hydrolizatu (pH 6,73) zawierało: 10,4 g N-całkowitego, 8,2 g N-aminowego całkowitego (po hydrolizie kwaśnej hydrolizatu enzymatycznego), 6,2 g N-wolnych grup aminowych oznaczonych metodą miedziową, 5,5 g N-aminowego wolnych aminokwasów oznaczonych metodą van Slyke'a i Hamiltona, 1,8 g N-aminowego związanego w peptydach.

Hydrolizat z glikozą zawierał ponadto 50 g glikozy w 1000 ml. Ilości N-całkowitego, N-wolnych grup aminowych i N-aminowego wolnych aminokwasów były w nim w granicach błędu identyczne z odpowiednimi wartościami dla hydrolizatu bez glikozy.

OPIS PRZYPADKÓW

Badania kliniczne przeprowadzono na 5 zdrowych mężczyznach w wieku lat 18—23 (przypadki 1—5). W czasie trwania doświadczeń badani otrzymywali doustnie pełnokaloryczną dietę węglowodanowo-tłuszczowo-białkową o zawartości białka około 120 g dziennie. Zastosowanie

Tablica 1

Azot aminowy moczu zdrowych mężczyzn na normalnej diecie oraz po podaniu dożylnym hydrolizatu białkowego, hydrolizatu z glikozą lub glikozy
 Amino-nitrogen in urine of healthy men on normal diet and after intravenous infusion of protein hydrolysate, hydrolysate with glucose or glucose

dni	rodzaj wlewu*) (ml)	mocz (ml)	N-aminowy metodą ninhydrynową aminokwasy			N-aminowy metodą miedziową		N-amoniaku (g)
			wolne	wolne i związane	związane	w moczu	w hydrolizacie moczu	
			(g)	(g)	(g)	(g)	(g)	
Przypadek 1. l. 18								
1	—	1200	0,08	0,22	0,14	0,18	nie oznaczano	nie oznaczano
2	—	1200	0,08	0,22	0,14	0,18	„ „	„ „
3	H 1000	1340	0,23	1,17	0,94	0,34	„ „	„ „
4	H 1000	1600	0,28	1,14	0,83	0,56	„ „	„ „
Przypadek 2. l. 19								
1	—	1400	0,17	0,54	0,37	0,32	nie oznaczano	nie oznaczano
2	—	980	0,16	0,55	0,39	0,31	„ „	„ „
3	H 1000	1580	0,23	1,42	1,23	0,57	„ „	„ „
4	H 1000	1400	0,27	1,46	1,19	0,58	„ „	„ „
Przypadek 3. l. 23								
1	—	1010	0,15	0,33	0,18	0,29	0,32	0,49
2	—	940	0,16	0,34	0,18	0,32	0,35	0,46
3	H+G 1000	1900	0,52	1,30	0,78	2,03	1,38	0,58
4	H+G 1000	1660	0,49	1,26	0,77	1,77	1,34	0,62
Przypadek 4. l. 19								
1	—	1500	0,15	0,29	0,14	0,17	0,29	0,48
2	—	1400	0,16	0,30	0,14	0,20	0,33	0,52
3	H+G 1000	1120	0,40	1,47	1,07	1,80	1,53	0,60
4	H+G 1000	1720	0,44	1,48	1,04	1,90	1,53	0,58

ciąg dalszy tablicy 1

dni	rodzaj wlewu*)	mocz	N-aminowy metodą ninhydrynową aminokwasy			N-aminowy metodą miedziową		N-amoniaku
			wolne	wolne i związane	związane	w moczu	w hydrolizacji mocz	
			(g)	(g)	(g)	(g)	(g)	
Przypadek 5. l. 20								
1	—	1200	0,12	0,22	0,10	0,18	nie oznaczano	nie oznaczano
2	—	1040	0,12	0,23	0,11	0,18	„ „	„ „
3	G 1000	2200	0,18	0,39	0,21	0,21	„ „	„ „
4	G 1000	1300	0,19	0,38	0,19	0,24	„ „	„ „

*) H — hydrolizat bez glikozy
Hydrolysate without glucose

H+G — hydrolizat z glikozą
hydrolysate with glucose

G — glikoza 5% roztwór
glucose 5% solution

diety wysokobiałkowej gwarantowało wyrównanie ewentualnych niedoborów białkowych u badanych ludzi.

Doświadczenia kliniczne rozpoczynano dwoma dniami kontrolnymi, w czasie których stosowana była tylko dieta doustna. W ciągu następnych dwóch dni badani otrzymywali ponadto po 1000 ml badanych roztworów (a), b) lub c)) metodą wlewu kroplowych z szybkością 60—80 kropel na minutę. W przypadkach 1 i 2 podano dożylnie w ciągu dwóch dni po 1000 ml hydrolizatu bez glikozy, w przypadkach 3 i 4 — po 1000 ml hydrolizatu z glikozą, w przypadku 5 — po 1000 ml 5% roztworu glikozy.

W zebranym moczu dobowym po stwierdzeniu nieobecności białka oznaczano: 1) N-wolnych grup aminowych metodą miedziową (przypadki 1—5), 2) N-aminowy wolnych aminokwasów metodą ninhydrynową van Slyke'a i Hamiltona (przypadki 1—5), 3) N-aminowy w hydrolizacji kwaśnym moczu (hydroliza 18 godz., 20% HCl) metodą ninhydrynową (przypadki 1—4), 4) N-aminowy w hydrolizacji kwaśnym moczu (hydroliza 18 godz., 20% HCl) metodą miedziową (przypadki 3 i 4), 5) zawartość amoniaku metodą Folina (przypadki 3 i 4), 6) N-aminowy aminokwasów związanych wyliczono z różnicy N-aminowego wolnych aminokwasów w moczu i w hydrolizacji kwaśnym moczu. Szczegółowe zestawienie wyników podano w tablicy 1.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

W tablicy 2 zestawiono wywołane podaniem hydrolizatu lub hydrolizatu z glikozą ilości wydalonego N-aminowego oznaczone metodą miedziową oraz N-aminowego aminokwasów wolnych i związanych oznaczone metodą ninhydrynową. Wartości te otrzymano przez odjęcie od ilości wydalonej w dni badania ilości danej frakcji wydalonej w dni kontrolne.

T a b l i c a 2

Wydalanie azotu aminowego w moczu zdrowych mężczyzn w wyniku dożylnego podania hydrolizatu białka lub hydrolizatu białka z glikozą

Excretion of amino-nitrogen in urine of healthy men as result of intravenous infusion of protein hydrolysate or protein hydrolysate with glucose

Przypadek	Rodzaj hydrolizatu*)	Wydalony w wyniku podania hydrolizatu:		
		N-aminowy metodą miedziową	N-aminowy wolnych aminokwasów metodą ninhydrynową	N-aminowy aminokwasów związanych
1	H	0,16	0,15	0,80
	H	0,38	0,20	0,72
2	H	0,26	0,07	0,85
	H	0,27	0,11	0,81
3	H + G	1,73	0,37	0,60
	H + G	1,47	0,34	0,59
4	H + G	1,62	0,25	0,93
	H + G	1,72	0,29	0,90

*) oznaczenia jak w tablicy 1.

W porównaniu z wartościami, otrzymanymi przy stosowaniu diety bezbiałkowej [2], przy diecie o dużej zawartości białka ilość N-aminowego, wydalona po podaniu hydrolizatu bez glikozy, nie ulega zmianie, natomiast ilość tej frakcji wydalonej po podaniu hydrolizatu z glikozą wzrasta średnio o 50%.

Ilość N-aminowego wydalonego po podaniu hydrolizatu z glikozą (przypadki 3 i 4) oznaczana metodą miedziową jest średnio 6 razy, a oznaczana metodą ninhydrynową 2,5 razy większa od ilości tych frakcji wydalonych po podaniu hydrolizatu bez glikozy (przypadki 1 i 2).

Ilości wydalonego N-aminowego aminokwasów związanych oznaczane metodą ninhydrynową są tego samego rzędu zarówno w przypadku podania hydrolizatu bez glikozy, jak i z glikozą. Natomiast, jak widać z ta-

blicy 1, wartości N-aminowego oznaczone metodą miedziową w kwaśnym hydrolizacie moczu (po usunięciu amoniaku powstałego w wyniku częściowego rozkładu mocznika) są w przypadku podania hydrolizatu z glikozą mniejsze od wartości oznaczonych bezpośrednio w moczu.

Te sprzeczne ze sobą wyniki oznaczenia N-aminowego metodą miedziową w moczu i w hydrolizacie moczu przypadków 3 i 4 w dniach podania hydrolizatu z glikozą staną się zrozumiałe przy założeniu, że: 1) po podaniu dożylnym hydrolizatu z glikozą znajdują się w moczu składniki oznaczane metodą miedziową łącznie ze związkami zawierającymi wolną grupę aminową, 2) składniki te w czasie kwaśnej hydrolizy moczu ulegają rozkładowi z wytworzeniem związków nie dających się oznaczyć metodą miedziową, nie są zatem aminokwasami ani ich pochodnymi.

Tak więc w czasie hydrolizy kwaśnej moczu wydalonego po podaniu hydrolizatu z glikozą zachodziłyby równocześnie dwie reakcje: rozszczepienie aminokwasów związanych, wywołujące wzrost N-aminowego (co obserwuje się przy oznaczaniu metodą ninhydrynową) i rozkład substancji interferujących w oznaczaniu azotu metodą miedziową, powodujący obniżenie wyników oznaczenia.

Związki interferujące w metodzie miedziowej oznaczania N-aminowego nie występują lub występują w nieznacznej ilości w moczu normalnym oraz w moczu wydalonym po podaniu hydrolizatu bez glikozy, bowiem różnice między ilością N-wolnych grup aminowych i N-aminowego wolnych aminokwasów są nieznaczne (Tabl. 1). Nie występują one również w moczu wydalonym po podaniu dożylnym 5% roztworu glikozy przy równoczesnej diecie o dużej zawartości białka (Tablica 1, przypadek 5). Związki te nie powstają w czasie sterylizacji cieplnej hydrolizatu z glikozą, gdyż wynik oznaczenia N-aminowego metodą miedziową w hydrolizacie z glikozą jest identyczny z wynikiem oznaczenia w hydrolizacie bez glikozy.

Szczegółowe badania nad wpływem jonu amoniowego na ilość N-aminowego oznaczanego metodą miedziową wykazały, że w większym stężeniu może on być czynnikiem interferującym [8]. Oznaczenie amoniaku w moczu wydalonym po podaniu hydrolizatu z glikozą dało jednak ilość znajdującą się w granicach fizjologicznych (Tablica 1, przypadki 3 i 4), nie oznaczaną w warunkach metody miedziowej.

Fakty te nasuwają przypuszczenie, że substancje interferujące w warunkach oznaczania N-wolnych grup aminowych, wydalone w moczu ludzi po podaniu dożylnym hydrolizatu z glikozą, powstają w organizmie ze składników wprowadzonego roztworu, to jest z aminokwasów lub glikozy.

WNIÓSKI

1. Po podaniu dożylnym hydrolizatu białkowego z glikozą zostaje wydalony w moczu składnik (lub składniki) oznaczany metodą miedziową łącznie ze związkami zawierającymi wolną grupę aminową. Składnik ten (składniki) ulega rozkładowi w czasie hydrolizy kwaśnej moczu z wytworzeniem związków nie dających się oznaczać metodą miedziową, nie należy zatem do grupy aminokwasów wolnych ani związanych.

2. Składnik (składniki) interferujący w metodzie miedziowej oznaczania grupy N-aminowych nie występuje lub występuje w nieznacznej ilości w moczu normalnym, w moczu wydalonym po podaniu dożylnym hydrolizatu białkowego bez glikozy, jak również w moczu wydalonym po podaniu dożylnym glikozy przy równoczesnej diecie o dużej zawartości białka.

3. Składnik (składniki) interferujący nie powstaje w czasie sterylizacji cieplnej hydrolizatu z glikozą.

4. Fakty podane w punktach 1—3 nasuwają przypuszczenie, że składnik (składniki) interferujący powstaje w organizmie ludzkim ze składników wprowadzonego dożylnie roztworu, to jest z aminokwasów lub glikozy.

Prof. dr J. Hellerowi, kierownikowi Zakładu Chemii Fizjologicznej A. M. w Warszawie, dziękujemy za dyskusje i uwagi, prof. dr J. Mossakowskiemu, kierownikowi II Kliniki Chirurgicznej A. M. w Warszawie — za zainteresowanie pracą i umożliwienie prowadzenia badań na terenie Kliniki.

L I T E R A T U R A

- [1] Albanese A., Irby V., *J. Biol. Chem.* **153**, 583, 1944.
- [2] Bełżecka K., Chmielewska I., *Acta Biochim. Polon.* **3**, 497, 1956.
- [3] Hallmann L., *Klinische Chemie und Mikroskopie*, Leipzig, 1941, str. 375.
- [4] Jurecka B., Barszcz D., Bergman Z., Bułhak B., Chmielewska I., *Przemysł Chem.* **13**, 343, 1957.
- [5] Patent Polski nr 34858, 1 czerwca 1951.
- [6] Raczyńska-Bojanowska K., Jurecka B., Hennig J., Młodkowska-Iwaszkiewicz M., Pniewska K., Chmielewska I., *Przemysł Chem.* **7**, 371, 1951.
- [7] Van Slyke D., Dillon R., MacFadyen D., Hamilton P., *J. Biol. Chem.* **141**, 627, 1941;
Hamilton P., van Slyke D., *J. Biol. Chem.* **150**, 231, 1943.
- [8] Dane nie opublikowane.

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

Summary

Clinical investigations have been undertaken to elucidate the cause of much greater increase of N_{NH_2} excretion after the intravenous administration of the blood protein hydrolysate enriched with glucose as compared with the excretion following the administration of the same kind of hydrolysate without glucose.

Different N_{NH_2} fractions have been examined as excreted by 5 healthy, young men maintained on full caloric carbohydrate-fat-protein diet, who received intravenously during 2 days: the protein hydrolysate (2 cases), the protein hydrolysate with glucose (2 cases) and glucose solution (1 case). The following N_{NH_2} fractions have been determined: a) N_{NH_2} of free aminoacids by ninhydrin method of van Slyke and Hamilton, b) N_{NH_2} of free amino groups by the copper method as modified by Albanese and Irby, c) N_{NH_2} of bond aminoacids calculated from the difference between N_{NH_2} of free aminoacids before and after the acidic hydrolysis of the urine.

It has been found, that after the intravenous administration of the hydrolysate with glucose some interfering substances are excreted, that are estimated by copper method together with α -amino groups. Urine excreted in control days or after the administration of either the protein hydrolysate without glucose or the glucose solution does not contain the appreciable amounts of these substances.

The unknown "interfering" substances are destroyed during acid hydrolysis. Moreover, they do not arise while the hydrolysate is autoclaved with glucose, proving thus, that they originate in the organism after the administration of the hydrolysate with glucose.

Otrzymano 8.7.1958 r.

JAN J. STANISŁAWSKI

**MODYFIKACJA CHROMATOGRAFICZNEJ METODY
WYKRYWANIA KWASU β -INDOLILOOCTOWEGO
I PRZYSTOSOWANIE JEJ DO OZNACZEŃ W KIEŁKACH
PSZENICY**

*Zakład Fizjologii Roślin Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu
Kierownik: doc. dr M. Michniewicz*

Regulatory wzrostu występują w roślinach w bardzo małych ilościach, rzędu 10^{-8} g, i z tego względu nie można ich oznaczać przy pomocy klasycznych metod chemicznych, których czułość w przypadku kwasu β -indoliloctowego jest rzędu 10^{-6} g [1]. Sam test biologiczny nie daje możliwości jakościowej identyfikacji poszczególnych regulatorów wzrostu.

Badania, które prowadzi Katedra Fizjologii Roślin Uniwersytetu M. Kopernika, nad dynamiką regulatorów wzrostu na tle ontogenetycznego rozwoju roślin, zrodziły konieczność opracowania metody chromatograficznej, pozwalającej, przy zastosowaniu testu barwnego, na wykrywanie, w skali seryjnej, kwasu β -indoliloctowego w kielkach i nasionach pszenic.

Ponieważ metody oznaczania tego kwasu, podawane przez Linskena [5], Linsera [4], Kefforda [3], Jerchela i Müllera [2], dawały w przypadku pszenicy wyniki negatywne albo nie nadawały się w ogóle jako metody do analiz seryjnych, wynikała konieczność opracowania modyfikacji chromatograficznej metody Kefforda, pozwalającej na wykrywanie kwasu β -indoliloctowego w kielkach pszenic. Metoda Kefforda opiera się na rozdziale ekstraktu roślinnego na frakcje kwaśne i obojętne, które są frakcjonowane następnie za pomocą chromatografii kolumnowej. Oznaczanie substancji wzrostowych przeprowadza się metodami chromatograficznymi lub biologicznymi.

SPOSÓB POSTĘPOWANIA I WYNIKI

Materiałem doświadczalnym były kielki pszenicy odmiany Leszczyńska Wczesna. Nasiona pszenicy moczoło w ciągu 24 godzin w temperaturze 18° , sterylizowano 0,1% roztworem $HgCl_2$ i wysiewano w ciemni na wil-

gotnym piasku kwarcowym, utrzymując podczas kiełkowania temperaturę 22°. Po 5 dniach, gdy długość etiolowanych siewek wynosiła 4 cm, ścinano wierzchołki długości 1 cm, których 100 g, po zadaniu 300 ml bezwodnego etanolu, umieszczano w zamrażarce w temperaturze -10° na okres 2 godzin. Po oddzieleniu alkoholu, zamrożony materiał roślinny miądziono, ponownie zalewano alkoholem i macerowano w ciągu 24 godzin na wytrząsarce. Po odsączeniu ekstrakt alkoholowy odparowywano w próżni w temperaturze 45—47° aż do całkowitego usunięcia alkoholu. Pozostałe 50 ml fazy wodnej frakcjonowano przez czterokrotne wytrząsanie równą objętością benzenu, tak aby ostatnia porcja benzenu była całkowicie bezbarwna. Benzen usuwał z wodnego ekstraktu roślinnego substancje, które przeszkadzały w oznaczeniach chromatograficznych.

Kwas β -indoliloctowy ekstrahowano z fazy wodnej za pomocą 100 ml eteru, wolnego od nadtlenu. Ekstrakcję eterem prowadzono w ciągu 24 godzin, a kolejne porcje eteru wynosiły: 50 ml, 25 ml i 25 ml; były zmieniane one co 8 godzin. Połączone ekstrakty eterowe zagęszczano do objętości 50 ml i oznaczano chromatograficznie.

Analizę chromatograficzną prowadzono w obecności roztworu kontrolnego, który zawierał eterowy ekstrakt roślinny oraz 0,001 M roztwór eterowy syntetycznego kwasu β -indoliloctowego. Stosowano technikę wstępującej chromatografii bibułowej, używając bibuły Whatman 1 nie przemywanej i nie kondycjonowanej. Roztwory badane nanoszono na arkusze bibuły o wymiarach 30×21 cm, w odległości 3 cm od brzegu, wprowadzając kolejno obok siebie ekstrakt badany i roztwór kontrolny. Objętość roztworów podawanych na bibułę wynosiła 10 μ l. Wilgotne plamy suszono, bibułę zwijano w kształcie cylindra i umieszczano w krystalizatorze, który wstawiano do komory chromatograficznej.

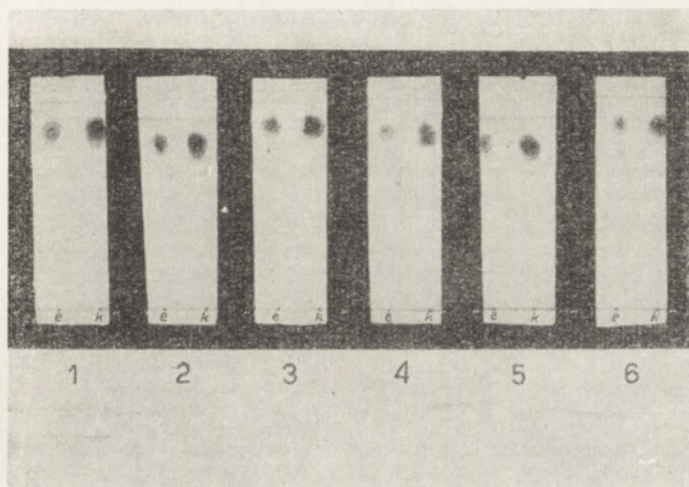
Do rozwijania chromatogramów stosowano układy mieszanin podane przez Linskensa [5]: 1) *n*-butanol, etanol, woda (4 : 1 : 1); 2) a) *n*-butanol, woda (623 : 42), b) kwas propionowy, woda (620 : 790); roztwory a) i b) mieszano ze sobą w stosunku 1 : 1; 3) 70% etanol.

Komory przed włożeniem bibuły nasycono w ciągu 24 godzin parami rozpuszczalnika.

Chromatogramy rozwijano w temperaturze 20—25° w ciągu 5—7 godzin, przy czym faza ruchoma wznosiła się na wysokość 20 cm. Bibułę po wyjęciu z komory suszono w temperaturze pokojowej w ciągu 1 godziny, a następnie cięto na paski w taki sposób, aby na jednym pasku znajdowała się plama ekstraktu i plama kontrolna. Chromatogramy wywoływano na drodze chemicznej przez uzyskiwanie plam barwnych. Barwy widoczne były na paskach po 6 lub 12 godzinnym suszeniu ich w temperaturze pokojowej, przy czym nie stwierdzono różnic zabarwienia dawa-

nych przez substancje badane i kontrolne. Zastosowano 7 różnych układów wywoływaczy, które dawały następujące zabarwienia:

1) FeCl_3 i HClO_4 [3] — ciemnoróżową, 2) NaNO_2 i HClO_4 [3] — malinowoczerwoną, 3) CoCl_2 i HClO_4 [4] — różową, 4) HgCl_2 i HClO_4 [4] — różową, 5) NaNO_2 i HNO_3 [3] — ceglastoczerwoną, 6) NaNO_2 i HCl [6] — jasnoczerwoną oraz 7) $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ i HNO_3 [3] — czerwono-brązową. Intensywne zabarwienie dawały wywoływacze nr 1, 2, 3 i 4, słabe — wywoływacz nr 6; wywoływacze nr 5 i 7 dawały plamy o zmiennej intensywności zabarwienia.



Rys. 1. Identyfikacja kwasu β -indolilooctowego
e — plama roztworu badanego
k — plama roztworu kontrolnego

Chromatogram 1, 2 i 3 wywołany FeCl_3 i HClO_4 , chromatogram 4, 5 i 6 wywołany NaNO_2 i HClO_4 , chromatogram 1 i 4 rozwinięty w układzie *n*-butanol:etanol:woda, chromatogram 2 i 5 rozwinięty w układzie *n*-butanol-woda, kwas propionowy:woda, chromatogram 3 i 6 rozwinięty w 70% etanolu

Identyfikację kwasu β -indolilooctowego przeprowadzono porównując współczynniki R_F plam badanych i kontrolnych. W zależności od stosowanego układu rozpuszczalników uzyskano wartości R_F od 0,84 do 0,86, przy czym w układzie *n*-butanol: etanol: woda wartość $R_F = 0,84$ wynosiła w przeliczeniu na współczynnik R_M [7] — 0,72. Przy użyciu 70% etanolu otrzymano wartość $R_F = 0,85$ i odpowiednio $R_M = -0,75$. W mieszaninie *n*-butanol: woda i kwas propionowy: woda otrzymano $R_F = 0,86$ oraz $R_M = -0,78$. Wartości R_F prób badanych i kontrolnych były identyczne, plamy miały kształt okrągły, nie wykazywały zniekształceń.

Chromatogram (Rys. 1) przedstawia wyniki jednego z przeprowadzonych doświadczeń. Opisana praca została wykonana w ciemni ze względu na wrażliwość kwasu β -indoliloctowego na światło.

STRESZCZENIE

Opisano modyfikację chromatograficznej metody wykrywania kwasu β -indoliloctowego.

Stwierdzono, że frakcjonowanie ekstraktu roślinnego za pomocą benzenu i eteru daje zadowalające rezultaty.

Opisana metoda nie wymaga rozdzielania ekstraktu roślinnego na frakcje kwaśne i obojętne ani wstępnego chromatografowania na kolumnie, dzięki czemu może mieć zastosowanie do seryjnych analiz kwasu β -indoliloctowego w pszenicach.

L I T E R A T U R A

- [1] Audus L. J., *Plant Growth Substances*, Neil and Co. London, 1953.
- [2] Jerchel D., Müller R., *Naturwiss.* **38**, 562, 1951.
- [3] Kefford N. P., *J. Exper. Bot.* **6**, 16, 129, 1955.
- [4] Linser H., Maschek F., *Planta* **41**, 567, 1953.
- [5] Linskens H. F., *Papierchromatographie in der Botanik*, Springer-Verlag, Berlin, 1955.
- [6] Mielnikow N. N., Baskaków J. A., Bokariw K. S., *Chemia Środków Chwastobójczych i Roślinnych Hormonów Wzrostowych*, PWN, Warszawa, 1956.
- [7] Opińska-Blauth J., *Chromatografia*, PWN, Warszawa, 1957.

A MODIFICATION OF THE CHROMATOGRAPHIC METHOD FOR DETECTION β -INDOLYL ACETIC ACID AND ITS APPLICATION TO THE ASSAY IN WHEAT SEEDLINGS

Summary

A modification of the chromatographic method for detection of β -indolyl acetic acid has been described.

It has been stated that fractioning the plant extract by means of benzene and ether gives satisfactory results.

The method just described requires neither the separation of the plant extract into acid and neutral fractions, nor preliminary column chromatography method. Therefore the method may be applied to serial estimations of β -indolyl acetic acid in wheat seedlings.

Otrzymano 12.7.1958 r.

S. ANGIELSKI, R. NIEMIRO, W. MAKAREWICZ i J. ROGULSKI

AMINOACYDURIA WYWOŁANA KWASEM MALEINOWYM

Zakład Chemii Fizjologicznej A. M. w Gdańsku

Kierownik: prof. dr W. Mozołowski

Kwas maleinowy, izomeron znanego metabolitu, jakim jest kwas fumarowy, posiada własności toksyczne. Hamuje on oddychanie skrawków mózgowych [12]; podany rachitycznym szczurom dootrzewnowo wywołuje fosfaturię i aminoacydurię [8], a u psów z kwasicą fosfaturię i uszkodzenie kanalików nerkowych [2]; we krwi szczurów wzmacnia poziom ketokwasów [6]. Fakt wywołania aminoacydurii potwierdzili Durand i współpracownicy; przyczynę tego zjawiska starają się oni objaśnić zaburzeniami gospodarki energetycznej [5].

W dążeniu do zrozumienia mechanizmu działania kwasu maleinowego nie można pominąć tego, że tworzy on połączenia ze związkami o wolnych grupach sulfhydrylowych. Morgan i Friedmann [11] potwierdzili to przypuszczenie izolując połączenia kwasu maleinowego z kwasem tiooctowym, cysteiną i glutationem. Działaniem swym różni się jednak kwas maleinowy od innych tego typu związków, jak na przykład jodooctanu [12].

Zadaniem obecnej pracy jest zbadanie wpływu, jaki wywiera zatrucie kwasem maleinowym na wydalanie w moczu aminokwasów u szczurów żywionych pokarmem o dużej zawartości mleka odtłuszczonego (dieta I podana przez Chorążego [3]).

METODY

Szczury trzymane w klatkach metabolicznych pozwalających na ilościowe zbieranie moczu bez domieszki kału i pokarmu. Mocz do czasu analizy (zwyczajnie w tym samym lub następnym dniu) przechowywano z dodatkiem tymolu w lodówce. Mocz odsalano na kolumnie z żywicą Dowex 50×8 o wysokości 5 cm i średnicy 1 cm. Gdy mocz zatrutych szczurów dawał dodatni odczyn z kwasem sulfosalicylowym, usuwano białko alkoholem etylowym. Azot α -aminowy w moczu odsolonym i nie odsolonym oznaczano metodą Yemmy i Cockinga [13]. Aminokwasy moczu

rozdzielano chromatograficznie na bibule Whatman nr 1 rozwijając trzykrotnie w układzie: butanol : kwas octowy : woda w stosunku objętościowym 60 : 15 : 25, i oznaczano według Meyera [10]. W odróżnieniu od Meyera, który dla wszystkich aminokwasów (z wyjątkiem tyrozyny i fenyloalaniny) używa jednej krzywej wzorcowej, w tej pracy posługiwano się różnymi krzywymi kalibracji dla czterech grup aminokwasowych, mianowicie: a) alaniny, lizyny, waliny i metioniny; b) glicyny, seryny, kwasu glutaminowego, treoniny i argininy; c) leucyny i izoleucyny; d) fenyloalaniny i tyrozyny. Amoniak oznaczano według Conwaya [4], fosforany metodą Gomoriego [7], sól i potas fotometrem płomieniowym firmy Zeiss model III [9].

WYNIKI

Badania przeprowadzono na czterech dorosłych białych szczurach (samicach). Umieszczone oddzielnie pozostawały przez okres około miesiąca na ściśle określonej diecie [3]. Dobowy mocz badano na zawartość azotu α -aminowego, aminokwasów, amoniaku, sodu, potasu i fosforanów. Badania obejmowały dwa okresy: pierwszy przed podaniem maleinianu (17 dni), drugi po podaniu (10 dni). Zobojętniony kwas maleinowy firmy Schuchardt podano dootrzewnowo w jednej porcji, jako jednomolarny roztwór wodny, w ilości 400 mg na 1 kg wagi szczura (w oparciu o dane El Hawary'ego). Zmiany składu moczu szczurów po podaniu maleinianu przedstawiają tablice 1 i 2 oraz wykres na rysunku 1.

Dane tablicy 1 wskazują na to, że zmiany w składzie moczu dotyczą przede wszystkim aminokwasów. Stwierdza się również wzrost ilości moczu, a także w niektórych dniach wydalania sodu, amoniaku i w pewnym stopniu fosforanów; natomiast ilość potasu nie ulega wyraźnym zmianom. Dominującą cechą moczu zatrutych szczurów jest aminoacyduria.

Rysunek 1 przedstawia wydalanie azotu α -aminowego pojedynczych szczurów. We wszystkich przypadkach podanie maleinianu wywołało 20 do 30-krotny wzrost wydalania azotu α -aminowego, maximum wydalania przypada na drugi dzień od podania, a powrót do poziomu normalnego na szósty dzień.

Uwagę zwraca fakt, że stosunek azotu α -aminowego moczu po odsoleniu do azotu α -aminowego moczu przed odsoleniem, który u zwierząt nie zatrutych wynosi około 0,4, znacznie wzrasta po zatruciu zbliżając się do wartości 1,0. Zatem te substancje aminowe, które nie zatrzymują się na kolumnie Dowex 50, a więc nie były przez nas badane, nie wydalają się po zatruciu w zwiększonej ilości; wśród nich w pierwszym rzędzie należy myśleć o taurynie [1]. Po zatruciu suma azotu α -aminowego poszczególnych aminokwasów (kolumna e, Tabl. 1), oznaczonych chromato-

T a b l i c a 1

Wpływ maleinianu na skład moczu szczurów. Podano dootrzewnowo 400 mg maleinianu na 1 kg wagi. Wartości wyrażają w mg średnie dobowego wydalania czterech szczurów. W nawiasach wartości graniczne.

	Ilość moczu ml a	Azot α -aminowy		Sto- sunek c/b d	Suma N- α -ami- nowego amino- kwasów* e	Fosforany f	NH ₃ g	Na ⁺ h	K ⁺ i
		przed odsoleniem b	po odsoleniu c						
Przed podaniem maleinianu (średnio z 17 dni)	9 (8-11)	2,8 (2,4-3,3)	1,1 (1,0-1,2)	0,39	0,47	22,4 (19,5-27)	5,4 (4,6-5,8)	45 (35-58)	167 (133-175)
Po podaniu malei- nianu dzień 1	27 (24-29)	14,7 (8,4-19,6)	14,4 (8,4-19,6)	0,98	13,1	37,5 (32,7-42,5)	6,4 (4,7-8,5)	70 (61-79)	169 (141-230)
2	28 (17-36)	26 (14,5-32,8)	25 (14,5-30,1)	0,96	22,3	26,5 (23,9-31,9)	10,1 (7,0-11,3)	39 (33-54)	146 (107-192)
3	30 (17-37)	20,0 (13,6-23,4)	19,5 (11,9-23,0)	0,98	17,5	28,4 (23,9-34,3)	11,2 (7,1-15,5)	53 (43-60)	188 (148-231)
4	21 (17-28)	9,8 (3,6-16,5)	7,3 (2,9-12,3)	0,75	6,3	29,5 (19,2-35,7)	8,5 (6,9-9,9)	40 (39-60)	189 (141-235)
5	18 (13-28)	6,1 (3,7-10,6)	5,9 (1,9-10,6)	0,97	4,6	31 (22,5-37,2)	8,5 (5,8-9,9)	46 (24-57)	185 (150-220)
6	18 (13-28)	6,0 (4,0-8,7)	3,3 (1,6-4,9)	0,55	2,4	30,2 (24,9-33,7)	7,5 (7,0-8,4)	55 (42-65)	200 (192-220)
7	17 (13-27)	4,4 (3,0-6,2)	2,8 (1,6-4,9)	0,64	0,81	30,2 (23,9-40,1)	7,7 (5,3-9,5)	51 (43-58)	206 (189-225)

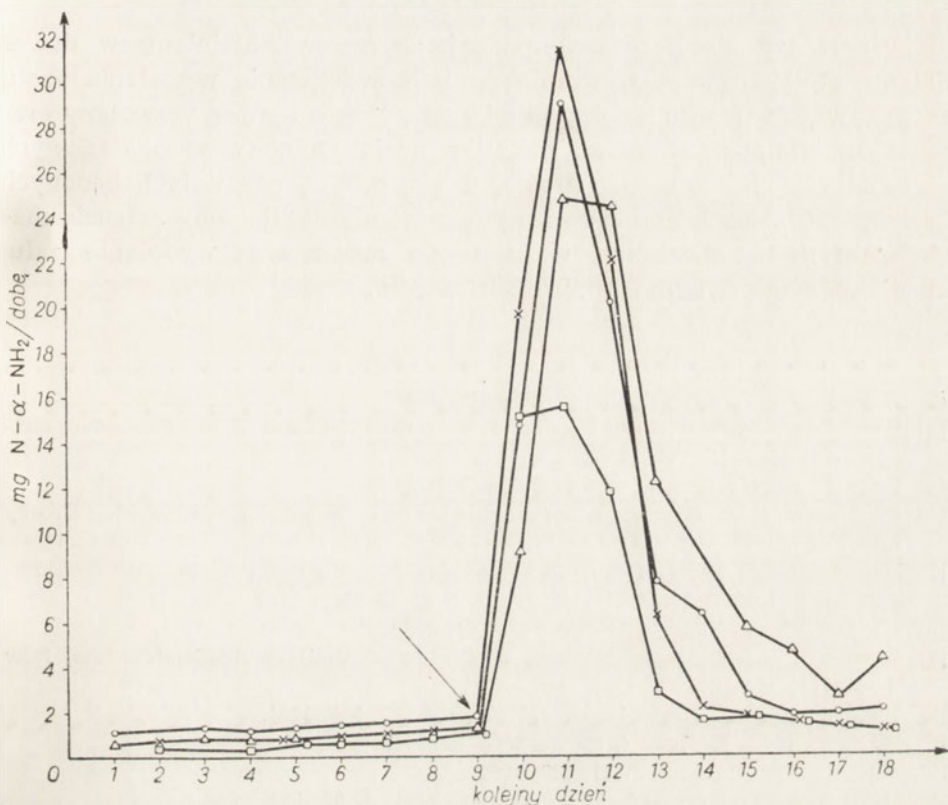
*) Aminokwasy oznaczone chromatograficznie jak podano w tabelicy 2.

T a b l i c a 2

Wpływu maleinianu na skład aminokwasowy moczu szczurów. Podano dootrzewnowo 400 mg maleinianu na 1 kg wagi. Wartości wyrażają w mg azotu α -aminowego średnie dobowe wydalania czterech szczurów. W nawiasach wartości graniczne

	Lizyna Histydyna	Arginina	Glutamina	Kw. aspar. Glicyna Seryna	Kw. glutam. Treonina	Alanina	Tyrozyna	Walina Metionina	Feniloala- nina	Leucyna Izoleucyna	Suma N- α -amino- wego aminokwa- sów
Przed podaniem maleinianu	0,050 (0,03-0,08)	0,030 (0,02-0,05)	0,030 (0,01-0,05)	0,110 (0,05-0,17)	0,100 (0,05-0,20)	0,030 (0,01-0,04)	0,060 (0,03-0,13)	0,015 (0,01-0,03)	0,020 (0,01-0,04)	0,020 (0,01-0,04)	0,470
Po podaniu maleinianu dzień 1	0,66 (0,47-0,82)	0,24 (0,20-0,28)	0,62 (0,34-1,13)	3,37 (2,11-4,56)	5,25 (2,70-7,51)	1,09 (0,52-2,02)	0,67 (0,45-1,12)	0,35 (0,20-0,51)	0,17 (0,10-0,31)	0,66 (0,40-0,850)	13,10
2	1,42 (0,90-2,14)	0,51 (0,28-0,67)	1,48 (0,63-1,98)	5,88 (3,04-8,95)	7,74 (4,91-10,14)	2,37 (0,98-2,75)	0,83 (0,43-1,15)	0,88 (0,44-1,49)	0,34 (0,150-0,58)	1,23 (0,71-2,06)	22,29
3	1,35 (0,46-2,57)	0,40 (0,16-0,44)	1,19 (0,59-1,62)	4,63 (2,14-6,58)	5,25 (3,08-6,50)	1,84 (0,61-2,59)	0,88 (0,53-1,31)	0,57 (0,22-0,75)	0,45 (0,13-0,80)	0,96 (0,42-1,25)	17,5
4	0,28 (0,15-0,38)	0,17 (0,08-0,24)	0,49 (0,12-0,81)	2,05 (0,48-4,00)	2,02 (0,60-3,10)	0,53 (0,10-0,93)	0,22 (0,15-0,44)	0,16 (0,05-0,21)	0,14 (0,03-0,26)	0,31 (0,07-0,43)	6,3
5	0,25 (0,06-0,55)	0,12 (0,04-0,27)	0,43 (0,05-1,29)	1,47 (0,21-4,09)	1,57 (0,24-3,80)	0,56 (0,08-0,98)	0,34	0,04 (0,02-0,07)	0,04 (0,02-0,09)	0,08 (0,04-0,17)	4,6
6	0,16 (0,09-0,28)	0,05 (0,04-0,08)	0,56 (0,09-0,58)	0,73 (0,31-1,51)	0,99 (0,45-1,86)	0,11 (0,05-0,24)		0,02 (0,01-0,04)	0,02 (0,01-0,02)	0,02 (0,02-0,11)	2,4
7	0,09 (0,08-0,09)	0,06 (0,03-0,08)	0,08 (0,08-0,09)	0,50 (0,17-0,25)	0,25 (0,21-0,48)	0,05 (0,03-0,06)		0,02 (0,02-0,02)	0,02 (0,02-0,02)	0,02 (0,02-0,02)	0,81
Stosunek wartości drugiego dnia do wartości przed za- truciem	28	17	50	53	73	79	14	59	17	61	

graficznie, jest równa w granicach błędu całkowitemu azotowi α -aminowemu. Widocznie więc wydalanie tych aminokwasów, których nie oznaczono w tej pracy (cysteina, cystyna, tryptofan), nie wpływa ilościowo na omówione stosunki.



Rys. 1. Azot α -aminowy odsolonego moczu czterech szczurów przed i po podaniu maleinianu. Strzałka oznacza czas dootrzewnowego podania maleinianu w dawce 400 mg na 1 kg wagi

- × — szczur nr 1
- — szczur nr 2
- △ — szczur nr 3
- — szczur nr 4

Wzrost wydalanych aminokwasów z moczem nie jest równomierny. Na podstawie danych tablicy 2 można rozróżnić dwie grupy aminokwasów. Jedne, których wydalanie wzrosło 50 razy lub więcej i drugie, których ilość zwiększyła się 10 do 30 razy. Do pierwszej grupy należą: glutamina, glicyna z seryną, kwas glutaminowy z treoniną, alanina, walina z metioniną, leucyna z izoleucyną; do drugiej grupy — lizyna z histydyną, arginina, tyrozyna i fenyloalanina.

Fakty przedstawione w tym doniesieniu stwarzają podstawę umożliwiającą podjęcie badań dotyczących doświadczalnej aminoacydurii, jako drogi poznania mechanizmu reabsorpcji i wydalania aminokwasów w nerce.

STRESZCZENIE

Jednorazowe dootrzewnowe podanie szczurom maleinianu w dawce 400 mg na 1 kg wagi wywołuje znaczne zwiększenie wydalania azotu α -aminowego w moczu na okres 4 do 7 dni. Wzrost ten jest wywołany prawie wyłącznie przez wolne aminokwasy; udział aminokwasów zasadowych i aromatycznych wydaje się grać mniejszą rolę od pozostałych badanych aminokwasów. Obok aminoacydurii jako dominującej cechy zatrucia maleinianem można stwierdzić wzrost ilości moczu oraz wydalania sodu, amoniaku, a w pewnym stopniu i fosforanów.

L I T E R A T U R A

- [1] Awapara J., *J. Biol. Chem.* **218**, 571, 1956.
- [2] Berliner R. W., Kennedy T. J. and Hilton J. G., *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.* **75**, 791, 1950.
- [3] Chorąży H., *Acta Biochim. Polon.* **3**, 131, 1956.
- [4] Conway E. J., *Microdiffusion Analysis and Volumetric Error*. London Crosby Lockwood, 1947, str. 98.
- [5] Durand P., Bruni R., Manzini W., Semach F., *Minerva Pediatrica* **8**, 1073, 1956.
- [6] El Hawary M. F. S., *Biochem. J.* **61**, 348, 1955.
- [7] Gomori G., *Standard Methods of Clinical Chemistry Academic Press*, New York, 1953, str. 84.
- [8] Harrison H., Harrison H., *Science* **120**, 606, 1954.
- [9] Hilgers A., *Z. Physiol. Chem.* **304**, 193, 1956.
- [10] Meyer H., *Biochem. J.* **67**, 333, 1957.
- [11] Morgan E. J., Friedmann E., *Biochem. J.* **32**, 862, 1938.
- [12] Weil-Malherbe H., *Biochem. J.* **32**, 2257, 1938.
- [13] Yemm E. W., Cocking E. C., *Analyst* **80**, 209, 1955.

AMINOACIDURIA INDUCED BY MALEIC ACID

Summary

Maleinate, given to rats intraperitoneally in a single dosis of 400 mg./kg. of weight induces over a period of 4 to 7 days increased elimination with urine of α -amine nitrogen. This is largely associated with free aminoacids; the part played by basic and aromatic aminoacids appears to be much smaller than that of the remaining aminoacids examined. In addition to aminoaciduria, which is the dominant feature of maleinate poisoning, increased elimination of urine, sodium, ammonia, and, to a degree, phosphates, was noted.

Otrzymano dnia 13.7.58 r.

A. MORAWIECKI

**BADANIA NAD KINAZĄ PIROGRONOWĄ.
WYZNACZENIE MASY CZĄSTECZKOWEJ ENZYMU Z MIĘŚNI
KRÓLIKA****(TYMCZASOWE DONIESIENIE)**

*Dział Biochemii Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu
Kierownik Działu: prof. dr T. Baranowski*

W poprzednich komunikatach zostały podane wyniki badań niektórych własności enzymatycznych [5] i fizykochemicznych [6] kinazy pirogronowej (transfosforylasy fosfopirogronowej) z mięśni królika. Badania te przeprowadzone były na częściowo oczyszczonym materiale. Dalsze prace doprowadziły do otrzymania lepiej oczyszczonego preparatu enzymu, co umożliwiło wyznaczenie masy cząsteczkowej.

PREPARATYKA ENZYMU

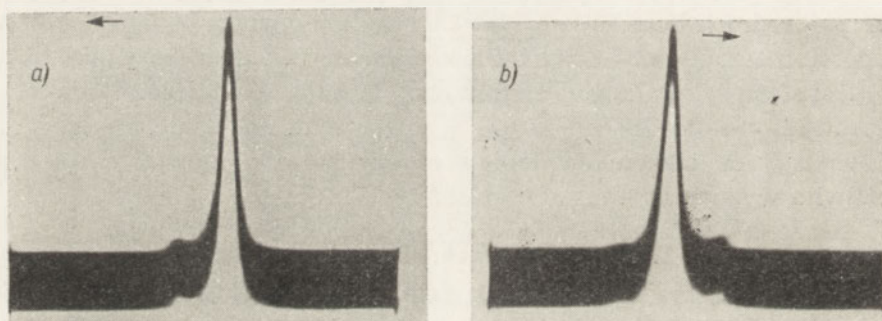
Zmielone mięśnie królika wyciągano równą objętością wody; wyciąg z dodatkiem toluenu pozostawiano przez kilka godzin w temperaturze pokojowej, po czym dializowano przez 12 godz. do wody wodociągowej, a następnie 24 godz. do wody destylowanej w temp. około 5°. Po odsączeniu osadu płyn zadawano 4-krotną objętością oziębionego acetonu w temperaturze nie przekraczającej 5°. Wytrącony osad oddzielano od acetonu przez wyciskanie, przemywano 2-krotnie nowymi porcjami acetonu i suszono przez kilkanaście godzin w temperaturze pokojowej. Tę część preparatyki wykonywano w zasadzie wg Baranowskiego [1].

Aktywność enzymatyczną oznaczano jak poprzednio [5] na podstawie ubytku kwasu enolofosfopirogronowego w reakcji transfosforylacji na ADP. Reakcję prowadzono jednak w pH 8,5, które to pH okazało się optymalne dla aktywności enzymu [6], w moderatorze trójetanoloaminowym [2]. Kwas enolofosfopirogronowy oznaczano jako fosforan odszczepialny podjodynem [4].

Otrzymany proszek acetonowy wyciągano 4-krotną ilością wody i wysalano frakcją białkową w granicach 0,50—0,58 nasycenia siarczanem

amoni w pH 7,0—7,1. Wytrącający się osad wykazywał powstawanie smug przy wstrząsaniu („szliry“), świadczących o tworzeniu się form krystalicznych. Frakcję tę, zawierającą większość aktywności kinazy pirogronowej, ekstrahowano kolejno roztworami siarczanu amonu (pH = 7,1) o stężeniach 0,58, 0,56, 0,54 ... itd. aż do 0,48 nasycenia. Każda ekstrakcja trwała kilka godzin w temperaturze pokojowej. Zawiesina była stale mieszana mechanicznie. Pozostający osad wykazywał znacznie większą aktywność właściwą enzymu.

Dalsze oczyszczenie osiągnięto przez dializę rozpuszczonego w wodzie preparatu do moderatora octanowego o pH 4,8 i sile jonowej 0,1. Dializę prowadzono przez 12 godz. w temp. 2°. Następnie, oddzielano wytrącony osad, a płyn doprowadzano do pH 6,0 i wysalano enzym siarczanem amonu do nasycenia 0,7. Osad wykazywał „szliry“ przy mieszaniu. Postępowanie takie (dializa do moderatora o pH 4,8) pozwala na uzyskanie lepszej wydajności, niż stosowane poprzednio [6] ogrzewanie do 45° w pH 5,5.



Rys. 1. Elektroforeza preparatu kinazy pirogronowej w moderatorze fosforanowym pH = 6,58; $\Gamma/2 = 0,1$. Czas: 90 min. Spadek napięcia: 7,35 v/cm.
← część wstępująca; → część zstępująca.

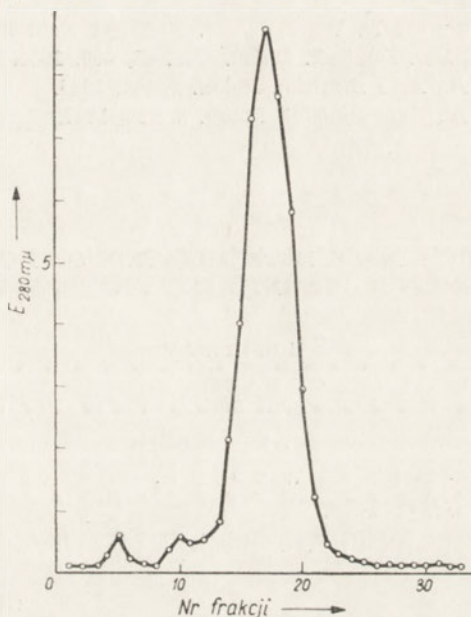
Otrzymany preparat miał czystość około 90%, jak wykazały oznaczenia metodą elektroforetyczną Tiseliusa (Rys. 1). Wykonano na nim oznaczenie punktu izoelektrycznego i powtórzono oznaczenia stałej sedymentacji.

Dalsze oczyszczenie przeprowadzono przy pomocy preparatywnej elektroforezy kolumnowej [3] na sproszkowanej celulozie w moderatorze weronalowym o pH 8,6 i sile jonowej 0,025 (Rys. 2). Główną frakcję otrzymaną z kolumny użyto do pomiarów stałej dyfuzji.

Punkt izoelektryczny kinazy pirogronowej wyznaczano w aparaturze Tiseliusa, na podstawie pomiarów ruchliwości elektroforetycznej w różnych pH. W moderatorze fosforanowym o sile jonowej 0,1 wynosi on 5,98.

OZNACZENIE MASY CZĄSTECZKOWEJ

Przeprowadzone przy pomocy ultrawirówki pomiary stałej sedymentacji przy 40 000 obr. min. ($117\,000 \times g$) w pH 5,98 dały wynik zgodny z uzyskanym poprzednio [6]: $10,6 \times 10^{-13}$ sek.



Rys. 2. Elektroforeza kolumnowa kinazy pirogronowej. Eluat z kolumny po 21-godzinnej elektroforezie. Przyłożone napięcie: 440 v. Objętość frakcji: 2 ml. Na osi rzędnych ekstynkja próbek przy $280\text{ m}\mu$. Frakcje 13—21 rozcieńczano przed oznaczeniem 10-krotnie.

Pomiary stałej dyfuzji przeprowadzono w aparacie elektroforetycznym Tiseliusa w temp. 20° , w moderatorze fosforanowym o pH 5,98 i sile jonowej 0,1. Otrzymano wartość $D_{20} = 4,4 \times 10^{-7}$ cm^2/sek .

Przyjmując objętość właściwą rozpuszczonego enzymu za 0,75 (wartość średnia dla większości białek), obliczono jego masę cząsteczkową na 230 000.

D_0 (stałą dyfuzji dla cząstek kulistych i nie uwodnionych, o tej samej masie) wyliczono na podstawie tych danych na 5,1. Stosunek $D_0/D = f/f_0$ wynosi więc 1,16.

STRESZCZENIE

Na podstawie oznaczeń szybkości sedymentacji i dyfuzji wyznaczono masę cząsteczkową kinazy pirogronowej z mięśni królika na 230 000.

Stała sedymentacji S_{20} wynosi 10,6 S; stała dyfuzji $D_{20} = 4,4 \times 10^{-7}$ cm^2/sek , $f/f_0 = 1,16$. Punkt izoelektryczny tego enzymu w moderatorze fosforanowym wynosi 5,98.

L I T E R A T U R A

- [1] Baranowski T., *Enzymologia* 5, 262, 1938.
[2] Beisenhertz G., Boltze H. J., Bücher Th., Czok R., Garbade K. H., Meyer-Arendt E., Pfeleiderer G., *Z. Naturforsch.* 8b, 555, 1953.
[3] Flodin P., Kupke D. W., *Biochim. Biophys. Acta* 21, 368, 1956.
[4] Kiessling W., *Ber. Deutsch. Chem. Ges.* 68, 597, 1935.
[5] Morawiecki A., *Acta Biochim. Polon.* 2, 107, 1955.
[6] Morawiecki A., *Acta Physiol. Polon.* 8, 468, 1957.

STUDIES ON PYRUVIC KINASE. DETERMINATION OF MOLECULAR WEIGHT OF THE ENZYME OBTAINED FROM RABBIT MUSCLES

S u m m a r y

By determination of the rates of sedimentation and diffusion the molecular weight of pyruvic kinase was found to be 230 000.

Sedimentation constant S_{20} was 10.6 S, diffusion constant D_{20} was 4.4×10^{-7} cm.²/sec., $f/f_0 = 1.16$.

The isoelectric point of the enzyme in a phosphate buffer was 5.98.

Otrzymano 16.8.1958 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 „ μg “, 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 odmienej 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.

Errata do tomu IV (1957)

Strona	wiersz	od góry	od dołu	Jest	Winno być
51	20	od góry		... wzrostu strukturalnego wzoru strukturalnego ...

2. Для подкорковых ядер, с более интенсивным обменом веществ, найдено в пересчете на сухой вес более высокое содержание, чем в коре тиаминa (14,7 $\mu\text{г}$) и пантотеновой кислоты (95,6 $\mu\text{г}$), близкое значение для рибофлавина (10,9 $\mu\text{г}$), но более низкое, чем в коре, содержание никотиновой кислоты (118,5 $\mu\text{г}$).

3. Метаболически менее активное белое вещество обнаруживает в пересчете на 1 г сухой ткани наименьшее содержание тиаминa (5 $\mu\text{г}$), рибофлавина (2,1 $\mu\text{г}$) и никотиновой кислоты (84,5 $\mu\text{г}$). Содержание пантотеновой кислоты в белом веществе не отличается от значений, полученных для коры и составляет 75,5 $\mu\text{г}$ на 1 г сухой ткани.

State of Iowa IV (1907)

Year	Value	Per cent	Total	Per cent
1906	100	100	100	100
1907	100	100	100	100

М. ЗДЫБ-ГУМИНЬСКА И Г. ДРОЖДЖ

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ НЕКОТОРЫХ ВИТАМИНОВ В ЧЕЛОВЕЧЕСКОМ МОЗГУ

Резюме

При помощи микробиологических методов исследовалось содержание тиамин, рибофлавина, ниацина и пантотеновой кислоты в различных участках человеческого мозга, а именно, в сером веществе коры (*gyr. centralis ant.*, *gyr. centralis post.*, *gyr. temporalis sup.*, область *fissura calcarina*), в подкорковых ядрах (*n. caudatus*, *n. lentiformis*, *thalamus*) и в белом веществе (*centrum semiovale*).

1. В мозговой коре найдено в среднем, в пересчете на 1 г сухой ткани: 11,4 $\mu\text{г}$ тиамин, 11,8 $\mu\text{г}$ рибофлавина, 140,9 $\mu\text{г}$ никотиновой кислоты и 82 $\mu\text{г}$ пантотеновой кислоты. Содержание этих витаминов в четырех различных участках правого и левого полушария мозга не обнаруживает статистически значимых различий. Исключение составляет серое вещество затылочной доли с несколько повышенным содержанием рибофлавина (13,6 $\mu\text{г}$) и ниацина (152 $\mu\text{г}$).

2. Для подкорковых ядер, с более интенсивным обменом веществ, найдено в пересчете на сухой вес более высокое содержание, чем в коре тиамин (14,7 $\mu\text{г}$) и пантотеновой кислоты (95,6 $\mu\text{г}$), близкое значение для рибофлавина (10,9 $\mu\text{г}$), но более низкое, чем в коре, содержание никотиновой кислоты (118,5 $\mu\text{г}$).

3. Метаболически менее активное белое вещество обнаруживает в пересчете на 1 г сухой ткани наименьшее содержание тиамин (5 $\mu\text{г}$), рибофлавина (2,1 $\mu\text{г}$) и никотиновой кислоты (84,5 $\mu\text{г}$). Содержание пантотеновой кислоты в белом веществе не отличается от значений, полученных для коры и составляет 75,5 $\mu\text{г}$ на 1 г сухой ткани.

ВЫДЕЛЕНИЕ ПСЕВДОВИТАМИНА B_{12} ИЗ КУЛЬТУР
PROPIONIBACTERIUM SHERMANII

Резюме

Установлено, что штамм пропионовокислых бактерий *Propionibacterium shermanii* синтезирует наряду со значительными количествами витамина B_{12p} (фактора В) и малыми количествами витамина B_{12r} , также следы псевдовитамина B_{12} (аденинцанкобаламина).

Из 30-литровой культуры выделено приблизительно 1 мг псевдовитамина B_{12} в кристаллическом виде.

Е. ГОНСИОР, М. ПЕТРУСЕВИЧ, Г. КОВАЛЬСКА и Я. ОПЕНЬСКА-БЛЯУТХ

ПРИМЕНЕНИЕ СУЛЬФОНИРОВАННОГО УГЛЯ ЭСКАРБО И СИНТЕТИЧЕСКИХ
ИОНООБМЕННЫХ СМОЛ ДЛЯ ОСВОБОЖДЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ
ЖИДКОСТЕЙ ОТ СОЛЕЙ

Резюме

Для удаления солей из мочи и сыворотки применялись различные катиониты: Даувекс-50, СДВ-3, Амберлит IR-100, катионит с ортофосфорными функциональными группами РФ, карбоксильный катионит и сульфонируемый уголь польского производства Эскарбо.

Установлено, что непременным условием получения однородной картины при хроматографии аминокислот является выбор специфических элюентов для каждого из катионитов. Для СДВ-3 и Даувекс-50 для элюции аминокислот применялся 2-нормальный аммиак, для Эскарбо и РФ — смесь аммиака и пиридина, а для Амберлита IR-100 — растворы алифатических аминов. Таурин получался при помощи слабо щелочного анионита.

Применяя технику двухмерной восходящей хроматографии в системах: пропанол : вода и фенол : вода, в 250 мл мочи найдены 18—20 аминокислот, из которых несколько не идентифицировано. Обсуждаются полученные результаты.

НЕОРГАНИЧЕСКИЕ ПОЛИФОСФАТЫ У БАБОЧКИ МОЛОЧАЙНОГО
БРАЖНИКА (*CELERIO EUPHORBIAE*)

Резюме

1. Идентификация пирофосфата из *ductus ejaculatorius* самца и *bursa copulatrix* самки *Celerio euphorbiae* производились путем энзиматического гидролиза чистой пирофосфатазой Кунница.

2. Свежо вылупившимся самцам впрыскивали в брюшко раствор ортофосфата с ^{32}P , в количестве 2 μC . В течение пяти минут после впрыскивания радиоактивный фосфат проникает в значительном количестве в *ductus ejaculatorius* и внедряется в АТР, из которого затем образуется неорганический пирофосфат. В течение 24 часов весь радиоактивный фосфат проходит этим путем и находится в верхней части *ductus ejaculatorius simplex*.

3. Введение радиоактивного фосфата за три дня перед вылупливанием и до шести часов после вылупливания дает такое же распределение радиоактивности, как описано выше. Введение пирофосфата спустя 18 часов после вылупливания дает незначительное внедрение, а при введении по истечении 72 часов после вылупливания, не наблюдалось вообще внедрение ^{32}P в пирофосфат.

4. Переносение пирофосфата во время копуляции подтверждено исследованиями при помощи изотопов. Не было обнаружено наличия изотопа ни в отложенных яйцах, ни в других тканях и органах самки кроме *bursa copularix*. Это показывает, что пирофосфат не потребляется организмом бабочки, а составляет побочный конечный продукт.

5. Выявлено при помощи хроматографии наличие фосфохолина в половых органах самца.

И. РАЙФЕР и К. ТОЧКО

О РАЗЛОЖЕНИИ НИКОТИНА В КОРНЯХ МАХОРКИ

Резюме

Исследовалось содержание никотина в корнях Махорки Поморской в процессе обмена веществ при голодании.

Установлено, что в стерильных условиях содержание никотина в корнях подвергается незначительным изменениям. Показано, что быстрое разложение никотина, наблюдающееся в нестерильных корнях махорки, может быть вызвано деятельностью почвенных микроорганизмов.

ОРНИТИНОВЫЙ ЦИКЛ В ПРОРОСТКАХ ГОРОХА

Резюме

Стерильные побеги гороха, после удаления котиледонов, культивировались на среде Уайта с добавлением орнитина, цитруллина или аргинина. Молодые побеги абсорбируют значительные количества аминокислот из среды. Авторы показали, что растущая ткань может катализировать весь орнитиновый цикл. Кроме того, при помощи хроматографии на бумаге удалось подтвердить, что культуры, растущие на среде с орнитином и цитруллином, синтезируют аспарагин, глютамин и глютаминовую кислоту, а на среде с аргинином синтезируют только аспарагин. Количественные исследования обмена орнитина, цитруллина и аргинина подтверждают мнение, что молодые побеги гороха содержат полный состав ферментов орнитинового цикла.

К. ТОЧКО

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ РАЗЛОЖЕНИЕ НИКОТИНА

Резюме

Выделен штамм почвенных бактерий рода *Pseudomonas*, способных развиваться на среде, в которой единственным источником азота и углерода является никотин.

Обнаружено, что во время роста содержание никотина в среде быстро падает и одновременно появляются новые вещества, образующие характерные для пиридиновых производных окрашенные соединения с пара-аминобензойной кислотой и с бромистым цианом, а также сильно поглощающие свет в области 260 мμ.

Из культуры, после пятидневной инкубации, было выделено при помощи хроматографии 10 веществ, для которых приводятся коэффициенты R_F в трех системах растворителей, окраска с пара-аминобензойной кислотой и бромистым цианом, растворимость в некоторых рас-

творителях, а также спектры поглощения в ультрафиолетовой области в водных растворах 0,01 N соляной кислоты и 0,01 N едкого натрия.

Из выделенных соединений хроматографически и спектрофотометрически были идентифицированы, кроме никотина, γ -кето- γ (3-пиридил)-масляная кислота и никотиновая кислота.

А. М. ДАНЦЕВИЧ, Б. ЛИПИНСКИ и О. РОСЕК

ВЛИЯНИЕ РЕНТГЕНОВСКОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА ДЕГИДРАЗУ
 δ -АМИНОЛЕВУЛИНОВОЙ КИСЛОТЫ *IN VIVO* У КРЫС

Резюме

Изучалась активность дегидразы δ -аминолевулиновой кислоты (АЛАД) в гомогенатах печени, почек, селезенки и костного мозга крыс после однократного облучения всего тела дозами 25—1000 г лучей X. Измерения активности проводились в разных интервалах времени после облучения (от нескольких часов до 60 суток). Дозы, меньше чем 100 г, вызывали в селезенке и костном мозгу повышение активности АЛАД в первые сутки после облучения. Средние дозы (400 г) вызывали вначале уменьшение, а потом, в регенерационном периоде лучевой болезни, увеличение активности АЛАД. Дозы 650 и 1000 г вызывали в этих органах быстрое уменьшение активности АЛАД, которое удерживалось на этом уровне практически до смерти животного. Активность АЛАД в печени и почках в вышеуказанных условиях облучения оставалась без существенных изменений. Наблюдалось лишь незначительное ее уменьшение.

С. НЕВЯРОВСКИ и А. ЧУПРИНА

ЗАМЕТКА К ВОПРОСУ О СТАНДАРТИЗАЦИИ И УСТАНОВЛЕНИИ
ЕДИНИЦ ТРАНСАМИНАЗЫ ЩАВЕЛЕВОУКСУСНОЙ И ПИРОВИНОГРАДНОЙ
КИСЛОТ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

Резюме

Найдено, что при колориметрическом определении трансаминаз по методу Умбрайта, присутствие α -кетоглutarовой кислоты (или ее динитрофенилгидразона) тормозит цветную реакцию динитрофенилгидразона пировиноградной кислоты в толуене после добавления

спиртового раствора КОН. При калибрации стандартной кривой пировиноградной кислоты, следует для вычисления единиц трансаминазы принимать во внимание содержание α -кетоглutarовой кислоты в исследуемом материале и изменения в ее содержании в процессе трансаминации.

В качестве единицы трансаминазы принято такое количество энзима, которое обуславливает прирост 1 μ г пировиноградной кислоты в течение 10 минут при температуре 37° в условиях данного метода. Вычислены нормы у 35 здоровых людей, которые совпадают с принятыми в литературе, а именно: содержание ГПТ составляет в среднем 20,5 ед/мл \pm 9,5, а содержание ГЦТ в среднем 16,5 ед/мл \pm 9,0.

П. МАСЛОВСКИ, Г. МАСЛОВСКА и В. МИНАКОВСКИ

МОДИФИЦИРОВАННЫЙ МЕТОД РЕТЕНЦИОННОГО АНАЛИЗА АМИНОКИСЛОТ

Резюме

Приводится метод ретенционного анализа аминокислот с применением диоксана в качестве ретенционного раствора.

Разделенные при помощи электрофореза аминокислоты элюировали и наносили на фильтровальную бумагу Schleicher-Schüll 2043 b.

Ретенциогамму погружали в ретенционном растворе: диоксан — вода — ледяная уксусная кислота (100 : 1,6 : 0,7) насыщенным ацетатом меди. Ретенционные „выемки” проявляли путем опрыскивания 0,1% раствором рубеоновой кислоты в 90% ацетоне.

В. ОСТРОВСКИ и А. КРАВЧИК

БИОХИМИЯ АВТОТРОФНЫХ СЕРНЫХ БАКТЕРИЙ V. БИОСИНТЕЗ ВИТАМИНА B₁₂ РАВНОМЕРНО МЕЧЕННОГО ¹⁴C

Резюме

На основании микробиологических определений при помощи *Euglena gracilis* и *Ochromonas malhamensis*, а также хроматографических и электрофоретических исследований установлено, что синтезируемый *Thiobacillus thioparus* фактор, стимулирующий рост *E. gracilis* является витамином B₁₂.

Витамин B_{12} синтезируется *Th. thioparus* из неорганических солей как карбонат, хлорид аммония и фосфат в присутствии тиосульфата как источника энергии. Этот факт был использован для биосинтеза витамина B_{12} , равномерно меченого ^{14}C , а также меченого одновременно ^{14}C и ^{60}C .

И. ХМЕЛЕВСКА, К. БЕЛЖЕЦКА, К. РАЧИНЬСКА-БОЯНОВСКА
и Я. МАНИЦКИ

ВЛИЯНИЕ ГЛЮКОЗЫ НА ПОТРЕБЛЕНИЕ ЧЕЛОВЕЧЕСКИМ ОРГАНИЗМОМ
ВНУТРИВЕННО ВВЕДЕННОГО ГИДРОЛИЗАТА БЕЛКОВ КРОВИ
КРУПНОГО СКОТА. II.

Резюме

Установлено, что при внутривенном введении белкового гидролизата с глюкозой, в моче выделяется вещество (или несколько веществ), мешающее определению N-аминных групп методом комплексообразования с медью.

Это вещество разлагается при кислотном гидролизе мочи, причем получают вещества, которые не могут быть определены „медным” методом и, следовательно, не являются свободной или связанной аминокислотой.

Я. СТАНИСЛАВСКИ

МОДИФИКАЦИЯ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО МЕТОДА ОБНАРУЖЕНИЯ
 β -ИНДОЛИЛ-УКСУСНОЙ КИСЛОТЫ И ЕЕ ПРИМЕНЕНИЕ
ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЙ В ПРОРОСТКАХ ПШЕНИЦЫ

Резюме

Описывается модификация хроматографического метода обнаружения β -индолил-уксусной кислоты.

Установлено, что фракционирование растительного экстракта бензолем и эфиром дает удовлетворительные результаты.

Описанный метод не требует ни разделения растительного экстракта на кислые и нейтральные фракции, ни предварительного хроматографирования на колонке, благодаря чему этот метод может найти применение при серийных определениях β -индолил-уксусной кислоты в пшеницах.

С. АНГЕЛЬСКИ, Р. НЕМИРО, В. МАКАРЕВИЧ и Я. РОГУЛЬСКИ

АМИНАЦИДУРИЯ ВЫЗВАННАЯ МАЛЕИНОВОЙ КИСЛОТОЙ

Резюме

Однократное внутривентральное введение крысам малеината в дозе 400 мг на 1 кг веса, вызывает значительное увеличение выделения с мочей α -аминного азота на протяжении от 4 до 7 дней. Это увеличение вызвано почти исключительно свободными аминокислотами; количество основных и ароматических аминокислот играет, повидимому, второстепенную роль по сравнению с остальными исследованными аминокислотами. Кроме аминацидурии — доминирующего симптома отравления малеинатом — можно обнаружить увеличение количества мочи, а также увеличение выделения натрия, аммиака, а в некоторой степени и фосфора.

А. МОРАВЕЦКИ

ИССЛЕДОВАНИЯ НАД КИНАЗОЙ ПИРОВИНОГРАДНОЙ КИСЛОТЫ ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОГО ВЕСА ФЕРМЕНТА ИЗ МЫШЦ КРОЛИКА

Резюме

На основании определений скорости седиментации и диффузии, молекулярный вес киназы пировиноградной кислоты определен на 230.000.

Константа седиментации S_{20} составляет 10,6 S; константа диффузии $D_{20} = 4,4 \times 10^{-7} \text{ см}^2/\text{сек.}$, $f/f_0 = 1,16$.

Изоэлектрическая точка этого фермента в фосфатном буфере составляет 5,98.

Komitet Mikrobiologiczny i Polskie Towarzystwo Mikrobiologiczne przy Wydziale II Polskiej Akademii Nauk ogłaszają dwa konkursy na eksperymentalne prace naukowe na tematy:

I konkurs „Zagadnienia z dziedziny metabolizmu drobnoustrojów“,

II konkurs „Zagadnienia indukowanej zmienności trwałej u drobnoustrojów”

z terminem nadsyłania prac do dnia 1 września 1960 roku.

Regulamin obu konkursów jest następujący:

1. Prawo zgłaszania prac konkursowych mają wszyscy pracownicy nauki ośrodków krajowych, obywatele polscy.
2. Prace mogą być indywidualne i zespołowe.
3. Do konkursu można zgłaszać prace nieopublikowane lub opublikowane nie wcześniej niż w 1959 roku.
4. Autor lub autorzy mogą zgłaszać dowolną ilość prac.
5. Prace winny być opatrzone imieniem, nazwiskiem i adresem autora (autorów) i nadesłane na adres Komitetu Mikrobiologicznego PAN, Warszawa, Pałac Kultury i Nauki — Wydział II, w nieprzekraczalnym terminie do dnia 1 września 1960 roku (decyduje data stempla pocztowego) w trzech egzemplarzach maszynopisu.
6. W pierwszej połowie września 1960 roku Komitet Mikrobiologiczny PAN ustali skład 3 osobowego Sądu Konkursowego, do którego mogą wejść tylko osoby, które nie nadesłały prac na konkurs.
7. Sąd Konkursowy przedstawia pisemną ocenę prac i umotywowanie decyzji do ostatecznej aprobaty Komitetowi Mikrobiologicznemu PAN. Decyzja Sądu Konkursowego wraz z aprobatą Komitetu Mikrobiologicznego PAN zostaną opublikowane w czasopiśmie fachowych. Rozstrzygnięcie konkursu nastąpi w terminie do dnia 1 grudnia 1960 roku.
8. W obydwóch konkursach przewidziane są 3 nagrody. Nagrody są w zasadzie trójstopniowe, ustala się:

I nagrodę w wysokości	zł. 7.000 --
II " "	zł. 5.000 —
III " "	zł. 3.000 —

9. W zależności od wyników oceny prac nadesłanych na konkurs, Sądowi Konkursowemu i Komitetowi Mikrobiologicznemu PAN przysługuje prawo:
 - a) przyznania trzech równorzędnych nagród
 - b) zmniejszenie ilości nagród lub tp. zmian
 - c) nie przyznanie żadnej nagrody.
10. Na życzenie autorów prace nagrodzone zostaną opublikowane staraniem Komitetu Mikrobiologicznego PAN.

Sekretarz Naukowy
Komitetu Mikrobiologicznego PAN
(Prof. dr R. Pakuła)

Przewodniczący
Komitetu Mikrobiologicznego PAN
(Prof. dr K. Bassalik)

