

P O L S K A A K A D E M I A N A U K
KOMITET BIOCHEMICZNY

ACTA
BIOCHIMICA POLONICA

KWARTALNIK

T O M V I

WARSZAWA 1959
PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE

<http://rcin.org.pl>

KOMITET REDAKCYJNY

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



K 213/65
<http://rcin.org.pl>

SPIS TREŚCI

(Tom VI, 1959 r.)

Zeszyt 1

Zofia Lassota, Pyrophosphatase und Adenosintriphosphatase der Bohnenkeimlinge	3
I. Reifer, J. Przeździecka i D. Kleczkowska, Chromatograficzna metoda ilościowego oznaczania alkaloidów łubinowych	17
H. Birecka, H. Rybicka i A. Ścibor-Marchocka, Alkaloidy <i>Lupinus albus</i> i metoda ich oznaczania ilościowego	25
L. Ledoux, A. Pileri, H. Poznańska-Linde i F. Vanderhaeghe, Zmiany zawartości i metabolizmu puryn w kwasach nukleinowych w przebiegu starzenia się nowotworu doświadczalnego	37
S. Niewiarowski, E. Kowalski and J. Stachurska, Influence of Fibrinogen Derived Antithrombin (Antithrombin VI) on the Blood Coagulation System	43
M. Wierzuchowski, Ciężka praca mięśniowa a odpływ cukru ze krwi na początku wysycania glikozą	55
L. Żelewski, Związki fosforowe erytrocytów krwi pepowinowej i krwi matki	119

Zeszyt 2

P. Szafrński and E. Sułkowski, Activation of Amino Acids in Various Organs of the Guinea Pig	133
M. Wiewiórowski, J. Augustyniak, H. Skrzypińska, J. Przybylska i Z. Kocialkowski, Z badań nad białkiem łubinowym. III. Przyczynek do poznania syntezy białek w nasionach łubinu	143
J. Heller, P. Szafrński and E. Sułkowski, Amino Acids Activation in Relation to the Synthesis of Silkprotein	165
W. Rzczycki, Kwas neuraminowy białek surowicy krwi. Sposoby jego oznaczania	171
P. Szafrński and E. Sułkowski, Incorporation of ¹⁴ C-Amino Acids and ³² P into Soluble Nucleoproteins from Guinea Pig Liver Cytoplasm	185
K. Bełżecka, K. Raczyńska-Bojanowska and J. Heller, Studies on Transamination in Insects. I. Aspartic- α -Ketoglutaric Transaminase in <i>Celerio euphorbiae</i> L.	195

Z. Szafran, H. Szafran i J. Oleksy , Hydroliza estrów karboksylowych przez esterazy soku trzustkowego psa	205
I. Reifer i L. Buraczewska , Mikrometoda oznaczania ornityny	219
I. Reifer i L. Buraczewska , Enzymy i substraty cyklu ornitynowego w żywicy trwałej (<i>Lolium perenne</i>)	227
Z. Tramer and D. Shugar , Studies on Phenolic Hydroxyl Binding in Proteins	235

Z e s z y t 3

E. Kowalski, A. M. Dancewicz, Z. Szot, B. Lipiński and O. Rosiek , Studies on δ -Aminolaevulic Acid Transamination	257
A. M. Dancewicz, Z. Szot, O. Rosiek i E. Kowalski , Wpływ promieniowania rentgenowskiego na transaminację kwasu δ -aminolewulinowego i asparaginowego w niektórych narządach szczurów	267
L. Szarkowska and Z. Poremska , Arginase in <i>Celerio euphorbiae</i>	273
J. Frendo, A. Koj i J. M. Zgliczyński , Przemiany związków siarkowych w płytkach krwi ludzkiej. Tworzenie tauryny	277
J. Brahms and Czesława Rżysko , Phosphorylation of H-Meromyosin in the Course of ATP Splitting	287
S. Angielski, J. Rogulski, E. Janowicz i L. Madońska , Aminoacyduria wywołana kwasem maleinowym. II. Wpływ diety	295
Irena Mochacka and Czesława Petryszyn , Trehalose in <i>Celerio euphorbiae</i>	307
K. L. Wierzchowski and D. Shugar , Studies of Reversible Photolysis in Oligo- and Poly-uridylic Acids	313
A. M. Michelson , Some Aspects of the Chemistry of Polynucleotides and Nucleotide Co-enzymes	335
B. Drożdż , Odróżnienie ksylozy od arabinozy i innych cukrów	369

Z e s z y t 4

Wanda Mejbaum-Katzenellenbogen , Insoluble Protein-Tannin Compounds	375
Wanda Mejbaum-Katzenellenbogen , Studies on Regeneration of Protein from Insoluble Protein-Tannin Compounds. I. Removal of Tannin from the Protein-Tannin Compounds by Caffeine	385
Hanna Michałek and Ludmiła Szarkowska , The Quinone-Amino Acid Complexes and Polyphenolase	399
S. Angielski and J. Rogulski , Aminoaciduria Caused by Maleic Acid. III. The Effect of Sulfhydryl Compounds	411
D. Shugar, A. Adamiec and Ewa Sztumpf , Role of Peptide Bond Absorption in Protein Photochemistry	417
A. Adamiec and D. Shugar , Two Procedures for Following the Kinetics of Degradation of Apurinic Acid	425

J. Pawełkiewicz, W. Walerych i B. Bartosiński , Badania nad biosyntezą związków korfirynowych. 3. Identyfikacja kobalaminy yl jako guanozynodwufosforanu witaminu B _{12p} (czynnika B)	431
J. Pawełkiewicz i W. Walerych , Szybka chromatograficzna metoda rozdziału związków korfirynowych	441
S. Buraczewski , Enzymy cyklu pentozowego w buraku cukrowym	447
Wanda Mejbaum-Katzenellenbogen i Bronisława Morawiecka , Badania nad regeneracją białek z nierozpuszczalnych połączeń białkowo-taninowych. II. Niektóre własności białek regenerowanych na przykładzie aldolazy z mięśni królika i kwaśnej fosfatazy z ziemniaków	453
Zawiadomienie o V Kongresie Biochemii.	

CONTENTS

Volume VI, Nos. 1—4, 1959

No. 1

Zofia Lassota , Pyrophosphatase und Adenosintriphosphatase der Bohnenkeimlinge	3
I. Reifer, J. Przeździecka and D. Kleczkowska , A Chromatographic Method for the Separation and Determination of Lupine Alkaloids	17
H. Birecka, H. Rybicka and A. Ścibor-Marchocka , The Alkaloids of <i>Lupinus albus</i> and the Method of their Quantitative Determination	25
L. Ledoux, A. Pileri, H. Poznańska-Linde and F. Vanderhaeghe , Purinic Metabolism in Nucleic Acids of Landschüts Ascites. Changes Occurring in the Process of Tumor Growth	37
S. Niewiarowski, E. Kowalski and J. Stachurska , Influence of Fibrinogen Derived Antithrombin (Antithrombin VI) on the Blood Coagulation System	43
M. Wierzuchowski , Heavy Muscular Exercise and Disappearance of Blood Sugar	55
L. Żelewski , Phosphorous Compounds in Erythrocytes of the Umbilical Blood and of the Maternal Blood	119

No. 2

P. Szafrąński , and E. Sulkowski , Activation of Amino Acids in Various Organs of the Guinea Pig	133
M. Wiewiórowski, J. Augustyniak, H. Skrzypińska, J. Przybylska and Z. Kociąlkowski , Studies on Lupine Protein III.	143
J. Heller, P. Szafrąński and E. Sulkowski , Amino Acids Activation in Relation to the Synthesis of Silkprotein	165
W. Rzczycki , Neuramic Acid of Blood Serum Proteins. The Method for Estimation	171
P. Szafrąński and E. Sulkowski , Incorporation of ¹⁴ C-Amino Acids and ³² P into Soluble Nucleoproteins from Guinea Pig Liver Cytoplasm	185
K. Belżecka, K. Raczyńska-Bojanowska and J. Heller , Studies on Transamination in Insects. I. Aspartic- α -Ketoglutaric Transaminase in <i>Celerio euphorbiae</i> L.	195

Z. Szafran, H. Szafran and J. Oleksy , Hydrolysis of Carboxylic Esters by Esterases Derived from Dog Pancreatic Juice	205
I. Reifer and L. Buraczewska , A Micromethod for the Determination of Ornithine	219
I. Reifer and L. Buraczewska , Substrates and Enzymes of the Ornithine Cycle in Perennial Reygrass (<i>Lolium perenne</i>)	227
Z. Tramer and D. Shugar , Studies on Phenolic Hydroxyl Binding in Proteins	235

No. 3

E. Kowalski, A. M. Danciewicz, Z. Szot, B. Lipiński and O. Rosiek , Studies on δ -Aminolaevulic Acid Transamination	257
A. M. Danciewicz, Z. Szot, O. Rosiek and E. Kowalski , The Influence of X-Irradiation on δ -Aminolaevulic and Aspartic Acid Transamination in Some Organs of the Rat	267
L. Szarkowska and Z. Poremska , Arginase in <i>Celerio euphorbiae</i>	273
J. Frendo, A. Koj and J. M. Zgliczyński , Metabolism of Sulphur Compounds in Human Thrombocytes. Taurine Formation	277
J. Brahms and Czesława Rzyśko , Phosphorylation of H-Meromyosin in the Course of ATP Splitting	287
S. Angielski, J. Rogulski, E. Janowicz and L. Madońska , Aminoaciduria Caused by Maleic Acid. II. The Effect of Diet	295
Irena Mochnacka and Czesława Petryszyn , Trehalose in <i>Celerio euphorbiae</i>	307
K. L. Wierzchowski and D. Shugar , Studies of Reversible Photolysis in Oligo- and Poly-uridylic Acids	313
A. M. Michelson , Some Aspects of the Chemistry of Polynucleotides and Nucleotide Co-enzymes	335
B. Drożdż , Identification of Xylose, Arabinose and Other Sugars	369

No. 4

Wanda Mejbaum-Katzenellenbogen , Insoluble Protein-Tannin Compounds	375
Wanda Mejbaum-Katzenellenbogen , Studies on Regeneration of Protein from Insoluble Protein-Tannin Compounds. I. Removal of Tannin from the Protein-Tannin Compounds by Caffeine	385
Hanna Michałek and Ludmiła Szarkowska , The Quinone-Amino Acid Complexes and Polyphenolase	399
S. Angielski and J. Rogulski , Aminoaciduria Caused by Maleic Acid. III. The Effect of Sulfhydryl Compounds	411
D. Shugar, A. Adamiec and Ewa Sztumpf , Role of Peptide Bond Absorption in Protein Photochemistry	417
A. Adamiec and D. Shugar , Two Procedures for Following the Kinetics of Degradation of Apurinic Acid	425

VII

J. Pawelkiewicz, W. Walerych and B. Bartosiński, Studies on Biosynthesis of Corphyrin Compounds. 3. Identification of Cobalamin yl as Guanosinediphosphate of Vitamin B_{12p} (Factor B)	431
J. Pawelkiewicz and W. Walerych, A Quick Chromatographic Method for the Separation of Corphyrin Compounds	441
S. Buraczewski, Enzymes of the Pentose Cycle in Sugar Beet	447
Wanda Mejbaum-Katzenellenbogen and Bronisława Morawiecka, Studies on Regeneration of Protein from Insoluble Protein-Tannin Compounds. II. Some Properties of Regenerated Proteins Illustrated by Means of the Rabbit Muscles Aldolase and Potato Acid Phosphatase	453

INDEKS AUTORÓW

A

Adamiec A. , patrz Shugar D. and Sztumpf Ewa	417
Adamiec A. and Shugar D. , Two Procedures for Following the Kinetics of Degradation of Apurinic Acid	425
Angielski S. , Rogulski J. , Janowicz E. i Madońska L. , Aminoacyduria wywołana kwasem maleinowym. II. Wpływ diety	295
Angielski S. and Rogulski J. , Aminoaciduria Caused by Maleic Acid III. The Effect of Sulfhydryl Compounds	411
Augustyniak J. , patrz Wiewiórowski M., Skrzypińska H., Przybylska, J. i Kociałkowski Z.	143

B

Bartosiński B. , patrz Pawelkiewicz J. i Walerych W.	431
Bełżecka K. , Raczyńska-Bojanowska K. and Heller J. , Studies on Transamination in Insects. I. Aspartic- α -Ketoglutaric Transaminase in <i>Celerio euphorbiae</i> L.	195
Birecka H. , Rybicka H. i Ścibor-Marchocka A. , Alkaloidy <i>Lupinus albus</i> i metoda ich oznaczania ilościowego	25
Brahms J. and Rżysko Czesława , Phosphorylation of H-Meromyosin in the Course of ATP Splitting	287
Buraczewska L. , patrz Reifer I.	219
Buraczewska L. , patrz Reifer I.	227
Buraczewski S. , Enzymy cyklu pentozowego w buraku cukrowym	447

D

Dancewicz A. M. , patrz Kowalski E., Szot Z., Lipiński B. i Rosiek O.	257
Dancewicz A. M. , Szot Z. , Rosiek O. i Kowalski E. , Wpływ promieniowania rentgenowskiego na transaminację kwasu δ -aminolaevulinowego i asparaginowego w niektórych narządach szczurów	267
Drożdż B. , Odróżnienie ksylozy od arabinozy i innych cukrów	369

F

Frendo J. , Koj A. i Zgliczyński J. M. , Przemiany związków siarkowych w płytkach krwi ludzkiej. Tworzenie tauryny	277
---	-----

H

Heller J., Szafranski P. and Sulkowski E., Amino Acids Activation in Relation to the Synthesis of Silkprotein	165
Heller J., patrz Belzecka K. and Raczynska-Bojanowska K.	195

J

Janowicz E., patrz Angielski S., Rogulski J. i Madońska L.	295
---	-----

K

Kleczkowska D., patrz Reifer I. i Przezdziecka J.	17
Kociałkowski Z., patrz Wiewiórowski M., Augustyniak J., Skrzypińska H. i Przybylska J.	143
Koj A., patrz Frenedo J. i Zgliczyński J. M.	277
Kowalski E., patrz Niewiarowski S. and Stachurska J.	43
Kowalski E., Danczewicz A. M., Szot Z., Lipiński B. and Rosiek O., Studies on δ -Aminolaevulinic Acid Transamination	257
Kowalski E., patrz Danczewicz A. M., Szot Z. i Rosiek O.	267

L

Lassota Zofia, Pyrophosphatase und Adenosintriphosphatase der Bohnenkeimlinge	3
Ledoux L., Pileri A., Poznańska-Linde H. i Vanderhaeghe F., Zmiany zawartości i metabolizmu puryn w kwasach nukleinowych w przebiegu starzenia się nowotworu doświadczalnego	37
Lipiński B., patrz Kowalski E., Danczewicz A. M., Szot Z. i Rosiek O.	257

M

Madońska L., patrz Angielski S., Rogulski J. i Janowicz E.	295
Mejbaum-Katzenellenbogen Wanda, Insoluble Protein-Tannin Compounds	375
Mejbaum-Katzenellenbogen Wanda, Studies on Regeneration of Protein from Insoluble Protein-Tannin Compounds. I. Removal of Tannin from the Protein-Tannin Compounds by Caffeine	385
Mejbaum-Katzenellenbogen Wanda i Morawiecka Bronisława, Badania nad regeneracją białek z nierozpuszczalnych połączeń białkowo-taninowych. II. Niektóre własności białek regenerowanych na przykładzie aldolazy z mięśni królika i kwaśnej fosfatazy z ziemniaków	453
Michalek Hanna and Szarkowska Ludmiła, The Quinone-Amino Acid Complexes and Polyphenolase	399
Michelson A. M., Some Aspects of the Chemistry of Polynucleotides and Nucleotide Co-enzymes	335
Mochnacka Irena and Petryszyn Czesława, Trehalose in <i>Celerio euphorbiae</i>	307
Morawiecka Bronisława, patrz Mejbaum-Katzenellenbogen Wanda	453

X

N

Niewiarowski S., Kowalski E. and Stachurska J., Influence of Fibrinogen Derived Antithrombin (Antithrombin VI) on the Blood Coagulation System	43
---	----

O

Oleksy J., patrz Szafran Z. i Szafran H.	205
---	-----

P

Pawelkiewicz J., Walerych W. i Bartosiński B., Badania nad biosyntezą związków korfirykowych. 3. Identyfikacja kobalaminy yl jako guanozynodwufosforanu witaminu B _{12p} (czynnika B)	431
Pawelkiewicz J. i Walerych W., Szybka chromatograficzna metoda rozdzielenia związków korfirykowych	441
Petrzyn Czesława, patrz Mochna Irena	307
Pileri A., patrz Ledoux L., Poznańska-Linde H. i Vanderhaeghe F.	37
Poremska Z., patrz Szarkowska L.	273
Poznańska-Linde H., patrz Ledoux L., Pileri A. i Vanderhaeghe F.	37
Przędziecka J., patrz Reifer I. i Kleczkowska D.	17
Przybylska J., patrz Wiewiórowski M., Augustyniak J., Skrzypińska H. i Kociałkowski Z.	143

R

Raczyńska-Bojanowska K., patrz Bełżecka K. and Heller J.	195
Reifer I., Przędziecka J. i Kleczkowska D., Chromatograficzna metoda ilościowego oznaczania alkaloidów lubinowych	17
Reifer I. i Buraczewska L., Mikrometoda oznaczania ornityny	219
Reifer I. i Buraczewska L., Enzymy i substraty cyklu ornitynowego w życiu trwałej (<i>Lolium perenne</i>)	227
Rogulski J., patrz Angielski S., Janowicz E. i Madońska L.	295
Rogulski J., patrz Angielski S.	411
Rosiek O., patrz Kowalski E., Danczewicz A. M., Szot Z. i Lipiński B.	257
Rosiek O., patrz Danczewicz A. M., Szot Z. i Kowalski E.	267
Rybicka H., patrz Birecka H. i Ścibor-Marchocka A.	25
Rzezycki W., Kwas neuraminowy białek surowicy krwi. Sposoby jego oznaczania	171
Rżysko Czesława, patrz Brahms J.	287

S

Shugar D., patrz Tramer Z.	235
Shugar D., patrz Wierzchowski K. L.	313
Shugar D., Adamiec A. and Sztumpf Ewa, Role of Peptide Bond Absorption in Protein Photochemistry	417

XI

Shugar D. , patrz Adamiec A.	425
Skrzypińska H. , patrz Wiewiórowski M., Augustyniak J., Przybylska J. i Kociałkowski Z.	143
Stachurska J. , patrz Niewiarowski S. and Kowalski E.	43
Sułkowski E. , patrz Szafrąński P.	133
Sułkowski E. , patrz Heller J. and Szafrąński P.	165
Sułkowski E. , patrz Szafrąński P.	185
Szafran H. , patrz Szafran Z. i Oleksy J.	205
Szafran Z. , Szafran H. i Oleksy J., Hydroliza estrów karboksylowych przez esterazy soku trzustkowego psa	205
Szafrąński P. and Sułkowski E. , Activation of Amino Acid in Various Organs of the Guinea Pig	133
Szafrąński P. , patrz Heller J. and Sułkowski E.	165
Szafrąński P. and Sułkowski E. , Incorporation of ¹⁴ C-Amino Acids and ³² P into Soluble Nucleoproteins from Guinea Pig Liver Cytoplasm	185
Szarkowska L. and Poremska Z. , Arginase in <i>Celerio euphorbiae</i>	273
Szarkowska Ludmiła , patrz Michałek Hanna	399
Szot Z. , patrz Kowalski E., Dancewicz A. M., Lipiński B. i Rosiek O.	257
Szot Z. , patrz Dancewicz A. M., Rosiek O. i Kowalski E.	267
Sztumpf Ewa , patrz Shugar D. and Adamiec A.	417
Scibor-Marchocka A. , patrz Birecka H. i Rybicka H.	25

T

Tramer Z. and Shugar D. , Studies on Phenolic Hydroxyl Binding in Proteins	235
---	-----

V

Vanderhaeghe F. , patrz Leodux L., Pileri A. i Poznańska-Linde H.	37
--	----

W

Walerych W. , patrz Pawełekiewicz J. i Bartosiński B.	431
Walerych W. , patrz Pawełekiewicz J.	441
Wierzchowski K. L. and Shugar D. , Studies of Reversible Photolysis in Oligo- and Poly-uridylic Acids	313
Wierzuchowski M. , Ciężka praca mięśniowa a odpływ cukru ze krwi na początku wysycania glikozą	55
Wiewiórowski M., Augustyniak J., Skrzypińska H., Przybylska J. i Kociałkowski Z. , Z badań nad białkiem łubinowym. III. Przyczynki do poznania syntezy białek w nasionach łubinu	143

Z

Zgliczyński J. M. , patrz Frendo J. i Koj A.	277
---	-----

Ż

Żelewski L. , Związki fosforowe erytrocytów krwi pepowinowej i krwi matki	119
--	-----

INDEKS RZECZOWY

A

Absorpcja: przez wiązanie peptydowe w fotochemii białek, D. Shugar, A. Adamiec i Ewa Sztumpf	417
Adenozynotrójfosfataza: w kielkach fasoli, Zofia Lassota	3
Adenozynotrójfosforowy kwas: fosforylacja H-meromiozynu podczas rozkładu, J. Brahms i Czesława Rżysko	287
Alkaloidy <i>Lupinus albus</i>: metoda oznaczania ilościowego, H. Birecka, H. Rybicka i A. Scibor-Marchocka	25
Alkaloidy iubinowe: chromatograficzna metoda ilościowego oznaczania, I. Reifer, J. Przeździecka i D. Kleczkowska	17
Aminoacyduria: wywołana kwasem maleinowym, wpływ diety, S. Angielski, J. Rogulski, E. Janowicz i L. Madońska	295
Aminoacyduria: wywołana kwasem maleinowym, wpływ związków siarkowych, S. Angielski i J. Rogulski	411
Aminokwasy—¹⁴C: włączanie do rozpuszczalnych nukleoproteidów cytoplazmy wątroby świnki morskiej, P. Szafrąński i E. Sułkowski	185
Aminokwasy: aktywacja w narządach świnki morskiej, P. Szafrąński i E. Sułkowski	133
Aminokwasy: aktywacja w syntezie białek jedwabiu, J. Heller, P. Szafrąński i E. Sułkowski	165
Aminokwasy: kompleksy z chinonami, H. Michałek i L. Szarkowska	399
δ-Aminolewulinowy kwas: badania nad transaminacją, E. Kowalski, A. M. Dancewicz, Z. Szot, B. Lipiński i O. Rosiek	257
δ-Aminolewulinowy kwas: wpływ promieniowania rentgenowskiego na transaminację, w narządach szczurów, A. M. Dancewicz, Z. Szot, O. Rosiek i E. Kowalski	267
Antytrombina VI: działanie na krzepnięcie krwi, S. Niewiarowski, E. Kowalski i J. Stachurska	43
Apurynowy kwas: dwie metody badania kinetyki rozkładu, A. Adamiec i D. Shugar	425
Arabinoza: odróżnienie od ksylozy i innych cukrów, B. Drożdż	369
Arginaza: u motyla <i>Celerio euphorbiae</i> , L., Szarkowska i Z. Poremska	273
Asparaginowy kwas: wpływ promieniowania rentgenowskiego na transaminację w narządach szczurów, A. M. Dancewicz, Z. Szot, O. Rosiek i E. Kowalski	267

B

Białka: badania nad wiązaniami hydroksyli fenolowych, Z. Tramer i D. Shugar	235
Białka: niektóre własności białek regenerowanych kofeiną z nierozpuszczalnych połączeń białkowo-taninowych, Wanda Mejbaum-Katzenellenbogen i Bronisława Morawiecka	453
Białka: nierozpuszczalne połączenia z taniną, Wanda Mejbaum-Katzenellenbogen	375
Białka: regeneracja kofeiną z nierozpuszczalnych połączeń białkowo-taninowych, Wanda Mejbaum-Katzenellenbogen	385
Białka: rola absorpcji przez wiązania peptydowe w fotochemii, D. Shugar, A. Adamiec i Ewa Sztumpf	417
Białko: jedwabiu, a aktywacja aminokwasów w syntezie, J. Heller, P. Szafranski i E. Sułkowski	165
Białko: synteza w nasionach łubinu, M. Wiewiórowski, J. Augustyniak, H. Skrzypińska, J. Przybylska i Z. Kociałkowski	143

C

<i>Celerio euphorbiae</i> : arginaza, u, L., Szarkowska i Z. Poremska	273
<i>Celerio euphorbiae</i> : transaminaza asparaginowo-a-ketoglutarowa, K. Belżeczka, K. Raczyńska-Bojanowska i J. Heller	195
<i>Celerio euphorbiae</i> : trehaloza u, Irena Mochnacka i Czesława Petryszyn	307
Chinony: kompleksy aminokwasowe a polifenolaza, Hanna Michałek i Ludmiła Szarkowska	399
Cykl pentozowy: w buraku cukrowym, enzymy, S. Buraczewski	447

E

Enzymy: cyklu ornitynowego w życicy trwałej, I. Reifer i L. Buraczewska	227
Enzymy: cyklu pentozowego w buraku cukrowym, S. Buraczewski	447
Erytrocyty: związki fosforowe krwi, porównanie krwi pępowinowej i matki, L. Żelewski	119
Esteraza: soku trzustkowego psa, hydroliza estrów karboksylowych, Z. Szafran, H. Szafran i J. Oleksy	205
Estry karboksylowe: hydroliza, przez esterazy soku trzustkowego psa, Z. Szafran, H. Szafran i J. Oleksy	205

F

Fosforan-³²P: włączanie do rozpuszczalnych nukleoproteidów cytoplazmy wątroby świnki morskiej, P. Szafranski i E. Sułkowski	185
Fosforowe związki: erytrocytów, krwi pępowinowej i krwi matki, L. Żelewski	119
Forforylacja: H-meromiozynu podczas rozkładu ATP, J. Brahms i Czesława Rżysko	287
Fotochemia białek: rola absorpcji przez wiązania peptydowe, D. Shugar, A. Adamiec i Ewa Sztumpf	417
Fotoliza: badania nad odwracalnością przy oligo- i poli-urydylowych kwasach, K. L. Wierzchowski i D. Shugar	313

G

Glikoza krwi: na początku wysycania glikozą a praca mięśniowa, M. Wierzychowski	55
--	----

K

Kobalamina yl: identyfikacja jako guanozynodwufosforan witaminu B ₁₂ , J. Pawełkiewicz, W. Walerych i B. Bartosiński	431
Koenzymy nukleotydowe: z poglądów na ich chemię, A. M. Michelson	335
Kofeina: do regeneracji białka z połączeń białkowo-taninowych, Wanda Mejbäum-Katzenellenbogen	385
Korfiryny: badania nad biosyntezą, J. Pawełkiewicz, W. Walerych i B. Bartosiński	431
Korfiryny: chromatograficzna metoda rozdzielania, J. Pawełkiewicz i W. Walerych	441
Krew krzepnięcie: wpływ antitrombiny VI, S. Niewiarowski, E. Kowalski i J. Stachurska	43
Krew płytki: tworzenie tauryny, J. Frendo, A. Koj i J. M. Zgliczyński	277
Ksyliza: odróżnienie od arabinozy i innych cukrów, B. Drożdż	369

Ł

Łubin: synteza białka w nasionach, W. Wiewiórowski, J. Augustyniak, H. Skrzyńska, J. Przybylska i Z. Kociałkowski	143
--	-----

M

Maleinowy kwas: wywołanie aminoacydurii, wpływ diety, S. Angielski, J. Rogulski, E. Janowicz i L. Madońska	295
Maleinowy kwas: wywołanie aminoacydurii, wpływ związków siarkowych, S. Angielski i J. Rogulski	411
H-Meromiozyn: fosforylacja podczas rozkładu ATP, J. Brahms i Czesława Rżysko	287
Metoda: chromatograficzna oznaczania alkaloidów łubinowych, I. Reifer, J. Przeździecka i D. Kleczkowska	17
Metoda: chromatograficzna rozdzielania związków korfirynowych, J. Pawełkiewicz i W. Walerych	441
Metoda: mikro oznaczania ornityny, I. Reifer i L. Buraczewska	219
Metoda: oznaczania alkaloidów <i>Lupinus albus</i> , H. Birecka, H. Rybicka, i A. Ścibor-Marchocka	25
Metody: badania kinetyki rozkładu kwasu apurynowego, A. Adamiec i D. Shugar	425
Mięśnie: praca a odpływ cukru z krwi na początku wysycania glikozą, M. Wierzychowski	55
Mocz: aminoaciduria wywołana kwasem maleinowym, wpływ diety, S. Angielski, J. Rogulski, E. Janowicz i L. Madońska	295
Mocz: wpływ związków siarkowych na aminoacidurię wywołaną kwasem maleinowym, S. Angielski i J. Rogulski	411

N

Neuraminowy kwas: oznaczanie w surowicy krwi, W. Rzęczycki	171
Nukleinowe kwasy: zmiany zawartości puryn w przebiegu starzenia się nowotworu, L. Ledoux, A. Pileri, H. Poznańska-Linde i F. Vanderhaeghe	37
Nukleoproteidy: rozpuszczalne cytoplazmy wątroby, włączenie ¹⁴ C-aminokwasów i ³² P, P. Szafranski i E. Suikowski	185

O

Oligo- i poli-urydylowe kwasy: badania nad odwracalnością fotolizy, K. L. Wierzchowski i D. Shugar	313
Ornityna: enzymy i substraty cyklu, w życiu trwałej, I. Reifer i L. Buraczewska	227
Ornityna: mikrometoda oznaczania, I. Reifer i L. Buraczewska	219

P

Pentozowy cykl: w buraku cukrowym, S. Buraczewski	447
Pirofosfataza: w kiełkach fasoli, Zofia Lassota	3
Polyfenolaza: a chinonowo-aminokwasowe kompleksy, Hanna Michałek i Ludmiła Szarkowska	399
Poli-nukleotydy: z poglądów na ich chemię, A. M. Michelson	335
Promieniowanie rentgenowskie: wpływ na transaminację kwasu δ-aminolewulinowego i asparaginowego u szczurów, A. M. Dancewicz, Z. Szot, O. Rosiek i E. Kowalski	267
Puryny: zmiany zawartości i metabolizmu w kwasach nukleinowych w przebiegu starzenia się nowotworu, L. Ledoux, A. Pileri, H. Poznańska-Linde i F. Vanderhaeghe	37

S

Siarkowe związki: przemiany w płytkach krwi ludzkiej, J. Frendo, A. Koj i J. Zgliczyński	277
Surowica krwi: oznaczanie i zawartość kwasu neuraminowego, W. Rzęczycki	171

T

Tanina: nierozpuszczalne połączenia z białkiem, Wanda Mejbaum-Katzenellenbogen	375
Tauryna: tworzenie w płytkach krwi, J. Frendo, A. Koj i J. M. Zgliczyński	277
Transaminacja: kwasu δ-aminolewulinowego, E. Kowalski, A. M. Dancewicz, Z. Szot, B. Lipiński i O. Rosiek	257
Transaminacja: asparaginowo-α-ketoglutazarowa u <i>C. euphorbiae</i> , K. Bełżecka, K. Raczyńska-Bojanowska i J. Heller	195
Trehaloza: w <i>Celerio euphorbiae</i> , Irena Mochnacka i Czesława Petryszyn	307
Trzustka: hydroliza estrów karboksylowych przez esterazy soku, Z. Szafran, H. Szafran i J. Oleksy	205

ZOFIA LASSOTA

**PYROPHOSPHATASE UND ADENOSINTRIPHOSPHATASE
DER BOHNENKEIMLINGE**

Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Warszawa
Zakład Biochemii Ewolucyjnej
Kierownik: prof. dr I. Mochnacka

Die Anwesenheit der spezifischen Pyrophosphatase im Gewebe höherer Pflanzen wird immer noch diskutiert [15]. Die, in diesem Material festgestellte Spaltungsfähigkeit des anorganischen Pyrophosphates wird gewöhnlich von einer Phosphataseaktivität gegen andere Substrate begleitet. Bis jetzt ist auch der Nachweis des anorganischen Pyrophosphates bei den höheren Pflanzen nicht gelungen, obwohl mehrere mit der Entstehung von Pyrophosphat verbundenen Vorgänge in diesen Organismen bekannt sind.

Die Anwesenheit von Adenosintriphosphorsäure (ATP) im pflanzlichen Material wurde dagegen mehrmals und zwar mit verschiedenen Methoden festgestellt. Im Jahre 1956 hat Bergkvist [3] die ATP aus Weizen isoliert und ihre Identität mit der tierischen Adenosintriphosphorsäure endgültig nachgewiesen. Mehrmals wurde auch in den höheren Pflanzen die Anwesenheit der von den Adenylnukleotiden Phosphat- abspaltenden Fermente festgelegt. ATP wird gewöhnlich zu Adenylsäure (AMP) und anorganischem Pyrophosphat (PP) gespalten. Diese Wirkungsart weisen die aus Kartoffeln isolierten Fermente aus [8—11]. Bei der Untersuchung der Kartoffelapapyrase, deren Temperaturoptimum bei 30° liegt, wurde bei 7° die Abspaltung von nur einem Phosphatrest beobachtet [12].

Da die Angaben über die anorganische Pyrophosphatase und den Wirkungsmechanismus der ATP-ase in den grünen Pflanzenorganen sehr sparsam sind, wurde die Untersuchung dieser Fermente in den Bohnenkeimlingen vorgenommen.

MATERIAL UND METHODEN

Weisse Bohnen (*Phaseolus vulgaris*) wurden nach 24-stündigen Aufweichung im Leitungswasser, auf einer feuchten Unterlage aus Watte und Filtrierpapier bei Zimmertemperatur gezüchtet. Die Pflanzen kamen zwischen dem 8 und 23 Tag der Keimung zur Aufbereitung. Pflanzengewebe wurde unter Zugabe von Sand und dest. Wasser in einem eisgekühlten Mörser zerrieben. Im Falle der Wurzel und Sprösslinge betrug der Wasserzusatz 0,4 ml, im Falle der Kotyledone 1 ml auf 1 g von frischem Material. Nach Zentrifugierung wurden die unlöslichen Teile verworfen und der Extrakt 20—24 Stunden lang gegen 30—50 malige Menge dest. Wasser bei 4° dialysiert. Der während der Dialyse ausfallende Niederschlag wurde abgeschleudert und der klare Supernatant untersucht.

Zwecks Reinigung des Fermentes wurde das Eiweiss der Extrakte mit Ammoniumsulfat fraktioniert. Das niedergefällte Eiweiss in 5—10 ml dest. Wasser suspendiert, wurde in der oben beschriebenen Weise der Dialyse unterworfen. Zur Untersuchung kam der klare Supernatant.

Die Substrate wurden als Na-Salze (ATP, ADP, AMP und anorganisches Pyrophosphat-Handelspräparate), K-Salze (Fruktose-1,6-Diphosphat und Glukose-1-Phosphat) oder Mg-Salze (Magnesium Glycerophosphat) hinzugegeben.

Es wurde die aufsteigende Papierchromatographie auf dem Papier Whatman 1 angewandt. Die bewegliche Phase stellte eine Mischung von: 75 ml Isopropanol, 25 ml dest. Wasser, 5 g Trichloressigsäure und 0,3 ml 21% Ammoniak dar [6]. Die Laufzeit der Chromatogramme bei Zimmertemperatur (Papierbogen 28×35 cm) in Anwesenheit von 100 ml Lösungsmittels betrug 18—20 Stunden. Das lufttrockene Chromatogramm wurde mit Hanes und Isherwoodschen Lösung [7] besprüht, 3—5 Minuten lang auf 90—95° erhitzt und dann 5—10 Minuten lang den Strahlen der UV-Lampe ausgesetzt [2]. Nach 1—2 Stunden wurde das Chromatogramm durch Eintauchung in das geschmolzene Paraffin fixiert.

Phosphor wurde nach der Fiske und Subbarowschen Methode (von Lohmann und Jendrassik [13] modifiziert), Eiweiss nach der Biuret-Methode [5] kolorimetrisch bestimmt. Die Extinktion wurde im Pulfrich Photometer unter Verwendung des Filters S66 für Phosphat und S57 für Eiweiss abgelesen. pH-Bestimmung war mittels eines Lampen-pH-meters mit Glas- und Kalomel-Elektrode durchgeführt.

Die Inkubation von 1 ml der Mischung von 0,1—0,2 ml des enzymatisch aktiven Präparat, 5 μ Molen Substrat und bzw. anderer Substanzen in 0,1 M Puffer dauerte 15—30 Minuten. Die Reaktion wurde durch Versetzung mit 1 ml eisgekühlten 12% Trichloressigsäure unter-

brochen. Das abgespaltete Orthophosphat wurde in 1 ml der enteiuweissten Reaktionsflüssigkeit bestimmt. Für chromatographische Zwecke wurde diese Flüssigkeit mit 2 N NaOH gegen Bromtymolblau neutralisiert.

Die Aktivität der Präparate wird als μg des vom Substrat freigesetzten Phosphates (auf 1 mg Eiweiss bezogen) angegeben. Im Falle von Pyrophosphat als Substrat sollte die in diese Weise angegebene Aktivität halbiert werden, da 1 Mol Substrat nach Abbau 2 Molen des Orthophosphats liefert.

Chromatographische Vorversuche

In den Einleitungsexperimenten wurde die Spaltung von ATP und ADP durch die Pflanzenextrakte chromatographisch verfolgt. Als Material dienten Pflanzen bei normalem Tageslicht gezüchtet, zwischen dem 8 und 11 Tage der Keimung. Die Extrakten wurden in diesen Experimenten jeweils mit $2\mu\text{M}$ MgCl_2 , bei Zimmertemperatur inkubiert, für pH 4 und 6 im Citrat, für pH 9 im Borat-Puffer.

Bei der Inkubation der undialysierten Extrakten aus den ganzen Keimlingen mit ATP verschwindet der Substrat-Fleck und es erfolgt eine bedeutende Verstärkung des Orthophosphat-Fleckes. Im Falle von ADP als Substrat verläuft die Reaktion analog. Wenn aber beide, ATP und ADP, gleichzeitig als Substrate dienen, verschwindet nur der ATP-Fleck, der Fleck von ADP bleibt nicht nur bestehen, aber sogar wird stärker und zugleich eine Verstärkung des Orthophosphat-Fleckes wird beobachtet. In allen Fällen wird ein schwacher Fleck an Stellung von AMP sichtbar. Eingeführtes Pyrophosphat unterliegt in diesen Bedingungen keiner Spaltung.

Die aus den Wurzeln und Sprösslingen getrennt hergestellten Extrakte weisen dieselbe Wirkung auf, wie die aus den ganzen Keimlingen.

Die Extrakte aus Kotyledonen wirken auf ATP oder ADP genau so wie die aus den Keimlingen. Im Falle der gleichzeitigen Zugabe beider Substrate verschwinden die Flecken beider, der Fleck von Orthophosphat wird stärker und es kommt ein schwacher, dem AMP entsprechender Fleck zum Vorschein.

Die undialysierten Extrakte weisen eine derartige Wirkung bei pH 9 und 6 — aber nicht bei pH 4 auf. Die dialysierten Extrakte behalten ihre Wirkung bei pH 6, sind aber bei pH 4 und 9 unwirksam.

Bei der Inkubation der dialysierten Extrakte ohne Mg^{2+} -Zugabe sowie in der Anwesenheit von $0,5\mu\text{M}$ EDTA lässt sich chromatographisch kein Unterschied zwischen der, und der bei Mg-Zugabe verlaufenden ATP- und ADP-Spaltung feststellen. Durch die Einführung von $2\mu\text{M}$ Hg^{2+} wird die ATP- und ADP-Spaltung vollständig und

von 100 μ Molen NaF teilweise gehemmt. Die Erhitzung der Extrakte 2 Minuten lang auf 100° oder 10 Minuten lang auf 50° inaktiviert sie vollständig.

Reinigung des Präparates

Auf Grund der Ergebnisse der chromatographischen Versuche wurde die Reinigung des Fermentes mittels Ammoniumsulfat-Fraktionierung vorgenommen. Es wurde festgestellt, dass die enzymatische Aktivität

Tabelle 1

Adenosintriphosphatase- und Pyrophosphatase-Aktivität der 16-tägigen Bohnenkeimlinge

(0,2 ml Präparat**), 5 μ Molen Substrat, 2 μ Molen MgCl₂, 0,1M-Citratpuffer zu 1 ml; pH 6; Zimmertemperatur, 20 Minuten)

Präparat	freigesetztes Orthophosphat (μ g P/mg Eiweiss)		
	aus ATP	aus ADP	aus PP
Extrakt aus den grünen Pflanzen	28	11	11
Extrakt aus den etiolierten Pflanzen	39	17	10
A-Fraktion aus den grünen Pflanzen	500	220	200
A-Fraktion aus den etiolierten Pflanzen	440	240	200

**) Pflanzenextrakte von Eiweissgehalt 3 mg/0,2 ml
A-Fractionen: ausfallend bei 0,33—0,54 der Ammoniumsulfatsättigung,
Eiweissgehalt 0,2 mg/0,2 ml

gegen Adenylnukleotide mit der bei 0,33—0,50 der Sättigung ausfallenden Eiweissfraktion (A-Fraktion) gebunden ist.

Aus den in der Tabelle 1 angeführten Daten geht hervor, dass die aus den ganzen Keimlingen im 16 Tage der Keimung angefertigten dialysierten Extrakte sowie deren A-Fraktion — ausser ATP und ADP auch das Pyrophosphat spalten. Die etiolierten Keimlinge weisen dieselbe enzymatische Wirkung und in demselben Grade wie die grünen auf.

Der pH- und Temperatur-Einfluss auf die ATP und Pyrophosphat-Spaltung wurde mit der A-Fraktion aus den grünen Keimlingen sowie aus Kotyledonen im 21 Tage der Keimung verfolgt.

Wie die Abb. 1 zeigt liegt das Optimum der ATP-Spaltung bei pH 6—7, der Pyrophosphat-Spaltung dagegen bei pH 3—4. Der Reaktionsverlauf ist von dem angewandten Puffer abhängig. Die Substratspaltung in demselben pH-Bereich ist viel intensiver im Citratpuffer als im Azetat- oder Boratpuffer. Das pH-Optimum ist aber von dem angewandten Puffer unabhängig. Die A-Fraktion aus Kotyledonen verhält sich in dieser Beziehung der entsprechenden Fraktion aus Keimlingen ähnlich (Abb. 2).

Die Abb. 3 und 4 stellen den Temperatureinfluss auf die enzymatische Wirkung der A-Fractionen der Keimlings- und der Kotyledonextrakte entsprechend dar. Der Kurvenverlauf ist für beide Präparate im allgemeinen ähnlich, obwohl die bedeutend niedrigere spezifische Aktivität

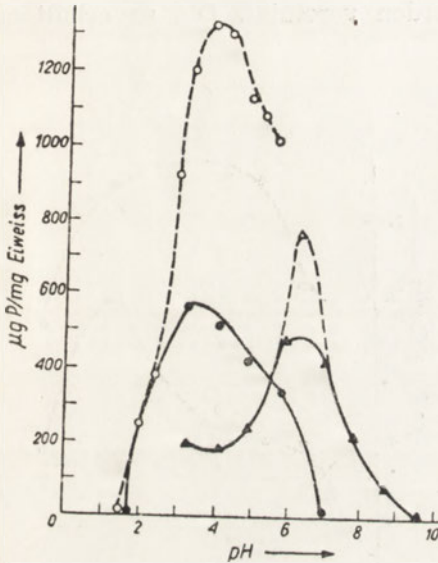


Abb. 1. pH-Abhängigkeit der Adenosin-triphosphorsäure- und Pyrophosphat-Spaltung unter dem Einfluss von Bohnenkeimlingsextrakten

A-Fraktion aus den 21-tägigen Keimlinge (bei 0,33–0,50 der Sättigung von Ammoniumsulfat gefällt), Eiweissgehalt 20 mg/ml, 0,1 ml Präparat, 5 μ Molen Substrat, 2 μ Molen $MgCl_2$, 0,1 M-Puffer zu 1 ml, bei 20° ($\pm 2^\circ$), 20 Minuten

Azetat- und Boratpuffer ATP \blacktriangle — \blacktriangle
 PP \bullet — \bullet
 Citratpuffer ATP \triangle --- \triangle PP \circ --- \circ

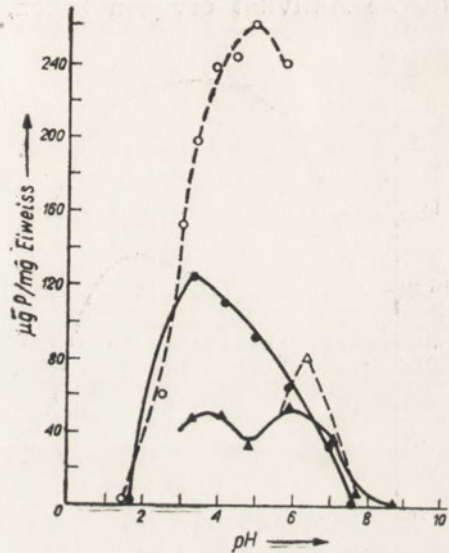


Abb. 2. pH-Abhängigkeit der Adenosin-triphosphorsäure- und Pyrophosphat-Spaltung unter dem Einfluss der Kotyledonextrakten

Inkubiert wie bei Abb. 1. angegeben
 Eiweissgehalt des Präparates 200 mg/ml
 Azetat- und Boratpuffer ATP \blacktriangle — \blacktriangle
 PP \bullet — \bullet
 Citratpuffer ATP \triangle --- \triangle PP \circ --- \circ

der Kotyledonpräparate den Vergleich erschwert. Die Reaktionsgeschwindigkeit nimmt im Bereich von 20–35° gleichmässig zu. Der Kurvenverlauf im Bereich von 35–50° ist für jedes Präparat ein anderer, bei 50° aber brechen beide Kurven ab.

Die, aus diesen Versuche gewonnenen Ergebnisse haben uns zu der Annahme veranlasst, dass die A-Fraktion zwei verschiedene Fermente:

ATP-ase und Pyrophosphatase enthält. Zwecks ihrer Trennung wurde der Extrakt aus den 23-tägigen Bohnenkeimlinge nach Schema I fraktioniert. In den einzelnen Fraktionen war die spezifische Aktivität gegen ATP und PP kontrolliert (Tabelle 2).

Die als I B und II B bezeichneten Fraktionen, welche die grösste spezifische Aktivität erwiesen haben, wurden vereinigt. Die so erhaltene

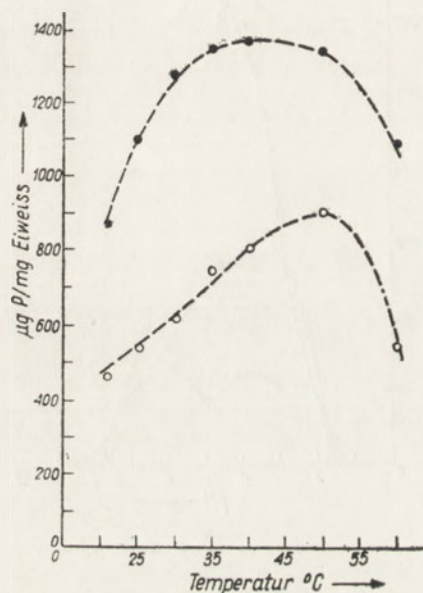


Abb. 3. Temperatur-Abhängigkeit der Adenosintri-phosphorsäure- und Pyrophosphat-Spaltung unter dem Einfluss der Bohnenkeimlingsextrakten

A-Fraktion aus den 21-tägigen Keimlinge (bei 0,33—0,50 der Sättigung von Ammoniumsulfat gefällt), Eiweissgehalt 20 mg/ml, 0,1 ml Präparat, 5 μ Molen Substrat, 2 μ Molen MgCl, 0,1 M-Citratpuffer zu 1 ml, 20 Minuten, bei pH6 für ATP und pH 4 für PP

ATP ○---○ PP ●---●

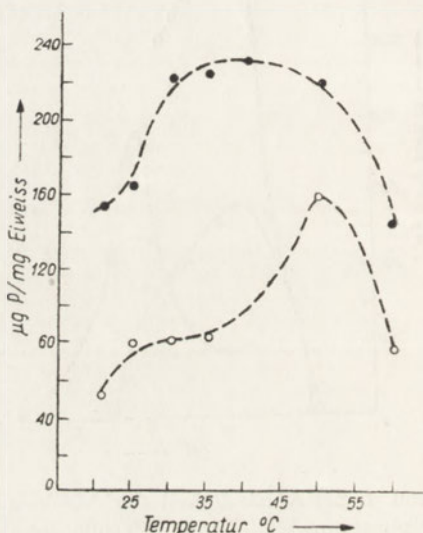


Abb. 4. Temperatur-Abhängigkeit der Adenosintri-phosphorsäure- und Pyrophosphat-Spaltung unter dem Einfluss von Kotyledonextrakte

Inkubiert wie bei Abb. 3 angegeben. Eiweissgehalt des Präparates 200 mg/ml

ATP ○---○ PP ●---●

10 ml Flüssigkeit von einem Eiweissgehalt von ca. 15 mg wurden nochmals mit Ammoniumsulfat fraktioniert und die Subfraktionen jedes Mal in 5 ml dest. Wasser suspendiert. Tabelle 3 führt die Aktivitäten der so erlangten Subfraktionen an.

Es wurde festgestellt, dass die wenig aktiven Subfraktionen 1 und 4 insgesamt ca. 5 mg Eiweiss enthalten. Denselben Eiweissgehalt weist auch

Schema I

Fraktionierung des Wassereextraktes aus Keimlingen

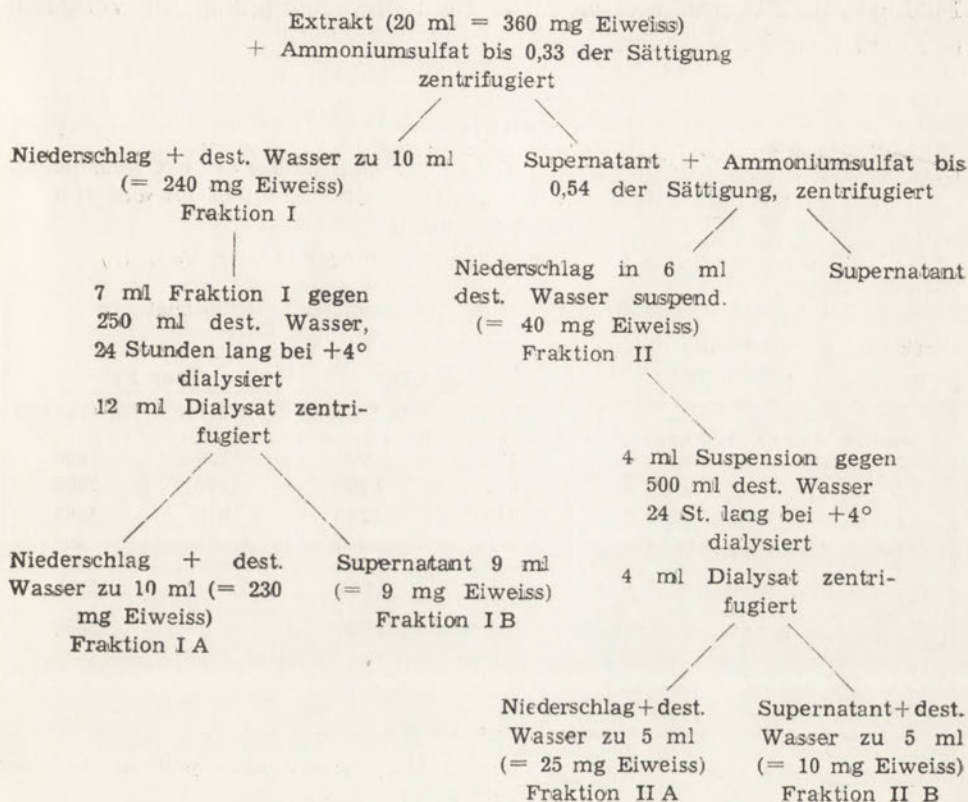


Tabelle 2

Die Aktivität der Adenosintriphosphatase und Pyrophosphatase während der Fraktionierung der Wassereextrakte aus Bohnenkeimlingen (nach Schema I)

(0,1 ml Präparat, 5 μ Molen Substrat, 0,1 M-Citratpuffer zu 1 ml, Temperatur 40° ($\pm 2^\circ$), 20 Minuten, bei pH 6 für ATP und pH 4 für PP)

Fraktion	freigesetztes Orthophosphat (μ g P, mg Eiweiss)	
	aus ATP	aus PP
Extrakt	100	102
Fraktion I	55	42
Fraktion II	236	242
Fraktion IA	16	36
Fraktion IB	560	840
Fraktion IIA	12	20
Fraktion IIB	620	1080

die Subfraktion 3 auf. In der Subfraktion 2 finden wir daher eine spezifische Aktivität gegen ATP von $840 \mu\text{g P/mg Eiweiss}$ und gegen PP von $1400 \mu\text{g P/mg Eiweiss}$, was eine 10—15 malige Reinigung im Vergleich mit dem Extrakt bedeutet.

Tabelle 3

Die Aktivität der Adenosintriphosphatase und Pyrophosphatase der mit Ammoniumsulfat niedergefallenen Subfraktionen der vereinigten Fraktion IB und IIB (nach Schema I)

(Zusammensetzung und Inkubationsbedingungen wie in Tab. 2)

Fraktion Nr.	Sättigung mit Ammoniumsulfat	freigesetztes Orthophosphat ($\mu\text{g P/mg Eiweiss}$)			
		aus ATP		aus PP	
		in 1 ml	im Ganzen	in 1 ml	im Ganzen
1.	0,0 — 0,3	120	600	120	600
2.	0,3 — 0,4	840	4200	1400	7000
3.	0,4 — 0,5	440	2200	840	4200
4.	0,5 — 0,6	0	0	80	400
Insgesamt die Aktivität		7000		12200	
Die gesamte ursprüngliche Aktivität der Lösung		9000		15000	

Tabelle 4

Der Verlauf der Adenosintriphosphorsäure- und Pyrophosphat-Spaltung bei der Temperatur 40°

(1 ml Fraktion 2 von 1 mg Eiweissgehalt, $25 \mu\text{M}$ Molen Substrat 0,1 M-Citratpuffer zur 10 ml, pH 6 für ATP und pH 4 für PP, Einzelproben von 1 ml zu 1 ml 12% Trichloressigsäure hineinpipettiert)

Inkubationsdauer (Min.)	freigesetztes Orthophosphat ($\mu\text{g P/mg Eiweiss}$)		Substratspaltung (%)	
	aus ATP	aus PP	ATP*)	PP
1	40	160	2,5	5
2	120	240	8	8
3	200	360	13	12
4	280	440	18	14
5	320	520	21	17
8	360	760	23	24
11	480	880	31	28
15	560	1080	36	35
20	800	1320	52	43

*) Die prozentige ATP-Spaltung wurde, unter der Voraussetzung dass nur ein Phosphatrest abgespalten wird, berechnet.

Die erste Ammoniumsulfat-Fraktionierung hat den Verlust von ca. 30% der Aktivität zu Folge. Nach der Dialyse wird die Aktivität der Fraktion II, welche die höchste spezifische Aktivität aufweist, gegen ATP um 30% niedriger, gegen PP aber bleibt die ursprüngliche Aktivität bestehen. Eine zweite Fraktionierung mit Ammoniumsulfat vermindert die Aktivität gegen beide Substrate um 20—25%. Keine von dieser Operationen hat zur Trennung der ATP-ase von PP-ase geführt.

Tabelle 5

Der Verlauf der Adenosintriphosphorsäurespaltung bei 20°

(0,2 ml der A-Fraktion von 0,15 mg Eiweißgehalt wurde bei den in Tab. 1 angegebenen Bedingungen inkubiert)

Inkubationsdauer (Min.)	freigesetztes Orthophosphat ($\mu\text{g P/mg Eiweiß}$)	ATP-Spaltung* (%)
4	233	28
14	346	34
24	400	39
30	400	39

*) wie im Tab. 4 errechnet.

Tabelle 6

Substratspezifität der Extrakte aus den 21-tägigen Bohnenkeimlinge

(0,2 ml der A-Fraktion von 0,06 mg Eiweißgehalt, 5 μM Substrat, 0,1 M-Citratpuffer zu 1 ml, bei 30°, 20 Minuten)

Substrat	pH der Inkubationsmischung	freigesetztes Orthophosphat ($\mu\text{g P/mg Eiweiß}$)
ATP	6	800
PP	4	1000
AMP (aus Hefe)	6	130
AMP (aus Hefe)	4	330
Magnesium Glycerophosphat	6	330
Magnesium Glycerophosphat	4	200
Glukose-1-Phosphat	6	0
Glukose-1-Phosphat	4	0
Fruktose-1,6-Diphosphat	6	0

Wenn die Fraktion II nach der ersten Fällung mit Ammoniumsulfat ohne Dialyse, mit 96% Äthanol bei Zimmertemperatur fraktioniert wird, werden beide Aktivitäten in der bei 1,5—2,0 vol. Alkohol ausfallenden Fraktion in demselben Verhältnis wiedergefunden. Aktivitätsverlust bei dieser Operation überschreitet nicht 15%.

Reaktionsgeschwindigkeit. Der Zeitverlauf der Substratspaltung war bei Anwendung der Subfraktion 2 im Citratpuffer bei einem, dem Substrat entsprechenden, optimalen pH verfolgt. Die Daten über die bei 40° durchgeführten Experimente sind in Tabelle 4 angeführt.

Die Inkubation wurde nach 20 Minuten, ohne den Gleichgewicht zu erreichen, unterbrochen. Aus diesen Daten geht hervor, dass die Spaltungsgeschwindigkeit für beide Substrate die gleiche ist. Bei 20° dagegen A-Fraktion der Auszüge aus den 23-tägigen Keimlingen gegen 20 Minute des Inkubationsdauer den Gleichgewicht bei 40% ATP-Spaltung erreicht (Tabelle 5).

Spezifität. Auf die Spezifität wurde die A-Fraktion der Extrakte aus den 21-tägigen grünen Keimlinge untersucht. Die einzelnen Substrate wurden sowohl bei pH optimalen für ATP-ase wie auch beim pH optimalen für PP-ase inkubiert. Die Ergebnisse sind aus Tabelle 6 ersichtlich.

Inhibitoren und Aktivatoren

Der Einfluss der Inhibitoren sowie Aktivatoren auf beide enzymatische Tätigkeiten der A-Fraktion der Pflanzenextrakte wurde bei den für jede Funktion entsprechend optimalen Bedingungen untersucht.

NaF in der Konzentration von $5 \times 10^{-3} M$ hemmt bei der Inkubation ohne Magnesiumzusatz beide Funktionen, jede in verschiedenem Grade: PP-ase — 100%, ATP-ase nur in 24%. Die zweifache Fluoridkonzentration erhöht unter diesen Bedingungen die ATP-ase Hemmung nur auf 38%. In Anwesenheit von Magnesium hemmt Fluorid in der Konzentration von $1 \times 10^{-1} M$ die PP-ase nur in 61%, die ATP-ase aber in 85%.

In Anwesenheit von Magnesium hemmt Hg^{2+} (als $HgCl_2$) in der Konzentration von $2 \times 10^{-3} M$ beide Funktionen in 92%. Cu^{2+} (als $CuCl_2$) in derselben Konzentration ohne Magnesiumzusatz übt keine hemmende Wirkung aus, beide Funktionen sind in diesen Bedingungen sogar um ca. 10% stimuliert. Die ekwimolare im Bezug auf Hg (d. h. $2 \times 10^{-3} M$) Konzentration von para-Chlor-Mercurium-Benzoat hemmt ohne Magnesiumzusatz die ATP-ase in 75%, die Konzentration von $4 \times 10^{-3} M$ hemmt sie vollständig.

Die Untersuchungen über den Einfluss von Mg^{2+} (als $MgCl_2$) ergaben nachstehende Resultate: die Konzentration von $2 \times 10^{-3} M$ von Mg^{2+} übt in den Präparaten mit niedrigerer¹⁾ spezifischen Aktivität (aus Kotyledonen), eine leichte (10—20%) Hemmung beider Funktionen aus, die Präparate mit höherer spezifischen Aktivität (aus Keimen) werden nicht gehemmt. Durch die Magnesiumkonzentration von $4 \times 10^{-3} M$ wird die APT-ase auch in den Präparaten von höherer spezifischen Aktivität in

¹⁾ Als niedrigere wurde die spez. Aktivität unter $100 \mu g$ P/mg Eiweiss angesehen.

30% gehemmt und die PP-ase wird überhaupt nicht beeinflusst. Die PP-ase wird aber bei pH 6 durch 2×10^{-3} M Magnesium in Präparaten aus Kotyledonen wie auch in den aus Keimlingen entsprechend in 20% und 40% gehemmt.

A-Fraktion lässt sich in Ammoniumsulfat-Lösung bei +4° ohne Aktivitätsverlust 2–3 Monate lang aufbewahren. Die dialysierten, wässrigen Lösungen dieser Fraktion weisen nach 10–14 Tagen keinen Aktivitätsverlust auf, werden aber nach 8 Wochen solcher Aufbewahrung vollständig unwirksam.

DISKUSSION

Die Aufspaltung von ATP und Pyrophosphat unter dem Einfluss unserer Präparate scheint von zwei verschiedenen spezifischen Fermenten katalysiert zu werden, obwohl während der Vorreinigung die Trennung beider Funktionen nicht erreicht wurde. Folgende Differenzen wurden zwischen den beiden Funktionen festgestellt: 1° Verschiedenes pH-Optimum. 2° Ein anderer Verlauf der Temperaturabhängigkeitskurve für jedes Ferment. 3° Verschiedenes Verhalten beim Magnesium- und Fluorid-Zusatz.

Die Präparate die beide enzymatische Funktionen aufweisen üben keine Wirkung gegen mono- und -diphosphorigen Ester der Hexosen aus.

Die Ergebnisse der mit den PP-asefreien Präparaten durchgeführten chromatographischen Versuche deuten darauf, dass es sich nicht um eine Abspaltung zweier Phosphatreste von ATP in Form eines Pyrophosphates handelt. ADP und AMP werden zwar durch dieses Präparat auch abgebaut, es geschieht aber höchstens mit der Hälfte von ATP-Abbaugeschwindigkeit. Diese Tatsachen, sowie der chromatographisch verfolgte Verlauf der Spaltung von ATP in Anwesenheit von ADP und Zeitverlauf der ATP-Spaltung bei Zimmertemperatur (Tabelle 5) sprechen dafür, dass in der Pflanze unter normalen Bedingungen dieses Ferment nur einen Phosphatrest von ATP abspaltet, und daher nicht als Apyrase angesehen werden kann [1, 10, 11]. Das pH-Optimum für die ATP-ase Wirkung stimmt mit dem pH frischer Homogenate der Bohnenkeimlinge überein.

Die PP-ase kann wegen des pH-Optimums von 3,8–4,0 zum Typus III der Pyrophosphatase nach Roche [16] klassifiziert werden. Das Ferment ist nicht Magnesiumabhängig. Obwohl die PP-ase Aktivität nach Überschreitung des pH-Optimums schnell abnimmt, ist sie bei pH 6 immer noch genügend um ihren Anteil an dem normalen Metabolismus der Pflanze anzunehmen.

Der Verlauf der Kurven für die Temperaturabhängigkeit beider Funktionen weist auf eine termische Inaktivierung bei 50° hin. Auch chromatographisch lässt sich feststellen, dass die 10 Minuten auf 50° erhitzten dialysierten Extrakte gegen ATP inaktiv sind. Diese Temperatur entspricht dem für andere pflanzlichen Fermente [4] beobachteten Schwankungsbereich der kritischen Inaktivierungstemperatur (50% Aktivitätsverlust in 1 Stunde). Es stimmt auch mit der Temperatur der Todeshitze für Blätter, die für Pflanzen des gemäßigten Klima 55—60° beträgt [14]. In unserem kurzdauernden Versuchen war die termische Aktivierung der Fermente ausreichend um in dem Temperaturbereich von 45—50° ein Optimum (Geschwindigkeitsmaximum der Spaltung) zu verursachen.

Es ist wahrscheinlich, dass zur ATP-ase Wirkung ein dialysierender Faktor notwendig ist, da die ATP-ase Aktivität der Präparate durch die Dialyse abnimmt. Es ist aus den entsprechenden Versuchen ersichtlich, dass sich dabei nicht um Mg^{2+} handeln kann.

Die mindestens zweimal höhere Aktivität beider Fermente im Citratpuffer im Vergleich zu dem Azetatpuffer unter sonst gleichen Bedingungen, können wir nicht erklären. Es ist möglich, dass dieser Effekt auf der Bindung des hemmend wirkenden Calcium beruht. Beide Aktivitäten sind in den etiolierten sowie den grünen Keimlingen zu beobachten, was einen unmittelbaren Zusammenhang zwischen ihnen und den photosynthetischen Prozessen zweifelhaft erscheinen lässt.

ZUSAMMENFASSUNG

Keimende Bohnen (*Phaseolus vulgaris*) wurden zwischen dem 8 und 23 Tage der Keimung untersucht.

1. In wässrigen Extrakten wurde die Anwesenheit zweier enzymatischen Funktionen: der ATP-ase und der sauren Pyrophosphatase festgestellt.

2. Mittels Fraktionierung mit Ammoniumsulfat und Dialyse wurden die Fermente zehnfach bis fünfzehnfach gereinigt. Bis zu diesem Reinigungsgrad wurde die Trennung beider Funktionen nicht erreicht. Das erhaltene Präparat wies keine Phosphomonoesterase Aktivität auf.

3. Die ATP-ase wirkt optimal bei pH 6, wird von Mg^{2+} in der Konzentration $10^{-3}M$ gehemmt, die Aktivität nimmt während der Dialyse ab; Fluorid in der Konzentration von $10^{-3}M$ hemmt in etwa dreissig Prozenten.

4. Die PP-ase wirkt optimal bei pH 4, wird durch $10^{-3}M$ Mg^{2+} nicht aktiviert, die Dialyse ist auf die Aktivität ohne Einfluss; Fluorid in der Konzentration von $10^{-3}M$ hemmt vollständig.

5. Beide Fermente werden durch 10^{-3}M Hg^{2+} gehemmt, dieselbe Konzentration von Cu^{2+} hat, dagegen sogar eine leicht stimulierende Wirkung.
6. Beide Fermente erleiden bei der Temperatur über 50° nach einigen Minuten eine termische Inaktivierung.
7. Beide Fermente wurden in Keimlingen der grünen sowie etiolierten Pflanzen gefunden.

LITERATUR

- [1] Axelrod B., *J. Biol. Chem.* **167**, 57, 1947.
- [2] Bandurski R. S., Axelrod B., *J. Biol. Chem.* **193**, 405, 1951.
- [3] Bergkvist R., *Acta Chem. Scand.* **10**, 1303, 1956.
- [4] Booth R. G., *Biochem. J.* **38**, 355, 1944.
- [5] Gornall A. G., Bardawill C. S., David M. M., *J. Biol. Chem.* **177**, 751, 1949.
- [6] Grunze H., Thilo E., *Papierchromatographie der kondensierten Phosphate*, Akademie Verlag, Berlin, 1955.
- [7] Hanes C. S., Isherwood F. A., *Nature* **164**, 1107, 1949.
- [8] Kornberg A., Pricer W. E. jr., *J. Biol. Chem.* **182**, 763, 1950.
- [9] Kornberg A., *J. Biol. Chem.* **182**, 779, 1950.
- [10] Krishnan P. S., *Arch. Biochem.* **20**, 261, 1949.
- [11] Krishnan P. S., *Arch. Biochem.* **20**, 272, 1949.
- [12] Lee K., Eiler J. J., *Science* **113**, 393, 1951.
- [13] Lohmann K., Jendrassik L. *Biochem. Z.* **178**, 419, 1926.
- [14] Rabinowitsch E. I., *Photosynthesis and Related Processes*, Interscience Publ. Inc., New York, 1956, vol. II, s. 1211.
- [15] Roberts D. W. A., *J. Biol. Chem.* **219**, 711, 1956.
- [16] Roche J., in *The Enzymes*, J. B. Sumner, K. Myrbäck, vol. I, part. I, Academic Press, New York, 1950, s. 473.

PIROFOSFATAZA I ADENOZYNOTRÓJFOSFATAZA W KIELKACH FASOLI

Streszczenie

Badano kiełkującą fasolę (*Phaseolus vulgaris*) pomiędzy 8 a 23 dniem wzrostu.

1. Stwierdzono w wyciągach wodnych obecność dwu czynności enzymatycznych: ATP-azy i pirofosfatazy kwaśnej.

2. Enzymy oczyszczono 10—15-krotnie stosując frakcjonowanie siarczanem amonu i dializę. Do tego stopnia oczyszczenia nie udało się rozdzielić obu funkcji. Otrzymany preparat nie wykazywał aktywności fosfoesterazy.

3. ATP-aza wykazuje optymalne pH działania 6; Mg^{2+} w stężeniu 10^{-3}M hamuje ją, dializa obniża aktywność preparatu, a fluorek w stężeniu 10^{-3}M hamuje w około 30%.

4. PP-aza wykazuje optymalne pH działania 4; Mg^{2+} w stężeniu $10^{-3} M$ nie aktywuje jej, dializa nie wpływa na czynność preparatu a fluorek w stężeniu $10^{-3} M$ hamuje całkowicie.

5. Oba enzymy są hamowane przez Hg^{2+} w stężeniu $10^{-3} M$ a nie są hamowane, a nawet są lekko stymulowane takimi samymi stężeniami Cu^{2+} .

6. Oba enzymy w temperaturze powyżej 50° ulegają w ciągu kilku minut inaktywacji cieplnej.

7. Oba enzymy znaleziono zarówno w kiełkach roślin zielonych jak i etiolowanych.

Otrzymano 22.3.1958 r.

I. REIFER, J. PRZEŹDZIECKA i D. KLECZKOWSKA

CHROMATOGRAFICZNA METODA ILOŚCIOWEGO OZNACZANIA ALKALOIDÓW ŁUBINOWYCH

*Katedra Biochemii Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego i Zakład Biochemii
Roślin Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN, Warszawa
Kierownik: prof. dr Ignacy Reifer*

Jaminet [1], Wiewiórowski i Bratek [6] oraz Schwarze i Hackbarth [5] zastosowali metodę chromatografii bibulowej do wykrywania alkaloidów łubinowych. Do rozdziału czterech głównych alkaloidów występujących w łubinach gorzkich, a mianowicie lupaniny, hydroksylupaniny, sparteiny i lupininy, wymienieni autorzy stosowali dwa względnie trzy układy rozwijające, ponieważ w każdym układzie dwa alkaloidy posiadały bardzo zbliżone R_f .

Niniejsza praca miała na celu zbadanie wpływu oczyszczania wyciągów alkaloidów w zastosowaniu do ich ilościowego oznaczania metodą chromatograficzną oraz opracowanie takiej fazy rozwijającej, która umożliwiałaby rozdział wszystkich czterech alkaloidów i ich oddzielne oznaczenie po elucji z bibuły.

CZĘŚĆ DOSWIADCZALNA

Do chromatograficznego rozdziału alkaloidów stosowano technikę krążkową używając bibuły Whatman nr 3. Wycinano krążki o średnicy 15 cm, język długości 5 cm i szerokości 3 mm. Roztwory wodne względnie chloroformowe alkaloidów наносzono na obwodzie koła o średnicy 2,5 cm na wycinkach o długości od 0,5 cm i więcej w zależności od zawartości alkaloidów w próbie. Roztwory alkaloidów nakraplano odmierzając pipetami Carlsberga i suszono na zimno.

Stosowano fazę rozwijającą o składzie *n*-butanol nasycony kwasem solnym-toluen (4:1). Fazę przygotowano w następujący sposób: 100 ml *n*-butanolu wytrząsano w rozdzielaczu z 300 ml około 10% kwasu solnego (HCl o d. 1,19 rozcieńczony 3 objętościami wody). Po oddzieleniu fazy wodnej (A) od fazy alkoholowej tę ostatnią wytrząsano z 25 ml toluenu.

T a b l i c a 1

Odzyskanie alkaloidów z mieszaniny po rozdziale chromatograficznym

Lp.	Hydroksylupanina			Sparteina			Lupanina			Lupinina		
	na-krop-lono (μg)	wy-kryto (μg)	róż-nica (%)	na-krop-lono (μg)	wy-kryto (μg)	róż-nica (%)	na-krop-lono (μg)	wy-kryto (μg)	róż-nica (%)	na-krop-lono (μg)	wy-kryto (μg)	róż-nica (%)
1	11,0	10,6	-3,6	6,7	6,6	-1,5	10,0	9,8	-2,0	6,4	6,4	0,0
2	22,0	22,0	0,0	13,4	13,4	0,0	20,0	20,0	0,0	12,8	13,0	+1,6
3	11,0	11,0	0,0	20,1	20,0	-0,5	10,0	9,8	-2,0	25,6	25,0	-2,3
4	55,0	55,5	+0,9	6,7	6,6	-1,5	50,0	49,0	-2,0	6,4	6,2	-3,1
5	64,8	62,0	-4,3	6,7	6,6	-1,5	—	—	—	—	—	—
6	5,4	5,0	-7,4	53,6	51,2	-4,5	—	—	—	—	—	—
7	—	—	—	6,7	6,8	+1,5	60,0	61,5	+2,5	—	—	—
8	—	—	—	93,8	96,0	+2,3	10,0	9,2	-8,0	—	—	—
9	—	—	—	—	—	—	60,0	61,0	+1,6	6,1	5,6	-8,2
10	—	—	—	—	—	—	10,0	10,2	+2,0	85,4	79,0	-7,5

W przypadku bardzo niskich względnie bardzo wysokich stężeń alkaloidów ekstrahowano je z bibuły do odpowiednio mniejszej lub większej ilości chloroformu.

Górną fazę butanol-toluen (B) sączono przez bibułę. Faza ta jest trwała i nie wymaga regeneracji.

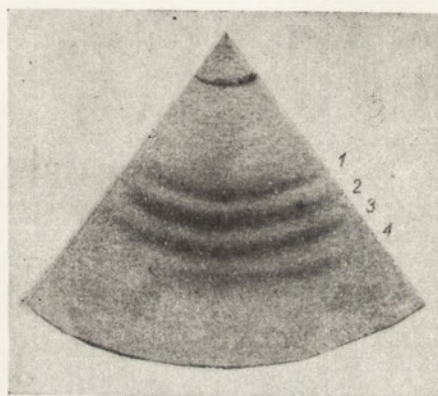
W eksykatorze o średnicy 21 cm umieszczano szalkę Petriego o średnicy 10 cm, zawierającą ok. 15 ml kwasu solnego nasyconego butanolem (A). Na środku szalki ustawiano naczynko wagowe (wysokość 4 cm, średnica 25 mm), do którego wlewano ok. 5 ml fazy B. Otwór naczynka zwięzano za pomocą nie wystającej ponad brzegi naczynka obrączki z korka z otworem o średnicy 10 mm. Odległość między bibułą a powierzchnią fazy wynosiła do 3,5 cm. Eksykatory uszczelniano plasteliną.

Chromatogramy rozwijano przez 24 godziny, suszono na zimno za pomocą suszarki fryzjerskiej i spryskiwano odczynnikami Dragendorffa w modyfikacji Muniera i współpr. [3]. Plama lupininy po spryskaniu odczynnikami Dragendorffa jest mało intensywna, jest ona dobrze widoczna dopiero po wysuszeniu.

Plamy poszczególnych alkaloidów wycinano, cięto na poprzeczne skrawki, zwilżano 0,4 N roztworem wodorotlenku sodowego (od 0,4—1,0 ml) i ekstrahowano chloroformem 4 razy po 5 ml. Zawartość alkaloidu w wyciągu chloroformowym oznaczano kolorymetryczną metodą Reifera

i Niziołka [4] ¹⁾. Oznaczenia wg tej metody należy przeprowadzać w pomieszczeniach absolutnie wolnych od par lotnych kwasów i zasad.

Wymienioną fazę rozwijającą przebadano na mieszaninie roztworów czystych alkaloidów. Jak wynika z tablicy 1, oznaczenia każdego z czterech alkaloidów po elucji z chromatogramów są zgodne z wynikami bezpośrednimi oznaczeń kolorymetrycznych na czystych roztworach. W tabelicy podano średnie wartości z 2—4 równoległych oznaczeń.



Rys. 1. Rozmieszczenie poszczególnych alkaloidów na chromatogramie: 1. hydroksylupanina, 2. sparteina, 3. lupanina, 4. lupinina

Odległości między poszczególnymi alkaloidami na chromatogramie są dostatecznie duże, tak że rozdzielenie bezpośrednio położonych obok siebie zasad jest możliwe nawet wówczas, gdy znajdują się one w stosunku 1 : 10. Na rys. 1 przedstawiony jest układ poszczególnych alkaloidów na chromatogramie, przy czym R_0 hydroksylupaniny, sparteiny i lupaniny w odniesieniu do lupininy wynosi 0.57, 0.71, 0.86.

Dla sprawdzenia przydatności opracowanej metody chromatograficznej do oznaczania alkaloidów w materiale roślinnym przeanalizowano nasiona i zielone części łubinu wąskolistnego, białego i żółtego. Ekstrakcję alkaloidów z roślin przeprowadzono metodą Reifera i Niziołka [4]. Na chromatogramach obok znanych alkaloidów stwierdzono obecność dodatkowych plam. Plamy te w miarę wzrastających wartości R_0 nazwano P_1 , P_2 itd. W tabelicy 2 zestawiono wyniki oznaczeń zawartości alkaloidów w nasionach i kielkach łubinów gorzkich. Porównano wyniki oznaczeń w wyciągach z chromatogramów z wynikami bezpośrednich oznaczeń metodą Reifera i Niziołka.

¹⁾ Wata opatrunkowa stosowana w tej metodzie do sączenia wyciągów chloroformowych powinna być przed użyciem odtłuszczona eterem.

T a b l i c a 2

Porównanie oznaczeń alkaloidów zawartych w oczyszczonych wyciągach z łubinu i rozdzielonych (A) metodą Reifera i Niziołka [4] oraz (B) chromatograficznie (wartości podano w % w przeliczeniu na suchą masę)

Łubin	Alkaloid	Nasiona			Kiełki		
		rozdział metodą		różnica	rozdział metodą		różnica
		A	B	(%)	A	B	(%)
Wąskolistny	P_{w1}	—	—		—	0,030*)	
	Hydroksylupanina	0,667	0,536		0,855	0,467	
	Lupanina	0,816	0,812		1,127	1,230	
	P_{w2}	—	0,115*)		—	ślady	
	P_{w3}	—	—		—	0,144*)	
	Suma	1,483	1,462	-1,4	1,982	1,871	-5,6
Biały	P_{b1}	—	ślady		—	0,310*)	
	P_{b2}	—	0,113*)		—		
	Hydroksylupanina	0,640	0,161		0,377		
	Lupanina	1,641	1,641		3,143	2,600	
	P_{b3}	—	ślady		—	0,517	
	Suma	2,281	1,915	-16,5	3,520	3,427	-2,6
Żółty	P_{z1}	—	0,106**)		—	0,026**)	
	Sparteina	0,199	0,195		0,511	0,512	
	Lupinina	0,610	0,457		0,822	0,709	
	P_{z2+3}	—	—		—	0,145**)	
	Suma	0,809	0,758	-6,3	1,333	1,292	-3,0

P_1, P_2 itd. oznaczają plamy innych zasad na chromatogramie

*) obliczone jako hydroksylupanina

***) obliczone jako lupinina

Wszystkie metody oznaczania alkaloidów w materiale roślinnym obejmują zasadniczo ekstrakcję alkaloidów, oczyszczanie wyciągu i ilościowe oznaczenie. Dlatego przy opracowywaniu opisanej metody zwrócono również uwagę, w jakim stopniu należy oczyszczać wyciągi łubinowe dla uzyskania poprawnych wyników w oparciu o ilościowy rozdział alkaloidów na chromatogramie. Przebadano nie oczyszczone chloroformowe wyciągi roślinne oraz oczyszczone jedno- i dwukrotnie [4]. Do oczyszczania ma-

T a b l i c a 3

Wyniki oznaczeń alkaloidów w zależności od oczyszczenia materiału łubinowego w % suchej masy

Lubin	Wyciąg							
	I chloroformowy		I kwaśny wodny		II chloroformowy		II kwaśny wodny	
	nasiona	kielki	nasiona	kielki	nasiona	kielki	nasiona	kielki
I. Wąskolistny								
P_{w1}	—	0,030	—	—	—	—	—	—
Hydroksylupanina	0,450*)	0,487	0,437*)	0,473	0,434*)	0,484	0,443*)	0,457
Lupanina	0,682*)	1,175	0,656*)	1,197	0,654*)	1,159	0,680*)	1,200
P_{w2}	0,135	—	0,135*)	—	0,128	—	0,133*)	—
P_{w2+3}	—	0,135	—	0,138	—	0,139	—	0,144
II. Biały								
P_{b1+2}	0,350	0,065	0,353	—	0,350	—	0,351	0,066
Hydroksylupanina	—	0,104	—	0,108	—	0,112	—	0,108
Lupanina	1,606	1,810	1,547	1,850	1,512	1,803	1,587	1,948
P_{b3}	—	0,120	—	0,121	—	0,119	—	0,110
III. Żółty								
P_{z1}	0,100	0,065	0,099	—	0,098	—	0,106	0,026
Sparteina	0,150	0,462	0,151	—	0,150	—	0,154	0,492
Lupinina	0,425	0,638	0,422	—	0,399	—	0,410	0,609
P_{z2+3}	—	0,145	—	—	—	—	—	0,145

*) średnie wartości z dwu równoległych naważek materiału

P — plamy innych zasad na chromatogramie

teriału wprowadzono dwie nieznaczne modyfikacje, a mianowicie chloroform oddestylowano pod zmniejszonym ciśnieniem oraz zaniechano oczyszczania chlorowodorków alkaloidów eterem naftowym. Wyniki przedstawiono w tabelicy 3, z której widać, że uzyskano we wszystkich przypadkach wyniki zgodne w granicach błędu metody. W oparciu o te spostrzeżenia do chromatografii używano pierwsze wyciągi chloroformowe, nie oczyszczając ich. Wyciąg chloroformowy uzupełniano do określonej objętości (zazwyczaj 50 ml) i nakraplano na bibułę 50—400 μ l. W przypadku oznaczania alkaloidów w świeżym materiale zagęszczano odpowiednio wyciąg chloroformowy pod zmniejszonym ciśnieniem przed nakropieniem na bibułę. W tabelicy 4 zestawiono wyniki analiz uzyskane metodą chromatograficzną dla materiału świeżego i suszonego w temperaturze 105°.

T a b l i c a 4

Zawartość alkaloidów w świeżych i suszonych kielkach łubinowych
(wartość podano w przeliczeniu na suchą masę)

Łubin	Alkaloid	% alkaloidów w kielkach	
		świeżych	suszonych
Wąskolistny	Hydroksylupanina	0,507	0,487
	Lupanina	1,156	1,175
	P_{w2+3}	0,137*)	0,139*)
	Suma	1,800	1,801
Biały	P_{b1+2}	} 0,311*)	0,310*)
	Hydroksylupanina		
	Lupanina	3,050	2,760
	P_{b3}	0,330	0,517
	Suma	3,691	3,587
Żółty	P_{z1}	0,086**)	0,065**)
	Sparteina	0,450	0,462
	Lupinina	0,600	0,638
	P_{z2+3}	0,143**)	0,145**)
	Suma	1,279	1,310

P — plamy innych zasad na chromatogramach

*) obliczone jako hydroksylupanina

***) obliczone jako lupinina

DYSKUSJA

Znane dotychczas metody chromatografii bibulowej alkaloidów łubinowych wymagają użycia dwóch względnie trzech układów rozpuszczalników dla przeprowadzenia rozdzielania hydroksylupaniny, sparteiny, lupaniny i lupininy. Natomiast opisana faza rozwijająca w ustalonych warunkach doświadczalnych umożliwi rozdzielanie wymienionych alkaloidów i oddzielne ich oznaczenie. Ponadto metoda chromatograficzna pozwala na wykrywanie i oznaczanie innych zasad występujących w łubinach gorzkich.

Na obecność dodatkowych zasad o charakterze alkaloidowym w wyciągach łubinowych zwrócili uwagę Wiewiórowski i Bratek [6, 7], Van der Kuy [2] oraz Schwarze i Hackbarth [5].

Na chromatogramach z nasion i kielków łubinu wąskolistnego, rozwijanych w podanym przez nas układzie, wykryto plamę odpowiadającą angustifolinie względnie lupininie. Ponieważ obie te zasady umiejscawiają się w opisanym układzie bez rozdzielania, plama P_2 odpowiada angustifolinie. Ponadto w kielkach stwierdzono dwie nieznanne zasady: jedną

w ilościach śladowych leżąca poniżej hydroksylupaniny, drugą o $R_{Li} = 1,28$.

W łubinie białym w nasionach i kielkach wykryto oprócz lupaniny i hydroksylupaniny trzy dodatkowe zasady o R_{Li} 1,27, 0,44 i jedną niewyraźną smugę poniżej hydroksylupaniny. W odróżnieniu od danych cytowanych w piśmiennictwie [2, 6] nie stwierdzono obecności sparteiny.

W nasionach łubinu żółtego zaobserwowano występowanie obok sparteiny i lupininy zasady o R_{Li} 0,52, w kielkach zaś jeszcze dwóch zasad o R_{Li} 1,44 i 1,66. Nie wykryto lupaniny i hydroksylupaniny [2].

Jak wynika z tablicy 1, w przypadku mieszaniny roztworów czystych alkaloidów uzyskano wyniki powtarzalne i obciążone niedużym błędem nawet wówczas, gdy położone najbliżej siebie alkaloidy znajdowały się w stosunku stężeń 1 : 10.

Wartości na sumę alkaloidów uzyskane metodą opisaną są zgodne z wynikami oznaczeń metodą Reifera i Niziołka w granicach błędu metody. Wykazano, że wyniki otrzymane metodą Reifera i Niziołka są zazwyczaj nieco wyższe, a różnice dochodzą do 16,0% (Tabl. 2). Nasiona i zielone części przebadanych łubinów zawierają poza znanymi alkaloidami jeszcze inne zasady reagujące zarówno z odczynnikiem Dragendorffa, jak i oranżem metylowym. W metodzie Reifera i Niziołka zasady występujące w łubinie białym i wąskolistnym oznaczane są razem z hydroksylupaniną, w łubinie zaś żółtym razem z lupininą.

Opisana metoda umożliwia oznaczanie alkaloidów w surowych wyciągach chloroformowych zarówno z materiału świeżego, jak i suszonego. Metoda ta jest szybka, pomija bowiem kłopotliwe i pracochłonne oczyszczanie materiału roślinnego.

STRESZCZENIE

1. Opisano chromatograficzną metodę oznaczania alkaloidów łubinowych.

2. Faza rozwijająca: butanol nasycony kwasem solnym-toluen (4 : 1) umożliwia rozdział hydroksylupaniny, sparteiny, lupaniny i lupininy oraz innych jeszcze nie zidentyfikowanych zasad.

3. Alkaloidy oznacza się w surowych wyciągach chloroformowych, dalsze oczyszczanie jest zbędne.

4. W łubinach: wąskolistnym, białym i żółtym wykazano chromatograficznie oprócz czterech znanych alkaloidów obecność innych zasad reagujących z odczynnikiem Dragendorffa.

LITERATURA

- [1] Jaminet Fr., *J. Pharm. Belg.*, **8**, 9, 1954.
- [2] Van der Kuy A., *Bijdrage tot de Kennis van alkaloïde vorming bij enkele species van het genus lupinus*, S-Gravenhage, 1956, Dysertacja.
- [3] Munier R., Macheboeuf H., *Bull. Soc. Chim. Biol.* **31**, 1144, 1949; **33**, 846, 1951; **34**, 204, 1952.
- [4] Reifer I., Niziołek S., *Acta Biochim. Polon.* **4**, 165, 1957.
- [5] Schwarze P., Hackbarth J., *Der Zuchter*, **27**, 332, 1957.
- [6] Wiewiórowski M., Bratek D., *Acta Soc. Bot. Pol.* **26**, 129, 1957.
- [7] Wiewiórowski M., Galinovsky F., Bratek D., *Mh. Chem.* **88**, 663, 1957.

A CHROMATOGRAPHIC METHOD FOR THE SEPARATION AND DETERMINATION OF LUPINE ALKALOIDS

Summary

A new method for the quantitative microdetermination of alkaloids in bitter lupines has been described. The method is based upon the use of a phase consisting of *n*-butanol saturated with hydrochloric acid — toluene (4 : 1). This phase permits of a convenient separation of lupinine, lupanine, sparteine and hydroxylupanine. The R_o of lupanine, sparteine and hydroxylupanine is equal to 0.86, 0.71 and 0.57, respectively, calculated on lupinine equal to 1.00.

Furthermore, it has been proved that the first raw chloroform extracts are quite suitable for chromatography and no further purification is required for the colorimetric estimation of alkaloids by the method of Reifer and Niziołek [4]. It was shown, that bitter lupines contain alkaloid bases other than the four commonly known.

Otrzymano 17.5.1958 r.

H. BIRECKA, H. RYBICKA i A. ŚCIBOR-MARCHOCKA

ALKALOIDY *LUPINUS ALBUS* I METODA ICH OZNACZANIA ILOŚCIOWEGO

Zakład Fizjologii Roślin S. G. G. W. w Warszawie

Kierownik: prof. dr H. Birecka

W związku z prowadzonymi przez nas badaniami nad alkaloidami *Lupinus albus* wystąpiła konieczność wyboru względnie modyfikacji istniejących metod ilościowego ich oznaczania, szczególnie biorąc pod uwagę, iż większość z nich pozwala jedynie na oznaczenie sumy tych związków.

Wiadomo, że w łubinie białym występuje lupanina, hydroksylupanina i dość często sparteina. Chodziło więc o metodę pozwalającą na rozdzielanie tych związków i oznaczenie ich nawet wtedy, gdy znajdują się w niewielkich ilościach. Ze znanych nam metod [10, 2, 5, 6] metoda Reifera i Niziołka [6] jest najczulsza i dlatego przyjęto ją jako podstawę do modyfikacji. Pozwala ona na oddzielenie lupaniny od hydroksylupaniny, lecz nie oddziela sparteiny.

W celu oddzielenia tego alkaloidu od pozostałych wykorzystaliśmy podobnie jak Van der Kuy [2] lotność jego z parą wodną. Autor ten oddestylowuje sparteinę do 25 ml z wyciągu alkaloidów składającego się z 20 ml 0,4 N NaOH i 5 ml eteru.

W naszych analizach obawiając się zmian w alkaloidach pod wpływem silnego ługu i wysokiej temperatury, alkalizowano roztwór węglanem sodowym. Do 10, 20 względnie 40 ml dodawano 0,37 g bezwodnego Na_2CO_3 , otrzymując od około 0,1 do 0,4 molarne stężenie węglanu. Dla uniknięcia ewentualnych strat lotnej sparteiny do odbieralnika dodawano 2 ml 0,1 N kwasu.

Próby destylacji wykonano na wodnych roztworach czystych soli alkaloidów¹⁾. Badano odzyskanie sparteiny w zależności od ilości prze-

¹⁾ Siarczan sparteiny B. $\text{H}_2\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Cefarm-Warszawa), chlorowodorek lupaniny B. $\text{HCl} \cdot \text{H}_2\text{O}$ — t. t. 126—127°, dwuchlorowodorek hydroksylupaniny B. $2\text{HCl} \cdot \text{H}_2\text{O}$ — t. t. 275°, wyekstrahowany i oczyszczony z łubinu wąskolistnego.

destylowanego płynu oraz zachowanie się nietlotnych alkaloidów, lupaniny i hydroksylupaniny w roztworze poddanym destylacji. Alkaloidy oznaczano kolorymetrycznie metodą Reifera i Niziołka. Próby destylacji sparteiny do 25 ml wykazały, że z tą objętością płynu nie można większych ilości oddestylować całkowicie. Natomiast z 50 ml wody, jak widać z wyników podanych w tabelicy 1, udaje się ilościowo odzyskać nawet 25 mg sparteiny, przy czym stężenie Na_2CO_3 może być od 0,1 do 0,4 M.

T a b l i c a 1

Odzyskanie sparteiny po destylacji alkalicznego roztworu z parą wodną

roztwór (ml)	destylat (ml)	sparteina	
		wzięto (mg)	odzyskano (mg)
10	50	0,59	0,60
10	50	2,05	1,99
10	50	3,70	3,65
20	50	1,03	1,02
20	50	4,12	4,24
20	100	4,12	4,14
25	50	5,15	4,97
25	100	5,15	5,14
40	50	8,24	8,10
40	100	8,24	8,28
25	50	24,72	24,50
25	100	24,72	25,13

T a b l i c a 2

Odzyskanie alkaloidów po destylacji alkalicznego roztworu z parą wodną (wyjściowa objętość roztworu alkaloidów 10 ml, objętość destylatu 50 ml; sparteinę oznaczano w destylacie i hydroksylupaninę w pozostałości)

alkaloid	przed destylacją (mg)	po destylacji (mg)	mieszanina alkaloidów	przed destylacją (mg)	po destylacji (mg)
lupanina	0,72	0,71	sparteina	0,58	0,59
	2,33	2,28	lupanina	1,01	1,00
	4,17	4,15	sparteina	0,75	0,73
	10,30	9,75	lupanina	1,00	1,01
	20,40	20,10	sparteina	1,00	0,99
hydroksylupanina	0,89	0,90	lupanina	1,00	0,98
	1,78	1,76	sparteina	3,02	2,95
	2,10	2,13	lupanina	1,00	1,01
	3,15	3,10	sparteina	3,02	3,06
	5,20	5,12	lupanina	5,06	4,92

Próby z przedestylowaniem lupininy nie dały tak pomyślnych wyników, gdyż nawet ze 100 ml płynu odzyskano ilościowo zaledwie 1 mg tego alkaloidu.

W tablicy 2 podane są wyniki badań nad oddziaływaniem zasadowego środowiska i procesu destylacji na lupaninę i hydroksylupaninę oraz badań nad oddzieleniem sparteiny w obecności lupaniny. Jak widać, sparteina z mieszaniny przechodzi ilościowo do destylatu, a oba nietolne alkaloidy odnajdują się praktycznie w niezmienionej ilości.

Ponieważ jednak przy dużych zawartościach lupaniny w kolbie destylacyjnej (zaopatrzonej w deflegmator) stwierdzono po destylacji niewielkie, ale stałe jej ubytki, destylaty z dwóch prób zawierających w sumie 30,7 mg lupaniny połączono i przeanalizowano. Zawierały one 300 μg , tzn. 1% ilości badanej. Wykonane chromatogramy destylatu potwierdziły w nim obecność lupaniny. Z punktu widzenia więc ilościowego oznaczenia tego alkaloidu znalezione w destylacie ślady nie mają istotnego znaczenia. Potwierdziły to wyniki szeregu analiz wyciągów z nasion i liści łubinu białego, u których nie stwierdzono chromatograficznie obecności sparteiny (np. z roztworu zawierającego 4270 μg lupaniny oraz 530 μg innych zasad nietolnych przedestylowało się około 37 μg alkaloidów).

Przeprowadzone próby, w których roztwór sparteiny samej względnie z lupaniną, albo też ze zmielonymi nasionami łubinu białego poddano pełnej analizie wg metody Reifera i Niziołka, wykazały, że nie zachodzą straty sparteiny. Chociaż z pomocą destylacji udało nam się oddzielić ilościowo sparteinę od lupaniny i hydroksylupaniny, mimo to jeszcze nie można było użyć tej metody bez dalszej modyfikacji.

Sposób postępowania wg tej metody z wyciągiem chloroformowym materiału roślinnego powoduje straty wynoszące około 10%, na skutek powstawania prawdopodobnie produktów rozkładu alkaloidów, szczególnie lupaniny. Drugim powodem był stwierdzony przez nas fakt, że gdy w wyciągu jest dużo więcej lupaniny od hydroksylupaniny, to nie ma dobrego rozdziału. Wreszcie w łubinie białym obok trzech znanych alkaloidów stwierdziliśmy obecność również i innych zasad, które metodą Reifera i Niziołka nie dają się oddzielić.

Ilościowe straty alkaloidów w metodzie Reifera i Niziołka mogłyby być spowodowane niepełną ekstrakcją podczas drugiego oczyszczania wyciągu. Obawiając się tego, Wiewiórowski i Bratek [13] zalecają ponowne osuszanie ziemią okrzemkową przed tym oczyszczaniem. Przeprowadzone przez nas analizy ilościowe wszystkich rozpuszczalników, przez które przeszedł ekstrakt z liści łubinu białego gorzkiego w każdej fazie postępowania wg metody Reifera i Niziołka, nie potwierdziły tego przypuszczenia

T a b l i c a 3
R_L alkaloidów na różnych fazach rozwijających

związki	faza rozwijająca					
	butanol- -H ₂ O*)	butanol-0,1 N HCl				HCl- -butanol- -toluen
		Whatman 1		Whatman 3		Whatman 1
		∅ 11	∅ 11	∅ 19	∅ 11	∅ 19
<i>n</i> ₂	0,45					
<i>n</i> ₃	0,53	0,46	0,37	0,47	0,41	1,00
sparteina	0,65	0,52	0,47	0,53	0,53	0,83
hydroksylupanina	0,76	0,70	0,69	0,72	0,73	0,68
<i>n</i> _{4 5}	0,91					
lupanina	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
lupinina	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,14
angustifolina	1,18		1,25		1,18	1,21

*) Umieszczone w tej rubryce *R_L* zostały obliczone na podstawie *R_F* podanych przez Wiewiórowskiego i Bratek [13, 14]. Otrzymane *R_L* na fazie siarczanowej dla lupaniny i hydroksylupaniny zgadzają się z danymi tych autorów.

(straty wynoszą około 1—1,5%). Dlatego też wydało nam się, że straty spowodowane są rozkładem alkaloidów w toku analizy. Dla sprawdzenia naszej hipotezy czyste sole sparteiny, lupaniny i hydroksylupaniny poddałyśmy działaniu czynników, jakie występują w toku analizy wg metody Reifera i Niziołka, a następnie badałyśmy je chromatograficznie.

Stosowano chromatografię krążkową wg Wiewiórowskiego i Bratek [12, 13] używając bibuły Whatman nr 1 i 3 (o średnicy 11, 15 i 19 cm, promień koła wewn., na który nanoszono roztwór badany, odpowiednio — 7, 10, 15 mm). Używano trzech faz rozwijających: I. butanol nasycony 0,1 N HCl²⁾, II. butanol-toluen-HCl [7], III. nasycony roztwór (NH₄)₂SO₄ z alkoholem [12]. Te trzy fazy stosowano zarówno w przypadku badania produktów rozkładu alkaloidów, jak też występowania tych związków w roślinach. Roztwór alkaloidów nanoszono w postaci chlorowodorków (najczęściej w 0,1 N HCl). Chromatogramy rozwijano jeden raz lub przy stosowaniu fazy I dwukrotnie, a następnie wywoływano zmodyfikowanym odczynnikiem Dragendorffa [11]. W tabelicy 3 podano orientacyjne rozmieszczenie alkaloidów w stosunku do lupaniny — *R_L*.

²⁾ Wiewiórowski i Bratek stosują butanol nasycony wodą, dodając na starcie 0,5 N HCl w celu uniknięcia „rozwarstwienia“ sparteiny. Jednak wg naszych obserwacji nie zawsze nawet w tym przypadku można uniknąć tego niepożądanego zjawiska. Natomiast przy stosowaniu butanolu nasyconego 0,1 N HCl sparteina nie „rozwarstwa się“, a ponadto pozostałe alkaloidy wyraźniej rozdzielają się.

Badano zachowanie się alkaloidów jako chlorowodorków w roztworach wodnych i 0,1 N HCl oraz jako zasad w roztworze chloroformowym — w różnych temperaturach, po częściowym lub całkowitym oddestylowaniu rozpuszczalników: a) w temp. wrzenia chloroformu i b) w temp. pokojowej.

Chlorowodorki badanych alkaloidów rozpuszczone w wodzie nie ulegały zmianom; to samo odnosi się do sparteiny w roztworze 0,1 N HCl zarówno w 25°, jak i około 62°. Natomiast lupanina w kwaśnym roztworze utrzymywana w temp. 62° już po 10—15 min. tak w obecności chloroformu, jak i bez niego daje na chromatogramach dodatkowy prążek, którego umiejscowienie odpowiada związkowi n_3 Wiewiórkowskiego i Bratek. Według tych autorów n_3 powstaje z lupaniny i nie rozpuszcza się w chloroformie. Hydroksylupanina w tych warunkach daje związek, którego R_L wynosi 0,28 do 0,30 (butanol-HCl). Wydaje się, że odpowiada on związkowi n_2 Wiewiórowskiego i Bratek. Częściowe zagęszczenie kwaśnych roztworów nawet w temperaturze pokojowej powoduje również powstawanie tych produktów.

W roztworach chloroformowych wszystkie trzy badane alkaloidy ulegają częściowo zmianom, i to zarówno przy dłuższym staniu w temp. pokojowej, szczególnie na świetle, jak i podczas destylacji chloroformu na łaźni wodnej. W tych warunkach sparteina daje dwa dodatkowe prążki, których R_L na obu kwaśnych fazach rozwijających są mniejsze od sparteiny. W roztworach lupaniny po destylacji chloroformu w temp. wrzenia (bez dodania 0,1 N HCl) jak i po dłuższym staniu w tym rozpuszczalniku, stwierdzono podobnie jak i w roztworach kwaśnych obecność n_3 , jednak w mniejszych ilościach. Z hydroksylupaniny w tych warunkach znajdowano dwa dodatkowe związki o R_L na fazie butanol-HCl: jeden — 0,23, drugi — 0,47 (pokrywającym się z R_L sparteiny), na fazie z toluenem — 0,50. Również w roztworze chloroformowym zawierającym 5% metanolu [13] podczas destylacji na łaźni wodnej występują analogiczne zmiany jak i w samym chloroformie, co gorsza w tych warunkach obserwuje się wyraźnie (15—20%) straty sparteiny.

Podane wyniki badań potwierdziły nasze przypuszczenia, że straty alkaloidów w metodzie Reifera i Niziołka spowodowane są ich rozkładem. Procesem bezpośrednio odpowiedzialnym za to jest oddestylowanie chloroformu w podwyższonej temperaturze z roztworu zakwaszonego kwasem solnym. Jeśli chloroform odpędzaliśmy z roztworu niezakwaszonego w temp. 25° pod zmniejszonym ciśnieniem, to w tych warunkach nie stwierdziliśmy żadnych zmian jakościowych ani ilościowych alkaloidów. Dlatego też we wszystkich następnych analizach używaliśmy tego sposobu usuwania chloroformu.

Nasze badania chromatograficzne łubinu białego pastewnego jak i gorzkiego wykazały obecność, poza lupaniną, hydroksylupaniną i ewentualnie sparteiną, innych jeszcze związków dających reakcję barwną z jodem i odczynnikami Dragendorffa. Jeden z nich, który będziemy nazywali α_x , jest rozpuszczalny w chloroformie, trudno rozpuszczalny w eterze nadtowym, nielotny z parą wodną; jego R_f na fazie butanol-woda i butanol-HCl wynosi 0,53—0,58 (Whatman nr 1, ϕ 19 cm), na fazie z toluenem — 0,55. Ponadto w łubinie białym, szczególnie pastewnym, stwierdzono również obecność angustifoliny [14]. Ponieważ w metodzie Reifera i Niziołka oba te związki oznacza się wraz z hydroksylupaniną, wynika konieczność

T a b l i c a 4

Odzyskanie alkaloidów po rozdziale chromatograficznym i elucji

a) roztwory standardowe zawierały po jednym alkaloidzie (μg)

lupinina		sparteina		lupanina		hydroksylupanina	
wzięto	odzyskano	wzięto	odzyskano	wzięto	odzyskano	wzięto	odzyskano
14,7	15,9	5,9	6,3	10,0	9,5	6,2	6,9
40,5	39,0	50,0	51,0	44,0	42,4	16,2	16,4
101,5	105,0	100,0	103,0	88,0	90,2	40,0	39,0

b) roztwory standardowe zawierały po 2 względnie 3 alkaloidy (μg)

sparteina		lupanina		hydroksylupanina	
wzięto	odzyskano	wzięto	odzyskano	wzięto	odzyskano
—	—	20,0	20,1	6,2	6,9
—	—	40,0	38,6	6,2	6,8
—	—	41,0	40,6	10,5	10,2
—	—	41,0	42,0	21,0	21,8
—	—	82,0	79,0	21,0	19,6
—	—	123,0	120,6	21,0	21,1
5,9	6,3	41,0	39,1	6,2	6,6
19,9	19,3	41,0	38,9	16,2	16,3
5,9	6,5	60,0	64,2	42,0	42,5
23,6	24,7	60,0	58,0	42,0	46,5

zastosowania innego rozdziału alkaloidów. Do tego celu wykorzystaliśmy rozdzielacz chromatograficzny. Na 1/3 lub 1/2 obwodu koła wewnętrznego bibuły Whatman (krażki ϕ 15 względnie 19 cm³) nanoszono 50 do 400 μl roztworu. Po dwukrotnym rozwinięciu na fazie butanol-0,1 N HCl chromatogramy lekko spryskiwano odczynnikami Dragendorffa do wyraźnego

³) Na krażkach średnicy 11 cm nie można oddzielić α_x od hydroksylupaniny.

zaznaczenia się prążków, które po wyschnięciu wycinano, cięto na drobne części, przenoszono do rozdzielacza, alkalizowano 0,5—1 ml 0,2 N NaOH aż do odbarwienia bibuły i eluowano stopniowo z 25 ml lub większą ilością chloroformu, zależnie od zawartości alkaloidu, który następnie oznaczano kolorymetrycznie metodą Reifera i Niziołka. Wyniki odzyskania znanych ilości alkaloidów po rozdziale chromatograficznym i eluacji podane są w tablicy 4. Okazało się, że metoda ta daje dla badanych związków dobre wyniki, z błędem około 3%. W celu umożliwienia ilościowego oznaczania również i angustifoliny, określono ekstynkcję dla 1 μ g tego alka-

T a b l i c a 5

Porównanie oznaczeń alkaloidów rozdzielonych dwiema metodami w dwukrotnie oczyszczonym wyciągu z nasion łubinów
(wartości podano w mg na 1 g nasion)

	Rozdział metodą			
	chromatograficzną	Reifera i Niziołka [6]		
		wyciąg kwaśny	wyciąg kwaśny	wyciąg kwaśny po destylacji
<i>Lupinus angustifolius</i> *)				
lupanina	10,10	10,26	10,78	9,11
hydroksylupanina	5,78	7,17	6,03	6,35
suma	15,88	17,43	16,81	15,46
<i>Lupinus albus</i>				
lupanina	18,32	14,89	15,07	15,60
hydroksylupanina**)	3,00	8,45	8,50	5,99
suma	21,32	23,34	23,57	21,59

*) Łubin wąskolistny zawierał zaledwie ślady angustifoliny, którą przy rozdziale chromatograficznym oznaczano wraz z lupaniną, a przy rozdziale Reifera i Niziołka wraz z hydroksylupaniną.

**) Podane wyniki odnoszą się do sumy hydroksylupaniny i a_x , dla którego tymczasowo przyjęto współczynnik ekstynkcji 0,10; związek ten nie przechodzi do eteru naftowego przy rozdziale metodą Reifera i Niziołka.

loidu w 1 ml chloroformu. W granicach od 0,2 do 3,0 μ g dla kolorimetru Leitza, filtr D, wynosi ona 0,115 (od 0,112 do 0,118).

Po próbach na roztworach standardowych przeszliśmy do badań wyciągów z materiału roślinnego. Do badań tych użyto dwukrotnie oczyszczonych wyciągów z nasion łubinów wąskolistnego oraz białego. Szło nam o porównanie ilościowego oznaczania alkaloidów po rozdziale metodą Reifera i Niziołka z oznaczeniem po rozdziale chromatograficznym. W pierwszym przypadku zawartość alkaloidów oznaczano bezpośrednio w roztworach kwaśnych (tego roztworu użyto do rozdzielacza chromatogra-

ficznego) oraz po destylacji, bez uprzedniego zalkalizowania względnie po alkalizacji. Wyniki podano w tablicy 5; widać z niej, że sumaryczna zawartość alkaloidów oznaczona po rozdziale chromatograficznym odpowiada sumarycznej ilości otrzymanej po rozdziale wg Reifera i Niziołka zalkalizowanego wyciągu poddanego destylacji. Natomiast rozdział wg tej metody, bezpośrednio względnie po destylacji bez zalkalizowania, daje wyniki nieco wyższe. Ilości alkaloidów znalezione w destylacie (u łubinu wąskolistnego — 250 μg , u łubinu białego — 12 μg na 1 g) nie usprawiedliwiają tych różnic, które powtarzały się systematycznie nie tylko przy analizie nasion, ale i liści nie zawierających sparteiny. Możliwe jest, że różnice te są spowodowane obecnością nawet w dwukrotnie oczyszczonych wyciągach małych ilości związków reagujących z metyloranzem i dających się usunąć względnie rozłożyć przy destylacji w zasadowym środowisku. Z uzyskanych wyników dla łubinu białego widać również, że gdy lupanina ilościowo znacznie przewyższa alkaloidy nierozpuszczalne w eterze naftowym, rozdział metodą Reifera i Niziołka nie jest dobry. Otrzymuje się za niskie wartości dla tej zasady. Wykonane przez nas chromatogramy frakcji hydroksylupaniny wykazały w niej obecność również lupaniny.

W tablicy 6 podano wyniki analiz liści młodych roślin łubinu białego gorzkiego. Badano wpływ sposobu zabijania i suszenia roślin oraz alkalizacji. Rozdział alkaloidów metodą Reifera i Niziołka przeprowadzono po destylacji z alkalicznego roztworu, chromatografowano zaś ekstrakty kwaśne, oczyszczone tylko eterem naftowym. Analizy destylatów wykazały, iż badane liście nie zawierają sparteiny. Sposób zabijania liści nie miał wpływu na zawartość alkaloidów⁴⁾. Przy rozcieraniu liści z 10% Na_2CO_3 (około 2 ml na 5 g świeżych względnie 0,5 ml na 1 g suchych) otrzymano takie same wyniki jak przy stosowaniu 10% NaOH . Wykonane analizy liści roślin, którym dano siarczan sparteiny przez łądygę i po upływie 24 godzin zabito, również wykazały, iż sposób zabijania nie wpływa na ilościowe oznaczanie czterech badanych zasad.

Przeprowadzone badania metodyczne upoważniają nas do wprowadzenia następujących modyfikacji do metody Reifera i Niziołka [6] analizy łubinu białego:

1. chloroform zawierający alkaloidy po ekstrakcji materiału roślinnego (alkalizowanego 10% Na_2CO_3 lub 10% NaOH) oddestylować pod zmniejszonym ciśnieniem w 25° bez uprzedniego dodawania kwasu solnego;

2. po oczyszczeniu eterem naftowym kwaśnego roztworu:

- a) przy małej zawartości sparteiny i a_x — bezpośrednio określoną ilość

⁴⁾ Nieco wyższe wyniki u świeżych liści są raczej skutkiem wędnięcia ich w czasie przygotowywania materiału — odważano je jako ostatnie.

T a b l i c a 6

Zawartość alkaloidów w liściach łubinu białego gorzkiego w zależności od sposobu ich zabijania, suszenia i alkalizacji (wartości w mg na gram)

liście	alkalizacja	Rozdział					
		wg Reifera i Niziołka			chromatograficzny		
		lupanina	hydroksylu- panina + a_x	suma	lupanina	hydroksylu- panina + a_x	suma
zabite w 105° suszone w 60"	10% Na ₂ CO ₃	15,41	6,75	22,16			
		18,34	3,94	22,28	18,70	2,95	21,65
	10% NaOH	16,31	5,62	21,93	19,45	2,43	21,89
		17,66	4,16	21,82	18,83	2,25	21,08
1 godz. w su- chym lodzie i liofilizo- wane	10% Na ₂ CO ₃	18,02	4,59	22,60	19,00	2,62	21,62
		15,73	6,44	21,17	19,62	2,43	22,05
natychmiast roztarte	10% Na ₂ CO ₃	16,35	7,62	23,97			
		17,25	6,25	23,52			
	10% NaOH	15,95	6,88	22,83	20,00	2,45	22,45
		16,91	6,25	23,16	20,80	2,76	23,56

roztworu nanieść na chromatogram, rozdzielone alkaloidy eluować i oznaczyć kolorymetrycznie metodą Reifera i Niziołka;

b) przy większych zawartościach sparteiny względnie a_x — z części lub całej ilości roztworu oddestylować sparteinę⁵⁾ z 50 ml wody; z roztworu zasadowego nietolne alkaloidy wyekstrahować odpowiednimi porcjami chloroformu (stosunek fazy wodnej do chloroformu powinien być jak 1 : 1,5; 1 : 1,5; 1 : 1; 1 : 1). Chloroform odpędzić pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość rozpuścić w odpowiedniej ilości 0,1 N HCl względnie kwaśnego 95% etanolu (99 ml + 1 ml 0,5 N HCl) i chromatografować jak wyżej.

Przy ustalaniu ilości potrzebnego do analizy materiału roślinnego jak i odpowiednich rozcieńczeń należy brać pod uwagę, iż chloroformowy eluat poszczególnego alkaloidu objętości 20—25 ml nie powinien zawierać mniej niż 4—5 μ g tego związku. Eluowanie 10 ml chloroformu daje mniej dokładne wyniki.

W ciągu ostatnich dwóch lat przebadano jakościowo i ilościowo zawartość alkaloidów w różnych organach łubinu białego gorzkiego (czech-

⁵⁾ Destylacja w tym wypadku jest bardzo celowa, gdyż R_L sparteiny niewiele różni się od $R_L a_x$ i przy większych ilościach jednego z tych związków trudno je oddzielić.

nickiego) i pastewnego średniowczesnego (hodowli Barbackiego) w różnych fazach rozwoju. Szczegółowe dane odnośnie dynamiki zawartości alkaloidów i ich przemian będą przedmiotem oddzielnych publikacji.

W badanych populacjach stwierdzono obecność lupaniny, hydroksylupaniny, sparteiny i a_x . Nie znaleziono natomiast ani lupininy ani $n_{4/5}$ [13]. Niestety, nie możemy jeszcze bliżej określić charakteru a_x ; nie wydaje się jednak, aby był artefaktem. Możliwe, że jest on jednym ze znanych alkaloidów występujących w roślinach motylkowych [1, 3, 4, 9]. W nielicznych przypadkach, głównie u formy pastewnej, stwierdzono małe ilości angustifoliny.

Należy również zaznaczyć, że w organach wegetatywnych jak i w nasionach często znajduje się związek o R_L bardzo zbliżonym do n_3 , ale w odróżnieniu od niego łatwo rozpuszczalny w chloroformie. Ponadto występuje również związek, który przemieszcza się na chromatogramach znacznie szybciej niż nawet angustifolina. Zarówno w łubinie gorzkim, jak i pastewnym lupanina występuje w największych ilościach we wszystkich organach niezależnie od ich wieku. Zawartość zaś hydroksylupaniny, której obecność w przeciwieństwie do innych autorów [12] zawsze stwierdzano nawet w młodych roślinach, jest przeważnie znacznie niższa. W liściach roślin młodych stosunek hydroksylupaniny do lupaniny wahał się jak 1:12—16. U starszych roślin stosunek ten zmniejszał się. W nasionach łubinu gorzkiego wynosił 1:15, w nasionach zaś łubinu pastewnego 1:3—4. Sparteinę w łubinie pastewnym znajdowano we wszystkich organach (oprócz nasion dojrzałych) w różnym wieku roślin. Ilości jej w stosunku do lupaniny wahają się w granicach od 1:8 do 1:3. Natomiast w łubinie gorzkim zawartość sparteiny w organach wegetatywnych jest często znikoma nawet u roślin młodych; niekiedy liście w ogóle jej nie zawierały. Wg szeregu autorów [2, 12, 13] łubin biały gorzki w młodym wieku zawiera dużo sparteiny. Uzyskane przez nas wyniki wskazują, że pod tym względem mogą istnieć dość duże różnice w zależności od biotypów, albo też warunków wegetacji. Obecność a_x stwierdzono zarówno u formy pastewnej, jak i gorzkiej. Występuje on w liściach, łodygach oraz korzeniach. Zawartość jego w częściach wegetatywnych była zbliżona do ilości hydroksylupaniny. W nasionach łubinu gorzkiego była dwukrotnie wyższa.

Podane wyżej wyniki wskazują, że u formy pastewnej i gorzkiej łubinu białego: a) jakościowy skład alkaloidów jest podobny i znacznie bardziej złożony niż stwierdzono dotychczas, b) w czasie wegetacji zachodzą duże zmiany w stosunkach ilościowych między alkaloidami w różnych organach roślin, jednakże zawsze dominującym alkaloidem jest lupanina.

Składamy serdeczne podziękowanie Prof. I. Reiferowi za udostępnienie nam lupaniny i hydroksylupaniny i Prof. M. Wiewiórowskiemu za udostępnienie hydroksylupaniny i angustifoliny.

Dziękujemy również Mgr D. Szklarek za wykonanie szeregu analiz chemicznych wchodzących w skład niniejszej pracy.

STRESZCZENIE

Zmodyfikowano metodę Reifera i Niziołka ilościowego oznaczania alkaloidów występujących w łubinie białym. Wprowadzono zmiany dotyczące: postępowania z chloroformowym ekstraktem alkaloidów, rozdziálu alkaloidów (który przeprowadzono chromatograficznie) oraz oddestylowania sparteiny przy większych jej ilościach.

W różnych organach łubinu białego gorzkiego i pastewnego stwierdzono chromatograficznie obecność lupaniny, hydroksylupaniny, sparteiny, angustifoliny i ponadto trzech zasad, łatwo rozpuszczalnych w chloroformie, reagujących z odczynnikiem Dragendorffa i jodem.

W czasie wegetacji zachodzą znaczne zmiany w stosunkach ilościowych między alkaloidami w różnych organach roślin; jednakże zawsze dominującym alkaloidem jest lupanina.

LITERATURA

- [1] Henry T. A., *Plant Alkaloids*, J. A. Churchill Ltd, London, 1949.
- [2] Van der Kuy A., *Bijdrage tot de Kennis van alkaloiden vorming bij enkele species van het genus lupinus*, S-Gravenhage, 1956, Dysertacja.
- [3] Marion L., Turcotte F., Quallet J., *Canad. J. Chem.* **29**, 22, 1951.
- [4] Marion L., Leonard N. J., Moore B. P., *Canad. J. Chem.* **31**, 81, 1953.
- [5] Reifer I., Możejko M., *Acta Biochim. Polon.* **1**, 197, 1954.
- [6] Reifer I., Niziołek S., *Acta Biochim. Polon.* **4**, 165, 1957.
- [7] Reifer I., Przeździecka J., Kleczkowska D., *Acta Biochim. Polon.* **6**, 17, 1959.
- [8] Schwarze P., Hackbarth J., *Der Zuchter*, **27**, 332, 1957.
- [9] Turcotte F., Ledne R., Marion L., *Canad. J. Chem.* **31**, 337, 1953.
- [10] Wierzchowski Z., Obuchowska L., *Roczniki Nauk Rolniczych* **61**, 159, 1952.
- [11] Wiewiórowski M., Bratek D., *Bull. Acad. Polon. Sci. Cl. II*, **4**, 3, 1956.
- [12] Wiewiórowski M., Bratek D., *Acta Soc. Bot. Poloniae* **26**, 129, 1957.
- [13] Wiewiórowski M., Bratek D., *Abhand. Deutsch. Akad. Wissenschft. zu Berlin, Biochemie und Physiologie der Alkaloide*, 1957.
- [14] Wiewiórowski M., Galinovsky F., Bratek D., *Mh. Chem.* **88**, 663, 1957.

THE ALKALOIDS OF *LUPINUS ALBUS* AND THE METHOD OF THEIR DETERMINATION

Summary

Some methods of alkaloid determination have been modified to apply them for the estimation of alkaloids in *Lupinus albus* during growth.

The method of Reifer and Niziołek [6] has been modified. Chloroform extracts of alkaloids were distilled *in vacuo*, the addition of HCl being omitted to prevent partial decomposition of the alkaloids.

The partially purified hydrochlorides of alkaloids were separated by paper chromatography before the colorimetric determination. Sparteine, when present in large amounts was removed by steam distillation before paper chromatography.

Various parts of white, sweet and bitter lupines contain: lupanine, hydroksylupanine, sparteine, angustifoline, as well as three other bases not identified.

Considerable changes were observed in the contents of the various alkaloids during vegetation, yet lupanine was always found to be the dominant one.

Otrzymano 19.5.1958 r.

L. LEDOUX*), A. PILERI**), H. POZNAŃSKA-LINDE***) i F. VANDERHAEGHE*)

ZMIANY ZAWARTOŚCI I METABOLIZMU PURYN W KWASACH NUKLEINOWYCH W PRZEBIEGU STARZENIA SIĘ NOWOTWORU DOŚWIADCZALNEGO

Praca wykonana w Zakładzie Morfologii Zwierzęcej Uniwersytetu w Brukseli

Niniejsza praca stanowi dalszy ciąg badań prowadzonych przez Ledoux i współpracowników nad metabolizmem kwasów nukleinowych w tkance nowotworowej [5—9, 12]. Do pracy wybrano przesiek Landschütza (ascites) stanowiący zawiesinę komórek jednorodnych (przeszło 99% komórek nowotworowych). Jest to bardzo wygodny materiał doświadczalny, gdyż dzięki ruchom perystaltycznym jelit komórki te posiadają dość stały skład chemiczny [2, 4, 8].

MATERIAŁ I METODY

Hodowle guza Landschütza uzyskiwano przeszczepiając dootrzewnowo myszom po 0,2 ml przesieku [8]. Doświadczenia wykonano na trzech grupach zwierząt: I grupa — z przesiekim trzydniowym i II grupa — z przesiekim pięciodniowym oraz III grupa zawierająca komórki stare — przesiek jedenastodniowy. (Przeciętny czas życia myszy zaszczepionych guzem Landschütza wynosi 14 dni).

Wybranych do doświadczeń myszom podawano dootrzewnowo roztwór adeniny znakowanej ^{14}C w ilości około $1\mu\text{C}/\text{ml}$ płynu przesiekowego. Po 2,5 godz. pobierano po 0,2 ml płynu przesiekowego i oznaczano zawartość puryn we frakcji kwasorozpuszczalnej (KS), w kwasie rybonukleinowym (RNA) i w kwasie dezoksyrybonukleinowym (DNA). Oznaczano następnie radioaktywność specyficzną (RS) i stopień wbudowania adeniny i guaniny. Ogółem wykonano 12 oznaczeń.

Pobrany przesiek rozcieńczano izotonicznym roztworem NaCl, odwirowywano i osad przemywano trzy razy tymże roztworem w celu usu-

*) Laboratoire de Morphologie Animale, Université Libre de Bruxelles.

**) Istituto di Patologia Medica, Torino.

***) Zakład Chemii Fizjologicznej Akademii Medycznej w Łodzi.

nięcia promieniowania powierzchniowego. (Osad przemywano bardzo szybko, wirując nie dłużej niż jedną minutę przy 3000 obr./min.) Przemyty osad ekstrahowano przez 15 minut 1 N HCl w temperaturze 0° (łaźnia z lodem). Po odwirowaniu, w płynie znad osadu oznaczano nukleotydy kwasorozpuszczalne. Osad zawierający kwasy nukleinowe odlipidowywano przy użyciu kolejno alkoholu, alkoholu i eteru (2 : 1), eteru i alkoholu (2 : 1) oraz eteru [9]. Następnie kwasy nukleinowe rozdzielano metodą Schmidta i Thannhausera [13, 9]. Puryny i nukleotydy pirymidynowe rozdzielano chromatograficznie. Zawartość i skład molowy zasad określano oznaczając absorbcję eluatów poszczególnych plam na spektrofotometrze Beckmana [10, 11]. Radioaktywność specyficzną (RS) poszczególnych frakcji oznaczano dzieląc ilość impulsów na min./ml przez stężenie danego związku wyrażone w mmolach/ml. Stopień wbudowywania (pourcentage d'incorporation) obliczano dzieląc RS RNA i RS DNA przez RS KS.

Poszczególne frakcje kwasów nukleinowych

a) *Frakcja kwasorozpuszczalna.* Po ekstrakcji przemyciej tkanki 1 N HCl i odwirowaniu, płyn znad osadu hydrolizowano przez 30 min. w łaźni wodnej w temperaturze 100° (otrzymywano nukleotydy pirymidynowe i wolne zasady purynowe) [14]. Następnie hydrolizat odparowywano do sucha, a pozostałość rozpuszczano w 1—2 kroplach 0,1 N HCl i nakraplano na bibułę Whatman nr 3. Wykonywano chromatografię wstępującą w układzie: metanol - HCl stęż. - H₂O (70 : 20 : 10) [15]. Po 16 godzinach chromatogram suszono i plamy eluowano przez 24 godz. 0,1 N HCl. Następnie oznaczano absorbcję eluatów, po czym określoną ilość substancji (1 ml) wylewano na płytki ze szkła matowego i oznaczano ilość impulsów na minutę przy pomocy licznika Geigera-Müllera [8].

b) *Kwas rybonukleinowy (RNA).* Osad zawierający kwasy nukleinowe poddawano hydrolizie zasadowej w 0,1 N NaOH [13, 9], następnie wytrącano DNA i białka 6 N HCl [13, 9], a płyn znad osadu hydrolizowano i chromatografowano podobnie jak we frakcji KS. W ten sam sposób oznaczano również absorbcję i ilość impulsów. Następnie obliczano molowy skład RNA, radioaktywność specyficzną zasad purynowych oraz stopień wbudowywania.

c) *Kwas dezoksyrybonukleinowy (DNA).* Osad DNA i białek przenoszono ilościowo (rozpuszczając w 0,1 N NaOH) do probówek z grubego szkła (pyrex). Następnie zobojętniano 0,1 N HCl, odparowywano i hydrolizowano stężonym HCOOH w temperaturze 180° przez dwie godziny (w tych warunkach otrzymuje się wolne zasady purynowe i pirymidynowe) [16, 17]. Po ostudzeniu i otwarciu probówek zawartość odparowy-

T a b l i c a 1

Skład molowy RNA i DNA w komórkach guza Landschütza w zależności od wieku guza

a) RNA

	I przebieg 3-dniowy	II przebieg 5-dniowy	III przebieg 11-dniowy
Guanina	$0,299 \pm 0,001$	$0,298 \pm 0,006$	$0,271 \pm 0,008$
Adenina	$0,236 \pm 0,009$	$0,233 \pm 0,001$	$0,228 \pm 0,010$
Cytozyna	$0,302 \pm 0,003$	$0,302 \pm 0,001$	$0,306 \pm 0,007$
Uracyl	$0,162 \pm 0,006$	$0,175 \pm 0,006$	$0,187 \pm 0,006$

b) DNA

Guanina	$0,147 \pm 0,007$	$0,143 \pm 0,002$	$0,148 \pm 0,001$
Adenina	$0,259 \pm 0,004$	$0,236 \pm 0,001$	$0,270 \pm 0,004$
Cytozyna	$0,257 \pm 0,001$	$0,227 \pm 0,003$	$6,242 \pm 0,006$
Uracyl	$0,399 \pm 0,009$	$0,355 \pm 0,001$	$0,340 \pm 0,005$

T a b l i c a 2

Radioaktywność specyficzna zasad purynowych w komórkach guza Landschütza w zależności od wieku guza (wyrażona w liczbie impulsów na min./mmol)

a) KS (Acid soluble)

	I przebieg 3-dniowy	II przebieg 5-dniowy	III przebieg 11-dniowy
Guanina	$9,9 \pm 1,0$	$15,1 \pm 0,9$	$34,1 \pm 4,1$
Adenina	$39,1 \pm 0,5$	$47,5 \pm 2,2$	$66,3 \pm 3,8$

b) RNA

Guanina	$2,72 \pm 0,24$	$3,76 \pm 1,1$	$1,46 \pm 0,4$
Adenina	$18,3 \pm 2,2$	$17,3 \pm 4,8$	$19,4 \pm 1,48$
	$\frac{RS G}{RS A} 0,15$	0,22	0,075

c) DNA

Guanina	$1,71 \pm 0,2$	$1,39 \pm 0,3$	$0,25 \pm 0,005$
Adenina	$10,1 \pm 0,5$	$10,1 \pm 0,6$	$1,25 \pm 0,007$
	$\frac{RS G}{RS A} 0,17$	0,14	0,2

T a b l i c a 3

Stopień wbudowywania (pourcentage d'incorporation) zasad purynowych do komórek guza Landschütza

(Stosunek RS RNA i stosunek RS DNA do RS KS $\times 100$)

a) RNA

	I przebieg 3-dniowy	II przebieg 5-dniowy	III przebieg 11-dniowy
Guanina	$27,5 \pm 5,1$	$24,7 \pm 5,1$	$7,4 \pm 1,1$
Adenina	$45,8 \pm 1,2$	$35,2 \pm 1,9$	$31,5 \pm 6,1$
	$\frac{G}{A} 0,60$	0,70	0,23

b) DNA

	I przebieg 3-dniowy	II przebieg 5-dniowy	III przebieg 11-dniowy
Guanina	$17,1 \pm 5,0$	$9,1 \pm 0,6$	$0,7 \pm 0,02$
Adenina	$26,0 \pm 6,5$	$21,5 \pm 1,0$	$1,9 \pm 0,5$
	$\frac{G}{A} 0,66$	0,42	0,36

wano do sucha, rozpuszczano w 1—2 kroplach 0,1 N HCl i przenoszono na bibułę Whatman Nr 3. Chromatografię wstępującą wykonywano w układzie *n*-butanol - H₂ - NH₃ (100 : 17 : 1,17) [3, 14]. Po szesnastu godzinach chromatogram suszono, plamy eluowano i oznaczano je jak wyżej.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Szczegółowe wyniki podane są w tablicach. W składzie molowym DNA (Tabl. 1) nie znaleziono różnic statystycznie znamiennej między komórkami młodymi i starymi. Natomiast w RNA zawartość guaniny jest mniejsza w komórkach starych.

We wszystkich frakcjach obserwujemy radioaktywność specyficzną (Tabl. 2) adeniny i guaniny, mimo że podano tylko znakowaną adeninę. We frakcji kwasorozpuszczalnej radioaktywność specyficzną adeniny i guaniny jest wyższa w komórkach starych. RS adeniny w RNA komórek starych i młodych nie wykazuje różnic statystycznie znamiennej, natomiast RS guaniny jest wyraźnie mniejsza w komórkach starych. W DNA zmniejszona jest RS obu puryn, tak że stosunek RS guaniny do adeniny nie ulega wyraźnej zmianie w komórkach młodych i starych.

Stopień wbudowania guaniny w RNA ulega w komórkach starych wyraźnemu zmniejszeniu. Obniżeniu ulega również stosunek guaniny do adeniny. W komórkach starych jest słabsze wbudowywanie się obu zasad

do DNA, co może być spowodowane mniej intensywnym podziałem komórki.

Z podanych wyników doświadczeń można wyciągnąć następujące wnioski:

a) W przebiegu starzenia się komórki zdolność przekształcania się adeniny w guaninę nie ulega zmianie (wysoka RS guaniny we frakcji kwasorozpuszczalnej).

b) Słabsze wbudowywanie się obu zasad do DNA może być wynikiem mniej intensywnego podziału starych komórek.

c) Wbudowywanie się guaniny do RNA w komórkach starych ulega wyraźnemu zmniejszeniu. Może to być spowodowane zahamowaniem działalności któregoś (czy kilku) z enzymów powodujących wbudowywanie się guaniny do RNA.

STRESZCZENIE

Autorzy badali wbudowywanie się zasad purynowych do kwasów nukleinowych komórek guza Landschütza. Myszom z przesięciem Landschütza podawano adeninę znakowaną ^{14}C i badano skład molowy kwasów nukleinowych oraz radioaktywność specyficzną adeniny i guaniny. W składzie kwasów nukleinowych nie stwierdzono zmian zależnych od wieku komórek. Stwierdzono natomiast słabsze wbudowywanie guaniny do kwasu rybonukleinowego w komórkach starych.

Praca zawiera opis metod i dyskusję wyników.

LITERATURA

- [1] Chargaff E., Dawidson J. N., *The Nucleic Acids*, Academic Press N. Y., Rozdz. VII, 1955.
- [2] Goldberg L., Klein E., Klein G., *Expl. Cell. Res.* **1**, 5431, 1950.
- [3] Hotchkiss R. O., *J. Biol. Chem.* **175**, 3151, 1948.
- [4] Klein E., Kuźnik N. B., Klein G., *Expl. Cell Res.* **1**, 1127, 1950.
- [5] Ledoux L., Pileri A., Vanderhaeghe F., Brändli S., *Nature* **180**, 1048, 1957.
- [6] Ledoux L., Pileri A., Vanderhaeghe F., *Arch. Int. Physiol. Bioch.* **66**, 122, 1958.
- [7] Ledoux L., Pileri A., Vanderhaeghe F., *Arch. Int. Physiol. Bioch.* **66**, 124, 1958.
- [8] Ledoux L., Revell S. H., *Biochim. Biophys. Acta* **18**, 416, 1955.
- [9] Ledoux L., Vanderhaeghe F., *Biochim. Biophys. Acta* **24**, 340, 1957.
- [10] Loring H. S., Bartner H. W., Levy L. W., Hammel M. L., *J. Biol. Chem.* **196**, 807, 1952.
- [11] Loring H. S., Fairley Y. L., Seagrom H. L., *J. Biol. Chem.* **197**, 823, 1952.
- [12] Pileri A., Ledoux L., Vanderhaeghe F., *Biochim. Biophys. Acta* **26**, 513, 1957.
- [13] Schmidt G., Thannhauser S. Y., *J. Biol. Chem.* **161**, 83, 1945.
- [14] Vischer E., Chargaff E., *J. Biol. Chem.* **176**, 7036, 1948.
- [15] Williams R. I., Kirby H., *Science* **107**, 481, 1948.
- [16] Wyatt R., *Biochem. J.* **48**, 584, 1951.
- [17] Wyatt R., Cohen S., *Biochem. J.* **55**, 774, 1955.

PURINIC METABOLISM IN NUCLEIC ACIDS OF LANDSCHÜTZ ASCITES.
CHANGES OCCURING IN THE PROCESS OF TUMOR GROWTH

Summary

The incorporation of purines into the nucleic acids of Landschütz tumor cells was investigated. The tumor bearing mice were injected with adenine labelled ^{14}C . Composition of nucleic acids and the specific radioactivity of adenine and guanine were determined. No marked changes between the old and young cells have been found in the composition of nucleic acids. In the old cells the incorporation of guanine was less intense than in the young ones.

The methods are described and the results discussed.

Otrzymano 23.6.1958 r.

S. NIEWIAROWSKI, E. KOWALSKI and J. STACHURSKA

INFLUENCE OF FIBRINOGEN DERIVED ANTITHROMBIN (ANTITHROMBIN VI) ON THE BLOOD COAGULATION SYSTEM

Pracownia Biochemii Klinicznej, Instytut Hematologii, Warszawa
Kierownik pracowni: doc. dr E. Kowalski

In previous communications the discovery of a new inhibitor of blood coagulation has been described [18, 19, 20]. The occurrence of this inhibitor has been confirmed by Buluk and Januszko [5]. We have shown that the inhibitor is formed as well *in vivo* after intravenous injection of plasmin into cats as *in vitro* after incubation of whole plasma with plasmin and trypsin. Thereafter it could be proved that the inhibitor is formed only from fibrinogen or from fibrin. Other proteins, after incubation with proteolytic enzymes, did not release any inhibitor of blood coagulation.

We were able to obtain purified preparations of this inhibitor by isoelectric precipitation of the incubation mixture containing fibrinogen and plasmin and by fractionation of the supernatant with ammonium sulphate. Thus it was possible to examine the mechanism of action of the new inhibitor on the blood coagulation system. Some experiments concerning this subject are presented in this paper.

PREPARATIONS AND METHODS

1. The inhibitor was prepared from purified fibrinogen obtained by the method of Kekwick *et al.* [9]. Plasmin obtained by trypsin or streptokinase activation of Kline's plasminogen was used [10, 21]. The whole preparation procedure was as follows: 1.8 volume of 1% fibrinogen was incubated with 0.2 volumes of plasmin. The solution of plasmin was diluted to such a concentration that the clottable protein disappeared in approximately 20 minutes. The protein concentration in plasmin solution was on the average 0.01%. Activity of the inhibitor was tested every 5 minutes (see below). When the inhibitor activity reached a maximum, the incubation mixture was diluted 10-fold with cold distilled water and pH was adjusted to 5.3 with 1% acetic acid. The solution was left

overnight at 4°. The precipitate centrifuged was discarded. The supernatant was precipitated by 50% ammonium sulphate saturation at pH 7.0. The precipitate was dissolved in water, dialysed overnight against tap water and thereafter against distilled water. The dialysate was filtered and lyophilised. The yield of inhibitor, if prepared from fibrin instead of fibrinogen, was significantly lower.

The preparations of inhibitor were devoided of plasmin; they contained, however, small quantities of plasminogen. On incubation of inhibitor with plasmin it could be shown that the inhibitor is digested by plasmin. The anticoagulant preparations inhibited slightly the fibrinolytic action of plasmin.

Electrophoretic behaviour of the anticoagulant preparations has been examined using Tiselius apparatus. The inhibitor activity is associated with a component of electrophoretic mobility $= 2.25 \cdot 10^{-5} \frac{\text{cm}^2}{\text{volt. sec}}$ (veronal buffer pH 8.6, $\mu = 0.1$).

2. In all experiments commercial preparations of streptokinase (Distreptaza, Warszawska Wytwórnia Surowic i Szczepionek), heparin and protamine sulphate (Hoffmann La Roche) were used.

3. The influence of the inhibitor on the blood coagulation system was examined by routine laboratory methods [4, 17] after adding inhibitor preparations to whole plasma or to isolated blood coagulation factors.

4. Determinations of antithrombin activity of anticoagulant preparations were performed as described previously [18, 19, 20]. 0.2 ml. of solution tested in different concentrations was added to 0.2 ml. bovine prothrombin-free plasma. After addition of 0.1 ml. thrombin the clotting time was recorded. The most suitable concentration of anticoagulant for all examinations was 2—5 mg. protein per ml.

5. Determination of antithromboplastic activity. Influence of the inhibitor on the first coagulation stage was performed by the method of Biggs and Douglas [3] in the modification of Duckert *et al.* [7]. The inhibitor preparations were added to the partially isolated components of the first coagulation stage (antihaemophilic globulin, Christmas factor, platelets, calcium chloride) and the amount of thromboplastin formed was tested using platelet-poor citrate plasma as a substrate containing both prothrombin and fibrinogen. At the same time the samples containing 0.9% NaCl instead of inhibitor solution were examined.

A typical test: 0.3 ml. inhibitor (or saline), 0.1 ml. human plasma adsorbed with BaSO₄, diluted 1/5 with saline (source of AHG), 0.1 ml. human serum, diluted 1/5 (source of Christmas Factor), 0.1 ml. platelets, 0.1 ml. calcium chloride 0.05 M. After 4 minutes of incubation 0.1 ml. of

Table 1

Influence of antithrombin VI on the coagulability of whole blood and plasma

	Antithrombin VI preparations							
	A ₁		A ₂		A ₃		A ₄	
	control	tested	control	tested	control	tested	control	tested
Thrombin time of plasma (seconds)	5	30	10	20	9	33	8	90
Clotting time of oxalate plasma after recalcination (seconds)	120	156	80	84	82	99	165	165
Clotting time of blood (Lee-White method) (minutes)	—	—	5 ⁰⁰	5 ³⁰	—	—	4 ⁰⁰	5 ⁰⁰
Prothrombin time (seconds)	15	20	18.5	21	19.5	20	11	24

Table 2

Antithrombin and antithromboplastin activity of two representative anticoagulant (A) preparations

	A ₅ control tested		A ₆ control tested	
I. Antithrombin activity				
Thrombin clotting time of bovine prothrombin-free plasma after addition of inhibitor (seconds)	8	30	8	30
II. Antithromboplastin activity				
Clotting time of human plasma after addition of thromboplastin generated 6 minutes in the presence of inhibitor (seconds)	18	66	18	22
Electrophoretic purity of the preparation	72%		95%	

the incubated mixture and 0.1 ml. 0.025 M CaCl₂ was added to 0.1 ml. of human platelet-poor citrate plasma.

6. The conversion of prothrombin was examined in diluted plasma in the presence of rabbit brain thromboplastin and calcium chloride by the two stage method of Leonow [15].

RESULTS

1. The influence of the inhibitor on the coagulability of whole blood and whole plasma is presented in Table 1. It can be seen that at concentrations used the inhibitor influenced mainly the thrombin time of plasma which was significantly prolonged.

Table 3

Influence of antithrombin VI on the conversion of prothrombin in diluted plasma
Incubation mixture: 0.5 ml, antithrombin preparation or saline (control), 0.2 ml. plasma diluted 1/3, 0.3 ml. thromboplastin-calcium

Incubation time	Activity of thrombin generated in the incubation mixtures expressed as clotting time of fibrinogen			
	Preparations of antithrombin VI			
	control	A ₁	A ₂	A ₇
30 sec.	5 min.	5 min.	5 min.	5 min.
1 min. 30 sec.	22.5 sec.	93 sec.	24 sec.	23 sec.
2 min. 30 sec.	18 sec.	22 sec.	18 sec.	15 sec.
3 min. 30 sec.	24 sec.	21 sec.	20 sec.	18 sec.
4 min. 30 sec.	27 sec.	23 sec.	21 sec.	19 sec.

Table 4

The clotting activity of the mixture of thrombin and antithrombin VI measured at various incubation times

Incubation time of the mixture	Preparations of antithrombin VI		
	1	2	3
	Clotting times of added fibrinogen (seconds)		
0 sec.	20	22	53
30 "	16	20	45
60 "	17	21	40
120 "	16	19	25
300 "	14	17	23
30 min.	—	16	23
90 "	—	15	23
Control (no inhibitor)	8	7	7

2. *The first coagulation stage.* It was found that some inhibitor preparations inhibited thromboplastin formation, however, some other preparations did not show any antithromboplastin activity. Table 2 shows the results of examinations of two representative preparations. Further studies revealed that antithromboplastin activity is due to a factor different from the thrombin inhibitor [22].

3. It was found that the inhibitor preparations did not influence the conversion of prothrombin (Table 3).

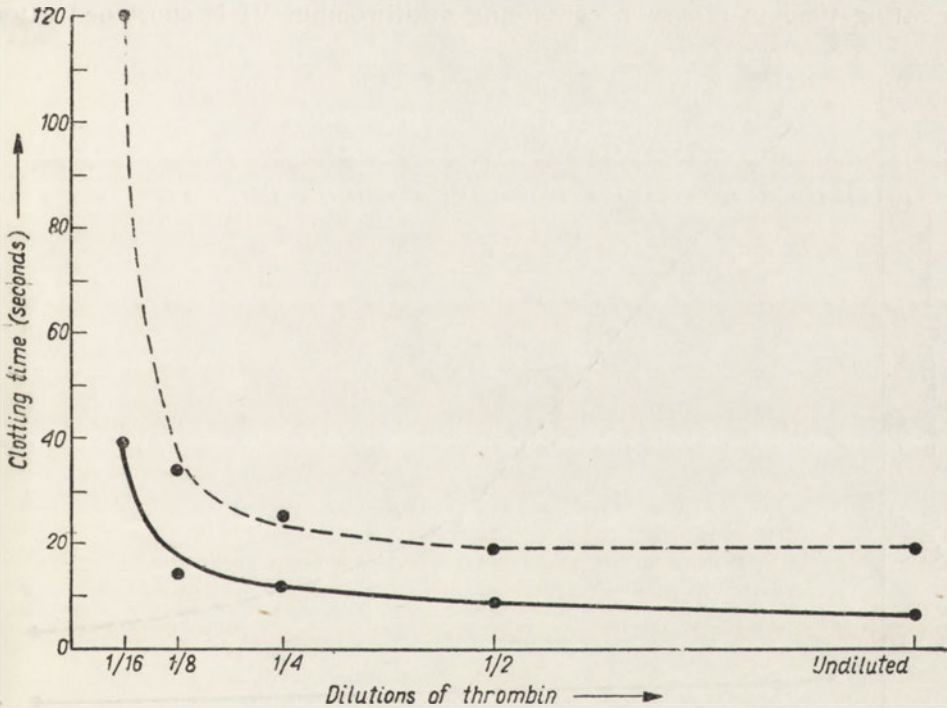


Fig. 1. Concentration of thrombin and the activity of thrombin inhibitor (System: 0.2 ml. fibrinogen + 0.2 ml. inhibitor or saline)

●—●—● with inhibitor ●—●—● without inhibitor

4. *The third coagulation stage.* The influence of antithrombin VI on the interaction of fibrinogen with thrombin was examined at different concentrations of thrombin and fibrinogen (Figs. 1 and 2). It was found that the anticoagulant activity is influenced mainly by the concentration of fibrinogen. The concentration of thrombin, however, has negligible influence on the degree of inhibition. This finding permits to suggest that fibrinogen and the thrombin inhibitor compete for thrombin.

The clotting time of fibrinogen plotted against different concentrations of inhibitor at constant concentration of thrombin is shown in Figure 3. After prolonged incubation of inhibitor with thrombin the thrombin activity was fully preserved but the inhibitor was progressively destroyed (Table 4). It may be concluded that the inhibitor does not destroy thrombin but it inhibits only the action of thrombin on fibrinogen. On the other hand, thrombin destroys antithrombin VI.

5. *Influence of protamine sulphate.* It may be seen that the thrombin clotting time in a system containing antithrombin VI is shortened after

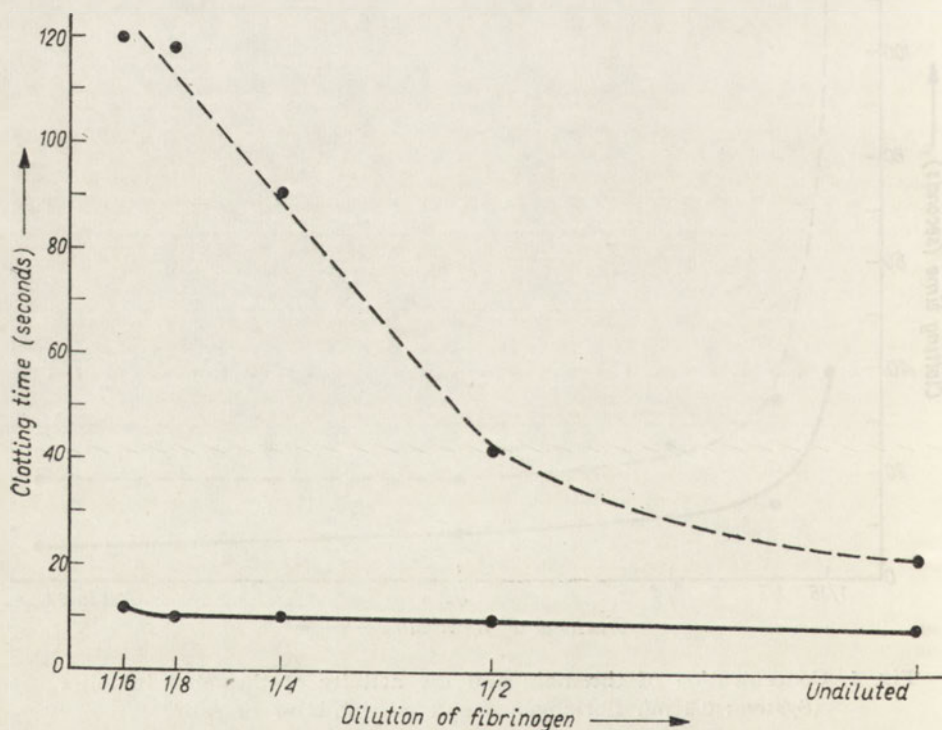


Fig. 2. Concentration of fibrinogen and the activity of thrombin inhibitor (System: 0.2 ml. fibrinogen + 0.2 ml. inhibitor (or saline) + 0.1 ml. thrombin)

●—●—● with inhibitor ●—●—● without inhibitor

addition of protamine sulphate. However, the effect of protamine sulphate against heparin is far more pronounced (Table 5). It is difficult to conclude whether protamine sulphate neutralises antithrombin VI or its effect is unspecific.

DISCUSSION

It may be concluded from the above experiments that the recently discovered fibrinogen derived anticoagulant inhibits competitively the conversion of fibrinogen to fibrin by thrombin. Its action on the other clotting factors and coagulation stages is negligible. The antithrombotic activity of some anticoagulant preparations and fibrinolysis products is due to an other factor derived also from fibrinogen [22].

Seegers [23] has classified the plasma antithrombins as I, II, III and IV. The above described inhibitor is different from Seegers antithrombins,

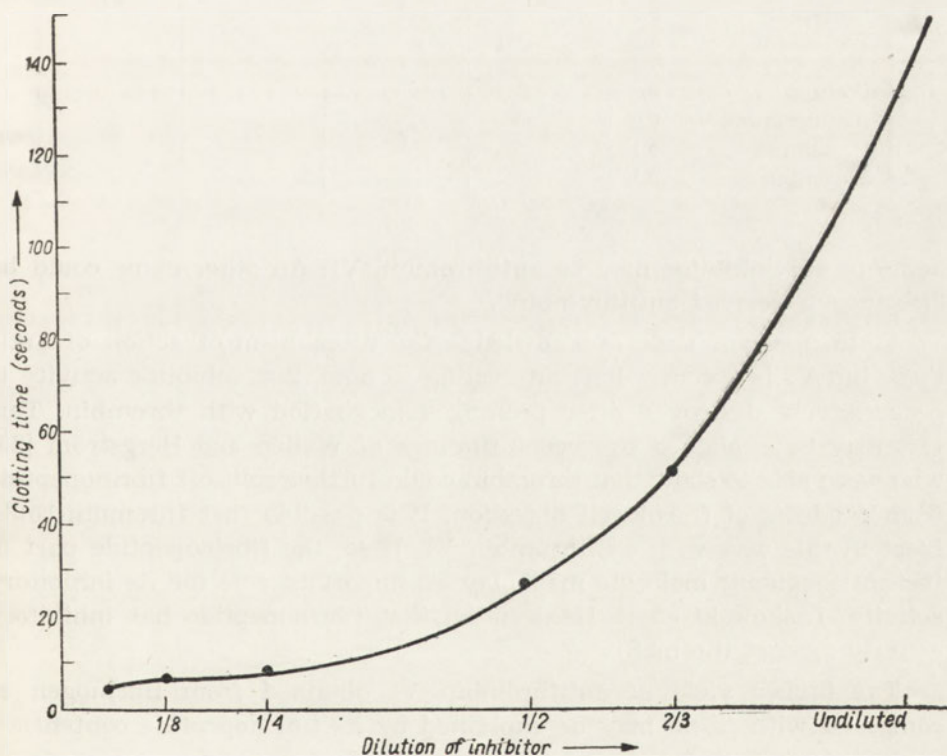


Fig. 3. Thrombin inhibitor dilution curve (System: 0.2 ml. fibrinogen + 0.2 ml. inhibitor (or saline) + 0.1 ml. thrombin)

so we suggested to call it antithrombin V. At the same time as this paper was prepared to publication Loeliger and Hess [16] described a thrombin inhibitor in the plasma of a patient with rheumatoid arthritis. These authors have called this inhibitor antithrombin V. If it is so, the

Table 5

Neutralisation of heparin and antithrombin VI by protamine sulphate

Solution tested	ml.	Concentration of protamine sulphate $\mu\text{g}/0.1$ ml.			
		5	2	1	0
Clotting time (second)					
Plasma	0.2				
Heparin	0.2	21	20	5 — 10	above 10
Protamine	0.2			minutes	minutes
Thrombin	0.2				
Plasma	0.2				
Saline	0.2	18	21	23	21
Protamine	0.1				
Thrombin	0.1				
Plasma	0.2				
Antithrombin VI	0.2	45	60	71	90
Protamine	0.1				
Thrombin	0.1				

name of our inhibitor may be antithrombin VI. An other name could be "fibrinogen derived antithrombin".

At the present state of knowledge the mechanism of action of antithrombin VI is obscure. It is interesting to note, that inhibitor activity is progressively destroyed after prolonged incubation with thrombin. This fact may be explained by recent findings of Wallen and Bergström [25] who were able to show that thrombin could further split off fibrinopeptide from products of fibrinogen digestion. It is possible that thrombin could react in this way with antithrombin VI. If so, the fibrinopeptide part in the anticoagulant molecule may play an important role for its inhibitory activity. Laskowski *et al.* [14a] stated that fibrinopeptide has inhibitory activity against thrombin.

The higher yield of antithrombin VI obtained from fibrinogen as compared with fibrin may be explained by its fibrinopeptide content.

A possible physiological role of antithrombin may be postulated on the basis of the dynamic concept of blood coagulation. According to this view, blood coagulation and fibrinolysis occur in a "steady state", in latent form: prothrombin is transformed into thrombin, fibrinogen into fibrin, and fibrin is dissolved continuously (Lasch *et al.* [13, 14], Copley [6], Jensen [8]). It may be, that antithrombin VI, a product of fibrinogen proteolysis plays a role in maintaining the equilibrium of this physiological process.

A role in pathology of antithrombin VI can be suggested on the basis of some recent observations in our laboratory. The appearance of an antithrombin in blood plasma was noted in our experiments after infusion of plasmin into cats [11], dogs and humans [12]. Similarly, in a case of fibrinogenopenia following *abruptio placentae* Bar-Pratkowska and Niewiarowska [2] observed an anticoagulant which may be identical with the fibrinogen derived antithrombin.

It is not excluded that some anticoagulants described by different authors in fibrinolytic haemorrhagic diathesis are identical with antithrombin VI [24]. However, further work is needed to obtain more information about the chemical structure of the fibrinogen derived antithrombin and to elucidate its role in physiological and pathological states.

We are indebted to Mrs. Zofia May (Department of Biochemistry, Institute of Haematology) who performed kindly the electrophoretical analysis.

SUMMARY

1. A method of preparation of antithrombin VI from fibrinogen proteolysis products is described.
2. Antithrombin VI influences slightly the clotting time of whole blood and recalcified plasma, however, it prolongs considerably the thrombin clotting time of plasma.
3. Purified antithrombin preparations do not inhibit thromboplastin generation; antithromboplastin activity was found only in electrophoretically not homogeneous preparations.
4. Antithrombin preparations do not influence the conversion of prothrombin into thrombin in diluted plasma, in the presence of calcium ions and tissue thromboplastin.
5. It could be shown that antithrombin inhibits competitively the action of thrombin on fibrinogen.
6. During incubation of antithrombin VI with thrombin the antithrombin activity decreases progressively.
7. Thrombin clotting time in a system containing antithrombin VI is shortened after addition of protamine sulphate, however, the effect of protamine sulphate against heparin is far more pronounced. It is difficult to conclude whether the protamine sulphate effect is specific.
8. Some data concerning the physiological and pathological role of antithrombin VI and the mechanism of its action are discussed.

REFERENCES

- [1] Astrup T., *Blood* **11**, 781, 1956.
- [2] Bar-Pratkowska J., Niewiarowska M., *Pol. Tyg. Lek.* **12**, 1958.
- [3] Biggs R., Douglas A. S., *J. Clin. Path.* **6**, 15, 1953.
- [4] Biggs R., Macfarlane R. G., *Human Blood Coagulation and its Disorders*, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1953.
- [5] Buluk K., Januszko T., *Postępy Higieny i Med. Dośw.* **12**, 91, 1958.
- [6] Copley A. L., *Ist Intern. Confer. on Thrombosis and Embolism*, Basel, 1954, Benno Schwabe, p. 452.
- [7] Duckert F., Flückinger P., Isenschmied H., Matter M., Vogel-Meng J., Köbler F., *Acta Haematol.*, **12**, 197, 1954.
- [8] Jensen H., *Exp. Medicine and Surgery*, **14**, 189, 1956.
- [9] Kekwick R. A., Mackay M. E., Nance M. H., Record B. R., *Biochem. J.* **60**, 671, 1955.
- [10] Kline D. L., *J. Biol. Chem.* **204**, 949, 1953.
- [11] Kowalski E., Latalo Z., Niewiarowski S., Marczak K., Panasewicz J., *Pol. Tyg. Lek.* **12**, 1221, 1957.
- [12] Kowalski E., Latalo Z., Niewiarowski S. (unpublished results).
- [13] Lasch H. G., Roka L., *Klin. Wschr.* **32**, 460, 1954.
- [14] Lasch H. G., Pfisterer J., Schimpf K., *Acta Haematol.* **17**, 280, 1957.
- [14a] Laskowski M., Rakowitz D. H., Scherarga H. A., *J. Am. Chem. Soc.* **74**, 280, 1952.
- [15] Leonow A., *Przegląd Lekarski* **6**, 21, 1950.
- [16] Loeliger A., Hers J. F., *Thrombosis et Diathesis Haemorrhagica* **1**, 499, 1957.
- [17] Niewiarowski S., *Krzepnięcie krwi*, P.Z.W.L. Warszawa, 1954.
- [18] Niewiarowski S., Kowalski E., *Bull. Acad. Polon. Sci., Cl. II*, **5**, 169, 1957.
- [19] Niewiarowski S., Kowalski E., *VI Congrès de la Société Européenne d'Hématologie*, Copenhagen, 1957, Karger (in press).
- [20] Niewiarowski S., Kowalski E., *Revue d'Hématologie* **13**, 320, 1958.
- [21] Niewiarowski S., Latalo Z., *Intern. Symposium on Blood Derivatives and Substitutes*, Warszawa, 1957.
- [22] Niewiarowski S., Latalo Z., Stachurska J. (to be published).
- [23] Seegers W. H., *Advances in Enzymology* **16**, 23, 1955.
- [24] Schneider C. L., *Progress in Haematology*, **1**, 202, 1956, ed. by L. M. Tocantis Grune and Stratton, New-York and London.
- [25] Wallen P., Bergström K., *Acta Chem. Scand.* **12**, 574, 1958.

DZIAŁANIE ANTYTROMBINY VI (POCHODNEJ FIBRYNOGENU)
NA UKŁAD KRZEPNIĘCIA KRWI

Streszczenie

1. Podano metodę otrzymywania antytrombiny z produktów proteolizy fibrynogeny.
2. Antytrombina VI wpływa w niewielkim stopniu na czas krzepnięcia pełnej krwi i na czas rekalcynacji osocza; natomiast wybitnie wydłuża czas trombinowy osocza (Tabl. 1).

3. Bardziej oczyszczone preparaty antytrombiny nie hamują generacji tromboplastyny osoczowej; aktywność antytromboplastynowa występuje natomiast w preparatach elektroforetycznie niejednorodnych (Tabl. 2).

4. Preparaty antytrombiny nie mają wpływu na konwersję prototrombiny na trombinę w rozcieńczonym osoczu, w obecności tromboplastyny osoczowej i jonów wapnia (Tabl. 3).

5. Wykazano, że antytrombina hamuje kompetetywnie działanie trombiny na fibrynogen (Rys. 1 i 2).

6. Dodanie siarczanu protaminy do układu zawierającego antytrombinę powoduje skrócenie czasu krzepnięcia. Działanie antyheparynowe protaminy jest jednak o tyle silniejsze, że trudno wypowiedzieć się, czy nie chodzi tu o efekt specyficzny.

7. Omówiono niektóre dane dotyczące znaczenia antytrombiny VI dla fizjologii i patologii.

Otrzymano 25.6.1958 r.

1. *Przebieg choroby*
 2. *Objawy*
 3. *Objawy*
 4. *Objawy*
 5. *Objawy*
 6. *Objawy*
 7. *Objawy*
 8. *Objawy*
 9. *Objawy*
 10. *Objawy*
 11. *Objawy*
 12. *Objawy*
 13. *Objawy*
 14. *Objawy*
 15. *Objawy*
 16. *Objawy*
 17. *Objawy*
 18. *Objawy*
 19. *Objawy*
 20. *Objawy*
 21. *Objawy*
 22. *Objawy*
 23. *Objawy*
 24. *Objawy*
 25. *Objawy*
 26. *Objawy*
 27. *Objawy*
 28. *Objawy*
 29. *Objawy*
 30. *Objawy*
 31. *Objawy*
 32. *Objawy*
 33. *Objawy*
 34. *Objawy*
 35. *Objawy*
 36. *Objawy*
 37. *Objawy*
 38. *Objawy*
 39. *Objawy*
 40. *Objawy*
 41. *Objawy*
 42. *Objawy*
 43. *Objawy*
 44. *Objawy*
 45. *Objawy*
 46. *Objawy*
 47. *Objawy*
 48. *Objawy*
 49. *Objawy*
 50. *Objawy*
 51. *Objawy*
 52. *Objawy*
 53. *Objawy*
 54. *Objawy*
 55. *Objawy*
 56. *Objawy*
 57. *Objawy*
 58. *Objawy*
 59. *Objawy*
 60. *Objawy*
 61. *Objawy*
 62. *Objawy*
 63. *Objawy*
 64. *Objawy*
 65. *Objawy*
 66. *Objawy*
 67. *Objawy*
 68. *Objawy*
 69. *Objawy*
 70. *Objawy*
 71. *Objawy*
 72. *Objawy*
 73. *Objawy*
 74. *Objawy*
 75. *Objawy*
 76. *Objawy*
 77. *Objawy*
 78. *Objawy*
 79. *Objawy*
 80. *Objawy*
 81. *Objawy*
 82. *Objawy*
 83. *Objawy*
 84. *Objawy*
 85. *Objawy*
 86. *Objawy*
 87. *Objawy*
 88. *Objawy*
 89. *Objawy*
 90. *Objawy*
 91. *Objawy*
 92. *Objawy*
 93. *Objawy*
 94. *Objawy*
 95. *Objawy*
 96. *Objawy*
 97. *Objawy*
 98. *Objawy*
 99. *Objawy*
 100. *Objawy*

M. WIERZUCHOWSKI

CIEŻKA PRACA MIĘŚNIOWA A ODPLYW CUKRU ZE KRWI NA POCZĄTKU WYSYCANIA GLIKOZĄ

Zakład Fizjologii Polskiej Akademii Nauk w Łodzi

ROZDZIAŁ WSTĘPNY

Niniejsza rozprawa opisuje rytmny rozmaitych czynności, które wyzwala w ustroju jednostajny dowóz szybko przetwarzalnego podłoża podczas stanu, który doprowadza ustrój do najwyższych wydatków energetycznych.

1. Zadanie

Plan pracy polegał na porównaniu u psa wpływu jednostajnych wlewań dożylnych glikozy, podczas ciężkich wysiłków mięśniowych, z opisanym już działaniem tychże wlewań u osobnika spoczywającego [47].

Przytoczony zespół wyników obejmuje niewiele więcej, niż pierwsze pół godziny dowozu glikozy ze stałą prędkością. Dalsze odcinki, przytoczone tylko dorywczo, zostaną omówione szerzej w przyszłości.

Sposób wykonania posiadał swe odrębności: Po pierwsze, badania wykonano na prawidłowych „nietkniętych“ nie uspionych osobnikach, które spełniały właściwy im fizjologicznie rodzaj długotrwałej czynności mięśniowej. Pozwalało to śledzić subtelną i prawdopodobnie nieskażoną dynamikę zmian ustrojowych. Po drugie, do rozbioru zjawisk użyto bardzo rozległej skali prędkości, z jaką stosowano glikozę.

Z wyżej określonym zadaniem wiąże się rusztowanie zagadnień:

1) Początkowa część każdego z obecnych doświadczeń była przykładem, na którym można było wypróbować kinetykę zapoczątkowującego wysycania glikozą, opracowaną dla osobników spoczywających [50, 51], i ocenić, jak wpływa praca mięśniowa u różnych osobników na parametry uchodzenia ze krwi tego cukru podczas początkowego szybkiego wzrostu przecukrzenia.

2) Gdy w pierwszej półgodzinie pracy zasilanej glikozą stężenie tego cukru podejdzie do odpowiedniego poziomu, należałoby oczekiwać, że

wszystkie dostępne punkty, katalizujące początkowy rozpad glikozy, zostaną obsadzone. Lecz dzieje się to podczas zwiększonego przez pracę zużycia glikozy, a więc i zwiększenia czynnej przetwórczo powierzchni enzymatycznej.

3) W dalszym przebiegu rytm wysycania stanowisk enzymatycznych glikozą spotyka się z poprawą przetwarzania, dającą się przypisać dopiero teraz występującemu pełnemu uruchomieniu punktów przetwórczych, które widocznie w pierwszej półgodzinie nie spełniały jeszcze dostatecznie swej roli. Fala tego wzbierania czynności enzymatycznej, która w podobny sposób zaznacza się również w spoczynku, ulega jednak podczas pracy pewnej zmianie. Należy ją przypisać adaptacji enzymatycznej, rozpiętej na podłożu działań hormonalnych.

4) Wprowadzany roztwór obok glikozy zawiera wodę, której objętość dochodziła do znacznych rozmiarów. Oznaczono więc jej obrót w pierwszej półgodzinie doświadczenia, by można było krytycznie rozpatrzeć zachowanie się glikozy.

2. Materiał zwierzęcy

Do doświadczeń z pracą mięśniową użyto 17 psów mieszańców (♀) o wadze 6,0 do 11,5 kg. Wykonano na nich 38 doświadczeń z dowozem glikozy i 11 kontrolnych bez jej dowozu. Przed właściwym doświadczeniem poddawano je w ciągu miesięcy ćwiczeniom w wykonywaniu mniejszych co do trwania dawek pracy, które jednak miały to samo natężenie co podczas właściwego doświadczenia.

Do badań spoczynkowych wzięto 30 psów (♀) o wadze między 4,3 a 22,6 kg. Wykonano na nich 71 jednostajnych wlewań glikozy oraz 5 wlewań roztworu fizjologicznego. Była to grupa, określona jako wzorcowa [51].

Każdy z osobników posiada na wykresach odrębny znak, dlatego każde doświadczenie można prześledzić przez wszystkie wykresy.

Oprócz tego podano wyniki 6 wlewań fruktozy u spoczywających i pracujących zwierząt i podobnie 3 wstrzykiwań galaktozy.

3. Diety

Zwierzęta, karmione stale odpadkami jedzenia szpitalnego z przewagą węglowodanów, otrzymywały przez tydzień poprzedzający doświadczenie dietę nr 1 [51] lub w paru przypadkach dietę nr 3.

Dieta nr 3 zawierała na dobę na kg wagi ciała: 13,2 g cukru jadalnego i 4,3 g mięsa końskiego oraz około 1,5 g suszonych kości. Zaspokajała ona koszt podstawowej wytwórczości cieplnej z nadwyżką 37%. Zwierzę

otrzymywało na 24 godziny, na kg wagi: 12,9 g węglowodanów, 0,94 g białka i 0,1 g tłuszczu, razem 56 kcal. W tym 91,3% ciepła pochodziło z węglowodanów. Ze wszystkich 3 diet zawierała ona w mierze bezwzględnej i względnej najwięcej węglowodanów, a najmniej tłuszczu i białka. Nic więc dziwnego, że przetwarzanie glikozy było po niej nieco lepsze, niż po obu innych dietach.

Waga i powierzchnia ciała znajdowały się w grupie doświadczeń z pracą w ramach węższych, niż w grupie spoczynkowej. Natomiast wskaźnik stanu odżywienia zachodził w obu zespołach w granicach optimum lub tylko nieznacznie przekraczał je ku górze albo ku dołowi. Ze stanowiska przygotowania pod względem stanu odżywienia dawały się więc porównać ze sobą (por. uwagi w [51]).

4. Oznaczenia różnych wartości

Oprócz metod użytych w poprzednim doniesieniu [50, 51] zastosowano do oznaczenia fruktozy we krwi [7, 55], do drożdżowej fermentacji we krwi [41, 57, 58, 54] (oznaczenia glikozy, reszty redukcyjnej i galaktozy), do określenia ilości jednocukrowców w moczu oznaczeń polarymetrycznych z redukcyjnymi przy pomocy metody Bertranda, do kwasu mlecznego we krwi z początku [14, 15], a potem [17]. Względne stężenie hemoglobiny określano we krwi rozcieńczonej za pomocą 0,1 N HCl. W kolorymetrze typu Duboscq'a porównywano krew badaną (l_1) z krwią wstępną (l_0), pobraną z tego samego naczynia, jako wzorcem. Stąd wynikły dwa sposoby wyrażania stopnia rozcieńczenia osocza krwi w ciągu doświadczenia:

Względne stężenie hemoglobiny we krwi = $100 \cdot l_0/l_1$.

Względna objętość osocza = $100 \cdot l_1/l_0$.

Obu określeń używano w sposób zamienny.

Aby osiągnąć dane przeziwu niewyczuwalnego wazono zwierzęta, przed dowozem roztworu glikozy, na wadze Sautera dla człowieka, z dokładnością 0,1 g i w ciągu godziny uzyskiwano co 10 min. stratę wagi (5 psów, 20 doświadczeń). Podobne pomiary wykonano również podczas dowozu glikozy u osobników spoczywających (4 psy, 16 doświadczeń). Natomiast podczas pracy oznaczano półgodzinną stratę na wadze, mierzoną ze ścisłością 1 g, po uwzględnieniu całego bilansu wagowego (12 psów, 30 doświadczeń). Przykład tych obliczeń podano [48a], ale udoskonalono je w obecnym doniesieniu.

5. Sposób prowadzenia doświadczeń u zwierząt pracujących

Plan polegał na tym, by dawkę pracy utrzymać taką samą, a zmieniać w poszczególnych doświadczeniach tylko szybkość dowozu roztworu glikozy, czy to na jednym i tym samym osobniku, czy też na różnych. Osta-

tecznie wykształcona technika tego postępowania wymaga osobnego opisu. Te same urządzenia i sposoby, które służyły do wlewania dożylnego roztworu glikozy w spoczynku, stosowano również podczas pracy [48a, 51].

W dniu doświadczenia mniej więcej w 24 godziny po ostatnim całodobowym posiłku rozpoczynano równocześnie i pracę mięśniową biegu pod górę i dowóz roztworu glikozy, zawsze mniej więcej 20%. W połowie i na końcu każdej godziny doświadczenia zatrzymywano bieżnię, szybko pobierano krew, cewnikowano zwierzę i wyplukiwano dokładnie mocz, po czym ważono je na wielkiej wadze Sautera z dokładnością 1 g i wprowadzano z powrotem na bieżnię, nie rozdzielając połączeń z urządzeniem przetwarzającym roztwór cukru z biuret. Przerwa wynosiła za każdym razem do 5 minut i pozwalała na krótki wypoczynek zwierzęcia.

Podczas pracy wlewanie odbywało się wyłącznie do żył szyjnych przy pomocy stosownych kaniul szklanych. Krew wstępną i dalsze pobierano zawsze z tego samego miejsca *Venae jugularis ext.* po drugiej stronie szyi. Podczas biegu zwierzę dość swobodnie oddawało mocz do odpowiednio zbudowanego naczynia lejkowatego, przymocowanego do uprzęży, które obejmowało wylot zewnętrznych części płciowych a zarazem także cewki moczowej. O ile zwierzę chciało oddać mocz podczas biegu, zatrzymywało się na kilkanaście sekund, ślizgając się na łapach, przy bieżni nadal bieżni, i swobodnie wypuszczało mocz do lejkowatego naczynia, z którego odpływał on bez żadnych strat poprzez szeroką rurkę gumową do naczynia miarowego. Natomiast półgodzinne porcje moczu oddzielano przy pomocy cewnikowania (jak wyżej).

W pierwszej półgodzinie wprowadzania roztworu glikozy nie dowożono dodatkowo wody ani podczas pracy, ani w spoczynku, ale z dwu odmiennych powodów. U osobników spoczywających nie trzeba było jej wprowadzać według sprawdzianów wypracowanych dawniej [48a], zaś u pracujących, ze względu na półgodzinny rytm pomiarów, nie było sposobności do uzyskania danych dla dodatkowego dowozu wody, choćby nawet zjawiała się taka konieczność.

6. Dawkowanie pracy

W ergometrze, zwanym bieżnią obrotową, stosowano dwa natężenia pracy mięśniowej. Przy obu zwierzę biegło po pasie ruchomym pod górę pod kątem nachylenia $17,6^\circ$ (Tabl. 1). Przy natężeniu, zwanym „Praca I“, zwierzę przebywało w ciągu godziny drogę, biegnącą skośnie, długości 3,88 km, zaś przy „Pracy II“ — 5,14 km. Natężenie narzuconej przez bieżnię pracy zewnętrznej (suma kilogramometrów (= kg m) składnika poziomego i pionowego) wynosiło dla pracy I — 81,3 kg m na 1 kg wagi

T a b l i c a 1

Zastosowanie natężenia pracy i ich współczynniki: a) wyłącznie dla samego okresu pracy, określające natężenie wysiłku, oraz b) przeciętne, użytkowe z całogodzinnej pracy, przeplatanej pauzami

Natę- żenie	Kąt biegu pod góre	Odległość przebyta		Składniki pracy zewnętrznej na kg/min.	Oznaczona podstawowa wytwórczość ciepłota k cal/kg/min.	Obliczona wytwórczość ciepłota					
		m/min.	km/godz.			a) Natężenie podczas pracy		b) Użytkowa (praca + spoczynek)			
						jako ciepło k cal/kg/min.	większe od podstawowej wytwórczości ciepłoty (razem) g/kg/min.	jako ciepło k cal/kg/min.	większe od podstawowej wytwórczości ciepłoty (razem) g/kg/min.		
I	17,6°	64,7	3,88	19,6	0,0256	0,200	7,8	0,0534	0,182	7,1	0,0487
II	17,6°	85,6	5,14	25,9	0,0256	0,253	9,8	0,0676	0,230	9,0	0,0614

ciała na min., zaś przy pracy II — 107,5 kg m. Było więc przy pracy II o 32% wyższe, niż przy pracy I.

Wprawdzie nie oznaczano wymiany gazowej podczas pracy, ale przy uwzględnieniu zasad dla tego rodzaju obliczeń [34] oraz stosownych współczynników, uzyskanych u psa [4], obliczono ciepło wytwarzane podczas obranych natężeń biegu. Podstawowa wytwórczość cieplna, oznaczona w 186 oznaczeniach na 19 psach grupy spoczynkowej (♀), przy pomocy urządzenia o obwodzie otwartym [47], wynosiła na min./kg 0,02558 kcal, $\sigma = \pm 0,00288$, współczynnik zmienności $\pm 11,7\%$. Natężenie wytwarzania ciepła podczas pracy I było 7,8 razy większe od podstawowego w spoczynku, zaś podczas pracy II — 9,8 razy (Tabl. 1). Gdy jednak po uwzględnieniu pauz spoczynkowych uzyskano prawdziwą użytkową wytwórczość cieplną, była ona 7,1 i 9,0 razy większa, niż spoczynkowa (Tabl. 1). Takie obciążenie wysiłkiem doprowadzało po 5 lub 6 godzinach do silnego wyczerpania zwierzęcia.

7. Mianownictwo, symbole, obliczenia

Obecne doniesienie wiąże się ściśle z poprzedzającymi [50, 51] i opiera się na takich samych sposobach obliczeń oraz posługuje się takimi samymi symbolami: C_k — całkowity cukier we krwi w mg/100 ml; ΔC_k — przyrost cukru we krwi ponad poziom wstępny (przed pracą i dowozem glikozy, wyjściowy); $\Delta C_{kvj}^{0'-30'}/t$ — zapoczątkowująca zmiana stężenia cukru we krwi w mg na 100 ml/min. we krwi *V. jugularis ext.* w ciągu pierwszych 30 minut jednostajnego dowozu glikozy; t — czas w minutach, przeważnie 30 minut; V_i — prędkość dowozu glikozy w g na m² powierzchni ciała na godzinę.

Wzór dla zapoczątkowującego wzrostu stężenia glikozy we krwi (lub zapoczątkowującej zmiany minutowej tegoż stężenia), uzasadniony dla osobników spoczywających [51], brzmi (Rys. 1):

$$\Delta C_{kvj}^{0'-30'}/t = b_p \cdot V_i. \quad (1)$$

Odpowiada on równaniu prostej, która przecina skrzyżowanie osi współrzędnych, $y = b \cdot x$. Wynika z niego stała o pewnym znaczeniu w obecnych rozważaniach:

$$b_p = \frac{\Delta C_{kvj}^{0'-30'}}{t \cdot V_i} = \text{tang } \alpha. \quad (2)$$

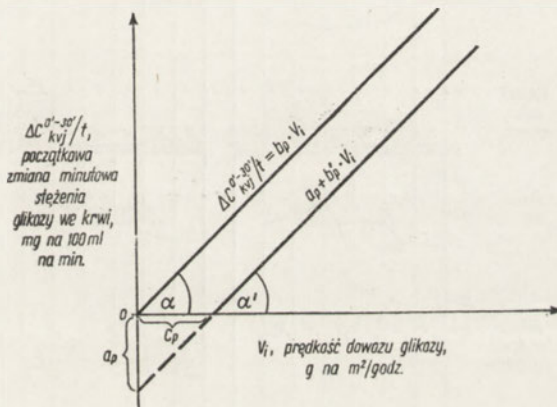
Podobnego wzoru użyto dla oznaczenia stałej b_p dla fruktozy i galaktozy (Tabl. 3 i 4).

Gdy jednak prosta przeprowadzona przez oznaczenia $\Delta C_{kvj}^{0'-30'}/t$ omija punkt zerowy, jak czyni to druga prosta na rys. 1, wtedy liczba stałych

powiększa się. Dla stałej b przyjęto wtedy znak b'_p . Równanie odpowiada prostej przebiegającej poniżej lub powyżej punktu zerowego, $y = a + b \cdot x$, co wyrażone przyjętymi symbolami daje wzór:

$$\Delta C_{k_{vj}}^{0'-30'}/t = a_p + b'_p \cdot V_i. \quad (3)$$

Stała a_p określa na osi rzędnych ($= \Delta C_{k_{vj}}^{0'-30'}/t$), o ile mg cukru na 100 ml krwi na min. prosta biegnie poniżej punktu zerowego w przykładzie na rys. 1. Stała b'_p wyznacza kąt nachylenia prostej, odepchniętej od punktu zerowego. Kąt ten może być odmienny (β), niż dla b_p (α). Jak uprzednio [51], obliczano stałe przy pomocy reguły najmniejszych kwadratów. Po obliczeniu obu stałych a_p i b'_p uzyskiwano, jako cenny parametr, punkt



Rys. 1. Przykłady prostych, które wyrażają stosunek między jednostajnie dożylnie skierowaną dawką glikozy a wywołanym przez nią minutowym przyrostem stężenia glikozy we krwi, w początkowych 30 minutach dowozu

przecięcia prostej z osią odciętych ($= V_i$), c_p , widoczny na rys. 1, gdy w formułę (3) wstawiono zero na miejsce $\Delta C_{k_{vj}}^{0'-30'}/t$. Wtedy

$$- a_p = b'_p \cdot V_i,$$

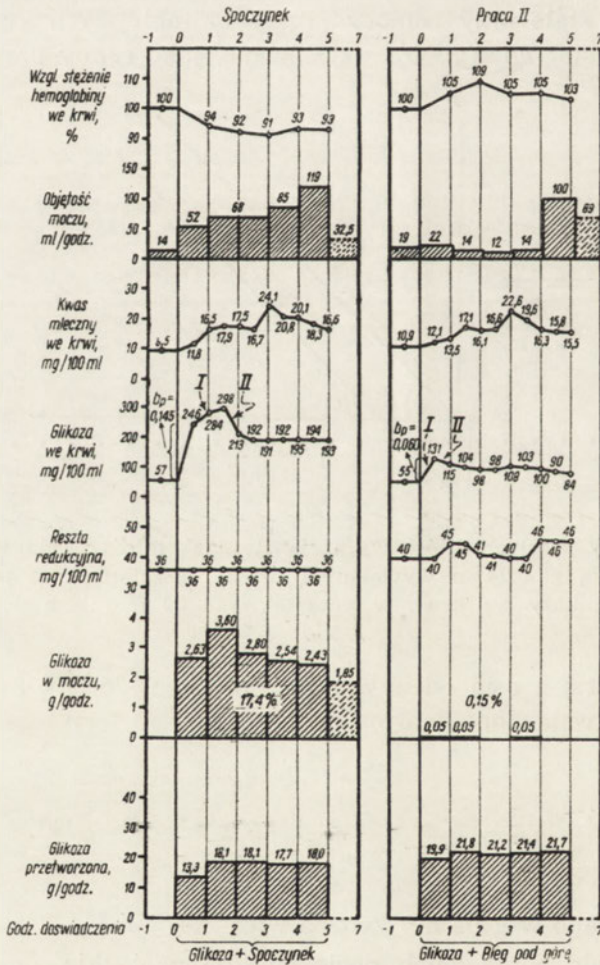
a stąd

$$c_p = - \frac{a_p}{b'_p}. \quad (4)$$

Stałą c_p wyrażano w g na m^2 /godz., a więc tak jak V_i .

Na podstawie poprzednich dociekań [51] wszystkie prawie wartości obliczano na powierzchnię ciała i dlatego wszystkie powyższe stałe mają dopisek P. Gdyby bowiem w powyższych wzorach użyto zamiast V_i szybkości dowozu na inne wymiary ciała, niż powierzchnia, stałe musiałyby przybrać odmiennie wartości.

Poprawne parametry prostej (3) można było uzyskać wyłącznie na podstawie liczby punktów większej, niż jeden. Dlatego, gdy chciano wykazać właściwości każdego punktu z osobna podczas pracy w porównaniu ze spoczynkiem, musiano się posłużyć równaniem (1) a nie (3). Otrzymana w ten sposób stała b_p była tylko pozorna, gdyż nie odpowiadała rzeczywistej kinetyce usuwania glikozy. Była jednak pożyteczna, bo wykazywała, jak wybitna różnica istnieje między pracą a spoczynkiem (Rys. 2, 10, Tabl. 2).



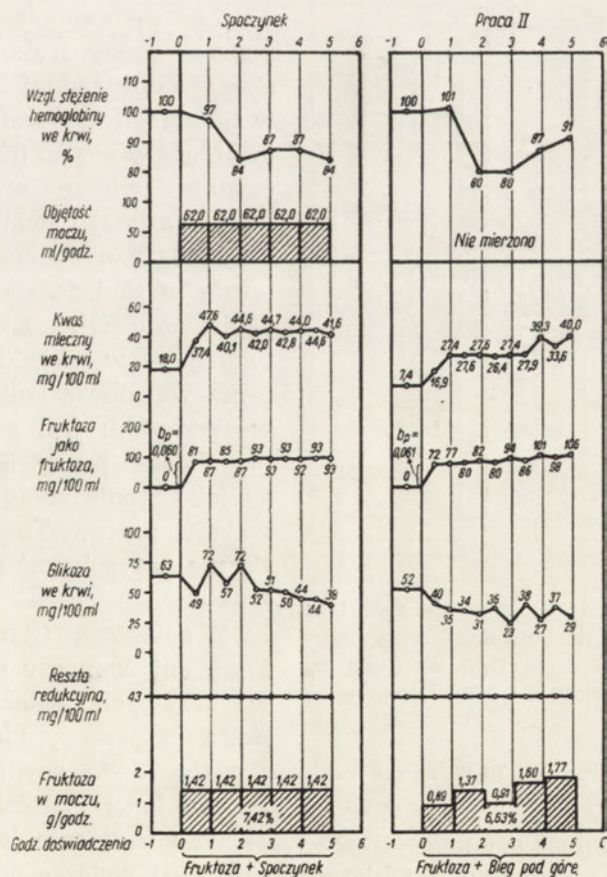
Rys. 2. Wlewano glikozę z tą samą prędkością (2 g na kg/godcz.) podczas spoczynku (Tabl. 2, Dian. d. 8) i podczas pracy (Dian. d. 7). Stała b_p podczas pracy jest pozorna. Odsetki naniesione na tle cukromoczu = wydalona z moczem część całej ilości wprowadzonego cukru. Dieta nr 3

WYNIKI

A. ZAPOCZĄTKOWUJĄCY WZROST STĘŻENIA CUKRU WE KRWI PODCZAS PRACY

1. Trzy jednocukrowce: zasadniczy fakt jakościowy

Już dawniej znaleziono [13, 52], że gdy w jednostajny sposób wprowadzać dożylnie glikozę, fruktozę i galaktozę u psa w tych samych ilościach podczas wyteżonej pracy mięśniowej i w spoczynku wtedy, tylko przetwarzanie glikozy wzmaga się pod wpływem pracy, zaś dwu innych heksoz nie ulega zmianie. Tak wywnioskowano z doświadczeń wykonanych wówczas na jednym i tym samym osobniku, z których parę przedstawiono na rys. 2—4.



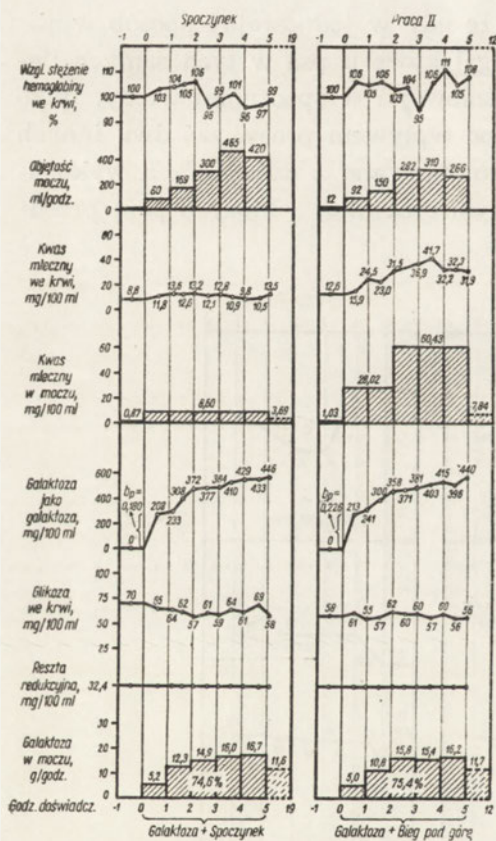
Rys. 3. Dowodzone dożylnie fruktozę, 2 g na kg/godz. Dian. (♀) spoczynek d. 3, praca d. 2 (Tabl. 3). Stałe b_p dla fruktozy krwi. Dieta nr 3

Podczas pracy i dowozu glikozy (Rys. 2) układ fazy I i II zostaje bardzo znacznie zmniejszony i skrócony do resztki, ledwie zaznaczającej się w krzywej glikozy we krwi. Również w 2—5 godzinie stężenie jej jest wybitnie niższe, niż w spoczynku i opada nieznacznie, ale nie dochodzi do wartości wyjściowej. Pozorna stała b_p spada do 0,060 z 0,145 w spoczynku.

Gdy w spoczynku zwierzę wydała 17,4% wprowadzonej glikozy, podczas pracy zaledwie 0,15%. Dlatego przetwarzanie glikozy wzmagają się wybitnie. Natomiast stężenie kwasu mlecznego we krwi pozostaje bez zmian. Objętość moczu maleje, a osocze krwi zagęszcza się.

Gdy się natomiast wprowadza podczas pracy fruktozę, nie dochodzi do żadnej zmiany ani w przebiegu krzywej fruktozy we krwi, ani w moczu (Rys. 3). W spoczynku zwierzę wydała 7,42% wprowadzonej dawki, zaś podczas pracy 6,63%. Glikoza we krwi opada w taki sam sposób w obu okolicznościach. Kwas mleczny tworzony w wielkich ilościach przez wątrobę z fruktozy [61, 59] w spoczynku jest nawet wyższy, niż podczas pracy. Być może służy jako źródło energii mięśniowej podczas pracy. To jednak zdaje się nie przyspieszać przetwarzania fruktozy.

Z galaktozą (Rys. 4) ani we krwi, ani w moczu nie ma różnic w krzywych galaktozy między pracą a spoczynkiem. W spoczynku pies wydała 74,6%, zaś podczas pracy 75,4% dowiezionej galaktozy. Nie ma też różnic w krzywej glikozy we krwi, oznaczanej obok galaktozy. Stężenie kwasu mlecznego we krwi i usuwanie jego z moczem jest wybitnie podwyższone. Objętość moczu jest podczas pracy mniejsza, a krew zagęszczona w stosunku do spoczynku, nie więcej jednak, niż przy dowozie glikozy. Nie dostrzega się w przytoczonym doświadczeniu



Rys. 4. Wprowadzano dożylnie galaktozę z szybkością 2 g na kg/godz. Dian. spoczynek d. 10, praca d. 9 (Tabl. 4). Stała b_p odnosi się do galaktozy krwi. Dieta nr 3

spoczynku pies wydała 74,6%, zaś podczas pracy 75,4% dowiezionej galaktozy. Nie ma też różnic w krzywej glikozy we krwi, oznaczanej obok galaktozy. Stężenie kwasu mlecznego we krwi i usuwanie jego z moczem jest wybitnie podwyższone. Objętość moczu jest podczas pracy mniejsza, a krew zagęszczona w stosunku do spoczynku, nie więcej jednak, niż przy dowozie glikozy. Nie dostrzega się w przytoczonym doświadczeniu

(Rys. 4), by galaktoza rozmieszczała się podczas pracy w większej przestrzeni wodnej, niż w spoczynku, w przeciwieństwie do niektórych danych na preparatach zwierząt [19, 25].

Z technicznego punktu widzenia wyniki z fruktozą i galaktozą mogą służyć jako kontrolne badania dla glikozy. Podobnie jak glikoza zachowywała się maltoza [13, 52].

2. Wyjątkowość glikozy wyrażona określeniami kinetyki zapoczątkowania

Już w pierwszych 30 minutach jednostajnego dowozu stała b_p zapowiada, jak ustrój będzie się obchodził z daną heksozą podczas pracy i spoczynku. Stwierdzono to na 3 grupach doświadczeń z dowozem 3 heksoz z tą samą szybkością na kg/godz. (Tabl. 2—4). Doświadczenia z pracą robiono na tym samym osobniku co w spoczynku. W porównywanych parach doświadczeń osobniki nie różniły się wybitnie stanem odżywienia.

U 4 spoczywających psów podczas dowozu glikozy stężenie tego cukru we krwi podnosiło się przeciętnie 7,24 mg na 100 ml/min. Natomiast u tych samych osobników podczas pracy tylko 2,71 mg na 100 ml/min. (Tabl. 2). Fakt ten dostrzeżony już dawniej [13, 52], był potem wielokrotnie ponownie stwierdzany [27, 28, 40, 2, 6]. W tych warunkach stała b_p wynosiła w spoczynku 0,1752, była więc nieco wyższa, niż przeciętna wzorcowa (0,1631 [51]). Podczas pracy (pozorna) stała b_p spadała aż do 0,0668 (Tabl. 2).

Przy wlewaniu fruktozy zarówno w spoczynku, jak podczas pracy przyrost minutowy (= zmiana minutowa dodatnia) stężenia fruktozy we krwi, jak i jej stała b_p nie różnią się wyraźnie od siebie (Tabl. 3). Są przy tym tak niskie, jak podczas pracy wśród stosowania glikozy. Mimo tak niskiej stałej b_p , fruktoza jednak ciągle jest dość obficie wydalana z moczem, nie znika z niego, gdyż wykazuje w nerce znacznie mniejsze wchłanianie zwrotne, niż glikoza. Jak wynika z dawniejszych doświadczeń [46, 53], stężenie fruktozy we krwi wzrasta ciągle jeszcze po upływie pierwszej godziny dowozu z tą samą prędkością, jak w tabl. 3. Przeważnie nie dochodzi do stanu równowagi przed połową pierwszej godziny dowozu, co dawałoby sztucznie zbyt małe wartości zapoczątkowania.

Już z ilości cukru wydalanego z moczem w pierwszej godzinie dowozu podczas spoczynku wynika (Tabl. 2—4), że ustrój najmniej odrzuca fruktozy, więcej glikozy, a najwięcej galaktozy, zgodnie z danymi w narkozie amyntalowej [54]. W stosunku do wartości, otrzymanych dla glikozy, przyrost minutowy galaktozy we krwi i jej stała b_p w spoczynku (Tabl. 4) nie są jednak tak wyraźnie wyższe, jakby się tego można było spodziewać. Nie ma wybitniejszej różnicy między pracą a spoczynkiem w stałej b_p (praca 0,226, spoczynek 0,180) i wydalaniu galaktozy.

T a b l i c a 2

Cechy okresu zapoczątkowującego (30 pierwszych minut) podczas spoczynku i pracy II, w ciągu jednostajnego dowozu glikozy przez żyłę z prędkością 2 g na kg/godz., w parach doświadczeń u 4 psów (♀). Cukromocz dla całej pierwszej godziny dowozu glikozy. Stala b_p dla pracy jest pozorna (por. „Mianownictwo...”)

Pies, l.p. doświad.	Dieta nr	Waga kg	Powierzchnia m ²	Wskaznik odżywienia	Dowóz na godz.		Praca wykonana kg m/kg/godz.	Cukier we krwi mg/100 ml			ΔC_{kwi}^{0-30} mg/100 ml/min.	b_p glikozy	Glikoza w moczu g/m ² /godz.	
					g/kg	g/m ²		Wstępny C_{kwi}^{0-30}	Po mi- nutach dowozu C_{kwi}^{0-30}	ΔC_{kwi}^{0-30}				
Dian. d. 8	3	10,18	0,481	0,301	2,00	42,2	—	93	31	282	189	6,10	0,145	5-45
Walsh. d. 1	3	10,83	0,548	—	2,00	39,6	—	97	29	329	231	7,98	0,201	5-20
Bib. d. 2	1	8,47	0,405	0,314	2,00	41,5	—	97	30	309	212	7,07	0,170	4-25
Mik. d. 2	1	10,68	0,517	0,290	2,00	42,3	—	93	30	328	235	7,83	0,185	4-28
P r z e c i ę t n a													0,1752	
BIEG POD GÓRĘ														
Dian. d. 7	3	10,69	0,490	0,306	2,00	43,6	5804	95	29	171	76	2,62	0,060	ślady
Walsh. d. 2	3	9,96	0,518	—	2,00	38,4	6019	98	35	226	128	3,65	0,095	0
Bib. d. 3	1	8,03	0,398	0,308	2,00	40,4	6019	96	29	138	42	1,45	0,036	0
Mik. d. 3	1	10,45	0,513	0,288	2,00	40,8	5912	98	30	192	94	3,13	0,077	0
P r z e c i ę t n a													2,71	0,067

Tablica 3

Okres zapoczątkowującej fruktozy podczas spoczynku i pracy II. Dowożono 2 g na kg/godz. u 4 psów (♀). Fruktoza w moczu dla całej pierwszej godziny dowozu

Pis	l.p. doświad.	Dieta nr	Waga kg	Powierzchnia m ²	Wskaźnik odżywienia	Dowóz na godz.		Praca wykonana kg m/kg/godz.	Krew wstępna mg/100 ml				Krew w połowie godz. mg/100 ml				Zmiana minutowa stężenia fruktozy $\Delta C_{kwi}^{0-90}/t$	b_p fruktozy	Fruktoza wydalona z moczem g/m ² /godz.
						g/kg	g/m ²		Całkowita redukja	Glikoza	Reszta redukcyjna	Po minutach dowozu	Glikoza	Fruktoza	Reszta redukcyjna				
Dian.	d. 3	3	10,51	0,487	0,304	2,00	43,19	—	109	63	43	31	49	81	43	2,61	0,060	2,91	
Gin.	d. 1	3	21,00	0,874	0,276	2,00	48,05	—	118	78	40	29	77	79	40	2,72	0,057	1,84	
Much.	d. 1	3	28,81	1,054	0,284	2,00	54,67	—	110	70	40	35	56	125	40	3,58	0,065	5,47	
Ante.	d. 3	3	12,94	0,551	0,311	2,00	46,92	—	95	49	46	30	28	87	46	2,90	0,062	1,04	
P r z e c i ę t n a																			
Dian.	d. 2.	3	10,76	0,491	0,307	2,00	43,83	5374	99	59	40	29	47	77	40	2,66	0,061	2,31	
Dian.	d. 5.	3	9,95	0,477	0,299	2,00	41,72	5374	95	52	43	25	40	72	43	2,88	0,069	2,75	
P r z e c i ę t n a																			
0,065																			

Tablica 4
Okres zapoczątkowania dowozu galaktozy (2 g na kg/godz.) u 2 psów (♂) podczas spoczynku i pracy. Galaktoza w moczu z całej pierwszej godziny dowozu

Pies, I.p. doświad.	Dieta nr	Waga kg	Powierzchnia m ²	Wskaźnik odżywienia	Dowóz galaktozy na godz.		Praca wykonana kg m/kg/godz.	Krew wstępna mg/100 ml			Krew w połowie godziny mg/100 ml				Zmiana minutowa stężenia galaktozy $\Delta C_{80}^{0-80} / l$	b_p galaktozy	Galaktoza wydalona z moczem g/m ² /godz.
					g/kg	g/m ²		Całkowita redukcja	Glikoza	Reszta redukcyjna	Po minutach dowozu	Glikoza	Galaktoza	Reszta redukcyjna			
Dian. d. 10	3	10,28	0,487	0,301	2,00	42,26	--	102	70	32	35	65	267	32	7,62	0,180	10,74
Aspaz. d. 1	3	19,22	0,737	0,292	2,00	52,19	--	120	80	40	31	99	296	40	9,55	0,184	11,28
Dian. d. 9	3	9,93	0,477	0,299	2,00	41,73	SPOCZYNEK.		98	58	32	29	61	273	9,42	0,226	10,49
							BIEG POD GÓRĘ										

Tabela 5

Dane dla krzywej A z rys. 5. Przeważnie praca II. 23 doświadczenia na 11 psach (□).

Dla wszystkich danych tablicy (z wyjątkiem kontrolnych bez glikozy) istnieje zależność:

$$\Delta C_{kwy}^{0'-30'}/t = -3,71 + 0,1459 \cdot V_i$$

W grupie wybranych doświadczeń**, z najmniejszą $\Delta C_{kwy}^{0'-30'}/t$, zależność ta przybiera jeszcze bardziej krańcową postać:

$$\Delta C_{kwy}^{0'-30'}/t = -4,25 + 0,1367 \cdot V_i$$

Przez te dane została przeprowadzona krzywa E na rys. 5, najbardziej wysunięta na prawo. Dowóz glikozy i pracę rozpoczynano równocześnie.

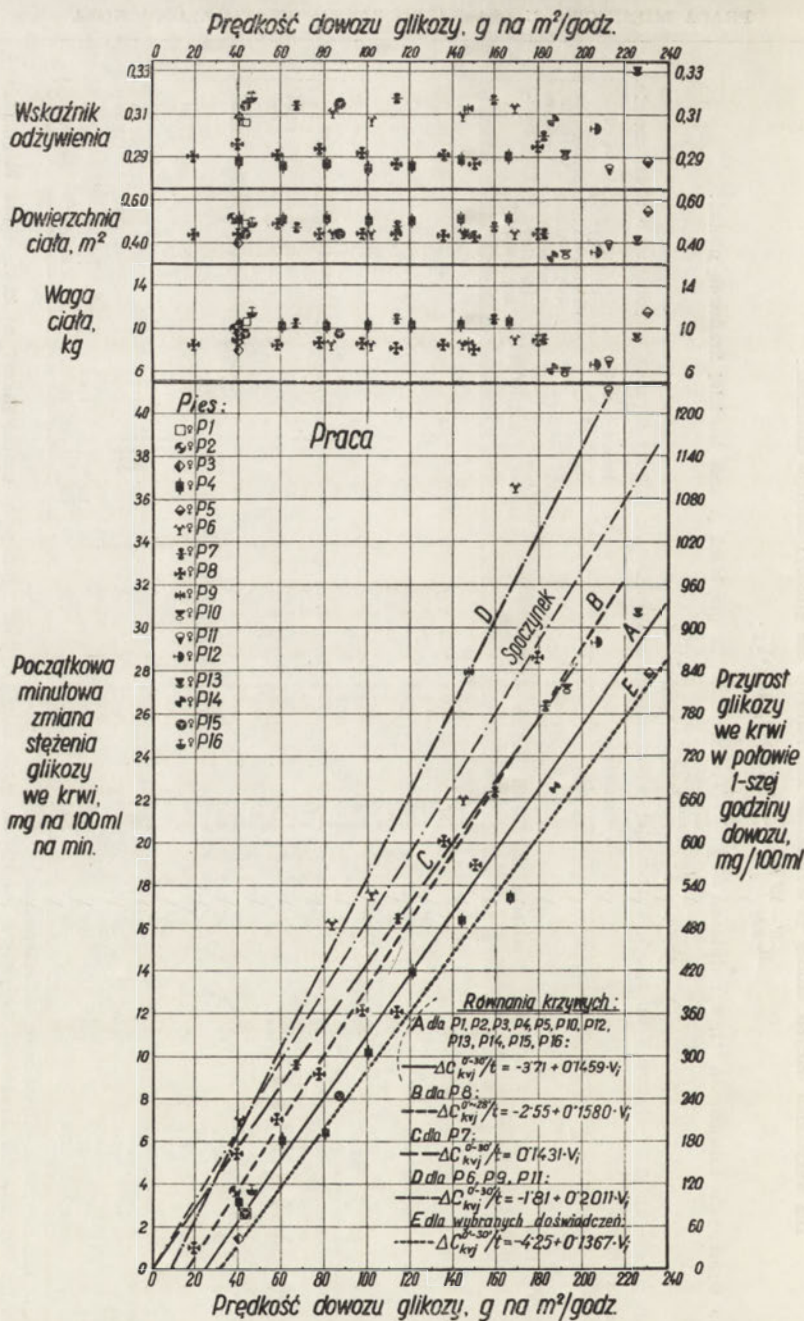
Pies dośw.	Dowóz glikozy na godz.		Pac k w k r g o d z .	C _{kwy} ^{0'} m g / 100 m l	W połowie godziny			Przy końcu godziny		Zmiana stężenia cukru we krwi między połową a końcem godziny m g / 100 m l	Glikoza w moczu g m ³ g o d z .
	g k g	g m ³			po upływie minut	C _{kwy} ^{~30'} m g / 100 m l	$\Delta C_{kwy}^{0'-30'}$ m g / 100 m l	$\Delta C_{kwy}^{0'-30'}/t$ m i n .	po upływie minut		
P1	d. 1	—	6019	95	86	—6	—0,22	63'	96	—	0
P1	d. 4	—	5574	92	97	—3	—0,10	57'	83	—3	0
P1	d. 6	—	5574	100	90	—1	—0,03	58'	100	3	0
P15	d. 1	—	4145	91	88	—2	—0,07	59'	84	—6	0
P16	d. 1	—	4227	90	88	—2	3,65	59'	89	—1	0
P2	d. 2	—	6019	98	226	128	3,65	62'	200	—26	0
P3	d. 3	2,00	6019	96	138	42	1,45	59'	119	—19	0
P4	d. 7	2,00	5804	95	171	76	2,62	59'	160	—11	0
P4	d. 3	2,00	5912	98	192	94	3,13	60'	135	—57	0
P6	d. 2	2,00	4927	89	193	104	3,71	58'	186	—7	1,53
P15	d. 3	2,00	4389	99	171	72	2,66	58'	161	—10	1,08
P4	d. 2	3,00	5912	104	285	181	6,01	60'	250	—35	0,32
P4	d. 5	4,00	5804	105	297	192	6,42	61'	294	—3	2,50
P15	d. 2	4,00	4145	98	343	244	8,13	58'	490	—147	1,25
P4	d. 6	5,00	5275	112	493	305	10,17*	60'	580	163	8,15
P4	d. 7	6,00	5574	77	417	417	13,91	60'	470	—24	17,50
P4	d. 8	7,00	6019	99	494	905	16,34	60'	627	38	28,40
P4	d. 9	8,00	5574	91	589	490	17,40	60'	612	—1	27,90
P14	d. 1	10,00	5697	169	613	522	22,57*	60'	1171	325	40,46
P13	d. 1	10,00	5974	109	846	677	30,70*	60'	1296	286	57,98
P5	d. 1	11,00	4945	104	1030	921	27,88	60'	1257	316	36,42
P10	d. 1	11,00	5974	134	941	837	27,17*	60'	1188	189	48,61
P12	d. 1	11,00	5974	107	986	879	29,30*	60'	1222	236	46,15

*) Interpolacja między blisko stojącymi oznaczeniami.

**) Doświadczenia wybrane dla krańcowej krzywej E na rys. 5, gdyż osiągała górną pułap usuwania glikozy ze krwi u psa blednącego pod górę w danych warunkach.

***) Wprowadzono jednostajnie dożylnie 10 ml 0,9% NaCl na kg na godz.

****) Rys. 6.



Rys. 5. Ciężka praca w bieżni obrotowej. Równocześnie dowożono przez żyłę jednostajnie roztwór glikozy z różnymi prędkościami. Dowóz glikozy rozpoczynano równocześnie z biegiem pod górę po pochyłości 17,6°. Wyniki ujęto w 5 prostych, których równania podano. Natężenie pracy: dla A i E praca bardziej nasilona (praca II), dla B, C i D nieco mniej nasilona (praca I). Prosta D — osobniki z częściową niedomogą nerek, stare. 16 psów (wyłącznie ♀), 38 doświadczeń. Bliższe szczegóły w tabl. 5—9. Kontrolna krzywa spoczynkowa dla 71 doświadczeń

Z 3 cukrów tylko glikoza okazała się bezpośrednio czerpanym ze krwi „paliwem“ pracy mięśniowej.

3. Zastosowanie do pracy mięśniowej danych kinetyki zapoczątkowującego wysycania glikozą

Samo zmniejszenie stężenia glikozy we krwi pod wpływem pracy mięśniowej w stosunku do wartości spoczynkowej przy jednakowej prędkości dowozu jest nie dość wnikliwym spostrzeżeniem, trochę tylko ściślejszym, niż przy dowozie glikozy doustnym lub innymi drogami [2, 40, 6].

Także ilościowa ocena stosunku między stężeniem podłoża w nieuszczelnym zbiorniku, do którego się je wpuszcza, a dowiezioną dawką przy jednej obranej V_i w postaci stałej b_p również niedość jeszcze dokładnie określa sposób usuwania glikozy podczas pracy, a także w innych stanach (Tabl. 2). Jest to bowiem oznaczenie przy jednym tylko punkcie V_i (= jednopunktowe) i do niego odnoszą się uwagi w rozdziale „Mianownictwo, symbole...“.

Dopiero gdy w jednym i tym samym momencie doświadczenia (od chwili rozpoczęcia dowozu podłoża) oznaczać całkowite stężenie wprowadzanego podłoża we krwi lub przyrosty jego ponad poziom wstępny przy wielu odległych od siebie V_i (= wielopunktowo), udaje się określić dokładniej sposób gromadzenia się we krwi, a więc i usuwania ze krwi podłoża w danych warunkach.

Wszystkie oznaczenia $\Delta C_{kwy}^{0'-30'}/t$ wobec V_i podczas pracy z dowozem glikozy dają się objąć równaniami prostych z rys. 1 (Rys. 5). Większość ich przecina oś odciętych na prawo od zera, a oś rzędnych poniżej zera.

Cały zespół doświadczeń daje się przedstawić w 5 krzywych rys. 5. W każdej z nich występuje, jako jedyna lub jako rozstrzygająca, grupa wartości zebranych na jednym osobniku przy pomocy rozległej skali V_i . Krzywe te zostaną kolejno omówione według liter, które posiadają na rys. 5.

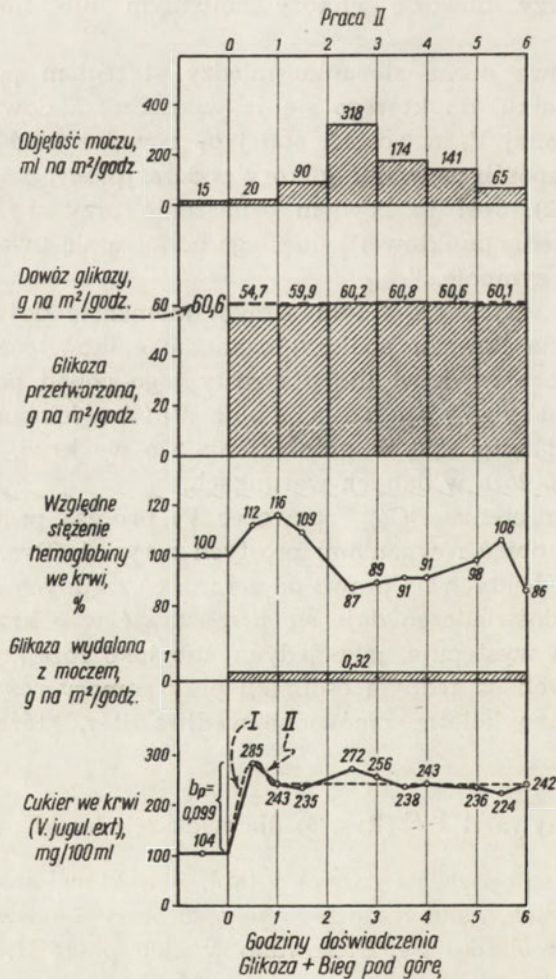
4. Krzywa A i E (Rys. 5) dla większej dawki pracy

Obie krzywe są oparte na danych z tabl. 5, w której znajdują się również wzory dla nich. Jako trzon tego zespołu służy 7 doświadczeń z rozmaitymi V_i na osobniku P4. Stosowano w nich pracę II. Przykład jednego z nich jest na rys. 6.

Prosta A (Rys. 5) rozpoczyna się na osi odciętych o 25,5 g glikozy na $m^2/\text{godz.}$ (= c_p) na prawo od punktu zerowego, przy czym początkowa zmiana minutowa wynosi zero. Oznacza to w przybliżeniu, że, gdyby

dowozić nawet 25,5 g glikozy na $m^2/godz.$, jeszcze nie uzyskaloby się żadnego podniesienia poziomu glikozy we krwi żyły jarczowej zewn. przy tej dawce pracy.

Jak wynika ze wzoru prostej A w tabl. 5, przecina ona oś rzędnych poniżej zera przy $a_p = -3,71$ mg na 100 ml/min. Tej części krzywej nie wykreślono na rys. 5, ale wynika ona z rys. 1. Wartość ta oznacza, że przy zastosowaniu takiej samej dawki pracy u osobnika, któremu nie wstrzykuje się glikozy, jej stężenie we krwi powinnyby spadać o 3,7 mg



Rys. 6. Wprowadzano 60,6 g glikozy na $m^2/godz.$ ($= 3$ g na $kg/godz.$) u psa P4 (φ) podczas pracy II. Waga 10,31 kg, P 0,510 m^2 , wskaźnik odżywienia 0,286. Pozorna stała b_p wynosi 0,0992. Dieta nr 1. Po małej fazie I i II krzywa cukru we krwi przebiega niemal bez zmiany stężenia na poziomie około 240 mg/100 ml

na 100 ml w ciągu minuty. Widać jednak z kontrolnych doświadczeń tabl. 5, że tak się nie dzieje. Jeżeli w ogóle opada w nich glikoza we krwi, ujemna zmiana minutowa stężenia glikozy we krwi sięga wtedy najwyżej 0,22 mg na 100 ml/min. Przeważnie jednak jest znacznie mniejsza.

Jej stała $b'_p = 0,1459$ wskazuje, że nachylenie prostej do osi odciętych jest mniejsze, niż nachylenie przeciętnej prostej we wzorcowej grupie spoczynkowej ($= 0,1631$ [51]). Prostą spoczynkową naniesiono na rys. 5 w postaci przerywanej linii, która przecina punkt zerowy.

Większe rozstrzelenie wartości dokoła prostej A tłumaczy się tym, że składa się na nią 11 osobników.

W stosunku do prostej spoczynkowej (Rys. 5) prosta A posiada więc dwie cechy odmienne: 1) nie przechodzi przez punkt zerowy osi współrzędnych, lecz jest odsunięta od niego na prawo; 2) jej kąt nachylenia, wyrażony stałą b'_p , zmniejszył się w stosunku do kąta prostej spoczynku. Zostanie udowodnione w dalszym doniesieniu, że wymienione cechy znamienne usuwania glikozy ze krwi nie zostały wywołane przez zwiększenie wydalania glikozy przez nerki.

Z całego zespołu danych krzywej A wybrano 5 wartości, wykazujących największe usuwanie glikozy ze krwi (Tabl. 5, wartości z dwoma gwiazdkami). Na ich podstawie nakreślono krzywą E rys. 5. W obecnych badaniach stanowi ona najwyższy pułap. Prawdopodobnie jest również bliska w ogóle najwyższego pułapu, osiągalnego u prawidłowego psa bez dodatkowych zabiegów. Prosta E przecina oś V_i przy 31,1 g na $m^2/\text{godz.}$, zaś oś rzędnych przy $-4,25$ mg na 100 ml/min. Jej stała b'_p wynosi 0,1367. Nie towarzyszy jej zwiększenie wydalania glikozy z moczem, a zatem niski stopień gromadzenia się glikozy we krwi należy przypisać wzmożonemu usuwaniu przez tkanki przetwarzające, a więc głównie mięśnie. Prosta E jest więc jeszcze bardziej odsunięta na prawo, niż prosta A , i jeszcze mniej stroma. Być może, iż dalsze spotęgowanie dawki pracy przesunęłoby prostą jeszcze bardziej w tych dwu kierunkach, polepszając zużycie glikozy.

Zjawiska, zachodzące w drugiej połowie pierwszej godziny, nie zostaną omówione wyczerpująco. Uznano jednak za konieczne, by podać stężenie cukru we krwi przy końcu pierwszej godziny dowozu glikozy podczas pracy i porównać je ze stężeniem, uzyskanym w połowie pierwszej godziny. W ten sposób powstała w tabl. 5—8 kolumna, nosząca tytuł „Zmiana stężenia cukru we krwi między połową a końcem godziny“:

$$\Delta C_{kvj}^{30'-60'} = C_{kvj}^{30'} - C_{kvj}^{60'}$$

Wartości ujemne wskazują na spadek stężenia glikozy we krwi w tej części doświadczenia, zaś dodatnie na przyrost.

W tabl. 5 z kolumny tej wynika, że podczas ciężkiej pracy bez dowozu glikozy stężenie cukru we krwi przy końcu pierwszej godziny może okazywać wychylenia o kilka mg/100 ml w dół lub w górę od wartości w połowie pierwszej godziny. Niekiedy spadek ten dochodzi nawet do kilkunastu mg (Tabl. 6, 7). Ale pojawia się niekiedy i przyrost o kilkanaście mg/100 ml (Tabl. 8). Spadek stężenia w tym wycinku doświadczenia jest częścią zasadniczej linii niżki stężenia, przebiegającej niekiedy nieregularnie, w ciągu całego okresu pracy niezasilanej z zewnątrz glikozą.

Zupełnie inne znaczenie posiada przebieg stężenia cukru we krwi w tym samym okresie pracy mięśni w *strumieniu glikozy*. Przy niższych i średnich V_i zarysowuje się wtedy przeważnie spadek stężenia, niekiedy nie ma wyraźnej zmiany, a nawet zjawia się czasem niewielkie podniesienie stężenia. Natomiast przy wysokich V_i stężenie wzrasta wybitnie.

Od tej reguły pojawiają się w tabl. 5 dwa wyjątki: w P15 dośw. 2 i w P4 dośw. 7. Jakkolwiek w obu tych doświadczeniach V_i jest średnia (4 i 5 g na kg/godz.), jednak przy końcu pierwszej godziny, inaczej niż we wszystkich innych doświadczeniach, glikoza podnosi się we krwi dość znacznie, o 147 i o 163 mg/100 ml. Wyjątkowo bowiem w tych 2 przypadkach stroma faza I przedłuża swe trwanie do końca pierwszej godziny doświadczenia, po czym, wyjątkowo późno, gdyż na początku drugiej godziny, przychodzi do gwałtownego spadku stężenia, jako wyrazu fazy II. We wszystkich innych doświadczeniach faza II albo zaznacza się wprost wcześniej, albo zapowiada swe wystąpienie spłaszczeniem krzywej cukru we krwi już w drugiej połowie pierwszej godziny.

W ten sposób pomiędzy 30 a 60 minutą dowozu glikozy podczas pracy ukazuje się początek polepszenia w usuwaniu glikozy ze krwi, który w znacznej mierze należy przypisać przystosowaniu enzymatycznemu (adaptacji) do wtłaczanej glikozy. Zjawisko to występuje w całym przedstawianym materiale w podobny sposób. Nie będzie więc omówione przy poszczególnych krzywych rys. 5 i przy przynależnych do tych krzywych tablicach, lecz łącznie w „Omówieniu“ — rozdz. 6 i 7.

Zresztą podczas 30 i 60 minuty obecnych doświadczeń zarysowuje się tylko początek zjawiska fazy II. Często rozwija się ono w pełni dopiero w następnych odcinkach doświadczenia (dalsze doniesienia).

5. Krzywa B i C (Rys. 5) dla niższego stopnia wysiłku

Proste B—D otrzymano u osobników poddanych pracy I, a więc mniej ciężkiemu wysiłkowi, niż przy uzyskiwaniu krzywych A i E. Cechą im właściwą jest, że są mniej odsunięte na prawo od punktu zerowego,

Tablica 6

Miarczkowanie ustroju psa P8 (♀) glikozą, podawaną dożylnie jednoraznie z różnymi prędkościami, podczas biegu pod górę. Praca I. Doświadczenia wykonane na przestrzeni 2 lat. Wartości początkowej zmiany minutowej stężenia glikozy we krwi, jak je znaleziono przeciętnie po 28 min. doświadczenia, dają równanie:

$$\Delta C_{kev}^{0' \sim 28'} / t = -2,55 + 0,1580 \cdot V_i$$

Pies dośw.	Dawóz glikozy na godz.		Praca wyko- szona kg/godz.	C_{kev}^0 mg/100 ml	W połowie godziny			Przy końcu godziny		Zmiana stężenia cukru we krwi między połową a końcem godziny mg/100 ml	Glikoza w moczu 1-sza cała godzina g m ² /godz.
	g/kg	g/m ²			po upływie minut	ΔC_{kev} mg/100 ml	$\Delta C_{kev}/t$ mg/100 ml/ min.	po upływie minut	C_{kev} mg/100 ml		
P8	d. 1	—	—	91	105	14	0,48	89	— 16	0	
P8	d. 8	1,00	19,3	131	160	29	1,05	138	— 22	0	
P8	d. 7	2,00	40,0	124	271	147	5,45	271	0	2,02	
P8*)	d. 5	3,00	58,3	111	310	199	7,09	196	— 114	2,86	
P8	d. 2	4,00	77,9	123	411	284	9,17	401	— 10	7,54	
P8	d. 6	5,00	97,5	132	472	340	12,14	408	— 64	8,99	
P8	d. 3	6,00	113,7	127	465	338	12,08	413	— 52	14,72	
P8	d. 4	7,00	135,5	118	702	584	20,87	656	— 46	28,63	
P8	d. 9	8,00	150,9	139	669	530	18,94	682	13	37,00	
P8	d. 10	9,00	179,5	113	885	772	28,59	965	80	47,98	
Przeciętna z glikozą				125							

*) Rys. 7A.

Tabela 7

Pies P7 (♀) podczas biegu pod górę (praca I), nasycany jednostajnie glikozą, doprowadzany z różnymi prędkościami. Przyrost stężenia glikozy we krwi na minutę przy końcu pierwszych 30' doświadczenia odpowiada wzorowi:

$$\Delta C_{k_{vj}}^{0'-30'}/t = 0,1431 \cdot V_i$$

Daje on krzywą C na rys. 5. Odośne doświadczenia wykonano na przestrzeni około 1 roku. Jest to osobnik wyjątkowy, którego krzywa $\Delta C_{k_{vj}}^{0'-30'}/t$ wobec V_i przechodzi przez punkt zerowy osi współrzędnych

Pies dośw.	Dowóz glikozy na godz.		Praca wykona- na kg rodz.	$C_{k_{vj}}^{0'}$ mg/100 ml	W połowie godziny				Przy końcu godziny znalezione		Zmiana stężenia cukru we krwi między połową a koniec godziny mg/100 ml	Glikoza w moczu g/m ² godz.
	g/kg	g m ²			po upływie minut	$C_{k_{vj}}$ mg/100 ml	$\Delta C_{k_{vj}}^{0'-30'}$ mg/100 ml	$\Delta C_{k_{vj}}^{0'-30'}/t$ mg/100 ml/min.	po upływie minut	$C_{k_{vj}}$ mg/100 ml		
P7 d. 1	—	—	4389	118	29'	111	— 7	— 0,21	59'	98	— 13	0
P7**) d. 2	3,00	67,0	4470	108	30'	396	288	9,59	60'	385	— 11	9,14
P7 d. 3	5,00	114,0	4227	115	30'	609	494	16,45	60'	588	— 21	11,61
P7 d. 4	7,00	159,2	4389	117	28'	744	627	22,38	58'	911	167	27,32
P7 d. 5	9,00	182,3	4145	128	30'	919*	791	26,37	58'	1163	244	54,86

*) Interpolacja z 27 minuty na 30 minutę po krzywej przeciągniętej przez wartość w 58 minucie i 88 minucie.

**) Rys. 7B.

niż krzywe *A* i *E* ciężiej pracujących zwierząt. Krzywa *D* będzie tematem dalszego ustępu.

Szczególną uwagę zwraca krzywa *B* (Rys. 5) na osobniku P8 (Tabl. 6) i krzywa *C* na osobniku P7 (Tabl. 7) ze względu na zachodzące między nimi różnice. Streszczają one układ sił znamieny dla danego zwierzęcia.

Oba osobniki odróżniają się przede wszystkim odrębnością kinetyki zapoczątkowania: krzywa *B* przecina oś V_i w punkcie 16,1 g na $m^2/godz.$, a więc na prawo od punktu zerowego, natomiast krzywa *C* biegnie dokładnie przez ten punkt, co jest niezwykle dla doświadczeń z pracą mięśniową (Tabl. 9). Oba badane osobniki (♀) były silne, wytrzymałe, wyćwiczone w bieganiu.

6. Zestawienie stałych zapoczątkowania z dalszym przebiegiem dowozu glikozy u 2 osobników pracujących: P8 i P7

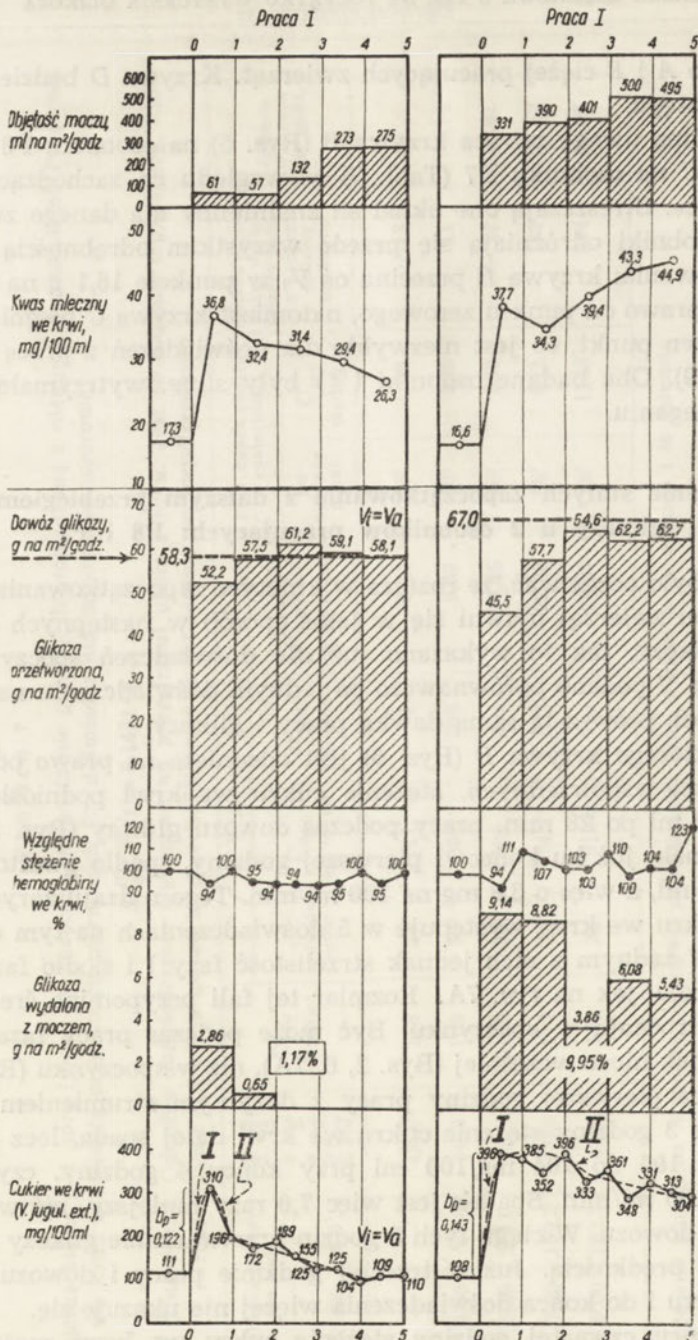
Można było oczekiwać, że różnica w kinetyce zapoczątkowania podczas pracy u obu zwierząt ujawni się w jakiś sposób w następnych okresach dowozu glikozy, jak to wykazano już dla doświadczeń spoczynkowych [51]. Na rys. 7 podano porównawczo po jednym doświadczeniu na każdym z tych dwóch psów z tą samą dawką pracy i glikozy.

U P8, którego krzywa *B* (Rys. 5) jest odsunięta na prawo od punktu zerowego osi współrzędnych, stężenie cukru we krwi podniosło się do 310 mg/100 ml po 28 min. pracy podczas dowozu glikozy (Rys. 7A). Następnie jednak, już ku końcowi pierwszej godziny, spadło gwałtownie do 196 mg/100 ml, a więc o 3,8 mg na 100 ml/min. Tego rodzaju zarys fazowy krzywej cukru we krwi występuje w 5 doświadczeniach na tym osobniku (Tabl. 6). W żadnym z nich jednak strzelistość fazy I i siodło fazy II nie są tak znaczne jak na rys. 7A. Rozmiar tej fali przypomina średnie odchylny tego rodzaju w spoczynku. Być może podczas pracy faza II występuje jednak nieco wcześniej (Rys. 2, 6, 7A), niż w spoczynku (Rys. 2, 8).

Od końca pierwszej godziny pracy z dożylnym strumieniem glikozy przez dalsze 3 godziny stężenie cukru we krwi dalej spada, lecz znacznie wolniej, od 196 do 104 mg/100 ml przy końcu 4 godziny, czyli około 0,5 mg na 100 ml/min. Spadek jest więc 7,6 razy mniejszy, niż w drugiej półgodzinie dowozu. W ciągu tych 3 godzin przetwarzanie glikozy wzmagają się ze stałą prędkością. Już w trzeciej godzinie pracy i dowozu glikoza znika z moczu i do końca doświadczenia więcej nie ukazuje się.

Przy końcu czwartej godziny stężenie cukru we krwi znajduje się o kilka mg/100 ml poniżej poziomu wstępnego, po czym w piątej godzinie niemal dokładnie dochodzi do niego.

Prędkość przetwarzania glikozy (obliczona według [47]) wskazuje (Rys. 7A), że glikoza niemal od początku (dopiero po ustąpieniu fazy I)



napotyka na ustrój bardzo sprawnie uruchamiający swe możliwości przetwórcze. Pokonawszy fazę I, przetwarza już w drugiej godzinie doświadczenia niemal tyle, ile się wprowadza. W trzeciej nawet więcej, gdy znika cukromocz jeszcze wśród przecukrzenia podprogowego. W piątej wreszcie przetwarza całą dawkę wprowadzanej glikozy bez żadnego przecukrzenia. Lecz jest to graniczny układ warunków. Już dalszy skok dawki glikozy o 1 g na kg/godz., mianowicie, do 4 g na kg/godz. w innym doświadczeniu dał w piątej godzinie pracy i dowozu przecukrzenie o 77 mg/100 ml ponad linię wstępną wśród przetwarzania całej wprowadzanej ilości.

Tak wymiarczkowany pułap najwyższego przetwarzania glikozy bez przecukrzenia, przy prawidłowym stężeniu cukru we krwi, odpowiadającym wstępnemu, jest bardzo pożyteczny dla obliczeń przetwarzania glikozy. W tych warunkach nie potrzeba bowiem żadnych dodatkowych założeń, by otrzymać prędkość przetwórczą V_a , gdyż $V_a = V_i$ wprost bez żadnych obliczeń. Ilość glikozy potrzebna do całkowitego pokrycia wydatków energetycznych w piątej godzinie pracy i dowozu glikozy wynosiła, stosownie do tabl. 1, 56,4 g na m²/godz., zaś przetwarzanie 58,1 g na m²/godz. (Rys. 7A). Była to zgodność dostatecznie zadowalająca, by orzec, że podczas ciężkiej pracy ustrój potrafi zaspokoić wszystkie swe wydatki energetyczne wprowadzaną dożylnie glikozą, przy czym, gdy utrafić natężenie dowozu, pracy i sprawności przetwórczej osobnika, opłata kosztów odbywa się jak gdyby bez udziału prawa mas-stężeń, bez żadnego widocznego nadmiaru cząsteczek glikozy w płynach dochodzących do komórek.

W przebiegu krzywych cukrowych podczas ciężkiej pracy istnieje szereg właściwości podobnych jak w spoczynku. Nie tylko odnosi się to do pewnych cech fazy I i II osobnika P8, ale także do dalszego przebiegu cukru we krwi, która od końca pierwszej godziny przez dalsze trzy lekko opada, podobnie jak u osobnika spoczywającego (Rys. 8) pomiędzy po-

Rys. 7. Dwa psy poddano jednakowo ciężkiej pracy (praca I) i równocześnie dowozowi dożylnemu 3 g glikozy na kg/godz.

A. Pies P8 d. 5: rozczyń glikozy 19,00‰, W 8,55 kg, P 0,440 m², WO 0,291,
 V_i 58,3 g na m²/godz.

B. Pies P7 d. 2: rozczyń glikozy 11,96‰, W 10,59 kg, P 0,474 m², WO 0,314,
 V_i 67,0 g na m²/godz.

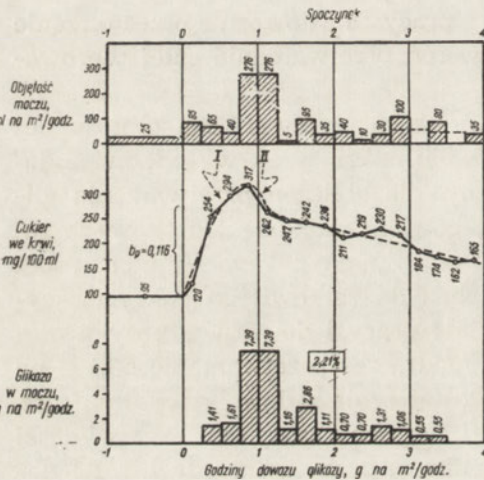
Oba osobniki różnią się kinetyką zapoczątkowania, uzyskaną ze wszystkich doświadczeń na każdym z nich z osobną. Natomiast pozorną stałą b_p , oznaczoną odrębnie dla każdego doświadczenia, podana w A. i B., przedstawia niewystarczająco zjawiska zapoczątkowania

czątkiem drugiej a końcem czwartej godziny dowozu (o 0,59 mg na 100 ml/min.).

Doświadczenie z rys. 7A wyjaśnia się w oparciu o krzywą B rys. 5. Zużycie glikozy bez przecukrzenia wynosi w połowie pierwszej półgodziny doświadczenia 16,1 g na m²/godz. (c_p w Tabl. 9). Wszystkie dalsze etapy (faza II, dalsze powolne zmniejszanie się stężenia glikozy we krwi,

zniknięcie cukromoczu) powiększały rozmiar utajonego zużycia bez przecukrzenia ze stopniowym kurczeniem się składowej, działającej za pośrednictwem podniesienia stężenia glikozy we krwi. Wreszcie w piątej godzinie doświadczenia wyłania się czyste zużycie bez przecukrzenia w najwyższym rozmiarze możliwym u danego psa, przy czym znika składowa posługująca się przyrostem jawnym stężenia glikozy we krwi. Zużycie bez przecukrzenia jest wtedy 4-krotnie wyższe, niż w połowie pierwszej godziny (por. „Omówienie“ — rozdz. 6).

Dane na osobniku P7 opierają się wprawdzie tylko na 4 punktach i jednej wartości kontrolnej (Tabl. 7), ale są one jednoznaczne. W przykładzie na rys. 7B ujawnia się podczas pracy ułomność przetwórcza psa P7 w porównaniu z P8:



Rys. 8. U spoczywającego psa, Carm. (♀) d. 2, wprowadzono dożylnie glikozę z szybkością 2 g na kg/godz. (52,3 g na m²/godz.) przez 4 godziny. W 20,8 kg, P 0,796 m², WO 0,302. Dieta mieszana z przewagą skrobi. Oestrus. Glikoza wydalona z moczem podczas całego doświadczenia = 2,12% całej ilości wstrzykniętej. Przy końcu czwartej godziny dowozu glikozy już nie ma w moczu

1) Zarówno krzywa cukru we krwi, jak i w moczu jest w ogóle wyższa u P7. Czynność jego nerek zdaje się być niezakłócona.

2) Już w pierwszej półgodzinie doświadczenia cukier we krwi wzrasta wyżej, niż u P8. Przyrost ten jest tak znaczny, że prosta przeprowadzona przez zmiany minutowe dla rozmaitych V_i przechodzi u tego osobnika wyjątkowo przez punkt zerowy współrzędnych (Rys. 5, krzywa C). Wskutek tego nie ma on odcinka c_p (Tabl. 9) zużycia glikozy bez przecukrzenia, pozbawiony jest zatem tego ułatwienia w usuwaniu glikozy ze krwi.

3) W bezpośrednio dalszym przebiegu krzywych cukrowych posiada blisko 1½ godziny trwający szczyt fazy I we krwi, nieregularny, dwu-

wierzchołkowy, ale dający się dobrze utożsamić w pierwszych 2 godzinach krzywej cukromoczu jako faza niewydolności przetwórczej, która kończy się w trzeciej godzinie niewyraźną we krwi, lecz wybitną w moczu fazą II poprawy przetwarzania.

4) Dalszy kilkugodzinny okres powolnego spadku cukru we krwi jest podobny u obu osobników, ale u P7 mniej stromy i na poziomie o 200 mg/100 ml wyższym, niż u P8.

W tych warunkach na końcu piątej godziny łącznego wpływu pracy i glikozy cukier we krwi u P7 wynosi 304 mg, a w moczu przez cały czas utrzymuje się cukromocz, gdy u P8 we krwi występuje poziom cukru taki jak przed doświadczeniem, a w moczu nie ma cukru. U P7 ilość glikozy przetwarzanej nigdy nie jest równa ilości glikozy dowożonej, lecz zawsze jest mniejsza od niej. Od połowy drugiej godziny kwas mleczny narasta we krwi P7, a opada u P8.

Podobne różnice występują i przy innych V_i między obu osobnikami. Wynika stąd jednoznacznie przewaga przetwórcza psa P8. Zdaje się ona przede wszystkim polegać na tym, że P8 posiada możliwość przetwarzania glikozy podczas pracy bez występowania przecukrzenia, podczas gdy P7 jest tego udogodnienia pozbawiony.

Powstaje zagadnienie, jak w okresie zapoczątkowania wpływa praca na znikanie glikozy ze krwi u psa P7, skoro nie wykazuje on zdolności usuwania glikozy bez przecukrzenia. Pozostaje wtedy druga składowa kinetyki zapoczątkowania, która może ułatwić uchodzenie glikozy ze krwi, a mianowicie, zmniejszenie kąta nachylenia prostej do osi V_i (krzywa C na rys. 5). Stała b_p (w tym przypadku już nie b'_p) wynosi u P7 0,1431. Jest więc podobna jak dla krzywej A rys. 5, w której b'_p wynosi 0,1459 (Tabl. 9). Zmniejszenie kąta nachylenia nie było jednak aż tak znaczne, by wynagrodziło ustrojowi brak przetwarzania bez przecukrzenia.

Na P7 nie wykonano wlewań glikozy w spoczynku, nie można więc zestawić ich z doświadczeniami z pracą. Należy jednak przypuścić, że P7 w spoczynku posiadałby raczej wysoką przeciętną stałą b_p , jako zwierzę gorzej przetwarzające, np. taką jak psy Zul. i Porc. w tabl. 11 i inne [51]. Wtedy stała b_p osobnika P7, równa 0,1431, byłaby, np. w stosunku do 0,210, wartością wybitnie obniżoną i stanowiłaby znaczne polepszenie zabierania glikozy ze krwi. Na diecie nr 1 w spoczynku przeciętna stała b_p , oznaczona wielopunktowo, wysokości 0,1431, jest nawet dla zwierzęcia o cechach wzorcowych za niska (przeciętna wzorcowa 0,1631).

Przy porównywaniu rys. 7B z rys. 7A można postawić dwa zarzuty:

1° Powierzchnia osobnika na rys. 7B jest większa, a więc i dawka glikozy jest większa na powierzchnię, a stąd krzywe cukrowe mogłyby

być wyższe stosownie do [51]. Różnica była jednak zbyt mała, by dać aż takie wzmożenie krzywych cukrowych jak na rys. 7B.

2° Drugi zarzut jest znacznie cięższy. Na rys. 7B zwierzę otrzymywało stale roztwór glikozy bardziej rozcieńczony (12%), niż osobnik na rys. 7A (19,00%), dlatego też odpływ moczu na rys. 7B jest większy, niż na 7A. Na zwierzęciu z rys. 7B najpierw oznaczono przeziw niewyczuwalny w doświadczeniu kontrolnym. Następnie wartości przeciętnej utraty wagi ciała wskutek przeziwu włączono z góry w sposób dokładny w roztwór wprowadzanej glikozy. W obu częściach rys. 7 zwierzęta otrzymywały dodatkowo wodę, lecz w 7B była ona zawarta od razu w pierwszej półgodzinie w roztworze glikozy, natomiast w 7A była dodawana po półgodzinnych kontrolach stosownie do straty na wadze. W sumie jednak niewątpliwie zwierzę na rys. 7B otrzymało więcej wody, niż na rys. 7A. Wykazano jednak uprzednio [49], że przejście z roztworu glikozy 20,84% na roztwór niemal o połowę mniej rozcieńczony, 10,83%, nie wywołuje żadnej uchwytnej zmiany w krzywej cukru we krwi i w moczu, o ile ilość wprowadzanej glikozy pozostaje taka sama; przy czym odpływ moczu wybitnie się zwiększa.

Odpływ moczu podczas wlewań dożylnych glikozy czasem biegnie równoległe do wydalania tej heksozy (np. Rys. 8). Jednak na rys. 2 u spożywającego osobnika stopniowemu wzrostowi odpływu moczu między 3 a 5 godziną towarzyszy w cukromoczu zjawisko przeciwne, a mianowicie, zmniejszanie się stopniowe wydalania glikozy. Dostrzegano to w wielu doświadczeniach. Świadczy to w obrębie pewnych granic o znacznej niezależności między zatrzymywaniem glikozy przez tkanki a przepływem wody przez ustrój.

Gdyby wskutek zwiększenia sączenia kłębkowego przy silniejszej diurezie odchodziło z moczem więcej glikozy, stężenie cukru we krwi musiałoby równocześnie opaść, a stężenie względne hemoglobiny we krwi obniżyć się. Nie dostrzega się tego na rys. 7B: cukier we krwi jest wybitnie wyższy, a stężenie hemoglobiny we krwi nawet wyższe, niż na rys. 7A. Podobną zresztą wybitną przewagę cukromoczu u psa P7 (z Rys. 7B) w porównaniu z psem P8 (z Rys. 7A) dostrzeżono we wszystkich prawie innych doświadczeniach na obu zwierzętach, gdy już u obu wstrzykiwano roztwór glikozy o jednakowym stężeniu. Nie wydaje się więc, by większe rozcieńczenie roztworu glikozy na rys. 7B wpłynęło w jakiś zasadniczy sposób na typ odczynu, choć w pierwszej chwili mogą powstać poważne wątpliwości. Tyle dla obrony niepowtarzalnej już serii doświadczeń.

7. Zależność stałych zapoczątkowania od kształtu fazy I i II

Warunkiem poprawnego obliczenia stałych zapoczątkowania opisanym sposobem [51] jest, by w ciągu pierwszej półgodziny dowozu glikozy stężenie cukru we krwi bezustannie wzrastało lub przynajmniej, by nie rozpoczęło opadać przed połową pierwszej godziny, kiedy następuje pomiar. Taki niezłożony przebieg zapoczątkowania wykazuje fruktoza przy wszelkich postaciach przygotowania dietetycznego [56, 57, 58, 46, 53, 55].

Tymczasem zapoczątkowujące wysycanie glikozą jest „podminowane“ szeregiem procesów (wyrzucanie insuliny, adrenaliny, noradrenaliny, glukagonu i innych), z których jednym, swoistym dla glikozy, jest początkowa fala stężenia glikozy we krwi, składająca się z narastającej fazy I i opadającej fazy II. Już w spoczynku przy jednakowej diecie jest ona i zmienna i wykazuje osobnicze różnice. Nawet drobna postać tej fali krzywych cukrowych zostaje przez pracę zagęszczona do miniaturowej formy, w której i różnica między szczytem a dołem fali zmniejsza się i dół fazy II występować się zdaje wcześniej, niż w spoczynku.

Przykład takiej fali przedstawia rys. 7A. Niepodobna określić, czy jej szczyt jest jej rzeczywistym wierzchołkiem, czy też znajduje się na ramieniu jeszcze wzrastającym, lub też obniżającym się, gdyż poszczególne punkty oznaczeń były od siebie zbyt odległe. Oznaczenie wykonano w 28 minut od chwili rozpoczęcia dowozu. W tych warunkach nie można było wykonać interpolacji na 30 minut, gdyż dalszy przebieg krzywej nie był jednoznaczny. W paru innych doświadczeniach w tej samej tabl. 6, w której znajdują się dane z doświadczenia na rys. 7A, początkowa fala stężenia (różnica między szczytem przy 30 min. a dołem przy 60 min.) była znacznie mniejsza (10—64 mg/100 ml) i przedstawiała mniej wątpliwości.

Ponieważ w tabl. 6 wszystkie oznaczenia w połowie pierwszej godziny dowozu pobrano po około 28 minutach od chwili rozpoczęcia, więc bez żadnej interpolacji, która była drażliwa w tym przypadku, otrzymano stałą b_p dla psa P8 w wysokości 0,1580. Była ona wyższa, niż u innych osobników pracujących (z wyjątkiem grupy krzywej D), a nawet dorównywała niemal wzorcowej spoczynkowej stałej b_p 0,1631 dla 30 minut.

Na podstawie powyższych danych niepodobna rozstrzygnąć, co oznacza tak wysoka stosunkowo stała b_p w 28 minucie doświadczenia u prawidłowego zwierzęcia, które wyraźnie wykazuje bezprzecukrzeniowe zużycie wprowadzonej glikozy podczas pracy. Można tylko nakreślić plan doświadczeń, które należy wykonać, by tę i wiele innych niewiadomych rozwiązać. Należałoby więc:

- 1) oznaczać cukier we krwi w krótkich odstępach czasu, by nie przekroczyć szczytu fazy I;

2) wyznaczyć nowy spoczynkowy wielopunktowy wzorzec dla odcinka czasu, w którym na pewno szczyt fazy I nie został jeszcze przekroczony, np. dla pierwszych 25 minut dowozu;

3) w tych samych punktach V_i , dla których wykształcono nowy spoczynkowy wzorzec, wykonać wielopunktowe oznaczenia stałych zapoczątkowania raz podczas pracy lżejszej, a drugi raz podczas cięższej.

Gdyby wszystkie te oznaczenia wykonano na jednym i tym samym osobniku, można by dokładnie orzec, jak zmieniają się stałe zapoczątkowania w związku z nasileniem pracy i co oznacza względnie niezmienną w stosunku do wartości spoczynkowej stała b'_p w obecności stałej c_p .

8. Krzywa D z rys. 5

Odnacza się od innych większym kątem nachylenia do osi odciętych, zatem stałą b'_p wyższą, 0,2011 (Tabl. 9). Mimo to odchyła się nieco na prawo od skrzyżowania osi współrzędnych ($c_p = 9,0$ g na $m^2/\text{godz.}$). Wznosi się wskutek tego bardziej stromo, niż wszystkie inne. W większości przynależnych doświadczeń (Tabl. 8) już w 1 godzinie dowozu widać mniejsze wydalanie glikozy z moczem, niż w innych przy tej samej V_i (Tabl. 8). Jako przyczynę wysokiego przyrostu glikozy we krwi należy przyjąć nerkowe zatrzymanie glikozy w ustroju. Wszystkie te osobniki były stare i łatwo wyczerpywały się podczas pracy. Istnienie uszkodzenia nerek zdradzało się u nich: a) obecnością białka w moczu już przed doświadczeniem lub po pierwszej godzinie biegu, b) znacznym upośledzeniem wydalania glikozy z moczem oraz c) wydalaniem wody, d) zmniejszonym oczyszczaniem osocza krwi z glikozy przez nerki.

Krzywej D nie można porównać z krzywą psa Zul. [51], gdyż Zul. miała cukromocz raczej wyższy, niż dwa inne osobniki podobnej wielkości (Ordo., Mess.), a nie niższy.

Jako drugi czynnik, który mógł się przyłączyć do czynnika nerkowego i podnieść zmianę minutową stężenia glikozy we krwi, należy podejrzewać upośledzone przetwarzanie glikozy u starych osobników [40, 10].

9. Zestawienie

Nawet w skromnym przedstawionym materiale, który niestety należy nazwać tylko orientacyjnym, udaje się przy pomocy kinetyki zapoczątkowania wyosobnić szereg odczynów. Najważniejsze jest, że znaleziono niezłożony stosunkowo klucz do ich wyodrębnienia. Można więc na razie rozróżnić podczas pracy (Rys. 5, Tabl. 9):

Tablica 8

Dane dla krzywej D na rys. 5. Bieg pod górę (praca I z wyjątkiem P11, w którym praca II) podczas jednostajnego dowozu glikozy przez żyłę z różnymi prędkościami. Psy (♀) stare, z mierną niewydolnością nerek. Początkowa zmiana minutowa stężenia glikozy we krwi stosuje się do wzoru:

$$\Delta C_{kwy}^{0'-30'}/t = -1,81 + 0,2011 \cdot V_i$$

Pies dośw.	Dowóz glikozy na g.dz.		Praca wyk.	Ks E g dz	C _{kwy} ^{0'} mg/100 ml	W połowie godziny			Przy końcu godziny		Zmiana stężenia cukru w krwi między połową a końcem godziny mg/100 ml	Glikoza w moczu g m ² godz.	
	g/kg	g m ²				po upływie minut	C _{kwy} mg/100 ml	ΔC _{kwy} mg/100 ml	ΔC _{kwy} ^{0'-30'} /t mg/100 ml/min.	po upływie minut			C _{kwy} mg/100 ml
P6 d. 1	—	—	4473	4473	106	29'	104	— 2	— 0,07	59'	107	3	0
P9*) d. 5	—	—	4473	4473	99	30'	105	6	0,20	59'	127	22	0
P9**) d. 7	—	—	4473	4473	123	29'	119	— 4	— 0,14	60'***)	123***)	4	0
P6 d. 2	2,00	41,0	4145	4145	82	29'	284	202	6,95	59'	210	— 74	0
P6 d. 6	4,00	83,1	4308	4308	137	28'	591	454	16,18	59'	554	— 37	10,41
P6 d. 3	5,00	101,8	4308	4308	115	29'	623	508	17,52	60'	616	— 7	14,06
P6 d. 4	7,00	144,4	4389	4389	107	30'	767	660	21,98****)	60'	866	99	28,53
P6 d. 7	8,00	169,0	4308	4308	151	27'	1137	986	36,53	58'	1394	257	40,23
P9 d. 6	7,00	147,2	4308	4308	112	29'	922	810	27,92	60'***)	990	68	10,85
P11 d. 1	12,00	212,7	5374	5374	134	30'	1364	1230	41,00****)	60'***)	1892	528	46,85

*) 30 ml 0,9% NaCl na kg wagi zwierzęcia na godzinę jednostajnie dożyłnie.

**) 60 ml 0,9% NaCl na kg wagi na godzinę jednostajnie dożyłnie.

***) Wartość interpolowana między blisko stojącymi oznaczeniami.

****) Omyłkowo zastosowano szybszy bieg pod górę z takim samym nachyleniem błędni, dlatego usuwanie glikozy ze krwi jest stosunkowo większe w tym doświadczeniu, niż w innych na tym samym osobniku. Jednak i tę wartość przyjęto do krzywej, gdyż usunęła jej nie zmienia zasadniczo przebiegu krzywej. Wzór krzywej bez tej wartości jest następujący: $\Delta C_{kwy}^{0'-30'}/t = -1,77 + 0,2076 \cdot V_i$.

Tablica 9

Ciężka praca podczas dożylnego karmienia glikozą. Klasyfikacja doświadczeń według parametrów początkowego przyrostu stężenia glikozy we krwi. 16 psów (♂). Zestawienie danych na rys. 5 z wartościami z tabl. 5—8

Krzywa z rys. 5	Tablica	Przeciętna		Osobnik dokładniej zbadany	Wzmożenie wytwórczości cieplnej w stosunku do podstawowej	Liczba doświadczeń	Stała a_p punkt przecięcia z osią rzędnych mg/100 ml min. g m ² godz. g kg/g·d.z.	Stałe krzywej		Ocena		
		Waga ciała kg m ²	Powierzchnia ciała m ²					Punkt przecięcia z osią odciętych stała c_p	Stała b'_p			
									(= tang β) mg na 100 ml na min. na 1 g odciętych na m ² /godz.		kąt β prosty z osią odciętych	
A*)	5	9,56	0,465	P4	9,0	18	— 3,71	25,5	1,24	0,1459	8,31°	Praca II.
B**)	6	8,56	0,440	P8	7,1	9	— 2,25	16,1	0,85	0,1580	8,98°	7-naczna sprawność przetwórcza, praca I.
C*)	7	10,38	0,471	P7	7,1	4	0	0	0	0,1431 = b_p (= tang α)	8,14° (= kąt α)	Mniejsza sprawność przetwórcza, praca I.
D*)	8	8,41	0,414	P6	7,1	7	— 1,81	9,0	0,44	0,2013	11,32°	Upóźnienie nerek, sta- rość, praca I.
E*) wybrane z tabl. 5		10,17	0,497	P4	9,0	5	— 4,25	31,1	1,52	0,1367	7,80°	Najwyższa sprawność w usuwaniu glikozy ze krwi, praca II.

*) Przejętnie z 30 min. doświadczenia.

***) Przejętnie z 28 min. doświadczenia.

a_p = teoretyczne usuwanie glikozy ze krwi podczas pracy bez dowozu glikozy.

c_p = najwyższe zużycie glikozy dowożonej podczas pracy, przy którym jeszcze nie dochodzi do przecukrzenia.

b'_p = stała oddająca prędkość gromadzenia się we krwi (i odpływu) glikozy, gdy krzywa jest przemieszczona na prawo od skrzyżowania współrzędnych.

b_p = stała oddająca te same zjawiska dla krzywej, przecinającej skrzyżowanie współrzędnych.

1) prostą przechodzącą przez punkt zerowy skrzyżowania osi współrzędnych; prosta posiada kąt nachylenia do osi V_i zmniejszony w stosunku do wzorca spoczynkowego (krzywa C);

2) prostą przesuniętą na prawo od punktu zerowego, która ma kąt podobny jak w doświadczeniach spoczynkowych (krzywa B);

3) prostą odchyloną na prawo od punktu zerowego, którą cechuje kąt nachylenia mniejszy, niż we wzorcu spoczynkowym (krzywa A); osiąga ona szczytowe nasilenie w krzywej E;

4) prostą, która jest wprawdzie przemieszczona na prawo od punktu zerowego, ale nachylenie do osi V_i posiada większe, niż w spoczynku (krzywa D).

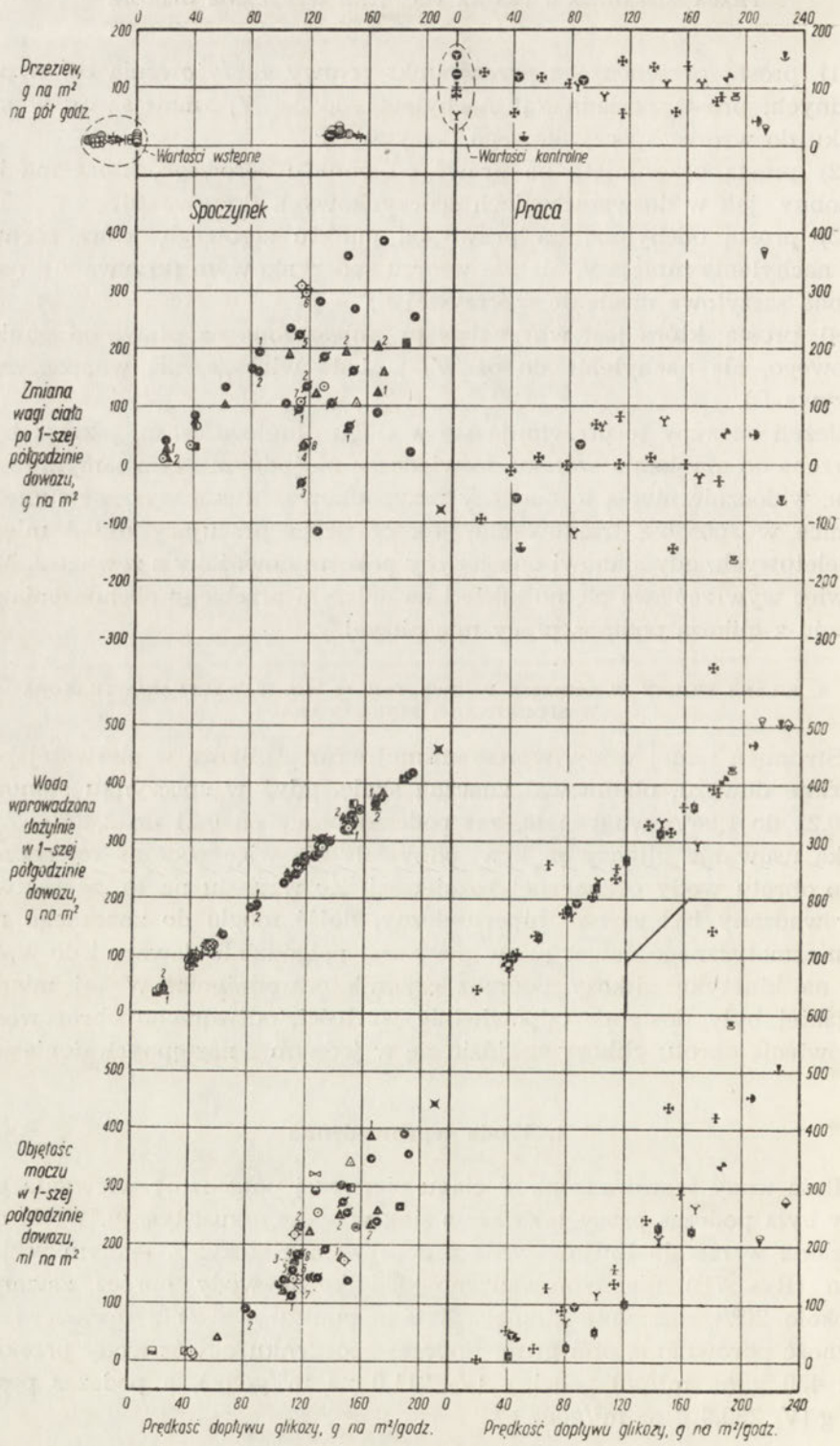
Jeżeli odczyny te utrzymują się w ciągu długiego czasu, jakiego było potrzeba do uzyskania szeregu doświadczeń na jednym i tym samym osobniku, widocznie nie są to odczyny przypadkowe. Muszą wyrażać subtelne różnice w sposobie traktowania glikozy przez pracujący układ mięśni szkieletowych, gdy stanowi ona jedyny pokarm dowożony z zewnątrz. Mogą więc wyrzucić swe piętno także i na dalszym przebiegu obchodzenia się ustroju z glikozą podczas pracy mięśniowej.

B. BILANS WODNY W OKRESIE PIERWSZYCH 30 MINUT WYSYCANIA GLIKOZĄ W SPOCZYNKU I PODCZAS PRACY

Strumień samej wody, wprowadzonej wraz z glikozą w pierwszej półgodzinie dowozu, obejmował znaczną skalę, gdyż w spoczynku stanowił od 0,21 do 1,94‰ wagi ciała, zaś podczas pracy od 0,21 do 2,40‰. Zjawiska usuwania glikozy ze krwi odbywały się więc podczas równoczesnego obrotu wody o znacznej rozpiętości. Ze względu na to, że roztwór wprowadzany był zawsze hipertoniczny, dojść mogło do znacznego naporu osmotycznego nawet już w pierwszej półgodzinie dowozu i do wpływu na kinetykę glikozy poprzez czynnik odwodnienia. W tej mierze, w jakiej były dostępne odpowiednie wartości, odtworzono obrót wody. Omówienie obrotu glikozy znajdzie się w jednym z następnych doniesień.

1. Woda wprowadzona

Ilość wody wprowadzona w ciągu pierwszej półgodziny wlewania glikozy była podczas pracy taka sama jak w spoczynku (Rys. 9). Woda dowieziona wzrastała liniowo wraz z dopływem glikozy. Z jednym wyjątkiem (Rys. 7B) nie wprowadzano dodatkowo wody oprócz zawartej w około 20‰ roztworze glikozy. Z tego punktu widzenia upraszcza się możliwość porównania obu grup. Podczas spoczynku dowóz wody przekraczał 450 g na m^2 /pół godziny (V_i 211,0 na m^2 /godz.), a podczas pracy 500 g (V_i 230,9 g na m^2 /godz.).



Rys. 9

2. Odpływ moczu

Między spoczynkiem a pracą nie ma wybitnych różnic w tworzeniu moczu podczas dowozu glikozy, które by się rozciągały poprzez całą skalę V_i (Rys. 9). Niekiedy podczas pracy zwierzęta już w pierwszej półgodzinie osiągnęły odpływ moczu większy, niż w spoczynku na odcinku V_i 150—210 g na m^2 /godz. Nie może więc być mowy o upośledzeniu cukrowej diurezy osmotycznej podczas pracy na żadnym odcinku V_i , a najmniej na odcinku wysokich V_i , w którym u jednego z pracujących osobników, P8, przy V_i 179,5 doszło do najwyższego pułapu, osiągalnego u psa (Rys. 9, 744 ml na m^2 /pół godz.).

Gdy V_i wzrosła powyżej 210 g na m^2 /godz., diureza uległa w dwu przypadkach pracy wybitnemu zmniejszeniu: do 211 ml na m^2 /pół godz. u P11 przy V_i 212,7 g na m^2 /godz. i do 274 ml na m^2 /pół godz. u P5 przy V_i 230,9 g na m^2 /godz. (Rys. 9). Zjawisko takiej nieomogi moczopędnej jeszcze niewyjaśnionego pochodzenia spotyka się również niekiedy w spoczynku we wczesnych okresach wlewania glikozy, gdy V_i przerasta 200 g na m^2 /godz.

Biorąc poszczególne osobniki pod uwagę, największą sprawność moczopędną w pierwszej półgodzinie posiadają P8 (krzywa B) i P7 (krzywa C, Rys. 5). Natomiast stary osobnik P6 (krzywa D, Rys. 5) miał często sprawność nieco mniejszą, niż oba te psy. Wszystkie trzy wykonywały pracę o nasileniu I. Najmniejsze wartości diurezy wykazywał osobnik P4 (krzywa A i E, Rys. 5), ale nie z powodu mniejszej sprawności wydalniczej, lecz dlatego, że wykonywał cięższe zadanie (praca II) i miał prawdopodobnie większy przeziw.

Zatem przy ciężkiej, ale jeszcze nie najcięższej, postaci wysiłku fizycznego (praca I) objętość wytworzonego moczu prawie nie zmienia się w stosunku do spoczynku w pierwszej półgodzinie dowozu glikozy. Dopiero najcięższa postać pracy (praca II) bardzo wyraźnie obniża odpływ moczu w rozpatrzonym odcinku czasu.

3. Ocena wody przeziwu niewyczuwalnego

Dla pracy jest to szczególnie ważny składnik utraty wody. Określeniem tym obejmuje się wartość chemicznie niejednorodną, którą da się streścić we wzorze, wyrażonym w gramach [37]:

Rys. 9. Porównanie niektórych danych obrotu wody w spoczynku (lewa strona) z danymi podczas pracy (prawa strona). Pierwsze pół godziny dowozu roztworu glikozy. Dalszy ciąg danych na rys. 10. Znaki dla zwierząt pracujących te same co na rys. 1, zaś dla spoczywających jak w doniesieniu [51]

Tablica 10

Strata na wadze wskutek przeziwu u psów, bez dowozu glikozy i podczas pierwszej godziny jednostajnego dowozu. Wartości na m²/godz. Strata na wadze jest nie różnicowana, większą jej część stanowi woda

Stan	Liczba doświadczeń	Dowóz glikozy średni (od... do...) g/m ² /godz.	Przeziw na godzinę/m ²		
			średnia g	minimum g	maximum g
Spoczynek, przed dowozem glikozy	19	—	20,1	9,0	39,4
Spoczynek, podczas dowozu glikozy	11	140,3 (132,9 — 153,6)	44,3	33,4	66,4
Kontrolne podczas pracy I, bez dowozu glikozy	6	—	205,2	107,8	311,8
Praca I, podczas dowozu glikozy	15	115,2 (19,3 — 179,5)	203,2	110,8	290,4
Praca II, podczas dowozu glikozy	7	141,2 (43,2 — 206,5)	187,8	35,8 (?)	313,6

Niewyczuwalna strata wagi ciała = Niewyczuwalna utrata wody + Wydalony CO₂ — Wchłonięty O₂. Oprócz wody bierze więc w niej udział wymiana gazowa.

Tabl. 10 zbiera w średnich wartościach godzinnych wyniki szczegółowe podane na rys. 9 na pół godziny. Całkowity przeziw niewyczuwalny według powyższego wzoru u psa, spoczywającego w temperaturze otoczenia 26°, wynosi 20,1 g na m²/godz. Podczas dowozu glikozy wzrasta on przeszło dwukrotnie, do 44 g. Natomiast podczas pracy bez wlewania glikozy, przy temperaturze otoczenia 20°, wartość otrzymana u psa spoczywającego, nie karmionego dożylnie glikozą, wzrasta się 20-krotnie, do 205 g, i nie zmienia się już wybitnie podczas zaopatrywania glikożą w czasie pracy (203 i 188 g na m²/godz.) (Tabl. 10).

Aby obliczyć graniczną ilość (tzn. mniej więcej najwyższą) wody istotnie traconą przez przeziw niewyczuwalny oparto się na licznych oznaczeniach wymiany gazowej, dokonanych podczas dowozu glikozy w spoczynku, wśród najwyższego utleniania glikozy, przy średniej V_i 151,0 g na m²/godz. Przyjęto, że cała wytwórczość cieplna została pokryta przez utlenianą glikozę. Zastąpiono glikożą udział niewielkich ilości wewnątrzpo pochodnego białka, co wprowadziło nieznaczny tylko błąd ze względu

du na równoczesne białkoszczędne działanie glikozy. Dla przeciętnej V_i 151,0 g na m^2 /godz. przy utlenianiu 14,0 g glikozy na m^2 /godz. równanie dla średniej przebiegu niewyczuwalnego dla spoczynku z tabl. 10 brzmi, po wstawieniu istotnie oznaczonych wartości, w g na m^2 /godz.:

44,3 g = Niewyczuwalna utrata wody + 20,5 g CO_2 — 14,9 g O_2 .
Z tego czysta niewyczuwalna utrata wody równa się 38,7 g na m^2 /godz.,
71,1 g glikozy na m^2 /godz.:

Dla pracy całkowitą wytwórczość cieplną obliczono w gramach utlenionej glikozy (Tabl. 1) i z nich otrzymano dane wymiany gazowej. Dla pracy I, przy przeciętnej V_i 145,2 g na m^2 /godz. i utlenianiu 60,0 g glikozy na m^2 /godz., równanie dla przebiegu osiągnęło postać cyfrową:

203,2 g = Niewyczuwalna utrata wody + 88,1 g CO_2 — 64,0 O_2 . Podobnie dla pracy II, przy przeciętnej V_i 178,6 g na m^2 /godz. i utlenianiu 71,1 g glikozy na m^2 /godz.:

187,8 g = Niewyczuwalna utrata wody + 104,3 g CO_2 — 75,9 g O_2 . Dla obu gatunków pracy niewyczuwalna utrata wody wynosiła więc na czysto 179,2 i 159,2 g na m^2 /godz., czyli 88,2% i 84,8% całego przebiegu.

Taki odsetek udziału wody w przebiegu zgadza się z wynikami w piśmiennictwie, osiągniętymi przy ilorazie oddechowym 1,00 i wśród utraty 35—50% ciepła drogą parowania wody [35, 37].

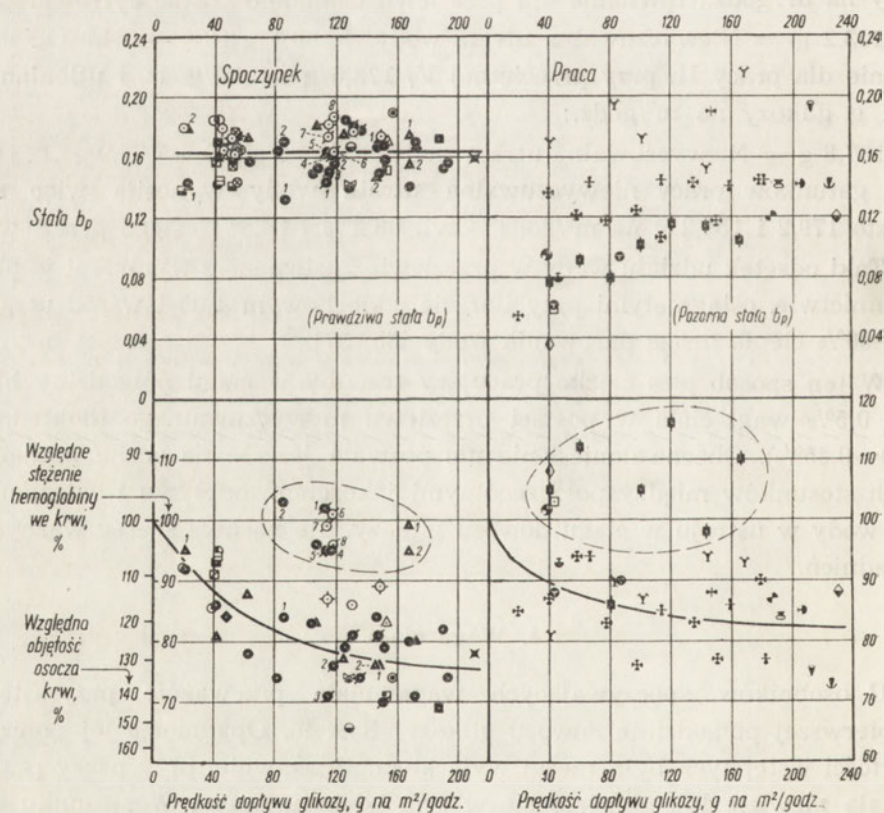
W ten sposób pies ciężko pracujący traciłby w ciągu półgodziny blisko 0,5% wagi ciała w postaci przebiegu niewyczuwalnego (dokładnie 0,40—0,45%). Obecne doniesienie nie pozwala jeszcze na ocenę wzajemnych stosunków między poszczególnymi jakościami odpływu i zatrzymania wody w ustroju w ciągu dowozu glikozy, ale nasuwa szereg ważnych zagadnień.

4. Waga ciała

U osobników spoczywających waga ciała przeważnie przyrastała w pierwszej półgodzinie dowozu glikozy (Rys. 9). Opadnięcie jej poniżej wartości wstępnych było raczej wyjątkiem. Przeciwnie, przy pracy przyrastała niewiele lub obniżała się w tym odcinku pracy. W stosunku do doświadczeń spoczynkowych istniał więc podczas pracy mniejszy zapas wody w ustroju, niż w spoczynku. Stan ten osiągał czasem stopień rzeczywistego, nie tylko względnego odwodnienia, co należy przypisać głównie utracie wody przez przebieg. Oprócz tego wybitniejsze wahania wagi ciała występowały podczas pracy tylko przy większych wychyleniach objętości moczu.

5. Stopień uwodnienia osocza po półgodzinnym wysycaniu glikozą

Od poprawnych wartości względnego stężenia hemoglobiny we krwi na rys. 10 wyodrębniono linią przerywaną grupy punktów, w których uwodnienie osocza było dlatego niewystarczające, że z moczem i przeziwem odchodziło więcej wody, niż jej wprowadzono w roztworze glikozy i niż mogło powstać z przetwarzań, a jeszcze nie rozpoczęto wlewać dodatkowo wody. Zachowanie się zwierząt nie było jednak schematyczne i między 20 a 30 minutą dowozu zjawisko to zaznaczało się słabiej lub silniej u zwierząt spoczywających. To była właśnie chwila rozpoczęcia dodatkowego dowozu wody obok roztworu glikozy.



Rys. 10. Dalszy ciąg rys. 9. Porównanie przyrostu glikozy we krwi, wyrażonego stałą b_p dla spoczynku i pozorną stałą b_p dla pracy ze względным stężeniem hemoglobiny we krwi (= względną objętością osocza). Grupę doświadczeń ze zbyt wysokim stężeniem hemoglobiny we krwi otacza linia przerywana (por. objaśnienia w tekście). Krzywe ciągłe przeciętnie przez punkty nieobwiedzione linią przerywaną. Prosta ciągła dla stałych b_p w spoczynku odpowiada zarówno przeciętnej dla tych punktów, dla których przeprowadzono krzywą zwaną wzorcową, jak i dla wszystkich 71 punktów ($b_p = 0,163$). Znaki te same co na poprzednim rysunku

Przez średnie grupowe pozostałych punktów przeprowadzono krzywe, które u osobników spoczywających oznaczają poprawne uwodnienie, zaś u pracujących przeciętne uwodnienie znalezione w opisanych warunkach.

S p o c z y n e k: Krzywa stężenia hemoglobiny we krwi (Rys. 10) spada gwałtownie przy niskich V_i , gdyż woda wprowadzana w roztwór glikozy prawie cała zostaje zatrzymana przez ustrój, jak tego dowodzi skąpy odpływ moczu. Dlatego nie było nadmiernie wysokich wartości stężenia hemoglobiny we krwi w obszarze V_i od 0—80 g na m^2 /godz. Dopiero przy dalszym wzroście V_i , od 80 g na m^2 /godz. w górę, objętość moczu wzrasta się silnie wraz z V_i . Pomiędzy V_i 100 a 120 g na m^2 /godz. tkanki pobierają coraz mniejszy odsetek przyrostu dowozu glikozy. Gromadząca się w ustroju glikoza odchodzi wraz z wodą w coraz większych ilościach z moczem. Spadek hemoglobiny we krwi przechodzi w końcu w część niemal asymptotyczną.

P r a c a: W grupie niedostatecznie uwodnionej, otoczonej linią przerywaną (Rys. 10), znajdowało się 9 doświadczeń z dawką pracy II (Tabl. 5), wśród nich większość na psie P4. Krzywa przebiega dość równomiernie o kilka odsetków hemoglobiny wyżej, niż w spoczynku. Mniejsze rozcieńczenie osocza może w tym przypadku być wywołane nie tylko przez większą utratę wody, lecz również i przez uruchomienie krwinek z miejsc zalegania. Dlatego tylko z zastrzeżeniami można przyjąć wniosek, że podczas dowozu jednakowych ilości glikozy w opisanych warunkach zwierzę pracujące posiadało mniejszą objętość krwi, niż spoczywające.

6. Względna objętość osocza krwi a stała b_p w okresie zapoczątkowującego wysycania

Staća b_p w spoczynku: Niewątpliwie poprawne stałe b_p w połowie pierwszej godziny dowozu glikozy otrzymuje się, gdy względne stężenie hemoglobiny we krwi znajduje się blisko krzywej na rys. 10. Krzywej tej od V_i w górę odpowiada wzór:

$$\text{Względne stężenie hemoglobiny we krwi, } \% = \frac{389}{V_i} + 74,4.$$

Dla wartości średnich grupowych wzór dawał błąd $\pm 1,4\%$. Ta ścisłość wystarczała aż nadto, by ocenić odstępstwo stężenia hemoglobiny od wzorca, zwłaszcza że chodziło tylko o grubsze odchylenia.

Gdy odchylenie względnego stężenia hemoglobiny we krwi sięgało $\pm 5\%$ w stosunku do wartości, wyznaczonych przez równanie, osobniki ujawniały ze szczególną ostrością swe stałe b_p znamienne dla nich, co widać u osobników zbadanych dokładnie pod tym względem [51] przy V_i od 86 do 176 g na m^2 /godz. (Tabl. 11).

Tablica 11

U sześciu spoczywających psów wprowadzano dożylnie znaczne ilości glikozy i wody. Mimo to zapoczątkowujące przecukrzenie, określone stałą b_p , zatrzymało cechy charakterystyczne dla każdego osobnika, przy należytych uwodnieniu krwi

Pies	Liczba doświadczeń	Przeciętna V_i g m ² /godz.	Przeciętne względne stężenia hemoglobiny we krwi		Różnica między wartością znaną a obliczoną %	Względne stężenie osocza krwi znalezione %	Przeciętna stała b_p mg na 100 ml min. g m ² godz.
			Znalezione %	Obliczone %			
Andro.	5	141,0	80,9	77,3	± 4,8	123,6	0,1509
Ordo.	7	129,8	80,5	77,5	± 3,8	124,3	0,1531
Mess.	4	131,1	78,0	77,4	± 1,9	128,2	0,1685
Giz.	6	132,8	75,2	77,3	± 4,5	132,9	0,1607
Zul.	5	124,6	77,2	77,8	± 1,2	129,5	0,2218
Porc.	7	135,4	75,1	77,2	± 2,9	133,1	0,2238

Różnice w stałej b_p u tych 6 osobników nie zostały więc wywołane w żadnym wybitniejszym stopniu mniejszym lub większym rozcieńczeniem osocza, lecz przede wszystkim sprawnością w usuwaniu glikozy ze krwi. Natomiast stała b_p uzyskana, gdy krew jest niedostatecznie uwodniona, jest mniej pewna. Żadnego zaś niebezpieczeństwa dla wiarygodności stałej b_p nie kryje nieco nadmierne rozcieńczenie osocza. Przy oznaczaniu stałej b_p może być pomocą równoczesne oznaczanie względnego stężenia hemoglobiny we krwi.

Pozorna stała b_p podczas pracy: Tylko stałej b_p można było użyć, by podczas pracy porównać dynamikę zapoczątkowania z obrotem wody, gdyż stałą tę można oznaczyć dla każdego punktu z osobna (por. „Mianownictwo...“). Stałe b_p (w przeciwieństwie do b'_p) tworzą pas wartości narastający łukowato z wypukłością na lewo ku górze (Rys. 10). W pasie tym uwarstwiają się od dołu wartości przynależne do krzywych A i E, ponad nimi zaś kolejno stałe dla krzywych B, C i D. Następowo to zgadza się z kolejnością odpowiednich zmian minutowych na rys. 5, na którym biegną one wzdłuż skośnie dążących prostych od prawej ku lewej stronie rysunku. Gdy chodzi o osobniki, które są przedstawicielami danej krzywej to kolejność na rys. 10 od dołu ku górze jest: P4, P8, P7, P6. Taka sama jest na rys. 5 od prawej ku lewej.

Należy rozważyć możliwość, czy niskich stałych b_p (także a_p i b'_p), a więc zwiększonego usuwania glikozy ze krwi podczas pracy, nie należy przypisać względnemu (w stosunku do spoczynku) albo bezwzględemu odwodnieniu. Zdawałaby się za tym przemawiać grupa krzywej A (P4 i inne), podczas cięższej dawki pracy. Posiada ona najniższe wartości pozornej stałej b_p i zarazem wyraźne odwodnienie krwi (znaczna część tych

doświadczeń posiada punkty obwiedzione linią przerywaną). Względna objętość osocza zmniejsza się w nich nawet poniżej 90% wartości wyjściowej. Następujący dowód przemawia za tym, że niskie stałe b_p zostały w tych przypadkach wywołane wysiłkiem mięśniowym, zużywającym więcej glikozy, a nie odwodnieniem.

W pozostałej grupie punktów (przeważnie praca I) nie udaje się w żaden sposób związać względnego stężenia osocza krwi z wysokością stałej b_p . Wśród nich punkty uzyskane na psie P8 nabierają szczególnego znaczenia wskutek tego, że uwodnienie osocza było w nich mimo pracy szczególnie wydatne, tak że dorównywało doświadczeniom spoczynkowym wzdłuż ich krzywej (Rys. 10). Dane usuwania glikozy ze krwi można było więc u tego osobnika wprost porównać z doświadczeniami spoczynkowymi. Wniosek z porównania jest jasny. Zarówno na rys. 10 pozorna stała b_p , a więc nie zróżnicowana wartość kinetyczna, jest u P8 wybitnie niższa, niż nawet najniższe b_p spoczynkowe, jak i na rys. 5 krzywa B zmiany minutowej odchyła się bardzo wyraźnie na prawo od punktu zerowego. Przy tym jednak odchylona na prawo krzywa posiada nachylenie, a więc stałą b'_p niemal taką samą jak spoczynkowa. A więc przy takim samym uwodnieniu jak w spoczynku składnik usuwania glikozy bez przecukrzenia występuje w sposób niedwuznaczny. Na rys. 5 krzywa B stoi najbliższej krzywej A, a więc właśnie tej grupy danych, w której odwodnienie krwi występowało najczęściej. W ten sposób osobnik stosunkowo najgorzej uwodniony (wskutek silniejszej dawki pracy, P4) i najlepiej uwodniony (P8) dały nie daleko siebie stojący zapoczątkowujący przyrost glikozy we krwi.

Należy więc na razie wyciągnąć wniosek, że w grupie zwierząt spełniających trwale wysiłki mięśniowe niewielkie wahania we względnym stężeniu osocza nie grają wybitniejszej roli w kinetyce zapoczątkowującego wysycania glikozą.

7. Bilans wodny a względne rozcieńczenie osocza w okresie zapoczątkowania

Sposoby badawcze użyte w obecnym doniesieniu nie upoważniają do głębszego rozbiórki zjawisk obrotu wody i jej rozmieszczenia w złożonych warunkach, jakie panowały podczas doświadczeń. Jedno spostrzeżenie narzuca się jednak w tabl. 12, którą sporządzono na podstawie danych na rys. 9 i 10.

Rozcieńczenie osocza krwi jest większe, niżby to odpowiadało zmianie w wadze ciała, czy to istotnie znalezionej, czy też obliczonej na podstawie pewnych założeń, uwidocznionych w tabl. 12. W spoczynku nawet wtedy, gdy waga ciała wyraźnie się nie zmienia, już krew jest nieco rozcień-

Tablica 12

Przykłady stopnia zgodności: a) obliczonej i znalezionej zmiany w wadze ciała oraz b) zmian w wadze ciała ze stopniem rozcięcia osocza krwi (względne stężenia hemoglobiny we krwi). Pierwsze pół godziny jednostajnego dowozu glikozy przez żyłę z różnymi prędkościami, u osobników spoczynających i pracujących. Zmiana w wadze ciała odbija się we względnym stężeniu osocza krwi. Stała b_p dla pracy jest pozorną statą b_p

Pies (♀)	L. po z. dośw.	Dowóz glikozy g m ² godz.	Przychód *) g/m ² na pół godz.	Rozchód *) g/m ² na pół godz.	Oczekiwana zmiana wagi g/m ² na pół godz.	Znaleziona zmiana wagi g/m ² na pół godz.	Względne stężenie hemoglobiny we krwi		Względne stężenie osocza krwi znalezione %	Stała b _p
							Ocenione***) graficznie	Znalezione		
S P O C Z Y N E K										
Zul.	8	19,6	52	56	16	11	94	92	109	0,180
Ordo.	7	21,1	55	56	+	20	94	92	109	0,142
Mess.	8	21,2	54	37	+	27	94	96	106	0,142
Zul.	9	38,9	110	69	+	41	88	86	116	0,185
Ordo.	8	41,2	111	56	+	75	88	86	116	0,143
Bib.	2	41,5	114	54	+	60	88	93	108	0,170
Ordo.	11	86,1	251	154	+	77	84	84	119	0,132
Mess.	4	124,7	354	152	+	82	78	77	130	0,175
Ordo.	14	127,9	341	176	+	175	78	74	135	0,140
Giz.	3	130,7	367	178	+	189	78	81	123	0,180
Giz.	1	135,6	367	220	+	141	77	74	135	0,178
Ordo.	6	193,0	509	398	+	111	76	74	135	0,156
P R A C A										
P. 8	7	40,0	117	112	+	5	90	87	115	0,136
P. 15	3	43,2	119	105	+	59	90	88	114	0,062
P. 8	2	77,9	213	190	+	14	86	83	123	0,118
P. 6	6	83,1	212	178	+	34	86	90	111	0,195
P. 15	2	87,0	237	210	+	97	86	90	111	0,093
P. 6	3	101,8	281	208	+	72	85	87	115	0,172
P. 7	3	114,0	300	218	+	94	84	85	118	0,144
P. 8	4	135,5	397	391	+	6	83	83	121	0,143
P. 12	1	206,5	472	474	+	98	82	85	118	0,142

*) Przychód wagi = g wody wstrzykniętej + g glikozy wstrzykniętej.

**) Szczegóły obliczenia rozchodu wagi ciała. Dla spoczynku: przyjęto średni jednakowy przebieg dla wszystkich doświadczeń; wydalanie glikozy w pierwszej półgodzinie przyjęto jako równe 0,367 wartości dla całej pierwszej godziny, objętość moczu wyrażono w gramach. Dla pracy: przeważnie oznaczono wprost, zaś wydalanie glikozy dla pierwszej półgodziny obliczano podobnie jak dla spoczynku, objętość moczu wyrażono w gramach.

***) Stężenie hemoglobiny oceniano graficznie z krzywej dla spoczynku w doświadczeniach spoczynkowych i z krzywej dla pracy w doświadczeniach z pracą (Rys. 10).

czona. W miarę jak wzrasta dowóz, powiększa się nieco waga ciała, ale niewspółmiernie silniej rozcieńcza się osocze (Tabl. 12).

Podczas pracy zjawisko to występuje jeszcze wyraźniej, gdyż osocze rozcieńcza się także wtedy, gdy zwierzę traci nieco na wadze. Przy wyższym dowozie glikozy zysk na wadze jest mniejszy, niż przy podobnych V_1 w spoczynku, i rozcieńczenie osocza jest odpowiednio mniejsze.

Jeżeli nawet przyrost na wadze odnieść do wody, nie może on wytłumaczyć rozwodnienia krwi. Wyjaśnienie leży prawdopodobnie w mozaikowym rozłożeniu wody, której nadmiar we krwi jest widocznie wyrównywany odwodnieniem okolic pozanaczyniowych. Włośnice układu krwionośnego napełnione płynem hipertonicznym jak osmometry wciągają wodę z zawartymi w niej rozpuszczonymi ciałami nie tylko z części śródmiąższowej płynu zewnątrzkomórkowego, ale także z wnętrza komórek. Świadczy o tym zalew ustroju potasem wewnątrzkomórkowym [48b]. Zachowanie się różnych przedziałów wodnych sprzyja linijskości przyrostu glikozy we krwi w okresie zapoczątkowania.

OMÓWIENIE

1. Ograniczenia i zalety okresu zapoczątkowania

Okres zapoczątkowującego wysycania glikozą jest czystym przeciwieństwem jednostajnego podtrzymywania stężenia glikozy w ustroju na stałym poziomie pomiędzy posiłkami i dlatego stanowi najprostszą sprawdzian wydolności urządzeń nastawiających stężenie glikozy we krwi. Przedstawiony zespół doświadczeń jest pierwszym próbnym zarysem ilościowego traktowania nieopisanych dotąd zjawisk, które występują w początkach jednostajnego wysycania glikozą ustroju, spełniającego ciężkie zadania fizyczne. Okres zapoczątkowujący posiada swe odrębności i zalety.

Zwierzęta w pierwszej półgodzinie ciężkiej pracy są jeszcze całkowicie świeże. Uzyskiwane wtedy stężenia cukru we krwi (glikozy) znajdują się jeszcze w granicach, które mogą podnieść przetwarzanie. Żaden ze sposobów obchodzenia się ustroju z glikozą nie osiąga jeszcze stanu trwałej równowagi. Nie dochodzi jeszcze do dłuższej trwającego działania znacznych stężeń osmotycznych, wywołanych nagromadzeniem glikozy. Od chwili rozpoczęcia dowozu każda jego minuta przynosi kolejno coraz to nowe zjawiska.

2. Wypośrodkowanie *maximum* pracy mięśniowej wśród jednostajnego dowozu glikozy w danych warunkach

Obecne badania miały być zastosowaniem do pracy mięśniowej sposobów jednostajnego wysycania glikozą przez żyłę, które uprzednio wy-

kształcono dla osobników spoczywających. Przy ich pomocy miano z jednej strony w ogólności ocenić na przykładzie glikozy możliwość, sposoby i wyniki jednostajnego karmienia dożylnego podczas naturalnej ciężkiej pracy mięśni prawidłowego, nie uśpionego i nie uszkodzonego osobnika. Z drugiej jednak strony nasuwał się szereg zagadnień teoretycznych o ogólnym znaczeniu, które zostaną poruszone w obecnym i dalszych doniesieniach.

Zgodnie z tym planem należało użyć takiej samej skali V_i jak u osobników spoczywających, a więc od 0,1—1,1 gramocząsteczki na $m^2/\text{godz.}$, lub nawet więcej, jeżeli takie same stężenia cukru we krwi miano osiągnąć. Ta część zadania była stosunkowo łatwa do spełnienia. Natomiast wysiłek podyktowany ustrojowi wymaga omówienia. Wysiłek ustroju winien być jak najbardziej zbliżony do fizjologicznego i to w warunkach, które można by nazwać pracą psa. Bieg pod górę, jako jedna postać zadań, jakimi człowiek w swej służbie obciąża psa, zasługuje na tę nazwę. Równocześnie wysiłek ten winien być najwyższy, jaki w ciągu 5 lub 6 godzin można zastosować bez uszkodzenia zwierzęcia. Chodziło bowiem o osiągnięcie możliwie największego odchylenia, związanego z pracą, by jej wpływ uwydatnił się wyraziście w stosunku do spoczynku.

Najwyższe obciążenie pracą układu mięśni prążkowanych mogłoby tylko wtedy dojść do pełnego wyrazu, gdyby pracą zostały objęte: 1) wszystkie mięśnie prążkowane ustroju i gdyby 2) czynność ich wszystkich równocześnie osiągnęła najwyższe natężenie. Należy przypuścić, że w warunkach fizjologicznych, a więc bez użycia sztucznych czynników pobudzających, stan taki jest nie do osiągnięcia.

Okazuje się bowiem na wartościach wchłaniania O_2 , że przy pewnym określonym gatunku pracy, dającym się dobrze opanować doświadczalnie, który zatrudnia ściśle określoną masę mięśniową, można otrzymać nieprzekraczalne *maximum* zużycia O_2 , co wykrył A. V. Hill [23] i potwierdziło po nim wielu innych. Na przykład przy biegu pod górę osiąga się zużycie O_2 , którego nie potrafi wyżej podnieść ani wzmożenie prędkości biegu, ani zwiększenie nachylenia płaszczyzny, na której bieg ku górze się odbywa, a więc dwu parametrów dających się wygodnie mierzyć. Mogłoby się w ten sposób zdawać, że ustrój doszedł już do *maximum* swych możliwości krążeniowo-oddechowych i przetwórczych. Tymczasem, gdy w grę wprowadzić nową masę mięśniową przez dodatkowe uruchomienie pewnymi zadaniami ramion biegnącego osobnika, pułap wchłaniania O_2 , zdawałoby się nie do przekroczenia, posuwa się ku nowej linii *maximum* [8b, 44], która też jeszcze zapewne nie musi być ostateczną.

Podobnego stanu rzeczy należy oczekiwać dla najwyższego zużycia glikozy. Wprawdzie u psa podczas biegu wszystkie cztery kończyny są dość równomiernie zatrudnione pracą, którą można doprowadzić do

szczytu, ale pozostają jeszcze niektóre mięśnie szyi i głowy oraz grzbietu i brzucha, które wprawdzie podczas biegu pod górę podlegają pewnym skurczom, dalekim jednak od najwyższych.

U szczura pozbawionego trzewi brzusznych skurcze obu tylnych kończyn, wywołane prądem elektrycznym, powodowały większe zużycie glikozy, wprowadzanej dożylnie, niż jednej tylnej kończyny [27]. Zwiększenie masy uruchamianych mięśni zwiększało więc zużycie glikozy.

Dlatego podczas biegu trwającego szereg godzin nie można oczekiwać, by: 1) nawet w grupie mięśni czynnych podczas biegania wysiłek na minutę był najwyższy; 2) tym mniej zaś, by obejmował on wszystkie mięśnie prążkowane, a zatem stanowił pułap rzeczywiście nieprzekraczalny. W tym znaczeniu praca zastosowana w obecnych doświadczeniach nie była najwyższa na minutę. Na przykład u psa biegnącego z prędkością 11 km/godz. w bieżni ustawionej poziomo występuje zapas po 1,5 godzinie biegu [30]. Czas ten oczywiście skraca się coraz bardziej w miarę, jak zwiększa się kąt nachylenia bieżni podczas biegu pod górę.

Gdy jednak narzucić inny parametr czasu tak, by praca trwała w ciągu 5 lub 6 godzin, wtedy należy uznać, że dawka pracy, zastosowana na podstawie licznych uprzednich prób, była przy pracy II prawdopodobnie bliska najwyższej możliwej, a przy pracy I była nieco niższa. Okazało się, że wypróbowana dawka pracy i sposób jej stosowania z 5 minutami wypoczynku na każde pół godziny była zgodna z dawkami pracy najwyższej, wydobytymi doświadczalnie u psa przez innych [11].

Istniało jeszcze jedno ograniczenie dawki pracy, z którym należało się liczyć, gdy obejmowano na jednym i tym samym osobniku cały, wyżej wyszczególniony zakres V_i . Wyższe V_i obarczały układ krążenia dodatkowo znaczną objętością hipertonicznego płynu. Mogły więc upośledzić wymianę gazową zwierzęcia, jego sprawność mięśniową, wydajność pracy i doprowadzić do zgubnej niedomogi krążenia. Dawka pracy musiała być tak dobrana, by nawet zwierzę nie posiadające uzdolnień atletycznych mogło wytrzymać całą skalę V_i . Z tego punktu widzenia dawka pracy II okazała się zbyt wysoka, co skłoniło do zastosowania pracy I. Lecz i ta stawała się graniczną dla V_i 190 g na m²/godz. (= 9 g na kg/godz.), gdyż na diecie nr 1 mogło przy niej dojść do nieodwracalnego uszkodzenia u najlepiej nawet wyćwiczonych osobników.

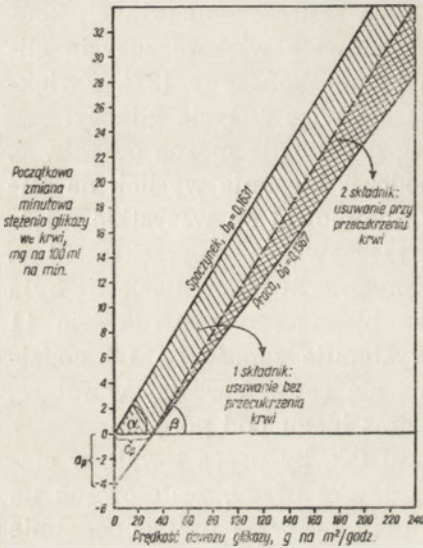
3. Zasadnicze zjawisko w usuwaniu glikozy ze krwi podczas pracy

U psa spoczywającego gromadzenie się we krwi glikozy, dowożonej dożylnie z jednostajną prędkością, posiada w połowie pierwszej godziny cechy wyjątkowe w porównaniu z dalszymi odcinkami dowozu. Przyrosty glikozy we krwi (oś y), uzyskane w pierwszych 30 minutach dowozu,

przy różnych V_i (oś x) dają linię prostą (Rys. 11), która: 1) przecina punkt zerowy układu osi współrzędnych, 2) zależy od wymiarów ciała mniejszych, niż waga, a bliskich wymiarowi powierzchni, 3) posiada nachylenie b_p zależne od wielkości dróg ujścia glikozy ze krwi [50, 51].

Nadaje się więc do łatwych ujęć kinetycznych. Zachowanie to pochodzi przede wszystkim stąd, że gromadzeniu się glikozy w płynach zewnątrzkomórkowych jeszcze nie przeciwstawia się w dostatecznej mierze jej uchodzenie z tych płynów.

Podczas ciężkiej pracy mięśniowej wyżej opisana prosta ulega przemieszczeniu (Rys. 11). Prosta, oparta na wartościach krzywej E z rys. 5, już nie przechodzi przez punkt zerowy, lecz przecina oś odciętych V_i na prawo od punktu zerowego przy $c_p = 31,1$ g na $m^2/\text{godz.}$, zaś oś rzędnych poniżej zera w punkcie a_p równym $-4,25$ mg na 100 ml/min. (dane z Tabl. 9). Prosta, która z tego punktu wspina się na prawo ku górze, posiada stałą $b'_p = 0,1367$, a zatem mniejszą, niż średnia b_p dla 71 spoczynkowych doświadczeń (0,1631). Gromadzenie się glikozy we krwi w okresie zapoczątkowania podczas pracy posiada więc dwie składowe, które uwidoczniono na rys. 11.



Rys. 11. Schemat na podstawie krzywej E (Rys. 5) odnosi się do bardzo ciężkiej pracy mięśniowej podczas dowozu glikozy u psa. Zwiększenie usuwania glikozy ze krwi w zależności od dowozu tego cukru posiada dwie składowe: jedną, która działa przy niezwiększonym stężeniu glikozy we krwi, i drugą, która zdaje się występować dopiero przy wzroście tego stężenia ponad poziom, który istniał przed rozpoczęciem pracy i dowozu glikozy

4. Pierwszy składnik kinetyczny usuwania glikozy ze krwi podczas pracy, działający przy stężeniu cukru we krwi bliskim prawidłowego

Odcinek s_p (Tabl. 9, Rys. 11) wyznacza graficznie na osi V_i , ile glikozy najwyżej mógł znieść ustrój bez wykazania przecukrzenia w danych warunkach. Ilość ta jest prawdopodobnie proporcjonalna do dawki pracy, gdyż stale jest niższa dla pracy I (krzywe B i D na rys. 5), a nawet może całkiem zaniknąć (krzywa C na rys. 5) u osobnika z wyraźnie upośledzonym przetwarzaniem glikozy (P7, Rys. 7B). Jak wykażą dalsze doniesienia, składowa ta występuje nie tylko w okresie zapoczątkowania, lecz również w dalszych godzinach dowozu glikozy podczas pracy. Musi więc

być uznana za zjawisko prawidłowe, występujące przy przeciętnym i silnym przetwarzaniu w tkance mięśniowej, a być może znikające przy upośledzeniu przetwarzania w mięśniach.

Można by przypuścić, że również bez dowozu glikozy, przy prawidłowym stężeniu cukru we krwi, glikoza powinna być usuwana z tą samą prędkością, znikając zatem w ilości 4,25 mg na 100 ml krwi na min. Okazuje się jednak w badaniach kontrolnych (Tabl. 5—8) z podobną dawką pracy, lecz bez dowozu glikozy z zewnątrz lub z dowozem roztworu fizjologicznego (Tabl. 5, 8), że często cukier we krwi obniżał się tylko lekko, a nawet niekiedy przyrastał. Wychylenia w górę lub w dół nie przekraczały $\pm 0,2$ mg na 100 ml/min. z jednym tylko wyjątkiem, gdy przyrost wyniósł 0,48 mg na 100 ml/min. (Tabl. 6). W ten sposób potwierdza się dobrze znane zjawisko, że nawet bez dowozu glikozy z zewnątrz nie przychodzi do poważniejszego niedoboru glikozy we krwi w pierwszej półgodzinie wysiłku. Powód może być dwojaki:

a) Albo już bez dowozu glikozy ustrój dostarcza mięśniom tak wielkich ilości glikozy, że pokrywa całkowicie koszt pracy. Można by wtedy przypuścić, że ustrój dostarcza mięśniom 1,52 g glikozy na kg/godz. po półgodzinie ciężkiej pracy ($= c_p$, Tabl. 9). Jeżeli zadanie to spadłoby na wątrobę, która u spoczywającego zwierzęcia wydziela około 0,16 g glikozy na kg/godz. byłoby to podczas pracy dziesięciokrotnienie tej czynności.

b) Albo też paliwem pracy są jeszcze w dodatku inne materiały, jak tłuszcz (por. [2, 40, 6]).

Ad a) Tworzenie glikozy przez wątrobę być może podsyćane przez wydzieliny pracujących mięśni, mogłoby być podczas pracy wzmoczone [25]. Na przykład wyciągi krwi i mięśni wzmagają wchłanianie O_2 przez przepłukiwaną wątrobę [33]. Niewątpliwie podczas ciężkich wysiłków mięśniowych może przyjść do zwiększenia wyrzucania adrenaliny i noradrenaliny przez rdzeń nadnerczy i układy adrenergiczne oraz wzmoczonej glikogenolizy [12] i być może do innych jeszcze działań podobnych.

Dopóki stężenie cukru we krwi nie podniesie się do pewnego poziomu, który działa wstrzymująco na wyrzucanie glikozy przez wątrobę, nie należy przyjmować, że działalność ta jest wstrzymana. Tym bardziej nie można tego przyjąć, gdy podczas działania pierwszego składnika kinetycznego stężenie cukru we krwi w ogóle nie podnosi się ponad poziom, który panował przed dowozem glikozy. Dlatego c_p , czyli najwyższa ilość glikozy jeszcze znoszona przez ustrój bez podniesienia stężenia cukru we krwi ponad poziom wstępny, zapewne dodaje się do tej ilości cukru, którą równocześnie oddaje do krwi wątroba i dopiero suma obu tych wartości stanowi główny wkład ustroju do pokrycia wydatków pracy. Należy się jednak zastrzec, że niewiadomo, czy wzmoczony przepływ glikozy przez

wątrobę podczas wlewania w czasie trwania pracy nie wywołuje zmian w ilości glikozy oddawanej do krwi, nawet wtedy, gdy stężenie glikozy we krwi nie ulega wyraźnym zmianom w stosunku do wartości wstępnej.

Ad b) Wydatek cieplny dla pracy I, wyrażony w gramach glikozy (Tabl. 1), wynosi około 60 g na m²/godz., zaś dla pracy II około 80 g na m²/godz. Trudno przypuścić, by podczas pracy bez dowozu glikozy (po diecie nr 1), do której ustrój przystępuje z pozabiałkowym ilorazem oddechowym rzędu 0,7 lub bliskim niego [47], nawet po uruchomieniu wszelkich dostępnych ciał szeregu węglowodanowego, cały wydatek cieplny mógł być pokryty tym rodzajem paliwa. Podczas zaś dowozu glikozy z mierną prędkością u szczura drażnionego prądem elektrycznym wzmagają się wprawdzie zużycie glikozy i powiększa równocześnie zużycie O₂, ale iloraz oddechowy spada w stosunku do spoczynkowego w tych starych warunkach [26].

Następują dwa tłumaczenia:

a) Albo ilość dostarczanej z zewnątrz glikozy była w tych doświadczeniach zbyt mała, tak że w sumie z równoważnikami węglowodanowymi, dorzucanymi przez sam ustrój, nie wystarczała, by ochronić tłuszcz przed rozpadem. Działanie tłuszczoszczędne węglowodanu wyraźnie występuje, np. u spoczywającego szczura [32].

b) Albo też wzmożona praca mięśni narzuca ustrojowi pracującemu wzmożony rozpad kwasów tłuszczowych nawet w obecności wystarczających dostaw paliwa węglowodanowego. Wyciągi mięśni wzmagają przetwarzanie kwasu palmitynowego w skrawkach i miazgach wątroby [16]. Podczas działania pierwszego składnika kinetycznego wprowadzana z zewnątrz glikoza wdziera się w ściśle zgrane dwustrumienne wewnątrzpochodne zaopatrzenie pracy mięśniowej, wypiera część obu wewnątrzpochodnych strug podłoża [1], współzawodnicząc z nimi („chroniąc“, „zastępując“) w zaopatrywaniu w paliwo układów wyzwalaających energię.

Najważniejszym rysem pierwszego składnika kinetycznego podczas pracy jest, że zwiększenie usuwania dowożonej glikozy odbywa się już przy prawidłowym stężeniu cukru we krwi. Zjawisko to, wyrażone w znanych fizjologii faktach, wygląda tak, jak gdyby ciało o rozpuszczalności w wodzie takiej, jaką posiada O₂, nagle zyskało rozpuszczalność CO₂. Sama glikoza swych właściwości w tych warunkach zdaje się nie zmieniać. Natomiast zjawiska rozstrzygające zachodzą w tkance mięśniowej, w której mogą wystąpić dwa rodzaje zmian, ułatwiających usuwanie glikozy ze krwi.

a) W mięśniach doszukać się można dwu koryt naczyniowych, ze sobą połączonych [3]. Jedno z nich, łożysko życia spoczynkowego, wiodłoby krew o małej różnicy tętniczo-żylną zawartości O₂. Inne zaś drogi krwionośne, w których zasięgu istnieją znaczne możliwości rozwinięcia

działalności przetwórczej, rozchylałyby się w pracujących mięśniach i niosłyby krew o wybitnej różnicy tętniczo-żylniej zawartości O_2 [4]. To wymaganie fizjologiczne zostało potwierdzone przez badania histofizjologiczne [62]. Choć organizacja tego przestawienia naczyniowego nie została dokładnie poznana, można przypuścić, że przyczynia się do niego wpływ adrenaliny, która podczas pracy pojawia się we krwi w większych ilościach. Może ona rozszerzać naczynia obwodowe nawet wtedy, gdy niemal nie podnosi ogólnego ciśnienia tętniczego [22].

Nawet odczynowe przekrwienie wywołane bezpośrednio przed rozpoczęciem ciężkiej pracy kilkuminutowej wielokrotnie zwiększa czas najwyższej pracy prowadzonej aż do wyczerpania [36]. Przypuszcza się, że przez przekrwienie wywołane tuż przed pracą nie zostają mięśnie lepiej zaopatrzone tlenem, lecz że polepsza się z mięśni odpływ niedostatecznie utlenionych ciał.

Budzi się zagadnienie, czy rozchylenie nawet znaczne koryta naczyniowego w pracujących mięśniach zwiększa powierzchnię enzymatyczną glikokinazy wewnątrz komórek mięśniowych [9, 31]. Według uzupełniającej hipotezy Helmreich'a i Cori'ego [20] dostęp do wnętrza komórki poprzez błony komórkowe byłby wzmożony wskutek rozgrywających się we wnętrzu komórki nasileń przetwórczych.

b) Drugą możliwością stanowi przepuszczanie glikozy do wnętrza komórki nie wskutek zwykłej dyfuzji, lecz przy pomocy nieznanego bliżej co do swej istoty procesu, w którym glikokinaza i fosforylacja nie stanowi części istotnej [19, 25, 39]. Proces ten, który przyspiesza insulina i praca mięśniowa, niezależnie od insuliny [29, 18] poprzedzałby działanie glikokinazy i doprowadzał do pojawienia się wewnątrz komórki niezmięnionej rzekomo glikozy, na którą dopiero mogłaby zadziałać glikokinaza, o ile jest sprawna i niewysycona podłożem.

Zastanawia fakt, że u psa, pozbawionego trzewi jamy brzusznej, wpływ mechanizmu b) podczas skurczów mięśniowych, wywołanych prądem elektrycznym, nie jest wyraźnie widoczny na końcu pierwszej półgodziny. Rozwijają się wyraźnie dopiero po upływie 2—3 godzin kurczenia się mięśni [19]. Jednakowoż w wyosobnionej kończynie psa prędkość usuwania cukrów z płynu przepłuczynowego wzmagają się bezpośrednio po rozpoczęciu drażnienia mięśni do skurczu [25]. A więc jednak możnaby uwzględnić jego wpływ już w pierwszej półgodzinie.

Mimo tych faktów, których tłumaczenie uzależnia przetwarzanie glikozy nie od szybkości, z jaką działa glikokinaza, ale od prędkości, z jaką odbywa się przeniesienie glikozy do punktów czynnych glikokinazy, jednak ostatecznym kresem działalności przetwórczej tkanek wobec glikozy jest praktycznie biorąc całkowite obsadzenie glikokinazy cząsteczkami glikozy, a nie ograniczenie w przeprowadzaniu glikozy do ich wnętrza [38].

W ten sposób w świetle nowych faktów doznaje potwierdzenia stan dawniej opisany na nietkniętym zwierzęciu i nazwany cukrzycą z nadmiaru, jako kres czynności przetwórczej, który się zjawia nawet w obecności znacznych ilości insuliny [47].

Gdyby we krwi tętniczej cukier wzrastał wybitnie, a różnica tętniczo-żylna była znaczna, stężenie cukru we krwi żylniej mogłoby się znaleźć na poziomie, jaki istniał przed dowozem. W ten sposób pierwszy składnik kinetyczny, wchłaniania glikozy bez przecukrzenia, oceniany w obecnym doniesieniu jedynie na podstawie badania krwi żylniej, byłby tylko pozorny. Tak nie jest. Równoczesne pomiary stężenia cukru we krwi tętniczej i żylniej podczas pracy i dowozu glikozy wykazały, że nie ma zasadniczych zmian w różnicy tętniczo-żylniej cukru we krwi między spoczynkiem a pracą. Najwidoczniej wzmoczony obrót glikozy odbywa się kosztem pomnożonego przepływu krwi przez narządy, a nie kosztem zwiększenia ilości mg glikozy usuwanych ze 100 ml krwi przez tkanki. Zatem pierwszy składnik kinetyczny istnieje zapewne w obu gatunkach krwi w podobnej postaci.

5. Drugi składnik kinetyczny wzmoczonego usuwania ze krwi glikozy dowozonej podczas pracy, który się zjawia przy przecukrzeniu krwi

Ażeby uwidocznić udział drugiego składnika, należy (Rys. 11) nakreślić równoległą do krzywej spoczynkowej w ten sposób, by przecięła ona ten sam punkt na osi odciętych, przez który przechodzi krzywa pracy. Wtedy między prostą pracy a prostą równoległą do linii spoczynku ukazuje się wycinek, nazwany drugim składnikiem. Jest on znacznie mniej wyraźny, niż pierwszy, a nawet może się wydać wątpliwy przy mniejszych nasileniach pracy i przy niższych V_i . Jednak na krzywej E z rys. 5 składnik ten występuje wyraźnie w porównaniu ze spoczynkową przeciętną dla 71 doświadczeń (Rys. 11). Cechuje się tym, że stanowi stały odsetek spoczynkowej zmiany minutowej.

Drugi składnik kinetyczny można wyrazić kilku sposobami. Najwygodniej określić go różnicą między spoczynkową stałą b_p a stałą b'_p podczas pracy. Np. dla rys. 11 różnica między przeciętną stałą b_p w spoczynku (0,1631) a b'_p ciężkiej pracy (krzywa E , Tabl. 9, $b'_p = 0,1367$) wynosi 0,0264, czyli każdy 1 g glikozy wprowadzony na $m^2/\text{godz.}$ powyżej $V_i = c_p$ podnosi podczas pracy stężenie glikozy we krwi o 0,0264 mg w 100 ml na min. mniej, niż w spoczynku.

Można go też wyrazić dla pewnej określonej V_i , jako różnicę między spoczynkową zmianą minutową stężenia cukru we krwi, pomniejszoną

o a_p , a zmianą minutową dla tej samej V_i podczas pracy ($\Delta U =$ przyrost usuwania):

$$\Delta U = (\Delta C_{kvj}^{0'-30'}/t \text{ dla spocz.} - b_p c_p) - (\Delta C_{kvj}^{0'-30'}/t \text{ dla pracy}). \quad (5)$$

Wynik będzie wyrażony w mg na 100 ml/min. Będzie oznaczał, o ile mg zmiana minutowa podczas pracy będzie niższa, niż w spoczynku. Obliczenie tegoż składnika dla jakiegokolwiek V_i w takich samych jednostkach brzmi:

$$\begin{aligned} \Delta U &= [(V_i - c_p) \cdot b_p] - [(V_i - c_p) \cdot b'_p], \\ \Delta U &= (V_i - c_p) \cdot (b_p - b'_p). \end{aligned} \quad (6)$$

Wszystkie te obliczenia dają się oczywiście zastosować tylko, gdy istnieje przecukrzenie.

Gdy zatem dowóz glikozy do krwiobiegu został podprowadzony do punktu c_p , przy którym teoretycznie równoważy się on dokładnie z odejściem ze krwi 4,25 mg glikozy na 100 ml krwi na min. (dlatego właśnie nie przychodzi do przecukrzenia krwi), wtedy dołącza się drugi składnik kinetyczny (Rys. 11). Widocznie ułatwienia odcukrzające krew do linii poziomu wstępnego doszły do wysycenia. Wśród wzmagającego się gromadzenia glikozy we krwi drugi składnik kinetyczny zwiększa dalej odpływ glikozy, ale nie wybuchowo i zabórco, jak czyni to składnik pierwszy, lecz równomiernie o 16% poprzez całą dalszą skalę V_i , objętą krzywą E pracy na rys. 11. W mierze bezwzględnej im większe wywołane przecukrzenie, tym wyraźniejszy staje się ten składnik na rys. 11. Na przykład, dla V_i 50 g na m^2 /godz. wynosi on zaledwie 0,5 mg na 100 ml/min., czyli taka tylko jest różnica w obliczeniu:

$$\Delta U = [(V_i - c_p) \cdot 0,1631] - [(V_i - c_p) \cdot 0,1367],$$

gdy V_i wynosi 50 g na m^2 /godz., a c_p 31,1 g na m^2 /godz. (Tabl. 9 dla krzywej E). Ale w miarę jak V_i wzrasta do 100, 150 i wreszcie do 200 g na m^2 /godz., wtedy składnik drugi powiększa się do 1,8 mg, 3,1 mg i w końcu do 4,5 mg na 100 ml²/min. Potrzebny jest dowóz aż 192 g glikozy na m^2 /godz., by składnik drugi osiągnął taką samą wysokość, jaką posiada składnik pierwszy, a mianowicie, 4,25 mg na 100 ml/min.

Co prawda przykład na rys. 11 jest krańcowy i dotyczy krzywej, która jest niejako górną granicą obu składników w obecnych doświadczeniach. Składnik drugi jest obecny również w zespole doświadczeń, przez które przeprowadzono krzywą A (Rys. 5, Tabl. 5), a które mają stałą b'_p 0,1459. Jest on prawdopodobnie cechą dojrzałego, w pełni sprawnego ustroju, a więc takiego, jaki posiadały psy z grupy 71 doświadczeń spoczynkowych. Składnik ten nie zostaje wywołany większą „przepuszczalnością“ nerek dla glikozy, gdyż ilość glikozy w moczu stoi w tej grupie danych w takim

samym stosunku do glikozy we krwi jak w doświadczeniach spoczynkowych (por. dalsze doniesienia).

Obecność składnika drugiego jako jedyne go można stwierdzić także w zespole krzywej *C* z rys. 5 (Tabl. 7), której stała b_p wynosi 0,1431, a prosta przechodzi przez zero. Nie można go odszukać w grupie krzywej *B* z rys. 5 (Tabl. 6), gdyż stała b'_p tej grupy (Tabl. 9) jest wyższa (0,1580) z tego powodu, że próbki krwi pobrano po 28 min., a nie po 30 min. trwania doświadczenia. W krzywej *D* rys. 5 stała b_p jest wybitnie wyższa (0,2013), niż u innych, gdyż są to wyniki uzyskane u osobników starych ze zmianami nerkowymi, co jednak nie przeszkodziło w pojawieniu się w nich niewielkiego składnika pierwszego. Nie jest jednak wykluczone, że i osobniki, z których uzyskano krzywą *D* wykazałyby wyraźny składnik drugi, gdyby wykonano na nich porównawczo także doświadczenia spoczynkowe. Mogłyby one bowiem wtedy dać stałą b_p wyższą, niż uzyskana podczas pracy, a wtedy stała b'_p podczas pracy byłaby niższa, choć w porównaniu z wzorcowymi spoczynkowymi doświadczeniami byłaby jeszcze wysoka.

Ocenił na pierwszy rzut oka właściwości obu składników zdają się być odmienne. Przede wszystkim składnik pierwszy posiadać może wybitne natężenie, nawet przy niskim dowozie glikozy. Nie wymaga więc porównania ze spoczynkowymi wartościami. Jest wyraźny, niedwuznaczny, gdyż występuje przy niepodniesionym stężeniu cukru we krwi. Jeżeli jest zależny od prawa mas-stężeń (nawet najmniejsze ilości glikozy we krwi muszą przecież temu prawu podlegać), musi to być zależność bardzo czuła, tak że już nieznaczna zmiana w stężeniu doprowadza do znikania poważnych ilości glikozy (por. podobieństwo do parcia CO_2). Natomiast składnik drugi bardzo skąpy i trudno dostrzegalny działa przy jawnie zwiększającym się stężeniu glikozy we krwi.

Niekoniecznie jednak to mało wyraźne zwiększenie odpływu glikozy w związku z pracą ze krwi przecukrzonej należy uznać za jedyny sposób przysporzenia paliwa mięśniom w obecności jego nadmiaru. Znaczna stosunkowo chłonność tkanki mięśniowej dla glikozy, jaką objawiają mięśnie podczas pracy bez przecukrzenia w pierwszej półgodzinie mogłaby wzmacniać się przy wystąpieniu przecukrzenia w znacznie większym stopniu, niż na to wskazuje składnik drugi. Mięśnie ciężko pracujące zagarniałyby znaczną ilość glikozy, odbierając ją innym narządom. Wtedy oznaczonym stężeniom wzrastającego cukru we krwi odpowiadałoby zupełnie odmienne rozmieszczenie wprowadzanego podłoża pomiędzy narządy, niż to się dzieje w spoczynku. Narządy ciężko pracujące byłyby w uzyskaniu glikozy uprzywilejowane tak, jak są uprzywilejowane w udziale w nich krążenia, dopływu O_2 , odpływu przetworzyny itd. Istniałoby ono nie tylko

bez przecukrzenia, jako składnik pierwszy, ale także podczas przecukrzenia.

Gdyby jednak tak było i usuwanie glikozy przez mięśnie przy przecukrzeniu w pierwszej półgodzinie dowozu i pracy było nieproporcjonalnie większe, niż innych narządów, musiałby także cukier we krwi spaść znacznie więcej, niż to odpowiada składnikowi drugiemu. Dlatego raczej należy przypuścić, że zasadniczą przewagę tkanki mięśniowej w usuwaniu glikozy ze krwi daje tylko składnik pierwszy i to już bez wystąpienia przecukrzenia. Składnik drugi powiększa usuwanie tylko w stosunkowo małym stopniu.

Ostateczne rozstrzygnięcie, w jakiej mierze składnik drugi istotnie zachodzi, dałoby wykonanie wielopunktowych oznaczeń gromadzenia się glikozy we krwi w czasie okresu zapoczątkowania u jednego i tego samego osobnika w spoczynku i podczas pracy. Tego dotąd nie uczyniono.

Podany zespół doświadczeń nie pozwala ocenić, czy składnik drugi zależy od natężenia pracy, czy zatem przy przecukrzeniu usuwanie jest tym większe, im praca jest cięższa. Nie pozwala również na wnioski co do rodzaju sił, ułatwiających znikanie glikozy ze krwi podczas pracy mięśniowej.

6. Rytm przystosowania zaczynowego na tle kinetyki zapoczątkowania podczas pracy

Już w pierwszych doniesieniach o przetwarzaniu heksoz wprowadzanych jednostajnie dożylnie podczas wysiłków fizycznych wykryto, że ułatwienie przetwórcze usuwania dowożonej glikozy przez mięśnie pracujące da się wyraźnie oddzielić od zwiększenia zużycia glikozy, cechującego fazę II [13, 52], tak znamienne występującego również w spoczynku [46, 56, 57, 58, 47]. Obok wszelkich innych zjawisk kinetycznych należy się liczyć w początkowym okresie dowozu glikozy z procesem przystosowania się enzymatycznego do glikozy z zewnątrz dostarczanej. Organizacja enzymatyczna zdaje się być nastawiana przez częste wzmaganie się stężenia glikozy w żyłach wrotnej w związku z posiłkami [24]. Wybiórczość tego procesu jest tak znaczna, że nawet gdy szczurowi wprowadzać w pokarmie przez parę dni fruktozę, jako wyłączny węglowodan, ustrój jego traci przystosowanie enzymatyczne do glikozy [24]. Utracie przystosowania towarzyszą istotnie zmiany w działalności enzymatycznej tkanek [45].

Gdy po dłuższej przerwie w dowozie ciał podtrzymujących adaptację enzymatyczną do glikozy (np. po 10-dniowym głodzie), wprowadzać dożylnie jednostajnie glikozę, otrzymuje się po pewnym okresie wlewania polepszenie się zużycia wprowadzanej glikozy. Można w nim wyodrębnić

dwa kolejno po sobie następujące okresy, widoczne z protokołów doświadczeń dawniej uzyskanych [46]:

a) *Okres częściowego, szybszego polepszania przetwarzania:* Krzywe cukrowe (we krwi i w moczu) z początku podnoszą się stopniowo aż do szczytu, który występuje po około 7 godzinach dowozu glikozy (faza I). Następnie krzywe cukrowe opadają w ciągu około 8 godzin, co można nazwać fazą II. Po fazie II krzywe cukrowe nie osiągają jednak jeszcze poziomu, który cechuje ustrój zaadaptowany do przetwarzania glikozy. (Oznaczenie faz jest nieco odmienne, niż niegdyś zastosowane, gdyż natomiast [46] nazwano fazą I to, co obecnie nosi miano fazy I i II.)

b) *Okres dalszego powolnego polepszania się przetwarzania:* Podczas dalszego jednostajnego dowozu glikozy po 10-dniowym głodzie powoli, w ciągu dni, wśród falowań krzywe dalej opadają, ale znacznie wolniej, niż w okresie fazy II. Powrót do przetwarzania pełnego po głodzie mimo podawania glikozy trwa szereg dni [8a].

Ten dwuokresowy przebieg polepszania się zużycia glikozy należy, być może w znacznej mierze, przypisać adaptacji enzymatycznej i po głodzie, okres a) zwłaszcza, nie przedstawia wątpliwości. Niewątpliwie oba okresy mogą być powiązane z działaniem hormonów i wzajemnym wpływem na siebie działań hormonalnych i adaptacji, co należy podkreślić.

Wykazano [46, 47], że przy stopniowo wzrastającym dowozie węglowodanów i białka w diecie, poprzedzającej jednostajny dowóz glikozy, można w sposób ciągły przeprowadzić u spoczywającego psa ciężką postać odczynu, znamiennej dla „cukrzycy głodowej“ poprzez wszystkie kształty pośrednie aż do najłżejszych form fazy I i II (tzn. bardzo krótko trwających i o małym nasileniu), jakie pojawiają się po diecie nr 1 lub nr 3 w obecnych badaniach. W tych dwu dietach węglowodan stanowił obfite, choć nie jedyne, źródło ciepła, a w diecie nr 1 tłuszcz brał udział w wysokości 40% [51]. Ostatni posiłek podawano na 24 godziny przed doświadczeniem. Zwierzę mogło więc wykazywać niewielkie postaci utraty przystosowania zaczynowego do przetwarzania glikozy. Jak wykazano, fruktoza posiada odmienny przebieg procesu przystosowania zaczynowego [46, 56, 57, 58, 55, 53, 61, 59], w którym nie występuje faza I i II. Galaktoza w obranych warunkach przygotowania dietetycznego zdaje się nie wykazywać w ogóle przystosowań enzymatycznych [46, 56, 57, 58, 54, 60].

W obecnych badaniach przebieg poprawy przetwarzania podczas spoczynku widać na rys. 8 (przykład niezbyt wzorowy, gdyż zwierzę miało ruję, ale w okresach międzyrujowych spotykano podobne odczyny). Pierwszą składową, szybko przebiegającą, stanowi faza II, trwająca do 20 minuty drugiej godziny dowozu glikozy, dostrzegalna we krwi i w moczu. Druga składowa, powolna, trwa do końca dowozu glikozy i polega na powolnym, jednostajnym opadaniu krzywych cukrowych. Na części spo-

czynkowej rys. 2 część szybsza trwa do połowy trzeciej godziny wlewania glikozy i jest widoczna we krwi i w moczu, część dalsza, powolna, objawia się tylko w spadku cukromoczu. We krwi spadek nie jest wyraźnie dostrzegalny.

Podczas pracy występują szczególnie wyraźnie dwie składowe poprawy przetwarzania glikozy na rys. 7A. Szybsza składowa, w postaci fazy II, trwa do końca pierwszej godziny pracy i dowozu glikozy. W ciągu dalszych 4 godzin doświadczenia zarysowuje się powolniejsza składowa, która jest podobna jak dla spoczynku na rys. 8. Na rys. 7B nie uwydatnia się wybitniej składowa szybsza (faza II); w sposób zamazany zdaje się ona przechodzić w składową powolną. Na rys. 2, w części odnoszącej się do pracy, obie składowe mają słabe natężenie: faza II kończy się przy końcu pierwszej godziny pracy i dowozu, poczem w ciągu czterech godzin zaznacza się składowa powolna. Na rys. 6 występuje wyraźnie tylko składowa szybka w postaci fazy II, trwającej do końca pierwszej godziny dowozu, natomiast składowej powolnej nie można się doszukać.

Na podstawie samego tylko podobieństwa przebiegu krzywych cukrowych podczas pracy i w spoczynku, w części odnoszącej się do składnika powolnego, nie podobna jeszcze wnosić o tożsamości procesów, których są one odblaskiem. Powolna składowa poprawy zużycia glikozy może mieć podczas ciężkiej pracy odmienne pochodzenie, niż w spoczynku, lub może zostać przysłonięta przez inne procesy. Podczas pracy występuje bowiem, jako dodatkowy czynnik, potęgujące się ułatwienie dojścia glikozy do wnętrza komórek mięśniowych. Również przebieg zaopatrywania ustroju w hormony może być zmieniony. Nawet zarys szybkiej składowej procesu adaptacji (faza II) ulega zmianom. Zjawiska wymagają więc dalszego rozbioru.

Zarys szybkiej składowej procesu adaptacji, skrócony podczas pracy, wystąpiłby wyraźniej, gdyby oznaczenia cukru we krwi i w moczu wykonywano w częstszych odstępach czasu. Wtedy możnaby dokładniej uchwycić szczyt i dół fali cukru we krwi i w moczu, jak uczyniono to na rys. 8. Oznaczenia, wykonane co pół godziny podczas pracy, jak w tabl. 5—8, pozwalają tylko na przybliżoną ocenę różnicy między szczytem fazy I a najniższym punktem fazy II. W tablicach tych występuje wyższe stężenie cukru we krwi w połowie pierwszej godziny pracy i dowozu glikozy, niż przy końcu tej godziny, gdy dowóz glikozy nie dochodzi do zbyt wielkiego natężenia. W różnicy tych dwu poziomów cukru we krwi udaje się stwierdzić ważne zjawisko. Tylko wtedy mianowicie opada (lub nie wzrasta) stężenie cukru we krwi przy końcu pierwszej godziny pracy i dowozu, gdy stężenie uzyskane po pierwszych 30 minutach, a więc w okresie nazwanym okresem zapoczątkowania, nie prze-

kracza poziomu, wysycającego układy enzymatyczne heksokinazy w obecności insuliny. Widać to z następujących spostrzeżeń:

Za kres występowania fazy II podczas pracy uznano taką najwyższą prędkość dowozu i takie najwyższe stężenie cukru we krwi, przy którym wartość przy końcu pierwszej godziny dowozu była już niemal taka sama jak w połowie pierwszej godziny. W ten sposób faza II znika w tabl. 5 przy około 600 mg/100 ml ($V_i = 166,3$ g na $m^2/\text{godz.}$), w tabl. 6 przy około 700 mg/100 ml ($V_i = 135,5$), w tabl. 7 przy około 600 mg/100 ml ($V_i = 114,0$) i w tabl. 8 przy około 600 mg/100 ml ($V_i = 101,8$).

Już prędkości dowozu, które się przy tym objawiają, posiadają wymowę przez swe stopniowanie. Podczas pracy II (Tabl. 5) zrównanie obu poziomów cukru we krwi (połowa i koniec pierwszej godziny dowozu) odbywa się przy najwyższej V_i (166,3), zaś przy pracy I (Tabl. 6) przy $V_i = 135,5$, a więc przy prędkości dowozu jeszcze dość wysokiej. Natomiast w tabl. 7 u psa P7 (którego zmiana minutowa w stosunku do V_i przechodziła przez skrzyżowanie osi) zrównanie obu poziomów wystąpiło przy V_i 114,0. Wreszcie u najgorzej przetwarzających i wydalających glikozę osobników z tabl. 8 (krzywa D Rys. 5) V_i wynosi zaledwie 101,8 g na $m^2/\text{godz.}$ W ten sposób przy znikaniu fazy II grupy osobników lub poszczególne osobniki ustawiają się w taką samą hierarchię, jaka istniała już podczas okresu zapoczątkowania.

Gdy kres występowania fazy II zostaje przekroczony, glikoza we krwi przy końcu pierwszej godziny już tylko powolniej lub szybciej wzrasta, zależnie od V_i . Podobnie dzieje się zresztą i w spoczynku [47], tylko dno fazy II często zachodzi później, niż przy końcu pierwszej godziny. Zniknięcie fazy II nie jest zresztą ostre. Można bowiem dostrzec jeszcze przy nieco wyższych V_i , niż te, które doprowadzają do kresu fazy II, że od połowy do końca pierwszej godziny dowozu stężenie cukru we krwi podnosi się łagodniej, niż w dalszych [47]. Oznacza to, że poziom graniczny cukru we krwi, przy którym zaciera się faza II należałoby przesunąć nieco powyżej 700 mg/100 ml.

7. Porównanie i zespolenie mechanizmów przetwórczych

Przedstawione wyniki pozwalają na rozważenie dwóch tylko urządzeń przetwórczych spośród wielu, które występują podczas pracy i dożylnego karmienia glikozą z różnymi prędkościami:

a) Pierwsze z nich to składniki kinetyczne usuwania glikozy przez pracujące mięśnie i przez układy stojące z nimi w związku.

b) Drugimi są składowe procesy adaptacji enzymatycznej do przetwarzania glikozy, sprzężone z działalnością hormonów, a przede wszystkim

insuliny, której wydzielanie i wyrzucanie do krwi zapewne powiększa się w miarę trwania dopływu glikozy z zewnątrz.

Podobieństwa i różnice obu tych wysoce zresztą złożonych działań są następujące:

Badana cecha	Składniki kinetyczne związane z pracą (c_p)	Szybka składowa adaptacji enzymatycznej (faza II)
Poziom i sposób działania	Składnik c_p (składnik drugi?) polega na ułatwieniu dostępu glikozy poprzez „błony“ komórek mięśniowych do ich wnętrza, zanim zadziała heksokinaza. Ostatecznym kresem działania jest jednak pełne obsadzenie heksokinazy przez podłoże. Poniżej granic wysycenia mechanizm niejasny [21, 42].	Zespół enzymatyczny heksokinazy. Faza II gubi się, gdy stężenie glikozy we krwi przekroczy obszar wysycenia enzymu podłożem.
Umiejscowienie w narządach	Mięśnie szkieletowe	Działa w całym ustroju, ale głównie w wątrobie, której komórki zdają się nie posiadać urządzeń zmieniających przepuszczalność komórek przed zadziałaniem heksokinazy [5].
Przebieg procesu	Zaczyna działać od pierwszej chwili pracy i jest rozwinięty wyraźnie po pierwszej półgodzinie pracy.	Poczyna działać wyraźnie dopiero po około półgodzinnym dowozie (faza II).
Wobec insuliny	Niezależny od insuliny, dodaje się do jej działania [29, 19].	Nie zależy od insuliny, która polepszająco wpływa na przetwarzanie podczas fazy I, ale pogarszająco podczas fazy II, aż do wysycenia enzymatycznego [56, 57, 58, 46, 43]. Powyżej tej granicy insulina zwiększa tylko „przestrzeń“, w której rozmieszcza się glikoza (nie ogłoszone) [38].
Inne podłoża: fruktoza	Nie ma wpływu na usuwanie fruktozy ze krwi [13, 52, 19, 25].	Adaptacja do fruktozy jest co do nasilenia podobna jak do glikozy. Ale fruktoza nie daje początkowego wychylenia fazowego krzywych cukrowych (fazy II) [56, 57, 58, 46, 53].

Kolejność zjawisk w ciągu pierwszej godziny dowozu glikozy i pracy przedstawia się jak następuje:

1) W okresie zapoczątkowującym (pierwsze 30 minut) działa najpierw pierwszy składnik kinetyczny pracy, poczem przyłącza się drugi. Ale

enzym w pewnej mierze nie jest jeszcze zaadaptowany. Glikoza wchodzi do wnętrza komórek mięśniowych, ale nie może jeszcze być w pełni przekształcana w tej mierze, w jakiej się przedostaje. Dochodzi więc do gromadzenia się jej w płynach zewnątrzkomórkowych w postaci narastania fazy I. Ustrój odnosi jednak pewną korzyść ze zwiększonego wciskania się glikozy do wnętrza komórek wskutek działania pracy, czego wynikiem jest zużycie tego cukru bez działania przecukrzenia. Zapewne w związku z brakiem pełnej adaptacji przychodzi do liniowego wzrostu stężenia cukru we krwi, gdy zwiększony dostęp do komórek zostanie zaspokojony. Przecukrzenie może jeszcze bardziej ułatwić ucieczkę glikozy ze krwi do mięśni.

2) *W drugiej połowie pierwszej godziny:* na powiększające się działanie obu składników kinetycznych związanych z pracą nakłada się szybsza składowa procesy adaptacji, przyspieszona nieco przez pracę. Dopiero więc w pewien czas po otwarciu błon komórkowych dla glikozy w związku z pracą rozwija się pełna czynność enzymatyczna. Gdy dowóz glikozy zostanie doprowadzony do prędkości, która wysyca czynne punkty enzymu, wtedy ułatwienie przetwórcze osiąga szczyt. Jest on sumą polepszenia pracy enzymatycznej przez szybszy składnik adaptacyjny i tych ułatwień przetwórczych, które daje praca mięśniowa.

Zmiany w przebiegu fazy I i II podczas pracy, a mianowicie zmniejszenie bezwzględnej wysokości szczytu fazy I, przyspieszenie wystąpienia najniższego punktu fazy II i zmniejszenie różnicy między szczytem fazy I a dnem fazy II można przypisać:

a) pierwotnemu zadziałaniu pracy mięśniowej u źródeł powstania fazy I i II w odcinku układu mięśni szkieletowych w postaci np. przyspieszenia utworzenia odnośnych enzymów, co jest może mniej prawdopodobne;

b) wtórnemu wpływowi obu sposobów przyspieszonego usuwania glikozy ze krwi podczas pracy na niezależnie powstałe wychylenie krzywych cukrowych, wywołane procesem adaptacji (możliwość bardziej prawdopodobna);

c) splotowi obu czynników.

WNIOSKI OGÓLNE

Podczas pierwszej półgodziny ciężkiej pracy mięśniowej wzmożone znikanie glikozy ze krwi daje się rozbić na dwa odrębne procesy:

Pierwszy z nich może się odbywać przy prawidłowym stężeniu glikozy we krwi i nie ustaje przy stężeniach wyższych. Pozornie przynajmniej zdaje się nie podlegać prawu mas-stężen.

Drugi natomiast zależy wyłącznie od stężenia glikozy we krwi, a zatem prawu mas- σ żeń w pełni podlega. Przeciwnie niż poprzedni, przy mniejszych stężeniach glikozy we krwi mało widoczny, potężnieje przy wyższych i wreszcie natężeniem dorównywa pierwszemu.

Nawet wybitne wzmoczenie czynności mięśni szkieletowych i zużycia przez nie glikozy nie wstrzymuje wystąpienia w ustroju procesu adaptacji enzymatycznej do tego podłoża.

Niniejsze doniesienie przygotowano do druku dzięki zasiłkowi udzielonemu przez Wydział VI Nauk Medycznych Polskiej Akademii Nauk.

STRESZCZENIE

Zasady kinetyki zapoczątkowującego wysycania zastosowano do ciężkiej pracy mięśniowej psów (♀) biegnących pod górę w bieżni obrotowej, którym przez żyłę wprowadzano jednostajnie glikozę z zastosowaniem rozległej skali prędkości dowozu (1—12 g na kg/godz., 19,3—230,9 g na $\text{m}^2/\text{godz.}$). Wyniki porównywano z kontrolnymi badaniami w spoczynku w podobnych warunkach dowozu.

Graficznie przyrost glikozy we krwi, wyznaczony na osi rzędnych wobec dowozu glikozy na osi odciętych daje prostą, której przebieg pozwala na wyodrębnienie dwu składników spotęgowanego przez pracę usuwania glikozy ze krwi:

1. Prosta, przesuwając się na prawo od zera współrzędnych wyznacza na osi odciętych, ile glikozy można wprowadzić, nie podnosząc stężenia glikozy we krwi *V. jugularis ext.* Wartość ta jest prawdopodobnie proporcjonalna do natężenia pracy. Nie zostaje wywołana przez odwodnienie, które ujawnia się wskutek znacznego przeziwu niewyczuwalnego. Posiada swoisty, lecz niewyjaśniony dotąd mechanizm.

2. Dopiero, gdy bez przecukrzenia mięśnie nie potrafią pobrać więcej glikozy, pojawia się wzmoczenie pobierania towarzyszące przecukrzeniu krwi. Wyraża się ono zmniejszeniem nachylenia prostej do osi dowozu szczególnie widocznym przy ciężkiej postaci pracy. Gromadzenie się glikozy we krwi jest wtedy o 16% mniejsze, niż w spoczynku. Istota tego sposobu wzmoczonego pobierania glikozy podczas pracy może być odmienna, niż składnika 1), lecz istnienie jego musi zostać potwierdzone.

Przy pomocy tych dwu składników kinetycznych odczyn każdego osobnika podczas pracy daje się dobrze określić już w pierwszej półgodzinie doświadczenia. Proste bowiem utworzone poprzez wyniki kilku odległych od siebie prędkości dowozu: a) już to przechodzą przez punkt zerowy,

b) już to w większej lub mniejszej odległości na prawo od niego (składnik 1). Mogą przy tym posiadać nachylenie: c) mniejsze, niż w spoczynku (składnik 2), d) takie jak w spoczynku lub e) większe (osobniki stare z niewydolnością nerek i przetwarzania).

Zarówno w spoczynku, jak podczas pracy rozcieńczenie osocza w połowie pierwszej godziny dowozu jest większe, niżby można oczekiwać z bilansu wody całego ustroju. Stoi to prawdopodobnie w związku z wciąganiem do krwi wody z tkanek oraz niedość szybkim usuwaniem wstrzykniętej wody przez nerki.

Stała proporcjonalności między dowozem a wywołanym przez nie stężeniem glikozy we krwi zdaje się nie zależeć od stopnia równoczesnego rozcieńczenia osocza ani podczas pracy, ani w spoczynku.

Dopiero pomiędzy połową a końcem pierwszej godziny dowozu pojawia się na tle zmian kinetycznych wywołanych pracą zwiększenie usuwania glikozy ze krwi wskutek przystosowania enzymatycznego do glikozy. Ma ono odmienne zależności, niż składniki kinetyczne sprzężone z pracą. Jakkolwiek zarys fali krzywych cukrowych w postaci fazy II, odpowiadającej szybkiej składowej zjawiska adaptacji, zostaje przez pracę nieco zmieniony, zasadniczo występuje on w postaci podobnej jak w spoczynku i w podobny też sposób zanika, gdy stężenie glikozy przekroczy poziom, który wysycia miejsca czynne enzymu.

L I T E R A T U R A

- [1] Albrink M. J., Fitzgerald J. R., Man E. B., *Metabolism* 7, 162, 1958.
- [2] Atzler E., *Ergeb. Physiol.* 40, 325, 1938; 41, 164, 1939.
- [3] Barcroft H., Dornhorst A. C., *Blood flow response and other factors in Peripheral circulation in man*, A Ciba Foundation Symposium, wyd. Wolstenholme G. E. W. i Etherington J., 122, 1954.
- [4] Barger A. C., Richards V., Metcalfe J., Günther B., *Am. J. Physiol.* 184, 613, 1956.
- [5] Cahill G. F., Ashmore J., Earle A. S., Zottu S., *Am. J. Physiol.* 192, 491, 1958.
- [6] Cahn T., *La régulation des processus métaboliques dans l'organisme*. Presses Universitaires de France, Paris 1956.
- [7] Campbell W. R., Hanna M. I., *J. Biol. Chem.* 69, 703, 1926.
- [8a] Chambers W. H., *Physiol. Rev.* 18, 248, 1938.
- [8b] Christensen E. H., Hogberg P., *Arbeitsphysiol.* 14, 292, 1950.
- [9] Colowick S. P., Cori G. T., Slein M. W., *J. Biol. Chem.* 168, 583, 1947.
- [10] Conard V., *Mesure de l'assimilation du glucose*. *Acta Medica Belgica*, 1955.
- [11] Dill D. B., Edwards H. T., Talbott J. H., *J. Physiol.* (London) 77, 49, 1932.
- [12] Euler U. S. von, *Noradrenaline*, C. C. Thomas, Springfield, Illinois, 290, 1956.
- [13] Fiszal H., Chmielewski T., Lapidus M., Wierzuchowski M., *Pamiętnik XIV Zjazdu Lekarzy i Przyrodników Polskich w Poznaniu* 2, 380, 1933.
- [14] Friedemann T. E., Cotonio M., Shaffer P. A., *J. Biol. Chem.* 73, 335, 1927.
- [15] Friedemann T. E., Kendall A. I., *J. Biol. Chem.* 82, 23, 1929.
- [16] Fritz I., *Acta Physiol. Scand.* 34, 367, 1955.

- [17] Fuchs H. J., *Z. physiol. Chem.* **221**, 271, 1933.
- [18] Genes S. G., *Uspechy Sowremennoj Biologii* **45**, 150, 1958.
- [19] Goldstein M. S., Mullick V., Huddlestun B., Levine R., *Am. J. Physiol.* **173**, 212, 1953.
- [20] Helmreich E., Cori C. F., *Some problems of the permeability of tissue cells to sugars*, w dziele *Internal Secretions of the Pancreas*, wyd. Wolstenholme G. E. W. i O'Connor C. M. Ciba Foundation Colloquia on Endocrinology **9**, 227, 1956, Churchill, London.
- [21] Helmreich E., Cori C. F., *J. Biol. Chem.* **224**, 663, 1957.
- [22] Heymans C., Bouckaert J. J., Wierzuchowski M., *Arch. Internat. Pharmacodyn. Thérap.* **55**, 233, 1937.
- [23] Hill A. V., *Muscular Activity*, Williams and Wilkins, Baltimore, 1926.
- [24] Hill R., Baker N., Chaikoff I. L., *J. Biol. Chem.* **209**, 705, 1954.
- [25] Huycke E. J., Kruhøffer P., *Acta Physiol. Scand.* **34**, 232, 1955.
- [26] Ingle D. J., Morley E. H., Stetten D. Jr., *Am. J. Physiol.* **182**, 263, 1955.
- [27] Ingle D. J., Nezamis J. E., *Am. J. Physiol.* **155**, 15, 1948.
- [28] Ingle D. J., Nezamis J. E., Morley E. H., *Am. J. Physiol.* **160**, 506, 1950.
- [29] Ingle D. J., Nezamis J. E., Morley E. H., *Am. J. Physiol.* **165**, 469, 1951.
- [30] Kouwenhoven W. B., Starzl T. E., Baker B., *J. Appl. Physiol.* **7**, 347, 1954.
- [31] Krahl M. E., Cori C. F., *J. Biol. Chem.* **170**, 607, 1947.
- [32] Lossow W. J., Chaikoff I. L., *Arch. Biochem. Biophys.* **57**, 23, 1955.
- [33] Lundsgaard E., *Biochim. Biophys. Acta* **4**, 322, 1950.
- [34] Lusk G., *The Elements of the Science of Nutrition*, III wydanie, Philadelphia-London, Saunders Co., 1917.
- [35] Mitchell H. H., Hamilton T. S., *J. Agric. Research* **52**, 837, 1936.
- [36] Müller E. A., *Pflügers Arch. ges. Physiol.* **265**, 429, 1958.
- [37] Newburgh L. H., Johnston M. W., *Physiol. Rev.* **22**, 1, 1942.
- [38] Park C. R., Bornstein J., Post R. L., *Am. J. Physiol.* **182**, 12, 1955.
- [39] Park C. R., Johnson L. H., Wright J. H. Jr., Batsel H., *Am. J. Physiol.* **191**, 13, 1957.
- [40] Peters J. P. and Van Slyke D. D., *Quantitative Clinical Chemistry Interpretations*, t. 1, Williams and Wilkins, Baltimore, 1946.
- [41] Raymond A. L., Blanco J. G., *J. Biol. Chem.* **79**, 649, 1928.
- [42] Sacks J., Smith J. F., *Am. J. Physiol.* **192**, 287, 1958.
- [43] Strack E., Balzer E., Gminder E., *Ber. math.-phys. Kl. sächs. Akademie Wissensch. Leipzig* **89**, 349, 1937.
- [44] Taylor H. L., Buskirk E., Henschel A., *J. Appl. Physiol.* **8**, 73, 1955.
- [45] Tepperman H. M., Tepperman J., *Am. J. Physiol.* **180**, 511, 1955.
- [46] Wierzuchowski M., *Acta Biologiae Exper. (Polon.)* **6**, 251, 1931; *Biochem. Z.* **237**, 92, 1931; *Biochem. Z.* **237**, 103, 1931.
- [47] Wierzuchowski M., *Journ. Physiol. (London)* **87**, 311, 1936; **90**, 440, 1937; **91**, 140, 1937; *Acta Biologiae Exper. (Polon.)* **12** (supl.), 77, 1938; PAU, *Rozpr. Wydz. Lek.* **12**, 221, 1952.
- [48a] Wierzuchowski M., PAU, *Rozpr. Wydz. Lek.* **13**, 177, 1952.
- [48b] Wierzuchowski M., PAU, *Rozpr. Wydz. Lek.* **13**, 219, 1952.
- [49] Wierzuchowski M., PAU, *Rozpr. Wydz. Lek.* **13**, 254, 1952.
- [50] Wierzuchowski M., *Bull. Acad. Polon. Sci. Série des Sci. biol.* **6**, 93, 1958.
- [51] Wierzuchowski M., *Acta Biochim. Polon.* **5**, 93, 1958.
- [52] Wierzuchowski M., Chmielewski T., Gostyńska A., Fiszal H., *C. R. Soc. Biol.* **119**, 433, 1935.

- [53] Wierzuchowski M., Fiszal H., *C. R. Soc. Biol.* **120**, 377, 1935.
- [54] Wierzuchowski M., Fiszal H., *Acta Biologiae Exper. (Polon.)* **9**, 292, 1935; *Biochem. Z.* **282**, 124, 1935.
- [55] Wierzuchowski M., Fiszal H., *Acta Biologiae Exper. (Polon.)* **10**, 15, 1936; *Biochem. Z.* **283**, 30, 1935.
- [56] Wierzuchowski M., Owsiany E., *Acta Biologiae Exper. (Polon.)* **5**, 147, 1930.
- [57] Wierzuchowski M., Pieskow W., *Acta Biologiae Exper. (Polon.)* **5**, 95, 1930.
- [58] Wierzuchowski M., Pieskow W., Owsiany E., *Biochem. Z.* **230**, 146, 1931.
- [59] Wierzuchowski M., Sekuracki F., *C. R. Soc. Biol.* **119**, 661, 1935.
- [60] Wierzuchowski M., Sekuracki F., *Acta Biologiae Exper. (Polon.)* **9**, 1, 1935; *Biochem. Z.* **276**, 91, 1935.
- [61] Wierzuchowski M., Sekuracki F., *Acta Biologiae Exper. (Polon.)* **9**, 236, 1935; *Biochem. Z.* **276**, 112, 1935.
- [62] Zweifach B. W., Metz D. B., *Federation Proc.* **14**, 168, 1955.

HEAVY MUSCULAR EXERCISE AND DISAPPEARANCE OF BLOOD SUGAR DURING PRIMING WITH GLUCOSE

Summary

The principles of kinetics of priming saturation (described formerly [50, 51]) were applied to heavy muscular work of female dogs running uphill in a treadmill and nourished continuously by vein at a rate constant in each experiment varying within vast scale (1.00 to 12.00 g per kg/hr., i. e., 19.3 to 230.9 g per sq. m./hr.). The results obtained were compared with controls from resting animals supplied analogically with glucose.

The rise of blood glucose plotted as ordinate against the dosage of glucose as abscissa gives a straight line whose properties make it possible to isolate two components of the increase of blood glucose removal resulting from the action of muscular work:

1) The straight line shifted to the right from the origin of the rectangular coordinate axes (in comparison with the resting straight line) intercepts the axis of abscissae at a distance which indicates, how much glucose may be administered without raising concentration of this sugar in the blood of the jugular external vein. This amount is probably proportional to the intensity of effort. It is not attributable to dehydration, which becomes manifest owing to considerable insensible perspiration. The mechanism involved is specific but still obscure.

2) Only when the muscles are unable to take up more glucose without hyperglycaemia, there appears an increased uptake attending hyperglycaemia. It becomes manifest in the decrease of the angle between the plot and the axis of abscissae (glucose supply), which becomes especially conspicuous in the case of the heavier form of work. In this case,

accumulation of glucose in the blood is at best only 16 per cent below that in animals at rest. The nature of this form of increased glucose uptake during work may be different from that of component 1), but its existence requires further confirmation.

With the aid of the two components, the individual reaction of an organism may be determined even within a half hour experiment, since the straight lines plotted from several different rates of supply run either (a) through the zero point, or (b) more or less to the right of the latter (component 1); their inclination may be (c) smaller than in resting animals (component 2), (d) similar to that in resting animals, or (e) larger (in old specimens with insufficiency of kidneys and metabolism).

At rest as well as during work, dilution of the plasma is within the first half hour of supply above that to be expected from the water balance of the entire organism. This is likely to be connected with the draining of water from the tissues into the blood stream and lack of prompt clearance of the injected water by the kidneys.

The constant of proportionality between the supply and the resulting concentration of glucose in the blood appears to be independent from the degree of concomitant dilution of the plasma in both working and resting animals.

Only in the other half of the first hour of supply, there appears against the background of kinetic changes due to exercise, an increased removal of blood glucose (phase II) as a result of improved enzymatic adaptation to glucose. It has different dependences than the kinetic components associated with work. Muscular exercise indeed somewhat modifies the rapid component of adaptation phenomenon presenting itself in sugar curves in the shape of the phase II. Essentially, however, it appears in similar form as in resting animals and similarly, as with them, disappears when blood glucose concentration overcrosses the level at which the active enzyme centres become saturated.

Otrzymano 29.7.1958 r.

The first part of the paper discusses the general principles of the method. It is shown that the method is based on the assumption that the system is in a steady state. This assumption is valid for most practical cases. The method is then applied to the case of a simple system. The results are compared with those obtained by other methods. It is shown that the method is very accurate and simple to use. The method is then applied to the case of a more complex system. The results are compared with those obtained by other methods. It is shown that the method is very accurate and simple to use.

The second part of the paper discusses the application of the method to the case of a more complex system. It is shown that the method is very accurate and simple to use. The method is then applied to the case of a more complex system. The results are compared with those obtained by other methods. It is shown that the method is very accurate and simple to use.

The third part of the paper discusses the application of the method to the case of a more complex system. It is shown that the method is very accurate and simple to use. The method is then applied to the case of a more complex system. The results are compared with those obtained by other methods. It is shown that the method is very accurate and simple to use.

The fourth part of the paper discusses the application of the method to the case of a more complex system. It is shown that the method is very accurate and simple to use. The method is then applied to the case of a more complex system. The results are compared with those obtained by other methods. It is shown that the method is very accurate and simple to use.

The fifth part of the paper discusses the application of the method to the case of a more complex system. It is shown that the method is very accurate and simple to use. The method is then applied to the case of a more complex system. The results are compared with those obtained by other methods. It is shown that the method is very accurate and simple to use.

L. ZELEWSKI

**ZWIĄZKI FOSFOROWE ERYTROCYTÓW KRWI PĘPOWINOWEJ
I KRWI MATKI *)***Zakład Chemii Fizjologicznej Akademii Medycznej w Gdańsku**Kierownik: prof. dr Włodzimierz Mozolowski*

W erytrocytach głównym procesem energetycznym jest glikoliza; zadaniem jej jest między innymi utrzymanie różnicy stężeń jonów nieorganicznych między krwinkami a osoczem. Związek glikolizy z aktywnym transportem jonów daje się stwierdzić w zachowaniu poszczególnych estrów fosforowych krwi [19, 29]. Zmiany w związkach fosforowych erytrocytów stwierdzono w zaburzeniach gospodarki kwasowo-zasadowej [20, 7, 8, 1]; także w innych stanach chorobowych zawartość poszczególnych frakcji fosforowych ulega zmianom [2, 23, 18, 30]. Przedmiotem niniejszej pracy jest porównanie związków fosforowych erytrocytów krwi płodu i matki.

Za możliwością istnienia różnic przemawia wiele faktów. Warunki, w jakich znajdują się erytrocyty krwi płodu i matki, są odmienne; także stwierdzono istnienie takich różnic jak różna łamliwość mechaniczna [6], zwiększenie przepuszczalności błony erytrocytów płodu dla jonu potasowego [24], wreszcie krótszy okres przeżywania erytrocytów płodowych po transfuzji [10].

Ze związków fosforowych występujących w erytrocytach wybrano do oznaczenia kwas adenozynotrójfosforowy¹⁾ i kwas 2,3-dwufosfoglicerynowy oraz fosforany nieorganiczne, a ponadto fosfor całkowity i fosfor związków rozpuszczalnych w kwasach.

*) Praca była subsydiowana przez Komitet Biochemiczny Polskiej Akademii Nauk.

¹⁾ Skróty: ATP — kwas adenozynotrójfosforowy; ADP — kwas adenozynodwufosforowy; 2,3-DPG — kwas 2,3-dwufosfoglicerynowy; P_c — fosfor całkowity; P_k — związki fosforowe rozpuszczalne w kwasach; P_n — fosfor nieorganiczny.

METODY DOSWIADCZALNE

Badano krew pępowinową pobraną w czasie fizjologicznego porodu oraz krew żylną matki w czasie porodu i w dwa do sześciu dni później. Wiek matek wahał się w granicach od 20 do 26 lat. Krew z żyły łokciowej pobierano przed przecięciem pępowiny płodu stosując krótkotrwały ucisk, a z żyły pępowinowej w tym samym czasie po założeniu ucisku na pępowinę. Zapobiegano krzepnięciu krwi przez użycie heparyny w roztworze fizjologicznym soli. Czas od pobrania do chwili rozpoczęcia wirowania nie przekraczał 20 minut.

Krwinki odwirowane (10 minut przy 2500 obr./min.) przemywano po usunięciu osocza podwójną objętością roztworu fizjologicznego i wirowano ponownie (15 minut przy 3500 obr./min.). 2 ml zbitej masy krwinkowej odbiałczano rozcierając z równą objętością zimnego 20% (wag./obj.) kwasu trójchlorooctowego, następnie wirowano, płyn z nad osadu sączono i celem usunięcia kwasu trójchlorooctowego wytrząsano go trzy razy z równą objętością eteru etylowego. Uzyskany roztwór służył do rozdzielu chromatograficznego. Z pozostałej masy krwinkowej pobierano próbki dla oznaczenia fosforu całkowitego oraz suchej wagi krwinek.

Tablica 1

*Dokładność stosowanych metod analitycznych
Zawartość związków fosforowych erytrocytów krwi człowieka dorosłego w mg
fosforu na 1 g suchej masy erytrocytów*

Liczby tablicy podają wartości średnie wraz z dyspersją

Symbol	Data	Liczba oznaczeń	P_c	P_k	ATP	2,3 - DPG	P_n
Z. L.	28.V.	4	$1,25 \pm 0,03$	$0,94 \pm 0,04$	$0,179 \pm 0,015$	$0,525 \pm 0,07$	$0,073 \pm 0,04$
Z. L.	6.VI.	4	$1,24 \pm 0,04$	$1,00 \pm 0,03$	$0,167 \pm 0,015$	$0,514 \pm 0,03$	$0,076 \pm 0,01$
P. J.	8.VII.	5	$1,48 \pm 0,04$	$0,85 \pm 0,02$	$0,200 \pm 0,010$	$0,405 \pm 0,02$	$0,066 \pm 0,01$

Do rozdzielu związków fosforowych rozpuszczalnych w kwasie trójchlorooctowym stosowano chromatografię zstępującą dwuwymiarową. Używano układy podane przez Hanesa i Isherwooda [9], a mianowicie: *n*-propanol-amoniak (c. wł. 0,908)-woda 60 : 30 : 10) oraz III-rzęd. butanol-kwas pikrynowy-woda (80 ml : 4 g : 20 ml). Układy te zastosował Pranker [17] do rozdzielu estrów fosforowych krwinek. Chromatogramy rozwijano w temperaturze 20 do 22°. Bibułę Whatman Nr 4 przemywano roztworem soli sodowej kwasu etylenodwuaminoczerooctowego, a następnie sześciokrotnie wodą [4]. Nakraplano 0,1 ml płynu susząc zimnym prądem powietrza. Po rozwinięciu i wysuszeniu spryskiwano chromatogramy

Tablica 2

Związki fosforowe erytrocytów krwi pępowinowej oraz krwi żyłnej matki w okresie porodu i w kilka dni później

Wartości wyrażono w mg fosforu na 1 g suchej masy erytrocytów

Lp.	Symbol	Krew	Data	P _c	P _k	ATP	2,3 - DPG	P _n
1.	Z. R.	pępowinowa rodzącej matki	15.IV.	1,74	1,08	0,146	0,465	0,072
			15.IV.	—	1,05	0,170	0,570	0,041
			20.IV.	1,30	0,92	0,232	0,500	0,038
2.	B. W.	pępowinowa rodzącej matki	23.IV.	1,93	0,98	0,220	0,533	0,098
			26.IV.	1,55	1,10	0,238	0,600	0,071
			2.V.	1,55	1,23	0,187	0,619	0,058
3.	K. A.	pępowinowa rodzącej matki	30.IV.	1,82	0,85	0,145	0,424	0,121
			30.IV.	1,45	1,03	0,170	0,424	0,072
			6.V.	1,51	1,21	0,180	0,588	0,072
4.	G. H.	pępowinowa rodzącej matki	3.V.	1,74	1,03	0,155	0,568	0,084
			3.V.	1,68	1,10	0,155	0,600	0,052
			6.V.	1,62	1,12	0,187	0,606	0,087
5.	M. B.	pępowinowa rodzącej matki	6.V.	1,71	0,98	0,170	0,462	0,095
			6.V.	1,46	1,14	0,209	0,470	0,063
			10.V.	1,55	1,19	0,213	0,473	0,058
6.	F. I.	pępowinowa rodzącej matki	8.V.	1,69	0,94	0,138	0,393	0,069
			8.V.	1,32	1,07	0,107	0,404	0,076
			10.V.	1,48	1,10	0,130	0,406	0,030
7.	L. S.	pępowinowa rodzącej matki	14.V.	1,87	1,13	0,213	0,375	0,129
			14.V.	1,47	0,94	0,241	0,453	0,058
			19.V.	1,50	1,11	0,204	0,558	0,078
8.	H. J.	pępowinowa rodzącej matki	17.V.	2,00	1,00	0,175	0,457	0,062
			17.V.	1,70	1,03	0,200	0,442	0,070
			19.V.	1,69	1,00	0,228	0,551	0,068
9.	K. U.	pępowinowa rodzącej matki	18.V.	1,94	1,19	0,156	0,394	0,100
			18.V.	1,75	1,28	0,187	0,487	0,084
			24.V.	1,69	1,25	0,259	0,488	5,084
10.	K. T.	pępowinowa rodzącej matki	19.V.	1,81	1,12	0,206	0,394	0,081
			19.V.	1,52	1,14	0,262	0,461	0,061
			24.V.	1,69	1,19	0,212	0,500	0,081
11.	B. Z.	pępowinowa rodzącej matki	23.V.	1,80	1,05	0,170	0,465	0,121
			23.V.	1,47	1,06	0,212	0,541	0,082
			28.V.	1,69	1,19	0,269	0,580	0,087

odczynnikami Hanesa i Isherwooda i suszono w temperaturze 85° przez 8 minut. Plamy odpowiadające związkom fosforowym wywołano umieszczając chromatogramy w komorze z siarkowodorem. Na chromatogramie dobrze odgraniczały się plamy odpowiadające, równocześnie chromatografowanym, standardom: ATP, 2,3-DPG, P_n oraz 1,6-dwufosfofruktozie, a także niewyraźnie zaznaczona plama odpowiadająca zarówno 1-fosfoglikozie jak i 6-fosfoglikozie. Plamy odpowiadające standardom ADP nie udało się uwidocznnić podobnie jak niektórym autorom [22, 16]. Odpowiednie części bibuły spalano z 0,5 ml mieszaniny składającej się z trzech części 98% (wag./wag.) kwasu siarkowego i dwóch części 60% (wag./wag.) kwasu nadchlorowego i oznaczano fosfor według Berenbluma i Chaina [3]. Kolorymetrowano w aparacie Pulfricha przy użyciu filtru S₇₅.

Fosfor całkowity i rozpuszczalny w kwasach oznaczano po spaleniu krwinek względnie trójchlorooctowego wyciągu z krwinek metodą Gomori'ego [21].

Suchą wagę krwinek uzyskano po ogrzewaniu 0,6 ml masy krwinkowej w temp. 105° do stałej wagi. Wszystkie wartości wyrażono w mg fosforu na 1 g suchej wagi krwinek.

Dla zidentyfikowania plam użyto preparatów: ATP sporządzonego według Szent-Györgyiego [28] i 2,3-DPG według metody podanej przez Josta [12]. Dla upewnienia się, że inne związki fosforowe nie interferują z nimi posłużono się preparatami: ADP, 1,6-dwufosfofruktozy, 1-fosfoglikozy [26] i 6-fosfoglikozy [27]. Wszystkie standardy używane w chromatografii dawały jedną plamę; jedynie preparat ATP wykazywał niewielką domieszkę fosforanu nieorganicznego.

Dokładność stosowanych metod analitycznych sprawdzono w ten sposób, że z tej samej krwi pobrano kilka próbek, które oddzielnie wirowano, myto i przeprowadzono przez wszystkie etapy analizy. Takie serie oznaczeń wykonano trzy razy. Wyniki podaje tablica 1.

WYNIKI

Wyniki przeprowadzonych oznaczeń zebrano w tablicach 2 i 3. Stwierdza się daleko idącą zgodność stężenia badanych związków w erytrocytach krwi matki w czasie porodu i kilka dni później. Różnice w składzie erytrocytów różnych osobników są stosunkowo wielkie. Nie jest to wynikiem wyłącznie niedokładności metody, o czym świadczą dane tablicy 1. Ma się wrażenie istnienia wielkich różnic indywidualnych. Do podobnego wniosku dochodzi Whittam [29] zestawiając dane z piśmiennictwa o zawartości estrów fosforowych w erytrocytach krwi ludzi dorosłych. Dlatego, z porównania średniej wartości dla krwi pępowinowej z wartościami krwi matki, można by wyciągnąć zdecydowane wnioski jedynie w razie istnie-

nia jednokierunkowych i stosunkowo dużych różnic. Takie statystycznie istotne różnice stwierdzono jedynie dla fosforu całkowitego (Tabl. 3). Dla fosforu związków rozpuszczalnych w kwasach oraz dla wszystkich trzech badanych frakcji różnice nie są statystycznie istotne.

Tablica 3

Porównanie zawartości związków fosforowych krwi pępowinowej z krwią żylną matki w czasie porodu i w kilka dni później

Wartości średnie wraz z dyspersją dla 11 serii oznaczeń (podanych w tablicy 2); wartości wyrażono w mg fosforu na 1 g suchej masy erytrocytów

Krew	P _c	P _k	ATP	2,3 - DPG	P _n
pępowinowa	1,81 ± 0,10	1,03 ± 0,10	0,172 ± 0,03	0,448 ± 0,060	0,094 ± 0,022
matki w czasie porodu	1,54 ± 0,13	1,09 ± 0,08	0,196 ± 0,045	0,496 ± 0,070	0,066 ± 0,015
matki kilka dni później	1,57 ± 0,12	1,14 ± 0,10	0,210 ± 0,040	0,534 ± 0,065	0,070 ± 0,015

DYSKUSJA

Dane piśmiennictwa o związkach fosforowych erytrocytów krwi pępowinowej są skąpe i częściowo sprzeczne ze sobą. Stearns i Warweg [25] badając związki fosforowe erytrocytów krwi ludzi w różnym wieku (od urodzenia do 25 lat) stwierdzają, że u noworodków poziom fosforu całkowitego, a także rozpuszczalnego w kwasach, jest wyższy niż u dorosłych. Greenwalt i Ayers [5] natomiast znajdują, że erytrocyty krwi pępowinowej mają w porównaniu z krwinkami ludzi dorosłych niższy poziom fosforu rozpuszczalnego w kwasach, a mianowicie frakcji łatwo hydrolizującej i niehydrolizującej przy wzroście fosforanów nieorganicznych. Kutās i Stutzel [15] zaś wykazują, że w odniesieniu do organicznego fosforu rozpuszczalnego w kwasach brak istotnych różnic między erytrocytami krwi noworodków i ludzi dorosłych. Podane badania porównujące związki fosforowe erytrocytów krwi pępowinowej i matki stwierdzają: 1) wyższy poziom fosforu całkowitego krwi pępowinowej, 2) brak istotnych różnic w zawartości fosforu rozpuszczalnego w kwasach. W odniesieniu do związków fosforowych o szczególnym znaczeniu w przemianach erytrocytów, tj. ATP i 2,3-DPG, nie wykazano w tej pracy istnienia różnic między krwią pępowinową a krwią matki. Trudność wyciągnięcia zdecydowanego wniosku jest spowodowana wielkim rozrzutem wartości, który może być wywołany zarówno różnicami indywidualnymi, jak i niejednorodnością badanego materiału biologicznego. Zarówno bowiem liczba retikulocytów, jak i białych krwinek [14], a wreszcie różnice związane

z wiekiem erytrocytów układających się w różnych warstwach podczas wirowania [13], mogą przyczynić się istotnie do zwiększenia rozrzutu wszystkich wyników. Zaobserwowany w erytrocytach płodowych wzrost związków fosforowych nierozpuszczalnych w kwasie trójchlorooctowym może zależeć od różnic w ich budowie. Zwrócenie uwagi na jednolitość materiału dokładnie scharakteryzowanego także morfologicznie mogłoby tu zapewne dać ściślejszą odpowiedź.

Kierownikowi Zakładu Prof. Dr W. Mozołowskiemu dziękuję za pomoc i rady udzielone podczas wykonywania tej pracy.

Prof. Dr I. Mochnackiej dziękuję za otrzymane estry fosforowe oraz za cenne uwagi, dotyczące preparatyki estrów fosforowych.

STRESZCZENIE

W erytrocytach krwi pępowinowej oraz krwi żyłnej matki w czasie porodu i w kilka dni później oznaczono: fosfor całkowity, rozpuszczalny w kwasach, ATP, 2,3-DPG i nieorganiczny. Nie stwierdzono różnic w zawartości tych związków w erytrocytach krwi żyłnej matki w czasie porodu i kilka dni później. Stwierdzono wyższy poziom fosforu całkowitego w erytrocytach krwi pępowinowej. Fosfor rozpuszczalny w kwasach krwi płodu i matki nie wykazał istotnych różnic. Frakcje estrowe erytrocytów krwi pępowinowej i matki ulegały szerokim wahaniom, które nie pozwalają na wprowadzenie jednoznacznych wniosków.

LITERATURA

- [1] Behrendt H., *Am. J. Dis. Child.* **64**, 55, 1942.
- [2] Behrendt H., *Am. J. Dis. Child.* **64**, 789, 1942.
- [3] Berenblum I., Chain E., *Biochem. J.* **32**, 295, 1948.
- [4] Gerlach E., Weber E., *Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Pathol. Pharmacol.* **224**, 496, 1955.
- [5] Greenwalt T. J., Ayers V. E., *J. Clin. Investigation*, **35**, 1404, 1956.
- [6] Greenwalt T. J., Triantaphyllopoulos D. C., *J. Lab. Clin. Med.* **45**, 135, 1955.
- [7] Guest G. M., Rapoport S., *Am. J. Dis. Child.* **58**, 1072, 1939.
- [8] Guest G. M., Rapoport S., *Am. J. Dis. Child.* **60**, 450, 1940.
- [9] Hanes S., Isherwood A., *Nature* **164**, 1107, 1949.
- [10] Hollingsworth J. W., *J. Lab. Clin. Med.* **45**, 469, 1955.
- [11] Jonxis J. H. P., Hinsman T. H. J., *Blood* **11**, 1009, 1956.
- [12] Jost H., *Z. Physiol. Chem.* **165**, 171, 1927.
- [13] Keitel H. G., Berman H., Jones H., MacLachlan E., *Blood* **10**, 370, 1955.
- [14] Kowalczyk K., *Ped. Pol.* **5**, 499, 1957.
- [15] Kutás F., Stutzel M., *Experientia* **14**, 214, 1958.

- [16] Macho L., *Nature* **180**, 1351, 1957.
- [17] Prankerd T. A. J., Altman K. J., *Biochem. J.* **58**, 622, 1954.
- [18] Prankerd T. A. J., Altman K. J., Young L. E., *J. Clin. Investigation* **34**, 1268, 1955.
- [19] Prankerd T. A. J., *Biochem. J.* **64**, 209, 1956.
- [20] Rapoport S., *Biochem. Z.* **289**, 411, 1937.
- [21] Reiner M., *Standard Methods of Clinical Chemistry*, Academic Press INC New York N. Y., 1953, Vol. I, 84.
- [22] Rohdewald M., Weber M., *Z. Physiol. Chem.* **306**, 90, 1956.
- [23] Rottino A., Hoffman G. T., Albaum H., *Blood* **7**, 836, 1952.
- [24] Sjölin S., *Acta Paediatrica* **43**, 1954, Suppl. 98, str. 66.
- [25] Stearns G., Warweg E., *J. Biol. Chem.* **102**, 749, 1933.
- [26] Sumner J. B., Somers G. F., *Arch. Biochem.* **4**, 11, 1944.
- [27] Swanson M. A., *J. Biol. Chem.* **184**, 647, 1950.
- [28] Szent-Györgyi A., *Chemistry of Muscular Contraction* Academic Press INC, New York, N. Y., 1947, str. 133.
- [29] Whittam R., *J. Physiol.* **140**, 479, 1958.
- [30] Wolff R., Lavergne E., *Bull. Soc. Chim. Biol.* **30**, 287, 1948.

PHOSPHOROUS COMPOUNDS IN ERYTHROCYTES OF THE UMBILICAL
BLOOD AND OF THE MATERNAL BLOOD

Summary

Estimation was carried out of total phosphorus (P_c), acid soluble phosphorus (P_k) adenosine triphosphate (ATP), 2,3-diphosphoglyceric acid (2,3-DPG) and inorganic phosphorus (P_n) — in erythrocytes of the umbilical blood and of the maternal venous blood during the delivery and a few days afterwards. No differences were noted in contents of these compounds in maternal venous blood during the delivery and after a few days. Total phosphorus in erythrocytes of umbilical blood was significantly higher than in maternal venous blood. Acid soluble phosphorus of maternal and foetal blood has not shown significant differences. Ester fraction in erythrocytes of umbilical and maternal blood show wide range of values, which makes it impossible to form any definite conclusions.

Otrzymano 6.10.1958 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 przesyłać 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 strona-
mi 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 molarności (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], Sniadecki J., *O fizycznym wychowaniu dzieci*, Turrowski, Sanok 1855. Wykaz używanych skrótów czasopism podają Roczniki Chemii **26**, 497, 1952. Prace kilkakrotnie cytowane należy podawać jeden raz, a wszystkie odsyłacze do tej pracy powinny mieć ten sam numer. Powołanie się w tekście na odnośną pozycję cytowanej literatury następuje przez wymienienie numeru pozycji wykazu w nawiasie, np. [13].

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

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

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