

# ACTA BIOLOGIAE EXPERIMENTALIS

VOL. VI.

SUBVENTIONNÉ PAR LE FOND NATIONAL POUR LA PROTECTION  
DE LA CULTURE POLONAISE

VARSOVIE  
RÉDACTION ET ADMINISTRATION:  
INSTITUT NENCKI (SOC. SCI. VARS.)  
8, RUE ŚNIADECKI  
1931

<http://rcin.org.pl>

## Acta Biologiae Experimentalis

Czasopismo, ogłaszające rozprawy naukowe z zakresu fizjologii i chemii fizjologicznej roślin i zwierząt, morfologii doświadczalnej, zoopsychologii oraz dziedzin pokrewnych. Ponadto — dział p. t.: „Bibliographia Polonica”.

Wydawnictwo to ukazuje się w liczbie około dwu tomów rocznie.

Tom V, 1930, (pod redakcją K. BIALASZEWICZA) zawiera następujące rozprawy:

M. SKALIŃSKA (Warszawa): Próba określenia roli cytoplazmy u mieszaiców matroklinalnych rodzaju *Aquilegia*. — O. OSTERN i J. K. PARNAS (Lwów): O rzekomej syntezie kwasu moczowego przez miążgę wątrobową. — L. KAUFMAN (Puławy): Badania nad pochodzeniem wielkości ciała, wraz z opisem nowej metody kultur *in vitro* jaj kur i gołębi. — M. BOGUCKI (Warszawa): O rzekomo hamującym wpływie cieczy celomatycznej żełwoców na powstawanie błony zapłodnienia i na brózdtkowanie. — K. BIALASZEWICZ (Warszawa): Badania nad zjawiskiem regulowania składu mineralnego cieczy ciała. I. Doświadczenia nad krabem *Maja squinado*. — M. WIERZUCHOWSKI (Warszawa): Przetwarzanie cukrów, wprowadzonych dożylnie ze stałą prędkością. I. Ogólna technika pracy. — M. WIERZUCHOWSKI i W. PIESKOW (Warszawa): II. Glikoza, fruktoza i galaktoza we krwi. — M. WIERZUCHOWSKI i E. OWSIANY (Warszawa): III. Wydalanie monoheksos z moczem, obrót fosforu i gospodarka wodna. — M. ŁANIEWSKI i M. WIERZUCHOWSKI. (Warszawa): IV. Tworzenie kwasu mlecznego. — M. WIERZUCHOWSKI. (Warszawa): V. Swoisto-dynamiczne działanie i utlenianie glikozy, fruktozy i galaktozy. — W. R. WITANOWSKI (Kraków): Fosfatydy. I. O fosfatydach wątroby królika. — W. R. WITANOWSKI (Kraków): Fosfatydy. II. O losie związków cholinowych w organizmie królika, pozbawionego wątroby. — STELLA SAKS (Warszawa): O przemianie mineralnej podczas głodu u psa. — R. TRUSZKOWSKI (Warszawa): Urikaza i jej działanie. — BIBLIOGRAPHIA POLONICA.

Cena pojedynczego tomu (około 20 arkuszy): w prenumeracie—20 zł. oddzielnie—25 zł. Współpracownicy czasopisma otrzymują 10% ustępstwa:

Zgłoszenie do prenumeraty przyjmuje:

Administracja Instytutu im. Nenckiego T. N. W.

(Warszawa, ul. Śniadeckich 8, tel. 536-31).

Skład główny:

„Ekspedycja Kasy im. J. Mianowskiego”

(Warszawa, Nowy-Świat 72, Pałac Staszica).

# ACTA BIOLOGIAE EXPERIMENTALIS

VOL. VI.

SUBVENTIONNÉ PAR LE FOND NATIONAL POUR LA PROTECTION  
DE LA CULTURE POLONAISE

VARSOVIE  
RÉDACTION ET ADMINISTRATION:  
INSTITUT NENCKI (SOC. SCI. VARS.)  
8, RUE ŚNIADECKI  
1931

Redaktor:

K. BIALASZEWICZ.



Drukarnia i Litografia „JAN COTTY” w Warszawie, Kapucyńska 7.

## S o m m a i r e.

№№

pp.

1. **E. A. Sym.** Badania nad syntetycznym działaniem lipazy w układzie: kwas oleinowy, gliceryna, woda i lipaza w stanie rozpuszczonym. *The syntetic action of lipase in the system: oleic acid-glycerol-water-dissolved lipase.* [Department of Physiological Chemistry, University of Warsaw] . . . . . 1
2. **H. Kowarzyk.** Promieniowanie mitogenetyczne a wpływ ciał lotnych ze zmiążdżonych tkanek cebuli na zjawiska koloidalne. *Über die Fernwirkung von Zwiebelsohlenbrei auf Kolloide und über den Nachweis mitogenetischer Strahlungen.* [Institut für allgemeine und experimentelle Pathologie an der Jagiellonischen Universität in Krakau] . . . . . 29
3. **A. Rowińska.** Badania nad zachowaniem się kwasu moczowego we krwi. *Researches on the action of blood on uric acid.* [Biochemical Laboratory, Medical Faculty, Warsaw University] . . . . . 37
4. **T. Mann.** O domniemanym udziale azotu amidowego białek krwi i mięśni w przemianach chemicznych mięśnia pracującego. *Über den angeblichen Anteil des Amidstickstoffes des Blut- und Muskel-Eiweisses an den chemischen Vorgängen im arbeitenden Muskel.* [Institut der medizinischen Chemie an der Universität Lwów] . . . . . 45
5. **H. P. Kryńska i W. R. Witanowski.** O przepuszczalności mięśnia dla jonów sodu i potasu. *Sur la perméabilité du coeur aux ions de sodium et de potassium.* [Laboratoire Pharmacognostique à l'Université de Cracovie] . . . . . 53
6. **J. Dembowski.** Dalsze studia nad geotropizmem Paramaecium. *Weitere Studien über den Geotropismus von Paramaecium.* [Laboratorium für experimentelle Morphologie. Nencki Institut in Warschau] . . . . . 59
7. **W. Gedroyc i St. J. Przyłęcki.** Wpływ soli na stężenie jonów wodorowych w roztworach amfolytów. *Effect of addition of salts on the pH of solutions of ampholytes.* [Biochemical Laboratory, Medical Faculty, Warsaw University] . . . . . 89
8. **K. Iwazskiewicz and J. Neyman.** *Counting Virulent Bacteria and Particles of Virus.* [Biometric Laboratory of Nencki Institute, Societas Scientiarum ae Litterarum Varsoviensis, Warsaw] . . . . . 101
9. **S. Frajbergerówna.** Struktura i reakcje enzymatyczne. Część X. Wpływ lepkości i stanu agregacji fazy rozdrobnionej. *La structure*

- et les réactions enzymatiques. X partie. Influence de la viscosité et de l'état d'aggrégation de la phase dispersée.* [Laboratoire de Chimie Physiologique de l'Université à Varsovie] . . . . . 143
10. **A. Wolański.** Studja nad reakcją Manołowa i niektórymi innymi reakcjami kolorymetrycznymi na pleć u ludzi, zwierząt i roślin. *Studies on the Manoiloff reactions and some other colorimetric sex-reactions in man, animals and plants.* [Institute of General Biology, University of Wilno] . . . . . 173
11. **M. Z. Grynberg.** Kinetyka działania urikazy. *Kinetik der Urikase-wirkung.* [Institut für physiologische Chemie an der Universität in Warschau] 211
12. **M. Wieruchowski.** Przetwarzanie cukrów, wprowadzanych dożylnie ze stałą prędkością. VI. Wpływ hormonów, głodu i czynników pokarmowych na przyswajanie galaktozy i glikozy. *Le métabolisme des sucres injectés par la voie intraveineuse à vitesse constante. VI. L'influence des hormones, du jeûne et des facteurs alimentaires sur l'assimilation du galactose et du glycose.* [Laboratoire de Métabolisme. II-me Clinique des Maladies Internes à l'Université de Varsovie] 251

[Zakład Chemji Fizjologicznej Uniwersytetu Warszawskiego].

E. A. Sym.

**Badania nad syntetycznem działaniem lipazy w układzie:  
kwas oleinowy, gliceryna, woda i lipaza w stanie rozpu-  
szczonym.**

*The synthetic action of lipase in the system: oleic acid-gly-  
cerol-water-dissolved lipase.*

Rękopis nadesłany w dniu 31. VII. 1930 r.

1°. Lipase undergoes sorption at the oil-glycerol interface in two ways. The first is a process of adsorption which is completed instantaneously, and the extent of which is independent of temperature. The second process consists in the formation of a membrane at the phase interface; this process takes place 5 times as rapidly at 38° as at 18°. The whole of the lipase remaining in solution after the completion of the first rapid process of sorption is concentrated in this membrane by the end of a few weeks. The membrane gives MILLON'S and the biuret reaction, as well as a feeble MOLISCH'S reaction (tables IX, X, XI, XII and XIII).

2°. The adsorption of lipase on oleic acid is partly reversible (table XIV).

3°. Only lipase present at the phase interface is active; for this reason, in systems in which the phase interface is smaller than that necessary to remove the entire lipase present by the first process of adsorption, the velocity of reaction is to a certain extent proportional to the area of the phase interface.

Above this limiting value the surface of contact does not affect the velocity of synthesis (tables II, III, IV and XI).

4°. The reaction of synthesis of olein gives results in agreement with a bimolecular reversible reaction. It would hence

appear that the reaction in question follows the law of mass action, although it takes place in a heterogeneous system (table V).

5°. Where the quantity of aqueous phase is varied, keeping the contact-surface, the amount of oleic acid, and the concentration of lipase, constant, the initial velocity of reaction increases for the whole system with the amount of aqueous phase taken. The number of millimoles of combined oleic acid per g. of aqueous phase falls, however, with increase in volume of the latter phase (table VI).

6°. The effect of increasing the concentration of glycerol in the aqueous phase is to accelerate reaction and to shift the equilibrium point in the direction of synthesis. The reaction does not, over the range of concentrations taken in these experiments, follow the law of mass action (table VII).

7°. The initial velocity of reaction but not the equilibrium constant is directly proportional to the concentration of enzyme in the aqueous phase (table VIII).

#### A. W s t ę p.

W makroheterogenicznie dwufazowym systemie, jakim jest: kwas oleinowy i lipaza trzustkowa, rozpuszczona w roztworze wodnoglicerynowym, można sobie wyobrazić umiejscowienie działania lipazy w trzech następujących miejscach układu: 1, w fazie wodnej, 2, w fazie kwasu oleinowego, oraz 3, w sferze granicznej, t. zn. w miejscu stykania się obu faz.

Ogólnie jest dziś przyjęty pogląd, że reakcja hydrolizy tłuszczów odbywa się na granicy fazy wodnej i tłuszczowej, jednakże pogląd ten nie jest oparty na ścisłych dowodach. Istnieją także przypuszczenia, że lipaza krwi (P. RONA i BIEN '14) i lipaza soku trzustkowego (J. M. MELLANBY i V. J. WOOLLEY '14) działają w odróżnieniu od lipazy, otrzymanej z narządów, w układzie jednorodnym w fazie wodnej. Szkoła WILL-



STÄTTERA (23) przyjmuje, że reakcja hydrolizy tłuszczów odbywa się w mikroheterogenicznym systemie, i na tej koncepcji opiera całą teorię adsorpcyjną działania aktywatorów.

Celem naszych doświadczeń było ściśle określenie miejsca działania lipazy, aby móc na tej podstawie wytłumaczyć zarówno jej kinetyczne własności, jak i mechanizm działania aktywatorów.

### B. Metodyka ogólna.

1<sup>o</sup>. Przy wyborze układu kierowano się zasadą redukcji do minimum czynników, mających wpływ na reakcję. W tym celu obrano reakcję syntezy glicerydu kwasu oleinowego, jako najodpowiedniejszą do tych badań. Jakie są jej zalety? Po pierwsze — przebiega ona, w pewnym zakresie, według prawa działania mas w odróżnieniu od hydrolizy oliwy, która przy pH = 5.7 (przy przeciętnem pH wyciągu glicerynowego trzustki) doznaje silnego zahamowania i osiąga stopień hydrolizy, dochodzący najwyżej 10%. Po drugie — pH ośrodka ulega w czasie reakcji syntezy małym tylko wahaniom, wskutek czego nie potrzeba stosować nowego czynnika—buforów. Po trzecie—nie potrzebne jest nawet stosowanie aktywatorów, gdyż aktywność lipazy w tym układzie pozostaje miesiącami bez zmiany. Dlatego też system standartowy WILLSTÄTTERA, służący do ilościowego oznaczania lipazy, zawierający bufony i aktywatory, uważano za nieodpowiedni do doświadczeń, w których chodziło o jaknajwiększe zredukowanie czynników ubocznych.

Ponieważ nie używano preparatów lipazy, oczyszczanych metodą WILLSTÄTTERA, dlatego też i ciała towarzyszące brały przypuszczalnie w reakcji udział. Jednakowoż wyniki, otrzymane z tym preparatem, były tak zgodne, że interpretacja ich nie nasuwa tu prawie żadnych trudności, mimo— że operowano preparatem surowym.

2<sup>o</sup>. Otrzymanie lipazy rozpuszczonej w wyciągu glicerynowym z preparatu trzustki trzody chlewnej.

Świeżo otrzymane z rzeźni trzustki oczyszczano z tkanki tłuszczowej, następnie zaś trzykrotnie przetarto w maszynce mięsnej. Tak otrzymaną miazgę rozcierano w moździerzu porcjami z acetonem i wrzucano do flaszek o pojemności 10-litrowej.

Do flaszek dolewano — w stosunku do wagi miazgi trzustkowej — 5-ciokrotną ilość acetonu. Flaszki tak napełnione, pozostawiano przez 4 godziny, wstrząsając od czasu do czasu. Po odsączeniu acetonu wystawiano jeszcze dwukrotnie miazgę na działanie acetonu w tej samej ilości i na ten sam przeciąg czasu. Po ostatecznym odsączeniu acetonu miazgę przemywano dwa razy 5-krotną ilością eteru. Po powtórnym odsączeniu eteru rozcierano miazgę w cienkiej warstwie na papierach sączkowych i suszono na powietrzu. Dobrze wysuszoną miazgę mielono w młynkach na drobny proszek. Proszek ten dwukrotnie przesiewano przez sitko o drob-

nych oczkach. Przesiany drobny proszek rozcierano w moździerzu, dodając 16-krotną ilość 88% gliceryny, poczem pozostawiano go przez 4 godziny w termostacie.

Po 4-godzinnem wytrawianiu proszku gliceryną dodawano do tej miazgi taką ilość wody destylowanej, aby stężenie gliceryny wynosiło około 75%.

Wyciąg glicerynowy oddzielono od proszku przez sączenie na sączkach buchnerowskich.

Tak otrzymany przesącz zawiera lipazę w formie rozpuszczonej, t. j. tak zwany roztwór „Lipase-Rohlösung“, który służy WILLSTÄTTEROWI (23) do otrzymywania oczyszczonej lipazy zapomocą metod adsorpcyjnych.

Doświadczenia wykonywano na tym wyciągu.

3°. Ilość kwasu oleinowego oznaczano 1/10 n roztworem alkoholowym ługu sodowego, używając jako wskaźnika o-krezolftaleiny. Ilość kwasu obliczano najczęściej dla 1000 g emulsji, ponieważ ilość emulsji nie oznaczano objętościowo (mała dokładność), lecz jedynie zapomocą ważenia.

Do badań tych używano kwasu oleinowego firmy Mercka, w ostatnich dwóch doświadczeniach firmy Wende.

Ilość powstałego estru na 1000 g emulsji oznaczano zapomocą hydrolizy estru 1/10 n alkoholowym roztworem ługu sodowego, dodając do danej próby około 30% H<sub>2</sub>O w stosunku do ilości użytego roztworu ługu, oznaczano 1/10 n HCl.

Dla określenia wpływu badanego czynnika zmieniano jego wielkość, pozostawiając resztę czynników bez zmiany.

Pracę zaczęto od badania wpływu powierzchni stykających się faz na reakcję.

## C. Doświadczenia kinetyczne.

### I. Wpływ powierzchni na szybkość reakcji i na stan równowagi.

Ażeby znaleźć zależność między szybkością estryfikacji a wielkością powierzchni stykających się faz, wodnej i tłuszczowej, wykonano następujące doświadczenie. Do trzech naczyń o różnej wielkości przekrojów poziomych, a mianowicie a) 19,5 cm<sup>2</sup>, b) 62,8 cm<sup>2</sup>, c) 399,0 cm<sup>2</sup>, wiano po 282,35 g kwasu oleinowego, poczem dodano wyciągu glicerynowego z preparatu trzustki o 73,0% gliceryny do ogólnej objętości 500 cm<sup>3</sup>. Wyciąg wlewano ostrożnie brzegiem naczynia do kwasu oleinowego, poprzednio odważonego, ażeby nie utworzyła się emulsja. W ten sposób otrzymano w każdym naczyniu dwie fazy, położone jedna nad drugą i oddzielone od siebie ostro odznaczającą się powierzchnią.

Wielkość tej powierzchni obliczono na wycinku papieru skrojonego w wielkości powierzchni przekroju poziomego poszczególnych naczyń.

Te trzy naczynia umieszczono w termostacie w temperaturze 37° C. Stopień estryfikacji oznaczano tylko w fazie tłuszczowej za pomocą od-

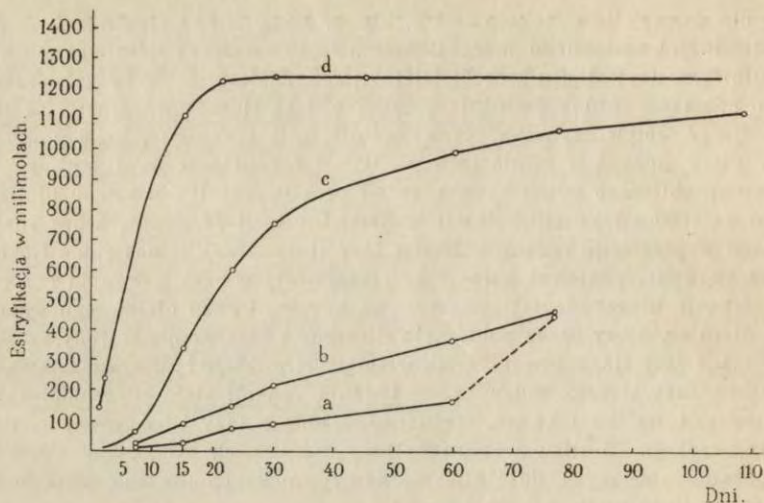
ważenia pewnej ilości (około 2–3 g) płynu, ściągniętego pipetą z warstwy tłuszczowej, i następnego miareczkowania tejże zważonej ilości ługiem alkoholowym, używając o-kreozolftaleiny jako indykatora. Przy każdorazowym ściąganiu próby ostrożnie mieszano fazę tłuszczową pipetą, ażeby zmniejszyć wpływ czynnika dyfuzji w ośrodku tłuszczowym. Ilość powstałego estru podaną w milimolach na 1000 g fazy tłuszczowej (zawartość molarna) obliczano w ten sposób, że od początkowej ilości kwasu oleinowego na 1000 g/3546 milimolów<sup>1)</sup> odejmowano tę ilość kwasu, którą znajdowano w przebiegu reakcji w 1000 g fazy tłuszczowej, a następnie liczbę tę korygowano, ponieważ skład fazy tłuszczowej w czasie trwania reakcji estryfikacji ulegał ciąglej zmianie — na miejsce kwasu oleinowego wchodził oleinjan, który przez pobieranie gliceryny i odszczepienie wody zwiększał masę fazy tłuszczowej. Suma więc ilości wolnego i związanego kwasu w 1000 g fazy tłuszczowej w czasie trwania reakcji stale się zmniejszała w stosunku do ilości kwasu, będącego w 1000 g fazy tłuszczowej na początku reakcji. Z kilku preparatów fazy tłuszczowej, otrzymanej z próby preparatów, będących dość blisko stanu równowagi obliczono za pomocą hydrolizy ilość estru w 1000 g fazy.

Oto wynik otrzymany:

5 g fazy tłuszczowej zawierało 11.7 milimolów kwasu oleinowego, t. zn. w 1000 g było 2340 milimolów kwasu, czyli według obliczenia bez korekty ilość kwasu związanego w estrze wynosiłaby  $3546 - 2340 = 1206$  milimolów. Zawartość molarna kwasu w 1000 g kwasu oleinowego wynosi 3546 milimolów. Hydroliza tych 5 g wykazała jednak, że istnieje 57 milimolów kwasu związanego w estrze, t. zn. w 1000 g około 1140 milimolów. W obliczeniach stopnia estryfikacji trzeba było wprowadzić poprawkę. Czyniono to w przybliżeniu, przez zmniejszenie obliczonego stopnia estryfikacji o 5%. Tyle też mniej więcej wynosi otrzymany błąd.

Równoległe z temi trzema próbami prowadzono czwartą, której skład był taki sam jak poprzednich; jedyną różnicę stanowiło to, że zawartość układu wstrząsano w czasie trwania reakcji w termostacie przy 37° C. Badając układ ten pod mikroskopem, zauważono, że faza wodna jest zawieszona w fazie tłuszczowej. Tutaj powierzchnię stykających się faz obliczono w przybliżeniu z wielkości kuleczek fazy wodnej, przyczem uczyniono poprawkę, ponieważ kulki fazy wodnej zawierały w sobie 2–3 jeszcze mniejszych kuleczek fazy tłuszczowej. Wielkość tej powierzchni, obliczona w przybliżeniu wystarczającą do celów porównawczych z próbami a) b) i c), wynosi około 356000 cm<sup>2</sup> (35.6 m<sup>2</sup>). Stopień estryfikacji w d) oznaczano w całej emulsji, na 100<sup>0</sup> g emulsji d) (tabela I), a następnie przeliczano na 100 g fazy tłuszczowej d) (tabela I), aby móc przeprowadzać porównania z układami a), b) i c). Tutaj poprawka nie jest potrzebna, jak to łatwo można wywnioskować. W tabelicy I podano stężenie estru, obliczone na 1000 g fazy tłuszczowej z przeprowadzeniem poprawki.

<sup>1)</sup> Odpowiednie oznaczenia zbliżyły się tak do tej teoretycznej liczby, że uważano za najlepsze liczbę tę użyć do obliczeń.



Rys. 1. Wpływ powierzchni na szybkość estryfikacji.

Fig. 1. Influence of surface on velocity of esterification.

a — 19.5 cm<sup>2</sup>;    b — 62.8 cm<sup>2</sup>;    c — 399.0 cm<sup>2</sup>;    d — 365 × 10<sup>3</sup> cm<sup>2</sup>  
 a — 19.5 sq. cm.;    b — 62.8 sq. cm.;    c — 399.0 sq. cm.;    d — 365 × 10<sup>3</sup> sq. cm.

Doświadczenie przeprowadzono przez 108 dni. Przebieg reakcji jest uwidoczniiony na rys. 1. Dla kontroli trzymano przez 2 miesiące kwas oleinowy, podwarstwowiony roztworem glicerynowo-wodnym, w naczyniu o przekroju około 100 cm<sup>2</sup> przy

Tabela 1.

Szybkość reakcji w zależności od powierzchni.  
 Velocity of synthesis using different contact surfaces.

Dośw. Exper.	Pow. w cm <sup>2</sup> Surface in sq. cm	P o d n i a c h — D a y s												Uwagi Remarks
		1	2	7	15	21	23	30	35	60	77	108	k	
a	19.5	—	—	7	22	—	72	84	—	160	451 <sup>1)</sup>	—	—	
b	62.8	—	—	15	68	—	145	215	—	307	463	—	—	
c	399.0	—	—	59	339	—	597	705	—	998	1076	1140	1.75	
d1	365.10 <sup>3</sup>	139	238	—	1110	1224	—	1243	1246	—	—	—	—	1.55
d2	365.10 <sup>3</sup>	88	150	—	698	770	—	782	884	—	—	—	—	

Obliczono  
na fazę tu-  
szczową  
Calculated  
for oil phase

Obliczono  
na 1000 g  
emulsji  
Calculated  
per 1000 g  
emulsion

37° C. Reakcja w tym układzie nie odbyła się. Z tabeli I widoczne jest, że w drugim tygodniu reakcje w próbach a), b) i c) przybierają czterokrotnie na szybkości. W trzecim tygodniu szybkość reakcji wzmagą się jeszcze bardziej, aniżeli w poprzednim. W następnych okresach czasu zachowuje reakcja szybkość, osiągniętą w trzecim tygodniu. Z rysunku 1 jest widoczne, że krzywe reakcji a), b) i c) posiadają kształt podobny do krzywej autokatalitycznej.

Tabela II.

Analiza na zawartość lipazy.  
*Distribution of lipase.*

	W systemie użyto <i>Material used</i>	Po dniach — <i>Days</i>			
		1	2	4	6
1	Fazę wodną bez kłaczek + kw. olein. <i>Filtered aqueous phase + oleic acid</i>	15	18	18	19
2	Fazę wodną z błonami + kw. olein. <i>Aqueous phase with membranes + oleic acid</i>	31	—	82	—
3	Fazę tłuszczową bez kłaczek + 74% glicer. <i>Oleic acid phase without membranes + 74% glycerol.</i>	11	—	10	—
4	System ten sam, badanie aktywności samych błon <i>Same as 3, with addition of membranes</i>	50	112	—	—

W czasie tych trzech pierwszych tygodni tworzyła się w okolicy granicy faz błona szaro-biała, która przybierała na grubości i czasami odrywała się strzępami. Równocześnie w fazie wodnej utworzyły się po pierwszym miesiącu kłaczki zawieszane w ośrodku; podobne strzępki pojawiły się również na dnie fazy tłuszczowej, ponieważ mała część tych błon postrzępionych przeszła z fazy wodnej w fazę tłuszczową.

Następne doświadczenia, wykonane po zakończeniu doświadczeń a) i b) na tych systemach, w celu zbadania aktywności lipazy po tak długotrwałej reakcji, wykazały, że znaczna większość lipazy znajduje się w tych kłaczkach i błonach (tabela II). Do zbadania aktywności użyto systemów o takim samym, co i w powyższych doświadczeniach, składzie, lecz w mniejszych ilościach (100 cm<sup>3</sup> 3).

Kolbki z zawartością wstrząsano przez 6 dni w termostacie w 37° C. Tabela II daje nam analizę systemów a) i b) na zawartość lipazy.

W próbie czwartej skład systemu był następujący: 74% gliceryny, do której podano większą ilość błon, zebranych na sączku i przemytych acetonem + kwas oleinowy. Ilość estru oznaczono na 1000 g emulsji. Przesączona faza wodna, a więc uwolniona od błon i strzępków, jakoteż i zdekantowana górna część fazy tłuszczowej, nie zawierająca kłaczków, posiadają tylko ślady lipazy (doświadczenie 1 i 3).

Kwasota fazy wodnej przed doświadczeniem wynosiła 31 milimolów na 1000 g, po doświadczeniu — 93 milimolów, kwasoty więc przybyło 62 milimolów; pH fazy wodnej przed doświadczeniem wynosiło 6.5, po doświadczeniu 4.6.

Obraz tych strzępków z fazy wodnej przedstawia pod 80-krotnym powiększeniem strukturę ziarnistą, nie zmieniającą się pod wpływem acetonu i wody, a słabo barwiącą się sudanem III. Błonki zaś z fazy tłuszczowej są gęsto obsiane kuleczkami, barwiącymi się sudanem III i rozpuszczającymi się w acetonie i eterze, a nie w wodzie. Błonka taka po zadziałaniu acetonem nabiera wyglądu błony z fazy wodnej. Bardzo dobrze można obserwować na granicy faz tworzenie się błony pod mikroskopem. Wzrastanie takiej błony trwa całymi tygodniami. Błona daje wybitną reakcję MILLONA i biuretową, natomiast bardzo nieznaczną reakcję MOLISCHA.

W doświadczeniu b) (tabela I) sześćdziesiątego dnia reakcji ściągnięto pipetą warstwę dolną fazy wodnej, pozostawiając około 1 cm grubości tej warstwy, w której znajdował się kożuch, utworzony na granicy faz z wyżej opisanych błonek.

Jak widzimy z dalszego przebiegu krzywej, bieg jej nie uległ przez to zmianie. Gdy w trzydziestu poprzednich dniach mamy syntezę wynoszącą  $152 : 30 = 5.1$  milimoli na dzień, to w następnych 17 dniach, po odciągnięciu warstwy wodnej, mamy syntezę, wynoszącą  $96 : 17 = 5.6$  milimoli na dzień, t. zn. nawet do pewnego stopnia zwiększoną.

Z tego wynika, że dolna warstwa fazy wodnej, w której była bardzo nieliczna ilość strzępków, nie brała udziału w działaniu katalitycznym.

Zawartość z naczynia z doświadczenia a) (tab. I) przelano, po ściągnięciu z tłuszczowej warstwy około  $\frac{2}{3}$  części tej warstwy, do zlewki o powierzchni przekroju poziomego, równej  $64.2 \text{ cm}^2$ , a więc zbliżonej do powierzchni z doświadczenia b).

Po 17-tu dniach znaleziono w tym układzie syntezę, wynoszącą  $291 : 17 = 17.1$  milimolów na dzień w fazie tłuszczowej, wynoszącej tylko  $\frac{1}{3}$  część poprzedniej. Gdyby ilości tej fazy nie zmniejszono, mielibyśmy wówczas prawdopodobnie zsyntetyzowaną część tej fazy, rozmieszczoną w potrójnej ilości tej fazy, rozcieńczenie jej byłoby więc 3 razy większe; w tym przypadku synteza w jednym dniu wynosiłaby  $17.1 : 3 = 5.7$ . Jest to wielkość bardzo zbliżona do poprzednich, to zn. że w  $\frac{1}{3}$  części fazy tłuszczowej mieliśmy 3 razy większe stężenie utworzonego estru. Później znaleziono tę samą zależność w doświadczeniach z emulsją (patrz rysunek I, krzywa kropkowana).

Tabela III.

Zależność szybkości reakcji od powierzchni.  
Influence of area of surface of contact on velocity of synthesis.

Dośw. Exper.	Powierzchnia Surface	P o d n i a c h — D a y s				
		1	7	15	23	30
a	19.5	—	0.05	0.075	0.160	0.14
b	62.8	—	0.04	0.072	0.100	0.12
c	399.0	—	0.02	0.057	0.065	0.06
d	Emulsja Emulsion 365.10 <sup>3</sup>	39.10 <sup>-5</sup>	—	—	—	—

Dziwnem tylko wydaje się, że przy tych zabiegach z przelewaniem i ściąganiem warstwy wodnej zrywa się przecież kontakt, jaki błona ta miała uprzednio z fazą tłuszczową, a mimo to działanie jej później się nie zmniejszyło. Wraca ona wprawdzie jako posiadająca mniejszy ciężar właściwy od fazy wodnej do swego dawnego położenia, t. zn. na granicę faz, trudno jednakże przypuścić, ażeby udało się jej dawny kontakt ponownie uzyskać.

Podzieliwszy ilość zestyfikowanego kwasu oleinowego przez wielkość powierzchni i przez ilość dni trwania reakcji, otrzymuje się wielkość, oznaczającą ilość zsyntetyzowanego estru w milimolach na 1 cm<sup>2</sup> w 1 dniu,

$$e = \frac{\text{milimol}}{\text{pow. dn.}}$$

Wielkości te są zestawione w powyższej tabeli.

W pierwszych trzech doświadczeniach mamy od 7 do 15 dnia pewną proporcjonalność między szybkością reakcji a wielkością powierzchni, mimo, że wielkości te w poszczególnych próbach znacznie od siebie odbiegają i mają się do siebie jak 1 : 3 : 20. Reakcje przebiegają średnio z szybkością 0.1 milimola na 1 cm<sup>2</sup> i na 1 dzień (t. zn. 6.10<sup>19</sup> cząstek przemienia się z kwasu na ester). Ponieważ wiemy, że na 1 cm<sup>2</sup> styka się z fazą wodną około 2.10<sup>14</sup> cząstek kwasu oleinowego (LANGMUIR '16), przeto mamy 3.10<sup>5</sup>-krotną przemianę tej całej powierzchni z kwasu na ester na dzień, co wynosi około 3.5 razy na sekundę.

Wymiana na tej powierzchni jest bardzo szybka i z pewnością czynnik dyfuzyjny odgrywać musi wielką rolę.

W doświadczeniu z emulsją d) mamy około 250 razy mniejszą szybkość reakcji w stosunku do powierzchni, aniżeli w systemach z małymi powierzchniami. Tu występuje wymiana wszystkich cząstek znajdujących się na powierzchni około jednego razu na 70 sekund. Szybkość reakcji w emulsji obliczono tylko na początku reakcji, ponieważ późniejsze oznaczenie nie było do porównania z tamtymi [z a) b) i c)].

Wprawdzie w doświadczeniach a), b) i c) nie osiągnięto stanu równowagi, sądzić jednak można z przebiegu krzywych, szczególnie c) i d), że w czasie będą się one zbliżały asymptotycznie do krzywej d).

Stała równowagi  $K = \frac{[Kw]}{[ester]}$ . W d) mamy  $K = 1.55$ , a w c)

1.75.  $K$  w tych doświadczeniach otrzymane nie zgadzają się z później otrzymanymi (stronica 12, tab. VII) przy tem samym stężeniu gliceryny, pochodzi to zaś stąd, że w tych układach użyto stosunkowo małej do kwasu ilości fazy wodnej — dlatego też nie można tu stosować wzoru, przyjmującego nadmiar alkoholu i wody.

Mając te wszystkie dane, nie trudno wywnioskować, jaka jest przyczyna charakterystycznego przebiegu reakcji w próbach a) b) i c). W pierwszym tygodniu, gdy większa część lipazy była w formie rozpuszczonej w fazie wodnej i nie stykała się na granicy faz z fazą tłuszczową, szybkość reakcji była 3 razy mniejszą, aniżeli w następnych tygodniach. To przyspieszenie reakcji jest w łączności z tworzeniem się błon, zawierających lipazę, na granicy faz;



dlatego kształt krzywej reakcji posiada cechę krzywej reakcji autokatalitycznej.

W celu znalezienia zależności pomiędzy wielkością powierzchni, utworzonej w formie emulsji, i szybkością reakcji, wykonano doświadczenia, zachowując w poszczególnych układach stałą ilość fazy wodnej, a zmieniając ilość kwasu oleinowego.

W tem doświadczeniu użyto inny preparat lipazy. Wyciąg zawierał 74.7% gliceryny. Przez wstrząsanie tych układów otrzymano emulsję, która pod mikroskopem wykazywała kuleczki kwasu, zawieszona w fazie wodnej, o przeciętnej wielkości promienia, wynoszącej około 25  $\mu$ . We wszystkich układach kuleczki były podobnej wielkości. Z wielkości kuleczek obliczono powierzchnię stykających się faz w poszczególnych układach. Jedna kulka waży  $562 \cdot 10^{-7}$  mg. Jeden gram kwasu oleinowego daje w emulsji  $18 \cdot 10^6$  kulek. Jedna kulka ma powierzchnię  $75 \cdot 10^{-4}$  mm<sup>2</sup>, a więc 1 g kwasu, zamieniony w formę emulsji, rozciąga powierzchnię, wynoszącą  $18 \cdot 10^6 \cdot 75 \cdot 10^{-4}$  mm<sup>2</sup> = 0.14 m<sup>2</sup> (W jednej kulce mamy około  $10^{14}$  cząstek kwasu oleinowego).

Tabela IV.

Wpływ ilości użytego kwasu oleinowego na szybkość reakcji.  
Podane znakowanie oznacza:  $w$  = ilość w g użytej fazy wodnej;  $kw$  = ilość w g użytego kwasu oleinowego;  $S = kw + w$  ciężar całego układu w g;  $e$  = ilość zesterylizowanego kwasu, na 1 g emulsji po 5-godzinnym trwaniu reakcji, w milimolach.  
*Influence of amount of oleic acid on velocity of reaction.*

Dośw. Exp.	$w$	$kw$	$S$	Powierz- w cm <sup>2</sup> Surface sq. cm <sup>2</sup>	$e$	$Se$	$K = \frac{kw}{est.}$
1	55	30	85	4.2	0.147	12.5	1.28
2	55	20	75	2.8	0.168	12.6	1.27
3	55	10	65	1.4	0.19	12.3	1.30
4	55	5	60	0.7	0.20	12.0	1.28

Wyniki otrzymane są zestawione w tabeli IV. Wykazuje ona wpływ powierzchni emulsji, a więc i stężenia użytego kwasu na szybkość reakcji.

W próbie 4) oznaczono początkową szybkość reakcji po 1.5 godzinie i przeliczono na 5 godzin. Część prób pozostawiono w termostacie na 10 dni w celu uzyskania stanu równowagi.

Aby otrzymać liczbę, oznaczającą ilość zsyntetyzowanego estru w całym układzie, trzeba pomnożyć  $e$  przez  $S$ . Oznaczenie początkowej szybkości reakcji, gdy jeszcze system daleki

jest od stanu równowagi i gdy wpływ reakcji przeciwnej jest minimalny, nadaje się do określenia ilości lub aktywności enzymu. W okresach początkowej reakcji szybkość jej jest jednostajna.

Z tych danych wynika, że 1) szybkość początkowa reakcji nie zależy od ilości użytego kwasu oleinowego, a więc i od wielkości stykających się powierzchni faz ( $Se = \text{konstans}$ ), 2) stała równowagi jest również niezależna od ilości użytego kwasu oleinowego. Rezultat tych doświadczeń jest odmienny od rezultatów uzyskanych w pierwszych doświadczeniach, a wykonanych na małych powierzchniach.

#### Przebieg całej reakcji.

Następnie zbadano, czy reakcja przebiega według wzoru:

$$\frac{k_1 + k_2}{2.303} = \frac{1}{t} \lg \frac{K}{Ka - (1+K)X}$$

wzoru dla reakcji dwucząsteczkowej odwracalnej przy nadmiarze dwóch substratów (wody i gliceryny). Do tego celu użyto układu, składającego się z 80 g wyciągu glicerynowego z trzustki o 73,6% zawartości gliceryny i 15 g kw. oleinowego. Utworzywszy emulsję przez wstrząsanie kolbki, włożono ją do termostatu, gdzie przez 7 dni przy 38° C układ ten poddawano wstrząsaniu. Co pewien czas odlewano część tej emulsji, odważano i oznaczano w niej zawartość wolnego kwasu w milimolach na 1000 g emulsji. W tabeli V przedstawione są wyniki.

Tabela V.

Zastosowanie wzoru kinetycznego. znakowanie jak w poprzedniej tabeli.  
Order of reaction.

Godz. Time h	$a - x$	$X$	$K = \frac{Est}{kw}$	$\frac{k_1 + k_2}{2.303}$
0	472	0	—	—
3	444	28	—	0.021
15.4	367	105	—	0.020
26.3	331	141	—	0.019
420	310	162	—	0.016
$\infty$	268	204	0.761	—

Z cyfr ostatniej kolumny widać, że wzór powyższy da się po części do tej reakcji zastosować. A więc prawo działania mas wchodzi tu w grę, mimo że reakcja odbywa się w układzie niejednorodnym. Ten fakt wskazuje, że czynnik dyfuzyjny przy jednoczesnym trzęsieniu małą musi odgrywać rolę.

## II. Wpływ ilości użytej fazy wodnej na początkową szybkość reakcji i na stałą równowagi $K = \frac{[Kw]}{[est]}$ .

W tem doświadczeniu użyto we wszystkich układach tej samej ilości kwasu oleinowego, zmieniano zaś ilość wyciągu glicerynowego z trzustki o zawartości 74.7% gliceryny. Stężenie lipazy jest w każdym układzie takie same, a ilość jej jest proporcjonalna do ilości użytego wyciągu. Chodzi tu o wykazanie wpływu ilości enzymu o tem samym stężeniu na początkową szybkość reakcji i na stałą równowagi, a więc ilości użytej fazy wodnej, w układach, w których powierzchnia stykających się faz oraz stężenie gliceryny i wody nie są zmieniane. Przez silne dwuminutowe wstrząsanie prób w celu utworzenia emulsji rozwija się powierzchnia graniczna faz, którą można uważać w poszczególnych układach za jednakową. Ilość kulek kwasu oleinowego, obliczona przy użyciu komory THOMA ZEISSA, jest w każdym układzie prawie jednakowa, jak to widać z ostatnich kolumn tabeli.

Obliczona powierzchnia wynosi około 2.8 m<sup>2</sup>.

### Tabela VI.

Wpływ fazy wodnej na szybkość reakcji i na równowagę.

Znakowanie:  $w$  = ilość w g użytej fazy wodnej;  $kw$ , = ilość w g użytego kwasu oleinowego;  $S = kw. + w$  = ciężar całego układu w g;  $e$  = ilość zestyfikowanego kwasu na 1 g emulsji po 4.5 godz. trwania reakcji, w milimolach;

*Effect on velocity of reaction of varying the quantity of aqueous phase.*

Układ System	$kw$ Oleic acid g	$w$ Aqueous phase g	$S$ Weight of whole system g	$e$ Millimoles combined oleic acid per g of emulsion	$x$ Millimoles combined oleic acid per g of aqueous phase	Kulek w cm <sup>3</sup> No. of globules in 1 cc. emulsion	Kulek w 1 g No. of globules in 1 g emulsion	Kulek w układzie No. of globules in whole system	K
1	20	20.2	40.2	0.116	0.230	10.10 <sup>6</sup>	9.10 <sup>6</sup>	36.10 <sup>7</sup>	1.27
2	20	36.0	56.0	0.114	0.224	7.5.10 <sup>6</sup>	6.3.10 <sup>6</sup>	35.10 <sup>7</sup>	1.12
3	20	72.8	92.8	0.170	0.222	4.5.10 <sup>6</sup>	3.8.10 <sup>6</sup>	35.10 <sup>7</sup>	1.10
4	20	108.0	128.0	0.105	0.184	3.3.10 <sup>6</sup>	2.8.10 <sup>6</sup>	35.10 <sup>7</sup>	1.15

Z tych danych można wyciągnąć następujące wnioski:

1. Początkowa szybkość reakcji jest do pewnego stopnia wprost proporcjonalna do ilości użytej fazy wodnej; wynika to z cyfr z kolumny pod x. Naogół jednak można stwierdzić pewien spadek szybkości reakcji, przypadający na 1 g fazy wodnej, w miarę powiększania ilości użytej fazy wodnej.

2. Stała równowagi  $K = \frac{[Kw]}{[est]}$  nie zależy od ilości użytej fazy wodnej. Gliceryna i woda są tu w nadmierze. Jednak w układzie 1 jest już widoczny wpływ zmiany stężeń tych substratów  $K$  odbiega od innych.

### III. Wpływ stężenia gliceryny na szybkość estryfikacji i na stałą równowagi.

W tych doświadczeniach starano się ustalić, jaki wpływ mają różne stężenia gliceryny i wody przy jednakowej ilości enzymu, jednakowej powierzchni faz i jednakowej ilości fazy wodnej, na początkową szybkość reakcji, na stałą szybkości reakcji i na stałą równowagi:

$$K_1 = \frac{[Kw]}{[ester]} \cdot \frac{[gliceryna]}{[H_2O]}$$

Układy takie skonstruowano w ten sposób, że mieszano równe ilości wyciągu glicerynowego o 74.7% gliceryny, z równą ilością w g gliceryny o różnych stężeniach.

Wprawdzie objętość fazy wodnej, a więc i stężenia enzymu, nie są w tych układach jednakowe, różnica jednak maksymalna w objętości w próbach o krańcowych stężeniach gliceryny wynosi około 2 cm<sup>3</sup>, lecz ilość enzymu we wszystkich układach jest jednakowa.

Do wszystkich prób użyto 55 g fazy wodnej i 20 g kwasu oleinowego. Układy wstrząsano w termostacie przy 38° C, a po 22 godzinach oznaczano stopień estryfikacji  $e$  w milimolach na 1000 g układu.

Wreszcie po dwóch tygodniach oznaczono stałą równowagi.

Tabela VII.

Wpływ stęż. gliceryny na szybkość reakcji.  
Influence of concentration of glycerol on velocity of reaction.

Próby Exper.	% glicer. Conc. of glycerol	Milimol. na 1000 g Millimoles combined oleic acid per 1000 g		e	K <sub>1</sub>	K <sub>2</sub> = $\frac{Est}{kw}$	$\frac{k_1 + k_2}{2.303}$	Uwagi Remarks
	%	glycerol.	HO					
1	62.3	6.8	2.1	52.5	12.6	0.257	0.0064	*) Obliczono porównawczo z dośw. 3 nad adsorbcją (tabela X) Calculated comparatively from adsorption experiment No. 3, Table X.
2	66.3	7.2	1.9	64.5	9.5	0.44	0.0050	
3	72.4	7.8	1.5	100.5	8.3	0.61	0.0065	
4	76.7	8.3	1.3	147	6.0	1.07	0.0069	
5	82.4	9.0	0.98	180	5.9	1.54	0.0077	
6	88.4	—	—	197	—	2.32	0.0074 <sup>*)</sup>	

Stałe szybkości reakcji obliczono według wzoru

$$\frac{k_1 + k_2}{2.303^1)} = \frac{1}{t} \cdot \lg \frac{K_2 \cdot A}{K_2 \cdot A - (1 + K_2) \cdot e}$$

Ponieważ wszelkie ilości substratów odnoszą się tu do 1000 g emulsji, nie mamy więc w tym przypadku do czynienia ze stężeniem w ścisłym tego słowa znaczeniu. Ale dla celów porównawczych można tu stosować wzory, których podstawą jest prawo działania mas, a błędy popełniane przez takie ujęcie sprawy nie przekraczają 4%.

Zwiększenie stężenia gliceryny przyspiesza w znacznym stopniu reakcję. Równorzędnie z większym stężeniem gliceryny następuje znaczne przesunięcie równowagi:  $K_1 = \frac{[Kwas]}{[Ester]}$ .  
[Gliceryna]  
[H<sub>2</sub>O] w kierunku syntezy. Z ostatnich kolumn wynika, że gliceryna w tych stężeniach nie działa aktywnie na lipazę i że zwiększenie początkowej szybkości reakcji pochodzi tylko z przesunięcia równowagi, przy czem suma stałych szybkości reakcji  $\frac{k_1 + k_2}{2.303}$  nie ulega znacznym zmianom.

1) 2.303 = moduł logarytmowy.

#### IV. Wpływ stężenia enzymu na szybkość reakcji i na stałą równowagi.

W tem doświadczeniu staraliśmy się stwierdzić, czy istnieje proporcjonalność między stężeniem enzymu a początkową szybkością reakcji, jak to ogólnie zauważono, badając zachowanie się innych enzymów.

W tym celu mieszano wyciąg glicerynowy w różnych ilościach z roztworem wodno-glicerynowym o takim samym stężeniu gliceryny, jakie było w wyciągu zawierającym lipazę (74.7%).

Do 55 g fazy wodnej dodano 20 g kwasu oleinowego.

Stopień estryfikacji oznaczano po 6-godzinnem wstrząsaniu prób w termostacie przy 38° C i obliczano na 1000 g emul-ji ( $e$ ).

Stężenie enzymu podawano we względnych stężeniach ( $E$ ), przyjmując największe stężenie za 1. Jest to stężenie w wyciągu pierwotnym, nierozcieńczonym.

Stałą równowagi  $K$  oznaczano po dwóch tygodniach trwania reakcji. W próbie 4, system był jeszcze znacznie oddalony od stanu równowagi.

### Tabela VIII.

Wpływ stężenia enzymu na szybkość reakcji i na  $K$ .  
Influence of concentration of enzyme on velocity of reaction and on equilibrium.

Dośw. Experi- ment	Wyciąg glic. w g Glycerol extract taken g	W 74.7% glic. w g 74.4% glycerol solution added g	$E$ Relative lipase conc.	$e$ Millimoles combined oleic acid per 1000 g emulsion	$e/E$	$K$
1	55.0	—	1	156	156	1.15
2	41.25	13.75	0.75	111	149	1.09
3	27.5	27.5	0.50	71	142	1.03
4	13.75	41.25	0.25	36	144	—

Z tego doświadczenia wynika, że:

1°. Szybkość początkowa reakcji  $e$  jest wprost proporcjonalna do względnego stężenia enzymu ( $E$ ).

2°. Stała równowagi jest niezależna od stężenia enzymu.

## D. Badania nad adsorbcją lipazy na kwasie oleinowym.

## Metodyka.

Doświadczenia adsorbcyjne wykonywano w ten sposób, że do 40 g roztworu lipazy w glicerynie dodawano pewną ilość kwasu oleinowego, następnie taki układ wstrząsano przez oznaczony czas i w określonej temperaturze, w końcu zaś poddawano emulsję odwirowaniu przez 10'. Po odwirowaniu kwasu zbierano górną warstwę, mającą konsystencję galaretowatą, zapomocą łyżeczki, dolną zaś ściągano przy pomocy pipety i badano na zawartość lipazy. W tym celu odważano z dolnej warstwy zwykle 20 g i dodawano 5 g kwasu oleinowego. Dla porównania zawartości lipazy w roztworze przed i po adsorpcji, wykonywano zawsze równoległe doświadczenie z 20 g roztworu lipazy, nie poddane adsorpcji, i z 5 g kwasu oleinowego. Jest to t. zw. system porównawczy. Procent adsorbcji lipazy obliczono w ten sposób, że od początkowej szybkości reakcji systemu porównawczego =  $v_1$  odejmowano początkową szybkość reakcji, jaką dają 20 g ściągniętych z dolnej warstwy układu odwirowanego =  $v_2$ .

Różnicę tę dzielono przez początkową szybkość reakcji systemu porównawczego, a otrzymaną w ten sposób liczbę mnożono przez 100.

$$\text{Procent adsorbcji} = \frac{V_1 - V_2}{V_1} \cdot 100.$$

Obraz mikroskopowy odwirowanej emulsji różni się tylko tem od emulsji równomiernie rozsianej w systemie, że po odwirowaniu kuleczki kwasu oleinowego są o wiele gęściej obok siebie położone, aniżeli w emulsji. W wielkości tych kulek niema różnicy.

Doświadczenia te miały wykazać łączność między adsorbcją lipazy a jej aktywnością.

## Doświadczenia.

## 1. Wpływ ilości użytego kwasu oleinowego na stopień adsorbcji.

Doświadczenie to wykonano z roztworem lipazy w 77% glicerynie o  $\text{pH} = 5.8$  Układy wstrząsano przez 10 minut w temperaturze 18° C, poczem tyleż czasu je wirowano. Wyniki doświadczeń podano w tabeli następującej:

Jak widać, już przy użyciu 25% kwasu oleinowego w stosunku do lipazy mamy prawie całkowitą (91%) adsorbcję lipazy. Między ilością użytego kwasu a adsorbcją istnieje pewna proporcjonalność, co zostaje uwidocznione na rysunku 2. **BIN**

Tabela IX.

Wpływ kwasu oleinowego na stopień adsorpcji.  
*Influence of relative quantity of oleic acid taken on degree of adsorption.*

		Trwanie reakcji w godz. <i>Time t. h.</i>	$v_2$ w milimolach $v_2$ in millimoles	$v_2/t$	$\frac{(v_1-v_2)}{v_1} \cdot 100$
1	Do 40 g roztworu lipazy dod. 10 g kwasu <i>To 40 g lipase solut. added 10 g oleic ac.</i>	5.0	22.1	4.4	91
2	" " " " " " "	20.0	95	4.7	90
3	" " " " " 4 g "	4.0	106	26	49
4	" " " " " 1.2 g "	4.0	152	38	26
5	System porówn.: 20 g lipazy + 5 g kwasu <i>Comparative system 20 g original extract + 5 g oleic acid</i>	3.7	$v_1=188$	$v_1/t=51$	0

## II. Badania nad szybkością adsorpcji i nad wpływem temperatury na równowagę adsorpcyjną.

40 g roztworu lipazy o 72% gliceryny wstrząsano z 1.2 g kwasu oleinowego w różnych temperaturach i przez różny okres czasu. Wirowano 8'.

Tabela X.

Wpływ temperatury i czasu wstrząsania na stopień adsorpcji.  
*Velocity of adsorption and influence of temp. on the degree of adsorption.*

	Doświadczenie <i>Experiment</i>	Czas reakcji <i>Time t. h.</i>	$V_2$	$V_2/t$	$\frac{V_1-V_2}{V_1} \cdot 100$
1	Wstrząsano 20' przy 18° C <i>Shaken 20 min. at 18° C</i>	6 godz.	168	28.0	22
2	" 5' " 18° C	"	157	26.0	27
3	" 1' " 18° C	"	161	27.0	25
4	" 20' " 28° C	"	148	24.7	31
5	" 20' " 38° C	"	150	25.0	30
6	" 1' " 38° C	"	148	24.7	31
7	System porównawczy: <i>Comparative system: 20 g original lipase extract, 5 g oleic acid</i>	"	$V_1=215$	$V_1/t=39$	0



W granicach czasu, w jakich zostały przeprowadzone doświadczenia, nie można było uchwycić czasu adsorbowania się lipazy. Już po jednoninutowem wstrząsaniu i 8 minutowem wirowaniu osiągnęliśmy zupełną równowagę adsorbacyjną. Procent adsorpcji lipazy powiększył się tylko nieznacznie skutkiem podwyższenia temperatury.

### III. Czy zadsorbowana lipaza jest czynna?

Dla wykazania zachowania się lipazy zadsorbowanej użyto do adsorpcji dwa następujące układy: 1) 40 g roztworu lipazy w 72% glicerynie i 10 g kwasu oleinowego; 2) 20 g roztworu lipazy i 10 g kwasu. Te dwa układy wstrząsano przez 10' i wirowano 10'. Po odwirowaniu emulsji przeniesiono ostrożnie górną warstwę z każdego układu z osobna przy pomocy łyżki do dwóch kolbek, zawierających po 40 g 86.4% gliceryny. i z 10 g kwasu oleinowego, pochodzącego z górnej warstwy odwirowanej z pierwszego układu, druga zaś z 40 g 88.4% gliceryny i z 10 g kwasu, pochodzącego z drugiego układu.

Z poprzednich doświadczeń wynika, że stopień adsorpcji lipazy w tych dwóch układach powinien sięgać ponad 90%, było zatem do przewidzenia, że ilość zadsorbowanej lipazy na kuleczkach emulsji (kwasu) będzie w 1 układzie około 2 razy większa, aniżeli w układzie drugim.

Tabela XI.

Aktywność zadsorbowanej lipazy.  
*Activity of adsorbed lipase.*

Dośw. <i>Exper.</i>	Czas $t$ reakcji <i>Time <math>t</math>. in h</i>	mmol = $v$	$v/t$	Stosunek obu szybkości <i>Ratio of velocities</i>
1	4 godz.	216	54	54 : 29 = 1.86
2	„	117	29	—

W pierwszej próbie reakcja przebiega 1.86 razy szybciej, aniżeli w drugiej. Mamy więc wielkie przybliżenie do teoretycznego przewidzianego rezultatu.

Z tego doświadczenia wynika, po pierwsze, że zadsorbowana lipaza jest czynna, po drugie zaś, że między ilością zadsorbowanej lipazy a początkową szybkością reakcji istnieje proporcjonalność.

Reakcje w próbie 1 doprowadzono do stanu równowagi i otrzymano  $K = 2.32$ .

#### IV. Wpływ 48-godzinnego trwania emulsji w różnych temperaturach na stopień adsorpcji.

W pierwszych doświadczeniach nad wpływem wielkości powierzchni okazało się, że reakcja przybiera w drugim tygodniu na szybkości; krzywa reakcji otrzymała charakter krzywej auto-katalitycznej.

W następnych doświadczeniach chodziło o stwierdzenie, czy w przypadkach, w których lipaza została niecałkowicie zadsorbowana, reszta lipazy pozostającej w roztworze glicerynowo-wodnym nie bywa również odkładana w jakiś inny sposób na powierzchni kulek kwasu oleinowego.

W tym celu wytworzono emulsję 1.2 g kwasu oleinowego w 40 g roztworu lipazy w 72% glicerynie i pozostawiono ją w rozdzielaczach przez 48 godzin w różnych temperaturach. Po dwóch dniach kuleczki kwasu zajęły w rozdzielaczach położenie w górnej połowie płynu. Badano dolną warstwę na zawartość lipazy. W tych przypadkach o inaktywacji lipazy nie może być mowy. Jak wiadomo z pierwszych doświadczeń, lipaza w formie błon zachowała aktywność nawet po trzech miesiącach.

### Tabela XII.

Drugi okres adsorpcji.  
Second period of sorption.

	Temperatura <i>Temperature</i>	Trwanie emulsji <i>Duration of emul.</i>	czas <i>t</i> <i>Time t. h.</i>	Mmol	Mmol/ <i>t</i>	% zniknięcia lipazy z roz- tworu % <i>elimin. of</i> <i>lipase from sol.</i>
1	18° C	20 minut <i>min.</i>	4 godz.	110	27.5	23%
2	18° C	48 godz. <i>hrs.</i>	4 "	99	25	31%
3	38° C	20 minut <i>min.</i>	4 "	104	26.0	27%
4	38° C	48 godz. <i>hrs.</i>	4 "	47	17.8	67%
5	System porówn. <i>Comparative</i> <i>system</i>	—	4 "	144	36.0	0

Jak widać z tabeli, dalsze wychwytywanie lipazy jest zależne w dużej mierze od temperatury i odbywa się wolniej. Różnica w stopniu zniknięcia lipazy z ośrodka wodnego w drugim okresie adsorbcyjnym wynosi przy 18° C  $31 - 23 = 8\%$ , przy 38° C  $67\% - 27 = 40\%$ . A więc wychwycenie lipazy przez kuleczki w 38° C jest 5 razy większe, niż w 18° C.

V. Zależność między ilością użytego kwasu oleinowego a wychwyconą ilością lipazy w drugim okresie znikania lipazy z roztworu.

Roztwór lipazy zawierał 77% gliceryny. Doświadczenie wykonano identycznie jak pod IV. Dla porównania z wynikami otrzymanymi pod I, zestawiono je razem z otrzymanymi obecnie w tabeli XIII i na rysunku 2.

Tabela XIII.

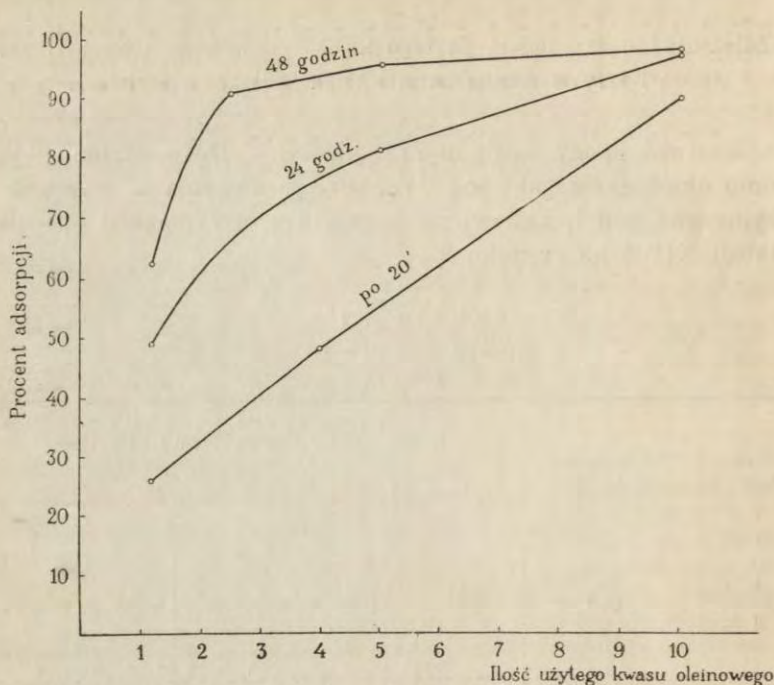
Procent adsorpcji lipazy.  
Percent. adsorption of lipase.

Doświadcz. <i>Exper.</i>	Kw. oleinowy <i>Oleic acid</i>	Trwanie emulsji <i>Duration of emulsion</i>		
		Okres <i>Period</i> I	Okres <i>Period</i> II	
		20 minut <i>min.</i>	24 godz. <i>hrs.</i>	48 godz. <i>hrs.</i>
1	1.2	26	49	65
2	2.5	—	—	91
3	4	49	—	—
4	5	—	82	96
5	10	91	98	99

Z tych danych widzimy, że w późniejszym okresie (adsorpcji) powolnego wychwytywania lipazy z roztworu mamy do czynienia z innym czynnikiem, aniżeli z adsorpcją, ponieważ: po pierwsze — znikanie lipazy z roztworu odbywa się w porównaniu do pierwszego okresu bardzo powoli, po drugie — jest ono zależne od temperatury.

Zestawiając powyższe z danymi doświadczalnymi pierwszych w tej pracy wykonanych badań, można wywnioskować, że drugi okres adsorpcji lipazy polega na tworzeniu się na granicy faz błon, zawierających lipazę.

Ponieważ we wszystkich następnych doświadczeniach kinetycznych używano takiej ilości kwasu oleinowego, że bezpośrednio po utworzeniu emulsji, a więc w pierwszym okresie adsorpcji znikła prawie cała ilość lipazy dlatego zrozumiałem się staję, że nie mamy w tych doświadczeniach szybkości reakcji proporcjonalnej do powierzchni faz, i że nie znajdujemy autokatalicznego przyspieszenia reakcji, jak to miało miejsce w pierw-



Rys. 2. Związek pomiędzy adsorbcją a czasem trwania emulsji.

Fig. 2. Relation between percentage adsorption and time of duration of emulsion.

I. 20 min.; II. 24 godz. hrs.; III. 48 godz. hrs.

szych doświadczeniach w czasie przebiegu reakcji.

#### VI. Badania nad odwracalnością adsorbpcji lipazy.

40 g roztworu lipazy w 72% glicerynie wstrząsano z 4 g kwasu oleinowego przez 10 minut (doświadczenie 1). Po następnem 10 minutowem wirowaniu wstrząsano zebraną górną warstwę odcentryfugowanego kwasu oleinowego z 40 g 72% gliceryny (b). Dolną warstwę (centryfugat b) po odwirowaniu zbadano na zawartość lipazy, używając do tego celu 20 g centryfugatu i 5 g nowej porcji kwasu oleinowego (tabela XIV, dośw. 2). Po ponownem odwirowaniu tych 4 g kwasu oleinowego, a przeniesionych do 40 g 72% gliceryny (c), oznaczono zawartość lipazy, eluowanej w centryfugacie (w 72% glicerynie) (Tabela XIV, dośw. 3).

Drugie doświadczenie przeprowadzono identycznie — jedynie końcowo zamiast 72 procentowej gliceryny, użyto do elucji 88.4% gliceryny (tab. XIV dośw. 4).

Ażeby skonstatować, czy końcowa równowaga adsorpcyjna będzie jednakowa niezależnie od tego, z jakiego początkowego układu się wyszło: czy od lipazy, będącej w układzie w całości zaadsorbowaną, czy też od lipazy, będącej tylko w roztworze, zbadano stopień adsorpcji lipazy w początkowym stężeniu, odpowiedniem do ilości zaadsorbowanej lipazy w doświadczeniu 2, t. zn. w stężeniu 44% poprzednich stężeń lipazy (tab. XIV, dośw. 6).

Tabela XIV.

Odwracalność adsorpcji lipazy.  
*Reversibility of the adsorption of lipase.*

№ doświadczenia № of experiment	Opis doświadczenia Condition of experiment	Zawartość lipazy w milimolach zsyntetyzowanego oleianu na 1000 g emulsji <i>Combined oleic ac. millimoles per 1000 g emulsion</i>	% adsorpcji % adsorption	% elucji % elution
1	System porównawczy dla doświadczenia: 2–5 g kw. olein. wstrząsano 4 godz. z 20 g wyciągu glicerynowego lipazy przy 38° C. Oznaczono stopień syntezy	144	—	—
2	4 g kw. olein. wstrząsano z 40 g wyciągu lipazy, następnie je odwirowano. Do 20-go centryfugatu dodano świeżych 5 g kw. olein., wstrząsano przez 4 godz. przy 38° C. Oznaczono stopień syntezy	81.7	43.3	—
3	4 g kw. olein. wstrząsano z 40 g wyciągu lipazy, odwirowano, następnie powtórnie wstrząsano z 40 g 72% gliceryny i odwirowano. 20 g ostatniego centryfugatu wstrząsano z 5 g kw. oleinowego przez 4 godz. przy 38° C. Oznaczono stopień syntezy.	19.9	68	32
4	Jak dośw. 3, lecz do elucji użyto nie 72%, tylko 88.4% gliceryny. Większa synteza, gdyż większe stężenie gliceryny.	37	—	—
5	Jak dośw. 1, tylko stężenie lipazy wynosi 44% stężenia w 1.	59.7	—	—
6	Jak dośw. 2, tylko stężenie lipazy wynosi 44% stężenia w dośw.	24.3	59	—

Z początkowego przebiegu reakcji w dośw. 1) i 2) obliczono procent adsorpcji:  $100 \frac{144-81,7}{144} = 43.3\%$ .

To samo uczyniono z doświadczeniami 5) i 6):  $100 \frac{59,7-24,3}{59,7} = 59\%$ . W tych ostatnich doświadczeniach stężenie lipazy byłoby równe stężeniu jej w dośw. 3), gdyby elucja lipazy była całkowitą.

Z danych doświadczenia 1) 2) i 3) obliczono % elucji w cłośw.

$$3) : 100 - 100 \frac{(144 - 81.7) - 19.9}{144 - 81.7} = 32\%$$

Z doświadczeń 3) i 6) można wywnioskować, że adsorpcja jest po części odwracalna. Gdy wyszło się z systemu, zawierającego lipazę w formie zaadsorbowanej, pozostało 68% lipazy na adsorbencie, a gdy się wyszło przeciwnie z układu, który zawierał tylko rozpuszczoną lipazę, to pozostało końcowo 59% lipazy zaadsorbowanej.

Z tych doświadczeń wynika dalej, że stopień adsorpcji jest większy przy mniejszym stężeniu lipazy (44% stężenia). W doświadczeniu 6.) (adsorpcja = 59%, w doświadczeniu zaś 2) = 43.3%.

#### W n i o s k i.

1. Lipaza działa w systemie: roztwór glicerynowy lipazy + kwas oleinowy w sferze granicznej między fazą wodną i tłuszczową. Po zetknięciu się obu faz, na początku reakcji, lipaza rozpuszczona w ośrodku wodnym znika z tego ośrodka i gromadzi się na granicy faz. Gromadzenie to odbywa się w dwojaki sposób. Po pierwsze, w charakterze adsorpcji, ponieważ gromadzenie to odbywa się bardzo szybko i mało jest zależne od temperatury. Lipaza tak zaadsorbowana jest czynna i istnieje proporcjonalność między ilością zaadsorbowanej lipazy a stopniem jej działania.

Drugi sposób gromadzenia polega na tworzeniu się błony na granicy faz, jak tego dowodzą—po pierwsze—doświadczenia, wykonane przy użyciu małych powierzchni stykających się faz, a po drugie, powolne znikanie lipazy w drugim okresie adsorpcji z ośrodka wodnego i zależność tego znikania od temperatury.

2. Wpływ powierzchni na szybkość reakcji występuje tylko przy stosunkowo bardzo małych powierzchniach odgraniczających fazy, gdy wielka ilość lipazy jest nagromadzona na małej przestrzeni. Wtedy z pewnością czynnik dyfuzji i czas tworzenia się błony wpływają na szybkość. Porównywując dane z doświadczeniami nad powierzchniami, możemy w przybliżeniu obliczyć,

jakie minimum powierzchni trzebaby użyć w tych ostatnich doświadczeniach, ażeby cała ilość lipazy została zaabsorbowana w pierwszym okresie adsorpcji. Z pierwszego doświadczenia nad adsorpcją wynika, że przy użyciu roztworu lipazy i kwasu oleinowego w stosunku jak 4:1, mamy prawie całkowitą adsorpcję lipazy: 1 g kwasu oleinowego w emulsji rozpościera 0.14 m<sup>2</sup> powierzchni. A więc używając fazy wodnej w ilości, jakiej użyto w pierwszych doświadczeniach, t. zn. około 220 g, trzeba dodać 55 g kwasu oleinowego, czyli stworzyć przynajmniej 7.7 m<sup>2</sup> powierzchni, aby cała ilość lipazy rozpuszczonej w roztworze glicerynowym adsorbowała się w pierwszym okresie na powierzchni.

Z tego widać, że w doświadczeniu pierwszym pod c) tylko 1/200 część lipazy zaadsorbowała się w pierwszym okresie; reszta lipazy musiała gromadzić się później podczas tworzenia się błony. Jeśli się przyjmie, że w doświadczeniu d) cała lipaza jest czynna, to można obliczyć, jaka część lipazy jest czynna w doświadczeniu c).

W drugim tygodniu w doświadczeniu c) mamy 35 milimolów estryfikowanych dziennie. W doświadczeniu d) zsyntetyzowało się estru w pierwszym dniu 193 milimolów. Z tego wynika, że 1/5 część lipazy z dośw. d) jest czynną w dośw. c).

Ponieważ grubość błony na granicy faz w dośw. c) wynosiła około 3 mm, a lipaza jest prawdopodobnie w tej błonie równomiernie rozprzestrzeniona, dlatego trzeba przyjąć, że przynajmniej 0.6 mm, górnej warstwy tej błony musiała być czynną. Biorąc i to pod uwagę, że przy przelewaniu układów w dośw. 1) niniejszej pracy błona ulegała przerwaniam i że mimo to błona ta nie zmieniała swej czynności, trudno sobie wyobrazić, w jaki sposób następował transport kwasu oleinowego do tych błon, i z powrotem — oleinjanu do ośrodka tłuszczowego. Przenoszenie takie musiałyby się odbywać, gdyby się przyjęło koncepcję tworzenia się pośredniczących związków enzym-substrat.

W dodatku pod mikroskopem w błonach, będących w fazie wodnej, nie zauważono kulek barwiących się sudanem. Na podstawie tych doświadczeń, narazie trudno stworzyć sobie obraz mikromechanizmu działania lipazy.

Składam niniejszem szczere podziękowanie Panu Profesorowi Stanisławowi Przyłęckiemu za udzielone rady i cenne wska-

zówki w czasie wykonywania tej pracy. Również dziękuję Panu D-rowskiemu Ryszardowi Truszkowskiemu za wydatną koleżeńską pomoc.

### S t r e s z c z e n i e .

Badania nad układem: kwas oleinowy, gliceryna, woda i lipaza rozpuszczona dały następujące wyniki:

1°. Lipaza ulega adsorpcji na granicy faz wodnej i tłuszczowej w dwóch okresach. W pierwszym odbywa się ta adsorpcja bardzo szybko i ilość zadsorbowanej lipazy jest prawie niezależna od temperatury. Drugi okres polega na tworzeniu się błony, zawierającej czynną lipazę. Ten drugi proces odbywa się bardzo powoli i jest 5 razy szybszy w 38° C, niż w 18° C. Błona ta daje reakcję MILLONA, biuretową i bardzo słabą reakcję MOLISCHA.

2°. Adsorpcja w pierwszym okresie jest po części odwracalna.

3°. Tylko zadsorbowana lipaza działa. Dlatego w systemach, w których użyto małe powierzchnie stykających się faz, szybkość reakcji estryfikacji jest proporcjonalna do wielkości i powierzchni.

4°. Przy stosowaniu wielkich powierzchni przez stworzenie emulsji cała ilość lipazy zostaje momentalnie w pierwszym okresie zadsorbowana i wtedy wielkość powierzchni nie odgrywa roli w szybkości estryfikacji.

5°. Mimo że system jest makroheterogeniczny i że już w początkach sama reakcja hydrolizy ulega z przyczyn niewiadomych hamowaniu, jednak przebieg reakcji syntezy odpowiada wzorowi kinetycznemu dla reakcji dwucząsteczkowych i odwracalnych.

6°. Początkowa szybkość reakcji estryfikacji jest proporcjonalna do ilości kwasu oleinowego.

7°. Zwiększenie stężenia gliceryny przyspiesza w znacznym stopniu reakcję, co pochodzi tylko z przesunięcia stałej równowagi w kierunku zwiększonej syntezy. Stała równowagi

$$K = \frac{[K\omega]}{[ester]}$$
 jest zależna od stężenia gliceryny.

8°. Początkowa szybkość reakcji jest proporcjonalna do stężenia enzymu.



9<sup>o</sup>. Stała równowagi  $K = \frac{[Kwas]}{[ester]}$  jest przy nadmiarze gliceryny i wody niezależna od wielkości powierzchni zetknięcia się faz, od ilości użytego roztworu glicerynowego lipazy, od stężenia lipazy i od ilości użytego kwasu oleinowego.

#### Piśmiennictwo.

Euler H. 1928. Allgemeine Chemie der Enzyme. Berlin. Mellanby i Wooley. 1914. Journ. of Physiol. 48 (287). Langmuir. 1916. The fundamental properties of liquids. (London). Oppenheimer C. 1925. Die Fermente und ihre Wirkungen. V wydanie. Leipzig. Rideal E. K. 1926. Surface Chemistry. Cambridge. Rona i Bien. 1914. Biochem. Zeitschr. 59 (100). Willstätter R. i Memmen F. 1923. Zur stalagmometrischen Bestimmung der lipatischen Tributyrinhydrolyse. Z. physiol. Chem. 129 (1). Willstätter R. i Memmen F. 1924. Über die Wirkung der Pankreaslipase auf verschiedene Substrate. Z. physiol. Chem. 133 (229). Willstätter R. i Memmen F. 1924. Vergleich von Magenlipase mit Pankreaslipase. Z. physiol. Chem. 133 (247). Willstätter R. i Waldschmidt-Leitz E. 1923. Über Pankreaslipase. Z. physiol. Chem. 125 (132). Willstätter R., Waldschmidt-Leitz E. i Memmen F. 1923. Bestimmung der pankreatischen Fettspaltung. Z. physiol. Chem. 125 (93).



[Zakład Patologii Ogólnej i Doświadczalnej Uniwersytetu Jagiellońskiego]  
Dyrektor: Prof. Dr. K. Klecki.

Hugon Kowarzyk.

**Promieniowania mitogenetyczne, a wpływ ciał lotnych ze  
zmiażdżonych tkanek cebuli na zjawiska koloidalne.**

*Über die Fernwirkung von Zwiebelsohlenbrei auf Kolloide und  
über den Nachweis mitogenetischer Strahlungen.*

Rękopis nadesłany w dniu 21. XI. 1930 r.

Bekanntlich stösst der physikalische Nachweis mitogenetischer Strahlungen auf grosse Schwierigkeiten. Dieser Umstand bewirkt es, dass die Existenz dieser Strahlungen, trotz vieler dafür sprechenden Befunde oft für unbewiesen erklärt wird.

STEMPELL'S ('29, '30) Behauptung, die biologischen Strahlungen wären durch ihre ausgeprägte Wirkung auf die LIESEGANGSCHE Ringbildung leicht feststellbar, müsste, falls sie sich als zutreffend erweisen würde, die bisher wohl mit Recht erhobenen Einwände ungültig machen. Im Folgenden wird über Untersuchungen berichtet, die den Mechanismus der von STEMPPELL entdeckten Fernwirkung von Zwiebelsohlenbrei auf die LIESEGANGSCHEN Ringe gewissermassen aufklären.

STEMPELL liess Zwiebelsohlenbrei aus kleinen Entfernungen auf die LIESEGANGSCHE Ringbildung einwirken, wobei er eine Zwischenwand aus Cellophan, Quarzglas und Uviolglas benutzte. Eine chemische Wirkung flüchtiger Stoffe, die möglicherweise von dem Zwiebelsohlenbrei ausgeschieden würden und die Ringbildung stören könnten, suchte er dadurch auszuschliessen, dass er einen Luftzug zwischen Brei und Gelatine durchliess, oder den Brei in anscheinend gasdichte Gefässchen brachte. STEMPPELL beobachtete ungefähr an dieser Stelle, wo die Strahlen einfallen sollten, Ringstörungen, vollkommen ungeordnete Niederschläge des Silberbichromats, in bestgelungenen Fällen eine gelbliche Ver-

färbung der Gelatine. Auch eine Verbesserung der Ringbildung in Dunkelversuchen ist nach STEPELL auf eine Strahlungswirkung zurückzuführen. In seiner zweiten Mitteilung vermutet STEPELL, dass die mitogenetischen Strahlen der flüchtigen, von der Zwiebel ausgetriebenen Stoffe gewissermassen als Katalysatoren bedürfen, um wirken zu können.

Eine Reihe von Autoren hat die Versuchsanordnung von STEPELL nachgeprüft und die Befunde bestätigt, jedoch haben CLUZET und KOFMAN ('30) unregelmässige Resultate erhalten, wobei statt der gelblichen Gelatineverfärbung milchige Flecke entstanden sind, die sich auch ausserhalb der Wirkungsbereiches der hypothetischen Strahlen erstreckten. Auch auf der von YPSILANTI und PALTAUF ('30) zu ihrer Arbeit beigefügten Photographie ist zwar Ringzerstückelung, aber keine ungeordneten Niederschlagsbrocken und keine Trübung ersichtlich.

Die in vorliegender Arbeit angewandte Versuchsanordnung macht diese Unterschiede in den Befunden leicht erklärbar.

#### Versuchstechnik und Resultate.

In der ersten Versuchsreihe wurde die Fernwirkung des Zwiebelsohlenbreies auf die Koagulationsgeschwindigkeit eines Goldsols (Aurolumbal Witte) geprüft.

In ca 7 cm<sup>3</sup> umfassende Gefässchen wurden 5 cm<sup>3</sup> des Goldsols gebracht, dann mit einem Objektträger aus Quarz oder aus Glas oder mit einer ca 0.8 cm dicken aus Objektträgern bestehenden Glasschicht zugedeckt, nachher frisches, leicht mit destilliertem Wasser befeuchtetes Zwiebelsohlenbrei aufgesetzt, endlich jedes Gefässchen einzeln unter eine Glasglocke gestellt. Einige Gefässchen (meist drei) wurden als Kontrolle ohne Zwiebelbrei belassen.

Nach einer halben Stunden wurde jedes Gefässchen mit 1 cm<sup>3</sup> Elektrolytlösung (5 cm<sup>3</sup> gesättigte KCl-Lösung auf 100 verdünnt) versetzt und die Kolloidlösung genau nach einer Minute mittels 3 Tropfen 10% Gelatinelösung stabilisiert.

Es ergab sich eine ausgeprägte Koagulationsbeschleunigung in allen Versuchsgefässchen, die sich in blauer Verfärbung des Sols kundgab, während die Kontrollen eine mehr violette Färbung annahmen. Im Spectroskope zeigte die Versuchslösung eine erhöhte

Durchlässigkeit für kurze Wellenlängen. Potentiometrisch liess sich auch bei einstündiger Versuchsdauer keine pH Verschiebung feststellen.

In weiteren Versuchen wurde die Fernwirkung in Gefässchen beobachtet, in denen der Brei zwecks Ausschliessung von chemischen Einflüssen vermeintlich gasdicht vermittelst Paraffin abgeschlossen war. Auch hier liess sich die Fernwirkung des Breies obwohl weniger prägnant, jedoch absolut deutlich wahrnehmen. Diese Wirkung liess sich nicht mehr beobachten, als ich den Brei derartig abgeschlossen habe, dass die ausgeschiedenen flüchtigen Stoffe durch Paraffin und eine Schicht Ringerlösung durchdringen müssten, um zur Goldlösung zu gelangen, wogegen die Strahlen durch eine dünne Quarzwand freien Weg hatten.

Aus diesen Versuchen folgt, dass nur die flüchtigen Stoffe des Zwiebelsohlenbreies eine ausgeprägte Wirkung auf die Koagulation der Kolloide ausüben.

In einer zweiten Versuchsreihe habe ich mich der auf der beigefügten Zeichnung schematisch dargestellten Apparatur bedient. Die flüchtigen Stoffe des Zwiebelsohlenbreies wurden mittelst eines schwachen Luftzuges der Wirkungsstelle zugeführt. Die Möglichkeit einer Mitwirkung von biologischen Strahlungen war bei dieser Anordnung vollkommen ausgeschlossen. Der schwache Luftzug allein (es wurden während einer 4 stündigen Versuchsdauer ca 300 cm<sup>3</sup> Luft durchgelassen) hatte keinen bemerkbaren Einfluss auf die Ringbildung. (In einem Falle bei einem etwa 2-mal stärkeren Luftzuge sah ich eine kaum bemerkbare Besserung der Ringbildung eintreten.)

Der Versuch wurde mit und ohne Zwiebelsohlenbrei insgesamt beinahe 100 Mal wiederholt. Es wurden für jeden Versuch die Sohlen von 3 Zwiebeln zermalmt und mit destilliertem Wasser ein wenig befeuchtet. Während des Versuches wurde der Brei nicht erneuert.

Die Ringbildung begann auf der dem Zwiebelbrei zugewendeten Seite. Nach einer Stunde erschien ein milchiger Überzug auf den Niederschlägen, nach weiteren 2 bis 4 Stunden erschien die dem knieförmiggebogenen Röhrchen fast genau entsprechende Stelle zuerst gelblich, dann dunkelbraun gefärbt. Die Ringbildung fehlte an der betreffenden Stelle, dagegen kam es zur

vollkommen ungeordneten Niederschlagsbildung. In den ersten Versuchen, in denen der Luftzug ca. 2 Mal stärker war, sah ich keine Trübungen und keine Niederschlagsbrocken, sondern bloss Ringzerstückelungen.

Bei zu dick ausgefallener Gelatineschicht, bei der es statt zur Ringbildung zu einer homogenen Niederschlagsbildung kam sah ich eine gewaltige Ringbildungsverbesserung, die sich an beiden Seiten des sandkornförmigen Niederschlages, des gelblichen Fleckes und der diese Gebilde umfassenden weissen Trübung ausbreitete.

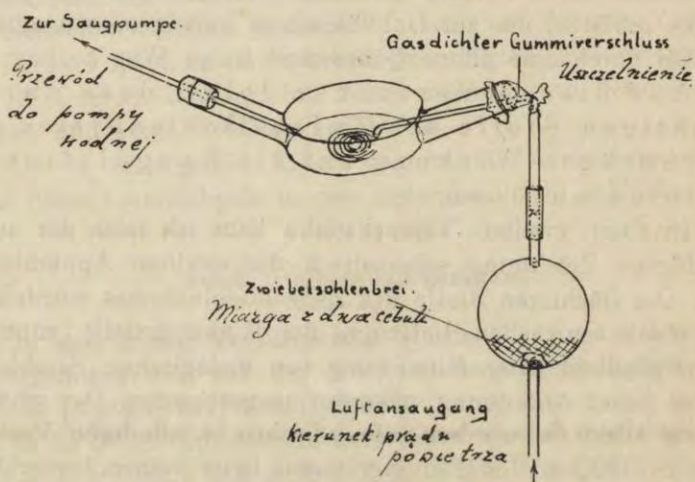


Fig. 1. Apparatur zur Darstellung der Fernwirkung von Zwiebelsohlenbrei auf die Liesegang'schen Ringe. Auf der Figur ist eine kleine Einrichtung zur Schätzung des Luftzuges nicht eingezeichnet.

Rys. 1. Schemat urządzenia, służącego do wykazania działania ciał lotnych miazgi cebuli na zjawisko Liesegang'a.

Diese Versuche beweisen, dass die flüchtigen Stoffe des Zwiebelsohlenbreies eine störende Wirkung auf die Liesegang'sche Ringbildung ausüben, die derjenigen die von STEPELL und den Nachuntersuchern beschrieben wurde, sehr ähnlich ist. Die verschiedenen Ringbildungsstörungen können auf die Ausscheidung von mehreren Stoffen aus dem Zwiebelbreie, oder auf die Wirkung desselben Stoffes in verschiedenen Konzentrationen zurückgeführt werden.

In 2 Versuchen wurde der Einfluss ultravioletter Strahlen auf die LIESEGANG'sche Ringbildung geprüft. In verschiedenen Abständen wurden die Objekte mit dem ungeschirmten Lichte einer „HÖHENSONNE“ der HANAUSCHEN Quarzlampengesellschaft anderhalb Stunden lang belichtet. Im Vergleich zur Dunkelkontrolle fand ich die Ringe besser und regelmässiger geformt. Im Vergleich zu Kontrollen, die in demselben Zimmer auf diese Weise aufgestellt waren, dass das Licht der Lampe nicht direkt einfallen konnte, war die Zahl der Ringe verringert, auch waren die Ringe etwas breiter. Die Wirkung war bei einem Abstand von 3 m nicht mehr beobachtbar.

Es ist hervorzuheben, dass die LIESEGANG'sche Ringbildung einen auf ultraviolette Strahlungen wenig empfindlichen Vorgang darstellt und aus dem Grunde für die mitogenetischen Strahlungsversuche nicht geeignet ist.

#### Besprechung der Resultate.

STEMPELL hat in seiner ersten Arbeit die beobachteten Ringstörungen gänzlich als Strahlungswirkung zu erklären gesucht. In seiner zweiten Arbeit berichtet er jedoch über Versuche, die bei einem gasdichten Verschlusse des Breies unregelmässige, im allgemeinen negative Resultate ergeben hatten. STEMPPELL glaubt von seiner zuerst ausgesprochenen Meinung nicht absehen zu müssen und nimmt an, dass die hypothetische Strahlung eines katalytisch wirkenden, flüchtigen Stoffes bedarf, um wirken zu können. Demgegenüber ist festzustellen, dass die flüchtigen Zwiebelstoffe ihre ausgesprochene Wirkung allein, ohne Strahlungsfaktor ausüben, keinesfalls daher als Katalysatoren angesehen werden müssen. Die Annahme von mitwirkenden Strahlen ist daher überflüssig und experimentell unbegründet. Es könnte noch angenommen werden, die Strahlenwirkung würde nur von der chemischen Wirkung verdeckt, bei Ausschliessung dieses Faktors jedoch gut erkennbar sein, dagegen spricht aber die kleine Empfindlichkeit der LIESEGANG'schen Ringbildung für ultraviolette Strahlen. Auch die im allgemeinen negativen Versuche STEMPPELL's bei gasdichtem Abschluss des Breies und meine negativen Resultate mit dem Goldsol, sowie die negativen Versuche von

YPSILANTI und PALTAUF mit verschiedenen Geschwülsten beweisen die Unrichtigkeit dieser Annahme.

#### Zusammenfassung.

Die von STEPELL entdeckte Fernwirkung des Zwiebelsohlenbreies auf die LIESEGANG'sche Ringbildung wird durch flüchtige, von der Zwiebel ausgeschiedene Stoffe bedingt. Zwiebelsohlenbrei übt eine ähnliche Fernwirkung auf das Goldsol im Sinne einer Beschleunigung der Elektrolytfällung aus. Die LIESEGANG'sche Ringbildung ist ein für ultraviolette Strahlen wenig empfindlicher Vorgang und daher für den Nachweis der GURWITSCHstrahlen ungeeignet.

#### Anmerkung bei der Korrektur:

Inzwischen sind die Arbeiten von CZAJA (Biol. Zblatt, 50, 577) und TOKIN (Biol. Zblatt, 50, 641) deren Ergebnisse im wesentlichen mit den meinigen übereinstimmen, veröffentlicht worden. Es sei hier hervorgehoben, dass die genannten Autoren keine Ringbildungsverbesserung beobachtet haben, diejenige dagegen meinen Beobachtungen nach, regelmässig und in ausgesprochener Weise auf der, der Gaswirkung am meisten ausgesetzten Seite, zum Vorschein kam, in denjenigen Zwiebelsohlenversuchen in denen statt Ringentwicklung die Bildung von tiefbraunen, homogenen Niederschlägen erfolgte. Diese Abweichung in den Befunden darf wohl auf Unterschiede in der Versuchsanordnung zurückgeführt werden.

#### Literaturverzeichnis.

Gluzet u. Kofman. 1930. De l'action des différentes radiations sur les anneaux de Liesegang. C. R. Soc. de Biol. 104, № 24 (1001). Frank, Baron, cit. nach A. Gurwitsch. „Protoplasma“ 9 (343). v. Romberg cit. nach Stempell l. c. ('30). Stempell W. 1929. Nachweis der vom frischen Zwiebelsohlenbrei ausgesandten Strahlen. Biol. Zentralbl. 49 (607). Stempell W. 1930. Notiz über die Wirkung frischen Zwiebelsohlenbreies auf die Bildung Liesegang'scher Ringe. Diese Arbeit sollte ausführlicher im „Protoplasma“ erscheinen war mir aber bis jetzt leider unzugänglich. Biol. Zentralbl. 50 (248). Ypsilanti u. Paltauf. 1930. Zur Frage des Nachweises von Wachstumstrahlen. Zeitschr. f. Krebsforschg. H. 4 (372).



## Streszczenie.

Dokoła kropli roztworu azotanu srebra, umieszczonej na powierzchni skrzeplej żelatyny, przepojonej dwuchromianem amonu, powstaje szereg regularnych, koncentrycznych warstw, t. zw. pierścieni LIESEGANGA, okresowo się osadzającego dwuchromianu srebra. Zjawisko to ulega charakterystycznemu zaburzeniu pod wpływem miazgi z dna cebuli, umieszczonej w niedużej odległości od powierzchni żelatyny i oddzielonej od niej szybką z kwarcu, papieru cellofanowego i t. p. STEPELL ('29), który te zaburzenia pierwszy opisał, twierdzi, że one są wyrazem działania promieni wykrytych przez GURWITSCHA, które miazga taka wysyła i przypuszcza, że zjawisko LIESEGANGA może służyć jako nieorganiczny detektor tego rodzaju promieni i uzyskać duże znaczenie dla badań w dziedzinie promieniotwórczości biologicznej. W późniejszych swych doświadczeniach natomiast, spostrzegł STEPELL ('30), że tego rodzaju zaburzenia występują nieregularnie, o ile miazga była zamknięta w naczynkach rzekomo zupełnie szczelnych i podaje hipotezę, że ciała lotne, wydzielane przez cebulę, potęgują i wzmacniają na podobieństwo katalizatorów działanie promieni biologicznych na pierścienie LIESEGANGA.

W pracy niniejszej wykazuję, że ciała lotne wydzielane ze zmiążdżonych tkanek z dna cebuli wywołują same, bez współdziałania promieniowań mitogenetycznych zaburzenia w powstawaniu pierścieni LIESEGANGA identyczne z zaburzeniami opisanymi przez STEPELLA. Ciała lotne zmiążdżonych tkanek cebuli wzmagają również szybkość wytrącania się złota koloidalnego, co rzuca pewne światło na mechanizm zjawiska opisanego przez STEPELLA. Doświadczenia wykonane nad wpływem promieniowań lampy kwarcowej na powstawanie pierścieni LIESEGANGA dowodzą małej wrażliwości tego procesu na promienie nadfioletowe. Również charakter zaburzeń, jakie tutaj powstają, jest odmienny niż w zjawisku STEPELLA.

Z powyższych doświadczeń wynika, że metoda wykazywania promieni mitogenetycznych na zasadzie ich rzekomego wpływu na pierścienie LIESEGANGA jest oparta na doświadczeniach, w których wpływ ciał lotnych wydzielonych z tkanek cebuli był

niedostatecznie uwzględniony, i że mała wrażliwość pierścieni LIESEGANGA na promieniowania w szczególności ultrafioletowe lampy kwarcowej czyni z nich obiekt, nienadający się do badań nad promieniotwórczością mitogenetyczną.

Przyjęcie, że ciała lotne cebuli oprócz opisanego wyżej działania uczulają ponadto proces LIESEGANGA na działanie promieni biologicznych, nie ma uzasadnienia eksperymentalnego.

[Zakład Chemji Fizjologicznej Uniwersytetu Warszawskiego]

A. Rowińska.

**Badania nad zachowaniem się kwasu moczowego we krwi.**

*Researches on the action of blood on uric acid.*

Rękopis nadesłany w dniu 31. VII. 1930 r.

Haemolysed human or avian blood destroys uric acid. The reaction of decomposition is very sensitive to oxygen; the slightest diminution in the oxygen supply diminishes its velocity. The quantity of uric acid oxidised in unit time is proportional to the amount of blood taken. Unhaemolysed blood does not catalyse the oxidation of uric acid.

---

Zagadnienie rozkładu kwasu moczowego przez tkanki zwierząt, u których nie stwierdzono we krwi urikazy, jest kwestją sporną. Gdy SCHITENCHELM i autorowie amerykańscy, jak FOLIN, BERGLAND i DERICK przypisują krwi tych zwierząt własności urikolityczne, inni, a między nimi GUDZENT ('26) i jego uczniowie, z naszych zaś badaczy PRZYŁĘCKI ('26) odrzucali możliwość rozkładu kwasu moczowego przez krew zwierząt nieposiadających urikazy.

W roku 1926 GAROT wykazał, że zawartość kwasu moczowego we krwi psa ulega znacznemu zmniejszeniu po trawieniu krwi za pomocą pankreatyny. Rozkład tłumaczy GAROT obecnością urikazy we krwi psa. FLATOW w roku 1926 dowodził, że kwas moczowy we krwi ulega utlenianiu i że zjawisko powyższe znacznie się przyspiesza po przepuszczeniu powietrza przez mieszaninę kwasu moczowego i krwi. Czynniki urikolityczne nazwane zostały przez FLATOWA urikoidem. BILTZ i SCHAUDER ('23) i PIAUX

przypuszczali, że czynnikiem, powodującym utlenianie kwasu moczowego, może być jeden z metali jak: żelazo, miedź, mangan, i że hemoglobina krwi zawierająca żelazo będzie najprawdopodobniej tym czynnikiem. Wyniki badań GOMOLIŃSKIEJ (28), przeprowadzone w zakładzie Chemji Fizjologicznej U. W., są zgodne z wynikami prac FLATOWA i innych. Stwierdzają one, że kwas moczowy wprowadzony do krwi zostaje przez nią rozłożony i że rozkład ten zwiększa się podczas przepuszczania tlenu. Ponadto szereg jej doświadczeń wykazuje, że najprawdopodobniej hemoglobina krwi jest decydującym czynnikiem przy utlenianiu kwasu moczowego. Surowica zaś krwi i stromata ciałek czerwonych rozkładu tego nie powodują. Doświadczenia GOMOLIŃSKIEJ wykonywane były na krwi zhemolizowanej.

Praca niniejsza jest zestawieniem szeregu dalszych doświadczeń, które rzucają pewne światło na mechanizm rozkładu kwasu moczowego przez krew. Badano rozpad we krwi ustrojów, pozbawionych urikazy, oraz rolę hemolizy.

#### Część eksperymentalna.

Metoda i materiały. Do doświadczeń brałam krew świeżą, najwyżej w 6 godz. po śmierci zwierzęcia. Zapomocą szczawianu sodu zniesiona była przy pobraniu zdolność krzepnięcia. Do 25 cm<sup>3</sup> tej krwi dodawałam — we wszystkich doświadczeniach z tabeli I, — 10 cm<sup>3</sup> roztworu kwasu moczowego o stężeniu, nie przekraczającym 50 mg %. Doświadczenia zgrupowane w tej tabeli wykonywane były w butelkach litrowych. Wspomnieć jeszcze muszę, że w celu określenia kwasu moczowego strącałam białko krwi metodą FOLINA i WU, t. j. dodawałam 25 cm<sup>3</sup> wolframianu sodu i 25 cm<sup>3</sup> kwasu siarkowego 2/3 n. Kwas moczowy oznaczałam w 4 cm<sup>3</sup> przesączu. Oznaczałam go trzykrotnie: po 3-ch godzinach od nastawiania doświadczenia, po 24-ch i 48 godz.

W tabeli tej są uwzględniane doświadczenia dokonywane w innych warunkach, lecz o tem mówić będę w toku poszczególnych opisów.

1<sup>o</sup>. Sprawdzenie rozkładu kwasu moczowego przez krew kurzą i ludzką. W pierwszych doświadczeniach powtórzyłam badania GAROTA, FLATOWA, BILTZA, SCHAUDERA i GOMOLIŃSKIEJ z tą tylko różnicą, że oni brali do doświadczeń krew końską i psią, ja zaś używałam krew kurzą i ludzką. Okazało się, że krew zhemolizowana ludzka i kurza rozkłada kwas moczowy. Po 24-ch godz. rozłożyło się około 50% pierwotnej ilości kwasu moczowego, po 48 godz. 72%. [Tab. I, doświadczenie 1 i 2].

Tabela I.

Wszystkie próby składają się z 25 cm<sup>3</sup> krwi i 10 cm<sup>3</sup> 0.05% kwasu moczowego.*All systems 25 cc. blood, 10 cc. 0.05% uric acid.*Mg kwasu moczowego w 4 cm<sup>3</sup> przesączu.*Mg uric acid in 4 cc. of filtrate.*

Krew <i>Oxygen of blood</i>	Warunki doświadczenia <i>Conditions of experi- ment</i>	6 godz. <i>6 hours</i>	24 godz. <i>24 hours</i>	% rozłoż. <i>% decomp.</i>	48 godz. <i>48 hours</i>	% rozłoż. <i>% decomp.</i>
1 ludzka <i>human</i>	20 cm <sup>3</sup> krwi, 10 cm <sup>3</sup> kwa- su moczowego nasycon. tlenem <i>20 cc. blood, 10 cc. uric acid saturated with oxy- gen</i>	0.46	0.2	56	ślady <i>traces</i>	100
2 kurza <i>chicken</i>	" "	0.36	0.2	43	wyraźne ślady <i>distinct traces</i>	< 100
3 końska <i>horse</i>	" "	0.44	0.12	74	0	100
4 "	nasycone powietrzem <i>saturated with air</i>	0.55	0.41	25.5	0.15	72.7
5 "	" " 0°	0.55	0.4	27.3	0.34	38.1
6 "	" " toluol	0.5	0.45	10	0.4	20
7 "	" " "	—	0.42	—	0.43	—
8 "	nasycone tlenem, toluol <i>sat. with O<sub>2</sub></i> "	0.39	0.38, <sup>5</sup>	0	0.34	13
9 "	" " thymol	0.38	0.36	5	0.2	47
10 "	gotowany, nasyt. O <sub>2</sub> <i>boiled, sat. O<sub>2</sub></i>	0.4	0.3	25	0.19	52
11 ludzka <i>human</i>	10 cm <sup>3</sup> krwi w małej kolbie, warunki jałowe <i>10 cc blood, in small flask, sterile conditions</i>	0.25	0.25	0	0.25	0
12 kurza <i>chicken</i>	" "	0.17	0.17	0	0.2	0
13 "	przypuszcz. powietrze <i>air passed</i>	0.3	0.15	50	—	—

2°. Wpływ tlenu i temperatury. W dalszych doświadczeniach, wykonanych z krwią końską, zgodnie z badaniami FLATOWA i innych wystąpił wybitny wpływ przyspieszający tlenu. Po 24 godz. w tlenie rozłożyło się 70% kwasu moczowego, po 48 godz. brak było nawet jego śladów (doświadczenie 3, tab. I). Inaczej rzecz się przedstawia w doświadczeniach, wykonanych w powietrzu. Po 24 godz. rozłożyło się zaledwie 25% pierwotnej ilości, a po 48 godz. dopiero 72% (doświadczenie 4, tab. I). Obniżenie temperatury do 0° również zwalniało rozkład kwasu moczowego: w temperaturze 0° po 24 godz. rozłożyło się 27.3%, po 48 godz. 38% pierwotnej ilości (doświadczenie 5, tab. I).

3°. Kwestja istnienia czynnika bakteryjnego. Niezależnie od tego, że badania bakterjologów wskazują, iż krew przez 48 godz. ma własności bakterjobójcze, postanowiłam przez dodanie toluolu wykluczyć możliwość czynników bakteryjnych. Pod wpływem toluolu wstrzymany został wybitnie rozkład kwasu moczowego: po 48 godz. rozłożyło się od 0—20% kwasu moczowego (tab. I, dośw. 6). Przekonałam się jednak, że nie własności bakterjobójcze toluolu są tego przyczyną: toluol jako gatunkowo lżejszy, pływając po powierzchni mieszaniny (krew plus kwas mocz.), oddzielał ją stale od kontaktu z tlenem. Stąd zahamowanie utleniania. W następnem doświadczeniu po dodaniu tymolu utlenianie miało miejsce, choć szybkość była nieco zahamowana: po 24 godz. rozłożyło się 3%, po 48 godz. 49% pierwotnej ilości kwasu moczowego (dośw. 8, tab. I).

Chcąc w inny jeszcze sposób wykluczyć czynnik bakteryjny, gotowałam przed wykonaniem doświadczenia mieszaninę krwi z kwasem moczowym. Wówczas również stwierdzałam zahamowanie szybkości utleniania: po 24 godz. utleniało się 17.5, po 48 godz. 52% (dośw. 9, tab. I). Przyczyną zwolnionego utleniania były najprawdopodobniej zmiany, wynikające ze strącania się białka krwi przy gotowaniu.

Jednocześnie ze wszystkimi powyższymi doświadczeniami badałam zachowanie się mieszaniny wodnej i kwasu moczowego w warunkach tlenu i powietrza bez krwi. Po 48 godz. zmian w składzie procentowym roztworu nie można było wykazać.

4°. Wpływ jałowości na rozpad kwasu moczowego we krwi. Jałowe warunki mieszaniny (krew plus kwas moczowy) nie wpływały na proces rozpadu.

Zwykle jednak zamknięcie erlenmajerki korkiem z waty wystarczyło by zwolniony dostęp tlenu wstrzymał urikolizę. Przepuszczając jednak jałowo tlen przez jałową mieszaninę krwi ludzkiej i kwasu moczowego, otrzymywałam zwykły rozpad. Po 24 godz. rozłożyło się około 50% pierwotnej ilości kwasu moczowego (tab. I, dośw. 12).

5°. Zależność rozpadu kwasu moczowego od ilości doprowadzonej krwi i tlenu. Dwukrotnie większa ilość krwi w tych samych warunkach stężenia kwasu moczowego utleniała dwukrotnie większą ilość kwasu (tab. II).

Doświadczenia wykonywane były w butelkach litrowych, a więc ilość tlenu będącego w kontakcie z mieszaniną pozostawała niezmienną. Biorąc do doświadczeń butelki dwulitrowe zamiast jednolitrowych, a więc doprowadzając dwukrotnie większe ilości tlenu, otrzymywałam wprawdzie zwiększenie rozłożonego kwasu

Tabela II.

	Ilość krwi zhemolizowanej wziętej do doświadczenia <i>Vol. of haemolysed blood taken</i> cm <sup>3</sup>	Ilość kwasu moczowego oznaczona w mieszaninie po 6 godz. od nastawienia <i>Uric acid content 6 h. taken</i> mg	Ilość rozłożonego kwasu po 24 godz. <i>Uric acid decomposed in 24 h.</i> mg
1	20 cm <sup>3</sup>	14.08	1.9
2	40 cm <sup>3</sup>	29.08	4.1
3	20 cm <sup>3</sup>	9.1	4.9
4	40 cm <sup>3</sup>	16.24	9.86

moczowego, lecz wzrost ten nie był proporcjonalny (tab. III): ilość rozłożonego kwasu moczowego w butelce jednolitrowej wyniosła np. 1.6 mg, w dwulitrowej 2.6. Możliwe, że odgrywał tu

Tabela III.

		Ilość kwasu moczowego oznaczona w mieszaninie po 6 godz. od nastawienia <i>Uric acid content after 6 h.</i> mg	Ilość rozłożonego kwasu moczowego po 24 godz. od nastawienia, butelki 1 litr, nasycone tlenem <i>Uric acid decomposed in 24 h. in litre flasks filled with oxygen tlenem</i> mg	Ilość rozłoż. kwasu moczow. po 24 godz. od nastaw., butelki 2 litrowe, nasycone tlenem <i>Do in 2 l. flasks tlenem</i> mg
brano po 20 cm <sup>3</sup> krwi końskiej	1	7.79	1.49	2.8
20 cc. horse blood	2	7.1	1.6	2.6

rolę nie tyle czynnik grubości warstwy tlenu nad mieszaniną, ile przekrój powierzchni zetknięcia się mieszaniny z tlenem; przekrój butelek dwulitrowych był nieco większy niż jednolitrowych, lecz nie dwukrotnie większy.

6°. Rozkład kwasu moczowego w warunkach możliwie fizjologicznych. W ostatniej serji doświadczeń sprawdziłam, czy zjawisko utleniania zachodzi w warunkach fizjologicznych, t.j. we krwi nieshemolizowanej. W tym celu przygotowałam roztwór dwa razy mocniejszy od płynu RINGERA i przed początkiem doświadczenia rozcieńczałam go równą

objętością roztworu kwasu moczowego. Do takiego izotonicznego roztworu (jonów prowadzonego kwasu moczowego nie brałam pod uwagę, wobec nikłych stężeń cząsteczkowych) dolewałam świeżej niezhemolizowanej krwi. W doświadczeniach kontrolnych

Tabela IV.

Krew kurza w warunkach izotonicznych plus mieszanina kwasu moczowego.  
*Chicken blood in isotonic suspension plus uric acid solution.*

	Ilość kwasu moczowego oznaczona w mieszaninie w mg <i>Mg uric acid in mixture</i>	Dośw. I <i>Expt. I</i> mg	Dośw. II <i>Expt. II</i> mg	Dośw. III <i>Expt. III</i> mg	Dośw. IV <i>Expt. IV</i> mg
1	po 6 godz. <i>in 6 h.</i>	15.1	7.9	9.6	17
2	po 24 godz. <i>in 24 h.</i>	15.3	7.2	10.2	18

stwierdzałam, że w tych rozcieńczeniach niema strącania kwasu moczowego wobec soli wapnia. Mieszaninę tę jak zwykle nasycałam tlenem. Gdy równocześnie w przygotowanych butelkach z krwią zhemolizowaną następował, jak zawsze, rozpad kwasu moczowego w mieszaninie krwi i kwasu moczowego, w warunkach izotonicznych rozpadu tego nie było zupełnie (tab. IV).

## D y s k u s j a.

Badania zapoczątkowane przez GAROTĄ, a ostatnie prowadzone przez GOMOLIŃSKĄ kazały przypuszczać, że najmniejsze utrudnienie dostępu tlenu wywrze wielki wpływ, zmniejszający sprawność utleniania kwasu moczowego. I rzeczywiście, zmiana tlenu czystego na atmosferyczny zwalniała znacznie ten rozkład. Gatunkowo lżejszy toluol, pokrywając mieszaninę (kwas moczowy plus krew) utrudniał dostęp tlenu i znosił rozkład kwasu moczowego. Wystarczało nawet zwykle zamknięcie erlenmajerki wata, by utrudniony dostęp powietrza zmniejszył rozkład kwasu moczowego. Wybitna zależność rozkładu kwasu moczowego od dostępu tlenu potwierdza przypuszczenie, że zjawisko to jest reakcją utleniania.

Badania GOMOLIŃSKIEJ w kwestji roli hemoglobiny i stromatów wskazują na hemoglobinę, jako na czynnik rozkładający kwas moczowy, stwierdzając jednocześnie, że stromata nie rozkładają kwasu moczowego.



Wobec tego można sobie było zadać pytanie, w jakim stopniu stromata, oddzielające hemoglobinę czerwonych ciałek od osocza, są przypuszczalne dla kwasu moczowego. A więc — czy i jak szybko w warunkach fizjologicznych następuje przejście kwasu moczowego przez stromata i rozkład jego przez hemoglobinę. Doświadczenia zestawione w tabeli IV wskazują, że w warunkach fizjologicznych w ciągu 24 godz. (tylko tak długo udawało mi się wstrzymać hemolizę), brak było znikania kwasu moczowego. Wynik tych doświadczeń wyjaśnia spostrzeżenie tych badaczy, którzy po podaniu środków wywołujących hemolizę stwierdzali zmniejszenie się kwasu moczowego we krwi. Zmniejszenie to najprawdopodobniej powstaje wskutek utleniającego działania hemoglobiny, która po hemolizie może działać na kwas moczowy, znajdujący się w osoczu. W warunkach jednak fizjologicznych, gdy krwinki są nieuszkodzone, krew niezawierająca urikazy nie powinna w większym stopniu utleniać kwasu moczowego. Utlenianie zależne byłoby od szybkości wędrowania kwasu moczowego z osocza do krwinek.

Można jednak wysunąć przypuszczenie, że urikoliza w ustroju żywym może się odbywać tam, gdzie mamy wolną hemoglobinę, a więc w tej części układu siateczkowo-wródbłonkowego, gdzie odbywa się rozkład ciałek czerwonych krwi. Rozstrzygnięcie tych zagadnień miałyby doniosłe znaczenie w patologii przemiany purynowej.

W ostatnich czasach KOSSIAKOWA ('30) wykonała szereg doświadczeń, potwierdzających przypuszczenie, że krwinki w warunkach fizjologicznych nie rozkładają kwasu moczowego znajdującego się poza niemi. Brała ona krew całkowitą i po 4, 24 i 48 godzinach określała zawartość kwasu moczowego oddzielnie we krwinkach i surowicy. Okazało się, że zawartość kwasu moczowego we krwinkach uległa wybitnemu zmniejszeniu, w surowicy zaś pozostawała cały czas niezmienną. Poruszone zaś przez nią zagadnienie wpływu diety zakwaszającej i alkalizującej na zawartość kwasu moczowego w krwinkach i surowicy wymaga jeszcze rozpatrzenia, gdyż dieta podawana przez nią jako alkalinizująca była jednocześnie mało-purynową, zaś zakwaszająca obfitowała w puryny. Przy rozpatrywaniu zawartości kwasu moczowego w krwinkach uwzględniłoby należało również zmienną ilość kwasu moczowego, zadsorbowanego na powierzchni krwinek w związku ze zwiększoną ilością kwasu moczowego w surowicy.

## Wnioski.

1°. Zhemolizowana krew ludzka i kurza rozkłada kwas moczowy.

2°. Najmniejsze utrudnienie dostępu tlenu powietrza wywołuje zmniejszenie rozkładu kwasu moczowego.

3°. Podwójne ilości krwi, przy tej samej ilości tlenu, rozkładają podwójną ilość kwasu moczowego.

4°. W warunkach fizjologicznych in vitro, krew niezhemolizowana nie utlenia kwasu moczowego w czasie 24-godzinnego doświadczenia.

## Piśmiennictwo.

- Bilz and Schauder. 1923. Journ. pract. Chem. (106, 108). Flatow. 1926. Münch. med. Woch. 73 (12). Garot. 1926. Journ. Physiol. Pathol. gén. 24 (779). Gomolińska M. 1928. Biochem. Journ. 22, Nr. 5 (34). Gudzent. 1928, Gicht u. Rheumatismus. Przyłęcki. 1926. Bull. de la Soc. de Chim. Biol. 8 (804). Kosiakowa. 1930. Biochem. Zeitsch. 217 (212).

[Instytut Chemji Lekarskiej Uniwersytetu Lwowskiego].

T. Mann.

**O domniemanym udziale azotu amidowego białek krwi i mięśni w przemianach chemicznych mięśnia pracującego.**

*Über den angeblichen Anteil des Amidstickstoffes des Blut- und Muskel-Eiweisses an den chemischen Vorgängen im arbeitenden Muskel.*

Rękopis nadestany w dniu 17. XI. 1930 r.

S. BLISS ('28.3) hat Versuche mitgeteilt, aus welchen er den Schluss zieht, dass die während der Arbeit entstehende Milchsäure zum Teil durch das in Geweben gebildete Ammoniak neutralisiert wird; aus dem so entstandenen Ammoniumlactat und den Bluteiweisskörpern synthetisieren die Gewebe die Amidverbindungen. Um die angebliche Fähigkeit der Gewebe zur Synthese von Amidverbindungen nachzuweisen, injizierte BLISS den Hunden intraarteriell Ammoniumcarbonat und verglich den Amidstickstoffgehalt im Arterienblut mit dem im Venenblut. Das Ansteigen des Amidstickstoffgehaltes in einzelnen Venenblutproben betrachtet er als Beweis für seine Vermutung. Den Beweis für den Einfluss der Muskelarbeit will BLISS dadurch erbringen, dass er bei Hunden nach einer zwei bzw. fünf Minuten dauernden Arbeit eine Abnahme des Amidstickstoffgehaltes in einzelnen Proben des arteriellen Blutes feststellt. Bei Berechnung der aus den Blisschen Versuchen sich ergebenden Amidstickstoffwerten kommt man zur Ansicht, dass die Blisschen Zahlen keinen Beweis für seine These bringen. Der angebliche Anteil des Amidstickstoffes in den chemischen Vorgängen im arbeitenden Muskel wurde experimentell nachgeprüft. Diesen Anteil könnte man auf doppeltem Wege feststellen, entweder indirekt durch die Analyse des aus dem ruhenden bzw. arbeitenden Muskel fließenden Blutes, oder direkt durch die Bestimmung des Amids-

tickstoffes im Muskeleiweiss. Die Versuche über den Amidstickstoffgehalt in dem Blute wurden an drei Personen ausgeführt derart, dass zuerst das Blut bei Muskelruhe aus der Ellbogenvene entnommen wurde, dann die Versuchsperson ein halbes Killogramm schweres Stück Plastellin bis zur vollkommenden Ermüdung der Hand knettete, worauf abermals eine Blutprobe aus der Ellbogenvene entnommen wurde. Es wurden ebenfalls einige Versuche an isolierten Froschmuskel unternommen, derart, dass man den Amidstickstoffgehalt des einen Gastrocnemius sofort nach der Tötung des Frosches bestimmte, dagegen wurde der zweite, symmetrische Gastrocnemius als Muskel-Nerv-Präparat in Ringerlösung eingetaucht und unter Sauerstoffzutritt je 10 Minuten vom Nerv aus gereizt. Auf Grund der ausgeführten Versuche kommt man zum Schlusse, dass weder im Menschenblut noch im isolierten Froschmuskel Veränderungen des Amidstickstoffgehaltes bei den die Muskularbeit begleitenden Stoffwechselförderungen nachweisbar sind.

---

## I.

S. BLISS ('28.1) stwardził, badając sprawę pochodzenia amonjaku, wydalanego w moczu, że w nerce istnieje zaczyn, odszczepiający amonjak z grup amidowych białek. To spostrzeżenie było punktem wyjścia hipotezy (BLISS '28.3), która miała wyjaśnić rolę amonjaku w zobojętnianiu kwasów, powstających w ustroju zwierzęcym. BLISS (28.3) sądzi, że kwas mlekowy, powstający w czasie czynności mięśni, ulega częściowemu zobojętnieniu przez amonjak wytwarzany w tkankach; z mleczanu amonowego oraz związków białkowych krwi syntetyzują tkanki związki amidowe, a jon sodowy dwuwęglanu sodowego krwi przejmuję rolę jonu amonowego w zobojętnianiu kwasu mlekowego; szczególną korzyść takiego urządzenia widzi autor w tem,

że szkodliwy dla ustroju jon amonowy przechodzi do nerki w postaci związków amidowych, a dopiero w nerce przychodzi pod działaniem zaczynu do wytworzenia amonjaku; amonjak wydalany z moczem byłby zatem pochodzenia tkankowego; w drodze z tkanek do nerek ukrywałby się pod postacią białkowych grup amidowych krwi. Celem wykazania zdolności tkanek do syntezy związków amidowych z białek krwi i jonu amonowego wprowadzał BLISS psom do tętnicy węglan amonowy i porównywał zawartość azotu amidowego w krwi tętnicznej i żylniej; wzrost ilości azotu amidowego w poszczególnych próbach krwi żylniej uważa za dowód, potwierdzający jego przypuszczenie. Kontrolę

Tabela I.

Średnie zawartości azotu amidowego we krwi tętnicznej i żylniej po podaniu jonu amonowego oraz w doświadczeniach kontrolnych po podaniu jonu sodowego, obliczone z dośw. Blissa ('28. 3, str. 144 i 145).

*Die mittleren Werte des Amidstickstoffgehaltes im Arterien- und Venenblut nach der Darreichung des Ammoniums und in Kontrollversuchen nach der Darreichung des Natriumions, berechnet aus den Versuchen von Bliss ('28. 3. S. 144 u. 145).*

Po podaniu jonu amonowego <i>Nach Darreichung des Ammoniums</i>			Po podaniu jonu sodowego <i>Nach Darreichung des Natriumions</i>		
Pies <i>Hund</i>	Krew tętnicza <i>Arterienblut</i>	Krew żylna <i>Venenblut</i>	Pies <i>Hund</i>	Krew tętnicza <i>Arterienblut</i>	Krew żylna <i>Venenblut</i>
№ 38	155.3 ± 0.71*)	155.5 ± 2.57	№ 34	124.8 ± 0.51	128.7 ± 0.51
№ 37	148.8 ± 1.49	155.3 ± 2.36	№ 32	109.4 ± 0.60	110.4 ± 0.68
№ 32	112.3 ± 0.80	116.1 ± 1.79	№ 35	122.1 ± 0.60	126.0 ± 0.72
№ 31	149.9 ± 0.83	151.6 ± 0.61	№ 37	136.1 ± 1.10	136.3 ± 2.37

\*) Średni błąd wyniku  $\sigma = \sqrt{\frac{\sum d^2}{n(n-1)}}$

\*) *Die mittlere Streuung des Mittelwertes*  $\sigma = \sqrt{\frac{\sum d^2}{n(n-1)}}$

stanowiły doświadczenia na psach, którym wprowadzał w podobny sposób roztwór węglanu sodowego o takim samym stężeniu i oddziaływaniu, co poprzednio użyty węglan amonowy; na podstawie tych doświadczeń stwierdza, że jon sodowy nie ma podobnego wpływu na poziom azotu amidowego krwi, jak jon amonowy. Wpływ pracy mięśniowej stara się wykazać na psach, u których, po dwu względnie pięciominutowej pracy, stwierdza obniżenie azotu amidowego w próbach krwi tętnicznej.

Powyższe wywody BLISSA poddali ostrej krytyce BENEDICT i NASH ('29). Przeliczenie doświadczeń BLISSA ('28.3) potwierdza w zupełności sceptyczny pogląd BENEDICTA i NASHA. Wyniki do-

świadczeń BLISSA nie uprawniają do twierdzenia, jakoby zawartość azotu amidowego wzrastała w krwi żyłnej po wprowadzeniu jonu amonowego do tętnicy. Wprawdzie poszczególne próby krwi żyłnej wykazują znaczne wahania, jednak średnia zawartość azotu amidowego obliczona dla krwi tętniczej i żyłnej nie wykazuje różnic jednokierunkowych. Obliczone średnie wraz ze średnim praktycznym błędem wyniku  $\left( \sigma = \sqrt{\frac{\sum d^2}{n(n-1)}} \right)$  wykazują wahania analogiczne do doświadczeń kontrolnych (tab. I).

Gdyby nawet uważać wartości podane przez BLISSA ('28,3) dla pojedynczych prób krwi nie za przypadkowe, ale za realne, to jedynym wnioskiem, który możnaby wyciągnąć, byłoby stwierdzenie, że wprowadzenie do krwi soli, zwłaszcza trujących soli amonowych, wywołuje zaburzenia w rozmieszczeniu wody, soli, a co zatem idzie, i białek w ustroju psa. Nie więcej przekonujące są doświadczenia z pracą mięśniową, w których wahania w zawartości azotu amidowego są bardzo nieznaczne i naogół leżą w granicach błędów doświadczalnych. Liczbom podanym przez BLISSA możnaby przypisać realne znaczenie dopiero wtedy, gdyby były średniami z kilku oznaczeń; pojedyncze liczby BLISSA robią wrażenie wartości otrzymanych przypadkowo. Sceptycyzm BENEDICTA i NASHA ('29) znajduje uzasadnienie w liczbach BLISSA.

## II.

Zagadnienie azotu amidowego oraz jego udziału w przemianach chemicznych mięśnia pracującego dotyka zagadnień, rozpatrywanych przez PARNASA i jego współpracowników (literatura PARNAS '28 i '29). Jednym z procesów, towarzyszących stale skurczowi mięśnia, jest wytwarzanie amonjaku. PARNAS wykazał, że substancją macierzystą amonjaku jest nukleotyd adeninowy. W pracy beztlenowej mięśnia ilość powstającego amonjaku odpowiada ilości rozłożonego nukleotydu adeninowego, natomiast nie dało się stwierdzić tej równoległości w mięśniu pracującym przy dostatecznym dopływie tlenu. W obecności tlenu następuje odbudowa nukleotydu adeninowego z powstałego po odszczepieniu amonjaku kwasu inozynowego, t. j. nukleotydu hypoksantynowego, ale do odbudowy tej nie może tkanka użyć

amonjaku odszczepionego; źródłem grupy aminowej jest inny, bliżej nieznaną związek azotowy. Pogląd ten ilustruje schemat.

Skurez: Nukleotyd adeninowy +  $H_2O$  → nukleotyd hypoksantynowy +  $NH_3$ .

Wypoczynek: Nukleotyd hypoksantynowy +  $O$  +  $XNH_2$  → nukleotyd adeninowy +  $XO$  +  $H_2O$ .

W związku ze sprawdzeniem prac BLISSA nasuwało się zbadanie, czy azot amidowy białek nie jest tym właśnie związkiem azotowym, który bierze udział w odbudowie tlenowej nukleotydu adeninowego. Udział jego można było starać się wykazać albo drogą pośrednią przez analizę krwi, wypływającej z mięśni spoczywających i pracujących, albo też bezpośrednio przez oznaczenie azotu amidowego białek mięśnia spoczywającego i pracującego.

### M e t o d y k a.

Azot amidowy białek krwi oznaczano według przepisu podanego przez BLISSA ('28.2) z tem, że kolorymetryczne oznaczanie amonjaku zastąpiono miareczkowaniem n/100 sodą żrącą z użyciem czerwień metylowej, jako indykatora; do odbieralnika dawano 10  $cm^3$  n/100 kwasu siarkowego.

Równolegle wykonano szereg oznaczeń, używając zamiast wietrzenia destylacji w próżni w aparacie PARNASA i HELLERA (PARNAS i HELLER '24, PARNAS '28). Ten sposób dawał wyniki podobne do dłużej trwającego i bardziej kłopotliwego wietrzenia. Azot amidowy białek mięśni oznaczano w sposób podobny do przepisu BLISSA. Mięsień łydkowy żaby roz tarto z piaskiem kwarcowym i 1  $cm^3$  wolframianu sodowego 10%-ego. Miazgę splótkano 7  $cm^3$  wody do rurki wirówkowej. Stracono białko przez dodanie 1  $cm^3$  kwasu siarkowego  $\frac{2}{3}$  n. Po wymieszaniu i splótkaniu pałeczki szklanej rozc. kwasem wolframowym (w 100  $cm^3$  — 1  $cm^3$  wolframianu sodowego 10% i 1  $cm^3$  kw. siarkowego  $\frac{2}{3}$  n), wirowano, płyn odlewarowano, a osad dwukrotnie przemywano 10  $cm^3$  rozc. kwasu wolframowego. Osad, do którego dodano 2  $cm^3$  wody i 1  $cm^3$  kwasu siarkowego 12 n, hydrolizowano przez 90 minut we wrzącej łaźni. Mieszanie zlewano do kolbki aparatu PARNASA i HELLERA, przepiókiwano rurkę nasye. boranem sodowym, dodawano 4  $cm^3$  3 n NaOH i destylowano do odbieralnika, zawierającego 5 wzgl. 10  $cm^3$  kwasu siarkowego n/100. Po każdej destylacji następowała destylacja kontrolna, wykazująca zazwyczaj zupełność destylacji poprzedniej.

Doświadczenia nad zawartością azotu amidowego w krwi przepływającej przez mięśnie spoczywające i pracujące, wyko-

nano na trzech osobach podobnie jak wykazywano w pracy PARNASA, MOZOŁOWSKIEGO i LEWIŃSKIEGO ('27) przyrost zawartości amoniaku we krwi na skutek pracy mięśniowej. Najpierw pobierano krew z żyły łokciowej człowieka spoczywającego; nie zakładano przytem przewiązki, by nie wywołać zastoju. Krew od-

Tabela II.

Badany osobnik <i>Die Versuchsperson</i>	Zawartość azotu amidowego w mg% <i>Der Amidstickstoffgehalt in mg%</i>		Średnia wartość <i>Der mittlere Wert</i>	
	przed pracą <i>von der Arbeit</i>	po pracy <i>nach der Arbeit</i>	przed pracą <i>vor der Arbeit</i>	po pracy <i>nach der Arbeit</i>
Mo	143.5	143.5	$\lambda_1 = 142.5$	$\lambda_2 = 143.7$
	143.5	143.5	$\sigma_1^*) = \pm 0.57$	$\sigma_2 = \pm 0.43$
	140.0	145.6	$m_1^{**}) = 1.37$	$m_2 = 1.44$
	142.1	143.5		
	142.8	144.9	$\frac{\lambda_2 - \lambda_1}{\sqrt{\sigma_1^2 + \sigma_2^2}} = \frac{1.2}{0.71} = 1.62$	
	143.5	141.4		
Ma	136.5	130.9	$\lambda_1 = 135.2$	$\lambda_2 = 134.8$
	133.7	134.4	$\sigma_1 = \pm 0.58$	$\sigma_2 = \pm 1.18$
	136.5	137.9	$m_1 = 1.42$	$m_2 = 2.60$
	134.4	136.5		
	136.5	134.4	$\frac{\lambda_2 - \lambda_1}{\sqrt{\sigma_1^2 + \sigma_2^2}} = \frac{0.4}{1.31} = 0.30$	
	133.7			
Pe	146.3	147.0	$\lambda_1 = 145.5$	$\lambda_2 = 146.4$
	147.0	146.2	$\sigma_1 = \pm 0.75$	$\sigma_2 = \pm 0.78$
	143.5	143.5	$m_1 = 1.84$	$m_2 = 1.73$
	142.8	147.7		
	146.3	147.7	$\frac{\lambda_2 - \lambda_1}{\sqrt{\sigma_1^2 + \sigma_2^2}} = \frac{0.9}{1.08} = 0.83$	
	147.0			

\*) Średni błąd wyniku  $\sigma = \sqrt{\frac{\sum d^2}{n(n-1)}}$

\*) *Der mittlere Fehler des Resultates*  $\sigma = \sqrt{\frac{\sum d^2}{n(n-1)}}$

\*\*) Średni prawdziwy błąd poszczeg. oznaczeń  $m = \sqrt{\frac{\sum d^2}{n-1}}$

\*\*) *Der mittlere wahre Fehler der Beobachtungen*  $m = \sqrt{\frac{\sum d^2}{n-1}}$

biańczano natychmiast bez zapobiegania krzepnieniu. Następnie osobnik badany ugniatał jedną ręką półkilogramowy kawałek plasteliny aż do chwili, kiedy odczuwał zupełne znużenie ręki (5 do 8 minut), potem zaciskał silnie dłoń i wtedy pobierano z żyły drugą próbę krwi. W każdej próbie wykonano 5 do 6 oznaczeń, pragnąc w ten sposób wykluczyć wartości przypadkowe.



Tabela II przedstawia otrzymane wyniki. Liczby podane w niej wykazują, że praca taka, jaką przeprowadzono w doświadczeniach, nie wywołuje zmian w zawartości azotu amidowego krwi. Tą drogą nie można wykazać ewentualnego udziału azotu amidowego w przemianach mięśnia pracującego.

Wykonano również kilka doświadczeń na izolowanych pracujących mięśniach żaby, w ten sposób, że oznaczano azot amidowy w jednym mięśniu łydkowym natychmiast po zabiciu żaby, a symetryczny mięsień umieszczano, jako preparat nerwowomięśniowy, w płynie RINGERA, wysycanym stale tlenem i drażniono

Tabela III.

Data Datum	Waga mięśnia Muskelgewicht	Zawartość azotu amidowego mięśnia niepracującego w mg% Der Amidstickstoffgehalt der ruhenden Muskels in mg%	Temp., w której mięsień pracował Die Temperatur bei welcher der Muskel gearbeitet hat	Czas pracy Die Arbeitsdauer	Zawartość azotu amidowego mięśnia pracującego w mg% Der Amidstickstoffgehalt des arbeitenden Muskels in mg%
19.V.	330 mg symetr.	133.5 137.5	— —	— —	— —
16.VI.	575 mg symetr.	140.4 —	— 15°	— 24h	— 141.8
22.VI.	456 mg symetr.	152.0 —	— 16°	— 20h	— 148.0
29.VI.	264 mg symetr.	137.9 —	— 17°	— 11h	— 136.9

przez nerw co 10 sekund. Po upływie oznaczonego czasu przerabiano mięsień w sposób wyżej podany. Udział azotu amidowego w odbudowie nukleotydu adeninowego zaznaczyłby się przez ubytek azotu amidowego w mięśniach pracujących. Liczby otrzymane (tab. III) wskazują, że w czasie pracy niema zmian w zawartości azotu amidowego białek mięśniowych.

W trzech doświadczeniach największą różnicę, 4 mg% N, znaleziono w mięśniach przerobionych w dn. 22.VI.; taką samą różnicę spotykamy w zawartości azotu amidowego dwóch symetrycznych mięśni, przerobionych natychmiast po zabiciu żaby (dośw. z dn. 19.V). Opierając się na otrzymanych wynikach, nie można wykluczyć możliwości zmian w zawartości azotu amidowego w granicach dokładności metody. Przeprowadzając ozna-

czenia na krwi, można wykonać szereg oznaczeń na tym samym materiale i otrzymać średnie; w analizie mięśni nie jest to możliwe z powodu obecności nierozpuszczalnych białek i niemożności podziału materiału.

Z wykonanych doświadczeń wyciągamy wnioski, że ani we krwi człowieka, ani w izolowanym mięśniu żaby nie można wykazać udziału azotu amidowego białek w przemianach chemicznych, towarzyszących pracy mięśniowej.

#### Streszczenie.

Poddano krytyce wyniki doświadczeń BLISSA, mających wykazać zdolność tkanek do syntezy związków amidowych z pożądanego jonu amonowego i białek krwi, oraz udział grup amidowych białek krwi w zobojętnianiu kwasów, powstających w mięśniu pracującym.

Wykazano doświadczalnie, że ani w krwi człowieka, ani w izolowanym mięśniu żaby nie można stwierdzić udziału azotu amidowego białek w przemianach chemicznych, towarzyszących pracy mięśniowej.

#### Piśmiennictwo.

Benedict S. R. a. T. P. Nash, 1929. On the question of the origin of urinary ammonia. *J. of biol. Chem.* 82 (673). Bliss S. 1928. 1. Further studies on ammonia formation. *J. of biol. Chem.* 78 VII. Bliss S. 1928. 2. The amide nitrogen of blood II. A quantitative method. *J. of biol. Chem.* 81 (129). Bliss S. 1928. 3. The amide nitrogen of blood. III. Muscular exercise. The role of ammonia in the neutralisation of lactic acid. *J. of biol. Chem.* 81 (137). Parnas J. K. 1928. Badania nad powstawaniem amonjaku i zależnością tej sprawy od czynności i stanu mięśni. *Acta Biologiae Experimentalis*, 1, № 3. Parnas J. K. 1929. Le metabolisme du muscle en activité. *C. r. d. l. Soc. Biol. Mai.* Parnas J. K. u. J. Heller. 1924. Über den Ammoniakgehalt und über die Ammoniakbildung im Blute I. *Biochem. Ztschr.* 152 (1). Parnas J. K., W. Mozołowski u. W. Lewiński. 1927. Über den Ammoniakgehalt u. die Ammoniakbildung im Blute. IX. Der Zusammenhang des Blutammoniaks mit der Muskelarbeit. *Biochem. Ztschrift.* 188 (15).

[Zakład Farmakognozji Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie]

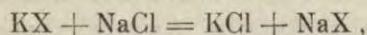
H. P. Kryńska i W. R. Witanowski.

**O przepuszczalności mięśnia sercowego dla jonów sodu i potasu.**  
*Sur la perméabilité du coeur aux ions de sodium et de potassium.*

Rękopis nadesłany w dniu 1. XII. 1930 r.

En 1926, WITANOWSKI et STREEF ont démontré que la perméabilité du coeur de la grenouille aux ions de potassium dépend de la quantité de chlorure de sodium contenue dans la liqueur de RINGER (WITANOWSKI '26). Le potassium renfermé dans le coeur passe plus lentement dans le liquide de la concentration en NaCl à 0.3% que dans un autre de la concentration en NaCl plus élevée (0.6%).

Les auteurs assayent d'expliquer ce fait de la manière la plus simple: par la supposition, qu'au cours de la diffusion des ions de potassium dans le liquide ambiant, on se trouve en présence d'une réaction de substitution:



où KX représente les composés potassiques dans le muscle du coeur. Ainsi, les cellules du coeur seraient perméables aux ions positifs de potassium et de sodium et imperméables aux ions négatifs de X et de Cl.

Comme on le sait, le battement du coeur de la grenouille s'arrête après la perte d'un tiers de son potassium. Le but de la présente recherche a été la vérification de l'équation présentée ci-dessus, d'après laquelle, le coeur devrait fixer — à la place du potassium perdu — une quantité équimoléculaire de sodium.

On a déterminé la quantité de K, renfermé dans les cendres des coeurs de grenouilles, d'après la méthode KRAMER-TISDALL ('21), et celle de Na — d'après la méthode colorimétrique de BARRENSCHEN-MESSINER ('27). Pour chaque détermination on a employé 10 coeurs de grenouilles.

Les coeurs ayant battu 1 h. 15' dans la liqueur de RINGER sans potassium, le pourcentage du potassium, soit 1.25%, descendait — dans la substance sèche-jusqu'à 0.835%, tandis que, celui du sodium, soit 0.28%, montait dans les mêmes conditions — dans la substance sèche — jusqu'à 0.38%.

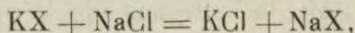
Si la réaction se faisait strictement d'après l'équation donnée ci-dessus, la diminution de 0.415 mgr. en K devrait être conforme à l'augmentation de 0.24 mgr. en Na. Le résultat expérimental: — 0.1 mgr., est 2,4 fois moindre.

On a donc constaté que le coeur perd son K en fixant en même temps le Na, mais que la quantité de Na fixé ne correspond pas à la quantité de K perdu.

---

W roku 1926 WITANOWSKI i STREEF stwierdzili, że przepuszczalność pulsującego serca żaby dla jonów potasu zależy od obecności jonów sodu w płynie RINGERA (WITANOWSKI '26). Serce żaby przemywane bezpotasowym płynem RINGERA oddaje potas znacznie wolniej do płynu zawierającego 0.3% NaCl, niż do bezpotasowego płynu RINGERA o normalnej zawartości chlorku sodu. Zjawisko to nie jest skutkiem zmiany ciśnienia osmotycznego, gdyż występuje również w płynach, których ciśnienie osmotyczne doprowadzono do normy przez dodatek cukru.

Jako najprostszą próbą wytłumaczenia tego zjawiska nasuwa się przypuszczenie, że zachodzi tu reakcja podstawienia:



gdzie KX są to związki potasu występujące wewnątrz mięśnia sercowego. Komórki mięśnia sercowego byłyby zatem przepuszczalne dla kationów K i Na, a nieprzepuszczalne dla anionów X i Cl. Tego rodzaju półprzepuszczalność posiadają w pewnym stopniu mięśnie prądkowane w stanie spoczynku w przeciwstawieniu do krwinek, które przy pH krwi są przepuszczalne tylko dla anionów, a dopiero powyżej pH 8 stają się dla nich nieprzepuszczalne, przepuszczając kationy (MOND '27). Według teorii

MICHAELISA ('26) wybiorcza przepuszczalność dla katjonów lub anjonów zależy od znaku naboju elektrycznego błon przepuszczających, a różnice w stopniu przepuszczalności poszczególnych jonów zależą od ich wielkości łącznie z otaczającym je płaszczem wodnym.

Półprzepuszczalność tkanki mięśniowej w czasie pracy małe. Gdyby użyte do doświadczeń serca żabie nie pulsowały, należałoby się spodziewać:

1°. że serce tracące potas wzbogaca się w sód,

2°. że ilość sodu związanego w czasie doświadczenia będzie proporcjonalna do ilości potasu utraconego.

Prowadząc doświadczenia na pulsujących sercach, możemy oczekiwać jedynie potwierdzenia pierwszego z tych wniosków, gdyż stopień półprzepuszczalności będzie się tu okresowo zmieniać.

Sprawdzenie eksperymentalne wniosków tu wyprowadzonych stanowi cel obecnej publikacji.

#### Część eksperymentalna.

Doświadczenia przeprowadzono na sercach żaby *Rana esculenta*, pulsujących na kaniulkach KRONECKERA (ZWAARDEMAKER '19). Płyn RINGERA posiadał skład następujący: 0.65% NaCl, 0.01% KCl, 0.01 CaCl<sub>2</sub>, 0.02% NaHCO<sub>3</sub>. Przemycanie płynem bezpotasowym oraz (w doświadczeniach kontrolnych) płynem RINGERA trwało 1 g. 15 minut. Bezpośrednio po zdjęciu z kaniuli, serca poddawano czterokrotnemu spłókaniu od wewnątrz, używając za każdym razem połowy cm<sup>3</sup> wody destylowanej. Wodę użytą do przemycia analizowano na sód; okazało się, że czterokrotne spłókanie usuwa w zupełności sód płynu wewnętrznego. Po przemyciu, materiał z 10 serc suszono do stałej wagi i razem spalono. W popiele oznaczano potas metodą KRAMER-TISDALLA ('21), a sód metodą BARRENSCHEN-MESSINERA ('27). Ponieważ oznaczenia potasu w normalnym sercu żabiem przeprowadzono już wielokrotnie oraz było wiadomem, że serce, przepłókiwane bezpotasowym płynem RINGERA, traci w ciągu 1 godziny około  $\frac{1}{3}$  potasu, ograniczono się do 2 równoległych oznaczeń (po 10 serc) potasu w tkance normalnej i pozbawionej potasu. O ile nam wiadomo, analiz sodu w sercu żaby dotąd nie przeprowadzono. Podajemy ich 7 dla tkanki normalnej i 6 dla tkanki pozbawionej częściowo potasu.

## Tabela I.

Zawartość procentowa potasu w odniesieniu do suchej substancji komory sercowej żaby *Rana esculenta* po 1 godzinie 15' przemywania serca płynem Ringera.

*Pourcentage du potassium dans le coeur de la Rana esculenta par rapport à la substance sèche après le passage de la liqueur de Ringer durant 1 h. 15'.*

I.	Płyn Ringera z potasem:	1.29
	<i>Liqueur de Ringer avec le potassium:</i>	1.22
	Średnio — <i>En moyenne</i>	1.25% K
II.	Płyn Ringera bez potasu:	0.77
	<i>Liqueur de Ringer sans potassium:</i>	0.90
	Średnio — <i>En moyenne</i>	0.835% K

Serce ssaków było już kilkakrotnie analizowane na sód. Dla porównania podajemy, cyfry zaczerpnięte z książki ZONDEKA ('27).

1°. Serce królika zawiera 110 mg<sub>0</sub> Na i 340 mg<sub>0</sub> K w odniesieniu do świeżej tkanki (MORAWITZ-NONNENBRUCH).

2°. Serce człowieka zawiera 36.6 mg<sub>0</sub> Na i 161.0 mg<sub>0</sub> K w odniesieniu do świeżej tkanki (RUMPF-DENNSTEDT).

Przeliczając otrzymane przez nas wyniki na procenty w odniesieniu do tkanki świeżej, otrzymujemy, że mięsień sercowy żaby zawiera około 250 mg<sub>0</sub> K i 56 mg<sub>0</sub> Na. Mięsień sercowy żaby nie różni się zatem zasadniczo pod względem zawartości sodu i potasu od mięśnia sercowego królika i człowieka.

Według załączonych danych w ciągu 1 godziny ilość potasu w tkance mięśnia sercowego spada w warunkach doświadczenia z 1.25 mg na 0.835. Równocześnie ilość sodu wzrasta o wartość 0.1 mg na 100 mg suchej substancji.

## Tabela II.

Zawartość procentowa sodu w odniesieniu do suchej substancji komory sercowej żaby *Rana esculenta* po 1 godzinie 15' przemywania płynem Ringera.

*Pourcentage du sodium dans le coeur de la Rana esculenta par rapport à la substance sèche après le passage de la liqueur de Ringer durant 1 h. 15'.*

I	Płyn Ringera z potasem:	0.35, 0.26, 0.21, 0.24, 0.30, 0.33, 0.28
	<i>Liqueur de Ringer avec le potassium:</i>	
	Średnio — <i>En moyenne</i>	0.28% Na
II	Płyn Ringera bez potasu:	0.43, 0.26, 0.45, 0.39, 0.39, 0.35
	<i>Liqueur de Ringer sans potassium:</i>	
	Średnio — <i>En moyenne</i>	0.38% Na

Gdyby podczas doświadczenia zachodziła tylko reakcja wymiany potasu na sól, to ubytkowi 0.415 mg potasu powinno odpowiadać wartość 0.24 mg sodu związanego przez serce. Wartość otrzymana doświadczalnie jest 2.4 razy mniejsza. Zupełnej zgodności z teorią nie należało się jednak spodziewać ze względu na to, że serce w czasie doświadczenia nie pozostawało w spoczynku, lecz pulsowało.

### W y n i k i.

1°. Komora sercowa żaby zawiera sól w ilości 0.28% suchej substancji. Odpowiednia zawartość potasu wynosi 1.25%.

2°. Sól i potas znajdują się w sercu żaby w ilościach zbliżonych do zawartości tych katjonów w sercu człowieka i królika.

3°. Serce żaby, pulsujące w płynie RINGERA pozbawionym potasu, wiąże sól, tracąc potas.

4°. Ilość związanego sodu jest mniejsza, niż ilość oddawanego potasu.

### Piśmiennictwo.

Barrenschen H. K. i L. Messiner. 1927. Colorimetrische Mikrobestimmung des Natriums. 189 (308). Kramer B. i F. Tisdall. 1921. A clinical method for the quantitative determination of K in small amounts of serum. Journ. of biol. Chem. 46 (339). Michaelis L. 1926. Die Permeabilität von Membranen. Naturwissenschaften. 14 (33). Mond R. 1927. Umkehr der Anionenpermeabilität der roten Blutkörperchen in eine elektive Durchlässigkeit für Kationen. Ein Beitrag zur Analyse der Zellmembranen. Pflügers Archiv. 217 (618). Streef G. M. patrz W. R. Witanowski. Witanowski W. R. 1926. Natrium und Herzautomatie. Pflügers Archiv. 212 (726). Zondek S. G. 1927. Die Elektrolyte. Springer. Berlin. (72-73). Zwaardemaker H. 1919. Die Bedeutung des Kaliums im Organismus. Pflügers Archiv 173 (28).





[Zakład Morfologii Doświadczalnej Instytutu im. Nenckiego]

J. Dembowski.

**Dalsze studja nad geotropizmem *Paramecium*.**

*Weitere Studien über den Geotropismus von Paramecium.*

Rękopis nadesłany w dniu 20.II.1931 r.

In der vorliegenden Arbeit stellt der Verf. Argumente zusammen, die zugunsten der mechanischen, bzw. der Statocystentheorie des Geotropismus von *Paramecium* sprechen.

Das Vorhandensein einer besonderen „zentrotaktischen“ Reaktion, wie sie von KOEHLER beschrieben worden ist, bleibt unbewiesen und ist sehr wenig wahrscheinlich. Das Verhalten der Tiere in den betr. Versuchen führt sich einerseits auf die gewöhnliche negativ geotropische Bewegung, andererseits auf die Reaktion des Sich-Zerstreuens der an einem Rohrpunkte zwangsmässig gesammelten Infusorien zurück.

Das Verhalten der Eisentiere im magnetischen Kraftfelde entspricht den Voraussetzungen der mechanischen Theorie.

Verf. beschreibt eine neue Methode der Beobachtung der Paramäcien während des Schleuderns. Es wird darauf hingewiesen, dass im Zentrifugerohr ein bedeutendes Gefälle der Zentrifugalkraft je nach Entfernung vom Drehzentrum vorhanden ist, was das Verhalten der Tiere wesentlich beeinflusst. Die Verteilung der Infusorien nach dem Schleudern zeigt Fig. 3. Auf derselben bedeuten die Zahlen der ersten vertikalen Reihe die jeweilige Tourenanzahl pro Minute, die übrigen Zahlen — die Grösse der Zentrifugalkraft für drei Rohrpunkte in Gravitationseinheiten ausgedrückt. Bei einer bestimmten Grösse der Zentrifugalkraft werden die Tiere passiv zentrifugal abgeworfen (Tab. I: *Obr.* — die Tourenanzahl pro Minute, *S. O.* — die Zentrifugalkraft). In der Tab. II sind die betr. Werte für das erste zentripetale Einstellen der Tiere, sowie für das erste passive Abdrängen dersel-

ben zusammengestellt worden. Die Tab. III enthält die Werte für das erste Sich-Einstellen der Infusorien. Durchschnittlich beginnen sich die Tiere bei einer Zentrifugalkraft von 3.5 Einheiten zentripetal einzustellen, bei 9.5 Einheiten werden sie zentrifugal abgedrängt. Das Resultat spricht zugunsten der mechanischen und gegen die Statocystentheorie. Denn im gewöhnlichen Gravitationsfeld vermögen die vermeintlichen Statoliten den Tieren keine gerichtete Bewegung aufzuprägen, indem dazu eine 3.5 mal grössere Kraft erforderlich ist.

Das freie Absinken lebender Tiere entspricht den Erwartungen der mechanischen Theorie. Unter Verwendung der Fixierungsflüssigkeit von GELEI erweisen sich tote Tiere, die im Glycerin absinken, als deutlich hinterlastig.

Sämtliche von KOEHLER erwähnte Erscheinungen lassen sich vom Standpunkte der mechanischen Theorie einfach und einheitlich erklären. Die Theorie selbst muss aber modernisiert werden. Es ist zu berücksichtigen, dass die infolge der Hinterlastigkeit eintretende passive Drehung des *Paramecium*körpers von dem Tiere als Reiz rezipiert werden kann. Sollte das der Fall sein, würde auch die ursprüngliche mechanische Theorie ihren ausschliesslich mechanischen Charakter verlieren. Beide hier besprochenen Ansichten beruhen auf demselben Erklärungsprinzip, indem beide mit Reizen arbeiten. Die Kontroverse bezieht sich lediglich auf die Natur der Mechanismen, welche den wirkenden Reiz auslösen.

---

Z czterech istniejących teoryj geotropizmu *Paramecium* teoria ciśnienia (JENSEN) i teoria oporu (DAVENPORT) należą już tylko do historii. W chwili obecnej dyskutowane są jedynie dwie możliwości. Poglądem panującym jest teoria statocystów (LOEB), która zakłada, iż w ciele wymoczka zawarte są statolity, w postaci ziarenek cięższych od otaczającej je protoplazmy i zmieniających swe położenie w komórce pod wpływem grawitacji.

Ruch statolitów wewnątrz komórki powoduje kierunkowe podrażnienie protoplazmy, która ma dążność do odpowiadania na to podrażnienie ruchem wymocзка w kierunku, przeciwnym do kierunku przesunięcia statolitów. Teoria „mechaniczna“ (VERWORN) natomiast zakłada, że tylna połowa ciała *Paramaecium* jest cięższa i przeważa ku dołowi, nadając zwierzęciu położenie pionowe, końcem przednim ku górze. Prócz VERWORNA, w obronie teorii mechanicznej wystąpił tylko HARPER.

W dwóch poprzednich publikacjach ('28, '29) wypowiedziałem się za teorią mechaniczną, poddając jednocześnie krytyce argumenty KOEHLERA, zwolennika teorii statocystów. Ostatnio KOEHLER w pracy polemicznej utrzymuje swe poprzednie stanowisko i wyraża przekonanie, iż mimo wszystko teoria statocystów najlepiej tłumaczy zjawiska.

Wobec tego podjąłem sprawę na nowo, stosując udoskonalone z wielu względów metody badania. Celem pracy niniejszej jest krytyczne zestawienie dowodów na korzyść obu omawianych teoryj. Zacznę od zjawisk, dowodzących, zdaniem KOEHLERA, słuszności teorii statocystów.

### Centrotaksja.

Jak wykazał KOEHLER ('22), po krótkim i silnym wirowaniu w rurce szklanej, wymocзки skierowują się ze wzmoczoną szybkością ku końcowi byłemu dośrodkowemu rurki, zupełnie niezależnie od położenia rurki w przestrzeni. Zjawisko jest zgodne z teorią statocystów, natomiast zaprzecza teorii mechanicznej. W nowszej pracy ('30) tłumaczy KOEHLER moje odmienne wyniki w doświadczeniach nad centrotaksją nie dość szybkim manipulowaniem przy zdejmowaniu rurki z wirówki, użyciem nie dość gęstych kultur wymoczków, oraz niedostateczną szybkością wirowania. W tych właśnie warunkach otrzymał KOEHLER te same wyniki, co ja.

Podjąłem te doświadczenia na nowo, udoskonalając jednocześnie metodę badania w myśl wskazówek KOEHLERA. Wirówkę umocowałem poziomo, dzięki czemu rurkę z wymoczkami we wszystkich krytycznych położeniach: końcem ośrodkowym ku górze, ku dołowi, oraz poziomo, można było do obserwacji ruchów pozostawić na wirówce, nie odejmując jej. W szczegółach układ doświadczenia był następujący.

Wymocзки brałem z gęstych kultur, hodowanych na pożywce sianowej, bezpośrednio z pierścienia adhezyjnego, który się tworzył w naczyniach hodowlanych w pobliżu powierzchni. Przed właściwym doświadczeniem wymocзки przez dłuższy czas pozostawały w spoczynku. Do zgęszczania kultur nigdy nie posługiwałem się wirowaniem. Rurki, w których wirowa-

wałem wymoczki, miały 5 cm długości i 2.6 mm średnicy wewnętrznej. Na jednym końcu rurki były zatopione, na drugim otwarte. Rurki takie umieszczałem na hematokrycie. Promień hematokrytu wynosił 77 mm., odległość dośrodkowego końca rurki od środka wirówki była 27 mm. Wirowałem z szybkością 2000 do 3000 obrotów na minutę, w ciągu jednej minuty. Po wirowaniu zatrzymywałem możliwie szybko wirówkę i obserwowałem zachowanie się wymoczków w różnych położeniach rurki.

Wynik wielokrotnie powtarzanych doświadczeń był zawsze ten sam. Po zatrzymaniu wirówki można widzieć gęstą masę wymoczków, wędrujących ku końcowi dośrodkowemu rurki, niezależnie od jej położenia. Jak to podał KOEHLER, ten ruch „centrotaktyczny“ jest krótkotrwały i szybko przechodzi w reakcję geotropiczną.

Reakcja początkowa odpowiadałaby więc istotnie zjawisku, opisanemu przez KOEHLERA pod nazwą „centrotaksji“. Jednak dokładniejsza obserwacja charakteru ruchów w różnych położeniach rurki stawia całe zjawisko w nowym świetle. Używałem do obserwacji poziomego mikroskopu binokularnego, o powiększeniu około 30.

a) Rurka po wirowaniu stoi pionowo, końcem odśrodkowym ku dołowi. Po zatrzymaniu hematokrytu zachodzi bardzo prawidłowy ruch kierunkowy ku górze: wymoczki płyną prostoliniowo, nie uderzając o ścianki rurki. Jest to typowa reakcja geotropiczna. Wirowanie spowodowało ustawienie się wymoczków cięższym tylnym końcem na zewnątrz i odrzucenie w tym samym kierunku zawartych w protoplazmie ciężkich ziarenek. Wskutek tego połowa tylna została obciążona jeszcze bardziej i jej silna obecnie przewaga spowodowała ustawienie się pionowe wymoczków. Zjawisko jest więc zgodne z teorią mechaniczną.

b) Rurka pionowa, koniec odśrodkowy na górze. Wymoczki po zatrzymaniu wirówki skierowują się masowo ku dołowi, ale droga ich nigdy nie jest prostoliniowa. Kierunek ruchu waha się coraz bardziej, wreszcie pierwotniaki zawracają i skierowują się ku górze. Zachodzi to po 10 — 12 sekundach, przebyta w ciągu tego czasu odległość wynosi około 2 cm. Tylko bardzo nieliczne pojedyncze wymoczki płyną dalej w dół.

Ze stanowiska teorii mechanicznej podobne zachowanie się wymoczków jest koniecznością. Wirowanie stanowi silną podniechę, na którą pierwotniaki odpowiadają wzmożoną szybkością ruchu.

Tylko droga ku dołowi jest wolna i tam też skierowują się wymoczki. Idzie tu o naturalne rozpraszanie się zebranych przymusowo w jednym punkcie rurki i silnie podrażnionych pierwotniaków. Ale podczas tego ruchu ku dołowi natychmiast wywiera swój wpływ przewaga tylnej połowy ciała. Ponieważ połowa tylna jest cięższa, ciało wymocзка płynącego w dół znajduje się w położeniu równowagi cńwiejnej, co tłumaczy wahania kierunku ruchu. Początkowo ruch jest szybki i może w znacznym stopniu zrównoważyć przewagę tylnego końca. Po 10 — 12 sekundach jednak działanie podrażnienia staje się słabsze, ruch ulega znacznemu zwolnieniu i opadający tylny koniec ciała powoduje zmianę kierunku ruchu. Jeśli pojedyncze wymoczki mimo to płyną dalej w dół, to opisałem w pracy poprzedniej ('28 str. 30), że podczas wirowania pojedyncze osobniki niekiedy nie zdołają obrócić się końcem tylnym na zewnątrz. U takich osobników ciężkie ziarenka zostają odrzucone ku przodowi, co zmienia znak reakcji geotropicznej.

Różnica charakteru ruchu w rurkach o końcu odśrodkowym na dole, a na górze, jest tak wybitna, że nie pozostawia żadnych wątpliwości. Reakcja rozpraszania się oraz zwiększona szybkość ruchu jest wspólna obu rurkom, jednak w rurce pierwszej reakcja ta współdziała z geotropizmem, zaś w drugiej przeciwdziała mu. Istnienie specjalnej reakcji „centrotaktycznej“ również i w tym przypadku pozostaje nieudowodnione.

c) Rurka pozioma. Gęsta masa wymoczków skierowuje się, jak poprzednio, dośrodkowo. Jeśli jednak obserwować ten ruch nie z góry, lecz z boku, to widzi się bardzo wyraźnie, iż droga wymocзка nigdy nie jest tu linią prostą. Jak podałem już poprzednio ('28, str. 39), *Paramecia* zakreślają szereg prawidłowych krzywych, w określonych odstępach uderzając o górną ściankę rurki. Raz jeszcze, zachowanie się wymocзка z punktu widzenia teorii mechanicznej nie mogłoby być inne. Pierwotniaki rozpraszają się, płyną zaś poziomo, ponieważ tylko ten kierunek jest dla nich otwarty. Jednocześnie ze względów mechanicznych przewaga tylnego końca powinna w tym przypadku oddziaływać szczególnie silnie, powodując wyginanie się kierunku drogi ku górze. Po zderzeniu się ze ścianką następuje odbicie, poczem znowu przewaga tyłu wygina drogę ku górze. Jest jasne, że wymoczek nie wykonywa reakcji „centrotaktycznej“, lecz zwykłą

reakcję geotropiczną, w której uskutecznieniu przeszkadza mu górna ścianka rurki.

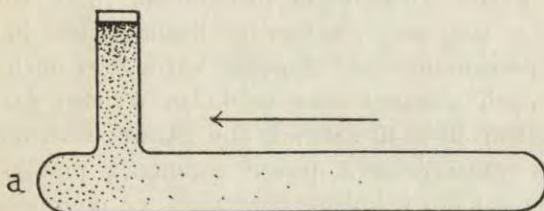
Według KOEHLERA, w podanych warunkach doświadczenia wymoczki płyną „geradlinig und parallel ohne Wandberührung die wagerechte Rohrlänge entlang bzw. die verkehrt senkrechte hinab“ ('30, str. 300). Sądzę, iż sprzeczność wynika z tego, że KOEHLER używał zbyt zgęszczonych kultur, w których wymoczki przykrywają się wzajemnie i dostrzeżenie drogi pojedynczego osobnika staje się bardzo trudne. W moich próbach prawidłowe krzywe występowały zawsze i były bardzo wyraźne.

„Gdyby w punkcie zderzenia wymoczka ze ścianką ta ostatnia posiadała otwór, prowadzący w górę, oczywiście *Paramaecium* skierowałoby się w górę“, pisałem w poprzedniej pracy ('28, str. 39). Doświadczenie to wykonałem obecnie. Rurka szklana o 8 mm średnicy wewnętrznej i 67 mm długości była zatopiona na obu końcach. Wpobliżu jednego z końców rurki była połączona z kawałkiem rurki węższej (6 mm średnicy wewnętrznej) pod kątem prostym, jak na rys. 1. Cały przyrząd napełniałem gęstą kulturą wymoczków, aż do wierzchołka rurki bocznej, poczem wstawiałem wszystko na wirówkę. Strzałka na rys. wskazuje kierunek działania siły odśrodkowej, rurka boczna stała pionowo. Po 1-minutowem wirowaniu z szybkością 2000 obrotów na minutę, wszystkie wymoczki zostały odrzucone w okolice **a** na rys. Po zatrzymaniu wirówki wszystkie wymoczki zakreśliły łuk i skierowały się do rurki bocznej, tworząc na jej wierzchołku gęste skupienie geotropiczne. Tylko kilka osobników udało się w kierunku poziomym.

W myśl teorii statocystów, statolity wymoczków, skupionych w czasie wirowania w okolicy **a**, zostały odrzucone w kierunku działania siły odśrodkowej, zatem wymoczki powinny płynąć w kierunku odwrotnym, czyli wzdłuż rurki większej. Obecność kawałka rurki bocznej w niczem nie zmienia sposobu działania siły odśrodkowej na statolity. A jednak ta ze stanowiska teorii zupełnie obojętna okoliczność zasadniczo zmienia kierunek reakcji. Wymoczki miały do wyboru reakcję „centrotaktyczną“ i reakcję geotropiczną. Wybrały geotropiczną, działając w ścisłej zgodności z teorią mechaniczną.

W analogiczny sposób można demonstrować wybór pomiędzy reakcją „centrotaktyczną“, a reakcją rozpraszania się. Rurka

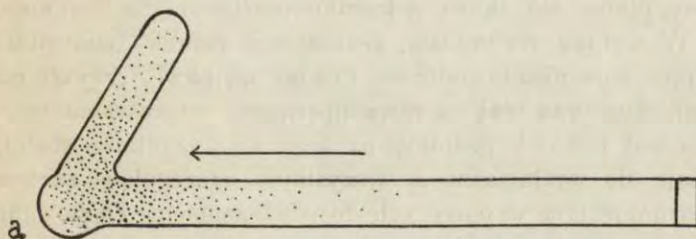
o 6 mm średnicy wewnętrznej zostaje zatopiona na jednym końcu i zgięta pod kątem około  $60^{\circ}$ , jak na rys. 2. W przegięciu, koło a, rurka posiada niewielkie rozszerzenie, symetryczne względem obu jej kolan. Rurkę umieszczałem na poziomej tarczy wirówki, w kierunku promienia, kolano krótsze leżało również poziomo. Po napełnieniu rurki kulturą *Paramecium* wirowałem ją przez



Rys. 1. Wybór pomiędzy reakcją „centrotaktyczną” a geotropiczną.

Fig. 1. Die Wahl zwischen der „Zentrotaxis” und dem Geotropismus. 40 Sek. nach dem Anhalten der Zentrifuge.

1 minutę z szybkością 2000/min. Zgodnie z teorią statocystów, wszystkie wymoczki po zatrzymaniu wirówki powinny wędrować dośrodkowo wzdłuż kolana dłuższego. Istotnie, wirowanie skupia wszystkie wymoczki w rozszerzeniu koło a. Te osobniki skupie-



Rys. 2. Wybór pomiędzy „centrotaksją”, a reakcją rozpraszania się.

Fig. 2. Die Wahl zwischen der „Zentrotaxis” und der Reaktion des Sich-Zerstreuens. 20 Sek. nach dem Anhalten der Zentrifuge.

nia, które przyszły z kolana dłuższego, muszą oczywiście doń powrócić. W kolanie krótszem początkowo siła odśrodkowa przycisnęła pierwotniaki do ścianki pod kątem  $30^{\circ}$ , po paru sekundach jednak wymoczki ześlizgnęły się i dostały się do tegoż skupienia a. Oddziaływała więc na nie ta sama siła odśrodkowa, w tym samym miejscu i w tym samym kierunku, zatem reakcja powinna nastąpić ta sama.

W rzeczywistości wymoczek, po zatrzymaniu wirówki, rozpraszają się równomiernie, jednakowo skierowując się do obu kolan rurki.

Istnieje jednak możliwość, że mimo wszystko wymoczek, które przyszły z dłuższego kolana, powracają doń, gdy wymoczek z krótszego powracają do krótszego. Zaprzecza temu następujące obliczenie. Przed wirowaniem pierwotniaki były równomiernie rozproszone w całej rurce, zatem ich liczba w obu kolanach była wprost proporcjonalna do długości każdego z nich. W moich doświadczeniach stosunek długości kolan wynosił 2.6. Po wirowaniu czekałem 30 — 40 sekund, aby pozwolić wymoczkom wydostać się z rozszerzenia a, potem zapomocą pipetki odessałem ciecz z wymoczkami z kolana dłuższego, aż do zagięcia. W tej porcji obliczyłem wymoczek, zaraz potem obliczyłem też wymoczek, pozostające w aparacie. Metoda jest mało dokładna i otrzymane liczby mają znaczenie przybliżone tylko. Nie mniej są one dość charakterystyczne. W jednym z takich obliczeń znalazłem 224 osobniki w dłuższym kolanie i 317 w krótszym, w drugim: 445 w długim na 396 w krótkim. Łącznie więc było 669 wymoczków w kolanie dłuższym, zaś 713 w krótszym. Trudno wątpić o tem, że pierwotniaki rozpraszają się równomiernie, płynąc jednakowo w każdym możliwym dla nich kierunku.

W wyniku stwierdzam, że istnienie reakcji „centrotaktycznej“ pozostaje nieudowodnione i nader wątpliwe. Zwykła reakcja geotropiczna oraz reakcja równomiernego rozpraszania się, obok wzmoczonej wskutek podniety mechanicznej szybkości ruchu, wystarczają do wytłumaczenia wszystkich szczegółów zachowania się *Paramecium* w opisanych doświadczeniach. Zachowanie się wymoczków jest w ścisłej zgodności z teorią mechaniczną.

#### Zachowanie się w polu magnetycznym.

Wykorzystując pomysł HARPERA, karmił KOEHLER wymoczek drobno roztartem zredukowanym żelazem i działał na nie silnym elektromagnesem. We wszystkich krytycznych położeniach rurki z wymoczkami w stosunku do bieguna magnesu: rurka pionowa, biegun u dołu, rurka pionowa, biegun u góry, rurka pozioma, przyczem linje sił pola magnetycznego przechodziły zawsze wzdłuż rurki, można było stwierdzić wpływ odpychający bieguna magne-



tycznego. Wymoczki zbierały się na końcu rurki, odwróconym od magnezu. Wynik ten nie zależał od tego, czy wodniczki żelazowe obciążały przeważnie tylny koniec ciała, czy też były zupełnie równomiernie rozproszone w komórce. Szybkość ruchu była stale zwiększona. Fakty te, zdaniem KOEHLERA, nie dadzą się pogodzić z teorią mechaniczną, stanowią natomiast ważny argument na korzyść teorii statocystów.

Wydaje mi się, iż wyniki powyższe nie mogą stanowić zarzutu przeciwko teorii mechanicznej. Przedewszystkiem należy uwzględnić trudną sprawę położenia wodniczków żelazowych w komórce. KOEHLER karmił wymoczki żelazem w jednych doświadczeniach w ciągu 5 minut, w innych w ciągu 20 do 60. Na początku karmienia świeżo utworzone wodniczki pokarmowe skierowują się ku tyłowi ciała i obciążają wówczas tylną połowę. Wędrowka takich wymoczków w kierunku od bieguna magnetycznego ze stanowiska teorii mechanicznej jest niezbędna. Bo- wiem magnes oddziaływa tylko na wodniczek z żelazem, skoro zaś ten znajduje się w tyle, musi zająć zwrot komórki tylnym końcem ku biegunowi, a zatem kierunek ruchu będzie od bieguna. Gdy wymoczki pobierają żelazo przez czas dłuższy, przystępują one do defekacji, co jest zawsze poprzedzone przez skupianie się wodniczków w okolicach cytoproktu, a więc znowuż w tylnym końcu ciała. Nieostrożnie dobierając czas karmienia, mamy do czynienia z wymoczkami o silnie obciążonym końcu tylnym. Ich zachowanie się będzie zgodne z teorią mechaniczną.

Weźmy jednak przypadek, gdy wodniczki są rozproszone zupełnie równomiernie w całej komórce. W myśl teorii mechanicznej tylna połowa *Paramaecium* jest cięższa od przedniej, gdyż posiada większą objętość, zawiera więcej endoplazmy. Jak wykazałem w pracy poprzedniej ('28, str. 27), model plastyczny *Paramaecium* z plastyliny w środowisku lepkiem opada zawsze tylnym końcem ku dołowi. Jeśli wymoczek jest zupełnie równomiernie napełniony wodniczkami żelazowymi, to wskutek różnicy objętości połowa tylna będzie [z konieczności zawierała tych wodniczków więcej]. W przypadku idealnym, gdy *Paramaecium* jest całkowicie, szczelnie wypełnione żelazem, otrzymujemy rodzaj modelu wymoczek z żelaza. Model ten oczywiście tak samo zachowa się w stosunku do magnezu, jak model plastylinowy

zachowuje się w stosunku do grawitacji. W tem niema żadnego nowego zagadnienia.

Co się tyczy zwiększonej szybkości ruchu wymoczków w polu magnetycznem, to mamy tu do czynienia ze zjawiskiem o mało poznanych czynnikach. W polu magnetycznem mamy bardzo silny dekrement natężenia, w zależności od odległości od bieguna. KOEHLER nie podaje dokładnie metody pomiaru szybkości ruchu, nie podaje na jakim odcinku rurki szybkość była mierzona i czy odcinek ten znajdował się bliżej czy dalej od bieguna. Jeśli istotnie działanie magnesu było przyczyną wzmożenia ruchu, to należało spodziewać się, iż wzmożenie to będzie stało w jakimś stosunku do intensywności siły działającej, czyli szybkość ruchu tego samego wymocзка w różnych punktach rurki będzie niejednakowa. Danych tych w pracy KOEHLERA brak, wobec czego bardzo trudno jest wyrobić sobie określone zdanie o istotnych czynnikach zwiększonej szybkości ruchu. Ponadto zarówno w wodzie, jak w środowisku kultury drobno roztertę zredukowane żelazo bardzo szybko ulega oksydacji, tracąc znaczną część swej aktywności magnetycznej. Jednocześnie zostaje przez to wprowadzony bodziec chemiczny o zupełnie nieznaney intensywności, tem bardziej, że w świeżo utworzonych wodniczkach pokarmowych *Paramaecium* jest obecny kwas solny.

Ale nawet pomijając te trudności, zadaniem zarówno teorii statocystów, jak teorii mechanicznej, jest wytłumaczenie kierunkowości ruchu, nie zaś jego intensywności. Jeśli cząstki żelaza uciskają na protoplazmę i podrażniają zwierzę, to nie stają się przez to bynajmniej statolitami. Fakt podrażnienia może nie zawierać żadnych wskazówek co do kierunkowości podrażnienia i dlatego sądzę, że w istocie zwiększona szybkość ruchu w polu magnetycznem ma niewiele wspólnego z naszym zagadnieniem przyczyn ruchów pionowych.

Reasumując możemy stwierdzić, że kierunek ruchu wymoczków, karmionych żelazem, w polu magnetycznem zgadza się dokładnie z przewidywaniami teorii mechanicznej. Z tego względu uważałem za możliwe nie sprawdzać tych doświadczeń KOEHLERA.

## Obserwacje podczas wirowania.

Podałem poprzednio ('28), że wymoczki, karmione ciężką zawiesziną chromianu baru i wirowane, wykazują skupienie wodniczaków barowych w tylnym końcu ciała, co dowodzi, że koniec ten podczas wirowania był skierowany na zewnątrz. Istnieje możliwość, że położenie to przybierają pierwotniaki aktywnie, nie zaś wskutek przewagi ciężaru tylnej połowy ciała. W pierwszej chwili wirowania siła odśrodkowa musi być niewielka i wymoczki mogą się jej przeciwstawić, aktywnie skierowując przedni koniec ciała dośrodkowo. W tym przypadku jednak istnienie przewagi tylnej połowy nie byłoby udowodnione.

Jednakże w zwykłym polu grawitacyjnym wymoczki, niepodrażnione nagłą zmianą środowiska, nie wykazują wcale ruchu kierunkowego. Trudno więc jest spodziewać się, aby przy sile odśrodkowej, niewiele odbiegającej od grawitacji, ruch taki zachodził. Sprawa ta może być rozstrzygnięta jedynie na drodze bezpośredniej obserwacji ruchów wymoczków podczas samego wirowania.

Przyjmuje się powszechnie, że działanie siły odśrodkowej jest identyczne z działaniem grawitacji. W przypadku wirowanych wymoczków, zachodzi jednak tu ważna różnica, której nieuwzględnienie przeszkadza w zrozumieniu wielu zjawisk. Gdy dla naszych stosunków grawitacja jest pewną wielkością stałą, w rurce wirówki mamy bardzo znaczny dekrement siły odśrodkowej, zależnie od wielkości promienia. W jednej i tej samej rurce ten sam wymoczek zachowa się zupełnie inaczej, gdy znajduje się w pobliżu końca dośrodkowego, niż gdy płynie w okolicach odśrodkowych rurki. Wykazują to jasno następujące doświadczenia orientacyjne.

Rurkę o 7 cm długości i 2 mm średnicy wewnętrznej napełniałem kulturą *Paramaecium* i wstawiałem na poziomą tarczę wirówki elektrycznej. Na jednym końcu rurka była zatopiona, na drugim otwarta. Koniec dośrodkowy rurki był odległy o 2 cm od środka wirówki. Wymoczki wirowałem ze stałą szybkością w ciągu 3 minut, po możliwie szybkim zatrzymaniu wirówki notowałem ich położenie w rurce. Poszczególne doświadczenia różniły się od siebie szybkością obrotów.

1. 120 obrotów na minutę. Po 3 minutach wirowania pierwotniaki są dość równomiernie rozproszone w całej rurce. W pobliżu końca dośrodkowego istnieje zaledwie uchwytna przewaga liczebności, na końcu odśrodkowym wymoczków trochę mniej.

2. 160 obrotów na minutę. Obraz rozmieszczenia jest podobny, ale przewaga dośrodkowego końca jest trochę wyraźniejsza.

3. 200 obrotów na minutę. Wyraźna przewaga dośrodkowego końca. Na peryferji zaledwie pojedyncze wymoczki.

4. 240 obrotów na minutę. Gęste skupienie wymoczków na końcu dośrodkowym, na peryferji wymoczków brak.

5. 300 obrotów na minutę. Punkt zwrotny reakcji. Zarówno na końcu dośrodkowym, jak odśrodkowym znajduje się gęste skupienie. Obydwa skupienia, o mniej więcej jednakowej liczebności, różnią się tem, że granice skupienia peryferycznego są znacznie ostrzejsze i samo skupienie zajmuje mniej miejsca. Środek rurki jest prawie wolny od wymoczków.

6. 400 obrotów na minutę. Większość wymoczków rurki wchodzi w skład skupienia odśrodkowego, skupienie dośrodkowe jest o wiele mniejsze. W środku zaledwie parę osobników.

7. 500 obrotów na minutę. Prawie wszystkie wymoczki odrzucone ku peryferji. Na końcu dośrodkowym zaledwie około 20 osobników. Środek całkowicie wolny od wymoczków.

8. 600 obrotów na minutę. Tylko parę osobników dośrodkowo. Reszta odrzucona ku peryferji.

9. 700 obrotów na minutę. Wszystkie wymoczki odrzucone ku obwodowi.

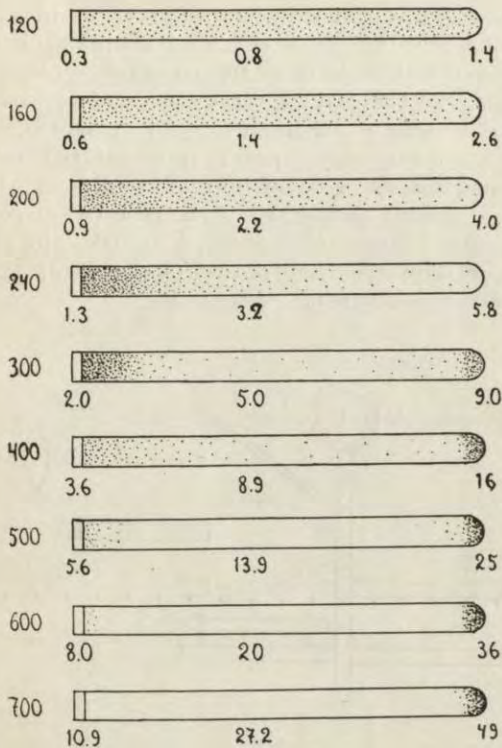
Załączony rys. 3 ilustruje te stosunki. Podaję na nim wielkość siły odśrodkowej w jednostkach grawitacyjnych dla trzech punktów rurki: promień wirowania 2 cm (koniec dośrodkowy), 5 cm (środek) i 9 cm (koniec peryferyczny). Siłę odśrodkową obliczałem według wzoru

$$c = R \left( \frac{N}{300} \right)^2,$$

gdzie  $R$  oznacza promień wirowania w centymetrach,  $N$ —liczbę obrotów na minutę.

Z rysunku widzimy odrazu, że wymoczki nie są w stanie oprzeć się sile odśrodkowej ponad 8 jednostek grawitacyjnych, natomiast w przypadku siły mniejszej płyną przeciwko jej kie-

runkowi. Jednocześnie widzimy, że siła conajmniej 2.6 jednostek jeszcze nie wystarcza, aby nadać ruchom wymoczków kierunkowość.

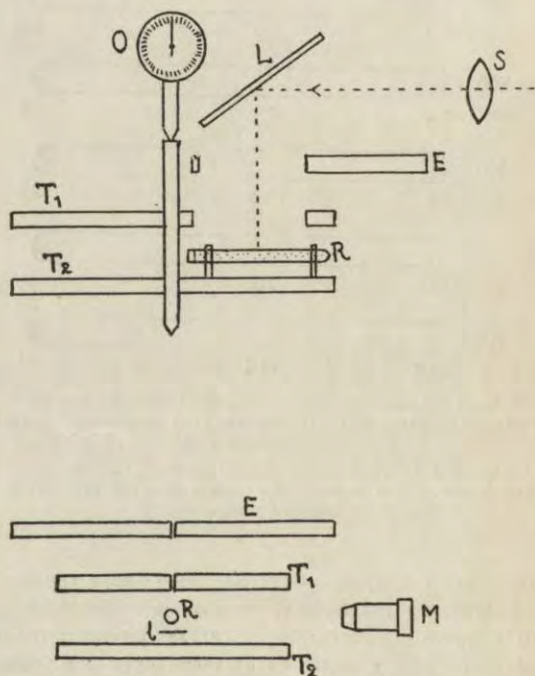


Rys. 3. W lewej kolumnie pionowej — liczba obrotów na minutę. Dla każdego doświadczenia podana jest siła odśrodkowa w jednostkach grawitacji, dla trzech punktów rurki.

Fig. 3. Verhalten bei verschiedener Zentrifugalkraft. Zahlen links bedeuten Touren pro Minute. Für 3 Punkte jedes Rohres sind die betr. Werte der Zentrifugalkraft angeführt.

Dokładniejszych danych dostarcza obserwacja ruchów *Paramecium* podczas wirowania. Skonstruowany w tym celu przyrząd oparty jest na znanej zasadzie szczeliny wirującej. Tarcza pozioma o średnicy 18 cm ( $T_2$ , rys. 4) połączona jest z motorem elektrycznym. Na powierzchni tarczy przytwierdzona jest w kierunku promienia rurka z wymoczkami (R). Nad tarczą do tej samej osi przytwierdzona jest druga tarcza pozioma ( $T_1$ ) o tych samych wymiarach, odległość pomiędzy obydwoma tarczami wynosiła 1.5 cm. W górnej tarczy znajduje się szczelina 0.4 mm szerokości, przebiegająca równolegle do rurki, tuż nad nią, i odległa o 7 mm od górnej ścianki rurki. Obie tarcze, szczelina i rurka, wszystko to obraca się

na wspólnej osi. 8 mm ponad górną tarczą umieszczony jest poziomy nieruchomy ekran (E), posiadający drugą szczelinę o szerokości 0.4 mm. Przy odpowiednim położeniu tarcz, szczelina górna przebiega dokładnie równoległe do szczeliny dolnej i do rurki, przyczem wszystko to leży w tej samej płaszczyźnie pionowej. Jeszcze wyżej jest lustro (L), nachylone o  $45^\circ$ , które rzuca promienie stojącej z boku lampy punktowej Zeissa (S) pionowo na szczelinę. Promienie są zogniskowane w płaszczyźnie szczeliny górnej. Gdy tarcze obracają się, rurka zostaje oświetlona tylko w chwili, gdy obie szczeliny leżą w jednej płaszczyźnie pionowej. W ciągu tego bardzo krótkiego czasu każdy punkt rurki zakreśli mały łuk, który w pierwszym przybliżeniu możemy uważać za linię prostą. Wymoczeki obserwuje się za pomocą poziomego binokularu (M) o powiększeniu 10-krotnym, w kierunku ruchu obrotowego, t. zn. tak, aby oś optyczna mikroskopu była przedłużeniem linii prostej (ściślej łuku), zakreślonej przez punkt obserwowany w chwili jego oświetlenia.



Rys. 4. Schemat przyrządu do obserwacji podczas wirowania. U góry — przekrój w płaszczyźnie obu szczeliny, u dołu — prostopady do nich.  $T_1$  i  $T_2$  — tarcza górna i dolna, E — nieruchomy ekran, R — rurka z wymoczkami, L — górne lustro, l — lustro dolne, O — licznik obrotów, S — soczewka lampy punktowej, M — obiektyw mikroskopu.

Fig. 4. Apparat zur Beobachtung während des Schleuderns, im schematischen Durchschnitt.

Wobec wąskości szczelin, promienie lampy oświetlają tylko środkową część przekroju poprzecznego rurki. Aby oświetlić ją całą, nie rozszerzając szczelin, co spowodowałoby mniejszą ostrość widzenia, umieszczałem pomiędzy rurką z wymoczkami, a dolną tarczą małe lusterko (L), rozpraszające promienie i oświetlające rurkę z dołu. Wreszcie, z osią wirowki sprzęgnięty był licznik obrotów (O).

Jak w poprzednich doświadczeniach, rurka miała 7 cm długości i 2 mm średnicy wewnętrznej.

W tych warunkach ruchy własne wymoczków podczas wirowania dają się obserwować bardzo wygodnie. Zaletą urządzenia jest absolutna i niezależna od liczby obrotów synchronizacja ruchu rurki i ruchu szczeliny oświetlającej, które obracają się na wspólnej osi. Ostrość widzenia możnaby znacznie zwiększyć, stosując węższe szczeliny oraz odpowiednio silniejsze źródło światła. Jednakże i w podanych warunkach, jakkolwiek kontury wymoczków są nieco rozmyte, niema żadnej trudności w oznaczeniu ustawienia się i kierunku ruchu każdego pojedynczego wymoczka

Przechodzimy do samych obserwacji. Gdy liczba obrotów jest niewielka, ruch pierwotniaków jest zupełnie bezkierunkowy. Wymoczki pływają we wszystkich możliwych kierunkach, dokładnie tak samo, jak w zwykłej rurce pionowej nieruchomej. Gdy zwiększamy stopniowo szybkość wirowania, wymoczki zaczynają ustawiać się końcami przednimi dośrodkowo. Początkowo czynią to niektóre, potem większość. Płynąc przed siebie, *Paramaecia* skierowują się ku dośrodkowemu końcowi rurki. Zwiększając stopniowo szybkość obrotów osiągamy punkt, w którym siła rzęsek wymoczka staje się równa tej sile, z jaką wymoczki są odrzucane ku peryferji, i *Paramaecium* staje nieruchomo w stosunku do ścianek rurki. Wreszcie jeszcze większa szybkość wirowania powoduje, że szybkość, z jaką wymoczki są odrzucane na zewnątrz, staje się większa od własnej szybkości ruchu. Pomimo intensywnej pracy rzęsek, *Paramaecium* zostaje stopniowo odepchnięte w kierunku odśrodkowym. Obok takich osobników, cofających się prawidłowo pod przemożnym działaniem siły odśrodkowej, zawsze można widzieć pojedyncze osobniki, szybko przelatujące, koziółkując, przez pole widzenia. W przypadku dużej szybkości wirowania, można także widzieć wymoczki, które od czasu do czasu przytwierdzają się do ścianki rurki i stają nieruchomo, aby w następnej chwili oderwać się i odskoczyć o parę milimetrów, zatrzymując się znowu.

Bardzo ciekawe wyniki dają obserwacje ilościowe. Wybrałem do obserwacji dwa punkty rurki: jeden z nich był odległy

o 32 mm, drugi o 70 mm od centrum wirówki. Dla obu oznaczyłem wielkość siły odśrodkowej, której wymoczeki zaledwie mogą się przeciwstawić. Uchwycenie właściwej chwili jest dość trudne z powodu bardzo różnego indywidualnego zachowania się pierwotniaków. Dużo zależy tu od wprawy. Należy też liczyć się z błędem około 10%. W 5 doświadczeniach znalazłem:

Tabela I.

Obr. we wszystkich tabelach oznacza liczbę obrotów na minutę.  
S. O. — siła odśrodkowa w jednostkach grawitacji.

Promień Radius 32 mm		Promień Radius 70 mm	
Obr.	S. O.	Obr.	S. O.
580	12.2	340	9
550	10.8	380	11.2
570	11.6	330	8.5
550	10.8	340	9
540	10.4	375	10.9
558	11.2	353	9.7

Do każdego oznaczenia używałem innej porcji wymoczków tej samej kultury. Otrzymana przeciętna siła odśrodkowa, odrzucająca wymoczeki, dość dobrze zgadza się z pomiarami JENSENA.

W drugiej serii oznaczałem w każdym doświadczeniu dwie wielkości: siłę odśrodkową, powodującą pierwsze kierunkowe ustawianie się wymoczków, oraz siłę, która zaczyna je odrzucać.

Tabela II.

Promień Radius 3.2 cm				Promień Radius 7 cm			
Ustawianie <i>Einstellen</i>		Odpychanie <i>Abdrängen</i>		Ustawianie <i>Einstellen</i>		Odpychanie <i>Abdrängen</i>	
Obr.	S. O.	Obr.	S. O.	Obr.	S. O.	Obr.	S. O.
240	2.1	540	10.4	230	4.1	340	9
330	3.9	460	7.6	230	4.1	340	9
330	3.9	515	9.5	240	4.5	330	8.5
270	2.6	520	9.7	210	3.4	320	7.9
280	2.8	460	7.6	220	3.8	300	7
290	3.1	499	9	226	4	326	8.2



W serji trzeciej zestawiam znowuż pomiary siły odśrodkowej, powodującej pierwsze kierunkowe ustawianie się wymoczków.

Po obliczeniu wielkości przeciętnej ze wszystkich pomiarów otrzymamy, iż pierwsze ustawianie się kierunkowe zaczyna się od siły odśrodkowej 3.5 jednostek, gdy siła 9.5 odrzuca wymoczki ku obwodowi. Zatem przeciętnie aż do siły odśrodkowej 3.5 jednostek ruchy wymoczków pozostają zupełnie bezkierunkowe.

Tabela III.

Promień Radius 3.2 cm		Promień Radius 7 cm	
Obr.	S. O.	Obr.	S. O.
300	3.2	210	3.4
270	2.6	230	4.1
280	2.8	210	3.4
270	2.6	240	4.5
300	3.2	200	3.1
320	3.6	220	3.8
280	2.8	220	3.8
290	3.0	230	4.2
310	3.4	210	3.4
290	3.0	240	4.5
291	3	221	3.8

Wynik ten przemawia na korzyść teorii mechanicznej, zaprzecza zaś teorii statocystów. Istotnie, tylna połowa ciała *Paramecium* jest cięższa. Jednak różnica ciężaru obu połów jest nieznaczna i w przypadku normalnej działalności rzęsek ruchowych nie może być przyczyną zmiany kierunku ruchu. Dla ciała rzędu wielkości *Paramecium*, gdy siły powierzchniowe muszą odgrywać tak przeważającą rolę, jest to zupełnie naturalne. W zwykłym polu grawitacyjnym można wywołać pionowe ustawienie się wymoczków, skoro dzięki jakimkolwiek wpływom ruch rzęsek zostaje silnie zwolniony. Inna metoda po temu polega na sztucznym zwiększeniu różnicy ciężarów obu połów ciała, przez dodatkowe obciążenie tylnego końca, lub też przez zastosowanie siły odśrodkowej, znacznie większej od normalnej grawitacji. Gdy siła odśrodkowa przekracza 3.5 jednostek, wymoczki nie są w stanie utrzymać ciała w położeniu asymetrycznym w stosunku do kierunku działającej siły odśrodkowej i ustawiają się dośrodkowo. *Paramecia* płyną teraz ku centrum wirowania. Skoro

jednak siła odśrodkowa przekracza 9.5 jednostek, szybkość, z jaką wymoczki zostają biernie odrzucane, jest większa od własnej szybkości ruchu zwierzęcia i dlatego wymoczki zostają odepchnięte ku peryferji. Działanie grawitacji w czasie wirowania możemy w przypadku wymoczków normalnych pominąć, bowiem jego intensywność nie jest wystarczająca, aby wpłynąć na kierunek ruchu.

Ze stanowiska teorii mechanicznej stosunki przedstawiają się więc bardzo prosto. Natomiast teoria statocystów napotyka tu poważne trudności. Normalnie pływające wymoczki zostają zmuszone do ustawienia się kierunkowego dopiero, poczynając od siły odśrodkowej 3.5 jednostek. Jeśli statolity mogą wyjawić swoje działanie tylko począwszy od tej wielkości, staje się niezrozumiałe, jak może istnieć urządzenie, działające jedynie w warunkach, w normalnem otoczeniu *Paramaecium* nigdy nieurzęczywistnionych. W jaki sposób statolity mogą dopomóc zwierzęciu do ustawienia się pionowego w zwykłym polu grawitacyjnem, skoro brak niezbędnej po temu siły? Dla teorii mechanicznej trudność ta nie istnieje. W warunkach naturalnych wystarcza krótkotrwałe osłabienie ruchu rzęskowego, aby spowodować przechylenie się ciała wymoczka końcem tylnym ku dołowi. Podczas wirowania potrzebna jest do tego siła większa, gdyż wymoczki pływają szybko i w tych warunkach nieznaczna przewaga tylnej połowy ciała nie może wpłynąć na kierunek ruchu, o ile siła odśrodkowa jest niedostateczna.

Inaczej przedstawia się sprawa, gdy idzie o wymoczki o sztucznie obciążonym tylnym końcu ciała. *Paramaecium*, karmione chromianem baru i wirowane, posiadają ciężkie wodniczki barowe skupione w tyle. Wymoczki takie wykazują tę same ruchy pionowe, co i normalne osobniki, jednak odpowiednie zjawiska zachodzą u nich o wiele wyraźniej. Jeśli obserwować takie osobniki podczas wirowania, to łatwo jest stwierdzić, że ustawiają się one kierunkowo przy znacznie mniejszej sile odśrodkowej. Z szeregu oznaczeń otrzymałem niezbędną po temu siłę 1.2 jednostek. Zarazem w tym przypadku wyraźnie występuje jednoczesność działania siły odśrodkowej i grawitacji. Wymoczki płyną dośrodkowo i trzymają się przytem górnej ścianki rurki. Najwyraźniej *Paramaecia* mają dążność do poruszania się w kierunku wypadkowej, w czem przeszkadza im opór górnej ścianki rurki. Znacznie zwiększona różnica ciężarów obu połów ciała

oraz znacznie mniejsza siła odśrodkowa tłumaczą to zjawisko, które zgadza się ściśle z przewidywaniami teorii mechanicznej.

Zatem wyniki obserwacji wymoczków podczas wirowania przemawiają na korzyść teorii mechanicznej i przeciwko teorii statocystów.

#### Swobodne opadanie wymoczków.

Już w pracy poprzedniej podałem, że obserwacja wolno pływających w naturalnym środowisku kultury wymoczków wskazuje na przeważanie tylnego końca ciała. Gdy wymoczek zwolni ruch rzęsek na przeciąg paru sekund, koniec tylny zaczyna opadać ku dołowi. Opiszę obecnie dokładniej metodę i wyniki.

Z bloku parafinowego wyciąłem naczynko o przekroju kwadratowym  $3 \times 3$  cm i wysokości 10 cm. W dwóch sąsiadujących z sobą ściankach u góry naczynia, wyciąłem dwa prostokątne okienka, w które wprawiłem szkiełka przykrywkowe  $21 \times 26$  mm. Płaszczyzny obu szkiełek stały do siebie prostopadle. Przez lewe okienko padała wiązka prawie równoległych poziomych promieni lampy punktowej, okienko frontowe służyło do obserwacji, do której użyłem binokularu poziomego o powiększeniu 30-krotnym. W podanych warunkach w ciemnym polu widzenia jaskrawo oświetlone wymoczki widoczne są z nadzwyczajną wyrazistością. Naczynko pokryłem od zewnątrz czarnym lakierem. Niezbędne jest chłodzenie promieni (warstwa wody kilku cm), gdyż w przeciwnym razie wymoczki zostają podrażniane, a w dodatku powstają w cieczy prądy konwekcyjne, bardzo utrudniające obserwację.

Wymoczki brałem bezpośrednio z gęstej kultury sianowej, możliwie unikając wszelkich podrażnień. W cieczy kultury zawieszono są liczne cząstki: detritus, kawałki błonki bakteryjnej i t. d.; wszystko to pozostaje nieruchome, prądów cieczy niema.

W takim polu widzenia bardzo często można dostrzec wolno pływające wymoczki, które po zderzeniu się z jakąś cząstką pływającą, pozostają z nią w kontakcie. Ruch postępowy wymoczka zostaje zawieszony na przeciąg nieraz kilku minut. Jednocześnie widać bardzo wyraźnie, że tylny koniec opada ku dołowi i *Paramaecium* przybiera położenie prawie pionowe. Ściśle mówiąc, nie dowodzi to przewagi tylnego końca. Bowiem ciężar właściwy zawieszonoj nieruchomo cząstki musi niewiele różnić się od ciężaru właściwego wody, gdy wymoczek jest wyraźnie cięższy. Kontakt przedniego końca z cząstką, lżejszą od wymoczka, powstrzymuje ten przedni koniec od opadania, dzięki czemu koniec tylny przeważa.

Ale bardzo pospolicie można dostrzec osobniki zupełnie wolne, niezwiązane z żadną częścią i poruszające się nadzwyczaj powoli. Prawie bez wyjątku wymoczki takie mają koniec tylny skierowany nieco ukośnie ku dołowi.

W ciągu całej obserwacji (około 2 godzin) pierwotniaki nie utworzyły w naczyniu żadnego skupienia geotropicznego, nie było zatem mowy o ruchu kierunkowym. A jednak przeważająca większość wolno płynących osobników wykazuje orientację ukośnie ku górze. Zachowanie się pojedynczych osobników tłumaczy, dlaczego mimo to nie skierowują się one ku górze. *Paramaecium* płynie przez krótką chwilę poziomo, potem stopniowo droga jego wygina się ku górze, aż wymoczek przybiera położenie prawie pionowe. Nagle *Paramaecium* cofa się gwałtownie, zmienia położenie ciała i płynie ukośnie ku dołowi. I znowu droga jego stopniowo przechodzi w poziomą i wygina się ku górze, aby zmienić się raptownie po nowem cofnięciu się. Reakcja cofania się zachodzi na różnych poziomach naczynia i przebyta w kierunku ku dołowi droga ma bardzo różną długość. Właśnie dzięki temu ruch ogólny pozostaje bezkierunkowy i nie ma skupienia geotropicznego.

Obecność mechanizmów sterujących, np. w postaci rzęsek w głębi cytopharynx, jak przypuszcza KOEHLER, jest bardzo prawdopodobna, nie stanowi jednak żadnego zarzutu przeciwko przewadze tylnego końca. Obserwacja wykazuje jasno, że ażeby skierować się ku dołowi, *Paramaecium* musi zrobić pewien wysiłek, musi aktywnie zmienić swoją drogę właśnie zapomocą mechanizmów sterujących. Ale skierowanie się wymoczka w górę nie wymaga żadnego wysiłku, ponieważ następuje to wskutek przeważania tylnej połowy ciała. Całe zachowanie się wymoczka jest w ścisłej zgodności z teorią mechaniczną.

Bodaj wszyscy autorzy, którzy pracowali nad geotropizmem *Paramaecium*, podają zgodnie, iż wymoczki zabite opadają w każdym dowolnem położeniu, nie wykazując żadnej przewagi któregokolwiek końca ciała. Wynik ten otrzymuje się stale, gdy nie uwzględnia się dokładnie fizycznych warunków opadania wymoczka. Wszelkie utrwalanie zwiększa ciężar właściwy wymoczka, dzięki czemu opadanie jego jest stosunkowo szybkie. A w tych warunkach nieznaczną przewagę tylnej połowy nie zdoła się należycie uzewnętrznić. Z drugiej strony utrwalenie

powoduje nieraz silną kontrakcję ciała, podłużną i poprzeczną. Wymoczek jest zdeformowany, środek ciężkości jego przesuwają się w niewiadomym kierunku i stąd też ustawianie się podczas opadania musi być przypadkowe. Obu tych trudności można uniknąć. Mieszanina GELEI (10 części 40% formaliny i 1 część kwasu osmowego) doskonale zachowuje kształt *Paramaecium*, zwłaszcza gdy używa się nieco słabszej koncentracji mieszaniny, niż podał GELEI. Na 5 części cieczy z wymoczkami brałem 1 część mieszaniny, która za każdym razem musi być świeżo sporządzona. Jeśli po kilku minutach utrwalania wstrząsnąć rurkę z wymoczkami i obserwować ich opadanie zapomocą mikroskopu poziomego, występuje dość wyraźna, choć nieznaczna przewaga tylnego końca. W jednym takim doświadczeniu obliczyłem, że 413 osobników opadło tylnym końcem naprzód, 201 miało koniec przedni skierowany ku dołowi, zaś 145 opadało w położeniu poziomym. Przewaga tylnej połowy jest tu mało wyraźna, gdyż szybkość opadania była stosunkowo znaczna.

Dokładniejsze wyniki można uzyskać inną metodą. Wymoczki utrwalone mieszaniną GELEI przenosiłem kolejno i bardzo ostrożnie do alkoholu: 7, 15, 30, 50, 70, 90 i 95%. Następnie odciągałem pipetą prawie cały alkohol, którego pozostało nad wymoczkami około  $\frac{1}{2}$  cm<sup>3</sup>, wstrząsałem rurkę i natychmiast, zanim pierwotniaki zdążyły opaść na dno, dodawałem około 2 cm<sup>3</sup> gęstej gliceryny. Teraz nad wysoką warstwą gliceryny znajdowała się cienka warstwa alkoholu z wymoczkami. Całość poddawałem silnemu i długotrwałemu wirowaniu. Opadanie wymoczków w glicerynie jest bardzo powolne i niezbędne jest silne wirowanie. Łatwo jest uchwycić moment, gdy wymoczki są zawieszony w glicerynie, po drodze do odśrodkowego końca rurki. Takie wymoczki w około 90% skierowują swój koniec tylny ku dołowi (na zewnątrz).

Nie uważam tego wyniku za decydujący, bowiem utrwalenie, pomimo jego zewnętrznej doskonałości, napewno spowodowało szereg skurczów i przesunięć wewnętrznych, zmieniając jednocześnie znacznie ciężar właściwy. Nie mniej jest zastanawiające, iż tak bardzo różne metody stale doprowadzają do tego samego wniosku: koniec tylny *Paramaecium* jest cięższy. Być może w niektórych z podanych doświadczeń tkwi jakiś niewykryty błąd metodyczny, ale wszystkie razem nie mogą dać li tylko przypadkowo zawsze tego samego wyniku.

## Uwagi ogólne.

Podane fakty pozwalają na zajęcie stanowiska w stosunku do sporu pomiędzy teorią mechaniczną, a teorią statocystów. Przeprowadzę systematyczne porównanie obu teorii pod względem uzasadnienia faktycznego oraz pod względem stosowalności do tłumaczenia zjawisk.

Teoria statocystów opiera się na trzech założeniach. Pierwsze z nich, to obecność w komórce *Paramaecium* statolitów, czyli cięższych od protoplazmy ciałek. Słuszność tego założenia nie ulega wątpliwości. Każde *Paramaecium* zawiera kryształki fosforanu wapnia, które mogłyby odegrać rolę statolitów.

Drugim założeniem teorii jest, że statolity mogą zmieniać swoje położenie w komórce pod wpływem grawitacji. Ta hipoteza jest nie tylko niedowiedziona, ale i nadzwyczaj nieprawdopodobna. Nie wydaje się możliwe, aby ciałka rzędu wielkości kryształów fosforanu wapnia, znajdujące się w cieczy tak bardzo lepkiej, jak protoplazma pierwotniaka, mogły ulec przesunięciom pod wpływem samej tylko grawitacji. Miss FETTER wykazała na wymoczkach karmionych żelazem, że cząstki żelaza zostają odrzucone na zewnątrz podczas wirowania dopiero po zastosowaniu siły odśrodkowej 709 jednostek grawitacyjnych. Autorka oblicza stąd lepkość protoplazmy *Paramaecium* w stosunku do wody na 8726. Nie dość na tem. Według VAN HERWERDEN pod wpływem słabych kwasów, jak np. kwas octowy, protoplazma *Paramaecium* ulega odwracalnej żelatynizacji. Ułamany koniec mikroigły szklanej sterczy w takiej protoplazmie, jak w jakimś ciele stałym. W tych warunkach przesunięcia statolitów pod wpływem grawitacji są nie do pomyślenia. A jednak właśnie w tych samych koncentracjach tego samego kwasu octowego wymoczkki wykazują zadziwiająco jednolitą reakcję geotropiczną. Udział w niej statolitów jest zupełnie wyłączony.

Trzecia hipoteza teorii zakłada istnienie skomplikowanego aparatu recepcyjnego i rozdzielczego, jak go widzimy w statocystach tkankowców. Tu obracamy się tylko wśród nader odległych analogij, nie posiadamy jednak absolutnie żadnych faktów na poparcie tak śmiałego przypuszczenia. Argument KOEHLERA, że u wielu tkankowców nie znamy dokładnie anatomicznego podłoża

odruchów, a mimo to nie wątpimy o udziale w nich systemu nerwowego, nie wydaje się zbyt przekonywujący. Trawienie *Paramaecium* wykazuje wielorakie i głębokie analogje do trawienia tkankowców, a jednak *Paramaecium* napewno nie posiada ani żołądka ani trzustki. Dlaczegoż więc komórka pierwotniacza miałaby być koniecznie statocystą? Na samych analogjach trudno jest coś budować.

Możemy więc stwierdzić, że właściwie uzasadnienie faktyczne teorii statocystów wogóle nie istnieje. Sama obecność w protoplazmie ciężkich ziarenek nie jest dostatecznym argumentem.

Natomiast uzasadnienie teorii mechanicznej jest wielorakie. Przemawia za nią przede wszystkim kształt ciała normalnego *Paramaecium*. Model *Paramaecium* z plastyliny wykazuje przewagę tylnej połowy, co potwierdza również KOEHLER. Wymoczki karmione chromianem baru i wirowane ustawiają się tylnym końcem na zewnątrz, zaś obserwacja ruchów podczas wirowania wskazuje, iż ustawianie się to nie jest aktywne. Pod wpływem silnego chłodzenia lub roztworów NaOH przednia połowa ciała grubieje znacznie. U takich wymoczków wirowanie wpędza ciężkie wodniczki barowe do przedniego końca. Zmiana kształtu powoduje przesunięcie się środka ciężkości ku przodowi, za czym podąża równolegle ustawianie się pierwotniaków na wirówce. Wreszcie obserwacja ruchów wymoczków w środowisku kultury i w braku sztucznych podrażnień również wykazuje przewagę tylnego końca, za czym przemawia także opadanie wymoczków utrwalonych. Niewątpliwie uzasadnienie teorii mechanicznej jest nierównie głębsze, niż teorii statocystów.

Zwracamy się teraz do stosowalności obu teorii do tłumaczenia zjawisk. KOEHLER żąda od teorii mechanicznej wytłumaczenia następujących faktów.

1°. Powstawanie skupień geotropicznych w zwykłym polu grawitacyjnym, pomimo bezkierunkowości ruchu. Musimy odróżnić tu dwa przypadki. Gdy umieszczamy wymoczki w pionowej rurce obserwacyjnej, unikając silnych podrażnień, obserwujemy ruch bezkierunkowy, a jednocześnie powstawanie w górnych warstwach cieczy gęstych skupień geotropicznych. Jak wykazałem na zasadzie obserwacji pojedynczych osobników ('29 str. 200), w rurce takiej występuje wybitna różnica zachowania się wymoczka u góry, a u dołu. Od dna rurki *Paramaecium* odbija

się natychmiastowo, aby skierować się w górę, natomiast w górnych warstwach cieczy zatrzymuje się na przeciąg kilku sekund, zanim skieruje się ponownie w dół. W tych warunkach powstaje skupienie geotropiczne, które zmienia swój skład z każdą chwilą, ale pozostaje jako takie. Różnica zachowania się wymoczków na obu końcach rurki nie jest sprawą wpływu grawitacji, lecz tylko sprawą jakiegoś wpływu przyciągającego górnej części rurki.

Inaczej wygląda zjawisko, gdy wymoczki silnie podrażnić, zmieniając raptownie własności środowiska, np. przez dodanie wody wodociągowej do kultury, lub przez przepuszczanie silnego prądu powietrza, azotu, wodoru przez kulturę. Teraz następuje silne wzmoczenie szybkości ruchu i ruch staje się kierunkowy: wszystkie wymoczki ustawiają się równolegle i płyną w górę, nie uderzając o ścianki rurki. U góry tworzy się gęste i trwałe skupienie, wymoczki, które dostały się do górnych warstw cieczy, nie zawracają ku dołowi. Teraz dopiero zachodzi reakcja, zasługująca na miano geotropizmu. Jej wytłumaczenie ze stanowiska teorii mechanicznej jest proste. Nagła zmiana środowiska jest bodźcem, który powoduje chwilowe zwolnienie ruchu rzęsek. W tych warunkach połowa tylna przeważa ku dołowi, wymoczki ustawiają się pionowo, zaś wznowiony normalny ruch rzęsek, łącznie z obrotami dookoła osi podłużnej ciała, warunkuje prostoliniowość drogi, skierowanej prostopadle ku górze. Istotnie, ustawienie się geotropiczne wymoczków zachodzi nie od razu po ustaniu działania podrażnienia: konieczna jest do tego pauza 10 — 15 sekund i właśnie pauzę tę wykorzystuje *Paramecium* na ustawienie się pionowo.

Jak jednak tłumaczy to samo zjawisko teoria statocystów? Gdy przepuszczamy przez kulturę silny strumień powietrza, wymoczki są rzucane i miotane we wszystkich możliwych kierunkach przestrzennych. Jeśli mimo to odpowiadają na podrażnienie ruchem ściśle kierunkowym, to jego kierunkowość nie może być sprawą działania statolitów. Wydaje mi się to tak jasne, że nie chciałbym sprawy dyskutować dalej.

2°. Powstawanie skupień geotropicznych po nasyceniu środowiska dwutlenkiem węgla. I to zjawisko nie stanowi trudności dla teorii mechanicznej. Wprowadzenie dwutlenku węgla oznacza raptowną zmianę środowiska, na którą wymoczki reagują tak samo, jak w poprzednim przypadku. Do tego dołącza się ta



okolicość, że  $\text{CO}_2$  działa jak narkotyk, powodujący silne zwolnienie ruchów wymocзка. Istotnie, w środowisku  $\text{CO}_2$ , ruchy *Paramaecium* są nadzwyczaj powolne. W tych warunkach przewaga tylnego końca ma wszelką możność spowodować pionowe ustawienie się wymocзка.

O wiele trudniejsza jest sprawa dla teorii statocystów. Przedewszystkiem twierdzenie KOEHLERA, iż obecność  $\text{CO}_2$  jest niezbędnym warunkiem powstawania kierunkowego ruchu geotropicznego, absolutnie nie zgadza się z moimi obserwacjami. Jeśli przepuszczamy przez kulturę powietrze, które przeszło uprzednio przez roztwór ługu, albo przepuszczamy czysty azot lub wodór, to usuwamy tem całkowicie  $\text{CO}_2$  ze środowiska. Mimo to wymoczki reagują ruchem kierunkowym. Ponadto pomiary kwasowości środowiska wykazały, iż ilość dwutlenku węgłowego, wydalaną przez wymoczki nawet w bardzo gęstej kulturze, jest o wiele za mała, aby spowodować wystąpienie kierunkowego ruchu. Ruch ten zachodzi w środowisku prawie nasyconem  $\text{CO}_2$ . Wobec tego geotropizm w doświadczeniach KOEHLERA z dwutlenkiem węgla zachodzi w warunkach, w normalnej kulturze nieobecnych.

Tłumaczenie, jakie daje KOEHLER zaobserwowanym przez siebie ruchom polega na hipotezie, iż  $\text{CO}_2$  działa jako sensylibizator, uczulając protoplazmę na ucisk ze strony statolitów. Na poparcie tego przypuszczenia, poza nader odległymi analogjami, nie możemy przytoczyć żadnych konkretnych faktów. Kierunkowy ruch zachodzi tak samo po przepuszczeniu przez kulturę azotu, jak dwutlenku węgla, a trudno jest twierdzić, aby i azot działał na protoplazmę uczulająco. Wyższość teorii mechanicznej jest w tym przypadku oczywista.

3<sup>o</sup> i 4<sup>o</sup>. Zachowanie się wymoczków, karmionych żelazem, w polu magnetycznym oraz zjawiska centrotaksji omówiliśmy już przedtem. Istnienie specjalnej reakcji „centrotaktycznej“ jest bardzo wątpliwe, zaś ruchy *Paramaecium* w polu magnetycznym są zgodne z teorią mechaniczną.

5<sup>o</sup>. Wzmoczona szybkość ruchu wymoczków wirowanych. Jak zaznaczyłem poprzednio, zadaniem obu omawianych teorii jest wytłumaczenie kierunkowości ruchu, nie jego natężenia. To ostatnie może być skutkiem zupełnie bezkierunkowego podrażnienia. W przypadku wirowania przyczyna wzmoczenia ruchu jest

jasna i nie ma ona nic wspólnego z teorią geotropizmu. W moich doświadczeniach z centrotaksją wymoczki ulegały wpływowi siły odśrodkowej 770 jednostek grawitacyjnych. Pod wpływem tak potężnego przyciskania wymoczków do dna rurki, ciało pierwotniaka ulega częściowemu spłaszczeniu. W każdym razie stanowi ono silne podrażnienie mechaniczne. Z doświadczeń ALVERDESA wynika, iż drażnienie lokalne *Paramaecium* zapomocą igły szklanej wywołuje zwiększoną szybkość ruchu. Podobny jest efekt działania siły odśrodkowej o pewnym natężeniu.

6°. Wzmózona szybkość ruchu w polu magnetycznym. Sprawę tę omawialiśmy już poprzednio. Czynniki zjawiska pozostają niezbadane, sam zaś fakt szybszego ruchu, jak w przypadku poprzednim, nie ma żadnego związku z jego kierunkowością, a zatem nie wymaga odwołania się do jakiegokolwiek teorii geotropizmu.

Wszystkie przytoczone przez KOEHLERA fakty dają się więc wytłumaczyć zapomocą teorii mechanicznej, stanowią natomiast poważną trudność dla teorii statocystów. Faktów podobnych jest jednak więcej. Linje krzywe, zakreślane przez wymoczki wirowane, są niezrozumiałe ze stanowiska teorii statocystów. Różnica charakteru ruchu w obu położeniach rurki pionowej w doświadczeniach „centrotaktycznych“ nie da się wytłumaczyć teorią statocystów. Niezrozumiałe jest z jej punktu widzenia stałe istnienie pauzy kilkunastu sekund pomiędzy odwróceniem pionowej rurki, w której zachodzi ruch geotropiczny, a ponownym geotropicznym ustawieniem się wymoczków. Przedewszystkiem jednak nie da się wytłumaczyć wielka różnorodność czynników, wywołujących ruch kierunkowy. W wyniku możemy stwierdzić, iż teoria mechaniczna jest nierównie lepiej uzasadniona, niż teoria statocystów. Stanowi ona w chwili obecnej najlepsze, jakie posiadamy, wytłumaczenie ruchów pionowych *Paramaecium*.

„A jednak, pomimo wszystko, teoria mechaniczna z pewnością nie da się utrzymać“ pisałem w pracy poprzedniej (28, str. 128). Nie miałem bynajmniej zamiaru wygłosić paradoks. Teoria mechaniczna VERWORNA zakłada, że ciało *Paramaecium* posiada własności areometru, powracającego automatycznie do położenia równowagi stałej po odchyleniu. Nie wynika stąd wcale, aby *Paramaecium* było tylko czemś na podobieństwo areometru. Tak sądził VERWORN i właśnie dlatego jego teoria nie da się utrzy-

mać. Teoria mechaniczna musi ulec modernizacji. Jest rzeczą bardzo prawdopodobną, iż bierny zwrot ciała, spowodowany przewagą tylnej połowy wymocзка, jest związany z odpowiednim bodźcem, na który wymoczek reaguje aktywnie zapomocą swoich mechanizmów rzęskowych. Jak widzieliśmy, wymocзки utrwalone, u których wszelka aktywność jest wyłączona, także wykazują przewagę tylnego końca, jednak przewaga ta uzewnętrznia się znacznie trudniej, niż u osobników żywych. Kontrakcja ciała, spowodowana przez utrwalenie, przesunięcie środka ciężkości oraz zwiększenie ciężaru właściwego z pewnością nie są tu bez znaczenia, ale fakt zgadza się również bardzo dobrze z istnieniem pewnej aktywności w zwrotach. Przechylenie ciała może być minimalne, zaledwie uchwytnie, ale posiada ono zawsze ten sam kierunek i ten kierunek wskazuje wymoczkowi kierunek ruchu. Jeśli *Paramecium* wykonywa ruch ujemnie geotropiczny, to musi koniecznie posiadać środki, które mu pozwalają odróżnić kierunek ku górze od kierunku ku dołowi. Wypowiedziany tu pogląd wyrażę antropomorficznie: gdy wymoczek „chce“ płynąć w górę, wstrzymuje on na chwilę ruch swoich rzęsek i na zasadzie kierunku, w jakim jego ciało zostaje biernie zwrócone, „wie“ od razu, gdzie leży góra. Możnaby to przetłumaczyć na język fizjologii, jednak punkt widzenia antropomorficzny posiada tę zaletę, że jest bardziej naoczny i daje się wyrazić krócej. Skoro zaś wymoczek „dowiedział“ się o położeniu góry, natychmiast uruchamia mechanizmy sterujące i ustawia się aktywnie ku górze.

Przewaga tylnej połowy ciała staje się dzięki temu nie przyczyną bezpośrednią ruchów geotropicznych, lecz źródłem bodźców, na które pierwotniak odpowiada. Odpowiedź zaś jego zależy od wielkiej mnogości różnorodnych czynników, od których wyczerpującego poznania jesteśmy jeszcze bardzo dalecy. Tylko w specjalnych, sztucznych warunkach zdołamy wyolbrzymić subtelne różnice ciężaru, istniejące u wymocзка normalnego. Obserwujemy wówczas zjawiska przymusowe, odznaczające się dużym stopniem prawidłowości, z których możemy dużo wnioskować o „elementach“ normalnego zachowania się pierwotniaka. W tem ostatniem jednak przewaga tylnej połowy ciała jest tylko subtelnym środkiem rozpoznawczym.

Tak ujęta teoria „mechaniczna“ zatracza swój wyłącznie mechanistyczny charakter. Dyskusja pomiędzy teorią mechaniczną

a teorią statocystów nie dotyczy bynajmniej zasady tłumaczenia ruchów pionowych. Zasada jest ta sama, gdyż obie teorie operują bodźcami i reakcjami. Niezgodność dotyczy jedynie natury tych mechanizmów, które stanowią źródło bodźców.

#### Streszczenie.

Praca ma na celu krytyczne zestawienie dowodów na korzyść mechanicznej teorii geotropizmu *Paramecium*, a teorii statocystów.

Istnienie specjalnej reakcji „centrotaktycznej” (KOEHLER) jest wątpliwe. Zachowanie się wymoczków wirowanych można wytłumaczyć zwykłym geotropizmem ujemnym, bądź reakcją rozpraszania się.

Zachowanie się wymoczków, karmionych żelazem, w polu magnetycznym odpowiada przewidywaniom teorii mechanicznej.

Została opracowana metoda obserwacji *Paramecium* podczas wirowania. Aż do siły odśrodkowej 3.5 jednostek grawitacyjnych, ruch wymoczków pozostaje bezkierunkowy. Zaprzecza to możliwości miarodajnego udziału statolitów w kierunkowym ruchu, zachodzącym w zwykłym polu grawitacyjnym.

Obserwacje swobodnego opadania wymoczków żywych lub utrwalonych wskazuje na istnienie przewagi tylnej połowy ciała.

Zestawienie faktów, uzasadniających obie omawiane teorie, wypada na korzyść teorii mechanicznej.

Zwrot ciała wymocзка pod wpływem przewagi tylnego końca może być połączony ze specyficznym bodźcem, co pozbawia teorię mechaniczną jej wyłącznie mechanistycznego charakteru. U wymocзка normalnego przewaga ta nie jest bezpośrednią przyczyną ruchów pionowych, lecz jest subtelnym środkiem rozpoznawczym, źródłem specyficznym bodźców, na które *Paramecium* reaguje.

#### Piśmiennictwo.

- Alverdes F.** 1922. Studien an Infusorien über Flimmerbewegung, Lokomotion und Reizbeantwortung. Arb. aus. d. Geb. d. exper. Biol. 3 (1).  
**Dembowski J.** 1928. Ruchy pionowe *Paramecium caudatum*. I. Względne położenie środka ciężkości w ciele wymocзка. Acta Biol. Exper. 3 (19).

- Dembowski J.** 1929. II. Wpływ niektórych warunków zewnętrznych. *Ibid.* **3** (195). **Fetter D.** 1926. Determination of the protoplasmic viscosity of *Paramecium* by the centrifuge method. *Journ. Exper. Zool.* **44** (279). **Gelei J. v.** 1926. Cilienstruktur und Cilienbewegung. *Zool. Anz. Suppl.* **2** (202). **Herwerden M. A. v.** 1926. Umkehrbare Gelbildung und Fixation. *Nederl. tijdschr. v. geneesk.* **70** (245). (Po holendersku). **Jensen P.** 1893. Die absolute Kraft einer Flimmerzelle. *Pflüg. Arch.* **54** (537). **Koehler O.** 1922. Über die Geotaxis von *Paramecium*. *Arch. f. Protistenk.* **45** (1) **Koehler O.** 1930. Über die Geotaxis von *Paramecium*. II. *Ibid.* **70** (292). **Verworn M.** 1889. *Psychophysiologische Protistenstudien* Jena, Fischer.

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

[Zakład Chemji Fizjologicznej Uniwersytetu Warszawskiego]

W. Giedroyć i St. J. Przyłęcki.

Wpływ soli na stężenie jonów wodorowych w roztworach  
amfolitów.

*Effect of addition of salts on the pH of solutions of ampholytes.*

Rękopis nadesłany w dniu 27. II. 1931 r.

1°. The addition of various mineral salts changes the pH of gelatin, ovalbumin, and peptone solutions.

2°. The depression of pH is at a maximum on the alkaline side of the isoelectric point.

3°. The action of salts is a function not only of their concentration but also of the valency of their ions.

4°. The effect produced by unit concentration of salts is greater at very low than at higher concentrations.

---

Dodanie  $\text{CaCl}_2$  do układów: żelatyna, skrobja i amylaza zmienia szybkość rozpadu skrobji.

Jedną z przyczyn, powodujących powyższe zjawisko mogła być zmiana stężenia jonów wodorowych. Obserwacja powyższa była punktem wyjścia do niniejszej pracy.

Pierwszy SPIRO ('22) zwrócił uwagę na możliwość zmiany pH roztworów białka pod wpływem dodanych soli, wykazując obniżenie się pH roztworu glikokolu w związku z dodawaniem  $\text{CaCl}_2$  i  $\text{KCl}$ .

Podobne badania na białkach wykonali MOND ('23), NETTER ('25), SIMMS ('30) i inni, potwierdzając obserwacje SPIRO. Większość badaczy dochodzi do wniosku, że działanie soli na pH koloidów, a więc i białka, nie różni się niczem od tegoż działania na krystaloidy amfoteryczne np. glikokol.

Wydawało nam się, że wniosek powyższy jest oparty na niedostatecznie ugruntowanych podstawach. Przedewszystkiem w wyżej wzmiankowanych badaniach oznaczano zmiany pH pod wpływem dużych stężeń soli, w granicach 150 — 250 mmol, nie oznaczano natomiast zmian, powstających zależnie od stężenia dodawanych soli. Z czysto teoretycznych danych wiemy, że różnic w związku z działaniem soli na koloidy i krystaloidy, jako elektrolity spodziewać się raczej należy przy stosowaniu małych stężeń soli (0—10—20 mmol). Wynika to zarówno z badań nad hydrofobami, t. j. koloidami typu elektrokratycznego (FREUNDLICH '30), i hydrofilami, solwatokratycznymi (KRUYT i współpracownicy '28 i '29), w których oznaczano lepkość, właściwości elektrokinetyczne i t. d.

Celem niniejszej pracy było poznanie zmian pH roztworów żelatyny, albuminy z jaj kurzych, peptonu i glikokolu w zależności: 1<sup>o</sup>, od stężeń soli w granicach 0—25 mmol; 2<sup>o</sup>, od wartościowości anjonu i katjonu soli i 3<sup>o</sup> — od pH układu pierwotnego.

### Metodyka.

Żelatynę francuską firmy Cognet Fils Paris, t. zw. „extra“, dwukrotnie przemytą wodą destylowaną w temp. 0<sup>o</sup>, rozpuszczano w takiejże wodzie, ogrzanej do 60<sup>o</sup>. Porcje po 100 cm<sup>3</sup> roztworów 0.5—2.0% umieszczano w uprzednio wymytych wodą erlenmayerkach, zawierających 100 cm<sup>3</sup> wody lub roztworów różnych soli (chemicznie czystych Mercka). Punktem wyjścia były roztwory  $\frac{1}{10}$  n poszczególnych soli. Po dokładnem wymieszaniu roztworów i doprowadzeniu do 20<sup>o</sup> oznaczano potencjometrycznie pH w aparacie firmy Cambridge, stosując elektrodę wodorowo-kalomelową. Kładliśmy specjalny nacisk na czystość aparatury, roztworów, naczyń oraz wody destylowanej, każde bowiem zanieczyszczenie mogło spowodować zmiany w stanie żelatyny. Stosowaliśmy sole NaCl, KCl, CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub> i Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Roztwory soli doprowadzaliśmy poprzednio do pH żelatyny, zaś pH tej ostatniej zmienialiśmy, dodając  $\frac{1}{10}$  lub  $\frac{1}{50}$  n NaOH. Podobne doświadczenia wykonaliśmy z peptonem Witte (Poulenc). Pepton ten zawierał koloidy wytrącalne 50% alkoholem. Białko jaja kurzego firmy Merck zawierało globuliny, które wypadały w czasie rozpuszczania białka w wodzie. Do badań używano przesącza.



## W y n i k i.

## I. Żelatyna.

## 1) Żelatyna w pH pierwotnem.

Doświadczenia, zestawione w tabeli I, zostały wykonane na roztworze 1% żelatyny, rozpuszczonej w wodzie destylowanej; pH wynosiło 5.8 — 5.9. Z liczb otrzymanych wynika, że sole  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{MgSO}_4$  oraz  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  działają bardzo różnie, wszystkie jednak obniżają pH układu. W przypadku zwiększania stężenia  $\text{KCl}$ , obniżenie zachodzi niemal proporcjonalnie do wzrostu stężenia. Wyjątek stanowi małe odchylenie na początku. Zupełnie inaczej przedstawiają się wyniki, otrzymane w związku z badaniem wpływu soli o dwuwartościowych anjonach i katjonach. Tak jedne, jak i drugie wywołują znacznie większe zmiany pH w obliczeniu na jednostkę stężenia, jeśli są użyte w stężeniach bardzo małych (1—5—10 mmol). Krzywe odnośne noszą charakter zbliżony do izoterm adsorbcyjnych.

T a b e l a I.

Zmiany pH w roztworze żelatyny; pH pierwotne = 5.8 — 5.9.  
*Variations in pH of gelatin solutions; pH of control systems*  
 = 5.8 — 5.9.

Stężenie soli w mol. <i>Molar concentration</i>	Obniżenie pH <i>Lowering of pH</i>				
	$\text{CaCl}_2$	$\text{MgCl}_2$	$\text{MgSO}_4$	$\text{Na}_2\text{SO}_4$	$\text{KCl}$
0.0025	0.21	0.12	0.09	0.06	—
0.005	0.25	0.20	—	—	—
0.010	0.30	0.26	0.19	0.15	—
0.020	0.39	0.33	—	—	—
0.025	0.43	0.38	0.27	0.26	—
0.050	—	—	—	—	0.09
0.100	—	—	—	—	0.17

Wpływ stężenia żelatyny na zmiany pH, wywołane przez identyczne stężenie soli  $\text{CaCl}_2$ , uwidacznia tabela II. W doświadczeniu użyto 0.4, 0.6, 0.8, 0.9 i 1.2% roztworów żelatyny. Z zestawionych liczb wynika, że w mniejszych stężeniach żelatyny zmiana wywołana identyczną koncentracją soli jest znaczniejsza, niż w stężeniach większych.

Tabela II.

Wpływ stężenia żelatyny.  
Influence of concentration of gelatin.

% żelatyny Gelatin %	Stężenie CaCl <sub>2</sub> Concentration of CaCl <sub>2</sub>	Obniżenie pH Lowering of pH
0.4	0.010 m	0.38
	0.020 m	0.59
0.6	0.010 m	0.48
	0.020 m	0.50
0.8	0.010 m	0.44
	0.020 m	0.46
0.9	0.020 m	0.44

## 2) Wpływ pH pierwotnego roztworu.

Dodając do roztworu żelatyny różne ilości  $1/50$  n NaOH, można regulować dowolnie pH roztworu. Badania przeprowadzono na roztworach o pH — 5.90, 8.03 i 9.21, sporządzonych z tej samej żelatyny, użytej w tem samym rozcieńczeniu. Największe zmiany pH stwierdzono, używając żelatynę alkaliczną o pH = 8.03 (tabela III). Gdy bowiem przy pH = 5.9, 5 mmol CaCl<sub>2</sub> wywołuje obniżenie o 0.25, w układzie, o pH = 8.03 zmiana wynosi aż 0.46. Gdy dodamy 10 mmol CaCl<sub>2</sub> w układzie o pH pierwotnym 5.9, zmiana stanowi 0.30, zaś przy pH = 8.03 — 0.54. Znacznie mniejsze zmiany pH zauważamy w układzie bardziej alkalicznym (pH = 9.21). Tutaj dodanie 5 mmol CaCl<sub>2</sub> wywołuje obniżenie zaledwie o 0.03, 10 mmol o 0.05 i 25 mmol o 0.20. Zaznaczyć należy, że przy pH = 9.0, dodanie CaCl<sub>2</sub> wywołuje opalescencję. Użycie do doświadczeń MgCl<sub>2</sub> nie zmieniło w niczem otrzymanych wyników.

Tabela III.

Wpływ pH pierwotnego.  
Influence of original pH.

Stężenie CaCl <sub>2</sub> Concentration of CaCl <sub>2</sub>	pH	Obniżenie pH Lowering of pH
0.0	8.03	0.0
0.005 m	7.57	0.46
0.010 m	7.49	0.54
0.0	7.44	0
0.0025 m	7.23	0.21
0.0	9.21	0
0.005 m	9.18	0.03
0.010 m	9.16	0.05
0.025 m	9.01	0.20

## II. Białko Mercka.

Doświadczenia wykonywano na białku rozpuszczonym w wodzie lub w roztworze lekko zalkalizowanym. Ograniczono się do zbadania działania  $\text{CaCl}_2$  oraz  $\text{MgSO}_4$ . Używano 2% roztworu, przygotowanego w przeddzień i przesączonego przez bibułę bezpośrednio przed doświadczeniem. Wyniki, zestawione w tabeli IV, dowodzą, że krzywa zmiany pH pod wpływem różnych stężeń soli jest również zbliżona do izotermy adsorbcyjnej.

Tabela IV.

Roztwór albuminy jaja kurzego.  
*Ovalbumin solutions.*

Stężenie soli <i>Salt concentration</i>	pH	Obniżenie pH <i>Depression</i>
$\text{CaCl}_2$ 0.0	8.58	0
" 0.005 m	8.42	0.16
" 0.010 m	8.37	0.21
" 0.020 m	8.32	0.26
" 0.025 m	8.31	0.27
$\text{MgSO}_4$ 0.010 m	8.47	0.11

## III. Pepton.

Badania przeprowadzono na 3% peptonie, porównyując działanie różnych stężeń  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  i  $\text{NaCl}$ , przy pH = 4.8, 5.7 — 6.0. Badania wykonane w punkcie izoelektrycznym (P. I.) dla peptonu pH = 4.8, wykazały, że zarówno sole o dwuwartościowym anionie ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) jak katjonie ( $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$ ) jak i o obu jonach dwuwartościowych, wywołują tylko bardzo nieznaczne zmiany pH (T. V.).

Tabela V.

Roztwór peptonu. Obniżenie pH.  
*Peptone. Lowering of pH.*

Stężenie soli <i>Concentration</i>	pH pierwotne = 4.78 — 4.80 <i>Original pH = 4.78 — 4.80</i>				pH pierwotne = 5.8 — 6.0 <i>Original pH = 5.8 — 6.0</i>		
	$\text{CaCl}_2$	$\text{MgCl}_2$	$\text{MgSO}_4$	$\text{Na}_2\text{SO}_4$	$\text{CaCl}_2$	$\text{MgCl}_2$	$\text{MgSO}_4$
0.005 m	0.05	0.06	0.05	0.05	—	—	—
0.010 m	0.07	0.09	0.07	0.07	0.23	—	0.17
0.025 m	0.08	0.12	0.09	—	0.42	0.38	0.38

Wyniki zgoła odmienne daje alkalizowanie roztworów przez dodanie różnych ilości  $\frac{1}{10}$  n NaOH. Liczby podane w tabeli VI, wykazują, że w tak zmienionych warunkach wszystkie sole o jonach dwuwartościowych wywołują silne obniżenie pH.

### W n i o s k i.

1°. Podane zestawienia potwierdzają przedewszystkiem wyniki poprzednich badaczy, wykazujących ogólnie, że sole obniżają pH roztworów elektrolitów amfoterycznych, jeśli one znajdują się przy pH, wyższym od P. I. Zjawisko to zdawałoby się można łatwo wytłumaczyć zmianą aktywności ( $f_a$ ) istniejącej soli, zmianą wyrażającą się w równaniu

$$H = \frac{K [\text{kwas}]}{f_a [\text{sól kwasu}]}.$$

Podobny sąd byłby przedwczesny z następujących powodów.

Po-pierwsze, w części skali pH podane równanie nie ujmuje całokształtu zjawisk. Jeśli przyjmiemy istnienie „Zwitter“ jonów amfolitu, wtedy poza grupą karboksylową przyjąć musimy dysocjację części grup aminowych. W tych warunkach sole mają podwójne działanie, którego suma zależna jest od wpływu na grupę kwasową i zasadową.

Po-drugie, poza wskaźnikiem aktywności  $f_a$  odgrywają rolę czynniki, wynikające ze stopnia dysocjacji soli (szczególnie jeśli chodzi o sole katjonów wielowartościowych).

Po-trzecie, w pewnych pH sól dzięki dysocjacji hydrolytycznej przechodzi w wodorotlenki o mniejszej  $f_a$  niż zasada, z której pomocą doprowadzono układ do pH pierwotnego.

Czwarty czynnik — to rozpuszczalność powstałych soli. W pewnych pH np. z białka, stwierdzamy po dodaniu soli  $\text{CaCl}_2$ , a nawet  $\text{MgCl}_2$ , — zmętnienie.

Ujęciem czynników, wywołujących zmiany pH przez dodanie soli, zajmiemy się w następnej pracy. Obecnie pragniemy zwrócić uwagę na zmiany pH, wywołane dodaniem różnych stężeń tej samej soli, i zmiany, powstałe dzięki użyciu soli o jonach różnej wartościowości. Zmiany pH, wywołane różnymi stężeniami soli 2.5 — 25.0 mmol świadczą, że wynik odbiega znacznie od obserwacji, dotyczących krystaloidów. Doświadczenia MICHAEL-

LISA i KRÜGERA (21) nad wpływem soli na stałą dysocjacji kwasu fosforowego lub układu kwas octowy-octan na pH roztworu oraz na pH roztworu glikokolu, świadczą wyraźnie, że: 1°, zmiany są w granicach badanych stężeń bardzo nieznaczne, że 2°, są one proporcjonalne do stężenia dodanych soli.

Nasze doświadczenia wykazują natomiast, że sole o katjonach czy anjonach dwuwartościowych wywołują w pewnych granicach pH zmiany bardzo znaczne i nieproporcjonalne do stężenia dodanych soli. I tak przy użyciu roztworu 1% żelatyny o pH pierwotnym = 5.9 pierwsze 2.5 mmol  $\text{CaCl}_2$  w litrze wywołują obniżenie pH o 0.21, drugie już tylko o 0.04, zaś trzecie o 0.025 i t. d.

Zasadniczo to samo stwierdzamy przy użyciu  $\text{MgCl}_2$  (I — 0.12, II — 0.08, III — 0.03)  $\text{MgSO}_4$  i  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Najmniej wyraźnie zarysowuje się powyższe zjawisko przy użyciu  $\text{KCl}$ , substancji tej bowiem trzeba dodać 100 mmol, t. j. 40 razy więcej niż  $\text{CaCl}_2$ , aby uzyskać ten sam wynik. Z powyższego zestawienia wynika, że obraz jest zgoła odmienny, niż w przypadku glikokolu. Dodanie do tego ostatniego 2.5 mmol  $\text{CaCl}_2$  wywołuje obniżenie pH tylko o 0.02.

Przyczyna różnego zachowania się soli o jonach jedno i dwuwartościowych może wynikać z ich własności. Pierwszą jest silniejszy wpływ jonów wielowartościowych na wskaźnik aktywności ( $f_a$ ) związku. Uwidacznia się to we wzorze

$$\log f_a = -0.354 n_i^2 \sqrt{\Gamma}, \text{ gdzie } \Gamma = \sum c_i n_i^2.$$

We wzorach powyższych  $c_i$  oznacza stężenie jonów w jednostce objętości, zaś  $n_i$  ich ładunek, przyczem ten ostatni występuje dwa razy w drugiej potęgze.

$\Gamma$  oznacza t. zw. ogólne stężenie jonowe („gesammte ionale Konzentration“) roztworu 1).

Druga przyczyna omawianych różnic leży w różnym nagromadzeniu się jonów na powierzchni koloidu, dzięki sorbcji 2).

Badania FREUNDLICHA i jego współpracowników oraz stworzona przez niego teoria uznają, że przyjmując nawet jedna-

1) Wzór zaczerpnięty z EUCKENA: „Lehrbuch der chemischen Physik“. Lipsk 1930, str. 410.

2) W najogólniejszem pojęciu zagęszczenia na powierzchni koloidu,

kową adsorbcję, jedno-, dwu- lub wielowartościowych jonów, otrzymana zmiana będzie tem większa, im wyższej wartości jony są sorbowane. Wydaje nam się, że podwójne występowanie wartościowości w równaniu wskaźnika aktywności może tylko częściowo tłumaczyć odmienne działanie różnych stężeń KCl z jednej i CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> oraz MgSO<sub>4</sub> z drugiej strony, istnieją bowiem zbyt duże różnice w charakterze krzywych KCl i innych badanych soli. Reasumując przypuszczamy, że różnice w działaniu soli na pH koloidów żelatyny, białka i peptonu w porównaniu z temże działaniem na krystaloidy wynika z nagromadzenia się — sorbcji — jonów na powierzchni cząstek. Przemawia za tem charakter krzywych, zbliżonych do izoterm adsorbcji. Jony, ulegając sorbcji, zostają zagęszczone w sferze okalającej cząstki. Ponieważ w tejsze sferze znajdują się związki nadające pH roztworu, białczany, przeto zmiana wywołana dodaniem soli, musi być znacznie większa od działania w układzie jednorodnym. Gdybyśmy chcieli określić  $\lg f_a$  i  $\Gamma$  to dla  $c_i$  (ogólne stężenie jonów w jednostce objętości), nie moglibyśmy podstawić stężenia obliczonego na ilość jonów w jednostce objętości całego układu, lecz musielibyśmy wyrazić je przez stężenie w sferze, okalającej cząstki koloidu.

Odmienne działanie różnych elektrolitów wynikałoby z różnych wartościowości ich jonów i różnej intensywności sorbcji. Jony jednowartościowe są może mniej sorbowane, stąd charakter krzywej działania bardziej zbliżony do krzywych, notowanych dla krystaloidów. Jony o dwuwartościowych anjonach lub katjonach byłyby natomiast silniej sorbowane. Za przypuszczeniem tem przemawiają wyniki, otrzymane przez BIALASZEWICZA ('28) oraz jego współpracownika ZAWADZKIEGO ('29). W pracy BIALASZEWICZA widzimy, że procent jonów poszczególnych elektrolitów, związanych z fazą rozdrobnioną w jajach różnych gatunków zwierząt, jest bardzo rozmaity, zależnie od wartościowości ich jonów. Wobec tego, że w warunkach doświadczalnych tych autorów jony jednowartościowe występowały zawsze w nadmiarze, wniosek powyższy wymaga jeszcze specjalnych doświadczeń.

2°. Porównyując działanie różnych soli o katjonach dwuwartościowych, widzimy duże podobieństwo między działaniem CaCl<sub>2</sub> i MgCl<sub>2</sub>. Świadczy o tem zarówno charakter krzywych, jak i absolutne liczby, wykazujące obniżenie pH, wywołane przez

jednakowe stężenie dwu powyższych soli ( $MgSO_4$ , a jeszcze bardziej  $Na_2SO_4$  odbiegają od powyższego).

3°. Porównanie krzywych działania soli o katjonach dwuwartościowych na żelatynę, białko i pepton, wykazuje, że charakter ich jest rozmaity. W białku stwierdzamy bardzo szybki, proporcjonalnie do ogólnej zmiany spadek pH (do 10 mmol  $CaCl_2$  o  $pH = 0.21$ ) przy bardzo małych stężeniach  $CaCl_2$ , poczem następuje już tylko nieznaczna zmiana (od 10 do 25 mmol o  $pH = 0.03$ ).

Nieco odmienny charakter wykazuje krzywa otrzymana z badań nad żelatyną. Po szybkim przyroście o 0.30 pH między 5—10 mmol  $CaCl_2$  następuje okres drugi wolniejszego spadku, kiedy między stężeniem 10 i 25 mmol  $CaCl_2$  różnica wynosi  $pH = 0.13$ .

Najmniej charakterystyczne, najmniej zbliżone do izoterm adsorbcyjnych krzywe otrzymuje się, badając wpływ soli na pepton. Szybki spadek pH daje się zauważyć jeszcze między 20 i 25 mmol  $CaCl_2$ .

Odchylenia te uwypuklają według nas zasadniczą różnicę działania jonów na koloidy i krystaloidy. Część różnic pochodzi jednak prawdopodobnie z ilości grup tamponujących i wiążących jony na powierzchni cząstek.

4°. Oznaczenia, wykonane na koloidach, których pH było sztucznie zmienione, wykazały co następuje:

W okolicy punktu izoelektrycznego działanie jonów soli jest najmniejsze, prawie żadne. Wzrasta ono następnie w miarę alkalizowania, a dochodząc do pewnego maksimum, znów się obniża. Stwierdzają to badania, wykonane zarówno na żelatynie, jako też na peptonie.

5°. Na uwagę zasługuje fakt, że w układach o pH wyższych od P. I., w których cząstki koloidu winny być szczególnie wrażliwe na wartościowość katjonu, sole o jednowartościowym katjonie i dwuwartościowym anionie, np.  $Na_2SO_4$ , działają znacznie silniej od  $KCl$  lub  $NaCl$ .

6°. Z doświadczeń naszych dadzą się wysnuć dwa wnioski natury biologicznej.

Pierwszy, to znaczne zmiany pH, wywołane małymi stężeniami soli o dwuwartościowych katjonach  $CaCl_2$  i  $MgCl_2$ . Najsilniej zmieniają pH różnice stężeń zawarte między 0—5—10 mmol.

Jeśli zważymy, że roztwór 5 mmol  $\text{CaCl}_2$  równy jest 55 mg%  $\text{CaCl}_2$ , więc 19.5 mg% Ca, zawartość zaś wapnia we krwi i cieczach ustroju waha się około 10 — 20 mg%, to widzimy, że wahania w biologicznym stężeniu soli mogłyby odgrywać pewną rolę w wysokości pH układu. Zmiany pH zależałyby nie od ogólnej ilości Ca lecz od wapnia, zagęszczonego na powierzchniach cząstek natury białkowej.

W dalszej serji badań zauważyliśmy wszelako, że działanie jonów Ca, zależne jest od obecności jonów Na i K. W przypadkach większych stężeń NaCl lub KCl zmiany wywołane małymi ilościami  $\text{CaCl}_2$  lub  $\text{MgCl}_2$  są znacznie mniejsze, niżby to wynikało z naszych danych. I tak 10 mmol  $\text{CaCl}_2$  wywołuje w 1% roztworze żelatyny pH = 5.9 obniżenie o pH = 0.31, gdy natomiast po dodaniu 150 mmol KCl w tych samych warunkach 10 mmol  $\text{CaCl}_2$  obniża pH zaledwie o 0.09. Dalsze doświadczenia są w toku.

7°. Drugi wyprowadzony przez nas wniosek dotyczy reakcyj enzymatycznych. Z szeregu badań wynika, że szybkość tych reakcyj jest zależna od pH środowiska. Weźmy dla przykładu pracę MYRBÄCKA ('26) nad amylazą śliny. Widzimy, że optimum szybkości przypada na pH = 6.96 (Krzywa str. 13). Natomiast przy pH = 5.4 i 8.3 stwierdzamy zaledwie 50% aktywności. W pewnych granicach małym zmianom pH odpowiadają duże różnice sprawności działania enzymu. Jeśli np. od układu o pH = 8.3 przejdziemy do innego o pH = 7.8, t. j. obniżymy pH o 0.5, to działanie aktywności wzrośnie z 45% (pH = 8.3) do 70% (pH = 7.8), innymi słowy — przyspieszymy szybkość rozpadu o 50% szybkości przy pH = 8.3.

Natomiast jeśli badanie nasze skierujemy na część wstępującą krzywej, to zauważymy odpowiednie wstrzymanie—zmniejszenie szybkości reakcji. Jeśli teraz powyższe dane zestawimy z naszymi obserwacjami, to stwierdzamy, że w pewnych układach z białkami, dodając małe ilości soli o jonie wielowartościowym, możemy zmieniać dowolnie szybkość reakcyj.

Czy zjawiska tego rodzaju mogą odgrywać jakąś rolę w ustroju żywym, nie jest rzeczą wiadomą, tembardziej, że obecność innych soli (NaCl, KCl) znacznie osłabia zmiany pH. Wydaje nam się wszelako, że w specjalnie pomyślanych doświadczeniach modelowych możnaby drogą małych zmian stężenia soli częściowo regulować szybkość reakcyj.



## Piśmiennictwo.

**Białaszewicz K.** 1928. *Ann. Physiol.* **4** (190). **Freundlich H.** 1930. *Kapillarchemie.* Leipzig. **Kruyt.** 1928, 1929. *Kolloid-Beih.* **29** (30). **Michaelis L. und R. Krüger.** 1921. *Biochem. Z.* **119** (307). **Mond R.** 1923. *Arch. ges. Physiol.* **200** (422). **Myrbäck K.** 1926. *Z. physiol. Chem.* **159** (1). **Netter M.** 1925. *Arch. ges. Physiol.* **208** (16). **Simms H.** 1929. *Journ. gen. Physiol.* **12** (511). **Spiro K.** 1922. *Kolloid-Z.* **31**. **Zawadzki B.** 1929. *Acta Biol. Exp. Warsaw.* **4** (119).



[Biometric Laboratory, Nencki Institute, Societas Scientiarum ac Litterarum Varsoviensis]

Karolina Iwaszkiewicz and J. Neyman.

**Counting Virulent Bacteria and Particles of Virus.**

*Rachowanie bakteryj chorobotwórczych i cząsteczek jadu w cieczy.*

Accepted for publication 7. III. 1931.

C o n t e n t s :

	Page
1. Introductory . . . . .	101
2. First method of approach . . . . .	105
3. The test for goodness of fit . . . . .	111
4. Illustrations . . . . .	113
5. Second method of approach . . . . .	129
6. Third method of approach . . . . .	138
7. Summary of results . . . . .	140
8. Polish summary . . . . .	140

1. Introductory.

In many questions of biological character it is extremely important to have a proper method of measuring the poisoning power of any given solution. The problem is complicated as the variation of the poisoning power may depend upon two essentially different causes: (1) in different cases we may have merely two different concentrations of the same poison, and (2) we may have to deal with two different poisons and in different concentrations. A satisfactory method of measuring ought to distinguish between these two factors, i. e. the concentration and the properties of the poison itself.

It will be perhaps interesting to commence by citing more or less definite biological problems in which the question mentioned has arisen.

(a) It is known that the poisoning power of the virus produced by some bacteria is not constant, but changes considerably with the time: injecting every day a certain dose of the same solution to a sample of mice we see that *f. i.* the percentage of deaths increases to a certain maximum and then falls. The nature of such processes is sometimes known, but in many cases it is not and the question arises whether the change in virility is due to the varying quantity of the poisoning substance in the solution or to the changing properties of the poison itself. Or indeed it may happen that both processes are going on together.

(b) We shall mention a further example, which has been recently considered by the Medical Research Council's Department of Biological Standards <sup>1)</sup>. It concerns the test for toxicity of novarsenobenzene. The object of this test is to provide a safeguard against the issue of material which, through the unavoidable variations of manufacture, has a toxicity greater than that which may be regarded as normal for the substance.

The perfectly satisfactory form of such a test would of course consist in determining ( $\alpha$ ) the chemical nature and ( $\beta$ ) the content of the poison in any one batch of the drug. Unfortunately the first part of the problem thus stated is not solved, which makes it impossible to solve the other. All that it was possible to do, was to compare the toxicity of any given batch with that of one of them, taken as a standard. To make such a comparison possible a special curve is constructed, the abscissae of points on which are the different doses of neosalvarsan injected into mice, while the ordinates are the corresponding percentages of deaths. To compare a batch of neosalvarsan with the standard we have only to inject several mice with a certain dose of the same, to count the subsequent deaths and finally to find on the curve the point, *P*, having its ordinate equal to the observed death rate. If the injected dose was, say, *a* and the abscissa of

---

<sup>1)</sup> Toxicity Tests for Novarsenobenzene, by F. M. DURHAM, J. M. GADDUM and J. E. MARSHAL, London 1929.

the point  $P$  was  $b$ , we should say that the toxicity of the tested batch was equal to  $(b/a) \times$  toxicity of the standard.

Such a test is of course subject to random errors of sampling and the authors invented a remarkable method of checking. But there is another possible source of error, which requires special examination.

The authors stated that the sensitiveness of different mice varies, depending upon sex, age and size. Probably also it depends upon hereditary factors. Hence if in a particular case we found that the death rate caused by a given batch of neosalvarsan was practically the same as that obtained by the authors, we cannot, strictly speaking, conclude that the toxicity in both cases was the same, as generally we know very little about the mice used for the experiments. The position would be hardly much better even if every laboratory testing neosalvarsan were to construct their toxicity curve of the standard and then breed from the same stock of mice, which had been injected with the standard neosalvarsan. For in choosing mice having a definite size for the routine work we may easily make a selection with regard to the sensitiveness and after several generations the „same“ stock of mice will not be the same. What is really wanted in the present case is to have a method of separating the effects of the varying concentration of the poison in the drug and of the changing mean sensitiveness of the mice.

(c) The last example is also taken from published work. A paper by H. H. Mc KINNEY <sup>1)</sup> deals with the virus producing the so called mosaic disease on tobacco plants. His problem is to find a method of measuring the concentration of the virus in any given solution. As the nature of the virus is unknown, the method proposed consists in the following.

The minimum concentration of the virus, which, being injected in a certain dose, produces mosaic on absolutely every plant, is called the unit of concentration. To measure the concentration of the virus in any given extract we have to make different solutions of the same and then to inject them into samples of the plants. Taking concentrations of the extract in solutions as abscissae and the corresponding rates of mosaic as

<sup>1)</sup> Quantitative and Purificative Method in Virus Studies. Journ. of Agric. Research. 35 (№ 1).

ordinates, the author constructs a toxicity curve. It is then necessary to find the first point on this, for which the ordinate is equal to 100. If the concentration of a given extract were  $a$  times the concentration corresponding to this point, it would mean that the concentration of the virus in the extract was equal to  $a$  units.

First of all we may remark that the unit of concentration described is hardly an exact one. In constructing a curve of toxicity we do not merely describe the results of an experiment, but — especially by fitting a theoretical curve to the points of observation — we are trying to deal with probabilities. Whatever be the virus under consideration we hardly can find a concentration corresponding to the probability equal to one, that the injection will produce the effect. But there are concentrations corresponding to the probabilities practically equal to one. Which of them determine the unit of concentration? Would not a more natural measure of concentration be obtained, if we could determine the number of bacteria or of particles of the toxin per unit of volume of the extract?

Another point is this: Mc KINNEY found that a certain extract of the virus had 2222 units of concentration. Suppose that in another laboratory the experiments were repeated and that a more resistant strain were used. Then the same extract would appear to have a smaller concentration of the virus. We have again the same difficulty of distinguishing between the poisoning property of the virus with regard to a definite population of the organisms and the concentration of the virus in the injected liquid.

The problem therefore appears to justify a more detailed analysis. We must consider both the effect of variation in the number of virus units from dose to dose drawn from the same solution and also in the resistance of the individuals treated. Making use of certain assumptions on these points we shall see how far the form of the observed toxicity curves will enable us to determine

(a) the concentration of natural virus units viz. bacteria, or molecules in the extract used, and

(b) the number (or the mean number) of the same units just sufficient to produce a definite physiological effect upon organisms taken at random from a definite population.

We cannot hope to be able to give a complete solution of this very complicated problem. We think however that the first simple schemes, however unsatisfactory, may produce criticism and further research, which may tend to the solution of the problem.

## 2. First method of approach <sup>1)</sup>.

The simplest hypotheses which can be made concerning experiments with injecting different solutions of a poison to organisms are the following. We shall suppose that there is a definite unit of poison, toxin or infective material which is not divisible. That is to say: 0, 1, 2, 3, ... etc. of these units may be present in a dose, but not a fraction of a unit. The unit may be a molecule of poison or toxin, or a single bacterium, f. i. a diplococcus. We shall not distinguish between these special cases and shall speak generally about the units of virus, whatever they are.

We shall deal only with the comparatively simple case where the poisoning properties of a liquid are due to the presence of only one sort of virus unit: to a definite strain of bacteria or to molecules of a single chemical substance.

We shall make one more convention. In the biological literature the words „poison“, „toxin“ and „virus“ have different meanings. These differences however are of no importance from the point of view of the theory exposed below. Therefore we shall use these words as synonymes, each of them meaning any liquid, which contains some units of virus in the sense of the word as explained above.

In serological practice doses are sometimes adjusted according to the weight of animals, to which they will be injected. We shall suppose however throughout the paper that no such adjustment is made and that each animal is given exactly the same volume of the fluid injected. As the choice of the unit of volume is arbitrary, we shall choose for our unit the quantity of the fluid constituting one dose injected into an animal, and call this the standard volume.

---

<sup>1)</sup> Being an extension of some results of R. A. FISHER. See his „Statistical Methods for Research Workers“, Chapter, Presence and Absence of Organisms in Samples.

Suppose that a standard volume of undiluted toxin contains  $N$  virus units. The number  $N$  is that which we shall try to determine. For that purpose we prepare a solution of our toxin adding to the standard volume of it, say  $k - 1$  equal volumes of water. This solution will be used for injection into animals. To obtain death rates less than 100% the number  $k$  must be usually very large.

The whole quantity of the solution obtained now contains  $k$  standard volumes. One of them, say  $V_1$ , we draw out for the injection of a particular animal. Consider a certain definite unit of virus and determine the probability that it will be contained in  $V_1$ . There is no particular reason why it should be in  $V_1$  rather than in any one of the  $k - 1$  standard volumes left behind. We may take therefore the probability of it being in  $V_1$  as  $1/k$ .

It is further assumed that the solution is properly mixed before the volume  $V_1$  is taken out, as a result of which we may suppose that the presence of one definite unit of virus in  $V_1$  does not affect the chance of the presence of another unit of virus in  $V_1$ . That will mean that there is no systematic accumulation of virus units in the solution, though of course there may exist accumulations due to random causes.

Under these conditions the probability that  $V_1$  will contain exactly  $x$  units of virus will be given by the binomial formula

$$\frac{N!}{x!(N-x)!} \left(\frac{1}{k}\right)^x \left(1 - \frac{1}{k}\right)^{N-x} \quad (2)$$

which, if  $k$  be large, degenerates into the Poisson probability law

$$P_x = e^{-\lambda} \frac{\lambda^x}{x!} \quad (2)$$

where  $k\lambda = N$  and thus  $\lambda$  is the mean number of virus units per standard volume of the solution. This is the reasoning which has been often applied, for example, in the theory of gases, etc.

The first attempt to apply the above theory to the distribution of microorganisms in equal volumes of a liquid is due to „Student“<sup>1)</sup>. The theoretical work was tested on an experiment which consisted in counting yeast cells with a haemocytometer. Each of 400 squares of the haemocytometer corresponds to our standard volume  $V_1$  and, were the theory true,

<sup>1)</sup> „On the Error of Counting with a Haemocytometer“ *Biometrika*, 5 (351 — 364).



the frequencies of yeast cells in squares would follow the law indicated by our formula (2). The experimental results are reproduced in the following four tables together with the figures expected under the assumption of the validity of the Poisson Law of frequency.

Table I.

Experiment I. Mean number of cells per square = 0.6825.

Number of cells per square	0	1	2	3	more than 3
Observed frequency	213	128	37	18	4
Expected frequency	202	138	47	11	2

Table II.

Experiment II. Mean number of cells per square = 1.3225.

Number of cells per square	0	1	2	3	4	5	6
Observed frequency	103	143	98	42	8	4	2
Expected frequency	106	141	93	41	14	4	1

Table III.

Experiment III. Mean number of cells per square = 1.80.

Number of cells per square	0	1	2	3	4	5	6	more than 6
Observed frequency	75	103	121	54	30	13	2	2
Expected frequency	66	119	107	64	29	10	3	1

Table IV.

Experiment IV. Mean number of cells per square = 4.68.

Number of cells per square	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Observed frequency	0	20	43	53	86	70	54	37	18	10	5	2	2
Expected frequency	4	17	41	63	74	70	54	36	21	11	5	2	1

Having these results we may now test the hypothesis that the frequency of yeast cells in squares followed the Poisson Law in each of the four experiments. For this purpose we shall follow the way indicated by J. NEYMAN and E. S. PEARSON <sup>1)</sup> and calculate the probability,  $P$ , of com-

<sup>1)</sup> „On the Use and Interpretation of Certain Test Criteria for Purposes of Statistical Inference“. *Biometrika*. 20-A (175—240, 263—294).

mitting an error if we decide to reject a tested hypothesis, when the divergencies of the observations from the theory are such as these observed. The values of this probability for the four experiments of „Student“ are 0.02, 0.55, 0.17 and 0.56 respectively. Thus if we decide to reject the hypothesis tested when the observed numbers differ from the expected ones as much as they do in the Experiment I, we shall be wrong only in about two out of a hundred cases — hence the agreement of the „Student's“ Experiment I with the Poisson theory is rather doubtful. On the contrary the Experiments II, III and IV are rather favourable to the tested hypothesis: if we decide to reject it with regard to the Experiment II, we should do so with regard to any other hypothesis when the experiments show the same disagreements with the theory (and a fortiori — when the agreement is worse); the calculated  $P = 0.55$  indicates that doing so we might be wrong 55 times out of a hundred cases.

These very important results seem to indicate that the validity of the Poisson Law is — at least in some cases — out of doubt. That means that the conditions of an experiment in which the microorganisms are distributed in standard volumes according to our formula (2), are not unobtainable in practice <sup>1)</sup>.

However we shall see further a much more important fact, that such divergencies from the Poisson Law, as all „Student's“ experiments present, including even the Experiment I, are of no importance whatever as regards the practical application of our theory.

One further assumption must be made concerning the animals (or similarly plants) used for the experiments. We shall suppose that all injected organisms are equally sensitive to the poison, that is to say that there exists a certain number,  $x_0$ , such that if the number of injected virus units be less than  $x_0$ , the injection has no visible effect upon the organism. If however the number of injected virus units is  $\geq x_0$ , the organism becomes obviously ill. Of course the constancy of the number  $x_0$  thus defined can occur in practice only in exceptional cases, where the experimental material is exceedingly uniform.

Now if we inject an animal with a dose, say  $V_1$ , the probability of the injection having a physiological effect is equal to the sum of probabilities that the dose will contain either  $x_0$  or  $x_0 + 1$ , etc. units of virus, that is to say it will be given by the formula

$$Y_{x_0} = \sum_{x=x_0}^{\infty} P_x = e^{-\lambda} \sum_{x=x_0}^{\infty} \frac{\lambda^x}{x!} \quad (3)$$

<sup>1)</sup> See also R. A. FISHER: „Statistical Methods for Research Workers“, London 1925, Chapter „Goodness of Fit, Independence, etc.“.

Injecting a considerable number of organisms with the same solution of the toxin, counting subsequent deaths and dividing their number into the number of organisms injected, we can easily determine an approximate value of  $Y(x_0)$ . As the formula (3) contains two unknown quantities,  $x_0$  and  $\lambda$ , to determine these we need two equations. Thus we could inject animals with two different solutions of the toxin, for example one could have the concentration  $1:k$  and the other  $\alpha:k$ . If the number of organisms injected in both cases be the same,  $n$ , and the numbers of deaths  $ny_1$  and  $ny_2$  respectively, then we should have two approximate equations

$$y_1 = e^{-\lambda} \sum_{x=x_0}^{\infty} \frac{\lambda^x}{x!} \quad (4)$$

$$y_2 = e^{-\alpha\lambda} \sum_{x=x_0}^{\infty} \frac{(\alpha\lambda)^x}{x!} \quad (5)$$

which could be used for the calculation of  $x_0$  and  $\lambda$ . Unfortunately these equations are not easy to solve. Besides the inevitable random errors in the  $y$ 's would have a considerable effect upon the accuracy of results if they were based only upon two equations of the form (4) and (5). We have thus chosen another way of proceeding.

Put instead of  $\lambda$  any definite number e. g.  $\lambda_0 = 10$  and instead of  $\alpha$  the ratio  $1/2^k$ . Then we shall have generally

$$Y_{x_0}(k) = e^{-\lambda_0 2^{-k}} \sum_{x=x_0}^{\infty} \frac{1}{x!} \left( \frac{\lambda_0}{2^k} \right)^x \quad (6)$$

If we fix any definite value of  $x_0$  and then calculate  $Y$  for different values of  $k$ , we can draw a curve — a toxicity curve — which will correspond to the fixed minimum lethal dose  $x_0$ . A set of such curves is shown on the Diagram I. The upper curve corresponds to  $x_0 = 1$ , the curve below — to  $x_0 = 2$ , etc. Suppose now we have a set of experimental data giving several different concentrations of the toxin injected to animals, say  $1:a_1$ ,  $1:a_2$ , etc. . . .  $1:a_s$  and the subsequent death rates respectively  $y_1, y_2, \dots, y_s$ . If the unknown concentration of virus

units in the original toxin were  $\lambda$ , then in the solution  $1 : a_i$  it would be  $\lambda : a_i$ , which can be written in the form

$$\frac{\lambda}{a_i} = \frac{\lambda_0}{2^{k_i}} \quad (7)$$

provided that  $k_i$  is properly chosen. As the equation (7) contains two unknown numbers, we cannot determine the  $k$ 's. All that we can do is to determine differences between every one of the  $k$ 's and the first of them. Dividing (7) into the same equation

$$\frac{\lambda}{a_1} = \frac{\lambda_0}{2^{k_1}} \quad (8)$$

corresponding to  $i = 1$ , we easily have

$$\frac{a_1}{a_i} = 2^{k_i - k_1} \quad (9)$$

and

$$\Delta_i = k_i - k_1 = \frac{\log a_i - \log a_1}{\log 2} \quad (10)$$

Next, as all differences  $k_2 - k_1, k_3 - k_1, \dots, k_s - k_1$  are known, we may proceed to a graphical representation of experimental results. Taking the point  $(k_1, y = 0)$  as a new origin, we determine points, say  $A_1, A_2, \dots, A_s$ , with coordinates  $(\Delta_1 = 0, y_1), (\Delta_2, y_2), \dots, (\Delta_s, y_s)$ . Were all conditions of the preceding theory satisfied, these points would lie near one of our toxicity curves. If the number,  $s$ , of experimental points is considerable, the choice of the proper curve is easily made without any calculations. For this purpose it would be sufficient to plot the experimental points on a transparent sheet of paper, using the same scale as in Diagram I. Then we could put the sheet with points  $A_i$  on the diagram so that the two  $k$  - axes would lie upon one another. Moving the sheet with the experimental points to the left or to the right, we should then find the most appropriate curve and the proper position of the sheet, such that some of the experimental points would lie below the curve and the others — above it, the deviations having a random character.

We have had the opportunity of dealing with several results of actual experiments, concerning different toxins and in some cases there was no doubt that the proper toxicity curve was present on Diagram I (namely the curve corresponding to

$x_0 = 1$ ) and in others — it was equally obvious that no curve of the set drawn could represent the experiments. Doubtful cases arose only when the number of experimental points was as small as three.

If the choice of the most appropriate curve seems not to be very difficult, the problem of fitting that curve to the experimental data so as to determine the unknown number  $\lambda$ , is more difficult. All usual methods of fitting (the method of moments and that of least squares) lead in this case to equations, which we were not able to solve. We therefore decided to use what can be considered only as a rough and preliminary method of approximation. It consists in the following.

We find on the curve in the Diagram I points, say  $B_1, B_2, \dots, B_s$  <sup>1)</sup> having the ordinates of the experimental points  $y_1, y_2, \dots, y_s$ . Let  $k'_1, k'_2, \dots, k'_s$  be their abscissae, which can be read from the diagram. Now the abscissae of the experimental points may be written

$$k_i = k_1 + \Delta_i \quad \text{for } i = 1, 2, \dots, s \quad (11)$$

where  $\Delta_1 = 0$ . The numbers  $\Delta_i$  being known, we have only to determine  $k_1$ , which we do by minimising the sum of squares

$$F(k_1) = \sum_{i=1}^s (k_i - k'_i)^2 = \sum_{i=1}^s (k_1 + \Delta_i - k'_i)^2 \quad (12)$$

Easy calculation gives then

$$k_1'' = \frac{1}{s} \left( \sum_{i=1}^s k'_i - \sum_{i=1}^s \Delta_i \right) = \bar{k} - \bar{\Delta} \quad (\text{say}) \quad (13)$$

as the value of  $k_1$  for which  $F(k_1)$  is a minimum. Taking this as the approximate value of  $k_1$ , we easily obtain from (8) the value of  $\lambda$ , namely

$$\lambda = \frac{a_1 \lambda_0}{2^{k_1''}} \quad (14)$$

### 3. The Test for Goodness of Fit.

Having thus determined the unknown numbers  $x_0$  and  $\lambda$  we may now test the hypothesis that the deviations of the experimental points from the fitted curve are due to random causes.

<sup>1)</sup> See also the Diagram II below.

For this purpose we read up from the diagram ordinates of points on the curve having abscissae respectively  $k_1''$ ,  $k_1'' + \Delta_2, \dots, k_1'' + \Delta_s$ . Let  $Y_{(1)}, Y_{(2)}, \dots, Y_{(s)}$  be these ordinates. They represent the hypothetical probabilities of death of an animal injected with the corresponding solution of the toxin. We may use further the PEARSON'S  $\chi^2$  test for goodness of fit where

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^s n_i \frac{(y_i - Y_{(i)})^2}{Y_{(i)}(1 - Y_{(i)})}, \quad (15)$$

where  $n_i$  means the number of the organisms injected with the solution one to  $a_i$ . This a little unusual form easily follows from the last part of the paper by J. NEYMAN and E. S. PEARSON, already referred to.

The deviations of  $y$ 's from their theoretical values are now independent from each other, except that these theoretical values have been calculated by finding  $k_1''$  as a function of the  $y$ 's. It follows that we have to enter the tables for the Test for Goodness of Fit putting  $n' = s$ . It must be remembered that — as follows from the same paper — the  $P_{\chi^2}$  corresponding to  $\chi^2$  calculated from (15) will generally underestimate the goodness of fit. It would give accurate results only if the  $k_1$  would be fitted by method of maximum likelihood, or by some other method, giving more reliable results than the method employed above. This point requires some further explanation, as the use of words „Goodness of Fit“ may—in this case — cause some misunderstanding. The purpose of applying the  $\chi^2$  test is not exactly to test the goodness of fit, which cannot be satisfactory when a rough method of fitting is used. What we want to test is the hypothesis that the death rates caused by injections follow the law expressed graphically by the curve of our set, we have found to be the most appropriate. Therefore in cases when the rough method of fitting described will still give a reasonably small value of  $\chi^2$ , we shall conclude that a more satisfactory method would give a still better agreement between the theory and the observation. This of course will increase our confidence in the hypothesis tested, though the actual value of  $k_1 = k_1''$  will be doubtful. We shall see however that the influence of the inaccuracy of the estimate of  $k_1$  upon the accuracy or  $\lambda$  is presumably not a very important one.

#### 4. Illustrations.

(a) As a first illustration of the preceding results we may use the experimental data published in the paper of MCKINNEY already referred to. These experiments are not very satisfactory from the point of view of the possibility of application of our theory. First of all the number of five plants, which were inoculated by the same solution of the toxin is rather too small. Consequently the experimental ordinates,  $y$ , could have one of only six possible values 0.0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 and 1.0.

This means that the shape of the toxicity curve — the essential point in our method — can be judged upon only very roughly when the MCKINNEY'S data are used. A further difficulty arises as the number of experimental points provided by each experiment is also very small. The points having ordinates equal to zero or to one are obviously of no use from the point of view of our theory and the number of points in MCKINNEY'S data having ordinates between these two limits never exceeds three. Lastly for the validity of PEARSON'S  $\chi^2$  test it is necessary to have not too small cell frequencies, which would require the number of inoculated plants in each series to be much larger than five. Nevertheless we shall complete all calculations including the test for goodness of fit since in the first place some sampling results<sup>1)</sup> seem to show that the frequency distribution of  $\chi^2$  in very small samples is not so very different from the theory of large samples; and in the second, as it is possible to combine several of MCKINNEY'S experiments and to use them all together for the test of the hypothesis that all essential conditions of the preceding theory are in the case considered satisfied. MCKINNEY'S experiments consisted in making extracts from the plants affected with mosaic disease, dissolving them in different proportions and injecting five healthy plants with each solution. The purpose of the work, besides the introduction of the quantitative method into the virus studies, was to compare the concentrations of the virus in different parts of the diseased plants. As we are interested only in the method, we shall not mention any additional circumstance of the experiments and will use only the data concerning the concentration of the original

<sup>1)</sup> J. NEYMAN and E. S. PEARSON: *Biometrika*. 22.

extract in the solutions used for inoculations and the resulting rate of disease. We shall use only the experiments in which there are at least three rates of mosaic larger than zero and less than 100%. Taking them out from the paper in their original order, we shall number them from one to ten, as in the following table.

Table V.

Experimental data used for illustration: the figures are percentages of plants affected with mosaic.

Nr. of the exp.	Dilutions one to									The number of plants
	100	500	1000	5000	10000	20000	50000	100000	200000	
1	100	—	100	80	60	—	20	00	—	5
2	—	60	80	—	20	—	00	—	—	5
3	—	—	—	—	100	80	—	40	20	5
4	—	—	—	—	100	80	—	80	60	5
5	—	—	100	—	60	—	20	20	—	5
6	—	—	100	—	40	—	20	20	—	5
7	—	—	100	—	80	—	60	20	—	5
8	—	—	100	—	80	—	20	20	—	5
9	90	—	40	—	20	—	—	—	—	10
10	90	—	50	—	10	—	—	—	—	10

We shall actually reproduce all the necessary calculations for only one set of these data and then give the final results concerning the others. As an example we shall use the data Nr. 3, giving a very good fit. We start calculating the  $\Delta_2$ ,  $\Delta_3$  and  $\bar{\Delta}$ . We have

$$\log a_2 - \log a_1 = \log 5 = 0.69897 \quad (16)$$

$$\log a_3 - \log a_1 = \log 10 = 1.00000 \quad (17)$$

Dividing these numbers into  $\log 2 = 0.30103$  we get

$$\Delta_2 = 2.32193, \quad \Delta_3 = 3.32193 \quad (18)$$

Adding the two  $\Delta$ 's and dividing into 3, we get  $\bar{\Delta} = 1.88080$ . The calculation of  $\Delta$ 's can be easily made to five decimal places, but owing to the inaccuracy of reading up the values of the  $k$ 's from the curves, we shall use only two decimal places. Having calculated the  $\Delta$ 's, we are able to get a diagrammatic representation of the experiment. Fitting the curves over the spots the reader will easily find that good agreement is given by the curve corresponding to  $x_0 = 1$ . The same fact can be brought out arithmetically.



Reading up from Diagram I the abscissae of the points lying on the curve  $x_o = 1$  and having the ordinates  $y_1 = 0.8$ ,  $y_2 = 0.4$ ,  $y_3 = 0.2$ , we find

$$k'_1 = 2.64, k'_2 = 4.29, k'_3 = 5.49 \quad (19)$$

The mean of these numbers is equal to  $\bar{k} = 4.14$ , hence

$$\begin{aligned} k''_1 &= \bar{k} - \bar{\Delta} = 2.26, \\ k''_2 &= k''_1 + \Delta_2 = 4.58, \\ k''_3 &= k''_1 + \Delta_3 = 5.58. \end{aligned} \quad (20)$$

These are the hypothetical abscissae of experimental points. Having the value of the  $k''_1$  we may estimate the unknown concentration,  $\lambda$ , of the virus units in the original abstract. The equation (8) can be written in the form

$$\frac{\lambda}{a_1} = \frac{10}{2^{k''_1}} \quad (21)$$

from which it follows that

$$\lambda = \frac{10 a_1}{2^{k''_1}} = \frac{200\,000}{2^{2.26}} = 41\,800 \text{ (approximately)} \quad (22)$$

Proceeding to the estimate of the goodness of fit we read up from the Diagram I the ordinates, say  $Y_1$ , of the points lying on the curve  $x_o = 1$ , and having the abscissae equal to  $k''_1$ ,  $k''_2$ ,  $k''_3$ , and compare them with the observed  $y$ 's. We have

Observed $y$ 's	0.8	0.4	0.2
Theoretical $Y_1$ 's	0.876	0.342	0.189

The position is illustrated on the Diagram II. (Page 116).

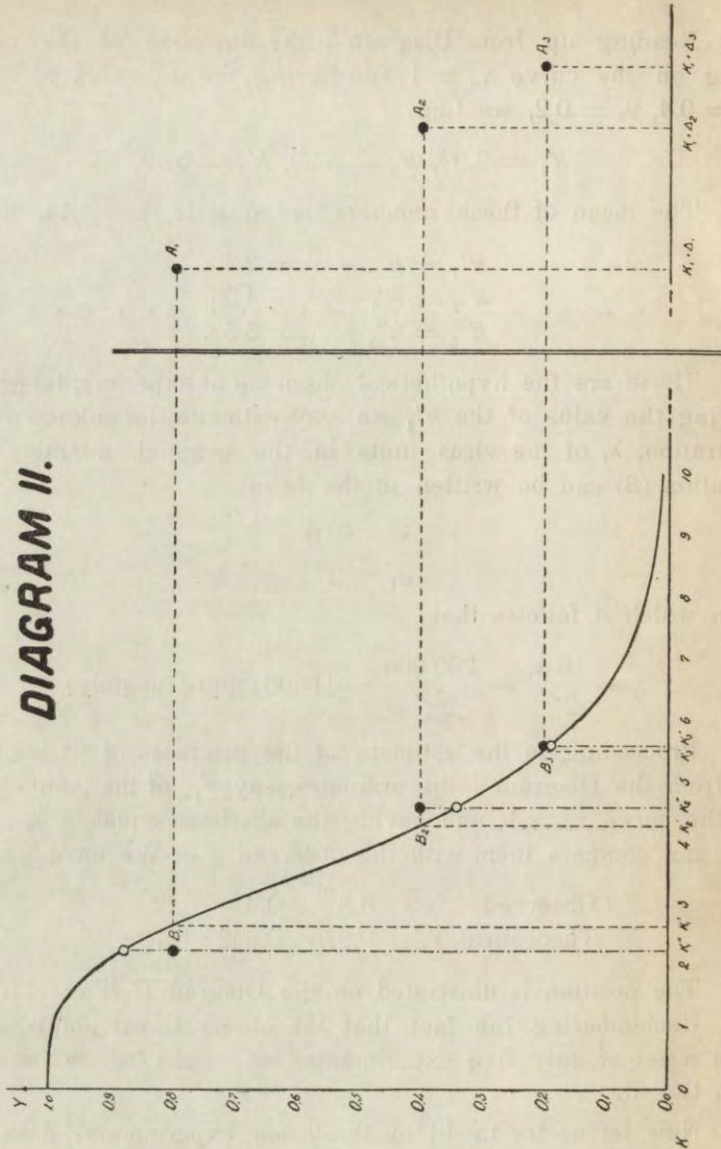
Remembering the fact that the observational points arise from a set of only five experiments, we ought to be satisfied with the fit.

Now let us try to fit to the same experimental data the curve corresponding to  $x_o = 2$ . The respective  $k'$ 's will be

$$k'_1 = 1.74, k'_2 = 2.88, k'_3 = 3.60 \quad (23)$$

Hence  $\bar{k} = 2.74$  and

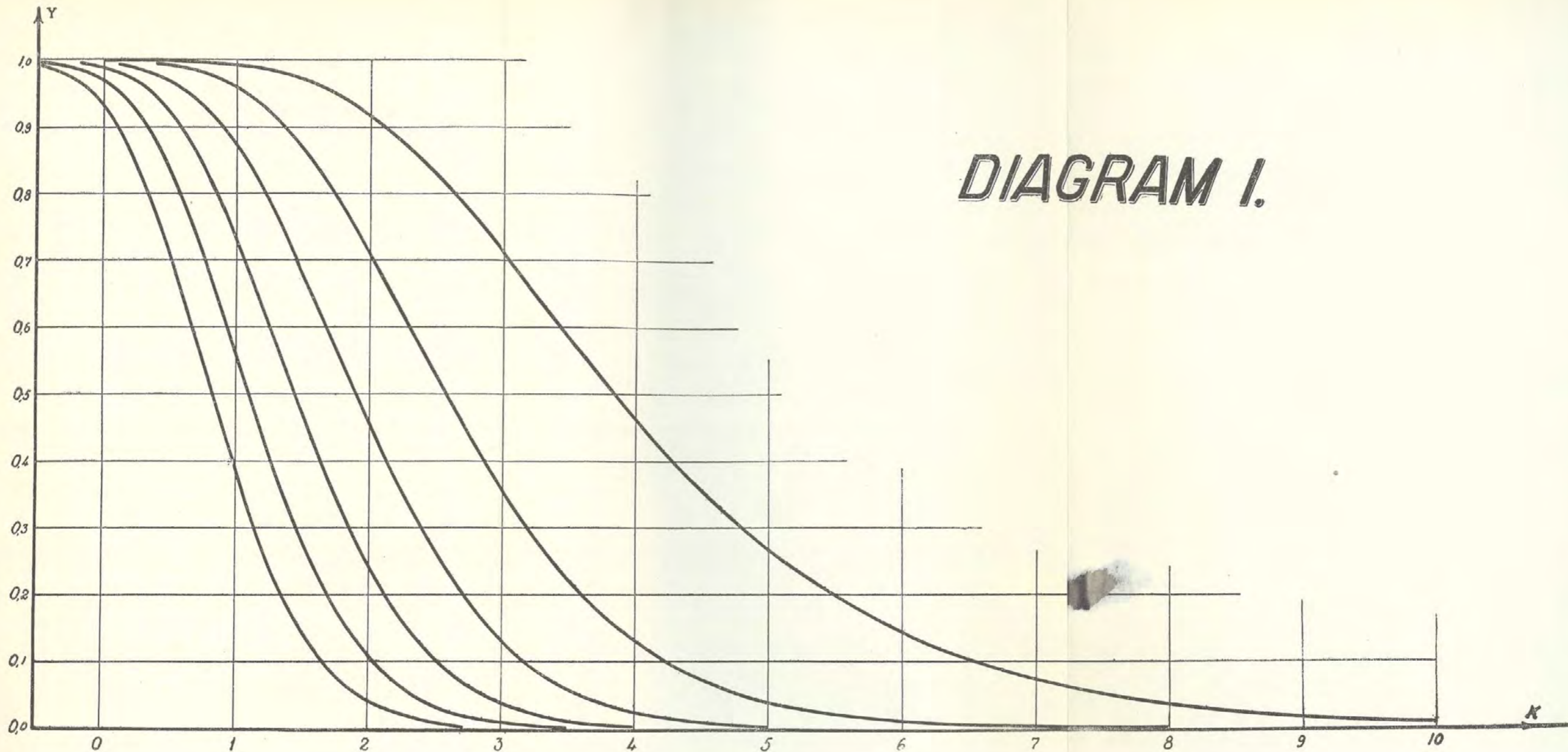
$$\begin{aligned} k''_1 &= \bar{k} - \Delta = 0.86 \\ k''_2 &= k''_1 + \Delta_2 = 3.18 \\ k''_3 &= k''_1 + \Delta_3 = 4.18 \end{aligned} \quad (24)$$



The theoretical frequencies of mosaic, read up from the curve  $x_0 = 2$ , say  $Y_2$ , corresponding to the above abscissae will be

Observed	$y$ 's	0.8	0.4	0.2
Theoretical	$Y$ 's	0.974	0.302	0.082

We see that the fit is significantly worse: the curve  $x_0 = 2$  is too steep as compared with the observational data. As the



**DIAGRAM I.**

other curves, corresponding to  $x_0 = 3, 4 \dots$  etc. are still steeper, there is no reason to try to fit them to these experimental results.

Having thus reproduced the calculations which are necessary to fit a given theoretical toxicity curve to the observational data, we shall now give the final results of the same calculations done with regard to all ten of the experiments. They are shown in the following table VI and VII, the first of which

Table VI.

Experimental results fitted to the curve  $x_0 = 1$ .

The significance of the letters is as follows:

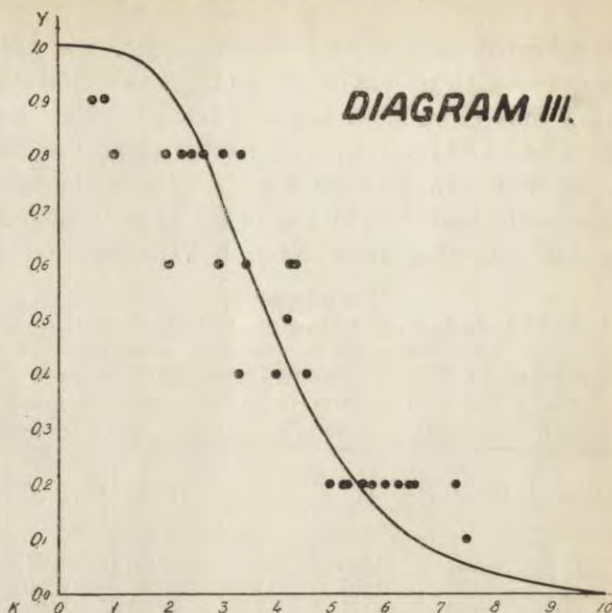
$k''(1)$  = the hypothetical abscissa of an experimental point under the assumption that  $x_0 = 1$ .

$Y_1$  = the ordinate of a point on the curve  $x_0 = 1$  having its abscissa equal to  $k''(1)$ .

$y$  = the ordinate of an observational point, i. e. the observed rate of mosaic.

Nr. of the experiment	$k''(1)$	$1 - Y_1$	$Y_1$	$y$	$Y_1 - y$	$(Y_1 - y)^2$	$\frac{(Y_1 - y)^2}{Y_1(1 - Y_1)}$
1	2.42	0.154	0.846	0.8	0.046	0.0021	0.016
	3.42	0.393	0.607	0.6	0.007	0.0000	0.000
	5.74	0.829	0.171	0.2	-0.029	0.0008	0.006
2	2.09	0.095	0.905	0.6	0.302	—	—
	3.09	0.309	0.691	0.8	-0.109	—	—
	6.41	0.889	0.111	0.2	-0.089	—	—
3	2.26	0.124	0.876	0.8	0.076	0.0058	0.053
	4.58	0.658	0.342	0.4	-0.058	0.0034	0.015
	5.58	0.811	0.189	0.2	-0.011	0.0001	0.001
4	1.03	0.007	0.993	0.8	0.193	—	—
	3.35	0.375	0.625	0.8	-0.175	—	—
	4.35	0.612	0.388	0.6	-0.212	—	—
5	2.93	0.269	0.731	0.6	0.131	0.0172	0.087
	5.25	0.769	0.231	0.2	0.031	0.0010	0.005
	6.25	0.879	0.121	0.2	-0.079	0.0062	0.059
6	3.31	0.339	0.661	0.4	0.261	0.0681	0.304
	5.53	0.805	0.195	0.2	-0.005	0.0000	0.000
	6.53	0.897	0.103	0.2	-0.097	0.0094	0.102
7	1.98	0.079	0.921	0.8	0.121	—	—
	4.30	0.602	0.398	0.6	-0.202	—	—
	5.30	0.776	0.224	0.2	0.024	—	—
8	2.66	0.206	0.794	0.8	-0.006	0.0000	0.000
	4.98	0.728	0.272	0.2	0.072	0.0052	0.028
	5.98	0.854	0.146	0.2	-0.054	0.0029	0.023
9	0.65	0.002	0.998	0.9	0.098	—	—
	3.97	0.528	0.472	0.4	0.072	—	—
	7.29	0.938	0.062	0.2	-0.138	—	—
10	0.86	0.004	0.996	0.9	0.096	—	—
	4.18	0.576	0.424	0.5	-0.076	—	—
	7.50	0.946	0.054	0.1	-0.046	—	—

$$\begin{aligned} \frac{1}{5} \chi^2 &= 0.697 \\ \chi^2 &= 3.485 \end{aligned}$$



contains also the calculation of the  $\chi^2$  test. The Diagram III represents MCKINNEY'S results fitted to the curve  $x_0 = 1$ .

We shall use for the calculation of the  $\chi^2$  test only experiments, which have no expected frequencies less than 0.1 or larger than 0.9. The reason for this is that the  $\chi^2$  test applies only in cases when the frequencies in cells follow approximately the normal law.

If the sample has only five individuals, the approximation to the normality is in any case more than doubtful, but to assume normality in cases where the cell probabilities are  $\geq 0.9$  or  $\leq 0.1$  would be altogether inadmissible.

We might apply the test to any single one of the experiments, but as they contain data giving us but three points, we could not hope to obtain definite results when testing the goodness of fit by this method: there are possible too many widely different curves which can be reasonably fitted to a set of three points. A more accurate idea of the adequacy of our hypotheses about the process of inoculation as well as about the size of the minimum infecting dose  $x_0 = 1$ , will be obtained by compiling all experiments chosen for the test into one set. As was pointed out, the method of testing follows easily from the general theory

explained elsewhere, so that we shall not enter into the theoretical discussion, but simply show the method of proceeding. Using the equation (15), in which  $n_i = 5$ , we multiply by 5 the sum of the last column of Table II and obtain

$$\chi^2 = 5 \sum \frac{(Y_1 - y)^2}{Y_1(1 - Y_1)} = 3.485 \quad (25)$$

If we are dealing with experiments in which the number of organisms injected with each solution varies, then each term in the sum should be multiplied by the respective number of the organisms and the results should be then summed.

Having thus calculated the  $\chi^2$ , we have to determine  $n'$ , with which to enter the ELDERTON'S Tables <sup>1)</sup> for the Test for Goodness of Fit. If we have a set of  $m$  experiments giving each respectively  $s_1, s_1, \dots s_m$  observational points, and we want to combine them all into one set and then to apply the test,  $n'$  is given by the formula

$$n' = \sum_{i=1}^m s_i - m + 1 \quad (26)$$

If we apply the test to a single experiment, then  $m = 1$  and  $n' = s$ , or in our case  $n' = 3$ . But for the combined set of five experiments

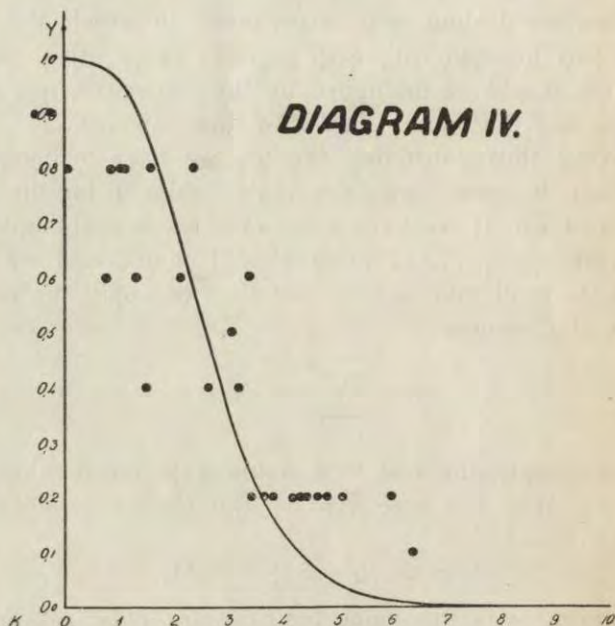
$$n' = 15 - 5 + 1 = 11. \quad (27)$$

Entering with this value the ELDERTON'S Tables we find that the calculated value of  $\chi^2$  corresponds to  $P > 0.95$ , which shows that were our assumptions about the interpretation of the experiments true, we could easily obtain results giving a far worse accordance with the theory.

The Table VII gives analogous results obtained on fitting the experimental data to the second curve, corresponding to  $x_0 = 2$ . We see from it at once, that what has been said with regard to the experiment Nr. 3, applies also to others: the curve corresponding to  $x_0 = 2$ , and *a fortiori* the curves corresponding to still higher values of  $x_0$ , are too steep to fit the experimental data properly. The experimental  $y$ 's are decreasing with decreasing concentration of the original liquid in the doses far more

<sup>1)</sup> K. PEARSON: Tables for Statisticians and Biometricians. Part I, Cambridge 1930. Third Ed.

slowly than the theoretical  $Y_2$ 's. This is obvious simply from considering the deviations  $Y_2 - y$  and comparing them with  $Y_1 - y$ , as in the last columns of the Table VII. The multitude of cases, where  $Y_2$ 's are  $\leq 0.1$  or  $\geq 0.9$  makes it impossible to apply the  $\chi^2$  test. The Diagram IV represents the data fitted to the curve  $x_0 = 2$ .



The conclusions which can be drawn from the above considerations of Mc KINNEY's data seem to be as follows.

(1) If any curve from our set fits the data, then it is the curve corresponding to  $x_0 = 1$ , i. e. to the assumption that the injection of one single virus unit (a molecule or a living organism, producing mosaic) is sufficient to cause the illness of the plant.

(2) If our assumptions about the mechanism of the process of intoxication were true, then experimental results could easily be even more divergent from the theoretical expectation, than are the experiments of Mc KINNEY. Of course we must be very careful in basing our conclusions of this sort on the value of  $\chi^2$  as the number of plants used in each experiment is so small. Besides this we feel a certain uneasiness in having to choose for the calculation of  $\chi^2$  only experiments having theoretical proba-

Table VII.

Experimental results fitted to the curve  $x_0 = 2$ .

The significance of the letters is as follows:

 $k''(2)$  = the hypothetical abscissa of an experimental point under the assumption that  $x_0 = 2$  $Y_2$  = the ordinate of the point on the curve  $x_0 = 2$ , having the abscissa equal to  $k''(2)$ . $y$  = the ordinate of an experimental point, i. e. the observed rate of mosaic.The two last columns give the deviations of experimental points from their expected positions on the curves  $x_0 = 1$  and  $x_0 = 2$ .

Nr. of the experiment	$k''(2)$	$Y_2$	$y$	$Y_2 - y$	$Y_1 - y$
1	1.11	0.946	0.8	0.146	0.046
	2.11	0.672	0.6	0.172	0.007
	4.43	0.080	0.2	-0.120	-0.029
2	0.78	0.982	0.6	0.328	0.302
	1.78	0.776	0.8	-0.024	-0.109
	5.10	0.036	0.2	-0.164	-0.089
3	0.86	0.974	0.8	0.174	0.076
	3.18	0.302	0.4	-0.098	-0.058
	4.18	0.082	0.2	0.118	-0.011
4	0.05	0.999	0.8	0.199	0.193
	2.37	0.576	0.8	-0.224	-0.175
	3.37	0.152	0.6	-0.448	-0.212
5	1.29	0.872	0.6	0.272	0.131
	3.61	0.200	0.2	0.000	0.031
	4.61	0.066	0.2	-0.134	-0.079
6	1.48	0.872	0.4	0.472	0.261
	3.80	0.164	0.2	-0.036	-0.005
	4.80	0.050	0.2	-0.150	-0.097
7	1.00	0.960	0.8	0.160	0.121
	3.32	0.264	0.6	-0.336	-0.202
	4.32	0.092	0.2	-0.108	0.024
8	1.10	0.946	0.8	0.146	-0.006
	3.42	0.242	0.2	0.042	0.072
	4.42	0.082	0.2	-0.118	-0.054
9	-0.70	1.000	0.9	0.100	0.098
	2.62	0.484	0.4	0.084	0.072
	5.94	0.012	0.2	-0.188	-0.138
10	-0.25	1.000	0.9	0.100	0.096
	3.07	0.334	0.5	-0.166	-0.076
	6.39	0.008	0.1	-0.092	-0.046

The figures in squares in the last column represent the only three cases (out of 30), in which  $|Y_1 - y| > |Y_2 - y|$ .

bilities between 0.1 and 0.9, which means a certain selection of possibly more favourable data. We think however that this was the best thing we could do.



(b) The next example concerns results obtained by Dr. G. F. PETRIE from the Lister Institute, Elstree, Herts, England and we have pleasure in expressing our thanks to the Experimenter for having placed his results to our disposal.

Seven different dilutions of a culture of highly virulent Pneumococca, Type I, were injected to ten mice each. A diagrammatic representation of results (see Diagram V) suggests that they can be easily fitted by the curve  $x_0 = 1$ . The results and the process of fitting are represented in the Table VIII, where the notation is identical with the one the one used above.

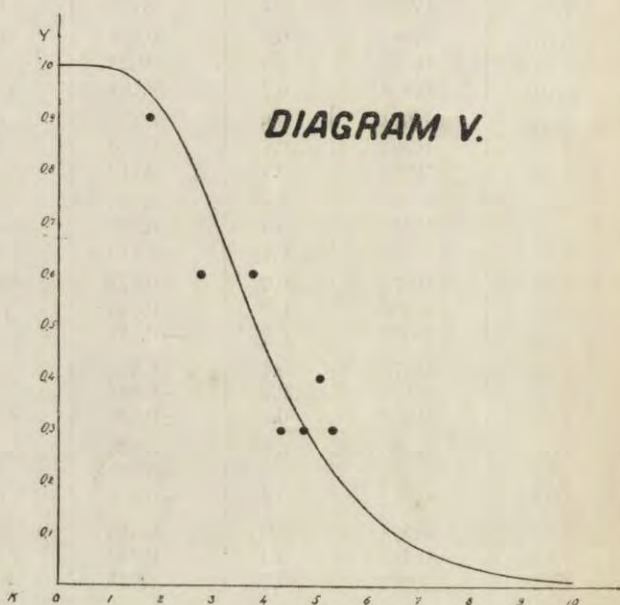


Table VIII.

Dilution one to	$k''$	$1 - Y_1$	$Y_1$	$y$	$Y_1 - y$	$(Y_1 - y)^2$	$\frac{(Y_1 - y)^2}{Y_1(1 - Y_1)}$
100.000.000	1.75	0.051	0.949	0.9	0.049	0.0024	0.050
200.000.000	2.75	0.226	0.774	0.6	0.174	0.0303	0.173
400.000.000	3.75	0.476	0.524	0.6	-0.076	0.0058	0.023
600.000.000	4.33	0.609	0.391	0.3	0.091	0.0083	0.035
800.000.000	4.75	0.690	0.310	0.3	0.010	0.0001	0.000
1.000.000.000	5.07	0.742	0.258	0.4	-0.142	0.0202	0.105
1.200.000.000	5.33	0.780	0.220	0.3	-0.080	0.0064	0.037

According to our convention not to use the experiments in which  $Y \geq 0.9$ , we shall calculate  $\chi^2$  omitting the first figure in the last column in the Table VIII. Consequently we shall have to take  $n' = 6$ , instead  $n' = 7$ , which we should use in the case where all seven experimental points would have ordinates suitable for the application of the  $\chi^2$  test.

Summing the figures in the last column of the table (all, except the first one) and multiplying the sum by 10 (the number of mice injected with each dilution of the culture) we get  $\chi^2 = 3.73$ , which corresponds to  $P > 0.54$ . We see again that the assumption of the preceding theory of the mechanism of intoxication, as well as the assumption that one single Pneumococcus is sufficient to kill every mouse, seem to be justified. In fact, were these assumptions true, we could easily obtain results giving a worse accordance with the theory.

The attempt to fit the same experiments to any other curve of our set, f. i. to the curve  $x_0 = 2$ , gives again no satisfactory results.

Solving the equation

$$\frac{\lambda}{a_1} = \frac{10}{2^{k_1''}} \quad (28)$$

with regard to  $\lambda$  we have at once

$$\lambda = \frac{10 \times 100\,000\,000}{2^{1.75}} = 297\,300\,000 \quad (29)$$

Pneumococci per standard volume of the original culture.

Though the experiments of Dr. PETRIE are much more appropriate to test our theory than the experiments of MCKINNEY, as they give a much larger number of experimental points and each of them is based upon a number of observations twice as large as it was in MCKINNEY'S data, the close agreement with the theory obtained cannot be considered as a complete evidence that the theory is true — even in the case of Pneumococci and the mosaic disease. In fact two different theories may sometimes lead to the same conclusions, which in our case are represented by the curves of Diagram I. The important fact is that it is possible to test whether the method described could be applied to determine the concentration of virus units in cases when no other method would work, for example in cases where, like with mosaic disease, the nature of the illness is unknown.

For this purpose it would be sufficient to determine the concentration of Pneumococca in a culture using our method and also some other, for example the method of R. A. FISHER<sup>1)</sup>, which can be used to determine the concentration of the microorganisms capable of producing colonies when sown in a known medium. It is important to realise that strictly speaking the two methods are suitable for determining different things. FISHER'S method counts the organisms which are able to produce colonies in the medium in which they are sown, while the method described above counts the virus units, which are able to produce a certain physiological effect. Consequently the two methods can give different figures with regard to the same liquid and both figures may be true, but will mean different things. Suppose f. i. that what is assumed to be a pure culture of some virulent bacteria in reality is a mixture of two strains, of which only one is virulent. In this case FISHER'S method will discover a larger concentration of bacteria than the method explained above. In the first case it will be the concentration of all living and healthy bacteria in the liquid which is measured, while in the second — the concentration of virulent bacteria only. In the case of well known bacteria however — as are the Pneumococca — this difficulty will probably not arise and the number of living bacteria in a properly grown culture will probably be the number of virulent bacteria. Consequently the application of the two methods to the same culture of Pneumococca will probably provide a good test of the validity of the new method. If the two figures should be practically the same, it would mean that the new method may give good results, at least in some cases, and may be useful, when other methods do not work.

(c) The above theory may not apply to practical experiments for various reasons which may be divided into two broad categories. This depends upon the character of our hypotheses, one part of which concerns the different conditions of the experiment preceding the injection, while the other concerns the presumably very complicated physiological process after the injection. Obviously these later assumptions are less likely to be satisfied and only the above mentioned crucial experiments can

---

<sup>1)</sup> Loc. cit.

throw light on the question whether the theory holds or not. As to the conditions of the first kind, we are at present able to give some evidence that in the ordinary laboratory conditions they are fairly well satisfied. At the same time we shall show that the apparent inaccuracy of the method (reading up  $k$ 's from the diagram, unsatisfactory method of fitting etc.) has a comparatively little effect upon the final result.

For this purpose we shall use the experimental results of „Student“ (see page 107). We shall assume that the quantity of the liquid contained over a square of the haemocytometer was a standard volume injected into some animal. We shall further assume that instead of yeast cells the injected liquid contained virulent bacteria (or virus units) just as many and following the same distribution as did the yeast cells dealt with by „Student“. These assumptions mean simply, that experiments with injections of some virulent bacteria can be done as accurately as were done the experiments of „Student“ and probably there will be no difficulty in accepting them. Our further assumption will be that the sensitiveness of the animals injected is constant and is equal to  $x_0 = 1, 2, 3, 4, 5$ , and of course it may happen that it will not hold, when properly tested.

Having „Student's“ experimental results in this new interpretation, we are able to calculate how many of the injected animals would die if  $x_0$  had any definite value and so we are able to get experimental results by which to test the validity of our assumptions concerning the part of the experiment preceding the injection.

We proceed as follows. We assume that the mean concentration of counted particles per standard volume of the liquid is not known, and that instead of this we know only the ratios of the concentrations used for injections. Thus we shall write

$$(1) \lambda \times 4.68, \quad (2) \lambda \times 1.80, \quad (3) \lambda \times 1.3225 \text{ and } (4) \lambda \times 0.6825,$$

for the quasi unknown mean concentrations of virus units per standard volume which correspond to „Student's“ experiments IV, III, II and I respectively. Our purpose will be to determine  $\lambda$  using our method. If the deviations of „Student's“ results from the Poisson Law are not very important, we should get  $\lambda = 1$ .

Assume first that the minimum lethal dose  $x_0 = 1$ . Then the number of animals which would survive after the injection

of the liquid in all four dilutions, would be equal to the number of squares in each of „Student's“ experiments in which there were no cells at all. Denoting by  $y_1, y_2, y_3, y_4$ , the death rates caused by injections of dilutions (1), (2), (3), (4) respectively, we shall have:

$$y_1 = \frac{400-0}{400} = 1.00 \qquad y_3 = \frac{400-103}{400} = 0.74$$

$$y_2 = \frac{400-75}{400} = 0.81 \qquad y_4 = \frac{400-213}{400} = 0.47$$

These figures will be used to determine  $\lambda$  as a series,  $A$ , of hypothetical results of injections. To get series  $B$  we shall assume that  $x_0 = 2$ , or that the minimum lethal dose is equal to two. The number of survivors among 400 injected animals will be equal to the number of squares in „Student's“ experiments in which there was only one cell or none at all. Thus the respective death rates will be

$$y_1 = \frac{400-0-20}{400} = 0.95 \qquad y_3 = \frac{400-103-143}{400} = 0.38$$

$$y_2 = \frac{400-103-121}{400} = 0.55 \qquad y_4 = \frac{400-213-128}{400} = 0.15$$

Proceeding in this way, we easily obtain three other series of hypothetical results,  $C, D, E$ , corresponding to the assumptions that  $x_0 = 3, x_0 = 4$ , and  $x_0 = 5$  respectively. All the hypothetical experimental data are contained in the following Table IX.

Table IX.

Series	A	B	C	D	E
$y_1$	1.00	0.95	0.84	0.71	0.49
$y_2$	0.81	0.55	0.25	0.12	0.04
$y_3$	0.74	0.38	0.14	0.03	0.01
$y_4$	0.47	0.15	0.05	0.01	0.00

Proceeding in the usual way we write

$$\lambda \times 4.68 = \frac{10}{2^{k_1}} \qquad \lambda \times 1.3225 = \frac{10}{2^{k_2}}$$

$$\lambda \times 1.80 = \frac{10}{2^{k_2}} \qquad \lambda \times 0.6825 = \frac{10}{2^{k_4}}$$

We determine then the differences  $\Delta_1 = k_1 - k_1$  and find the curves which are most suitable to fit the data. Finally we get the following values of the following Table X

Table X.

Series	$\lambda$	Number of experimental points
A	1.74	3
B	0.99	4
C	1.02	4
D	1.01	4
E	1.31	3

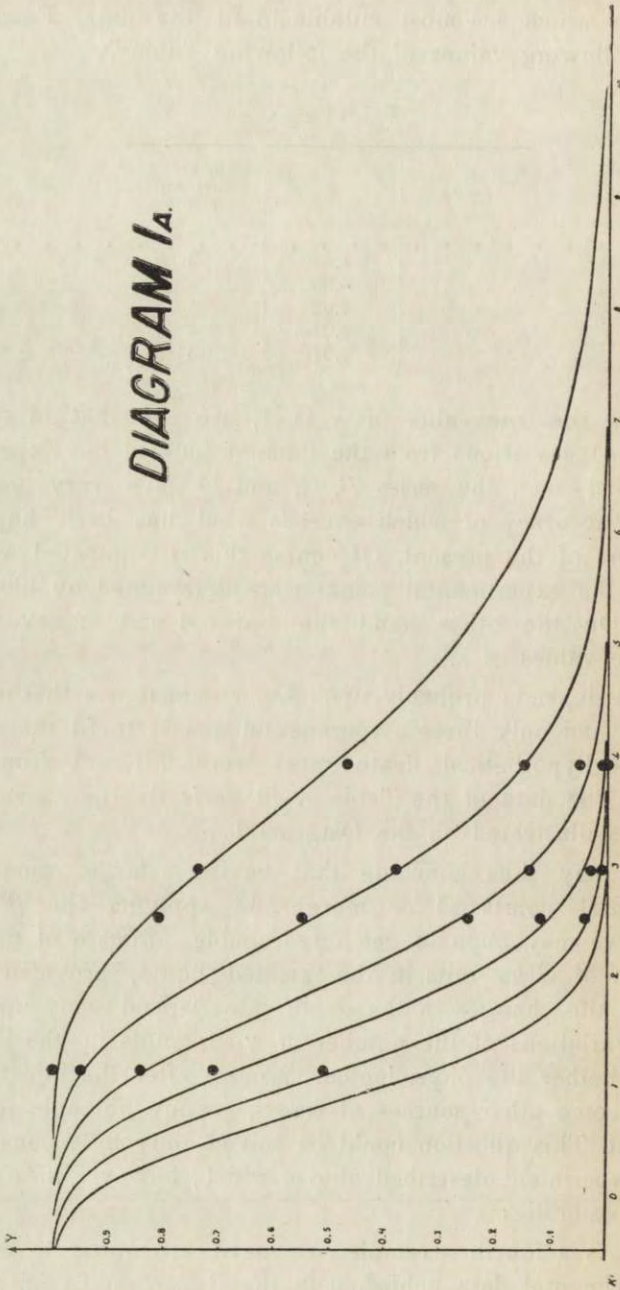
Since the true value of  $\lambda$  is 1, we see that in spite of some stated deviations from the Poisson Law in the Experiment I of „Student“, the series *B*, *C*, and *D* gave very good results, the accuracy of which exceeds what has been hoped by the authors of the present. Of course this is connected with the fact that the experimental points were determined by 400 observations. On the other hand the series *A* and *E* gave rather inaccurate values of  $\lambda$ .

This depends probably upon the circumstance that in these series we had only three experimental points to fit the curves: only three hypothetical death rates were different from zero and one. The data of the Table X fit perfectly the curves. The position is illustrated on the Diagram I<sub>A</sub>.

We may thus conclude that having a larger number of experimental points (4 or more) and applying the proposed method, we may hope to get a reasonable estimate of the concentration of virus units in the injected liquid, provided however that the changes in the death rates depend solely upon the random variations of the number of virus units in the injected doses. Whether the physiological process after the injection introduces some other sources of errors, we are not able to judge at present. This question could be solved only by means of the crucial experiment described above, which, however, lies outside of our possibilities.

(d) As a fourth example we have attempted to consider the experimental data published in the Report on Toxicity Tests for Neosalvarsan already mentioned, but when we had obtained

*DIAGRAM I<sub>A</sub>.*



the graphic representation of the results, prepared as described above, we saw at once that the actual decrease of toxicity was far too rapid for us to hope that any curve of our set, going as far as  $x_0 = 15$ , would give a fit.

This suggested that probably the minimum lethal dose of virus units contained in the neosalvarsan was a very large one. And from other points of view this seems likely since the virus in this case is of chemical character and as the „unit“ would be probably a molecule or a group of them. One could expect even that the minimum lethal dose  $x_0$  might be easily as large as a million or so. For this reason we have looked for another method of approach, which is explained below.

#### 5. Second method of approach.

Besides the difficulties pointed out in the preceding paragraph there are some others which arise when we consider the problem more closely. Formerly we have assumed that the sensitiveness to the injected virus of all the injected organisms is the same and thus that there exists a minimum lethal dose,  $x_0$ , common to all the organisms under consideration. It is known however that individual organisms are frequently very variable in their sensitiveness to different poisons and bacteria. Moreover it seems probable that the case of a constant minimum lethal dose will arise only when we are dealing with such extremely virulent poisons or bacteria, that  $x_0 = 1$ . We decided therefore to examine a method of counting units of virus allowing for the varying sensitiveness of the organisms injected.

Our assumptions are. We suppose that animals used for the experiment form a sample from a population with varying minimum lethal dose. Let  $x$  denote the minimum lethal dose for any individual in the population. We shall suppose that  $x$  is normally distributed about its mean  $x_0$  with the standard deviation  $\sigma$ . Of course the assumption of the normality of the distribution is an arbitrary one, but very often it appears to be justified. These assumptions imply some others, namely that the numbers  $x_0$  and  $\sigma$  are fairly large, and also that the concentration of virus units in the solutions used for injection are considerable. Otherwise the death rates will be only rarely different from zero. As a result of this the Poisson distribution representing the variation in the num-



ber of virus units from dose to dose will approach the normal curve in form. Let us denote by  $z$  the number of virus units in a standard volume injected into an organism, and, as formerly, by  $\lambda$  the mean number of virus units per standard volume of the original extract. If the concentration of the same in the solution used for the injections be  $\alpha : 1$ , the mean value of  $z$  and its variance will be  $\alpha\lambda$ . So finally the frequency distribution of  $z$  in the injected doses will be approximately

$$\frac{1}{\sqrt{2\alpha\lambda\pi}} e^{-\frac{(z-\alpha\lambda)^2}{2\alpha\lambda}} \quad (30)$$

The frequency distribution of  $x$  in different animals will be

$$\frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(x-x_0)^2}{2\sigma^2}}. \quad (31)$$

We suppose further that any injected animal becomes ill whenever  $z \geq x$ . Thus the probability of the specific physiological effect of an injection is that of having fulfilled the inequality  $x \leq z$ , both variables following the normal laws (30) and (31), respectively. Write  $u = x - z$ . It is known that the difference between two variables each following a normal law will be also normally distributed, with its mean equal to the difference between the respective means of the two variables and with the variance given by the equation

$$\sigma_{x-z}^2 = \sigma_x^2 - 2r\sigma_x\sigma_z + \sigma_z^2, \quad (32)$$

$r$  being the coefficient of correlation between  $x$  and  $z$ . In our case the correlation will be zero and we shall have

$$\sigma_u^2 = \sigma_x^2 + \sigma_z^2 = \sigma^2 + \alpha\lambda \quad (33)$$

Thus the frequency distribution of  $u$  will be

$$\varphi(u) = \frac{1}{\sqrt{2\pi(\sigma^2 + \alpha\lambda)}} e^{-\frac{[u - (x_0 - \alpha\lambda)]^2}{2(\sigma^2 + \alpha\lambda)}} \quad (34)$$

To get the probability,  $P(u)$ , of having  $x \leq z$  or  $u \leq 0$ , we have only to integrate  $\varphi(u)$  within the limits minus infinity and zero. We have

$$P(\alpha) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}(\sigma^2 + \alpha\lambda)} \int_{-\infty}^{\alpha} e^{-\frac{[u - (x_0 - \alpha\lambda)]^2}{2(\sigma^2 + \alpha\lambda)}} du \quad (35)$$

or, if we put

$$\frac{u - (x_0 - \alpha\lambda)}{\sqrt{\sigma^2 + \alpha\lambda}} = t \quad (36)$$

then

$$P(\alpha) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{t(\alpha)} e^{-\frac{t^2}{2}} dt, \quad (37)$$

where

$$t(\alpha) = \frac{\alpha\lambda - x_0}{\sqrt{\sigma^2 + \alpha\lambda}}. \quad (38)$$

If the values of  $x_0$ ,  $\lambda$  and  $\sigma$  were known, we could give a series of values to the variable  $\alpha$  and obtain the probabilities  $P(\alpha)$  of death corresponding to each of them. If the number of animals injected with each solution  $\alpha:1$  of the original fluid were large, then the observed death rates, say  $y(\alpha)$  would be approximately equal to  $P(\alpha)$ . Actually we have to solve an inverse problem: having several (not less than three) pairs of values of  $\alpha$  and  $y(\alpha)$ , to find approximate values of  $x_0$ ,  $\lambda$  and  $\sigma$ . Here again no usual method of fitting can be easily applied. We suggest the following.

Represent the pairs of values of  $\alpha$  and  $y(\alpha)$  by points  $A(\alpha)$  having abscissae equal to  $\alpha$  and the ordinates — to  $y(\alpha)$ . Then fit to the set of points  $A(\alpha)$  a parabola of a sufficient order to give an adequate fit. Next take on the parabola three points with coordinates equal to, say  $\alpha_i$ ,  $y_i$  for  $i = 1, 2, 3$  and consider  $y_i$  as a true value of  $P(\alpha_i)$ . Using tables of the normal integral find then the numbers  $t_i$ , for  $i = 1, 2, 3$ , such that

$$y_i = P(\alpha_i) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{t_i} e^{-\frac{t^2}{2}} dt. \quad (39)$$

The last stage will consist in solving three equations

$$\begin{aligned}
 \alpha_1 \lambda - x_0 &= t_1 \sqrt{\sigma^2 + \alpha_1 \lambda} \\
 \alpha_2 \lambda - x_0 &= t_2 \sqrt{\sigma^2 + \alpha_2 \lambda} \\
 \alpha_3 \lambda - x_0 &= t_3 \sqrt{\sigma^2 + \alpha_3 \lambda}
 \end{aligned}
 \tag{40}$$

with regard to the three unknown quantities  $x_0$ ,  $\lambda$  and  $\sigma$ . The solution is a little laborious but quite straightforward as it involves only some substitutions and the calculation of roots of quadratics.

This is the second method of approach to the problem. It was invented having regard to the data on toxicity tests for neosalvarsan. Unfortunately when all necessary calculations for these experiments were carried out, they gave absurd results. The reason for this lies in some inadequateness of the theory, one condition of which was obviously not satisfied by the experiments. We assumed that each animal received the same dose of the solution, and that the variations in the numbers of virus units injected were due only to random causes. Actually the doses were adjusted to the weight of the mice, which in different experiments varied in limits such as 13 — 15 gm or 18 — 20 gm. The range is not large, but it is possible that the variability of doses caused such a different variability in  $y$ 's that our theory became altogether inapplicable to the experiments under consideration. Before we show how the above theory could be altered in order to allow for the adjustment of the doses to the weight of mice, we will consider briefly the effect of changes in the two constants  $x_0$  and  $\sigma$  on the shape of the toxicity curve corresponding to the equation (37).

We start noticing, that when comparing the shapes of toxicity curves it is important to fix a certain scale of changes in the concentration of the virus units in different solutions used for the injections. For this purpose we shall express the mean number of the virus units of a solution per standard volume in the form

$$\alpha \lambda = 2^k C \tag{41}$$

$C$  being any constant positive number. We notice that when two different dilutions, say  $\alpha_1$  to one and  $\alpha_2$  to one, are used, the difference between the abscissae,  $k_1$  and  $k_2$ , of the respective experimental points will be constant and independent from  $\lambda$  and  $C$ . In fact:

$$k_1 = \frac{\lg \alpha_1 + \lg \lambda - \lg C}{\lg 2}$$

$$k_2 = \frac{\lg \alpha_2 + \lg \lambda - \lg C}{\lg 2} \quad (42)$$

and

$$k_2 - k_1 = \frac{\lg \alpha_2 - \lg \alpha_1}{\lg 2}. \quad (43)$$

In the first method of approach we assumed  $C = \lambda_0 = 10$ . At present it is convenient to assume  $C = x_0$ , which will not alter the shape of the toxicity curve and will only mean the change of the origin of the coordinates. Putting  $\alpha\lambda = 2^k x_0$  into the expression (38) of  $t(\alpha)$  we shall have, (say)

$$T(k) = t(\alpha) = \frac{x_0(2^k - 1)}{\sqrt{\sigma^2 + 2^k x_0}} = \frac{2^k - 1}{\sqrt{v^2 + 2^k x_0^{-1}}} \quad (44)$$

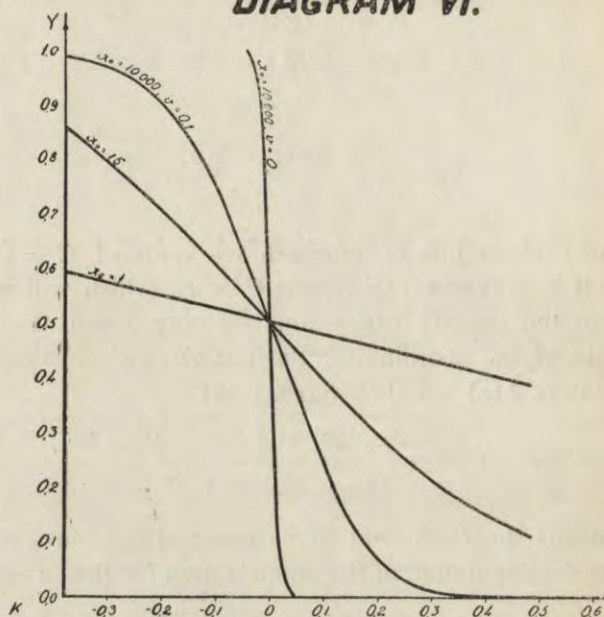
where  $v$  means the coefficient of variation of the minimum lethal dose,  $x$ , in the population of the animals used for the experiments:

$$v = \frac{\sigma}{x_0}.$$

The general effect of the changing mean sensitiveness and of its variability in the animals is now easy to see. Fix a certain  $k$  and consider the variation of  $T(k)$  corresponding to the variation of  $v$  and  $x_0$ . If  $v$  is increased,  $x_0$  being constant (i. e. if the mean sensitiveness of the animals is unchanged, but the variability is increased) then the absolute value of  $T(k)$  becomes smaller. This means that the increase of the variability in the sensitiveness of the animals tends to make the corresponding probability of death approach  $1/2$ , and that the general effect of this upon the curve is in its becoming less steep. The effect of the increase of  $x_0$ , the variability  $v$  of the animals being constant, is an opposite one. Whatever be  $k$ , the increase of  $x_0$  means the increase of  $|T(k)|$  and thus the increase of  $|1/2 - P(\alpha)|$  — thus the curve becomes steeper. The Diagram VI illustrates the position.

The curves marked  $x_0 = 1$ ,  $x_0 = 15$ , and  $x_0 = 10\,000$  correspond to the assumption that there is no variability in the sensitiveness of the animals. We see that the increase of the minimum lethal dose results in the increase of the steepness of the toxicity curve. The last curve, marked  $x_0 = 10\,000$ ,  $v = 0.1$  corresponds

## DIAGRAM VI.



to the assumption that the coefficient of variation in the minimum lethal dose of the animals is  $v = 0.1$  and that the mean minimum lethal dose equals  $x_0 = 10\,000$ .

We have to notice a rather unfortunate circumstance, that if  $x_0$  is already very large and  $v$  has a moderate value, say  $v = 0.1$ , then a further increase of  $x_0$  of even 100% of its original value does not significantly affect the shape of the toxicity curve. We have calculated the ordinates of two such curves corresponding both to  $v = 0.1$  and to  $x_0 = 10\,000$  and  $x_0 = 20\,000$  respectively. The results are shown in the Table XI. We see

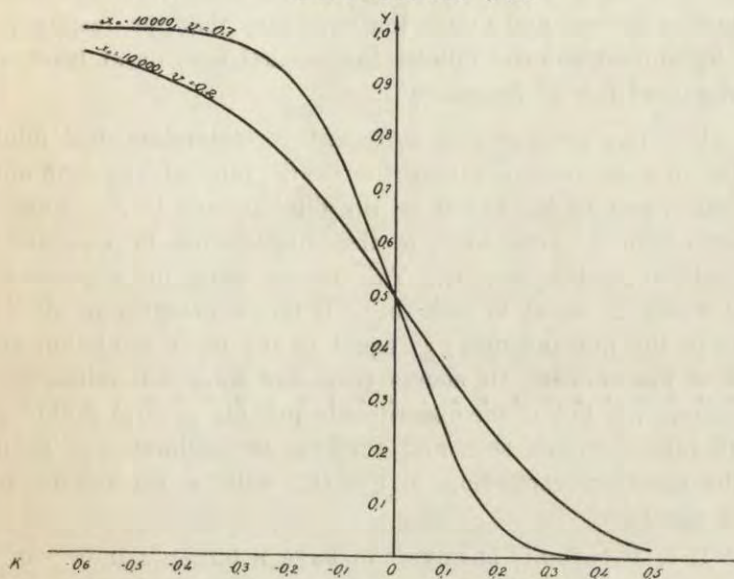
Table XI.

$k$	-0.6	-0.5	-0.4	-0.3	-0.2	-0.1	0.0	+0.1	+0.2	+0.3	+0.4	+0.5
$x_0 = 10000$ $v = 0.1$	1.000	0.998	0.992	0.969	0.901	0.747	0.500	0.238	0.070	0.011	0.001	0.000
$x_0 = 20000$ $v = 0.1$	1.000	0.998	0.992	0.970	0.902	0.748	0.500	0.237	0.069	0.011	0.001	0.000
$x_0 = 10000$ $v = 0.2$	0.955	0.928	0.886	0.826	0.741	0.631	0.500	0.360	0.229	0.124	0.055	0.019

that the differences of the ordinates are hardly noticeable. Therefore, unless an extremely large number of experiments is carried out, it will be impossible to obtain the values of  $x_0$  and  $v_0$  with any sort of accuracy when the value of  $x_0$  is very large.

The last line of the Table XI illustrates the change in the toxicity curve due to the increase of  $v$  from the value of 0.1 to 0.2. The same is illustrated on the Diagram VII.

**DIAGRAM VII.**



Though in cases when  $x_0$  is very large, the accuracy of its estimation on the basis of the shape of the toxicity curve only seems to be hopeless, there are some other ways of estimating  $x_0$  at least in certain important cases. Dr. PETRIE kindly informed us about a serological problem consisting in the determination of the dependency of the minimum lethal dose of some bacteria upon the dose of some serum injected previously into the animals. Since the serum increases considerably the minimum lethal dose, this would probably be a case where the shape of the toxicity curve would give insufficient information to determine  $x_0$ . However, if the minimum lethal dose of the animals which have not got any injection of the serum, is not a very high one — as

f. i. it is with regard to Pneumococa, where it is probably equal to one — then we may determine the change in  $x_o$ , due to the injection of the serum, carrying out two experiments, using the same culture of the bacteria. For the first experiment we should use non-immunised animals and its aim would be to determine  $\lambda$  — the mean concentration of virus units in the culture. The purpose of the second experiment, for which we should use the animals injected with the serum, would be to determine the increased minimum lethal dose  $x_o$  of the immunised animals. This is easily done when the concentration of bacteria in the original culture is known and under the condition that the resistance of the immunised animals follows the normal law, or at least some symmetrical law of frequency.

For this purpose it is sufficient to determine the dilution of the original culture giving the death rate of the immunised animals equal to  $1/2$ . Let it be the dilution one to  $a_o$ . Then the concentration of virus units in this dilution will be  $\lambda/a_o$  and we can affirm that  $x_o = \lambda/a_o$ . This follows from the expression of  $t(\alpha)$  which is equal to zero only if the concentration of virus units in the injected doses is equal to the mean minimum lethal dose of the animals. Of course there are some difficulties in determining  $a_o$ , but if the experiments provide several points with death rates between zero and one, we can estimate the position of the point corresponding to  $y = 0.5$  with a practically sufficient accuracy.

It is important however to have a larger number of the experimental points and besides to have them homogeneously distributed over the range of the curve. For this purpose it would be sufficient to alter the concentration in the dilutions used for the injections in a special way, so that the ratio,  $q$ , of the two consecutive concentrations would keep a constant value. We could f. i. assume  $q = 2$ , so that the respective dilutions would be one to, say  $a$ , where.

$$a = 100, 200, 400, 800, 1600, 3200, \text{ etc.}$$

If the ratio equal to 2 would prove to be too large, we could take instead of  $q = 2$  the value  $q = 2^{0.5}, 2^{0.2}, 2^{0.1}$  or even  $2^{0.05}$ . The following table gives the four resulting scales of dilutions, assuring the equidistance of the experimental points.

Table XII.

$q$	$2^{0.5}$	$2^{0.2}$	$2^{0.1}$	$2^{0.05}$
	100.000	100.000	100.000	100.000
	141.422	114.871	107.178	103.529
	200.000	131.952	114.871	107.148
	282.847	151.572	123.114	110.956
Consecutive	400.000	174.120	131.951	114.871
dilutions	565.687	200.000	141.422	118.922
	800.000	229.216	151.572	123.114
one to	1.131.383	263.900	162.450	127.456
	1.600.000	303.143	174.108	131.952
	2.262.789	348.217	186.609	136.603
	3.200.000	400.000	200.000	141.422
	4.525.556	459.480	214.350	146.410
	6.400.000	527.800	229.742	151.572
	9.051.000	606.286	246.229	156.918

As a matter of fact, if we alter the dilutions in, say, arithmetical progression, so that f. i. the consecutive concentrations would be one to  $a$ , where

$$a = 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, \text{ etc.}$$

then, using two different cultures with different original concentrations of virus units, we should get curves of different shapes, which could not be superposed by mere shifting. Assume for instance that the original concentration of virus units was in one case  $\lambda_1 = 100$  in the other  $\lambda_2 = 200$ . The concentrations of virus units in different dilutions will be as in the following Table XIII.

Table XIII.

	1	2	3	4	5	6	7
Dilutions one to	100	200	300	400	500	600	700
Concentrations of virus units when $\lambda = 100$	1.000	0.500	0.333	0.250	0.200	0.167	0.143
Concentrations of virus units when $\lambda = 200$	2.000	1.000	0.667	0.500	0.400	0.333	0.286

The death rates in the two cases will be the values of some monotonic function of the figures in the two last rows of the table and if these cannot be superposed by mere shifting, the same will be true with regard to the curves. Now we see that the figures in the two rows diminish in quite different ways.



If we use as abscissae of the experimental points not the  $a$ 's themselves, but the logarithms of the  $a$ 's, then the two toxicity curves will be parallel, but the experimental points will not be homogeneously distributed on the axis of abscissae: they will be comparatively rare in the beginning of the range and will accumulate towards the end.

There remains to be considered briefly the alteration of the theory in order to allow for the adjustment of the doses to the weight of the animals. The authors of the Report on the Test for Toxicity of the Neosalvarsan state that the sensibility of mice has a negative correlation with their weight, though probably the regression line is not quite linear. As the doses were adjusted to the weight of mice, there must be some correlation,  $r$ , between  $z$  — the number of virus units injected and the resistance  $x$  of a mouse. Further, the variance of  $z$  is now no more  $\alpha\lambda$ , but can be represented by a sum of two terms. The first term depends upon the variability of the dose, and the second — upon the random sampling of virus units into the doses of a given size. Probably we should not be very much mistaken assuming that the first term is equal to  $(\sigma_v\alpha\lambda)^2$  where  $\sigma_v^2$  is the variance of doses having their mean equal to 1, and that the second is  $\alpha\lambda$ . In this way we should have

$$\sigma_z^2 = \alpha\lambda + \sigma_v^2\alpha^2\lambda^2 \quad (45)$$

and

$$\sigma_u^2 = \alpha\lambda (1 + \sigma_v^2\alpha\lambda) - 2r\sigma\sqrt{\alpha\lambda + \sigma_v^2\alpha^2\lambda^2} + \sigma^2 \quad (46)$$

Using this instead of  $\sigma^2 + \alpha\lambda$  in the expression for  $t_i$  we could get equations from which the unknown quantities  $\lambda$ ,  $\sigma_v$ ,  $r$ ,  $x_0$ ,  $\sigma$  could be perhaps determined. We did not proceed with the calculations because the extreme multiplication of constants which have to be determined on the basis of a few experimental points will make the value of any one of them at least doubtful. We judged it better to wait until we could obtain data of experiments in which every animal was injected with the same dose of the toxin, in which case the equations (40) could perhaps give the adequate results, were our theory true.

#### 6. Third method of approach.

The two first methods of approach differ in this essential, that in the first the varying result of injections (death or no

effect) has been ascribed only to variations in the number of virus units injected; while in the second method we have taken into account not only the variations in the number of virus units, but also the variations in the sensibility of animals. It is also possible to go further in the same direction, assuming that the variation in the number of virus units injected, though undoubtedly existing, is very small compared to the variation of the sensitiveness of the animals. This of course could be considered as a special case of the situation dealt with in the second method of approach, in which we have only to assume that  $\alpha\lambda$  is vanishingly small compared to  $\sigma^2$ . The equations (40) could be now written in the form:

$$\begin{aligned} \alpha_1\lambda - x_0 &= t_1\sigma \\ \alpha_2\lambda - x_0 &= t_2\sigma \\ \alpha_3\lambda - x_0 &= t_3\sigma \end{aligned} \quad (47)$$

which shows that the theory can be valid only in cases when  $t$  is a linear function of  $\alpha$ . Supposing that it is so, we easily find  $x_0$  and  $\lambda$  in terms of  $\sigma$  by minimising the sum of squares

$$\sum_{i=1}^s \left( \alpha_i \frac{\lambda}{\sigma} - \frac{x_0}{\sigma} - t_i \right)^2 \quad (48)$$

but it is impossible to have all three unknowns completely determined.

The values of the unknowns minimising (48) are given by the formulae

$$\frac{\lambda}{\sigma} = \frac{s \sum \alpha_i t_i - \sum \alpha_i \sum t_i}{s \sum \alpha_i^2 - (\sum \alpha_i)^2} \quad (49)$$

$$\frac{x_0}{\sigma} = \frac{\sum \alpha_i \sum \alpha_i t_i - \sum \alpha_i^2 \sum t_i^2}{s \sum \alpha_i^2 - (\sum \alpha_i)^2} \quad (50)$$

The last formula gives the inverse value of the coefficient of variation in the sensitiveness of the animals,

$$v = \frac{\sigma}{x_0} = \frac{s \sum \alpha_i^2 - (\sum \alpha_i)^2}{\sum \alpha_i \sum \alpha_i t_i - \sum \alpha_i^2 \sum t_i^2} \quad (51)$$

In the case when  $\lambda$  is known from some other grounds, the two formulae (49) and (50) will easily give the values of  $\sigma$  and  $x_0$ , and thus may be useful f. i. when we are dealing with

the dependency of the mean minimum lethal dose  $x_0$  upon the injected doses of the serum.

### 7. Summary of results.

The problem of estimation of the number of virus units in an extract, on the basis of death rates caused by injection of different dilutions of the same into samples of animals (plants), requires for its solution certain hypotheses about the question: Why of two animals, which have been injected apparently with identical doses of the toxin, one dies while the other remains healthy? The possible answers are:

(a) The difference in the results of injection depends only upon the random variation in the number of virus units present in equal volumes of the injected liquid, all animals being equally sensitive.

(b) Not only the number of virus units in the injected doses is varying, but also there is some variation in sensitiveness of the animals.

(c) The variation in the number of virus units in equal volumes of the liquid is negligible when compared to the variation in the sensitiveness of the animals.

These three different assumptions, together with some additional ones, form the three methods of approach. All of them suppose essentially that the doses injected into the different animals have identical volumes. Owing to the fact that most of the available data did not satisfy this condition, only the first method of approach could be successfully illustrated.

P. S. We are indebted to Dr. EGON S. PEARSON for the very kind correction of our English and we have pleasure in expressing to him our hearty thanks.

### 8. Streszczenie.

Poprawna (bez błędów systematycznych) metoda rachowania bakteryj żywych w cieczy była stworzona przez R. A. FISHERA<sup>1)</sup>.

<sup>1)</sup> Uzasadnienie tej metody opublikowane jest w pracy p. t. „On the Mathematical Foundations of Theoretical Statistics”, Phil. Transactions, A, 222, str. 309—368.

Opis metody wraz z pomocniczą tablicą znaleźć można w książce tegoż autora p. t. „Statistical Methods for Research Workers”, Londyn, 1930, wydanie trzecie, w rozdziale „Presence and absence of organisms”.

Nie nadaje się ona jednak do stosowania w tych przypadkach, gdy chodzi o zrachowanie bakteryj pewnego typu, nie w czystej ich kulturze, lecz w cieczy, zawierającej jeszcze jakieś inne bakterje.

Zadaniem pracy niniejszej jest próba metod, które nadawałyby się do określania stężenia w cieczy bakteryj, dających jakiś swoisty efekt fizjologiczny, przyczem obecność innych (nie dających tego efektu) bakteryj w tejże cieczy nie byłaby czynnikiem zakłócającym.

Rozwiązanie postawionego w ten sposób zagadnienia łączy się z innym, polegającym na wyznaczeniu liczby danych bakteryj, niezbędnej do spowodowania swoistego efektu fizjologicznego.

Proponowane trzy próby rozwiązania tych zagadnień, stanowiące rozwinięcie wspomnianej metody FISHERA, oparte są w znacznej mierze na trzech różnych hipotezach, dotyczących zmienności wyniku zastrzyków tych samych doz różnym zwierzętom. Chodzi mianowicie o odpowiedź na pytanie, dlaczego jedno z dwóch zwierząt tej samej kategorii, którym zastrzyknięto te same dozy pewnej cieczy, umiera na daną chorobę, gdy drugie pozostaje przy życiu i nie okazuje oznak tej choroby.

Korzystaliśmy z następujących hipotez.

(a) Różnica w wyniku zastrzyku tej samej dozy pewnej cieczy zależy tylko od przypadkowej zmienności liczby rozważanych bakteryj w równych objętościach cieczy, gdy odporność zwierząt doświadczalnych jest dokładnie ta sama.

(b) Prócz zmienności liczby bakteryj w równych dozach, na wynik doświadczenia wpływa również zmienność odporności zwierząt, używanych do doświadczeń. Zmienność ta stanowi jeszcze jedną niewiadomą, którą należy wyznaczyć.

(c) Zmienność odporności zwierząt doświadczalnych jest tak wielka, że w porównaniu z nią zmienność liczby bakteryj w równych dozach cieczy jest bez znaczenia.

Korzystając z tych zasadniczych i jeszcze pewnych dodatkowych założeń zostały wyprowadzone równania i wykreślone krzywe, według których, gdyby proponowana teoria była prawdziwa, musiałyby układać się punkty, reprezentujące wyniki doświadczeń, polegających na zastrzykach różnych rozcieńczeń cieczy chorobotwórczej. Odcięte tych punktów mierzą stopień rozcieńczenia zastrzykiwanej dozy, zaś rzędne — częstotliwość występowania efektu fizjologicznego. Metody mierzenia

wyliczonych wyżej niewiadomych (stężenie bakteryj, minimalna dawka śmiertelna lub jej wartość przeciętna, oraz zmienność odporności organizmów doświadczalnych) polegają w swej istocie na rozpoznaniu krzywej teoretycznej, według której układają się punkty eksperymentalne oraz na dopasowaniu jej do tychże punktów.

Stosowalność trzech wynikających z powyższych hipotez metod (właściwie — tylko pierwszej z nich) została zilustrowana na wynikach doświadczeń Mc KINNEY'A <sup>1)</sup> i Dr. G. F. PETRIE z Lister Institute, Elstree, Herts, w Anglii, któremu na tej drodze wyrażamy serdeczną wdzięczność za dostarczenie nam cennych dla nas materiałów.

Metody te mogą być również stosowane do rachowania cząsteczek jadu (virusu) wzastrzykiwanych cieczach.

Pomimo zgodności liczb doświadczalnych z przewidywaniami proponowanej teorii, nie można uważać, że słuszność wynikających z niej metod została tem samem dowiedziona. Dowodem takim mogłyby ewentualnie być zadawalniające wyniki rachunku bakteryj chorobotwórczych w czystej kulturze, kontrolowane stosowalną w tym przypadku metodą R. A. FISHERA. Wykonanie odnośnych doświadczeń leży poza granicami możliwości autorów.

---

<sup>1)</sup> „Quantitative and Purificative Method in Virus Studies“, *Journal of Agricultural Research*. 35.

[Zakład Chemji Fizjologicznej Uniwersytetu Warszawskiego]

S. Frajbergerówna.

**Struktura i reakcje enzymatyczne. Część X. Wpływ lepkości i stanu agregacji fazy rozdrobnionej.**

*La structure et les réactions enzymatiques. X. partie. Influence de la viscosité et de l'état d'agrégation de la phase dispersée.*

Rękopis nadesłany w dniu 27. II. 1931 r.

La présence de la gélatine diminue la quantité de glycose ou de maltose, déterminée d'après la méthode de BERTRAND. Cette quantité ne dépend ni de la température, ni du temps de contact. Elle est proportionnelle à la quantité de sucre et de gélatine et dépend de leur forme (tableaux I, II, III).

La viscosité n'influe que peu sur la réaction: amylose-amidon. La diminution de la vitesse de la réaction ne s'observe guère dans les solutions de gélatine que depuis 4.5% (37°). Le ralentissement de la réaction: urée — uréase est à noter dans les solutions plus concentrées que 8% (tableaux VI, VII, VIII, IX, XVI). L'amidon et l'amylose sont inaptes à la diffusion dans les gelées de gélatine (tableau X). L'occlusion d'un seul des deux corps, — amidon ou amylose, dans la gelée provoque un ralentissement de la réaction (tableau XI, XII). Si, par contre, les deux composants subissent simultanément l'occlusion et que les distances séparant l'amidon de l'amylose ne sont pas trop grandes, la réaction s'effectue sans retard prononcé, ainsi, p. ex., dans une gelée de la gélatine à 5% et à 20°, la vitesse de la réaction diffère à peine de celle chez le témoin (tableau XIII). Le secouement accélère la réaction au cas, où un seul composant subit l'occlusion (tableau XIV). L'alcool éthylique ralentit la réaction dans les systèmes: amylose-amidon, mais l'accélère, par contre, au cas, où l'amidon subit l'occlusion dans la gélatine, ou bien la gélatine subit une gélification (tableau XV).

## W s t ę p.

Reakcje enzymatyczne, zachodzące w organizmach, są reakcjami, przebiegającymi w układach wielofazowych. Wielofazowość układu jest prawdopodobnie warunkiem, dzięki któremu w organizmie zachodzą jednocześnie reakcje bardzo różnych typów. Podobne ujęcie zagadnienia zawdzięczamy przede wszystkim HOFFMEISTER'OWI ('01) i JACOBY'EMU.<sup>1)</sup>

Układy in vivo nie są bezpośrednio dostępne badaniu. Celem wniknięcia w czynniki, regulujące reakcje enzymatyczne in vivo, prowadzone są badania nad układami eksperymentalnymi na modelach. Chcąc stwierdzić wpływ jakiegoś czynnika na przebieg reakcyj enzymatycznych, musimy się ograniczyć do rozpatrywania układu, w którym zachodzi reakcja, wywołana działaniem tylko jednego enzymu (Wprowadzenie tej metody badań jest zasługą WARBURGA '28 oraz LESSERA '13, '19, '23).

Prowadząc doświadczenia in vitro na odpowiednich modelach, można, usuwając jedne czynniki, wprowadzając zaś inne, badać wpływ tych czynników na reakcje enzymatyczne, i z danych doświadczenia próbować odtworzyć przebieg reakcyj, zachodzących in vivo, bardziej złożonych, odbywających się w środowisku bardziej niejednorodnym.

W pracach modelowych należy starać się o wytworzenie warunków jak najbardziej zbliżonych do niejednorodnego podłoża komórkowego, któreby pozwoliły wyjaśnić rolę wielofazowości, którą w pojęciu biologicznym nazywamy strukturą.

Badania HEDINA ('2), LESSERA ('13, '19), WARBURGA ('28), WILLSTÄTTERA ('29) oraz prace, wykonane w Zakładzie Chemji Fizjologicznej U. W., dowiodły wpływu struktury na kinetykę reakcyj enzymatycznych. Wpływ ten jest bardzo różny. Z prac LESSERA, prowadzonych nad glikogenem, wynika, że istnienie struktury wpływa hamująco na przebieg reakcji, ten sam wynik dały badania, prowadzone przez PRZYŁĘCKIEGO ('30) nad kinetyką desmolaz. Badania zaś WARBURGA ('14) nad procesami oksydacyjnymi stwierdziły, w przypadku zniszczenia struktury, silne zahamowanie reakcji.

Widzimy więc, że rola struktury jest bardzo różnorodna.

W pracy niniejszej zamierzałam zbadać rolę lepkości, okluzji

---

<sup>1)</sup> Wg. OPPENHEIMERA: Die Fermente. 1925. Lipsk.

oraz powstawania agregacji i roli struktur w znaczeniu biologicznym w przebiegu reakcyj enzymatycznych.

Bardzo wielu procesom biologicznym towarzyszą zmiany lepkości środowiska. Chodziłoby o stwierdzenie, czy zmiany szybkości powyższych procesów są spowodowane zmianami lepkości.

Jeżeli chodzi o wpływ lepkości na przebieg reakcyj enzymatycznych, należałoby się spodziewać, zgodnie z rozważaniami teoretycznymi, zmniejszenia szybkości reakcyj wraz ze wzrostem lepkości; i to tem większego, im lepkość środowiska będzie większa. Wiemy, że aby reakcja enzymatyczna zaszła, konieczne jest zetknięcie enzymu z substratem, t. j. żeby substrat znajdował się w sferze działania enzymu. O ile zwiększymy lepkość środowiska, zbliżenie się cząsteczek napotyka na coraz większy opór i jest ono utrudnione. Lepkość może wpływać nie tylko na częstość zderzenia się enzymu i substratu, znajdujących się na powierzchni sorbenta. Może się zdarzyć, że odległość enzymu od substratu, znajdującego się na tej samej miceli, przekracza sferę działania enzymu. Reakcja w tym przypadku zajdzie, o ile różne micelle zbliżą się do siebie w ten sposób, aby enzym, znajdujący się na jednej z nich, zetknął się z substratem zasorbowanym na miceli drugiej.

Tego rodzaju zetknięcia zachodzą pod wpływem bezwładnych ruchów BROWNA. Znaczne zwiększenie lepkości środowiska wpływa na zmniejszenie częstości zderzeń, tem samem na możliwość zetknięcia enzymu i substratu, i to tem więcej, im bardziej koloidalny charakter wykazują enzym i substrat.

Badając układy, w których środowiskiem jest roztwór żelatyny o różnych stężeniach, a więc układy o bardzo dużej lepkości, będziemy mogli stwierdzić, czy i w jakim stopniu lepkość wpływa na prędkość reakcyj enzymatycznych.

Porównywając układy, w których substratem jest 1) ciało o własnościach koloidalnych, a więc o dużej cząsteczce (która np. dla skrobi wynosi kilkadziesiąt tysięcy) i małej zdolności dyfuzji, oraz 2) krystaloid o małej cząsteczce (mocznik), wyróżniający się wielką zdolnością dyfundowania, będziemy mogli stwierdzić wzajemne oddziaływanie na siebie koloidów oraz oddziaływanie koloidalnego środowiska na substrat o charakterze krystalicznym.

Zmieniając stopień dyspersji ośrodka dyspersyjnego, będziemy mogli badać przebieg reakcyj w zależności od stopnia



agregacji i istnienia struktur, oraz wpływ zjawiska okluzji na procesy kinetyczne. O ile zmiana zachodzi w kierunku zmniejszenia się dyspersji układu, zauważymy, że proste cząsteczki koloidalne (monony, protony) dążą do zbliżenia się ze sobą, tworząc cząsteczki złożone o niewielkim stopniu aglomeracji (polyony), te zaś tworzą, w dalszym ciągu, zbliżając się, agregaty; jako stan końcowy tego procesu występuje tworzenie się gelu.

Przejście protonu w polyon prowadzi do zamknięcia wewnątrz polyonu, zasorbowanego na protonie enzymu lub substratu. Zjawisko to nosi nazwę okluzji. Może ono być wywołane zarówno przejściem protonu w polyon lub powstaniem agregacji typu żelatyny, jak też przy zwiększeniu cząsteczek koloidu.

Konieczne jest w tym przypadku zastrzeżenie, że czynniki, powodujące zmiany w stanie koloidalnym ośrodka, nie prowadzą do elucji zasorbowanych cząsteczek. W przypadku, gdy enzym uległ okluzji przedostawanie się substratu do wnętrza polyonu jest zależne od wielkości cząsteczki i własności sorbcyjnych polyonu i substratu.

W związku z dużą cząsteczką enzymu, w przypadku zamknięcia substratu wskutek okluzji, reakcja zostanie zahamowana (badania nad układem glikogen + kazeina  $\rightarrow$  wytrącanie kazeiny, stwierdziły uniedostępnienie wędrowki amylazy w głąb polyonu: PRZYŁĘCKI '30).

Okluzja wywiera zatem znaczny wpływ na hamowanie reakcji. Hamowanie to może być w pewnych przypadkach zupełne.

Struktura wpływa na przestrzenne rozmieszczenie substratu i enzymu, a zatem na zmianę stężenia działających na siebie wzajemnie enzymu i substratu. O ile mamy do czynienia z procesami, zachodzącymi w komórkach, możemy sobie wyobrazić, że istnieją tam przestrzenie, rozdzielone błonkami. Wskutek tego rozgraniczenia wędrowka niektórych ciał z jednej przestrzeni do drugiej jest zupełnie uniemożliwiona. Możemy mieć niekiedy do czynienia z całkowitem rozdzieleniem enzymu i substratu.

W układach wielofazowych, pozbawionych powierzchni rozgraniczających, lub w przypadku, gdy powierzchnie rozgraniczają drobne przestrzenie (wielofazowość tę nazywamy strukturą w pojęciu biologicznym), mamy również do czynienia z oddzieleniem przestrzennym enzymu i substratu wskutek jednoczesnej sorbcji obu składników na sorbencie (PRZYŁĘCKI '29).

Wytworzeniu się żelu towarzyszy powstanie wtórnych struktur mikroskopowych. Zachodzi jednocześnie uniedostępnienie wędrówki enzymu, jak też substratu, z jednej przestrzeni do drugiej. W tych warunkach oczekujemy znacznego zahamowania reakcji.

Celem wykazania wpływu zmian stanu dyspersji ośrodka i związanych z tem zjawisk (okluzja, agregacja, ustanie ruchów BROWNA, powstanie wtórnych struktur mikroskopowych) prowadzimy badania w układach, w których stan dyspersji zmieniać się może do pewnego stopnia odwracalnie w dwóch kierunkach— w kierunku zmiany stanu dyspersji, przechodząc od stanu sol do stanu gel, lub w kierunku odwrotnym.

W pracy niniejszej używam wyrazu gel nie w sensie ścisłym, związanym z powstaniem koagulacji, lecz raczej jako skrótu wyrazu galareta.

### Część doświadczalna.

#### A. Układy: amylaza-skrobia-żelatyna.

Roztwór skrobi. Skrobię (Mercka) rozpuszczałam w małej ilości zimnej wody, następnie wlewałam do wrzącej wody, stale mieszając i gotowałam przez pół godziny, stosując chłodnicę zwrotną.

W ten sposób otrzymujemy dosyć stały sol skrobi.

Roztwór żelatyny. Żelatyna francuska firmy Coignet Père et Cie, Paris - Lyon, „gélatine extra“, pH potencjometrycznie oznaczone wynosi 5.89. Żelatynę krajałam na małe kawałki, zalewałam zimną wodą i ogrzewałam w wodzie o temperaturze 40° C.

Roztwór 1% jest to taki roztwór, który w 100 cm<sup>3</sup> wody zawiera 1 g żelatyny.

Roztwór amylazy. Amylaza: diastaza sproszkowana Mercka.

Do każdego doświadczenia przygotowywałam świeży roztwór amylazy, dlatego też nie dodawałam do roztworu żadnego antyseptyka. Amylazę rozpuszczałam w roztworze NaCl, zawierającym tyle gramów NaCl, ile gramów amylazy w nim rozpuszczałam. Pozostawiałam go na ½ godziny i po upływie tego czasu sączyłam przez sączek ze zwykłej bibuły.

Bufory. Jako bufory stosowałam mieszaninę fosforanów (SØRENSENA) Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O i KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Roztwory są  $\frac{1}{15}$  molarne ( $\frac{m}{15}$ ); pH sprawdzane przy pomocy indykatorów (bromokrezol i czerwień metylenowa).

Metody pomiarów. Oznaczanie siły redukcyjnej w-g BERTRANDA. Oznaczanie skrobi w-g metody glikogenowej — PFLÜGERA.

#### 1. Wiązanie cukru przez żelatynę.

Wobec tego, że żelatyna wiąże cukier, chodziło mi o znalezienie zależności między ilością związanego cukru a stężeniem żelatyny i cukru

w roztworze, oraz zależności od temperatury, w jakiej zetknięcie zachodzi, i czasu zetknięcia.

### A. Wpływ temperatury i czasu zetknięcia na ilość cukru związanego przez żelatynę.

Badalam roztwory 0.3% glukozy i maltozy, stężenie żelatyny w roztworach wynosiło 1, 2, 3 i 4%. Roztwory te umieszczałam na 2 godziny w termostacie powietrznym ( $t = 30^{\circ} \text{C}$ ). Jednocześnie wstawiałam do termostatu roztwory, niezawierające żelatyny, do których dodawałam żelatynę po upływie 2 godzin; w tych układach czas zetknięcia żelatyny wynosił około 10 minut, zetknięcie zachodzi w temperaturze pokojowej  $15^{\circ} \text{C}$ . Do oznaczenia brałam  $15 \text{ cm}^3$  badanego roztworu.

Jak widzimy z tabeli I, ilość związanego cukru nie zależy ani od temperatury, ani od czasu zetknięcia.

Tabela I.

Wpływ temperatury i czasu zetknięcia na ilość cukru związanego przez żelatynę.  
*Influence du temps et de la température sur la quantité du sucre liée à la gélatine.*

Stężenie żelatyny <i>Concentration de la gélatine</i>	Roztwory pozostawały w zetknięciu z żelatyną 2 g. $t = 30^{\circ} \text{C}$ <i>Solutions restaient en contact avec la gélatine 2 heures <math>t = 30^{\circ} \text{C}</math></i>				% związanego cukru <i>Sucre lié %</i>		Zetknięcie trwało około 10 minut $t = 16^{\circ} \text{C}$ <i>Le contact durait 10 min. env. <math>t = 16^{\circ} \text{C}</math></i>				% związanego cukru <i>Sucre lié %</i>	
	Glukoza <i>Glycose</i>		Maltoza <i>Maltose</i>		Gl.	Ml.	Glukoza <i>Glycose</i>		Maltoza <i>Maltose</i>		Gl.	Ml.
	mg	Średn. Moy.	mg.	redn. Moy.			mg	Średn. Moy.	mg	Średn. Moy.		
	%											
0	43	44	43	43	—	—	—	—	—	—	—	—
	44		43									
	44		42									
	45		44									
1	43	42.9	40	39.7	2.5	7.6	43	42.9	39	40	2.5	7
	42		39				42		40			
	43		40				43		41			
2	40	40.3	38	38.3	8.4	13.3	40	40	38	37.3	9	13.2
	41		39				40		37			
	40		38				40		38			
3	39	39	36	36.3	11.4	15.6	39	39	36	36	11.4	16.2
	39		36				39		36			
	39		37				39		36			
4	35	35.3	33	33.7	19.6	21.6	35	35.3	34	33.3	19.6	22.5
	36		34				36		33			
	35		33				35		33			

B. Wpływ stężenia cukru w roztworze na ilość cukru, związanego przez żelatynę.

W 20 cm<sup>3</sup> roztworu cukru (glukozy, maltozy) o różnym stężeniu 0.1%, 0.2, 0.3 i 0.4% rozpuszczam 1 g żelatyny (stężenie roztworu wynosi 5%) i oznaczam cukier. Dla 0.5% stężenia żelatyny zwiększałam stężenie cukru, aż do 0.8%.

Dla roztworów 0.6% i 0.8% otrzymałam wyniki niezgodne, gdyż dla tak wysokich stężeń cukru metoda BERTRANDA nie jest stosowana. Gdybym roztwór odpowiednio rozcieńczyła, zmieniłyby się stosunki w układzie, i nie można byłoby porównywać wyników, otrzymanych dla tych stężeń, z wynikami, otrzymanymi dla stężeń niższych.

Jak widzimy z tabeli II, ilość związanego cukru zależy od stężenia cukru w roztworze. Jednak trudno jest tę zależność ilościowo przedstawić.

Tabela II.

Wpływ stężenia cukru w roztworze na ilość cukru, związanego przez żelatynę.

*Rapport entre la concentration du sucre présent et la quantité du sucre lié dans une solution de gélatine à 5%.*

(a)

Rodzaj cukru <i>Genre de sucre</i>	5% roztwory żelatyny <i>Solution de gélatine à 5%</i>											
	0.1%			0.2%			0.3%			0.4%		
	mg	Średn. Moy.	Wią- zania Lié % %	mg	Średn. Moy.	Wią- zania Lié % %	mg	Średn. Moy.	Wią- zania Lié % %	mg	Średn. Moy.	Wią- zania Lié % %
Maltoza <i>Maltose</i>	9.7	9.7	51.5	29	30.5	23.7	50	50	16.6	65	64	20
	9.8			29			50			62		
	9.6			32			50			65		
				32			50			64		
Glu- koza <i>Glycose</i>	13	12.5	37.5	26	26.7	33.3	48	48	20.0	52	52	35
	12			27			48			51		
	12			27			48			53		
	13			27			48			53		

(b)

Rodzaj cukru <i>Genre de sucre</i>	0.5% roztwory żelatyny <i>Solutions de gélatine à 0.5%</i>											
	0.2%			0.4%			0.6%			0.8%		
	mg	Średn. Moy.	Wią- zania Lié % %	mg	Średn. Moy.	Wią- zania Lié % %	mg	Średn. Moy.	Wią- zania Lié % %	mg	Średn. Moy.	Wią- zania Lié % %
Maltoza <i>Maltose</i>	39	39	1.5	74	75	6.25	83	83	30	142	142	11.2
	39			75			83			142		
	39			75			94			139		
	39			75			95			139		
				94.5	21.2	139	139	13.1				

C. Wpływ stężenia żelatyny na ilość cukru, związanego przez żelatynę.

Układy badane zawierają 0.3% roztwór maltozy i glukozy. Stężenie żelatyny zmieniałam od 1.25% do 7.5%. Do oznaczenia brałam 20 cm<sup>3</sup> roztworu.

Z tabeli III wynika, że ilość związanego cukru zależy od stężenia żelatyny, a mianowicie wzrasta wraz ze wzrostem stężenia żelatyny.

Tabela III.

Wpływ stężenia żelatyny na ilość cukru, związanego przez żelatynę.  
Rapport entre la concentration de gélatine et le sucre lié.

Stężenie żelatyny Concentr. de la gélatine %	Roztwory maltozy Solutions de maltose			Roztwory glukozy Solutions de glycose		
	Cukru Sucre mg	Średnia Moyenne	Wiązanie Lié %	Cukru Sucre mg	Średnia Moyenne	Wiązanie Lié %
0	57	57,5	—	59,5	60	—
	58			59,5		
	57			60		
	58			61		
1.25	57	56,5	1,8	56	55,5	7,5
	57			55		
	56			56		
	56			55		
2.5	54	55	4,3	53	53	11,7
	55			53		
	56			53		
	55			53		
5	50	50	11,1	48	48	20
	50			48		
	50			48		
	50			48		
7.5	41	40,5	30,4	33	33	28,3
	40			33		
	41			33		
	40			33		

#### D. Charakter wiązania cukru.

Chodzi nam teraz o to, ażeby stwierdzić, jakiego rodzaju jest wiązanie cukru przez żelatynę: czy mamy do czynienia z działaniem chemicznym, t. zn. że pod wpływem żelatyny cukier przechodzi w formę o mniejszych zdolnościach redukcyjnych, czy odgrywają tu rolę zjawiska natury fizycznej, albo może żelatyna wiąże wytrącony tlenek miedziawy.

W tym celu wykonywamy 2 serie doświadczeń.

1. Badanie, czy zachodzi wiązanie tlenku miedziawego przez żelatynę.

W 0,3% roztworach maltozy oznaczałam cukier. Do oznaczenia brałam 15 cm<sup>3</sup> roztworu. W czasie ogrzewania, gdy powstaje zmętnienie, do

jednych porcyj dodawałam 5 cm<sup>3</sup> 8% roztworu żelatyny, do drugich 5 cm<sup>3</sup> wody destylowanej.

Okazuje się (tab. IV), że żelatyna nie wpływa na osadzanie się tlenku miedziawego i wiązanie nie zachodzi.

Tabela IV.

Wiązanie tlenku miedziawego przez żelatynę.  
*Influence de la gélatine sur la formation du Cu<sub>2</sub>O.*

Roztwór z żelatyną <i>Solutions avec gélatine</i>		Roztwór bez żelatyną <i>Solutions sans gélatine</i>	
Maltoza <i>Maltose</i> mg	Średnia <i>Moyenne</i>	Maltoza <i>Maltose</i> mg	Średnia <i>Moyenne</i>
44	42	41	41.8
42		42	
43		42	
42		42	
43		42	
40		43	

## 2. Ultrasączenie.

Aby stwierdzić, czy nie mamy do czynienia z chemicznym wiązaniem cukru przez żelatynę, uciekłam się do ultrasączenia, stosując ultrasączenie systemu ZSIGMONDY'EGO. Sączenie odbywa się pod zwiększonym ciśnieniem w termostacie powietrznym,  $t = 30^{\circ} \text{C.}$ , a to dlatego, że sączenie trwa długo i żelatyna w temperaturze pokojowej przeszłaby w gel, uniemożliwiając w ten sposób sączenie. Błonę badałam na przepuszczalność cukru i żelatyny. Trudno dobrać błonę całkowicie nieprzepuszczalną dla żelatyny, gdyż błona taka rozcieńczała zazwyczaj roztwór cukru. O ile w przesączu reakcja alkoholowa na białko wypada ujemnie, błona taka jest dostatecznie nieprzepuszczalna do naszych celów. W chwili gdy w przesączu zbierze się około 20 cm<sup>3</sup>, błona jest dostatecznie nasycona roztworem cukru i możemy się już nie obawiać wpływu błony na stężenie przesączu. Zmieniałam kolbę i z tej części przesączu oznaczałam stężenie cukru.

Roztwór maltozy był 0.3%, stężenie żelatyny wynosiło 2%, do oznaczenia brałam 10 cm<sup>3</sup> przesączu.

Widzimy z tabeli V, że stężenie przesączu jest takie same dla roztworów żelatynowych, jak i dla niezawierających żelatyny.

Doświadczenia powyższe nie pozwalają na stwierdzenie charakteru wiązania cukru przez żelatynę.

## II. Wpływ stężenia żelatyny na prędkość rozpadu skrobi pod wpływem amylazy.

A. Prędkość reakcji mierzyłam siłą redukcijną cukru, powstałego z rozpadu skrobi, według metody BERTRANDA.

## Tabela V.

Wyniki ultrasączenia.  
*Influence de la gélatine sur la quantité du sucre déterminé  
 par l'ultra-filtration.*

Roztwory sączone przez ultrasączonek <i>Solutions obtenues par l'ultra-filtre</i>			
Z żelatyną <i>Avec gélatine</i>		Bez żelatyny <i>Sans gélatine</i>	
mg	Średnia <i>Moyenne</i>	mg	Średnia <i>Moyenne</i>
35.0	34.8	35.5	35.3
34.5		35.0	
35.0		35.5	
Roztwory niesączone <i>Solution non filtrées</i>			
Z żelatyną <i>Avec gélatine</i>		Bez żelatyny <i>Sans gélatine</i>	
mg	Średnia <i>Moyenne</i>	mg	Średnia <i>Moyenne</i>
32	32	39	38.7
32		38	
32		39	

W kolbkach Erlenmayera umieszczalam 15 cm<sup>3</sup> 1% skrobi, 5 cm<sup>3</sup> roztworu żelatyny o odpowiednim stężeniu (przy pomocy pipety), następnie dodawałam 1 cm<sup>3</sup> 0.1% amylazy. Do każdego stężenia żelatyny prowadziłam odpowiednią kontrolę. W kontroli zamiast żelatyny dodawałam 5 cm<sup>3</sup> fosforanów, tak aby kwasowość środowiska wynosiła pH = 5.9. Kolbki umieszczalam w termostacie powietrznym, t = 30° C, czas reakcji wynosił 2 godziny. Po 2 godzinach do kontroli dodawałam 5 cm<sup>3</sup> roztworu żelatyny o odpowiednim stężeniu, tak aby otrzymać odpowiednio takie same stężenie, jak w układzie, w którym reakcja zachodziła w środowisku żelatynowym, a to w tym celu, aby uniknąć wprowadzania poprawek na ilość związanego cukru przez żelatynę. Do pozostałych kolb dodawałam 5 cm<sup>3</sup> wody destylowanej, aby wszędzie mieć to samo rozcieńczenie, poczem przystępowałam do oznaczeń.

W przypadku większego stężenia żelatyny przed zagotowaniem roztwory rozcieńczałam (20 cm<sup>3</sup> roztworu badanego, 20 cm<sup>3</sup> I odczynnika, 20 cm<sup>3</sup> II odczynnika i 40 cm<sup>3</sup> wody), a to z obawy, żeby żelatyna nie zapchała sączków.

Po kilku doświadczeniach zaniechałam tego, natomiast wstawiałam kolbki z wytrąconym tlenkiem do gorącej wody.

Używając wyższych stężeń żelatyny, zdarzało się, że jeszcze przed dodaniem amylazy roztwór krzepł. Aby tego uniknąć, roztwory skrobi i żelatyny dokładnie wymieszane podgrzewałam na łaźni wodnej (t = 40° C), wstawiałam do termostatu, również roztwór amylazy. Dopiero po wyrów-

naniu temperatury do 30° C wprowadzałam amylazę do układu. Otrzymałam wyniki bardzo niezgodne pomimo zupełnie jednakowych warunków zewnętrznych i wszelkich ostrożności.

Wyniki są tego rodzaju, że nie pozwalają zorjentować się w kierunku reakcji. Obecność żelatyny niekiedy hamuje, niekiedy zaś przyspiesza reakcję rozpadu skrobi. Wyniki podaje w tabeli VI.

Tabela VI.

Wpływ stężenia żelatyny na prędkość reakcji.

*Influence de la gélatine sur l'action d'amylase.*

Stężenie żelatyny <i>Concentration de la gélatine</i> %	Maltoza w roztworze badanym <i>Maltose trouvée dans la solution étudiée</i> mg	Maltoza w kontroli <i>Maltose chez le témoin sans gélatine</i> mg	Hamowania <i>Ralentissements</i> %
2	57	60	5.0
	58	60	3.5
3	58	57	— 1.8
	57	61	6.4
4	58	60	3.5
	61	61	0.0
5	62	65	4.6
	84	83	— 1.2
6	55; 81	58; 80	5.1
	22; 49	36; 49	— 1.2
			3.9 0.0
7	43; 62	47; 49	6.4
	75; 59	80; 49	— 26.0
			6.2 — 20.4
8	47; 54	55; 34	14.5
	36; 37		2.9
			— 59.0

Pipetowanie żelatyny, zwłaszcza o wysokim stężeniu, sprawia wiele trudności, niekiedy żelatyna krzepła w pipecie, i wobec długiego czasu wpływu utrudnione było jednoczesne hamowanie we wszystkich układach. Zamiast więc żelatynę pipetować do roztworu skrobi, przygotowałam dokładnie 5 cm<sup>3</sup> roztworu żelatyny o odpowiednim stężeniu, do roztworu wprowadzałam skrobię, podgrzewałam, wstawiałam do termostatu i po wyrównaniu temperatury wprowadzałam amylazę.

W tym przypadku otrzymałam przyspieszenie reakcji przez żelatynę. Wyniki są niezgodne, odbiegające bardzo od siebie. Wyniki podaje tabela VII.

B. Oznaczanie skrobi pozostałej w układzie po reakcji.



Tabela VII.

Wpływ stężenia żelatyny na prędkość reakcji.  
*Influence de la gélatine sur l'action d'amylase.*

Stężenie żelatyny <i>Concentration de la gélatine</i>	Maltoza w roz- tworze badanym <i>Maltose dans la solution étudiée</i>	Maltoza w kontroli <i>Maltose chez le témoin sans gélatine</i>	Przyspieszenie <i>Accélérations</i>
%	mg	mg	%
5	62	49	26.5
	52	39	31.8
	59	44	33.3
	51	42	21.4
6	53	54	-1.9
	53	49	9.0
	49	45	8.0
	49	37	30.8
7	54	42	28.5
	48	42	30.0
	28	21	14.2
	39	27	44.0
8	54	34	6.0
	45	41	8.0
	13	12	9.7
	45	28	6.5
9	49	47	4.2
	36	38	-5.2
	4	2	100.0
	28	21	30.0

Zamiast oznaczać powstały z rozpadu skrobi cukier, oznaczałam ilość pozostającej w układzie skrobi według metody glikogenowej PFLÜGERA. Przy stosowaniu tej metody staje się zbyt dużą osobną kontrolą dla każdego stężenia żelatyny, wystarczy jedna dla całego szeregu stężeń, gdyż w tym przypadku wiązanie cukru przez żelatynę nie odgrywa już roli.

Żelatynę wprowadzałam w kawałkach. Układy zawierają 10 cm<sup>3</sup> skrobi, 5 cm<sup>3</sup> żelatyny i 1 cm<sup>3</sup> 0.1% amylazy.

Ja widzimy z tabeli VIII i IX, w roztworach żelatyny poniżej 4% nie mamy wpływu żelatyny na prędkość reakcji, powyżej zaznacza się hamujące działanie żelatyny. W 0.5% roztworze skrobi hamowanie jest większe, niż w 1%.

### III. Dyfuzja skrobi poprzez gel.

W badaniu zjawiska dyfuzji poprzez gel dużą rolę odgrywają zjawisko zwilżania (likworyzacji) i spulchniania powierzchni zetknięcia. Aby możliwie uwolnić się od tych wpływów, doświadczenie prowadziliśmy

Tabela VIII.

Wpływ stężenia żelatyny na prędkość reakcji 1% skrobi.

*Influence de la gélatine sur l'action d'amylase dans une solution d'amidon à 1%.*

Stężenie żelatyny <i>Concentration de la gélatine</i> %	Ilość rozłożonej skrobi w roztw. badanym <i>Amidon dégradé</i> mg	Ilość rozłożonej skrobi w kontroli <i>Amidon dégradé chez le témoin sans gélatine</i> mg	Hamowanie <i>Ralentissements</i> %
1	85. 83. 81. 83. 87. 88. 87. 90.		0.0 1.1 0.0 2.3 3.0 2.0 2.0 0.0
2	84. 79. 81. 81. 88. 89. 91. 90.		1.2 4.8 0.2 5.0 2.0 1.0 1.0 0.0
3	84. 83. 83. 90. 90. 88. 90. 90.	85. 84. 81. 85. 90. 88. 89. 90.	1.2 1.1 0.0 5.0 2.0 0.0 1.0 0.0
4	81. 76. 63. 81. 88. 88. 89. 90.		4.8 9.0 22.0 6.0 2.0 0.0 1.0 0.0
5	78. 84. 45. 58. 89. 88. 85. 86.		9.0 1.1 45.0 27.0 10.0 0.0 4.0 4.4
6	72. 68. 79. 79.		5.2 10.5 10.2 10.2
7	72. 73. 78. 78.		18.0 17.0 5.0 5.0
8	73. 73. 75. 76. 79. 79.	76. 76. 88. 82. 82.	17.0 17.0 8.0 7.0 3.6 3.6
9	76. 76. 79. 78.		14.0 14.0 2.0 5.0
10	69. 72. 76. 76.		8.0 18.0 7.0 7.0

w próbkach o średnicy 1 cm w temperaturze 20° C. (próbki umieszczalam w lodowce).

W próbki mamy 15 cm<sup>3</sup> roztworu żelatyny (6, 8%) i 10 cm<sup>3</sup> 1% skrobi. Wstawiamy do lodówki na 12 godz. dla wytworzenia się gelu. Po 12 godz. do wszystkich probówek wprowadzamy 15 cm<sup>3</sup> wody. Po upływie 2, 4, 6 i 12 godz. zlewamy wodę i oznaczamy skrobię, która przez ten czas przedyfundowała (oznaczenie metodą PFLÜGERA).

Okazało się, że w tych warunkach dyfuzja skrobi zupełnie nie zachodzi.

#### IV. Dyfuzja amylazy poprzez gel.

Doświadczenie jest prowadzone w tych samych warunkach, jak poprzednie. W próbkach znajduje się 15 cm<sup>3</sup> roztworu żelatyny (6 i 8%) i 15 cm<sup>3</sup> 0.2% amylazy. Układ pozostawialiśmy na 12 godz. do żelowania. Po 12 godz. wprowadzaliśmy 10 cm<sup>3</sup> wody do każdej próbki. Po upływie 4, 8 i 12 godz. zlewano wodę ostrożnie do erlenmayerek, w których znajduje się 10 cm<sup>3</sup> 1% skrobi i 5 cm<sup>3</sup> fosforanów. Amylaza, która przedyfundowała do wody,

Tabela IX.

Wpływ stężenia żelatyny na działanie amylazy w 0.5% roztworze skrobi.

*Influence de la gélatine sur l'action d'amylase dans une solution d'amidon à 0.5%*

Stężenie żelatyny <i>Concentration de la gélatine</i>	Ilość rozłożonej skrobi w roztw. badanym <i>Amidon dégradé</i>	Ilość rozłożonej skrobi w kontr. <i>Amidon dégradés dans le système sans gélatine</i>	Hamowanie <i>Ralentissements</i>
%	mg	mg	%
1	38		0.0
	37		
	38		
2	39		2.6
	38		
	39		
3	37		0.0
	38		
	38		
4	37	38	0.0
	37	38	
	37	37	
5	30		20.0
	31		
	30		
7	30		22.0
	29		
	29		
9	23		36.0
	24		
	25		

rozkładu skrobię, z % rozpadu obliczymy w przybliżeniu stężenie amylazy. Erlenmajerki umieszczaliśmy w termostacie ( $t = 30^{\circ} \text{C}$ ) na godzinę.

Otrzymane ilości maltozy są tak małe (tab. X), że możemy przyjąć, że dyfuzja amylazy poprzez gel nie zachodzi.

#### V. Wpływ zamknięcia skrobi przez żelatynę na prędkość reakcji.

Do kolbek Erlenmeyera na  $100 \text{ cm}^3$  wprowadzałam  $10 \text{ cm}^3$  1% skrobi  $15 \text{ cm}^3$  3% żelatyny, do drugich  $10 \text{ cm}^3$  wody,  $15 \text{ cm}^3$  3% żelatyny. Układy te pozostawiałam do żelowania (żelowanie odbywało się w temperaturze  $16^{\circ} \text{C}$ ). Roztwory miały żelować 24 g, 8 g i 2 godziny. Wszystkie roztwory były jednocześnie przygotowane. Aby więc nie dopuścić do żelowania, w chwili, gdy pierwsze kolbki odstawałam do żelowania, pozostałe umieszczałam w termostacie powietrznym  $t = 30^{\circ} \text{C}$ . W odpowiednim czasie wyjmowałam je z termostatu i odstawałam do żelowania. Po upływie 24 godz. od chwili wstawienia pierwszej porcji do żelowania, do kolbek, w których żelowanie odbywało się bez skrobi, dodawałam  $10 \text{ cm}^3$  1% skrobi, do pozostałych zaś  $10 \text{ cm}^3$  wody. Układy te pozostawiałam w temperaturze pokojowej na godzinę. Po godzinie dodawałam do każdej kolbki  $1 \text{ cm}^3$  0.1% amylazy. Przytem jedne układy były wymieszane przecięciem szklanym

Tabela X.

Dyfuzyja amylazy poprzez gel.  
*Diffusion d'amylase à travers la gelée.*

Czas dyfuzji w godz. <i>Durée de diffusion heures</i>	Stężenie żelatyny <i>Concentration de la gélatine</i>	
	%	
	3	4
	Maltozy — Maltoses mg	
4	2.9	2.9
	2.8	2.4
	2.6	2.8
8	2.7	2.5
	2.8	2.4
	2.9	2.8
12	2.4	2.4
	2.5	2.5

przed dodaniem amylazy, do drugich wprowadzałam amylazę bez uprzedniego wymieszania. Reakcja zachodziła w 16° C i trwała 1 godz. Powierzchnia dna wynosiła 19.6 cm<sup>2</sup>, grubość warstwy 1.4 cm.

Wyniki są podane na tabeli XI. Skrobia uległa zamknięciu, żelatyna zamyka dostęp amylazy do skrobi i prędkość reakcji ulega znacznemu zmniejszeniu (średnio około 70%).

Tabela XI.

Wpływ zamknięcia skrobi na prędkość reakcji.  
*Influence de l'occlusion de l'amidon.*

Czas zelowania w godzinach <i>Durée de gélification. Heures</i>	Roztwory żelowały bez skrobi <i>Amidon ajouté après la formation de la gelée</i>			Roztwory żelowały ze skrobią <i>Gélification avec amidon</i>			Roztwory żelowały bez skrobi <i>Amidon ajouté après la formation de la gelée</i>			Roztwory żelowały ze skrobią <i>Gélification avec amidon</i>		
	Niez mieszane przed dodaniem amylazy <i>Non secoués</i>						Zmieszane przed dodaniem amylazy <i>Secoués</i>					
	Maltoza <i>Maltose</i> mg	Średnia <i>Mo-yenne</i>	Maltoza <i>Maltose</i> mg	Średnia <i>Mo-yenne</i>	Hamowanie <i>Ralen-tissem.</i> %	Maltoza <i>Maltose</i> mg	Średnia <i>Mo-yenne</i>	Maltoza <i>Maltose</i> mg	Średnia <i>Mo-yenne</i>	Hamowanie <i>Ralen-tissem.</i> %		
24	28.0	26.6	8.1	4.9	81.2	25	26.3	8.1	15.4	45.2		
	25.0		4.0			26		23.0				
	27.0		2.8			28		15.0				
8	30	28	8.1	4.3	84.6	26	28.3	18.0	15.6	44.8		
	26		3.0			34		11.0				
	28		1.8			25		18.0				
2	23	25	9.0	1.2	52	23	29.3	21.0	17.3	40.9		
	25		18.0			37		33.0				
	27		9.0			28		8.0				
1	21	25.3	11.0	7.2	71	30	28	21.0	19.6	30.0		
	27		3.5			26		33.0				
	28					28		5.0				

## VI. Wpływ zamknięcia amylazy przez żelatynę na prędkość reakcji.

Do kolbek na 100 cm<sup>3</sup> wprowadzałam 15 cm<sup>3</sup> 3% żelatyny i 1 cm<sup>3</sup> 0.1% amylazy. Pozostawiałam na 24 godz. do żelowania ( $t = 16^{\circ} \text{C}$ ). Po 24 godz. dodawałam do każdej kolbki 10 cm<sup>3</sup> 1% skrobi w ten sposób, że w jednych kolbkach rozrywałam żel przez dokładne zmieszanie przeciekiem szklanym, w drugich nie mieszałam wcale. Reakcja zachodziła 1½ godz.

Wyniki podane na tabeli XII. Żelatyna unieruchamia amylazę. Reakcja uległa całkowitemu zahamowaniu.

### Tabela XII.

Wpływ zamknięcia amylazy na prędkość reakcji.  
*Influence de l'occlusion d'amylase sur la vitesse de la réaction.*

Kontrola <i>Témoin</i>	Zmieszane przed dodaniem skrobi <i>Secoué avant l'ad- dition d'amidon</i>	Niezmieszane przed dodaniem skrobi <i>Non secoué avant l'addition d'amidon</i>
Maltoza <i>Maltose</i> mg	Maltoza <i>Maltose</i> mg	Maltoza <i>Maltose</i> mg
46	7.6	0.0
46	7.5	0.0
46	7.6	0.0

## VII. Wpływ jednoczesnego zamknięcia skrobi i amylazy na prędkość reakcji.

Do kolbek wprowadzałam 10 cm<sup>3</sup> 1% skrobi, 15 cm<sup>3</sup> (0.5 i 5%) żelatyny i 1 cm<sup>3</sup> 0.1% amylazy. Kolbki wstawiałam do naczyń z lodem. Po 5-ciu minutach wytworzyła się w całej masie galareta (dla skrótów używam w całej pracy wyrazu gel zamiast galarety). Po wytworzeniu gelu umieszczałam kolbki w wodzie o  $t = 16^{\circ} \text{C}$ . Reakcja trwała 4 godz.

Jak wynika z tabeli XIII, reakcja w układzie takim zachodzi ze znaczną prędkością.

Chodziłoby teraz o stwierdzenie, czy nie mamy w tym przypadku do czynienia z wielką prędkością początkową. Dlatego też oznaczałam cukier w układach takich natychmiast po wytworzeniu się gelu.

Okazuje się, że w tych układach reakcja zachodzi i to ze znaczną prędkością.

Hamowanie wynosi około 13.0%.

Tabela XIII.

Wpływ zamknięcia obu składników na prędkość reakcji.  
*Le système subit la gélification après l'addition de l'amidon et de l'amylose.*

(a)			(b)				
Stężenie żelatyny <i>Concentration de la gélatine</i> %	Czas reakcji w godz. <i>Durée de la réaction. Heures</i>	Maltoza <i>Maltose</i> mg	Stężenie żelatyny <i>Concentration de la gélatine</i> %	t = 10'	t 2½ godz.		
				Maltoza <i>Maltose</i> mg	Maltoza <i>Maltose</i> mg		
0.5	4	53	5	1.8	40		
		54					
		53					
		54					
5	4	46				1.8	40
		45				1.8	40
		49				1.9	39
		46				1.8	40

## VIII. Wpływ gelu na prędkość reakcji.

Z poprzednich tabel wynika, że dla przebiegu reakcji najważniejszym jest, czy układ znajduje się w stanie solu, czy gelu. Następne pytanie, jakie postawiłam sobie, było następujące: jak przedstawia się kinetyka reakcji, jeżeli mechanicznie zniszczymy gel, albo też przez wprowadzenie alkoholu utrudnimy żelowanie.

## A. Wpływ trzęsienia.

10 cm<sup>3</sup> 1% skrobi 15 cm<sup>3</sup> 2% żelatyny umieszczałam w erlenmajerce na 100 cm<sup>3</sup>. Pozostawiałam na 20 godz. do żelowania. Po 20 godz. 2 erlenmajerki umieszczałam na trzęsawce (trzęsawka poruszana turbiną wodną, ilość obrotów wynosiła 60 na minutę). Trzęsienie trwało 3½ godz. Do prób trzęsionych i nietrzęsionych dodawałam 1 cm<sup>3</sup> 0.1% amylazy, umieszczałam na trzęsawce na 1 godzinę, jednocześnie dodawałam amylazę do układów, które nie zawierają żelatyny.

Miałam następujące układy:

- I amylaza skrobia żelatyna — trzęsione przed dodaniem amylazy  
 II " " " — " po podaniu "  
 III " " " — nietrzęsione wcale  
 IV amylaza + skrobia + bufory

W układach tych wytwarzałam gel, a następnie rozbijałam go przez trzęsienie. W następnym doświadczeniu przez trzęsienie nie dopuszczałam do żelowania układu.

Roztwory, które nie żelowały przed trzęsieniem:

skrobia + żelatyna — trzęsione  
 " " — nietrzęsione  
 skrobia + bufory — trzęsione  
 " " — nietrzęsione.

Po 2-godzinnym trzęsieniu umieszczalam wszystkie erlenmajerki na 20 godz. w termostacie. Następnie dodałam 1 cm<sup>3</sup> 0.1% amylazy do każdej z nich.

Reakcja trwała godzinę.

Wyniki są zebrane w tabeli XIV.

Tabela XIV.

Wpływ trzęsienia.

*Influence d'agents mécaniques.*

(a)

Roztwory żelowały przed trzęsieniem  
*Le système recevait la gélatine avant d'être secoué*

Z żelatyną <i>Avec la gélatine</i>						Bez żelatyny <i>Sans gélatine</i>			
I		II		III		IV		V	
mg	średn.	mg	średn.	mg	średn.	mg	średn.	mg	średn.
14		19		0.0					
13		12		0.0					
22	19.3	20	19	0.0	0.0	20	24	20	24
22		21		0.0		26		26	
22		20		0.0		26		26	
22		20		0.0					
22		20		0.0					

(b)

Roztwory nie żelowały przed trzęsieniem  
*Solutions sans gélification avant d'être secoué*

Z żelatyną <i>Avec gélatine</i>				Bez żelatyny <i>Sans gélatine</i>			
Trzęsione IV		Nietrzęsione V		Trzęsione IV		Nietrzęsione V	
mg	średn.	mg	średn.	mg	średn.	mg	średn.
43		48		44		47	
46		45		47		46	
48	46.8	46	46	43	44	46	46.3
48		46		42		46	
48		45		43		46	
48		46		44		47	

- I. Trzęsione przed dodaniem amylazy  
*Sécouées avant l'addition d'amylase*
- II. Trzęsione po dodaniu amylazy  
*Sécouées après l'addition d'amylase*
- V. Nietrzęsione  
*Non sécouées*
- III. Nietrzęsione wcale  
*Non sécouées*
- IV. Trzęsione  
*Sécouées*

B. Opóźniające działanie alkoholu etylowego na szybkość gelowania i zmiany prędkości reakcji, pozostające w związku z tem.

Prowadzimy reakcję w następujących układach:

10 cm<sup>3</sup> 1% skrobi, 5 cm<sup>3</sup> 9% żel., 4 cm<sup>3</sup> wody

10 cm<sup>3</sup> 1% „ 5 cm<sup>3</sup> 9% „ , 4 cm<sup>3</sup> 96% alk. et.

10 cm<sup>3</sup> 1% „ 5 cm<sup>3</sup> fosforanów, 4 cm<sup>3</sup> wody

10 cm<sup>3</sup> 1% „ 5 cm<sup>3</sup> „ , 4 cm<sup>3</sup> alk. et.

Do układów tych dodajemy po 1 cm<sup>3</sup> 0.1% amylazy.

Reakcja zachodzi w temperaturze pokojowej ( $t = 17^{\circ} \text{C}$ ) i w termostacie ( $t = 30^{\circ} \text{C}$ ). Przez dodanie alkoholu opóźniamy w bardzo dużym stopniu gelowanie roztworu, a więc w roztworach, zawierających alkohol, amylaza zostaje wprowadzona, wtedy, gdy układ znajduje się jeszcze w stanie sol.

Widzimy z tabeli XV, że alkohol, pomimo hamującego działania na amylazę, przyspiesza szybkość reakcji, przebiegających w temp.  $17^{\circ} \text{C}$ . w układach, zawierających żelatynę; w układach zaś, w których agregacja zachodzi w  $30^{\circ} \text{C}$ , nie obserwujemy przyspieszającego działania alkoholu.

Tabela XV.

Działanie alkoholu etylowego.  
*Action de l'alcool éthylique.*

$t = 17^{\circ} \text{C}$							
Am + S + F		Am + S + F + A		Am + S + Z		Am + S + Z + A	
mg	Średn. Moy.	mg	Średn. Moy.	mg	Średn. Moy.	mg	Średn. Moy.
57		45		5.0		44	
61		41		5.3		49	
56		45		5.0		40	
62	59.7	41	42.7	5.0	5.3	38	40.2
57		42		5.0		38	
60		46		5.0		37	
56		42		6.7		37	
68		40		5.0		39	
				5.3			
$t = 30^{\circ} \text{C}$							
44		31		45		34	
44		32		46		32	
44		31		45		34	
45	44	31	31.4	46	44.9	33	32.6
44		32		44		32	
43		31		43		31	
43		31		46		34	
45		32		44		31	

Am — amylaza, S — skrobia, F — fosforany, A — alk. et., Z — żelatyna.

Am — amylase, S — amidon, F — phosphates, A — alcool éthylique, Z — gélatine.



## B. Układy: ureaza — mocznik — żelatyna.

Rozpad mocznika pod wpływem ureazy w środowisku żelatynowym. Mocznik: preparat K. Wendy. Stosowałam roztwór 1%.

Ureaza: preparat amerykański w tabletkach — Squibba. 1 tabletka waży 0.1 g. Rozpuszczałam w wodzie na zimno i roztwór niesączoney wprowadzałam do układu.

Bufory: jako bufory stosowałam mieszaninę fosforanów.

Amonjak, powstały z rozpadu mocznika, oznaczałam metodą FOLINA.

### I. Wpływ stężenia żelatyny na prędkość rozpadu mocznika pod wpływem ureazy.

Układy badane zawierają 10 cm<sup>3</sup> 1% mocznika, 5 cm<sup>3</sup> fosforanów (pH wynosi 5.9) i 5 cm<sup>3</sup> żelatyny o odpowiednim stężeniu. Roztwory znajdowały się w kolbkach Erlenmajera na 100 cm<sup>3</sup>. Dodawałam 1 cm<sup>3</sup> 0.1% ureazy. Reakcja trwała godzinę w temperaturze 30° C.

Pomimo dużego stężenia (od 1 do 8%) żelatyny prędkość reakcji nie zmienia się. Wyniki zebrane są w tabeli XVI.

### II. Dyfuzja mocznika poprzez gel.

15 cm<sup>3</sup> 1% mocznika umieszczałam w probówkach o średnicy 1 cm<sup>3</sup>. Pozostawiałam na 12 godz. do żelowania w lodówce. Po 12 godz. do każdej próbki wlewałam 20 cm<sup>3</sup> wody. Po 4, 8 i 12 godz. zlewałam ostrożnie wodę do erlenmajerek, dodawałam 2 cm<sup>3</sup> 0.1% ureazy i 5 cm<sup>3</sup> fosforanów, wstawiałam na jedną godz. do termostatu, następnie oznaczałam wydzielony amonjak i z tego obliczałam ilość mocznika, która przedyfundowała.

Okazuje się (tab. XVII), że prędkość dyfuzji mocznika przez gel jest znacznie mniejsza, niż w roztworze, znajdującym się w stanie solu.

## W n i o s k i.

### I. Zmiana własności redukcyjnych cukru wywołana obecnością żelatyny.

Jak wynika z tabeli I, II i III, zmiana cukru przez żelatynę jest bardzo duża. Ilość cukru nie zależy ani od czasu zetknięcia żelatyny z cukrem, ani od temperatury, w jakiej zachodzi to zetknięcie, natomiast zależy zarówno od stężenia cukru (maltozy, glukozy) w roztworze, jak też od stężenia żelatyny. Krzywa, podająca zależność związanego cukru od stężenia żelatyny, odbiega kształtem od izotermy adsorpcji.

Tabela XVI.

Wpływ stężenia żelatyny na prędkość rozpadu mocznika.  
*L'action de la gélatine sur la dégradation de l'urée par l'uréase.*

Stężenie żelatyny <i>Concentration de la gélatine</i>	Rozpad w roztworze badanym <i>Dégradation dans la solution étudiée</i>		Rozpad w kontroli <i>Dégradation chez le témoin</i>		Przyspieszenie <i>Accelerations</i>
	%		%		
	<i>g/g</i>	Średnia <i>Moyenne</i>	<i>g/g</i>	Średnia <i>Moyenne</i>	
1	65.2	66.7	64.0	63.0	5
	67.4				
	67.1				
	67.3				
2	68.1	68.2	62.3	63.0	8
	68.4				
	68.2				
	68.0				
3	65.2	65.2	62.0	62.0	5
	65.2				
	65.2				
	65.2				
4	68.4	68.4	62.0	62.0	10
	68.1				
	68.4				
	68.4				
5	67.4	66.6	62.2	65.4	2
	67.4				
	65.9				
	65.9				
6	67.1	66.9	65.1	65.2	3
	67.4				
	66.2				
	67.1				
7	68.1	68.1	65.2	66.2	2.8
	67.0				
	69.3				
	68.1				
8	69.7	68.7	67.2	67.2	3.8
	69.7				
	67.4				
	68.1				

Reakcja w kontroli była stale o 3 minuty później hamowana.

Zjawisko w zależności od stężenia cukru w roztworze nie przebiega w sposób prawidłowy, mamy tu pewne skoki, wzrost i spadek w zależności od stężenia. Charakter zmiany cukru przez żelatynę próbowaliśmy określić przy pomocy ultrasonu roztworów, zawierających żelatynę i bez żelatyny (wyniki zebrane w tab. V). Stężenie cukru w przesączu zarówno roztworów żelatynowych, jak i niezawierających żelatyny jest

## Tabela XVII.

Dyfuzja mocznika poprzez gel.  
*Diffusion de l'urée à travers la gelée.*

Czas dyfuzji w godzinach <i>Temps de la diffusion. Heures.</i>	Stężenie żelatyny w roztworze <i>Concentration de la gélatine</i>					
	3 ‰			4 ‰		
	Amonj. <i>NH<sub>3</sub></i> mg	Moczn. <i>Urée</i> mg	Średnia <i>Moyenne</i>	Amonj. <i>NH<sub>3</sub></i> mg	Moczn. <i>Urée</i> mg	Średnia <i>Moyenne</i>
4	3.15	5.5	5.7	3.33	5.5	5.7
	3.33	5.8		3.15	5.8	
	3.15	5.5		3.33	5.5	
	3.33	5.8		3.15	5.8	
	3.33	5.8		3.33	5.5	
	4.24	7.4		4.05	7.1	
8	4.59	8.1	7.8	4.23	7.4	7.5
	4.24	7.4		4.42	7.8	
	4.42	7.8		4.05	7.1	
	4.59	8.1		4.24	7.4	
	4.59	8.1		4.59	8.1	
	4.05	8.7		5.13	9.0	
12	5.13	9.0	8.6	5.13	9.0	8.9
	5.13	9.0		5.13	9.0	
	4.77	8.4		4.77	8.4	
	4.77	8.4		5.13	9.0	
	4.77	8.4		5.13	9.0	
	4.77	8.4		5.13	9.0	

w jednym i drugim przypadku takie same. Widzimy więc, że rozcieńczenie roztworu nie nastąpiło.

Z tabeli IV wynika, że żelatyna nie wiąże tlenu miedziowego, o tem świadczy również fakt, że dla różnych cukrów otrzymujemy różne liczby, oznaczające ilości związane.

Na podstawie powyższych danych trudno nam wytłumaczyć istotę wiązania cukru przez żelatynę. Bardzo możliwe, że mamy tu do czynienia z pewnego rodzaju zmniejszeniem siły redukcyjnej pewnych grup pod wpływem działania żelatyny.

## II. Wpływ lepkości na przebieg reakcji.

Badając prędkość reakcji w układach o różnym stężeniu żelatyny, można było stwierdzić, czy i w jakim stopniu lepkość środowiska wpływa na przebieg reakcji.

Zgodnie z rozważaniami, podanymi we wstępie, lepkość zmniejsza ruch BROWNA i wpływa na prędkość wzajemnego zbliżania się enzymu i substratu, wolnych oraz zasorbowanych. Czyn-

nik ten wywiera wielki wpływ na przebieg reakcji, gdyż warunkuje on zetknięcie lub graniczne zbliżenie enzymu i substratu, jakie jest konieczne, aby reakcja zaszła. Wiemy również tem samem, że prędkość reakcji w układach niejednorodnych zależy w dużym stopniu od łatwości dyfundowania cząsteczek poprzez środowisko, dyfuzja zaś zależy bardzo od lepkości środowiska, jak to wynika wprost ze wzoru EINSTEINA

$$\text{i SMOLUCHOWSKIEGO } D = \frac{RT}{6\pi r\eta N}.$$

Wobec powyższego nawet nieznaczny wzrost lepkości powinienby wpłynąć na zmniejszenie szybkości reakcji. Jednak wyniki doświadczeń przeczą do pewnego stopnia temu. Z danych zawartych w tabeli VIII i IX wynika, że pomimo znacznego wzrostu lepkości, jaki obserwujemy już w układach, zawierających żelatynę w stężeniu od 1 do 4% w temp. 30° C, nie otrzymujemy zarówno dla skrobi 1%, jak i 0.5%, zmiany prędkości reakcji. Dopiero w 5% stężeniu żelatyny następuje pewne zmniejszenie szybkości rozpadu. Dla 1% skrobi wielkość hamowania jest prawie ta sama pomimo ciągłego wzrostu lepkości. Jeżeli zważymy, że reakcja przebiega w temperaturze 30° C i że w tych warunkach przy powyższych stężeniach lepkość układu jest bardzo wielka, tak że dla 9 i 10% stężeń żelatyny układ przechodzi w stan półpłynny, to o ileby lepkość była czynnikiem hamującym reakcję, zmniejszenie szybkości reakcji powinnyby stale wzrastać wraz ze wzrostem lepkości, i w tych warunkach powinniśmy otrzymać znacznie mniejszy stopień rozpadu. Roztwory 0.5% skrobi aż do stężeń, nie przekraczających 4%, zachowują się tak samo, jak 1% skrobi; po przekroczeniu tych stężeń szybkość reakcji zmniejsza się i to stale wraz ze wzrostem lepkości. Zwiększenie hamowania wraz ze zmniejszeniem stężenia skrobi świadczy o tem, że dyfuzja wpływa na przebieg reakcji. Cząsteczki skrobi, które w tym przypadku są rozmieszczone w większych odległościach od siebie, mają do przebycia większe drogi, opór środowiska jest ten sam, dlatego też w pewnej chwili może zabraknąć skrobi w pobliżu amylazy.

Wpływ lepkości na przebieg rozpadu mocznika pod wpływem ureazy nie przejawia się wcale. Prędkość reakcji przy przejściu od układów 1% stężenia żelatyny aż do 8%, pomimo tak znacznego wzrostu lepkości, nie ulega zmianie.

Widzimy więc (tabela VIII, IX i XVI), że w przypadku

skrobi mamy pewien, nieznaczny stosunkowo, wpływ lepkości na prędkość reakcji, w przypadku zaś mocznika lepkość nie wpływa na prędkość reakcji.

Powyższy przebieg reakcji świadczy o silnym działaniu atrakcyjnym amylazy.

Fakt, że prędkość rozpadu skrobi ulega zmniejszeniu w 5% stężeniu żelatyny, pozostaje w pewnej sprzeczności z tem, że w układach, które przeprowadzamy ze stanu sol w stan gel, gdzie mamy do czynienia z całkowitem unieruchomieniem układu, reakcja zachodzi prawie z tą samą prędkością, jak w środowisku bezżelatynowym. Jednak stężenie żelatyny w układach, znajdujących się w stanie gel, w naszych warunkach doświadczenia, było niewielkie — około 1%. Taki przebieg reakcji da się wytłumaczyć do pewnego stopnia stężeniami cząstkowymi skrobi i amylazy w układzie. O tem będzie mowa poniżej.

### III. Unieruchomianie składników.

W układach, mających na celu stwierdzenie roli zamknięcia, unieruchomienia składników na przebieg reakcji, rozróżniamy następujące przypadki: 1) zamknięcie jednego składnika a) skrobi, b) amylazy, c) mocznika, 2) zamknięcie obu składników a) amylazy i b) skrobi.

Zamknięcie w tym przypadku przejawia się w stabilizacji układu w tym sensie, że dyfuzja ciał reagujących zostaje uniemożliwiona bądź całkowicie, bądź w znacznym stopniu. Z doświadczenia na str. 156 wynika, że po wytworzeniu gelu w układzie, gdzie geluje mieszanina żelatyny i skrobi, skrobia zostaje unieruchomiona, dyfuzja jest całkowicie uniemożliwiona. O ile do układu, w którym przez gelowanie, wywołane przez zamknięcie skrobi w żelatynie, wprowadzimy amylazę, to reakcja w takim układzie będzie zależała od dwóch czynników: 1) od czasu gelowania 2) od tego, czy przed dodaniem amylazy wymieszamy gel, t. j. zwiększymy powierzchnię gelu, czy też nie. Z tabeli X wynika, że o ile wprowadzimy amylazę na powierzchnię gelu, nie mieszając go, dostęp amylazy do wnętrza jest uniemożliwiony. Działanie amylazy przejawia się do pewnego stopnia na powierzchni, przytem grubość warstwy działania amylazy zależy od stopnia zgalaretowania, gdyż jak widzimy, stopień rozpadu zmienia się w zależności od czasu żelowania.

O ile przed dodaniem amylazy gel wymieszamy, t. zn. rozrwiemy go, widzimy, że zahamowanie reakcji jest mniejsze. Tłumaczymy to tem, że amylaza zyskała dostęp i do głębszych warstw skrobi, oraz — że część skrobi została wyswobodzona przez peptyzację żelatyny. Jeżeli przez wytworzenie gelu zamkniemy amylazę i do takiego układu dodamy skrobi, to niezależnie od tego czy gel wymieszamy, czy też nie, reakcja ulegnie zupełnemu zahamowaniu. Widzimy więc, że amylaza uległa zupełnemu zamknięciu i że skrobia nie wykazuje zupełnie zdolności przenikania włąb gelu, względnie że amylaza uległa okluzji we właściwym sensie.

Dlatego też mamy w tym przypadku zupełne zahamowanie reakcji (tabela XII). Na przebieg reakcji w tych układach mogą wpływać zjawiska pęcznienia i peptyzacji.

O ile na warstwę gelu, zamykającego amylazę, nalejemy skrobi, to wskutek pęcznienia mogłaby ona przeniknąć głębiej, i o ileby zamknięcie amylazy nie było zupełne, reakcja mogłaby zajść. Wpływem peptyzacji tłumaczy się fakt, że w warstwie, znajdującej się nad bardzo starym gelem, reakcja zachodzi znacznie prędzej, aniżeli w gelu niezbyt dawno przygotowanym.

Jeżeli zbadamy szybkość dyfuzji mocznika poprzez gel, to możemy zauważyć, że pomimo wielkiej zdolności dyfundowania w roztworach, znajdujących się w stanie sol, zdolność dyfuzji poprzez gel zmniejsza się bardzo i wynosi zaledwie 10% poprzedniej wartości (tabela XVII).

Jak wynika z tab. XIV, prędkość reakcji ulega zmianie stosunkowo nieznacznej w przypadku jednoczesnego zamknięcia obu składników.

Taki przebieg reakcji możemy sobie wytłumaczyć małemi przestrzeniami między poszczególnymi składnikami, stosunkami stężeń cząsteczkowych skrobi i amylazy w układzie, oraz oddziaływaniem sił międzycząsteczkowych pomiędzy cząsteczkami skrobi i amylazy.

Układy badane zawierają 10 cm<sup>3</sup> 1% skrobi, 1 cm<sup>3</sup> 0.1% amylazy (preparatu) w 16 cm<sup>3</sup> łącznej objętości. Przyjmując ciężar cząsteczkowy amylazy równy 20.000 (ciężar ten podawany jest w granicach od 10 do 100 tysięcy), oraz, że w danym preparacie amylaza stanowi 1% proszku, otrzymamy, że w danym roztworze znajduje się  $2 \times 10^{16}$  cząsteczek amylazy (Liczba LOSCHMIDTA  $60.6 \times 10^{22}$ ). Z tych samych wyliczeń, o ile przy-

miemy ciężar cząsteczkowy skrobi za równy 20—40.000, wynika, że ilość cząsteczek skrobi w danej objętości wynosi  $10^{20}$ . Widzimy stąd, że na jedną cząsteczkę amylazy przypada  $\infty$  2500—5000 cząsteczek skrobi. W  $1 \text{ cm}^3$  mamy  $6.2 \times 10^{18}$  cząsteczek skrobi i  $2.5 \times 10^{-14}$  cząsteczek amylazy. O ile nie weźmiemy pod uwagę objętości cząsteczkowych skrobi i amylazy, otrzymamy, że odległość pomiędzy cząsteczkami skrobi wynosi  $5\mu\mu$ , zaś między cząsteczkami amylazy około  $100\mu\mu$ .

Fakt, że w układzie, w którym wytworzymy gel po uprzednim wymieszaniu skrobi i amylazy, prędkość ulega stosunkowo niewielkiemu zmniejszeniu, można tłumaczyć w rozmaity sposób.

1°. O ile przyjmiemy, że na cząsteczce amylazy uległa zasorbowaniu cała ilość skrobi, odpowiadająca jednej cząsteczce amylazy, to wtedy ta złożona cząsteczka amylaza + skrobia nie zależy od warunków, panujących w układzie i pomimo unieruchomienia układu i uniemożliwienia wędrówki z jednej przestrzeni do drugiej prędkość reakcji nie powinna ulec zmianie. Podobne wyjaśnienie zjawiska pozostaje w sprzeczności z założeniami MICHAELISA ('13) co do związku enzym-substrat i wartości otrzymane dla stałej  $K_M$  (stała dysocjacji związku enzym-substrat) przeczą podobnym założeniom.

2°. Inne wytłumaczenie przebiegu reakcji możemy podać, opierając się na istnieniu sił przyciągania pomiędzy cząsteczkami. Istota tych sił nie jest zbadana, jest ona, jeśli chodzi o koloidy, natury elektrostatycznej. Według ostatnich badań okazało się, że ich oddziaływanie nie jest tak bardzo ograniczone, siły te przejawiają działanie w odległości  $100 \mu\mu$  i więcej, a nie jak dawniej przypuszczano, że sfera ich działania równa się średnicy cząsteczki (HARDY '28).

Występowaniem sił międzycząsteczkowych na znacznej odległości mógł FREUNDLICH wytłumaczyć zjawisko tiksotropji.

Również dalsze badania tego zjawiska pozwoliły stwierdzić duży zasięg tych sił. Siły międzycząsteczkowe mogą przejawiać swoje działanie jeszcze na większych odległościach, jak to wynika z rozważań (SUTHERLANDA według HARDY'EGO '12) dla rozтворów. Cząsteczka rozpuszczona orjentuje cząsteczki rozpuszczalnika w swoim sąsiedztwie, te zaś znów orientują cząsteczki, leżące poza nimi, tak że w końcu pomimo małej siły przyciągania cząsteczki rozpuszczonej działanie jej przejawia się na znacznej odległości. HARDY na podstawie swoich badań doszedł

do wniosku, że nawet jeśli pomiędzy warstwą adsorbcyjną i resztą materiału istnieje określona warstwa graniczna, to warstwa ta nie jest ostateczną granicą siły przyciągania danej cząsteczki.

Jeśli przyjmiemy, że wokół cząsteczki koloidalnej wytwarza się pole przyciągania o dużym stosunkowo zasięgu, to wskutek oddziaływania tego pola, w danej przestrzeni następuje przestrzenne ugrupowanie miceli skrobi wokół tej cząstki. Sposób ułożenia może być różny: prosty lub skomplikowany, zależnie od budowy miceli, grupujących się wokół danej cząsteczki.

Jeżeli te dane zechcemy zastosować do naszego układu, to możemy sobie wyobrazić, że cząsteczka amylazy, wytwarza wokół siebie pole o dużej sferze działania. Wskutek tego pola następuje polaryzowanie się cząsteczek skrobi. Cząsteczki te układają się w pewien prawidłowy sposób, w najprostszym przypadku w postaci kół koncentrycznych, których środkiem jest amylaza. Cząsteczki skrobi, znajdujące się w pobliżu amylazy, polaryzują dalsze. Jako ostateczny rezultat otrzymujemy zagęszczenie skrobi w jednej przestrzeni. Skrobia, która w układzie niezawierającym amylazy jest rozrzucona w sposób równomierny, ale nieuporządkowany, ulega wskutek oddziaływania amylazy pewnemu ugrupowaniu i zagęszczeniu w pewnych przestrzeniach.

Tego rodzaju ugrupowanie cząsteczek skrobi wokół amylazy nastąpi w roztworze wodnym tych składników. Jeżeli rozpatrujemy układ, zawierający żelatynę, to ugrupowanie takie również nastąpi, różnica jednak będzie ta, że pomiędzy cząsteczki wnikną cząsteczki żelatyny, które je otoczą i w ten sposób dostęp skrobi do cząsteczek amylazy będzie utrudniony. Należałoby się zatem spodziewać, że w chwili, gdy w takim układzie wytworzymy gel, wędrówka skrobi do amylazy jest uniemożliwiona przez nieruchome, cieniutkie warstewki żelatyny [posiadające wymiary  $\mu\mu$ ]. Jednak dane doświadczenia przeczą temu, jak wynika z tab. XIV, a więc skrobia posiada możliwość przenikania przez rozsuwanie cząstek [i przez otwory powstające przez te warstewki], żelatyny i dlatego prędkość reakcji ulega nieznacznej zmianie.

Te stosunki możemy tłumaczyć tiksotropją (FREUNDLICH '28).

Cząsteczka amylazy posiada pewien potencjał w stosunku do roztworu.

Siły elektryczne oddziałują na sąsiadującą warstewkę żelatyny, która jako koloid jest otoczona podwójną warstwą elektryczną. Wskutek oddziaływania amylazy następują pewne prze-



sunięcia w podwójnej warstewce, a więc występują w tych warunkach siły mechaniczne, które mogą spowodować przejście gelu w sol, a więc tiksotropję. Warstewka żelatyny stawia więc mniejszy opór cząsteczkom skrobi, które teraz mogą przeniknąć do amylazy. Tego rodzaju działanie amylazy powtarza się, tak że coraz większe ilości skrobi przenikają w głąb. I dlatego też pomimo wytworzenia gelu reakcja w danym układzie zachodzi ze znaczną prędkością.

Taki przebieg reakcji świadczyłby o oddziaływaniu amylazy na dość znaczną odległość.

Istnieje jeszcze jedna możliwość. Układ nie jest całkowicie stabilizowany. W żelatynie zgalaretowaciałej istnieją między agregatami przestrzenie bardziej płynne. W nich niejako zagęszczone są głównie amylaza i skrobia. Jeśli w każdej przestrzeni znajduje się czynna amylaza, wtedy—przyjmując możliwość swobodnego dyfundowania wewnątrz przestrzeni skrobi—zachodzi możliwość reakcji, przebiegającej z dużą szybkością. Wyświetleniem powyższej sprawy zajmuje się p. BAUMGARTEN w Zakładzie Chemji Fizjologicznej.

#### IV. Kinetyka w związku z agregacją i tworzeniem się galaret.

Tworzenie się agregatów w wyniku ostatecznym powoduje unieruchomienie układu, w chwili powstania galarety stabilizacja jest zupełna w całym układzie. Jeżeli układy będziemy trzęśli jedne przed wytworzeniem gelu, drugie zaś już po wytworzeniu gelu, w jednym przypadku nie dopuszczamy do agregacji, w drugim powodujemy dezagregację, to w jednym i drugim przypadku nie zaobserwujemy zmniejszenia prędkości (tabela XII).

Przez dodanie alkoholu etylowego do układu żelatyna-skrobia-amylaza powodujemy opóźnienie agregacji. W tych warunkach następuje wymieszanie skrobi i amylazy i pomimo, że po pewnym czasie nastąpi gelowanie, reakcja nie ulegnie zahamowaniu.

Widzimy więc, że w przebiegu reakcyj odgrywa decydującą rolę umożliwienie przenikania enzymu i substratu z jednej przestrzeni do drugiej i że w przypadku wytworzenia się gelu grubość warstwy oraz jej spójność odgrywa poważną rolę.

Wyniki niniejszej pracy skłaniają nas do wniosku, że przynajmniej dla niektórych reakcyj enzymatycznych, szczególnie

gdy enzym i substrat są niezasorbowane, szybkość reakcji jest niezależna od lepkości układu. Jak jest w przypadkach układów, gdy enzym jest zasorbowany lub jest powierzchnią kontaktową, nie możemy nic dokładnie powiedzieć. Zagadnienie wymaga oddzielnych doświadczeń.

Czynniki, regulujące reakcje między enzymem i substratem wolnym, prowadzą się raczej do tworzenia agregatów, tworzących strukturę bądź porowatą, bądź w formie błon.

Agregaty dostatecznie zagęszczone, przechodząc w gel czy w stan galarety, zamykają w swem wnętrzu enzym lub substrat, unieruchamiając go.

W ten sposób unieruchomione składniki reakcji zachowują się bardzo rozmaicie zależnie od grubości warstwy zgalaretowaciałej. W przypadkach naszych odstępny 30  $\mu\mu$  nie są zaporą, reakcja przebiega z szybkością normalną.

Nie jesteśmy w stanie dziś określić grubości warstwy potrzebnej do zniesienia reakcji, zresztą wydaje nam się, że nie tylko grubość, lecz i stopień zgalaretowacenia układu decyduje o grubości galarety, potrzebnej do unieruchomienia składnika i zniesienia jego działania atrakcyjnego. Wynika to z działania dwu wzajemnie przeciwstawiających się sił: siły atrakcyjnej (siły powierzchniowe, elektrostatyczne) i mechanicznej (opór stawiany dyfuzji).

#### Streszczenie wyników.

1°. Żelatyna zmniejsza ilość cukru dającego się oznaczyć metodą BERTRANDA. Ilość ta nie zależy ani od temperatury, ani od czasu zetknięcia, zależy natomiast od stężenia żelatyny i cukru w roztworze. Charakteru wiązania nie udało mi się stwierdzić.

2°. Lepkość wpływa na prędkość reakcji rozpadu skrobi dopiero począwszy od pewnych stężeń (4%), pomimo dalszego wzrostu lepkości procent hamowania jest dla 1% ten sam, dla 0.5% natomiast wzrasta wraz ze wzrostem lepkości. Na prędkość rozpadu mocznika zmiana lepkości nie wpływa aż do 8% stężenia żelatyny.

3°. Skrobia i amylaza nie dyfundują przez gel, mocznik zaś dyfunduje, wprawdzie szybkość dyfuzji jest nieznaczna, wynosi 10% normalnej dyfuzji.

4°. Zamknięcie bądź skrobi bądź amylazy powoduje znaczne zahamowanie reakcji, przy jednoczesnym zamknięciu obu składników reakcja zachodzi ze znaczną prędkością.

5°. Trzęsienie przyspiesza reakcję w układach amylaza-skrobia-żelatyna.

6°. Alkohol etylowy hamuje reakcję w układach amylaza-skrobia; natomiast przyspiesza w układach amylaza-żelatyna, przytem działanie alkoholu jest zależne od temperatury, w jakiej zachodzi reakcja: w temp. 16° C mamy przyspieszenie reakcji, w temp. zaś 30° C przyspieszenie już nie występuje.

#### Piśmiennictwo.

**Freundlich H.**, 1928. Koll. Zs. **46** (289). **Hardy W. B.**, 1928. Koll. Zs. **46** (268). **Lesser E. J.**, 1913. Bioch. Zs. **55** (355). **Lesser E. J.**, 1919. Bioch. Zs. **102** (304). **Lesser E. J.**, 1923. Bioch. Zs. **140** (439). **Michaelis L. und M. Menthen**, 1913. Bioch. Zs. **49** (333). **Przyłęcki St. J.**, 1929. Bioch. Zs. **206** (60). **Przyłęcki St. J.**, 1930. Medycyna Doświadczalna i Społeczna. **9** (288). **Warburg O.**, 1928. Über die katalitische Wirkung der lebendigen Substanz. Berlin. **Willstätter, Waldschmidt, Leitz u. Memmen**, 1925. Hoppe-Seyler Zs. **125** (1).

[Zakład Biologii Ogólnej Uniwersytetu Wileńskiego]

Al. Wolański.

**Studja nad reakcją Manojłowa i niektórymi innymi reakcjami  
kolorymetrycznymi na płęć u ludzi, zwierząt i roślin<sup>1)</sup>.**

*Studies on the Manoiloff reaction and some other colorimetric  
sex-reactions in man, animals and plants.*

Rękopis nadestany w dniu 26. I. 1931 r.

The author applied: 1<sup>o</sup>, MANOILOFF'S reaction, adding to the extracts under examination 10 drops of 1% papayotin solution, 1 — 3 drops of alcoholic solution of Dahlia, 4 — 20 drops of 0.25% — 1% KMnO<sub>4</sub> solution, 1 — 3 drops of 40% HCl and 10 drops of 2% thiosinamine solution. By appropriate adjustment of the number of drops of each of the above reagents it was in every case found possible to decolorise the male substances, whilst at the same time the female substances remained colored (see colored plate). 2<sup>o</sup>, BIERNACKI'S reaction, which consists in adding 1 drop of BIERNACKI'S reagent to tissue extracts, prepared by extracting tissues with isotonic solution containing equal parts of NaOH and KOH. BIERNACKI'S reagent consists of a mixture of equal quantities of 1% methyl green, eosin and Dahlia solutions.

The experimental material used consisted of aqueous extracts of human blood clots and serum, of the sexual glands of herrings; of the liver, kidneys, and sexual glands of crucians; of the liver, kidneys, muscles, skin, heart-muscles and sexual glands of frogs; of the liver, brain and sexual glands of horned cattle, and of the plants specified below.

1<sup>o</sup>. Extracts from different animal organs give reactions of various intensity: thus among extracts from different organs of

---

<sup>1)</sup> Część osiągniętych wyników została zreferowana na Zjeździe Przyrodników i Lekarzy w Wilnie w roku 1929.

fish those of the sexual glands give the most distinct reaction; liver extracts give a somewhat weaker reaction, while extracts of other organs give a still weaker reaction. In the case of extracts of different organs of frogs and horned cattle the most distinct reaction are obtained with liver extracts, being often far more distinct than those of sexual glands extracts. This fact suggest that the agent responsible for Manoilloff's reaction probably accumulates in the liver. The reactions with extracts of the sexual organs of fishes and of frog livers proved exact in 100 p. cent of cases.

2°. On raising the concentration of certain extracts such as that of the sexual glands of fishes, the reaction is obtained in the absence of papayotin from MANOILLOFF'S reagent. Contrarily, using dilute extracts, dilution may be obtained at which no reaction takes place in the absence of papayotin, whereas it is possible in its presence. It follows that papayotin increases the sensitivity of the reaction.

3°. Keeping the quantities of reagents used for the reaction constant all degrees of intensity of coloration may be obtained with male and female extracts according to the concentration of the extract used in each test. For this reason the quantities and proportions of certain of the reagents taken, in particular of  $\text{KMnO}_4$ , must be varied in each test, according to the quantity and concentration of extract taken in each case.

4°. The factors to which the different coloration obtained in MANOILLOFF'S reaction according to sex are due, are to certain extent thermostable. MANOILLOFF'S reaction is given by extracts which have been boiled a short time, whilst after prolonged boiling sex differences can no longer be demonstrated. These factors are susceptible to the action of time, old extracts giving no reaction whatever; freezing and putrefaction, however, seem to influence them but little. It is not probable that the factors responsible for differences in coloration are proteins, as KJELDAHL'S method does not show any difference in the nitrogen content of extracts, giving a distinct MANOILLOFF'S reaction.

5°. In tests with human material, using extracts of blood clots or serum a correct determination of sex was obtained in 92% cases of the total number of 595 examined. The reactions with extracts of blood-clots were on the whole more distinct than

those of serums. A necessary condition for the reaction with blood-clot extracts is that the concentration of hemoglobin be the same in both male and female extracts, as hemoglobin distinctly influences the coloration obtained. This was accomplished using a Dubosq colorimeter and a SAHLI'S hemoglobinometer.

6°. If such quantities of male and female extracts be taken which give an equal coloration with the same quantity of reagents, and if the quantities taken be successively augmented in the proportion 1 — 2 — 3 — 6, then using a constant volume of reagents the same coloration was obtained using each time a disproportionate number of drops of extracts. The curve connecting the number of drops of male and female extracts giving equal coloration (fig. 1) using rectilinear coordinates, is not a straight, but a broken line, whence it may be concluded, that the factor responsible for Manoiloff's reaction is not the difference in concentration of one substance, but of two unknown substances.

The existence of these two factors is further supported by the following fact: if, using the same system of rectilinear coordinates, we plot on the horizontal axis the intensity of coloration of a standard solution, and on the vertical axis the number of drops of  $\text{KMnO}_4$  used in each test, the line joining the points of intersection of perpendiculars drawn from those points will give a curve, expressing the velocity of decolorisation in the given test (fig. 2). The standard consisted of the same reagents as those used in Manoiloff's reaction, only the quantities of  $\text{KMnO}_4$  being varied. If the points of intersection of perpendiculars traced from points corresponding to different intensities of coloration on the horizontal axis and from points on the vertical axis representing the same number of drops of  $\text{KMnO}_4$  as used in the standard, a curve is obtained, designated in the figure as the standard curve. If similar curves are drawn for extracts of the sexual glands of herrings, Nos, 2, 3 and 4, human serums No 5 and human blood-clots N. 6, the curves representing velocity of decoloration of male tests are on the whole parallel to the above mentioned standard curve, whilst the curves representing velocity of decoloration of female tests are not parallel. This confirms the above stated supposition that the reaction is due to two substances. On the basis of the well known principle that the

divergence of a line in a system of rectilinear coordinates is caused by a difference in the coefficients of the function under examination, it is concluded that the difference between male and female extracts is occasioned by difference in the concentrations of both substances. The divergence from the standard of the line representing female reaction increases with augmentation of quantity of extract taken for the reaction, as is shown by fig. 4 in which are represented male and female reactions with 3—6 drops of extracts of the sexual glands of herrings. If the amount of extract taken be augmented in successive tests by 1 drop, a regularly appearing divergence is observed (fig. 7) which can be explained by a regularly occurring disproportion between the number of drops of  $\text{KMnO}_4$  and of extract under investigation.

7°. Positive results were not obtained in the application of BIERNACKI'S reaction to different extracts. Using, however, a solution of methyl green, which enters into the composition of BIERNACKI'S reagent, and applying an appropriate alkalinity to each extract in every case, the author was in many cases able to determine sex correctly with the aid of this reagent alone.

8°. In tests with plants the reaction is given correctly, according to sex, by the birch and reed-grass flowers: birch flowers should, however, be dried before extraction. Investigations with birch extracts show that extracts of leaves give less intense coloration than do extracts of blossoms.

9°. Extracts of the upper and lower parts of the stalk of *Anthriscus silvestris* in bloom give different reactions. Those taken from the upper parts of the stalk give a somewhat darker coloration than do those from the lower parts. This is explained by the hypothesis that the substance characterising sex in plants in MANOILOFF'S reaction is formed in the leaves and is then conveyed to the blossoms. Thus extracts from higher parts would contain more of this substance, it having been conveyed from a greater number of leaves

10°. Extracts of different parts of the blossoms of *Anthriscus silvestris* show that those taken from the carpel give the darkest reactions, indicating that the substance characterizing sex accumulates in the carpels. Petals of male and female blossoms of *Melandryum album* show no difference whatever.

Wilno, November 1930.

## Explication of Plate I.

MANOILOFF'S reaction in its natural colours.

A and B ♂ and ♀ reaction from, the sexual glands of herring  
 C „ D ♂ „ ♀ „ „ extract of dried birch flowers  
 E „ F ♂ „ ♀ „ „ aqueous extracts of human blood-clots

(The plate was drawn from nature immediately on performance of reactions by Miss Eugenia Kowalska-draughtswomen of the Dept. of General Biology, University of Wilno).

Zadaniem niniejszej pracy, które pierwotnie sobie stawilem, było sprawdzenie reakcji MANOJŁOWA i ściślejsze poznanie jej istoty przez wypróbowanie na najróżnorodniejszym materiale i w rozmaitych warunkach doświadczalnych. W toku jednak doświadczeń wyłoniły się inne kwestje pokrewne oraz zaszła potrzeba przerobienia innych jeszcze reakcyj, na których opracowanie poświęciłem lata 1928—1930.

## I. Historia badań.

Jakkolwiek istnienie reakcji kolorymetrycznej MANOJŁOWA, mającej odmienny przebieg dla obu płci, zostało już ściśle ustalone i zdaje się nie ulegać wątpliwości, to jednak wciąż jeszcze panuje znaczna różnica zdań co do jej wartości w badaniach biologicznych. Gdy jedni, jak np. SOŁOWCOWA ('27), przypisują jej ogromne znaczenie sądząc, że dzięki niej zostały otwarte nowe drogi do poznania przyrody i została wykryta wspólna cecha, łącząca odrębne dotychczas światy roślinny i zwierzęcy a nawet mineralny, — szereg poniżej wymienionych autorów odmawia jej jakiegokolwiek głębszej wartości, twierdząc, że jest ona wyrazem tylko pewnych różnic ilościowych i właściwie nie jest wskaźnikiem płci. I choćby obydwą wyżej wyłuszczone mniemania miały okazać się zbyt krańcowymi, to jednak każdy z nich ma dużo racji. Jeżeli bowiem przyjmujemy, że reakcja jest wskaźnikiem tylko różnic ilościowych, to znaczy, że polega na rozmaitej ilości, nie zaś jakości substancyj, biorących udział w reakcji, to jednak pozostanie zadziwiający fakt, że różnice te są związane z tą



lub ową płcią jednakowo, choćby tylko w stosunku do świata roślinnego i zwierzęcego, gdyż doświadczenia z minerałami, których sam nie miałem możliwości przerabiać, tutaj pomijam.

Zkolei fakt skomplikowanego przebiegu reakcji i dosyć duża liczba biorących w niej udział odczynników zmuszała do tego, aby dążyć do jej uproszczenia lub do zmiany sposobów jej wykonania. Zdawało się, że w tym kierunku idzie np. ogłoszona w parę lat po reakcji MANOJŁOWA reakcja BIERNACKIEGO, również kolorymetryczna, prostsza w przebiegu, a według zdania SCHRATZA ('26), dająca nawet lepsze rezultaty, czego jednak stwierdzić nie mogłem w swoich doświadczeniach.

Niezależnie od tych dążeń, zarówno reakcja MANOJŁOWA, jak i wszelkie inne reakcje kolorymetryczne do określenia płci pozostają niezupełnie wyjaśnione z punktu widzenia zachodzącego tu chemizmu.

W ten sposób dotychczasowe badania nad temi reakcjami szły w dwu kierunkach. Z jednej strony przerabiano je na coraz to obszerniejszym i bardziej różnorodnym materiale, z drugiej zaś — zajmowano się poznaniem zachodzącego tu chemizmu i czynników tę reakcję powodujących. O ile, co do pierwszego zagadnienia, starano się rozszerzyć ilość obiektów do doświadczeń i uzależnić ją od pewnych narządów zwierzęcych lub roślinnych, dochodząc przyniem do mniej lub więcej zgodnych wniosków, o tyle w stosunku do zagadnienia drugiego — do chemizmu reakcyj — spotyka się twierdzenia najrozmaitsze, dotyczące przyczyn i czynników tę reakcję wywołujących. Jedni z samym MANOJŁOWYM i SOŁOWCOWĄ na czele uważają reakcję tę za jakościową, zależną od zawartości tych lub owych hormonów płciowych, a więc uzależniają ją od gonad. Drudzy znowu opierają reakcję na różnicach wyłącznie ilościowych. Ale i w tym ostatnim przypadku zdania są ogromnie rozbieżne. SATINA i BLAKESLEE ('26) uważają, że podstawą odmiennie przebiegających reakcyj dla obu płci jest rozmaita ilość peroksydaz, JOYET LAVERGNE ('28), PERKINS ('27), POLONOWSKI ('29 a i b) ujmują tę kwestję inaczej, twierząc, że reakcja polega na rozmaitej zdolności wyciągów do utleniania się i redukcji. Zkolei FERREIRA DE MIRA ('29), GAWIAŁOW, WŁODIMIROW, WINOGRADOW i OPPEL ('26), SCHMIDT i PEREWOSKAJA ('26), SCHRATZ ('26), PERKINS ('27) przypisują zachodzącą reakcję rozmaitej ilości zawartych w wyciągach białek lub innych ciał nieokreślonych. Nie brak wreszcie zdania, iż reakcja jest wskaźnikiem raczej ogólnego natężenia przemiany materji wogóle, aniżeli płci (RIDL i REINHART '28). Wypowiadane są również przypuszczenia, że reakcję powodują lub powodowałyby mogły rozmaite stężenia jonów H, aczkolwiek kwestja ta została już całkowicie, zdaje się, wyczerpana w doświadczeniach KRASIŃSKIEJ-IGNATOWOJ ('29), w których różnice w zawartości jonów H w substancjach, dających reakcję MANOJŁOWA, nie dały się stwierdzić. Nie mniej jednak autorka ta przychyliła się również do zdania, że reakcję powodują różnice ilościowe.

Moje doświadczenia nad tą reakcją dotyczyły obu poruszanych w dotychczasowej literaturze zagadnień, a zatem — po-

pierwsze, stwierdzenia samego występowania reakcji na jaknajobszerniejszym i jaknajróżnorodniejszym materiale, powtóre — wykrycia i ustalenia przyczyn lub czynników reakcję wywołujących.

## II. Technika postępowania i rola poszczególnych odczynników.

We wszystkich wspomnianych niżej próbach przerabiałem reakcję MANOJŁOWA według jej trzeciej modyfikacji, opisanej przez SOŁOWCOWĄ ('26). Z reguły przeto jako odczynników używałem 1% roztworu papajotyiny Grüblera lub Merka, przygotowywanego *ex tempore* 1% alkoholowego roztworu Dhalji, 1 — 0.25% roztworu nadmanganianu potasowego, 40% roztworu HCl, 2% roztworu tyozinaminy. Jak wiadomo, z odczynnikami temi, dodawanemi w pewnej kolejności i w pewnym stosunku, substancje męskie dają reakcję bezbarwną, gdy natomiast żeńskie pozostają zabarwione na ciemnoczerwono, wiśniowo lub fioletowo.

Reakcję samą przeprowadzono w sposób następujący. Najpierw przez kolejne dodawanie papajotyiny, Dhalji,  $KMnO_4$ , HCl, tyozinaminy ustalono tę najmniejszą ilość kropeł nadmanganianu potasowego, przy której następuje odbarwienie samych odczynników bez jakiegokolwiek bądź wyciągów. Praktycznie biorąc, chodziło tu o ustalenie liczby kropeł  $KMnO_4$  w szeregu

10, 3, x, 3, 10,

gdzie liczby oznaczają kolejno ilość wyżej wspomnianych odczynników, x zaś odnosi się do liczby kropeł  $KMnO_4$ . Tak znaleziona liczba kropeł jest punktem wyjściowym danej serii prób.

Do pary próbek, zawierających jednakowe ilości wyciągów męskiego i żeńskiego, dodawałem powyżej ustaloną ilość odczynników. O ile zabarwienie utrzymywało się zarówno w męskim, jak i w żeńskim wyciągu, wówczas w następnych — zawsze równoległych — próbach zwiększałem ilość kropeł nadmanganianu. Przyczem, jak wyżej powiedziałem, roztworu nadmanganianu używano od 0.25% do 1%. Różnice bowiem pomiędzy męskimi i żeńskimi słabemi wyciągami nieraz są niemożliwe do uchwycenia zapomocą 1% roztworu.

Coprządza takie same zabarwienia można było otrzymać, mieszając z sobą w tejże kolejności same odczynniki, — bez jakiegokolwiek substancji, branej do zbadania, — przyczem, zmieniając ilości niektórych z tych odczynników, można otrzymać wszystkie stopnie zabarwienia od zupełnie ciemnego, niemal nieprzezroczystego, aż do zupełnego odbarwienia. W ten sposób, na przykład, zmniejszenie ilości Dhalji lub zwiększenie  $KMnO_4$  powoduje odbarwienie się, i odwrotnie. Okoliczność tę można wykorzystać w ten sposób, że zmieniając tylko ilości nadmanganianu potasowego przy zachowaniu niezmiennej ilości reszty odczynników — można sporządzić wzorcową skalę kolorów (od bezbarwnego do najciemniej zabarwionego),

mogącą służyć do porównania z zabarwieniem, otrzymywanem podczas badań rozmaitych substancyj.

Z drugiej strony, w niektórych wyciągach bardzo mocnych, np. z gruczołów płciowych śledzi, można wykazać różnicę między wyciągiem męskim i żeńskim, wyeliminowując nawet pewne odczynniki, przedewszystkiem zaś papajotynę, która jest potrzebna tylko w przypadku bardzo małych ilości wyciągów, przy wyciągach b. słabych lub po użyciu wyciągów, w których różnica, zależna od płci, jest bardzo mała, jak np. w przypadku surowicy i krwi. Potwierdzeniem tego może być przykład następujący. Wzięto po 1 cm<sup>3</sup> wyciągu męskiego i żeńskiego (ze śledzi) w 2 cm<sup>3</sup> wody, znaleziono odpowiednią liczbę kropeł odczynników, przy której reakcja wypadła dodatnio, i otrzymano:

w męskim z papajotyną i bez niej — odbarwienie;

w żeńskim z papajotyną i bez niej — zabarwienie ciemne.

Następnie wzięto rozcieńczenia dwukrotnie większe i otrzymano:

w męskim z papajotyną i bez niej — odbarwienie;

w żeńskim z papajotyną i bez niej — zabarwienie, ale słabsze, niż poprzednio.

W powyższych więc próbach papajotyna nie była wcale potrzebna do wykazania różnicy między męskim i żeńskim wyciągiem. Jeżeli zaś wziąć rozcieńczenie jeszcze dwa razy większe, to otrzymamy z tą samą ilością odczynników:

w męskim	w żeńskim
z papajotyną — lekkie żółte zabarwienie	z papajotyną — kolor czerwonego wina
bez papajotyny — odbarwienie	bez papajotyny — lekko żółty

Tu już występuje wyraźnie działanie papajotyny. Bez papajotyny bowiem różnica byłaby bardzo słaba: odbarwienie i zabarwienie lekko żółte. Gdyby tu odpowiednio zmniejszyć ilość KMnO<sub>4</sub>, to coprawda zabarwienie w męskiej i żeńskiej próbach powstałoby ciemniejsze, jednak różnica nie byłaby wyraźniejsza.

Następnie, jeżeli wziąć rozcieńczenie jeszcze dwa razy większe, to otrzymamy

w męskim	w żeńskim
bez papajotyny — odbarwienie	bez papajotyny — odbarwienie
z papajotyną — lekko żółte	z papajotyną — kolor czerwonego wina, ale trochę jaśniejszy, niż poprzednio.

W tem ostatniem więc rozcieńczeniu nie dałoby się wcale wykazać bez papajotyny różnicy między męskim i żeńskim wyciągiem nie zwiększając ilości tych wyciągów, a stąd słuszny byłby wniosek, że papajotyna zwiększa tylko czułość reakcji.

Do tego samego wniosku można dojść na mocy faktu, że domieszkę wyciągu żeńskiego do wyciągu męskiego można stwierdzić w znacznie mniejszej ilości z papajotyną, niż bez niej. Tak np. 3 cm<sup>3</sup> wyciągu z gruczołów płciowych śledzi męskich z dodatkiem dwu kropeł takiegoż wy-

ciągu żeńskiego dają z papajotyną i bez niej reakcję męską, czyli odbarwienie. Taka sama ilość wyciągu męskiego z czterema kroplami wyciągu żeńskiego, daje takie same zabarwienie, lecz z papajotyną nieco tylko ciemniejsze, niż bez niej. Dodanie 8 kropel wyciągu żeńskiego daje z papajotyną wyraźne zabarwienie, bez niej natomiast ledwie widoczne. W próbach powyższych była stosowana liczba kropel  $\text{KMnO}_4$  trochę większa, niż najmniejsza, przy której występuje różnica między wyciągami męskim i żeńskim, albowiem w przeciwnym razie nawet jedna kropla żeńskiego wyciągu dałaby odrazu zabarwienie.

Papajotyna, dodana do samych tylko odczynników, powoduje utrzymanie zabarwienia. Jeżeli same odczynniki w kolejnych próbach, w których zmieniamy tylko liczbę kropel  $\text{KMnO}_4$ , od 4 do 7, ilość zaś innych odczynników pozostawiamy bez zmiany, dają zabarwienie od ciemnego do zupełnie bezbarwnego, to bez papajotyny ten sam skutek otrzymamy po dodaniu już 3 — 5 kropel. Inaczej mówiąc, używając papajotynę, otrzymamy wzorzec z mniejszej liczby próbek, i sama różnica kolorów między poszczególnymi próbkami będzie większa. Zauważyłem natomiast, że w niektórych przypadkach, jeżeli w reakcjach, przeprowadzanych z wyciągami z krwi męskiej i żeńskiej, wyeliminować papajotynę, to żeński wyciąg da niekiedy jaśniejszą reakcję, niż męski, a więc w tym przypadku papajotyna działałaby wręcz odwrotnie. Można by stąd wysnuć wniosek, że papajotyna inaczej działa w wyciągu męskim, a inaczej w żeńskim. Czyli —, że przebieg reakcji męskiej i żeńskiej jest jakościowo różny.

Stałoby to jednak do pewnego stopnia w sprzeczności z twierdzeniem SCHRATZA i FERREIRA DE MIRY, że papajotyna nie jest potrzebna bezpośrednio w reakcji, a przemawiałoby raczej za tem, że papajotyna działa tu jak ferment. Przypuszczał to już zresztą sam MANOJŁOW, używając w modyfikacjach swojej reakcji zamiast papajotyny innych fermentów proteolitycznych. Zgadzałoby się to natomiast z obserwacją, że dodanie papajotyny wymaga użycia nieco większej ilości  $\text{KMnO}_4$ .

W bardzo mocnych wyciągach można również otrzymać różnicę przed dodaniem tyosinaminy, która rozpuszcza brunatny osad, gmatwający wyrazistość reakcji.

Pewien wpływ na zmiany w przebiegu reakcji wywierają również niektóre czynniki fizyczne. Można np. stwierdzić, że reakcja jest do pewnego stopnia termostabilna, po krótkim bowiem zagotowaniu reakcja również pozostaje niezmieniona, co się zgadza z doświadczeniami KUZNIECOWA ('25). Mogłem jednakże stwierdzić, że dłuższe gotowanie osłabia zdolność utrzymywania zabarwienia lub ją znosi zupełnie.

O słałości lub też mocy wyciągu można wnioskować z liczby kropel  $\text{KMnO}_4$ , które trzeba dodać do obu substancyj, by uzyskać zupełne odbarwienie. Tak np. reakcja, przeprowadzona z wyciągiem z męskich i żeńskich gruczołów płciowych śledzi, przed zagotowaniem była następująca: 10, 3, 8, 3, 10, przyczem cyfry oznaczają liczbę kropel kolejno dodawanych odczynników. Wyciąg męski w tym przypadku dawał zupełne odbarwienie, żeński natomiast — bardzo ciemny, fioletowy kolor. Po krótkim przegotowaniu także same zabarwienie uzyskano przy 10, 3, 5, 3, 10,

jeszcze po dłuższym 10, 3, 4, 3, 10 i t. d., aż wreszcie wyciągi przestały dawać różnicę. W próbach tych używałem zawsze ilości  $\text{KMnO}_4$  największej, z którą jeszcze występuje zabarwienie. W powyższych więc próbach widzimy, że np. w miarę dłuższego gotowania ilość nadmanganjanu ciągle się zmniejszała: 8, 5, 4 krople i t. d.

Odwrotnie, zamrażanie tylko w nieznaczny sposób wpływa na osłabienie wyciągów. Trochę więcej wpływa czas, jaki upłynął od chwili przygotowania wyciągu do chwili jego użycia. Np. w surowicy krwi ludzkiej po 4 — 5 dniach już nie zdołałem wykazać charakterystycznych reakcyj, wyciągi jednak z kawałeczków wątroby, rozkładającej się skutkiem gnicia, dają reakcję prawidłową.

### III. Reakcje z materiałem zwierzęcym.

Materiał zwierzęcy użyty do prób stanowiły gruczoły płciowe i niektóre inne narządy śledzi solonych i karasi świeżych, żaby płowej i jadalnej, bydła rogatego, oraz skrzepę i surowicę krwi ludzkiej; z materiału roślinnego zaś — kwiaty, liście i łodygi brzozy, turzycy, marchaneji, czechrzycy leśnej, spiręi, czerwonej lilji i *Melandrym album*. Wyciągi z tkanek zwierzęcych robiono zapomocą wody destylowanej. Tkanki należy drobno posiekać, zalać wodą i pozostawić na 24 godziny.

Wyciągi z gruczołów płciowych śledzi. Wyciągi te są bardzo mocne. W celu przygotowania wyciągu do 3 gramów gruczołów dodawano 10  $\text{cm}^3$  wody i stawiano na dobę. Przy przrządzaniu lepiej je rozszarpać lub rozetrzeć w moździerzu. W ten sposób były zbadane 52 śledzie, 26 męskich i 26 żeńskich. We wszystkich przypadkach otrzymano nadzwyczaj wybitne i typowe reakcje (100% prawidłowych), przyczem zależnie od sposobu przygotowania wyciągu otrzymano większą lub mniejszą różnicę, zależną od płci. W tenże sposób przygotowywane były wyciągi z mięśni, lecz są one znacznie słabsze.

Wyciągi przygotowywane ze śledzi, jak wiadomo, zawierały dosyć dużą ilość soli. Zauważono, że zwiększanie soli w takich wyciągach (np. 5  $\text{cm}^3$  nasyconego  $\text{NaCl}$  w 20 — 30  $\text{cm}^3$  wyciągu) daje jaśniejszą nieco reakcję lub większy osad, którego ilość zmniejszała się wraz z rozcieńczeniem. Jeśli natomiast dodać rozczynu  $\text{NaCl}$  po dokonaniu reakcyj, wówczas nastąpi większe strącenie się osadu.

Podobne rezultaty otrzymano, przerabiając reakcję z wyciągami z nerek, wątrób, mięśni i gruczołów płciowych karasi. Do doświadczenia użyto 3 samice i 3 samce. Tu, jak i w śledziach solonych, najwybitniejsza różnica wypadła z wyciągami z gruczołów płciowych, następnie z wyciągami z wątrób, reszta wyciągów dała taką samą stosunkowo słabą różnicę.

Dodać też należy, że wyciągi z nerki karasi wyróżniają się tem, że zaczynają odbarwiać się dopiero przy znacznie większej liczbie kropli  $\text{KMnO}_4$ , chociaż różnica w zabarwieniu nie jest wyraźniejsza, niż z wszelkimi innymi wyciągami.

## IV. Reakcja z narządami żab.

Sporządzano zkolei wyciągi z mięśni i wątrób żab; pomimo, że zarówno sposób przyrządzania jak i użyte ilości były identyczne, dawały one jednak reakcje niejednakowe. Różnica między wyciągami męskimi i żeńskimi z wątroby była o wiele bardziej wyraźna, niż z mięśni. Wyciągi z wątroby są znacznie silniejsze w tem znaczeniu, że przy znacznie większej ilości nadmanganjanu jeszcze utrzymują zabarwienie; wyciąg męski z wątroby, na przykład, utrzymuje zabarwienie znacznie mocniej, niż nawet wyciągi żeńskie z mięśni. Znaczy to, że jeżeli przypuszczenie, iż płęć w reakcji MANOJŁOWA cechuje obecność pewnych ciał zdolnych do utleniania się jest słuszne, to w męskim wyciągu z wątroby znajdziemy ich więcej, niż w żeńskim z mięśni. Stąd powstała możność dalszego przypuszczenia, że różne narządy zawierają różne ilości tych utleniających się substancyj.

W celu sprawdzenia tego przypuszczenia, w następnych próbach zrobiłem wyciągi z wątrób, mięśni szkieletowych, mięśni sercowych, śledzion, jąder i jajników żab. Wyciągi były robione ze wszystkich narządów w sposób identyczny. Materiał wzięto od razu z 15 samców i 15 samic. Okazało się przytem, że wyciągi ze wszystkich organów, z wyjątkiem wątroby, dają takąż samą słabą reakcję, zależną od płci, jak i mięśnie. Natomiast wyciągi z wątrób wybitnie się wyróżniają swoją wyrazistością. W razie użycia większej ilości wyciągów, lecz pozostawienia tej samej ilości kropeł  $\text{KMnO}_4$  we wszystkich reakcjach, reakcje z wątrobą nie różnią się wcale pomiędzy sobą, pozostają ciemne i dopiero po dodaniu większej ilości tego odczynnika dają wyraźną różnicę zabarwień, nieraz z taką nawet ilością  $\text{KMnO}_4$ , wobec której zarówno męskie jak i żeńskie wyciągi z innych narządów pozostają bezbarwne.

Zaznaczyć jednak należy, że wyciągi z jąder i jajników dawały czasem bardzo słabą, a nawet odwrotną reakcję. Wytlumaczyć to byłoby można chyba obecnością jakościowo zupełnie innego białka w gruczołach rozrodczych samców i samic, zwłaszcza że próby były robione wiosną, gdy jajniki znajdowały się w stanie przerostu.

Przypuszczenie to potwierdzały także niżej omówione doświadczenia nad wyciągami z jąder byka i jajników krowy,

w których otrzymano reakcje znacznie mniej wyraźne od reakcyj z wyciągami z wątrób i zupełnie podobne do reakcyj z wyciągami z mięśni. Możliwe, że są różnice w zawartości tej czy też tych substancyj, cechujących płeć w różnych narządach tego samego organizmu; w każdym bądź razie różnice te byłyby minimalne w porównaniu z wątrobą. To też biorąc pod uwagę doświadczenia KUZNIECOWA ('25), z których wynika, że krew z *venae portae* daje reakcję wręcz odmienną, niż krew z innych żył, należących do jej zakresu, byłby może usprawiedliwiony wniosek, że substancje, cechujące swą ilościową zawartością obie płci lub przynajmniej jedną z nich (patrz niżej), produkuje wątroba. Coprawda nie wyłączone byłoby twierdzenie, że wątroba tylko je gromadzi w sobie, produkują zaś gruczoły płciowe, wówczas jednak trudny byłby do wytłumaczenia fakt istnienia słabej bardzo różnicy między wyciągami z jajników krowy a wyciągami z jąder byka (jak niżej), różnicy, nie większej, niż przy różnicy z wyciągami z mięśni.

Z żab zbadano po 50 wyciągów z mięśni i wątrób 25 samic i 25 samców. Wyciągi z wątrób dały 100% prawidłowych odpowiedzi. Odrębnie natomiast przeprowadzone reakcje z żółcią nie dały różnicy między żółcią samic i samców, być może dlatego, że jest jej zbyt mało, wobec czego reakcje musiały być przeprowadzane w wielkim rozcieńczeniu.

#### V. Reakcje z narządami bydła.

Analogiczne zachowanie się stwierdziłem w reakcjach z narządami bydła. I tu reakcje z wątrób wypadły bardzo wyraźnie, natomiast wszystkie inne narządy, jak gruczoły płciowe, mięśnie i mózgi, dały różnice bardzo słabe.

Porównyując te doświadczenia z doświadczeniami nad rybami, widzimy dosyć znaczną analogję. Z wyjątkiem bowiem wyciągów z gruczołów płciowych ryb, które reagują wyraźniej niż wyciągi z wątroby, co dałoby się być może wytłumaczyć różnicą jakościową białek gruczołów męskich i żeńskich, ze wszystkich innych wyciągów wątroba reaguje najwyraźniej.

#### VI. Reakcje z krwią i surowicą ludzką.

Badając krew ludzką, używałem skrzepów po „Wassermanie“. Robiono wyciągi wodne (woda destylowana), otrzymując

rozczyzny około 20—25% hemoglobiny, oznaczone hemoglobinometrem SAHLIEGO, przyczem do reakcji brano rozcieńczenie powyższego wyciągu 1:5, z tego zaś do prób używano 3 cm<sup>3</sup>. Znacznie wyraźniej reakcje wypadły w bardziej stężonych rozczyznach, np. 30—40% Hb według SAHLIEGO, przyczem do próby wystarczył wówczas 1 cm<sup>3</sup>. Przy takim postępowaniu otrzymano czerwone zabarwienie wyciągu żeńskiego i przejrzyste żółte męskiego (patrz tablicę barwną). Zależnie od „mocy“ wyciągu używano mniejszej lub większej ilości nadmanganianu potasowego, według zwykłych zasad. W ten sposób zbadano 142 męskich i 133 żeńskich skrzepów krwi. W męskich skrzepach odpowiedzi nieprawidłowych było 14, co stanowi tylko 9%, w żeńskich - nieprawidłowych 16, czyli 12%. Jedna z nieprawidłowych żeńskich dała zabarwienie nadmierne. Ponadto zbadano jeszcze 5 par próbek krwi, robiąc wyciągi zapomocą rozczywnu fizjologicznego, lecz reakcje w tym przypadku były znacznie mniej wyraźne. Badając ludzkie surowice, brano 3—5 kropeł surowicy, co się równa mniej więcej 0.1 — 0.2 cm<sup>3</sup>, i dodawano 0.5 cm<sup>3</sup> wody lub brano wprost surowice nierozcieńczone.

Zwykle przeprowadzano próby na parze próbek surowic (męskiej i żeńskiej), które były w jednakowym stanie zhemolizowania. Zauważono bowiem (wbrew twierdzeniom MANOJŁOWA i SOŁOWCOWEJ), że hemoglobina wpływa w bardzo wyraźny sposób na utrzymanie zabarwienia. Mocno bowiem zhemolizowana surowica męska daje reakcję nieraz znacznie ciemniejszą, niż słabo hemolizowana lub zupełnie nie zhemolizowana żeńska. Przeprowadzając więc reakcje na szeregu surowic, należało zawsze brać pod uwagę stopień zhemolizowania. Zbadano 152 surowice żeńskie, z nich 12 dało reakcję nieprawidłową, i 156 surowic męskich, z nich reagowało nieprawidłowo też 12, co dla obu seryj wynosi około 7.8%. Różnice przy badaniu surowic nie były tak wyraźne, jak przy badaniu wyciągów ze skrzepów zapomocą wody dystylowanej, być może dlatego, że z konieczności wypadło ograniczać się do zbyt małej ilości surowicy (3 krople).

Razem więc zbadano 595 próbek krwi ludzkiej. Z nich otrzymano reakcyj nieprawidłowych 54. Procent prawidłowych odpowiedzi równa się 91, czyli jest nieco większy od spotykanego w literaturze, a to być może z tego powodu, że uważano za prawidłowe te odpowiedzi, które niektórzy z autorów uważają



za nietypowe, np. żeńskie, dające zabarwienie nieco słabsze od reszty żeńskich, lub męskie nieco ciemniejsze. W doświadczeniach moich zaliczałem do prawidłowych wszystkie te reakcje, które dawały wystarczająco wyraźne różnice zabarwienia (uważane za „nietypowe“ przez SOŁOWCOWĄ). Sporządzone częstokroć na oko wyciągi w rzeczywistości mogły różnić się cokolwiek mniejszą lub większą zawartością hemoglobiny, ta zaś — jak wyżej powiedziałem — w bardzo wyraźny sposób wpływa na przebieg reakcji; nieuchwytna jednak dla oka różnica w zawartości Hb nie mogłaby wpłynąć na zupełne odwrócenie reakcji. To samo dotyczy prób przeprowadzanych nad surowicami, gdyż po większej części były one zhemolizowane.

Mimo to reakcje z wyciągami ze skrzepów krwi i z surowicami są technicznie trudne do przeprowadzenia, gdyż różne ilości hemoglobiny, jak wyżej wspomniałem, wpływają wybitnie na rezultat reakcyj.

Technikę reakcyj z wyciągami ze skrzepów krwi opracowałem następująco: surowicę ze skrzepów męskiego i żeńskiego należy dokładnie usunąć przed doświadczeniem, gdyż różnica jej zawartości może decydować o przebiegu reakcji. Następnie do skrzepów dolewałem wody destylowanej i wstrząsałem tak długo, aż otrzyma się roztwór Hb mniej więcej 30 — 40%. Rozczyny te po zlaniu ze skrzepu należy doprowadzić — o ile możliwe — do równego stężenia, rozcieńczając bardziej ciemne wodą i porywnywając obydwie roztwory w kolorymetrze DUBOSQUE'A. W ten sposób przygotowane roztwory używano do prób w ilości 1 cm<sup>3</sup>, dobierając odpowiednią ilość KMnO<sub>4</sub>, tak aby różnica reakcji męskiej i żeńskiej wystąpiła wyraźnie.

Przy niektórych próbach krwi (zdaje się starych) można dobrać ilość KMnO<sub>4</sub> dopiero po zmniejszeniu HCl do 1—2 kropeł.

Używano również do prób wodę, lub roztwór fizjologiczny soli po przepłókaniu nim ust. Do płókania przez jedną osobę brano 7 cm<sup>3</sup>. Z roztworem fizjologicznym w tym przypadku reakcje wypadały nieco wyraźniej, niż z wodą. Ilość odczynników używanych była 10, 3, 5, 3, 10. Zbadano 14 przypadków żeńskich i 15 męskich. Z tych prawidłowych odpowiedzi otrzymano: w żeńskich 9 w męskich 13. Nieprawidłowych więc męskich 2 i żeńskich 5. Reakcje uważano za dodatnie nawet przy ledwie dającej się dostrzec różnicy kolorów. Nie otrzymano tu zupeł-

nego zabarwienia żeńskich i zupełnego odbarwienia męskich prób być może dlatego, że wyciągi były zbyt słabe, lub też dlatego, że w reakcjach brano je w ilości niedostatecznej: zbyt wielka znowu ilość powodowałaby zbytne rozcieńczenie odczynników, co z kolei gmatwałoby wyrazistość reakcji.

#### VII. Stosunki ilościowe pomiędzy czynnikami, warunkującymi reakcję.

Zagadnienie, czy reakcja ma charakter wyłącznie jakościowy, czy występuje skutkiem różnicy w zawartości pewnych ciał w osobnikach obu płci, wychodzi na jaw już z tego powodu, że dodanie w wyżej podanej kolejności odczynników do wyciągów męskich lub żeńskich może powodować utrzymanie zabarwienia zarówno w próbie męskiej, jak i w żeńskiej; zwiększając następnie w kolejnych równoczesnych próbach liczbę kropeł  $\text{KMnO}_4$ , prawie zawsze można uzyskać taką kombinację, w której wyciąg męski będzie już odbarwiony (typowa męska reakcja), żeński zaś będzie jeszcze ciemny; ten ostatni odbarwi się dopiero po dodaniu odpowiednio większej ilości nadmanganjanu, którego rola w tym przypadku polega prawdopodobnie na utlenianiu. Z tego widać, że męskie i żeńskie wyciągi wstrzymują odbarwianie się odczynników, lecz w stopniu niejednakowym. Należy zaznaczyć, że różnica ta będzie tem wyraźniejsza, im więcej użyto do próby wyciągu, jednak do pewnej tylko granicy, nadmierna bowiem ilość wyciągu gmatwa wyrazistość reakcji, powodując widocznie zbytne rozcieńczenie odczynników. Używając zaś bardzo małych ilości wyciągu, albo wcale nie można otrzymać charakterystycznych reakcyj albo też wypadają one zbyt słabo; przy zbyt małej np. ilości wyciągów jedna nawet kropla  $\text{KMnO}_4$  stanowi już nadmiar dla obu substancyj i może wywołać zupełne odbarwienie się zarówno próby męskiej, jak żeńskiej. W takich razach wypada często używać nie 1% lecz 0.5%, a nawet 0.25% roztworu nadmanganjanu potasu. Potwierdzałyby to wygłoszone przypuszczenie, że reakcja ta zależy od różnicy ilościowej w wyciągach męskich i żeńskich. Do tej sprawy jeszcze powrócimy.

Niektórzy wspomniani na wstępie badacze dochodzili do powyższego twierdzenia na podstawie takich samych lub analogicznych doświadczeń. Jedni, jak na przykład SCHRATZ, KRASINSKA-  
JA-IGNATOWA, pozostawiali ilość odczynników niezmienną, uży-

wając natomiast rozmaitej ilości badanych wyciągów. W takim przypadku, zależnie od ilości tych wyciągów, reakcja wypadła raz bezbarwna, to znowu barwna, z czego wynika, że tylko w pewnych granicach ilościowych reakcja wypada odmiennie dla obu płci. Natomiast poza temi granicami wyciągi zarówno męskie, jak i żeńskie dają odbarwienie (reakcja męska) lub utrzymują zabarwienie (reakcja żeńska). Inni znowuż, jak np. FERREIRA DE MIRA, zmieniali zarówno ilość  $\text{KMnO}_4$ , jak równocześnie i ilość reszty odczynników, dbając jedynie, by stosunek wzajemny odczynników, podany przez MANOJLOWA, pozostawał zachowany.

We własnych niżej opisanych doświadczeniach, w celu otrzymania reakcji, zmieniałem tylko ilość  $\text{KMnO}_4$ , przez co mogłem otrzymać różnice zależne od płci i niezależne do pewnego stopnia od ilości wyciągów, wziętych do próby.

Powstają więc owe różnice w zabarwieniu wyciągów męskich i żeńskich nie wskutek zdolności wyciągu męskiego do odbarwienia się, lecz wskutek własności obydwu wyciągów do utrzymywania zabarwienia w różnym stopniu, co łatwo również można wykazać, biorąc trzy próbówki: z wodą destylowaną, z wyciągiem męskim i wreszcie z wyciągiem żeńskim. Reakcje przerobione po poprzednim ustaleniu odpowiedniej ilości odczynników, z którą wyciągi męskie i żeńskie dają najwyraźniejszą różnicę, wykażą, że woda destylowana i wyciąg męski odbarwiają się, gdy natomiast wyciąg żeński pozostaje wyraźnie zabarwiony. Przy nieco mniejszej ilości nadmanganjanu próba z wodą pozostanie bezbarwna, próba męska okaże się nieznacznie zabarwiona, a żeńska — ciemna. Jeszcze przy mniejszej ilości  $\text{KMnO}_4$  zarówno próba żeńska, jak i męska pozostaje ciemno zabarwiona. Potwierdzałoby to raz jeszcze znany już nam fakt, że próba żeńska odbarwia się po dodaniu większej nieco ilości nadmanganjanu potasowego, niż męska. Różnice te zresztą są minimalne. Np. FERREIRA DE MIRA ('28), obliczając te różnice dla krwi królików w rozcieńczeniu 1/20 i używając do próby po 3  $\text{cm}^3$ , znalazł, że żeńska próba odbarwia się średnio przy 19 i 10/12 kroplach 1%  $\text{KMnO}_4$ , męska zaś przy 19 i 4/12 kroplach.

Jak już wyżej powiedziałem, wyciągi męski i żeński w niezbyt małych ilościach powodują utrzymanie zabarwienia. A że wyciąg żeński utrzymuje to zabarwienie silniej niż męski, więc można byłoby przypuszczać, że dokonywa tego ten sam czynnik,

jedynie dzięki rozmaitej jego zawartości w męskich i żeńskich wyciągach, czyli że różnica w reakcji męskich i żeńskich wyciągów jest tylko ilościowa. Założeniu temu jednak przeczy następujące doświadczenie: jeżeli do pewnej ilości wyciągu żeńskiego dodamy taką kombinację wyżej wymienionych odczynników, że da ona jeszcze zabarwienie, a następnie powtórzmy to samo, tylko dodając o jedną kroplę  $\text{KMnO}_4$  więcej i otrzymamy odbarwienie, czyli jeżeli znajdziemy reakcję graniczną dla wyciągu żeńskiego, a dalej, jeżeli znajdziemy ilość kropeł wyciągu męskiego, która z tą samą ilością odczynników daje także zabarwienie, to będziemy mogli przypuścić, że pod względem zawartości czynnika, utrzymującego zabarwienie, obie te ilości wyciągów męskiego i żeńskiego są sobie równoznaczne. Wielokrotne przeto ilości tychże wyciągów powinnyby dawać z jednakową liczbą kropeł odczynników jednakowe zabarwienie. Zobaczymy jednak, że tak nie jest. Dla przykładu mogą służyć następujące liczby, uzyskane w doświadczeniach nad wyciągami z narządów płciowych śledzi:

1 kropla żeńskiego wyciągu odpowiada	9-iu męskiego
2 " " " "	14 " "
3 " " " "	22 " "
6 " " " "	46 " "

Z liczb tych widzimy, że utrzymanie jednakowego zabarwienia przy stopniowym zwiększaniu wyciągów nie wymaga proporcjonalnego zwiększenia  $\text{KMnO}_4$ , czyli że substancje, które w rozmaity sposób działają w wyciągach męskich i żeńskich, muszą być nie tylko ilościowo różne, lecz również jakościowo odrębne.

Coprawda na powstanie ostatecznego zabarwienia w powyższych reakcjach wpływa jeszcze rozcieńczenie wskutek dodawania większej liczby kropeł męskiego wyciągu niż żeńskiego, ale tego nie można brać pod uwagę, gdyż większe rozcieńczenie odczynników w męskich próbach powinnoby raczej wzmacniać zabarwienie, co znów z kolei zmniejszałoby różnicę pomiędzy męską a żeńską próbą. Reakcja bowiem, wykonywana z wyciągami w dużym rozcieńczeniu, to znaczy z dużą ilością wyciągów rozcieńczonych, wypada zawsze trochę ciemniej, niż robiona z tą samą ilością, lecz nierozcieńczonego wyciągu. Różnica ta jest jednak minimalna i tu nie może być brana pod uwagę. Można to stwierdzić, jeżeli przerobi się reakcję pomiędzy samymi tylko odczynnikami,

a następnie powtórzy się ją z dodaniem poprzednio wody. Wówczas, dopiero po dodaniu 8—10 cm<sup>3</sup> wody można zauważyć nieznaczną różnicę w zabarwieniu, spowodowaną widocznie innym rozcieńczeniem odczynników. Z tego możemy wnioskować, że wielokrotne zwiększenie liczby kropeł wyciągów w powyższych próbach nie mogło odegrać żadnej istotnej roli wskutek rozcieńczania odczynników.

Jeżeli przedstawimy na wykresie podany wyżej przykład stosunku kropeł męskich i żeńskich wyciągów, oznaczając na osi odciętych ilości kropeł wyciągów żeńskich, a na osi rzędnych — męskich, to otrzymamy krzywą jednakowego zabarwienia, której kształt będzie zależał od stężenia wyciągu (rys. 1). Przypuszczenie, że istnieją dwie substancje reagujące, potwierdzałyby jeszcze i ten przytoczony wyżej fakt, że jedna i ta sama ilość dodanej papajotyny w niektórych przypadkach inaczej reaguje z wyciągiem męskim a inaczej z żeńskim. Skoro więc przyjmiemy obecność dwóch ciał odmiennych i weźmiemy pod uwagę, że męski wyciąg w odpowiedniej ilości zachowuje zabarwienie, czyli że daje reakcję żeńską, wówczas będziemy mogli przypuszczać, że w wyciągu męskim istnieją obydwie te ciała (oznaczymy męski przez  $a$  i żeński przez  $b$ ), czyli że wzór empiryczny wyciągu męskiego mógłby być np.

$$2a + 2b$$

W takim jednak razie żeński wyciąg mógłby się różnić tem, że zawierałby czynnika żeńskiego więcej, czyli odpowiadałby mu wzór

$$2a + 3b$$

lub też przeciwnie mniejszą ilość  $a$ , przez co na pierwszy plan wysuwa się  $b$ , czyli wzór byłby

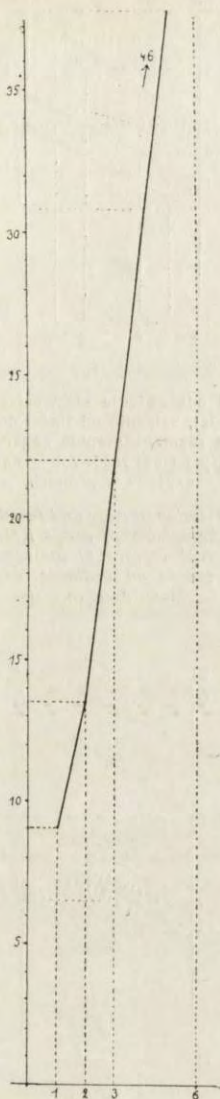
$$a + 2b$$

lub też wreszcie w wyciągu żeńskim jest jednocześnie mniej  $a$  i więcej  $b$ , czyli wzór przedstawiałby się np.

$$a + 3b$$

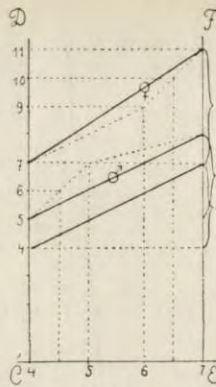
Dla rozstrzygnięcia pytania, jaki wzór najlepiej odpowiadałby stwierdzonym empirycznie stosunkom, przerobiono następujące doświadczenie, którego wynik jest uwidoczniiony na rys. 2.

Na linii odciętych punkty 4, 5, 6 i 7 czyli rozmaite stopnie wzorca odpowiadają 4, 5, 6, 7 kroplom  $\text{KMnO}_4$ , biorącym udział w reakcji przy jego przygotowywaniu. Punkt 4 odpowiada zu-



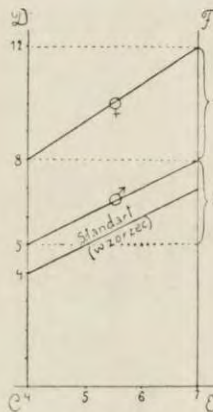
Rys. 1. Wykres wzajemnego stosunku kropeł wyciągu męskiego i żeńskiego z gruczołów płciowych śledzi. Na osi odciętych punkty odpowiadają ilościom kropeł wyciągu żeńskiego, na osi rzędnych — męskiego.

Fig. 1. Curve expressing the connexion between drops of male and female extracts of sexual glands of herrings. Points on abscissa correspond to number of drops of female extract, on ordinate — to that of male extract



Rys. 2. Wykres szybkości odbarwienia się wyciągów męskiego i żeńskiego z gruczołów płciowych śledzi, zależnie od ilości dodawanego  $KMnO_4$ . Punkty na osi odciętych oznaczają rozmaite stopnie zabarwienia wzorca przy 4, 5, 6 i 7 kroplach  $KMnO_4$ . Punkty na osi rzędnych oznaczają ilości kropli  $KMnO_4$ , użytych w próbach.

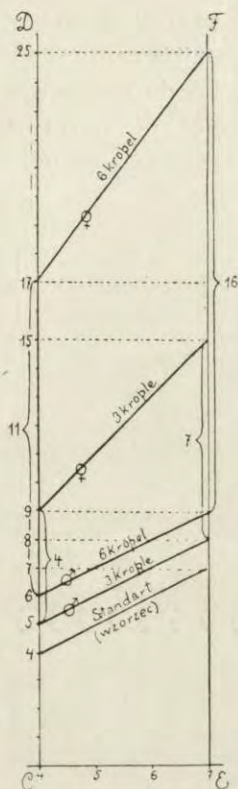
Fig. 2. Velocity of decolorisation of male and female extracts of sexual glands of herrings, according to the number of drops  $KMnO_4$  added to them. Points on abscissa represent different degrees of colouring of standard with 4, 5, 6 and 7 drops of  $KMnO_4$ . Points on ordinate indicate number of drops of  $KMnO_4$  used in tests.



Rys. 3. Wykres wzajemnego stosunku szybkości odbarwienia się wyciągów męskiego i żeńskiego z gruczołów płciowych śledzi, zależnie od ilości dodawanego  $KMnO_4$ . Punkty na osi odciętych oznaczają rozmaite stopnie zabarwienia wzorca, na osi rzędnych zaś ilości kropli  $KMnO_4$ , użytych w próbach.

Fig. 3. Connexion between rate of decolorisation of male and female extracts of the sexual glands of herrings and the amount of  $KMnO_4$  added to them. Points on abscissa indicate different intensities of coloration of standard, on ordinate number of drops of  $KMnO_4$  used in tests.

pełnemu zabarwieniu, punkt 7 zupełnemu odbarwieniu. Na osi rzędnych odkładamy ilość kropeł  $\text{KMnO}_4$ , stosowanych w reakcjach z wyciągami, przytem zaznaczone już było, iż przy ma-



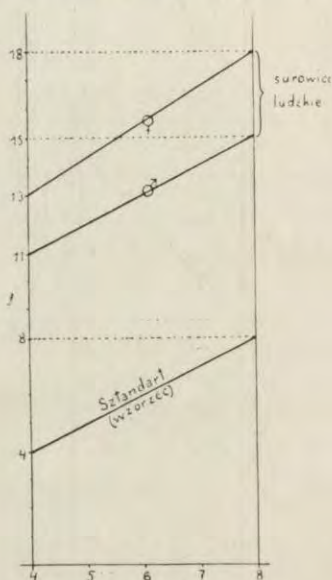
Rys. 4. Wykres zmiany szybkości odbarwiania się wyciągów męskiego i żeńskiego z gruczołów piciowych śledzi, zależnie od ilości dodawanego  $\text{KMnO}_4$ , oraz od ilości używanych w doświadczeniach wyciągów. Punkty na osi odciętych oznaczają rozmaite stopnie zabarwienia wzorca, na osi rzędnych zaś ilości kropeł  $\text{KMnO}_4$ , używanych w próbach.

Fig. 4. Connexion between rate decolorisation of male and female extracts of the sexual glands of herrings, and the number of drops of  $\text{KMnO}_4$ , added to them, and amount of extracts used in tests. Points on abscissa represent different intensities of coloration of standard, on ordinate number of drops of  $\text{KMnO}_4$ , used in tests.

łych ilościach  $\text{KMnO}_4$  otrzymuje się zawsze zupełne zabarwienie, czyli że krzywa zabarwienia w początkowych liczbach kropeł  $\text{KMnO}_4$  idzie pionowo po linii rzędnych (CD), następnie przy pewnej ilości  $\text{KMnO}_4$  zaczyna się odbarwienie coraz to mocniejsze, aż dojdzie do linii (ef) i od tego miejsca idzie pionowo



wgórę, czyli że poczynając od tego punktu, próby zawsze wypadają bezbarwne. Punkty, w których zaczyna się odbarwienie i te, w których występuje ono kompletnie, są inne dla wyciągu męskiego i żeńskiego. Po zrobieniu takich wykresów przekonano się, że linia wyciągów męskich idzie równoległe z linią czystych odczynników (czyli ze standartem), natomiast linia dla wyciągu żeńskiego jest w stosunku do tych dwu rozbieżna. Rozbieżność ta byłaby jeszcze jednym dowodem istnienia dwu odrębnych substancyj *a* i *b*, a to w myśl znanej zasady geometrii anali-



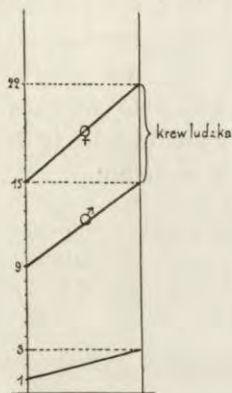
Rys. 5. Wykres stosunku szybkości odbarwienia się surowicy krwi ludzkiej (męskiej i żeńskiej) zależnie od ilości kropeł  $KMnO_4$ . Punkty na osi odciętych oznaczają rozmaite stopnie zabarwienia wzorca po dodaniu 4, 5, 6, 7 i 8 kropeł  $KMnO_4$ , użytych do jego sporządzania. Punkty na osi rzędnych oznaczają ilości kropeł  $KMnO_4$ , użyte w próbach.

*Fig. 5. Connexion between rate of decolorisation of male and female, human blood serums, and the number of drops of  $KMnO_4$ . Points on abscissa represent different intensities of coloration of the standard with 4, 5, 6, 7 and 8 drops of  $KMnO_4$ , used in its preparation, whilst those on ordinate represent number of drops of  $KMnO_4$ , used in tests.*

tycznej, że rozbieżność linii w układzie współrzędnych prostoliniowych jest zależna od różnicy współczynników badanej funkcji — i pozwoliłaby przypuszczać, że wyciąg żeński nie różni się od męskiego zawartością tylko jednej którejkolwiek z tych substancyj, lecz obydwu, czyli że wzór powyższy jako różniący

się obu współczynnikami  $a + 3 b$  dla substancji żeńskiej w stosunku do  $2 a + 2 b$  dla substancji męskiej były najbardziej odpowiedni i faktycznie zachodzący.

Wykresy w ten sposób sporządzono dla śledzi (rys. 2, 3, 4) i dla wyciągów ze skrzepów krwi ludzkiej (6), przyczem punktów, odpowiadających zmieniającej się barwie wzorca, na linii odciętych jest tutaj mniej, gdyż w sporządzaniu tegoż używano nie 0.5 lecz 1% rozczynu  $KMnO_4$ , wreszcie dla surowic ludzkich (5).



Rys. 6. Wykres szybkości odbarwienia się wyciągów wodnych ze skrzepów krwi ludzkiej, zależnie od ilości kropeł  $KMnO_4$ . Punkty na osi odciętych oznaczają rozmaite stopnie zabarwienia wzorca, zaś na osi rzędnych ilości kropeł  $KMnO_4$ , używane w próbach.

Fig. 6. Connexion between rate of decolorisation of aqueous extrats of human blood-clots and the number of drops of  $KMnO_4$ . Points on abscissa represent different intensities of coloration of the standard, on ordinate — number of drops of  $KMnO_4$ , used in tests.

Z wykresów w ten sposób sporządzonych odrazu można się orjentować, czy z pewną ilością wyciągów męskiego i żeńskiego można otrzymać reakcję, w której żeńska byłaby zupełnie zabarwiona a męska zupełnie bezbarwna, gdyż kompletne zabarwienie pierwszej i kompletne odbarwienie drugiej możliwe jest tylko wówczas, jeżeli na wykresie da się zmieścić poziomą linię między początkowym punktem odbarwienia się reakcji żeńskiej, a końcowym męskiej (np. rys. 4); w razie jeżeli ta pozioma przecina linje wyrażające przebieg reakcyj obu wyciągów, wówczas nigdy nie będzie krańcowych różnic (kompletne zabarwienie — kompletne odbarwienie) przy danej ilości wyciągu. Ponadto sporządzenie takich wykresów, czyli określenie punktów, w któ-

rych zaczyna się odbarwienie i w których zachodzi ono kompletnie, daje możność przeprowadzenia reakcji nad wyciągami żeńskimi lub męskimi oddzielnie nie zaś parzysto, jak robiono dotychczas. Przy równoległym przebiegu linii reakcji względem wzorca wyciąg jest męski, przy rozbieżności tych linii — żeński. Zauważono, że dość często krwie żeńskie, które dają reakcję nietypową, mają tylko bardziej niski punkt, w którym zaczynają się odbarwiać, natomiast punkt, w którym odbarwiają się zupełnie, jest normalny. Przy sporządzaniu odpowiednich wykresów zauważono, że używając rozmaitych ilości wyciągu żeńskiego otrzymywano niezawsze równoległe linje: tak np. przeraabiając próby kolejno z coraz to większą ilością kropeł wyciągu żeńskiego z gruczołów płciowych śledzia, przy ilości odczynników 10, 3,  $x$ , 3, 10 otrzymano:

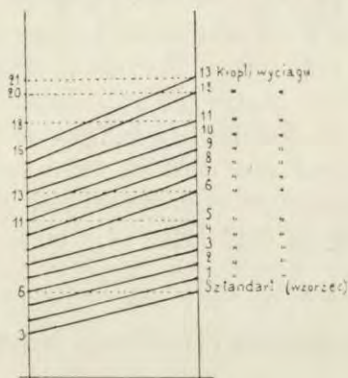
przy jednej kropli wyciągu żeńskiego	zupełne odbarwienie się, czyli górne załamanie krzywej wypadło przy $x = 7$ , czyli 7 kropeł $\text{KMnO}_4$
przy dwu kroplach wyciągu żeńskiego	zupełne odbarwienie się przy 8

przy 3	9
4	10
5	11
6	13 nie zaś 12
7	14
8	15
9	16
10	17
11	18
12	20 nie zaś 19

Na wykresie przedstawiałoby się to w następujący sposób (rys. 7). Dla wytłumaczenia tych skoków możnaby przypuścić, że zwiększane ilości kropeł wyciągu nie są w reakcji ściśle współmierne z kroplami dodawanego  $\text{KMnO}_4$ , to też przy pewnej liczbie kropeł (tu 6) powstaje odpowiednio brak pewnej ilości nadmanganianu potasowego, potrzebnego do odbarwienia, który uzupełnia się dopiero po dodaniu następnej kropli tego odczynnika. Brak ten, zbierając się nieznacznie, znowu ujawni się przy 12 kroplach wyciągu i 19 kroplach  $\text{KMnO}_4$  i t. d. Dalsze jednak próby stają się utrudnione wskutek trudności technicznych, wynikających z udziału w reakcji zbyt dużej ilości wyciągów, wzglę-

dem których dodanie jednej kropli daje tylko słabą różnicę zabarwienia.

Jeżeli każdą z powyższych prób przedstawić jako krzywą na wykresie, to przy użyciu w próbach 3—5 kropeł wyciągu otrzymany szereg równoległych linii. Krzywa, wykazująca reakcję z 6 kroplami, da już większe odchylenie, następne z kolei



Rys. 7. Wykres kolejno występujących dysproporcji w stosunku liczb kropeł badanego wyciągu i potrzebnych do ich odbarwienia się liczb kropeł  $KMnO_4$ . Punkty na osi odciętych oznaczają rozmaite stopnie zabarwienia wzorca, na osi rzędnych zaś—ilości kropeł  $KMnO_4$ , używane w kolejnych próbach.

Fig. 7. Connexion between successively occurring disproportionalities between the number of drops of extract examined and the number of drops of  $KMnO_4$  required for their decolorisation. Points on abscissa represent different intensities of coloration of standard, on ordinate — number of drops  $KMnO_4$  used in successive tests.

próby od 6 — 12 kropeł dadzą linje równoległe, linja zaś wykazująca przebieg reakcji przy 12 kroplach da znowuż większe odchylenie, czyli że w danym przypadku przy zwiększeniu ilości wyciągu, biorącego udział w reakcji, o 6 kropeł, krzywa staje się coraz bardziej pochylą, innymi słowy, odbarwienie następuje z nieproporcjonalnie większą ilością  $KMnO_4$ .

Podany tu wykres odpowiada przebiegowi reakcji z wyciągiem z żeńskich gruczołów płciowych śledzi. Pochylenie więc krzywych zmienia się zależnie od stężenia wyciągu.

Sporządzając wyżej omawiane wykresy, miałem sposobność stwierdzić, że ten sam wyciąg, trzymany w zwykłych warunkach doświadczalnych, po upływie kilku dób wykazał drugi przeskok dopiero przy 14, a nie przy 12 kroplach, co zgadzałoby się z powyżej wzmiankowanym twierdzeniem, że wyciąg im jest starszy,

tem jest słabszy, to znaczny — zatrzymuje graniczną reakcję przy większej liczbie kropeł wyciągu lub daje taką samą reakcję przy mniejszej ilości nadmanganjanu.

Taką samą rozbieżność linii zależnie od większej ilości wyciągu w próbach, jako też i większą rozbieżność linii, wykazujących przebieg reakcji żeńskiej również przy rozmaitych ilościach wyciągów widzimy na rys. 4, gdzie wykres odpowiada przebiegowi reakcji z bardziej stężonymi wyciągami.

Rozbieżność linii, wykazujących przebieg reakcyj, da się oznaczyć jako różnica kropeł użytego nadmanganjanu, odpowiadających punktom na liniach *CD* i *EF* w miejscach między sporządzonymi wykresami dla męskich i żeńskich wyciągów [czyli że w ten sposób wyrażona rozbieżność linii przy 3 kroplach wyciągu równałaby się tu 3 (7 mniej 4), przy 6 kroplach zaś 5 (16—11, rys. 4)].

#### VIII. Badania chemiczne i modyfikacja reakcji Biernackiego.

Skoro w doświadczeniach powyższych zostało stwierdzone, że różnice, powodujące odmienne reakcje zależnie od płci, są prawdopodobnie natury czysto ilościowej, to powstawało pytanie, na czym ta różnica polega. Przedewszystkiem nasuwało się przypuszczenie, że różnica ta zależy od różnic w zawartości ciał białkowych. Dla stwierdzenia tego próbowałem oznaczać zawartość azotu metodą *KHJELDALA* w wyciągach z wątrób bydłęcych. Do prób używałem wyciągów z 25 g wątroby posiekanej, zalanej 80 — 100 cm<sup>3</sup> wody destylowanej. Rezultaty jednak tych prób były zmienne i niestałe: w zbadanych 8 parach prób wykryto nieznaczny nadmiar substancyj białkowych w żeńskich wyciągach, w dziesięciu natomiast żadnej różnicy stwierdzić nie mogłem, w 2 zaś znalazłem nadmiar substancyj białkowych w wyciągu męskim. Przy równoległym badaniu części tych wyciągów na reakcję *MANOJLOWA*, próby wypadły chociaż słabo, lecz zawsze dodatnio. Dodać należy, że próby przeprowadzałem w zimie. Szczegół ten podkreślam dlatego, że reakcje przeprowadzane z wyciągami z wątroby w zimie z reguły dają słabsze różnice, niż w okresie wiosennym. Być może różnica ta zależna od pory roku pozostawałaby w związku z intensywnością metabolizmu żywszego w czasie godowym, który w znacznym

stopniu wpływa na przebieg reakcji. Stwierdzony bowiem został fakt (RIDL i REINHARD), że krew gołębi młodych daje inną reakcję, niż starych, co potwierdzałoby powyższe przypuszczenie. Zależności tej jednak ściśle nie stwierdziłem i ilościowo nie określiłem, muszę przytem zaznaczyć, że reakcje w tym czasie przeprowadzałem z nowo sprowadzonymi odczynnikami i często obserwowaną nietypowość reakcyj kładłem na karb tych ostatnich.

Zkolei przeprowadzono próby w celu wykazania różnic ilościowych w zawartości ciał organicznych wogóle w żeńskich i męskich wyciągach z wątroby zapomocą metody KUBEL-TIEMANNA, które również nie dały konkretnych rezultatów, chociaż cprawda przerabiałem je małą ilość razy.

Następnie próbowałem wykryć różnice w zawartości wogóle jakichkolwiek bądź ciał zdolnych do utleniania się, dodając wprost do wyciągów rozczyntu  $\text{KMnO}_4$ . Doświadczenia przeprowadzałem z wyciągami z gruczołów płciowych śledzi kilkakrotnie w sposób następujący: do 8 kropeł wyciągu dodawałem 1—2  $\text{cm}^3$  wody i parę kropeł 0.5% rozczyntu  $\text{NaOH}$ . Następnie równocześnie do obu prób dodawałem po jednej kropli 1% rozczyntu  $\text{KMnO}_4$ . Przytem zauważyłem, że zielonkawe zabarwienie, wywołane nadmanganianem potasu, niejednakowo prędko znika, a mianowicie znacznie prędziej w próbach żeńskich. W następnych doświadczeniach, też przy użyciu mniej więcej 1  $\text{cm}^3$  wyciągu, co się równało około 37 kroplom, zauważyłem, że w próbach żeńskich nietylko prędziej, lecz i większa ilość nadmanganianu się odbarwia. Następnie próbowałem wykazać różnicę zależną od płci zapomocą tejże metody w wyciągach z wątrób i w surowicach krwi ludzkiej, lecz wyraźnych wyników i tu nie otrzymałem.

Próby te jednak zbliżyły mnie znacznie do reakcji BIERNACKIEGO, która, jak wiadomo, polega na tem, że do wyciągów, przyrządzonych w izotonicznych rozczyntach  $\text{NaOH}$  i  $\text{KOH}$  (dla człowieka  $\text{KOH}$  0.816%,  $\text{NaOH}$  0.582%), dodaje się kroplę odczynnika tego autora. W skład tego odczynnika wchodzą: 1% rozczyntu Dhalji, zieleni metylenowej i eozynty. Powstawać przy tem powinno rozmaite zabarwienie prób męskich i żeńskich. Ponieważ w podanej przez BIERNACKIEGO ('29) metodzie używa się rozczyntów barwików alkoholowych, a we wskazówkach, przesłanych nam listownie, BIERNACKI radzi używać rozczyntów wodnych, próbowałem stosować obydwaj rodzaje tych

rozczyńców. Mimo to w wielokrotnie i w rozmaicie przygotowywanych i rozmaitych wyciągach nie mogłem wykryć żadnych różnic. Spróbowałem więc następnie wyłączać kolejno barwiki z odczynnika BIERNACKIEGO i stosować także każdy barwik z osobna. Pozwoliło mi to ustalić pewną modyfikację tejże reakcji, dającą się zastosować w wielu przypadkach. Do doświadczeń tych używałem wyciągów z gruczołów płciowych śledzi. Brano do próby 8—20 kropeł wyciągów i dodawano od 5—10 kropeł mieszaniny wspomnianych alkali. Następnie dodawano kolejno każdy z barwików, wchodzących w skład odczynnika BIERNACKIEGO. Po dodaniu 1% roztworu Dhalji różnice nie występowały, toż samo po dodaniu eozyny. Natomiast po dodaniu zieleni metylenowej natychmiast występowała różnica, która po chwili zniknęła (obydwie próby się odbarwiały) i występowała znowuż po dodaniu następnej kropli zieleni metylenowej. Z tego doświadczenia widać, że w wyciągach męskich i żeńskich odbarwienie zieleni metylenowej zachodzi niejednakowo szybko. Po zbyt dużym stopniu zalkalizowania odbarwienie w obydwu próbach zachodzi tak prędko, że nie można zauważyć jakiegokolwiek bądź różnicy. Natomiast po zbyt słabym zalkalizowaniu różnice występują dopiero po upływie mniej lub więcej dłuższego czasu. To też dla każdej ilości badanego w ten sposób wyciągu trzeba dostosować ilość poprzednio zadawanych do wyciągów alkali. W następnej serii prób dodawano zieleni metylenowej razem z każdym kolejno z pozostałych barwików. Po dodaniu zieleni metylenowej i Dhalji zaobserwowane zjawisko ginie: widocznie Dhalja dzięki ciemnemu zabarwieniu uniemożliwia zauważenie różnicy zabarwień, eozyna natomiast zmienia tylko kolor prób. Gdy czysta zieleń metylenowa dawała, zależnie od czasu stania próby i od stopnia zalkalizowania, zabarwienia ciemno i jasno niebieskie lub niebieskie i bezbarwne, to po dodaniu doń eozyny zabarwienia były fioletowe i czerwone. Po zmieszaniu 8 kropeł tego wyciągu z 2 cm<sup>3</sup> wody i po dodaniu zieleni metylenowej różnice wogóle nie występowały. Występowały natomiast po zalkalizowaniu. To samo, tylko mniej wyraźnie, dało się spostrzec w doświadczeniach nad wyciągami z wątrób byka i krowy. Do 8 kropeł otrzymanego wyciągu dodawano 2—3—4 krople 0.5% roztworu NaOH i jednocześnie do obu prób męskiej i żeńskiej po 1 kropli 1% roztworu zieleni metylenowej. Również wyraźne różnice otrzymywano, wrzucając jednakowe kawałeczki

wątrób do kilku  $\text{cm}^3$  wody i następnie dodając po kropli zieleni metylenowej, przytem lekko alkaliczując. To samo przerabiano ze skórą żab. Dla uproszczenia próbowano zmaczać kawałeczki bibuły w badanych wyciągach i w słabych alkaliczach, a następnie opuszczając na nie kroplami barwik. W podobny sposób postępowano ze świeżo zdjętą z żab skórą, zanurzając ją przed badaniem do roztworu ługu. Dodawanie zieleni metylenowej we wszystkich wyżej wspomnianych próbach powinno odbywać się jednocześnie do prób męskich i żeńskich, gdyż zabarwienie w obydwu, szczególnie po znaczniejszem nieco zalkalizowaniu, niknie bardzo prędko. To też lepiej odmierzone ilości przygotowanych i zalkalizowanych wyciągów przelewać jednocześnie do różnych probówek, zawierających odmierzoną ilość barwika. Przelewanie męskiej i żeńskiej próby powinno być jednoczesne (probówki do każdej reakcji są trzymane w obu rękach), by móc porównywać. W badanych jednakowoż w ten sposób 12 parach wyciągów spotkałem dwa razy brak jakiegokolwiek różnicy, dwa razy zaś różnica wypadła odwrotnie.

#### IX. Reakcje z materiałem roślinnym.

W próbach przerabianych na wyciągach z organizmów roślinnych stosowałem tylko reakcję MANOJŁOWA. Wyciągi z roślin sporządzano w ten sam sposób, co i z tkanek zwierzęcych. Odważone i posiekane lub w moździerzku roztarte kawałeczki roślin zalewano wodą destylowaną i pozostawiano na dobę.

Badając wyciągi z kwiatów brzozy, brano 8 g kwiatów i zalewano  $40 \text{ cm}^3$  wody. Występująca tu reakcja jest wręcz odwrotna: wyciąg z kwiatów żeńskich daje odbarwienie, z kwiatów męskich zabarwienie utrzymuje, liście zaś dają zabarwienie pośrednie z liljowem odcieniem czyli reakcja wypada odwrotna. Po wysuszeniu tych kwiatów w temperaturze pokojowej otrzymano odwrócenie reakcji: teraz już najmocniejsze zabarwienie dawał wyciąg żeński, pośrednie zaś liście, a najslabsze — wyciąg męski (patrz tablicę barwną). Różnica jest tu bardzo wyraźna, gdyż przy użyciu do próby jednego  $\text{cm}^3$  wyciągu żeńskiego zaczyna on się odbarwiać przy 17, a męski przy 5 kroplach  $\text{KMnO}_4$ .

Wytłumaczyć ten odwrotny wynik reakcji można byłoby tem, że kwiaty męskie zawierają o wiele mniej wody i są przeto znacznie



lżejsze. To też przy odważaniu daleko więcej bierze się męskich niż żeńskich kwiatów i przez to wyciąg męski staje się mocniejszy, niż żeński, chociaż stosunkowo kwiaty męskie zawierają substancyj „płciowej“ mniej, niż kwiaty żeńskie. Przyczyna ta da się usunąć przez równoczesne wysuszenie tak żeńskich, jak i męskich kwiatów.

O ile kwiaty nie różnią się od siebie zbyt zawartością wody, to znaczy przy odważaniu bierze się mniej więcej jednakoowe masy tak męskich jak i żeńskich kwiatów (np. kwiaty turzycy), wówczas dają one prawidłową reakcję zarówno przed jak i po wysuszeniu. Taką prawidłową, tylko trochę mniej wyraźną reakcję dają wyciągi z plechami męskimi i żeńskimi *Marchantia polymorpha*.

W celu wyjaśnienia, w którym z organów ciała roślinnego powstają specyficznie substancje płciowe,— sporządzałem wyciągi z turzycy jednocześnie z ich kwiatów męskich i żeńskich, łodyg i liści. Okazało się, że liście dają reakcję pośredniej intensywności w stosunku do wyciągów z kwiatów, analogicznie do doświadczeń nad wysuszonymi kwiatami i liśćmi brzozy. Łodyga natomiast daje reakcję o wiele jaśniejszą. Zrodziło się stąd przypuszczenie, że substancja lub substancje, cechujące płęć, powstają w liściach, a dopiero potem zostają przeprowadzone przez łodygę i gromadzą się w kwiatach, i to przeważnie w kwiatach żeńskich, co zgadzałoby się z poprzednim doświadczeniem, które wykazało, że najmocniejszy jest wyciąg z kwiatów żeńskich, jaśniejszy z liści, jeszcze jaśniejszy z kwiatów męskich, najjaśniejszy zaś z łodygi, jako z tej części, która nie gromadzi w sobie, a tylko przeprowadza tę substancję do kwiatów.

Celem potwierdzenia tych przypuszczeń przerobiłem następujące próby: zrobiono wyciąg z górnych i dolnych części łodygi kwitnącej czechrzycy leśnej (*Anthriscus silvestris*), wychodząc z założenia, że w górnych odcinkach łodygi będą przeprowadzane naraz większe ilości substancji płciowej, niż w odcinkach dolnych, jako pochodzące z większej ilości liści. To też wyciąg z części górnych musiałby dawać reakcję ciemniejszą, niż z dolnych. Doświadczenie, postawione w ten sposób, rzeczywiście potwierdziło to przypuszczenie, pod warunkiem wszakże, aby przed sporządzaniem wyciągu była usunięta zewnętrzna warstwa tkankowa zawierająca chlorofil. Usuwanie jej należy skutecznie z dwu

przyczyn, po pierwsze, dlatego, że chociaż waga kawałeczków z dolnej i górnej części łądygi jest jednakowa, to jednak powierzchnia ogólna tych ostatnich będzie zawsze większa, gdyż odcinki łądygi w górnych częściach mają mniejszą średnicę, a przez to stosunek warstw zewnętrznych do tkanek przeprowadzających będzie różny w próbach z górnych i z dolnych części łądygi, co znowu wpłynie na powstanie zabarwienia w reakcjach; czynny bowiem powinien tu być wyciąg tylko z tkanki przeprowadzającej. Po drugie, wyciąg z górnych części, w myśl poprzedniego rozważania, będzie zawierał więcej warstw zewnętrznych, a przez to i więcej gromadzącego się w nich chlorofilu, który przechodząc częściowo do wyciągu już z racji swej barwy może gmatwać reakcję. Rozważanie powyższe potwierdza i ten fakt, że różnica między wyciągami z górnej i dolnej części łądygi przy zachowaniu tych warstw wypadła nieraz bardzo słabo lub nawet odwrotnie, zależnie od tego, czy brano do przyrządzania wyciągu grubsze, czy cieńsze kawałeczki łądygi, gdyż w cienkich łądygach stosunek ilościowy warstw zewnętrznych do tkanki przeprowadzającej zmienia się na niekorzyść tej ostatniej i reakcja w tym przypadku musiałaby być jaśniejsza.

Analogiczne doświadczenie z wyciągami z dolnych i górnych części łądygi przerabiano ze spireją i rezultat w tym przypadku był taki sam, tylko znacznie słabszy.

Jeśli zatem substancja cechująca płęć powstaje w liściach i zostaje przeprowadzona do kwiatów, gdzie się gromadzi, to powstaje pytanie, jaka część kwiatów zawiera jej najwięcej. Wyciągi robione z pręcików, słupków i płatków kwiatów *Chelidonium majus* nie dały mi rezultatów z powodu trudności w przygotowywaniu wyciągów (zbyt mała ilość i drobne kwiaty).

Następne próby były przeprowadzane na wyciągach z części kwiatów pomarańczowej lilji *Lilium croceum*. Wyciągi sporządzane z pręcików, słupków i płatków dały reakcję w uszeregowaniu odwrotnem aniżeli u zwierząt, a mianowicie: pręciki dały zabarwienie najciemniejsze, pośrednie—płatki, a najjaśniejsze—słupki. Przy sporządzaniu wyciągów  $1\frac{1}{2}$  g tkanek po roztarciu zalewano 6 cm<sup>3</sup> wody i pozostawiano na dobę. Do reakcji używano 1 cm<sup>3</sup>.

Analogicznie do poprzednich doświadczeń z brzozą, wysuszone pręciki, słupki i płatki w temperaturze około 60 stopni. Wyciągi sporządzano, dodając 0.5 g do 15 — 20 g wody. Do

reakcji brano również 1 cm<sup>3</sup> wyciągu. W tym przypadku najmocniejsze zabarwienie dawały płatki, następnie pręciki i najsłabsze słupki, czyli reakcja zostaje nadal odwrotną. Celem wyjaśnienia przyczyn tego zjawiska przerobiono próby z następującym szeregiem wyciągów: 1) z pręcików z pylnikami, niepozbawionymi pyłku, 2) z pręcików z pylnikami, pozbawionymi pyłku przez staranne zmywanie ich wodą i osuszanie bibułą, 3) z pręcików bez pylników czyli z nitek, 4) ze słupków, 5) z płatków. Tu również najmocniejsze zabarwienie dały wyciągi z pręcików z pylnikami z nieusuniętym pyłkiem. Trochę jaśniejsze i jednakowej intensywności zabarwienie dały pręciki z pylnikami pozbawionymi pyłku i słupki, jaśniejsze płatki i wreszcie najjaśniejsze wyciągi z nitek pręcików. Rezultat tych prób pozwala przypuszczać, że reakcja pozostaje tu odwrotną wskutek nierównomiernego rozmieszczenia ciemnego barwika w kwiecie. Widzimy tu, że po usunięciu pylników reakcja wypadła prawidłowo, czyli że słupki dają reakcję ciemniejszą niż nitki, płatki zaś pośrednią. W pylniku więc i pyłku należy szukać przyczyny gmatwującej reakcję. Rzeczywiście w tym przypadku sam pyłek i pylniki są wyraźnie zabarwione, przeto i wyciągi z nich są barwne.

W celu wyświeślenia, w której części słupka najwięcej jest czynnika, wywołującego reakcję, przerobiłem następnie próby z rozmaitych części słupków tej samej pomarańczowej lilji. Wyciągi z załązki dawały znacznie ciemniejsze zabarwienie, niż z szyjki i znamienia, co pozwala na wyprowadzenie wniosku, że substancja cechująca płęć gromadzi się przeważnie w załązku. Doświadczenia te są w zgodzie z wynikami już otrzymanymi poprzednio na pleśniakach (SATINA i BLAKESLEE, Proc. Nac. Acad. Sc. Washington, XII, 197—206, 1926). Autorzy ci również doszli do przekonania, że i narządy kwiatów dają reakcję zgodnie z płcią.

Wyciągi, sporządzane przeze mnie z płatków żeńskich i męskich kwiatów rośliny dwupiennej *Melandryum album* (biorąc po 1.5 g i 15 cm<sup>3</sup> wody) nie wykazały różnicy być może dlatego, że były one zbyt słabe, ale nie wyłączone też byłoby przypuszczenie, że płatki wogóle nie dają różnicy zależnej od płci, co poniekąd byłoby wytłumaczone tem, że płatki są filogenetycznie przekształconymi liśćmi, a więc organami, które tę substancję nie gromadzą, lecz tylko wytwarzają w sobie.

### Streszczenie.

1°. Przeprowadzając badania nad wyciągami z gruczołów płciowych śledzi solonych i karasi żywych, autor stwierdza 100% prawidłowej reakcji MANOJŁOWA w jej 3-ciej modyfikacji.

2°. Z reakcyj nad narządami żaby tylko wątroba daje 100% prawidłowych odpowiedzi, a również i względem wątrób była reakcja wypada najwyraźniej, z czego autor wnioskuje, że pod względem zawartości substancyj cechujących płęć w reakcji MANOJŁOWA wątroba stoi na pierwszym miejscu.

3°. Krew ludzka (skrzepy i surowica po „Wassermanie“) dała około 90% prawidłowych reakcyj. Ślina ludzka również pozwala na określenie płęci zapomocą reakcji MANOJŁOWA.

4°. Hemoglobina w reakcjach krwi przyczynia się wybitnie do utrzymywania zabarwienia.

5°. Papajotylna, używana w reakcji, jest potrzebna tylko do wykazania różnic w bardzo słabych wyciągach lub przy małej ich ilości.

6°. Podstawą reakcji MANOJŁOWA są różnice ilościowe, występujące w dwóch bliżej nie oznaczonych substancjach.

7°. Substancje cechujące płęć w reakcji MANOJŁOWA prawdopodobnie nie są białkami, są one (lub przynajmniej jedna) znacznie termostabilne, niszczy je dość prędko czas, natomiast słabo — zamrażanie i gnicie.

8°. W świecie roślinnym substancje, cechujące płęć w reakcji MANOJŁOWA, tworzą się w liściach, a następnie zostają przeprowadzone do kwiatów, gdzie gromadzą się przeważnie w zalążniach.

9°. Po lekkim odpowiednio dobraniem zalkalizowaniu wyciągów z niektórych narządów jako odczynnik na płęć może służyć 1% roztwór wodny zieleni metylenowej.

Pragnę wyrazić głęboką wdzięczność przede wszystkim p. Prof. Dr. Janowi Wilczyńskiemu, pod którego kierownictwem pracując już przeszło 2 lata korzystałem z niejednej cennej wskazówki i pomocy, który nie szczędził trudu czy to udzielenia życzliwej i pożytecznej rady, czy to wyszukania i zaznajamiania się z odpowiednią literaturą. Niemniejszą wdzięczność wi-

nieniem p. Dr. Kazimierze Urbanowiczównie, której pożyteczne rady ułatwiały mi niejednokrotnie pracę. Laboratorium Chemiczno-Bakterjologicznemu Prof. Dr. Opoczyńskiego i Dr. Jakóbowskiego w osobach wyżej wspomnianych, oraz Państwowemu Instytutowi Higjeny w osobie Dr. Prażmowskiego, jako też Dr. Gelmanowi z Laboratorium Miejskiego Szpitala dziękuję za użyczenie skrzepów i surowic krwi po Wassermanie, które mi służyły do niniejszej pracy. Wreszcie podziękować pragnę p. E. Lenkiewiczowi, współpracownikowi Zakładu Biologii za zawsze staranne dostarczanie materiałów potrzebnych do badań.

### Objaśnienie tablicy I.

Reakcja MANOJŁOWA w naturalnych kolorach:

A i B	♂ i ♀	reakcja z gruczołów płciowych śledzia,
C i D	♂ i ♀	„ z wyciągiem z suszonych kwiatów brzozy,
E i F	♂ i ♀	„ z wyciągami wodnymi ze skrzepów krwi ludzkiej.

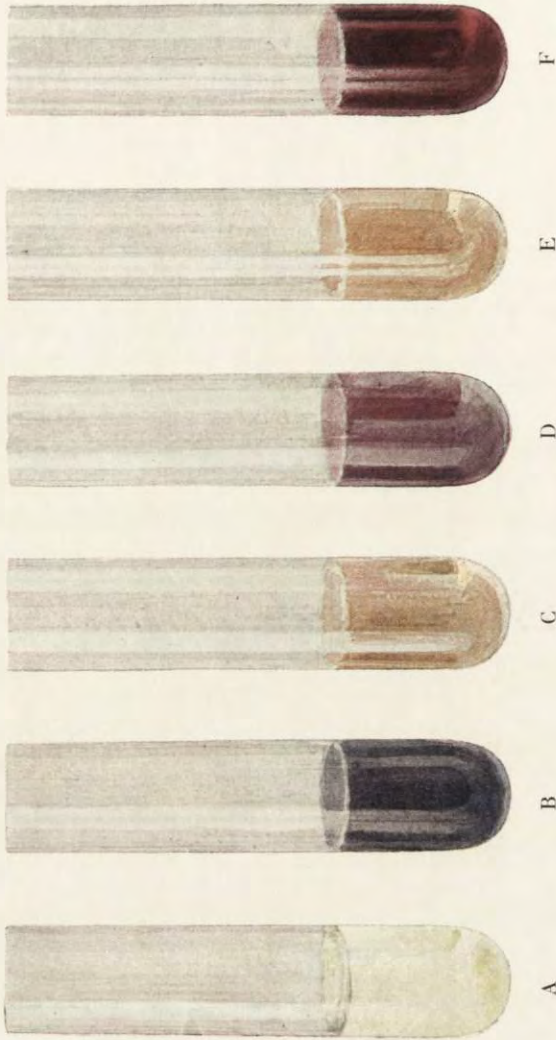
(Tablicę z natury bezpośrednio po dokonywanych reakcjach wykonała p. Eugenia Kowalska, rysowniczka Zakładu Biologii Ogólnej Uniw. Wileńskiego).

### Piśmiennictwo

- Biernacki M. L.** 1924. Specyficzna reakcja na postawi właściwości roślinnych ta twarinyh tkanin. Zapisk. Kamien. Sielsk. Gosp. Inst. 1 (1).  
**Crew F. A.** 1926. Blutreaction and Sex. Nature. 118 (85).  
**Calisto J.** 1926. Sur la réaction de Manoiloff chez le cobaye. C. R. Soc. Biol. 94 (904).  
**Czigarin.** 1928. K woprosu o primienienji reakcji Manojłowa dla opredielenia poła wnutriutrobnago ploda. Kazanski Med. Żurnał, № 9.  
**Ferreira de Mira M.** 1927. Sur la réaction de Manoiloff. C. R. Soc. Biol. 98 (877).  
**Ferreira de Mira M.** 1928. Sur l'interpretation de la réaction de Monoiloff. C. R. Soc. Biol. 98 (83).  
**Gawiało M., G. Włodimirow, A. Winogradow, W. Ooppel.** 1926 Zur Frage nach dem Chemismus der Monoiloffschen Reaktion und ihre Spezifität. Biochem. Zeitschr. 96 (189).  
**Joyet Lavergne Ph.** 1928. L'interpretation de réaction de Monoiloff. C. R. Soc. Biol. 99 (766).  
**Krasinskaja-Ignatowa V. N.** 1929. Farbige Blutreaktion zur Geschlechtsbestimmung. Deutsch. Zeitsch. d. gesamt. Gesicht. Med. 13 (278).  
**Kuzniecowa K.** 1927. Die Reaktion von Manoiloff bei patalogischen Zuschtänden. Zeit. f. d. gesamt. Exp. Med. 55 (133).  
**Lecius W.** 1927. Über die Geschlechtsbestimmung bei Menschen durch die chemische Blutreaktion nach Manoiloff. Inaugural - Dissertation. Königsberg.  
**Leopold G.** 1924. Die Geschlechtsbestimmung. Verhandl. d. Physik. Med. Gesellschaft zu Würzburg. 49 (163).  
**Orthon J. H.** 1927. Manoilov's blood test for sex. Nature. November (768).  
**Perkins M.** 1927. The Manoilov and other

chemical sex reaction. *Nature*, November (654). **Polonowski M.** 1929. Sur la réaction de Manoïloff. *C. R. Soc. Biol.* **100** (1867). **Polonowski M.** 1929. Sur la valeur de la réaction de Manoïloff. *C. R. Soc. Biol.* **100** (870). **Riddle O.** 1927. Metabolic changes in the body of female Pigeons at ovulation. *Proc. Amer. Phil. Soc.* **66** (497). **Satina G. a. M. Demerec** 1925. Manoïlov's reaction for identification of the sexes. *Science*, September (225). **Schmidt A. i N. Perewosskaja**, 1926. Physiologisch-chemische Begründung der Manoïloffschen Reaktion. *Biochem. Zeitschr.* **176** (198). **Sołowcowa A.** 1927. Reakcja Manoïłowa i jejo biologiczeskoje znaczenje i pierspiektiwy. **Schratz E.** 1926. Zur Frage der Geschlechtsdiagnose auf Grund chemischer Reaktionen. *Biol. Zentralblatt.* **47** (629).

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



Eugenja Kowalska del.

Al. Wolański.





[Zakład Chemji Fizjologicznej Uniwersytetu Warszawskiego]

M. Z. Grynberg.

## Kinetyka działania urikazy.

### *Kinetik der Urikasewirkung.*

Rękopis nadesłany w dniu 27.II.1931 r.

Die vom Verfasser während seiner Versuche gebrauchte Urikase (das Enzym, welches Harnsäure zu Allantoin oxydiert) stammte von Rindesnieren und von Fröschen her. Die Harnsäure wurde als eine Lösung vom harnsauerem Natron gebraucht, und colorimetrisch nach FOLIN-DENIS, oder gasometrisch nach BARCROFT-WARBURG bestimmt.

Die Analyse der Reaktionskinetik hat folgende Resultate ergeben:

1°. Die Urikase ist in Wasser unlöslich und muss als Suspension angewandt werden. Um homogene Urikasesuspensionen zu erhalten, wurden die Systeme während des Versuches geschüttelt.

2°. Der U-Abbau ist in Sauerstoffatmosphäre viel energischer als in gewöhnlicher Luft (Tab. I).

3°. Die Zugabe der bis auf 100° erhitzten Urikase verkleinert unbemerktlich die Reaktionsgeschwindigkeit (Tab. II). Die Zugabe vom Filtrat der so erhitzten Urikase übt auf die Kinetik keinen Einfluss aus (Tab. III).

4°. Allantoin, auch in ganz gesättigten Lösungen, bleibt ohne Einfluss auf die Urikalyse (Tab. IV).

5°. Die Urikase ist ein Idealkatalysator (Tab. V).

6°. Die enzymatische Harnsäurezersetzung verläuft unter Aufnahme von einem Atom Sauerstoff und einem Molekül Wasser pro 1 Molekül Harnsäure, und unter Ausscheidung von einem Molekül Kohlendioxyd (Tab. VI—VII).

7°. Die Sauerstoffaufnahme und der Harnsäureabbau sind von der Frische des Urikaseauszuges nicht abhängig. Der respi-

ratorische Quotient der bei frischen Extrakten dem theoretischen, d. h. — 2 gleich ist, nimmt im Gegensatz bei älterndem Auszüge ab (Tab. VIII).

8°. Die Affinitätskonstante der Verbindung: „Urikase-Harnsäure“ ist ziemlich gross (Tab. XIV).

9°. Die Kinetik ist der Reaktion der 1. Ordnung genähert (Tab. XI—XII).

10°. Der  $\bar{U}$ -Abbau ist in gewissen Grenzen der angewandten Urikasemengen proportional (Tab. IX—X).

11°. Der Zerfall ist von der Harnsäurekonzentration abhängig und nimmt mit der  $\bar{U}$ -Konzentration zu. Bei grösseren Harnsäuremengen ist die Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration unabhängig (Tab. XI—XII).

12°. Schwache Konzentrationen des Propyl- und des Butylalkohols beschleunigen, grössere hemmen den Harnsäurezerfall (Tab. XV—XVIII).

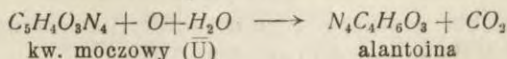
13°. Die hemmende Alkoholwirkung ist der Konzentration des Alkohols proportional und von der  $\bar{U}$ -Konzentration unabhängig (Tab. XVII—XVIII).

14°. Die Hemmung des Butylalkohols ist reversibel, die des Propylalkohols—unreversibel (Tab. XIX—XX).

## 1. W s t ę p.

Kwas moczowy ulega rozpadowi w organizmie wielu zwierząt pod wpływem swoiście działającego enzymu—urikazy.

Produktami reakcji są: alantoina i dwutlenek węgla. Sumarycznie reakcja przedstawia się następująco:



Rozpad zachodzi więc jednocześnie z pobraniem jednego atomu tlenu i jednej cząsteczki wody.

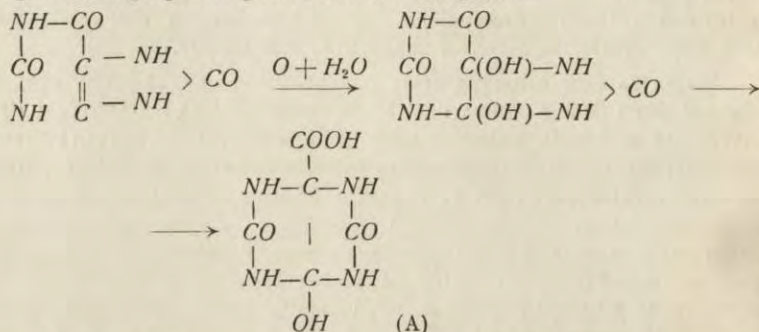
Pierwsze badania nad enzymatycznym rozpadem kwasu moczowego wykonane były przez: STOOCKWISA ('59), CHASSEVANTA i RICHETA ('97), ASCOLEGO ('98) i JACOBYEGO ('99), który pierwszy zwrócił uwagę na tworzenie się alantoiny. Dopiero WIECHOWSKI ('06) wykazał, że alantoina jest obok dwutlenku węgla jedynym produktem rozpadu  $\bar{U}$  pod wpływem urikazy. WIECHOWSKI i WIENER ('06) wykonali w tym kierunku szereg doświadczeń, w których jako źródło urikazy używali sproszkowanych i wysuszonych nerek bydłych. Wykazali oni, że trzęsienie wpływa przyspieszająco na rozpad; w nieobecności powietrza (tlenu) rozpad nie zachodzi, jak również w środowisku kwaśnym. Ciała antyseptyczne (chloroform, toluen) w małych ilościach nie hamują reakcji, to samo dotyczy alkoholu metylowego i etylowego ( $\frac{1}{2}$ ) oraz alantoiny.

Prawie wszystkie wyżej wymienione wyniki zgodne są z rezultatami naszych badań. Autorzy ci badali również zależność urykolizy od ilości fermentu i substratu. Ponieważ jednak używali rozmaitych ilości roztworu przy tej samej ilości kwasu moczowego, a tem samem różnych stężeń kwasu, więc wyniki mają raczej znaczenie orientacyjne.

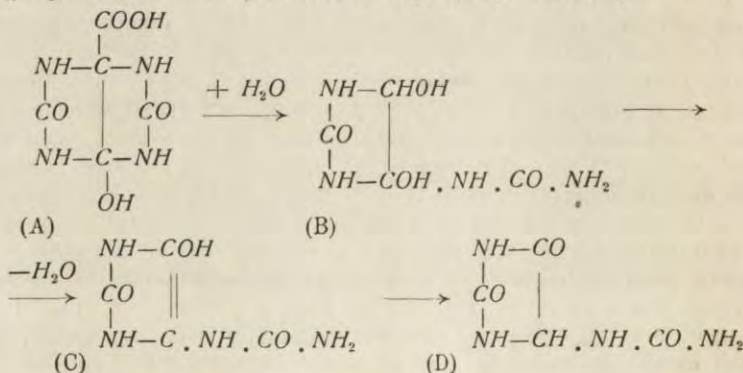
W tym samym czasie zostały poczynione pierwsze próby oczyszczania enzymu przez WIENERA ('05), SCHITTENHELMA ('05), GALLEOTI'EGO ('11) i innych. Jak wykazały jednak ostatnie badania PRZYŁĘCKIEGO ('29) i TRUSZKOWSKIEGO ('30), roztwory oczyszczone zawierają bakterje aerobiczne, które samoistnie rozkładają  $\bar{U}$ , tak że wszelkie badania, wykonane na roztworach oczyszczonych, są nieistotne. Urikaza jest fermentem nierozpuszczalnym ani w wodzie, ani w roztworach wodnych elektrolitów i może być jedynie użyta w formie zawiesiny. Z badań dawniejszych wartość mają więc te prace, w których jako enzymu urikolitycznego użyto bądź tkanki świeżej, bądź sproszkowanej i to wobec antyseptyków. Badania bez dodatku antyseptyków mają jednakże również wartość, o ile nie trwają dłużej, niż 3—4 godziny, gdyż po upływie tego czasu aeroby zaczynają rozkładać  $\bar{U}$ . Zresztą prac, wykonanych przy użyciu oczyszczonej urikazy, było bardzo mało. Oprócz pracy WIECHOWSKIEGO i WIENERA warunkom wyżej omówionym odpowiadają prace BATELLIEGO i STERN ('09) oraz FELIXA, SCHEELA i SCHULERA ('29). BATELLIEGO i STERN, którym zawdzięczamy nazwę urikazy, badali zależność między wydzielonym  $\text{CO}_2$  a pobranym tlenem, znajdując, że stosunek ten wynosi 2, t. j. równa się teoretycznemu. Badania te wykonane zostały przy użyciu świeżych i zmieszanych nerek lub wątrób wielu zwierząt. W preparatach alkoholowych stosunek badany opada do jedności (możliwość bakteryj). Oznaczyli też temperaturę optymalną, która wynosi  $50^{\circ}$ — $55^{\circ}$  C. Wykazali, że w atmosferze tlenu rozpad jest energiczniejszy niż w powietrzu, i że utlenianie  $\bar{U}$  nie zachodzi pod wpływem tlenu nadtlenków. Autorom można postawić zarzut natury metodycznej. Kwas moczowy był rozpuszczany w odpowiedniej ilości ługu w temperaturze ok.  $40^{\circ}$ , już w naczyniu doświadczalnym. Nie wiemy, czy w tych warunkach kwas był całkowicie rozpuszczony. W obu pracach nie znamy dokładnie pH środowiska. Wiemy jedynie, że jest to środowisko słabo zasadowe.

W ostatnich badaniach, wykonanych przez FELIXA, SCHEELA i SCHULERERA ('29), autorowie ci używali jako fermentu urikolitycznego sproszkowanej i wysuszonej wątroby świni, i to wobec antyseptyka — toluenu. Znaleźli oni, że zarówno rozpad  $\bar{U}$ , jak i wydzielanie  $\text{CO}_2$  zależy od pH środowiska, potwierdzając badania dawniejsze, że w środowisku kwaśnym rozpad nie zachodzi. Sam rozpad ma dwa maksyma: jedno przy  $\text{pH} = 9.9$ , gdzie autorowie otrzymali całkowitą teoretyczną ilość wydzielonego dwutlenku węgla. Przy pierwszym optimum rozpadu  $\text{pH} = 8.9$  ilość wydzielonego  $\text{CO}_2$  wynosi zaledwie 20—30% liczby teoretycznej. Nie badali oni rozpadu w środowisku obojętnym. Przy  $\text{pH} < 8.9$  otrzymują jednak ci autorowie liczby wyższe: np. przy 8.7—63%  $\text{CO}_2$ .

Mechanizm rozpadu  $\bar{U}$  był wielokrotnie badany i, jak wykazały liczne doświadczenia BEHRENDZA ('09,'15) i BILTZA (20,'21,'23), w roztworach alkalicznych i obojętnych utlenianie kwasu moczowego zachodzi według wszelkiego prawdopodobieństwa następująco:



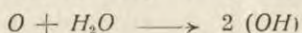
Możliwe jest, że produkt A (kwas oksyacetylenodwuureinokarbonyowy) powstaje bezpośrednio, przez utlenianie i przegrupowanie jednoczesne. Produkt ten pod wpływem działania rozcieńczonych kwasów traci  $\text{CO}_2$ , i przez rozerwanie pierścienia otrzymujemy alantoinę.



Utlenianie enzymatyczne przebiegałoby w wyżej podany sposób. Fazą najpowolniej odbywającą się byłoby właściwe utle-

nienie, t. j. przyłączenie jednego atomu tlenu do węgla 4 lub 5, które rozrywałoby podwójne wiązanie, a następnie mielibyśmy równoczesne przyłączenie 1 cząsteczki wody.

Gdyby przypuścić, że odbywa się reakcja typu:



a następnie, że pod wpływem urikazy zachodzi przyłączenie tych grup do  $\bar{U}$ , to powinniśmy byli otrzymać krzywą pobrania tlenu typu autokatalitycznego, czegośmy w badaniach naszych nie obserwowali. Utlenianie to zachodzi w każdym bądź razie kosztem tlenu, a nie wody, o czym również mówi krzywa pobrania tlenu. Utlenianie kw. moczowego następuje również pod katalitycznym wpływem soli miedzi (PIAUX '24, PRZYŁĘCKI '29), a wiemy, że utlenianie kosztem wody nie jest katalizowane przez sole miedzi.

Co się tyczy ostatniej fazy — oddzielenia dwutlenku węgla — to rolę kwasu z reakcyjniebiologicznych spełniałaby część dekarboksylująca urikazy, mająca charakter karboksylazy NEUBERGA. O istnieniu tej części świadczyłyby i to, że w pewnych warunkach (pH etc.) nie otrzymujemy całkowitej wydajności  $CO_2$ . Wiemy, że w innych przypadkach utleniania związków dwutlenek nie tworzy się przez bezpośrednie rozerwanie łańcucha węglowego, ale przez dekarboksylację powstałej grupy karboksylowej, jak to zachodzi i w naszym przypadku.

Właściwe utlenianie kwasu moczowego jest częścią reakcji, przebiegającą najpowolniej, i ta podlegałaby pomiarom. Mamy tu analogję z reakcjami, zachodzącymi stopniowo, gdzie część pierwsza jest najpowolniejsza, a następne zachodzą szybko.

Większość teoryj enzymatycznych stoi na stanowisku, że w jednakowych warunkach zewnętrznych prędkość reakcji jest proporcjonalna do każdorazowego stężenia połączenia „enzym-substrat”. Przemawia za tem zależność prędkości od stężenia substratu, swoistość działania enzymu i wiele innych czynników.

Ze względu na siły, kierujące tem połączeniem, mamy dwa poglądy. Jedni, jak BAYLISS ('14), uważają, że kinetyka enzymatyczna da się wytłumaczyć, wychodząc z założeń chemii koloïdów. Podczas hydrolizy np. mają podlegać działaniu te cząsteczki substratu, które są sorbowane na powierzchni cząsteczek fermentu i tylko te, stykając się z cząsteczkami wody, ulegają rozpadowi. W przestrzeni sorbcyjnej zachodzi właściwa reakcja.

W jakim stosunku siły powierzchniowe mogą w myśl tej teorii wpłynąć na zdolność reagowania, nie udało się jeszcze wyjaśnić.

Według innych autorów, można w reakcjach enzymatycznych zastosować prawa, dotyczące kinetyki układów jednolitych, biorąc pod uwagę całkowite stężenie substratu, a nie tylko część połączoną z fermentem. Dla określonego roztworu fermentu równowaga „enzym-substrat“ jest podana przez stałą dysocjacji tego połączenia. W niektórych przypadkach dało się w ten sposób dokładnie opisać kinetykę reakcji (np. w stosunku do sacharazy).

Ogólne rozstrzygnięcie jest zdaje się niemożliwe i według EULERA ('20) jest ono nawet nieistotne. Jeżeli się bowiem weźmie pod uwagę nowsze badania, wykazujące, że pod pojęciem sorbcji należy rozumieć zjawiska, „polegające na chemicznych reakcjach wymiany i związania, zachodzących na sztywnych powierzchniach lub spowodowanych przez siły elektrochemiczne, właściwe ciałom reagującym“, to „przeciwstawienie procesów sorbcyjnych zjawiskom chemicznym jest bezprzedmiotowe“ i „traktowanie roztworu enzymatycznego jako układu jednolitego lub niejednolitego nie jest pytaniem zasadniczym, ale sprawą celowości“.

W przypadku urikazy, gdzie mamy do czynienia z zawiesziną, mamy układ makro-niejednolity. Jeżeli jednak układ ten jest trzęsiony dość energicznie i ze stałą prędkością, to można przyjąć, że zawieszina jest równomiernie rozmieszczona.

Badania kinetyki enzymatycznej, traktowane z punktu widzenia układów jednolitych, opracowali MICHAELIS i MENTEN ('13). Stała dysocjacji równania MICHAELISA na mocy prawa działania mas związana jest wielkościami:

$$[S] [\Phi - \varphi] = K_M \cdot \varphi \quad (1)$$

$[S]$  jest to molarne stężenie wolnego substratu. Ponieważ tylko nieznaczną część substratu pozostaje w związku z enzymem, można więc dla prędkości początkowych uważać  $[S]$  za całkowite stężenie substratu.

$\Phi$  — całkowite molarne stężenie enzymu;

$[\Phi - \varphi]$  — stężenie enzymu wolnego;

$\varphi$  — stężenie połączenia „ferment-substrat“;

$K_M$  — stała dysocjacji równania MICHAELISA.

Równanie (1) da się przekształcić:

$$\varphi = \Phi \frac{[S]}{[S] + K_M} \quad (2)$$

Ponieważ prędkość rozpadu jest proporcjonalna do stężenia  $\varphi$ :

$$v = c \cdot \varphi \quad (3)$$

( $c$  — współczynnik proporcjonalności), więc:

$$v = c \Phi \frac{[S]}{[S] + K_M} \quad (3a)$$

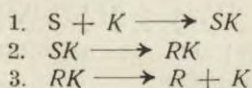
Przyjmując:

$$\frac{v}{c\Phi} = V$$

mamy:

$$V = \frac{[S]}{[S] + K_M} \quad (4)$$

Możemy więc podobnie obliczyć  $K$  (szczegóły w części doświadczalnej). W przypadku całkowitego przekształcenia połączenia „enzym-substrat“ na „enzym-produkt reakcji“ i tego ostatniego na wolny produkt i enzym mielibyśmy do czynienia z katalizą idealną w myśl schematu:



( $S$  — jest substratem,  $R$  — produktem reakcji, a  $K$  — katalizatorem).

Gdyby w trzeciej części „produkt reakcji-katalizator“ nie ulegał całkowitemu rozpadowi mielibyśmy katalizę nieidealną; ten niezupełny rozpad może spowodować hamowanie drugiej części reakcji, ponieważ mamy do czynienia z przypadkami równowagi.

Ilość katalizatora, który w końcu procesu łączy się ze substratem, zależy wtedy od powinowactwa „katalizator-produkt rozpadu“ i trwałości tego połączenia. W przypadku, gdy to powinowactwo istnieje, mielibyśmy równanie (1) poprawione:

$$[S] [\Phi - \varphi - \Psi] = K_M \cdot \varphi \quad (5)$$

gdzie  $\Psi$  — jest to stężenie molarne wyżej wspomnianego połączenia. Podobnie mielibyśmy:

$$[R] [\Phi - \varphi - \Psi] = K_R \cdot \Psi \quad (6)$$



gdzie  $[R]$  — jest stężeniem molarnem produktu rozpadu, a  $K_R$  — jego stałą dysocjacji. Z równań (5) i (6) po wyeliminowaniu wielkości  $\Psi$  mamy:

$$K_R = \frac{[R] \cdot K_M}{[S] \left[ \frac{\Phi}{\varphi} - 1 \right]} - K_M \quad (7)$$

Podobnie postąpilibyśmy w przypadku większej ilości produktów rozpadu.

**Narkotyki.** Działanie hamujące alkoholi i innych narkotyków ma pewną analogię z zatruciami kontaktów nieorganicznych. Działanie to nie jest zjawiskiem czysto chemicznym. Przyjawszy bowiem, że enzym zmienił swoją strukturę chemiczną wskutek połączenia się z alkoholem, nie umielibyśmy wytłumaczyć szeregu zjawisk, jak np. odwracalności procesu. W niektórych przypadkach po usunięciu alkoholu ferment działa (działanie alkoholu butylowego na urikazę jest nawet po 24 godzinach odwracalne). Nie tłumaczyłoby to również jednakowego hamowania w różnych stężeniach enzymu. Byłoby to również sprzeczne z teorią enzymatyczną, przyjmującą nieznaczne stężenie enzymu, dla którego już najmniejsza ilość alkoholu powinna powodować całkowite hamowanie.

Zachodzą raczej zjawiska fizyczne lub fizyko-chemiczne. Według **WARBURGA** i **WIESŁA** ('12), alkohol desorbuje substrat z powierzchni fermentu; sam się nagromadza i zmniejsza wskutek tego aktywność fermentu.

Wyższe człony homologiczne hamują intensywniej, gdyż jako duże cząsteczki zajmują na powierzchni koloidalnej enzymu większy obszar i adsorbują się intensywniej. Wyparty substrat nie ulegałby już rozbiciu i byłby miarą hamowania aktywności enzymu przez narkotyk.

Czynności narkotyczne alkoholi miałyby więc związek z obniżeniem przez nie napięcia powierzchniowego wody, i alkohole izomeryczne powinnyby jednakowo hamować.

## II. C z ę ś ć d o ś w i a d c z a l n a.

### A. Metodyka.

**Urikaza.** Wyciąg urikazy był przyrządzany według metody **PRZYŁĘCKIEGO** ('28).

**Substrat.** Jako substratu używano kwaśnego moczanu sodu, przyrządzanego osobno do każdego doświadczenia. Na każde 100 mg  $\bar{U}$

brano 6 cm<sup>3</sup> 0.1 n NaOH, co całkowicie odpowiada teoretycznej ilości sodu, potrzebnej do otrzymania moczanu. Dodawano wody destylowanej i gotowano do całkowitego rozpuszczenia kwasu. Po ostudzeniu dopełniano do odpowiedniej objętości. Otrzymany moczan był dobrym buforem i wraz z solami, zawartymi w wyciągu urikazy, dawał stałe pH = 7.4 ± 0.05, niezależne od stężenia kwasu (w granicach używanych przez nas stężeń).

**Metodyka.** Oznaczenia wykonane były dwiema metodami: kolorymetrycznie i gazometrycznie. W pierwszej — metodzie FOLINA-DENISA doświadczenia były wykonywane w erlenmayerkach na 150 cm<sup>3</sup> i zawierały zawsze 40 cm<sup>3</sup> badanego roztworu: zwykle 20 cm<sup>3</sup> roztworu moczanu i 20 cm<sup>3</sup> wyciągu urikolitycznego. W doświadczeniach z alkoholami i winnych, gdzie w układzie był trzeci składnik, było zawsze urikazy 20 cm<sup>3</sup> na ogólną ilość 40 cm<sup>3</sup> roztworu. Chloroform zawarty w wyciągu urikazy doskonale bronił przed bakterjami; jednakże dla celów antyseptycznych przed każdym doświadczeniem prażono suche kolbki zatkałe watą przez 5' na palniku bunsenowskim. Gumowe korki, któremi były zakorkowane erlenmayerki podczas doświadczeń, były uprzednio wyjaławiane 20% alk. etylowym. Erlenmayerki umieszczano podczas doświadczeń w termostacie wodnym o temperaturze 37° — 38°, która podczas doświadczenia nie ulegała zmianie (dokładność 0.1°). Były one wstrząsane ruchem wahadlowym przez cały czas przebiegu reakcji za pomocą specjalnego urządzenia, umieszczonego w termostacie, wskutek czego roztwory z zawieszoną urikazy miały zawsze skład jednolity. Ilość wstrząśnień wynosiła około 60 na minutę. Zwiększenie tej liczby nie powodowało różnicy w kinetyce rozpadu  $\bar{U}$ , jak wynika z poniższej tabelki:

Ilość wstrząśnień na minutę	Stężenie początkowe $\bar{U}$ (mg/cm <sup>3</sup> )	
	0.41	0.82
	Rozłożony $\bar{U}$ po 1 godz.	
0	0.05	0.09
40	0.11	0.185
64	0.135	0.215
92	0.135	0.215

Kąt obrotu erlenmayerki przy wstrząśnięciu wynosił około 120°. Przed doświadczeniem umieszczano osobno roztwory kwasu i urikazy w termostacie na 10' — 15', ażeby ogrzały się do żądanej temperatury, dopiero potem umieszczano je w erlenmayerkach. Wyciągi urikazy używane były przez 2—3 dni, poczem brano inny wyciąg. Wyniki, otrzymane z jednego wyciągu, dawały się zwykle reprodukować, natomiast z różnymi wyciągami udawało to się rzadziej. Charakter wyników bywał jednakże ten sam. Liczby w tabelach, dotyczące znalezionej ilości sodowego, mówią o ilości mg  $\bar{U}$  w 1 cm<sup>3</sup> roztworu. Podczas pomiaru odmierzano mikropipetą odpowiednią ilość roztworu, poczem umieszczano natychmiast zakorkowaną erlenmayerkę z powrotem do termostatu. Wszędzie badano dla kontroli roztwór moczanu z odpowiednią ilością wody destylowanej, równą ilości wyciągu w erlenmayerkach doświadczalnych.

Kontrola zwykle nie ulegała zmianie z wyjątkiem doświadczeń, trwających ponad 12 godzin. Doświadczenia wykonywane były w dwóch równoległych próbach i zwykle niewiele się różniły między sobą. Liczby podane są średnią.

Metoda gazowa BARCROFTA - WARBURGA polega na mierzeniu ilości  $x$  wydzielonego lub pobranego gazu.

Wydzielany podczas reakcji dwutlenek węgla zostaje rozpuszczony w ługu ( $1/2$  cm<sup>3</sup> 5% KOH) zawartym w bocznej części naczynka.

Do pomiarów brano 2 cm<sup>3</sup> urikazy i 2 cm<sup>3</sup> kw. moczowego, które umieszczano w części głównej naczynka. Całkowita objętość cieczy wynosiła więc (wraz z ługiem)  $V_c = 4500$  mm<sup>3</sup>. Objętość naczynka wynosiła ok. 15 cm<sup>3</sup>; stała gazowa dla tlenu  $K_{O_2} =$  ok. 1.0 mm<sup>3</sup>.

Tabela I.

Wpływ atmosfery.  
Einfluss der Atmosphäre.

Data Datum	a	t	Tlen Sauerstoff		Powietrze Luft	
			x	%	x	%
			19. VII. 1929	0.8	2	0.19
	4	0.35	44		0.21	26
	6	0.48	60		0.28	35
I		8	0.60	75	0.376	47
23. VII. 1929	0.75	2	0.19	25	0.11	15
		4	0.345	46	0.21	28
		6	0.50	67	0.30	40
II		8	0.61	81	0.38	51

a — Stężenie początkowe kw. moczowego w mg/cm<sup>3</sup>.  
Anfangskonzentration der Harnsäure in mg/ccm.

(a - x) — Stężenie u po czasie t w mg/cm<sup>3</sup>.  
U — Konzentration nach der Zeit t in mg/ccm.

t — Czas w godzinach.  
Zeit in Stunden.

x — Rozłożony kw. moczowy w mg/cm<sup>3</sup>.  
Die abgebaute Harnsäure in mg/cm<sup>3</sup>.

% — Procent rozłożonego kw. moczowego.  
% der abgebauten Harnsäure.

## B. W y n i k i.

### Wpływ czynników zewnętrznych.

a) Atmosfera. Z tabeli I widzimy, że rozpad kwasu moczowego pod wpływem urikazy zależy od atmosfery, w której się odbywa, i w atmosferze tlenu jest szybszy, niż w powietrzu.

Tabela II.

Wpływ zagotowanej urikazy.  
Einfluss der bis auf 100° erhitzten Urikase.

a i data a u. Datum	Układ System	t	a - x	t	a - x	t	a - x
a = 0.50 21 II. 1930	A B	1	0.335 0.33	2	0.18 0.165	3.25	0.076 0.073
a = 0.46 22 II. 1930	A B	1	0.31 0.305	2	0.18 0.165	3	0.08 0.067
a = 0.46 22 II. 1930	A B	1	0.33 0.32	2	0.23 0.20	3.25	0.10 0.075
a = 0.46 25 II. 1930	A B	1	0.34 0.315	2	0.23 0.20	3	0.115 0.093
a = 0.45 25 II. 1930	A B	1	0.305 0.305	2	0.22 0.215	3	0.112 0.10
a = 0.44 26 II. 1930	A B	1	0.32 0.30	2	0.21 0.20	3	0.125 0.11

Układ „A” zawiera: 20 cm<sup>3</sup> urikazy, 10 cm<sup>3</sup>  $\bar{U}$  i 10 cm<sup>3</sup> zagotowanej urikazy;

Układ „B” zawiera: 20 cm<sup>3</sup> urikazy, 10 cm<sup>3</sup>  $\bar{U}$  i 10 cm<sup>3</sup> H<sub>2</sub>O.

System „B” enthält: 20 ccm Urikase, 10 ccm  $\bar{U}$  und 10 ccm H<sub>2</sub>O.

System „A” „ 20 ccm „ 10 ccm  $\bar{U}$  und 10 ccm der bis auf 100° erhitzten Urikase.

Doświadczenia te zostały wykonane w ten sposób, że przygotowano kilka (10) erlenmayerek o tej samej zawartości (20 cm<sup>3</sup> urikazy i 20 cm<sup>3</sup>  $\bar{U}$ ). Do każdej erlenmayerki wpuszczano przez 5' tlen (2 — 3 pęcherzyki na sekundę), poczem natychmiast zakorkowaną kolbkę umieszczano w termostacie. Każda kolbka po jednym pomiarze nie była już więcej badana z powodu wpuszczenia powietrza. Porównywano z roztworami, działającymi w atmosferze powietrza.

### b) Zagotowanie enzymu.

Doświadczenia, ilustrujące wpływ zagotowanej urikazy, zanotowane zostały w tab. II i zostały wykonane następująco: erlenmayerkę, zawierającą 10 cm<sup>3</sup> urikazy, ogrzewano do wrzenia, poczem zaraz odstawiano do ostudzenia, tak że objętość zagotowanej urikazy nie uległa zmianie. Po ostudzeniu dodawano 10 cm<sup>3</sup> kw. moczowego i 20 — właściwej urikazy. Stanowiło to układ „A” doświadczenia. Układ „B” użyty jako kontrola zawierał: 10 cm<sup>3</sup> H<sub>2</sub>O, 10 cm<sup>3</sup>  $\bar{U}$  i 20 cm<sup>3</sup> urikazy.

Widzimy, że zagotowany wyciąg urikolityczny, przedstawiający się w postaci ściętych kłaczek i przezroczystego roztworu żółtego, lekko hamuje rozpad. Natomiast przesącz z zagotowanej urikazy żadnego hamowania nie wykazuje (tab. III).

Schemat tych doświadczeń jest umieszczony obok tab. III. Wyniki, zawarte w tych tabelach, świadczą również o tem, że urikaza zagotowana jest inaktywna.

Tabela III.

Wpływ zagotowanej i przesączonej urikazy.  
*Einfluss der bis auf 100° erhitzten und abfiltrierten Urikase.*

Data Datum	Układ System	t	a - x	t	a - x
a = 0,50 26. II 1930	C D	1	0,355 0,355	2	0,26 0,265
a = 0,50 27. II 1930	C D	1	0,38 0,36	2	0,29 0,29
a = 0,43 28. II 1930	C D	1	0,305 0,30	2	0,20 0,197
a = 0,41 28. II 1930	C D	1	0,29 0,29	2	0,205 0,205

Układ „C” zawiera: 20 cm<sup>3</sup> urikazy, 10 cm<sup>3</sup>  $\bar{U}$  i 10 cm<sup>3</sup> przesączu z zagotowanej urikazy;

Układ „D” zawiera: 20 cm<sup>3</sup> urikazy, 10 cm<sup>3</sup>  $\bar{U}$  i 10 cm<sup>3</sup> H<sub>2</sub>O.

System „C” enthält: 20 ccm Urikase, 10 ccm  $\bar{U}$  und 10 ccm Filtrat der bis auf 100° erhitzten Urikase.

System „D” enthält: 20 ccm Urikase, 10 ccm  $\bar{U}$  und 10 ccm H<sub>2</sub>O.

### c) Alantoina.

Szybkość reakcji enzymatycznej zależy, jak wiadomo, od powinowactwa i trwałości połączenia „enzym-produkt rozpadu”. Jak jednak wykazują doświadczenia zanotowane w tab. IV, dodanie nawet nasyconego roztworu alantoiny nie obniża prędkości reakcji. Alantoina zachowuje się jak ciało obojętne i nie wpływa na kinetykę.

Doświadczenia te zostały wykonane w ten sposób, że zawartość części erlenmayerek, stanowiących układ „A”, wynosiła: 10 cm<sup>3</sup>  $\bar{U}$ , 20 cm<sup>3</sup> urikazy i 10 cm<sup>3</sup> nasyconego roztworu alantoiny. Stężenie alantoiny wynosiło ok. 3 mg w 1 cm<sup>3</sup> roztworu. Układ „B” użyty jako kontrola zawierał: 10 cm<sup>3</sup>  $\bar{U}$ , 20 cm<sup>3</sup> urikazy i 10 cm<sup>3</sup> H<sub>2</sub>O.

Tabela IV.

Wpływ alantoiny.  
Einfluss des Allantoins.

Układ „A” zawiera: 20 cm<sup>3</sup> urikazy, 10 cm<sup>3</sup>  $\bar{U}$  i 10 cm<sup>3</sup> nasyc. roztworu alantoiny.

Układ „B” zawiera: 20 cm<sup>3</sup> urikazy, 10 cm<sup>3</sup>  $\bar{U}$  i 10 cm<sup>3</sup> H<sub>2</sub>O.

System „A” enthält: 20 ccm Urikase, 10 ccm  $\bar{U}$  und 10 ccm ges. Allantoinlösung.

System „B” enthält: 20 ccm Urikase, 10 ccm  $\bar{U}$  und 10 ccm H<sub>2</sub>O.

Data Datum	a	Układ System	t	a — x	t	a — x
1. III 1930	0.45	A B	1	0.315 0.315	2	0.20 0.205
1. III 1930	0.50	A B	1	0.36 0.365	2	0.285 0.28
3. III 1930	0.50	A B	1	0.365 0.367	2	0.29 0.29

Stężenie alantoiny w „A”: ok. 3 mg w 1 cm<sup>3</sup> roztworu.  
Allantoinkonzentration in „A”: ca. 3 mg/ccm.

## 2. Starzenie się enzymu.

### a) Zużycie się enzymu:

Doświadczenia, dotyczące zużycia się enzymu, wykazują tabele V i VI. W erlenmayerkach typu „A” umieszczano 20 cm<sup>3</sup> urikazy i 10 cm<sup>3</sup> kw. moczowego takiego, że stężenie  $\bar{U}$  w roztworze wynosiło 0.7 mg/cm<sup>3</sup>. Układ „B” zawierał: 20 cm<sup>3</sup> urikazy, 9 cm<sup>3</sup> H<sub>2</sub>O i 1 cm<sup>3</sup>  $\bar{U}$ , który został dodany w tym celu, ażeby się w „B” nie utworzyły kłaczkii, co zachodziło stale, gdy umieszczano sam roztwór urikazy w termostacie przez dłuższy czas. Chodziło o to, by stan fizyczny obu układów był jednaki. Erlenmayerki obydwu układów umieszczano, jak zwykle, w termostacie. Po ok. 7 godz. całkowita ilość kwasu zawarta w „A” została rozłożona, o czym się przekonywano biorąc 5 cm<sup>3</sup> do oznaczenia. Z układu „B” ujęto również 5 cm<sup>3</sup>. Dodawano teraz do obydwu układów, zawierających obecnie po 25 cm<sup>3</sup> roztworu, po 10 cm<sup>3</sup>  $\bar{U}$  o dowolnym stężeniu i po ponownym umieszczeniu w termostacie wykonywano właściwe pomiary.

W doświadczeniach, zanotowanych w tabeli V, układ „A” rozłożył przed właściwym doświadczeniem 21 mg  $\bar{U}$ , a „B” — 2.1 mg.

Tabela V.

Zużycie się urikazy.  
Verbrauch der Urikase.

Schemat doświadczeń:  
Schema der Versuche:

	Urikaza Urikase	$\bar{U}$	H <sub>2</sub> O	po 5 — 7 godz. nach 5 — 7 St.	
	w in cm <sup>3</sup>			ujęto weggenommen	
„A“ . . . . .	20	10	—	— 5 cm <sup>3</sup>	+ 10 cm <sup>3</sup> $\bar{U}$
„B“ . . . . .	20	1	9	— 5 cm <sup>3</sup>	+ 10 cm <sup>3</sup> $\bar{U}$

Data Datum	a	Układ System	t	a — x	t	a — x
21. II. 1930	0.53	A B	1	0.402 0.395	2	0.31 0.31
22. II. 1930	0.41	A B	1	0.30 0.305	2	0.17 0.16
24. II. 1930	0.50	A B	1	0.36 0.35	2	0.25 0.24
25. II. 1930	0.50	A B	1	0.355 0.355	2	0.20 0.185
26. II. 1930	0.51	A B	1	0.37 0.36	2	0.24 0.235

„A“ rozłożyło uprzednio  $0.7 \times 30 = 21$  mg  $\bar{U}$ . „B“ — 2.1 mg  $\bar{U}$   
„A“ hat zerlegt zuvor  $0.7 \times 30 = 21$  mg  $\bar{U}$ . „B“ — 2.1 mg  $\bar{U}$ .

Jak widzimy z zestawionej tabeli, urikaza się nie zużywa.

b) Stosunek wydzielonego dwutlenku węgla do pobranego tlenu i rozłożonego kwasu przedstawiony został w tabelach VI—VIII.

Ponieważ wydzielający się dwutlenek łączył się chemicznie ze słabo zasadowym roztworem doświadczalnym, zastosowano metodę, w której użyto 4 „Barcroftów“. Naczynko 0 — służyło jako termobarometr. Naczynko 1 — zawierało w części głównej („a“) roztwór badany, a w części bocznej „b“ roztwór KOH do pochłaniania CO<sub>2</sub>. Naczynko 2 — zawierało w „a“ roztwór badany, a w „b“ roztwór H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Naczynko 3 — zawierało tę samą zawartość co nacz. 2.

Po umieszczeniu wszystkich przyrządów w termostacie i wyrównaniu temperatury przechylamy nacz. 3 tak, żeby kwas siarkowy zawarty w „b“ dostał się do części „a“. Ilość chemicznie związanego dwutlenku węgla zawarta w roztworze na początku doświadczenia wyniesie:

$$h_3 k'''_{CO_2}$$

gdzie  $h_3$  jest odczytaną różnicą poziomów w manometrze po doprowadze-

Tabela VI.

stosunek  $\frac{CO_2}{O_2}$ .  
*Respiratorischer Quotient*  $\frac{CO_2}{O_2}$ .

22. V. 1930.

Naczynko Gefäss 0	Naczynko Gefäss 1	Naczynko Gefäss 2	Naczynko Gefäss 3
Termobarometr a 2 cm <sup>3</sup> urikazy 2 cm <sup>3</sup> H <sub>2</sub> O b 0.5 cm <sup>3</sup> 5% KOH	O <sub>2</sub> - Verbrauch Pobraný tlen a 2 cm <sup>3</sup> urikazy 2 cm <sup>3</sup> Ū b 0.5 cm <sup>3</sup> 5% KOH	CO <sub>2</sub> a 2 cm <sup>3</sup> urikazy 2 cm <sup>3</sup> Ū b 0.5 cm <sup>3</sup> H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	CO <sub>2</sub> na początku doświadcz. CO <sub>2</sub> am Anfang des Versuches a } jak w nac. 2. b } wie im Gefäss 2.
	K <sub>o<sub>2</sub></sub> = 1.00 mm <sup>2</sup>	K <sub>o<sub>2</sub></sub> = 1.16 mm <sup>2</sup> K <sub>co<sub>2</sub></sub> = 1.40 mm <sup>2</sup>	K <sub>co<sub>2</sub></sub> = 1.41 mm <sup>2</sup>
t = 3 godz. + 3.5	— 99.5 h <sub>1</sub> = — 103 mm x <sub>o<sub>2</sub></sub> = — $\frac{103}{1.00}$ mm <sup>3</sup>	+ 8.0 h <sub>2</sub> = + 4.5 mm. x <sub>co<sub>2</sub></sub> = 4.5 · 1.40 + + 103 $\frac{1.40}{1.16}$ x <sub>co<sub>2</sub></sub> = $\frac{130}{1.16}$ mm <sup>3</sup> Po wyrównaniu poziomów i wlianiu H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> h <sub>2</sub> = 59 mm h <sub>2</sub> · k <sub>co<sub>2</sub></sub> = 82.6 mm <sup>3</sup> Związanego chem. CO <sub>2</sub> 82.6 mm <sup>3</sup> — 26.8 mm <sup>3</sup> = = 55.8 mm. Nach Ausgleichung der Niveauflächen und Hineinführung von H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> h <sub>2</sub> = 59 mm, h <sub>2</sub> · k <sub>co<sub>2</sub></sub> = 82,6 mm <sup>3</sup> Chemisch gebunden.	t = 0 Po wlianiu H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> h <sub>3</sub> = 19 mm h <sub>3</sub> · K <sub>co<sub>2</sub></sub> = 26.8 mm <sup>3</sup> CO <sub>2</sub>

a = 0.8; t = 3 godz.

Całkowita ilość CO<sub>2</sub> = 130 mm<sup>3</sup> + 55.8 mm<sup>3</sup> = 185.8 mm<sup>3</sup>.Totalmenge des CO<sub>2</sub>

$$\frac{CO_2}{O_2} = \frac{185.8}{-103} = -1.8$$

niu poziomą w rurce prawej do połączenia zerowego a k<sub>co<sub>2</sub></sub> — stałą naczyniową dla CO<sub>2</sub>.

Po wykonaniu doświadczenia ilość pobranego tlenu (nac. № 1) wyniesie:

$$x_{o_2} = -h_1 \cdot k'_{o_2}$$

Ilość wydzielonego dwutlenku podczas doświadczenia oznaczymy za pomocą manometru № 2.

$$x'_{co_2} = h_2 \cdot k''_{co_2} - x_{o_2} \frac{k'_{co_2}}{k''_{o_2}}$$



gdzie  $k''_{CO_2}$  i  $k'''_{CO_2}$  są to stałe naczyńniowe danego naczynka (№ 2), a  $h_2$  odczytaną różnicą poziomów manometru (po doprowadzeniu do położenia zerowego). Po odczytaniu  $h_2$  wyrównujemy poziomy przez odkręcenie kurka manometru, poczem po zamknięciu kurka wlewamy kwas siarkowy z „b” do „a”. Odczytujemy, podobnie jak dla naczynka 3, różnicę poziomów  $h'_2$ . Ilość wydzielonego  $CO_2$  związanego chemicznie wyniesie:

$$h'_2 \cdot k''_{CO_2}$$

Ilość związanego chemicznie dwutlenku wydobytego podczas doświadczenia wyniesie wtedy:

$$h'_2 \cdot k''_{CO_2} - h_2 \cdot k'''_{CO_2}$$

Stąd całkowita ilość wydzielonego  $CO_2$ :

$$x_{O_2} = h_2 \cdot k''_{CO_2} - x_{O_2} \frac{k''_{CO_2}}{k''_{O_2}} + h'_2 \cdot k''_{CO_2} - h_2 \cdot k'''_{CO_2}$$

W „a” umieszczano zawsze 4 cm<sup>3</sup> roztworu (2 cm<sup>3</sup>  $\bar{U}$  i 2 cm<sup>3</sup> urikazy). W „b” 0.5 cm<sup>3</sup> 5% KOH, względnie 0.5 cm<sup>3</sup> n/1 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

W celu oznaczenia stosunku pobranego tlenu i wydzielonego  $CO_2$  do rozłożonego kwasu moczowego oznaczano po doświadczeniu ilość  $\bar{U}$  w naczynku 1, kolorymetrycznie. Liczby, dotyczące ilości pobranego tlenu i przeliczone na rozłożony kwas moczowy, biorąc stosunek 1 at. tlenu: 1 cząst.  $\bar{U}$ , okazały się jednakowe z oznaczeniami kolorymetrycznymi w granicach błędu doświadczalnego (rubryki 6 i 7 tabeli VII i VIII).

Zwykle używano wyciągów 4 — 5 dniowych, licząc od chwili przygotowania.

Tabela VII.

Stosunek  $\frac{CO_2}{O_2}$ .

Respiratorischer Quotient  $\frac{CO_2}{O_2}$

Wszędzie całkowita ilość  $\bar{U} = 3.2$  mg ( $a = 0.8$ ).  
überall totale  $\bar{U}$ -Menge = 3.2 mg.

Szczegóły doświadczeń w tabeli VI.  
Einzelheiten der Versuche in der Tab. VI.

Data Datum	t	O <sub>2</sub> w mm <sup>3</sup>	CO <sub>2</sub>	$\frac{CO_2}{O_2}$	Rozłożony oblicz berechnet	$\bar{U}$ w mg oznacz. $\bar{U}$ in mg bezeichnet	Rodzaj wyciągu Art des Extraktes	Uwagi Bemerkungen
1	2	3	4	5	6	7	8	9
20. V. 1930	4	121	225	1.86	1.96	2.00	4-0 dniowy 4-tägiges.	
22. V. 1930	3	103	185.8	1.80	1.55	1.58	”	
23. V. 1930	1	41	72.6	1.77	0.61	0.60	5-0 ”	
23. V. 1930	5	138	260.8	1.89	2.06	2.08	” ”	
23-24. V. 1930	12	106.7	192.1	1.80	1.61	1.60	6-0 ”	układ nie był trzęsiony. Das System wurde nicht geschüttelt.
26. V. 1930	4.5	212	349.8	1.65	3.18	3.20	8-0 ”	
27. V. 1930	12	144	233.3	1.63	2.14	2.20	9-0 ”	układ nie by trzęsiony. Das System wurde nicht geschüttelt.

Widzimy, że o ile stosunek pobranego tlenu do rozłożonego  $\text{O}_2$  nie zależy od rodzaju urikazy, to stosunek  $\frac{\text{CO}_2}{\text{O}_2}$  opada w wyciągach starszych.

W wyciągach bezglicerynowych, użytych do doświadczeń bezpośrednio po przygotowaniu, stosunek ten wynosi 2, t. j. równa się teoretycznemu, ale w miarę starzenia się wyciągu — opada. Zresztą często powtarzająca się liczba ok. 1.8 daje również obraz stosunku teoretycznego, gdyż jest zawarta w granicach błędu doświadczalnego.

Tabela VIII.

Stosunek  $\frac{\text{CO}_2}{\text{O}_2}$  Respiratorischer Quotient.

Doświadczenia wykonane nad jednym wyciągiem przez kilka dni. (Nerka b. świeża). Wyciąg glicerynowy i bezglicerynowy z tej samej miazgi nerczej.

Versuche ausgeführt mit einem und demselben Extrakt während einiger weniger Tage. (Niere sehr frisch). Extrakte: mit und ohne Glycerin.

Wszędzie  $a = 0.8$  i  $t = 3$  godziny.

überall  $a = 0.8$  und  $t = 3$  Stunden.

Data Datum	$\text{O}_2$	$\text{CO}_2$	$\frac{\text{CO}_2}{\text{O}_2}$	Rozbity obliczony <i>berechnet</i>	U w mg oznaczony <i>U — Abbau in mg. gefunden</i>	Rodzaj wyciągu <i>Art des Extraktes</i>
1	2	3	4	5	6	7
31. V. 1930	106.9	210.6	1.97	1.62	1.62	bezglicerynowy 1-dniowy <i>ohne Glycerin, 1 Tage alt.</i>
	107.3	216.0	2.02	1.62	1.62	
2. VI. 1930	106.6	195.0	1.92	1.61	1.60	bezglicerynowy 3-dniowy <i>ohne Glycerin, 3 Tage alt.</i>
	106.9	197.4	1.94	1.62	1.60	
3. VI. 1930	106.6	200.4	1.88	1.60	1.60	bezglicerynowy 4-dniowy <i>ohne Glycerin, 4 Tage alt.</i>
	106.7	200.6	1.88	1.60	1.62	
	106.8	205.9	1.92	1.62	1.58	glicerynowy 4-dniowy <i>Glycerinextrakt 4 T. alt.</i>
	106.0	199.6	1.88	1.58	1.58	
4. VI. 1930	107.2	189.7	1.77	1.64	1.60	bezglicerynowy 5-dniowy <i>ohne Glycerin, 5 T. alt.</i>
	105.8	185.2	1.75	1.57	1.60	
	106.8	194.2	1.82	1.61	1.58	glicerynowy 5-dniowy <i>Glycerin, 5 T. alt.</i>
	106.0	193.2	1.84	1.57	1.65	
6. VI. 1930	103.0	158.6	1.54	1.55	1.60	bezglicerynowy 7-dniowy <i>ohne Glycerin, 7 T. alt.</i>
	105.2	157.8	1.50	1.57	1.60	
	104.8	178.1	1.70	1.56	1.51	glicerynowy 7-dniowy <i>Glycerin, 7 T. alt.</i>
	103.9	183.9	1.77	1.55	1.58	

Wyciągi bezglicerynowe zostały przygotowane podobnie do normalnych. Zamiast gliceryny użyto tej samej ilości wody destylowanej i wyciąg był użyty do doświadczeń już pierwszego dnia.

W doświadczeniach z temi wyciągami badany stosunek w miarę starzenia się wyciągu opada bardziej, niż w wyciągach glicerynowych. Natomiast I faza — rozpad kwasu moczowego — nie zależy od świeżości enzymu, ani od rodzaju wyciągu.

### 3. K i n e t y k a.

#### a) Stężenie enzymu.

Doświadczenia, ilustrujące wpływ stężenia enzymu na przebieg reakcji, zostały wykonane według schematu:

$\bar{U}$	E	H <sub>2</sub> O w cm <sup>3</sup>
20	20	— „
20	15	5 „
20	10	10 „
20	5	15 „

(E — oznacza ilość pierwotnego wyciągu urikazy).

Wyciąg zostaje więc odpowiednio rozcieńczony. Wszędzie stężenie kwasu moczowego i całkowita objętość roztworu są jednakowe. Stosunki urikazy wynoszą więc odpowiednio 100 : 75 : 50 : 25). (Wszędzie w tabelach gdzie nie podano pochodzenia wyciągu, urikaza została wydobyta z nerek bydłych).

Z tabeli IX widzimy, że rozpad w większości przypadków (1, 2, 4, w mniejszym stopniu w 3 i 5) jest proporcjonalny do stężenia enzymu. Proporcjonalność zaznacza się dość wyraźnie, jeśli uwzględnimy w mniejszych stężeniach urikazy dłuższy okres doświadczenia. Pomiarzy zestawione w tab. X wykazują proporcjonalność zupełnie wyraźnie. Te ostatnie doświadczenia zostały wykonane metodą gazową. Liczby (w mm<sup>3</sup>) mówią o ilości pobranego tlenu. Procent rozpadu został obliczony, biorąc pod uwagę, że po całkowitym rozpadzie 1 mg  $\bar{U}$  zostaje pobrane 66.64 mm<sup>3</sup>O<sub>2</sub>. Jest to ilość, odpowiadająca 1 at. 0 : 1 cząst.  $\bar{U}$ . Stosunek ten został wyznaczony doświadczalnie (tab. VII i VIII).

b) Stężenie kwasu moczowego. Wyniki, dotyczące wpływu stężenia  $\bar{U}$ , zostały podane w tab. XI—XII. Jak widzimy z ostatniej rubryki zestawionych tabel, rozpad jest dość zbliżony do reakcji stopnia pierwszego. W wyższych stężeniach kwasu, szczególnie pod koniec reakcji, otrzymujemy dla stałej  $k$  wartości coraz wyższe. W niższych stężeniach  $\bar{U}$  wartości na  $k$

Tabela IX.

Wpływ stężenia enzymu.  
Einfluss der Konzentration der Enzyme.

a i data a u. Datum	t	Względne stężenie enzymu Relative Konzentration der Enzyme							
		100		75		50		25	
		x	%	x	%	x	%	x	%
a = 0.55 25. XI. 1929 I.	1	0.193	35	0.137	25	0.094	17	0.055	10
	2	0.35	64	0.275	50	0.17	31	0.11	20
	3	0.45	83	0.38	69	0.26	47	—	—
	4	—	—	0.456	82	0.33	60	0.193	35
a = 0.55 26. XI. 1929 II.	1	0.155	28	0.125	23	0.10	18	0.05	9
	2	0.275	50	0.24	44	0.193	35	0.09	16
	3	0.38	69	0.335	61	0.27	48	0.125	23
	4	0.46	84	0.41	75	0.33	60	0.165	30
a = 0.70 28. XI. 1929 III.	1	0.16	23	0.12	17	0.10	14	0.05	7
	2	0.28	40	0.216	31	0.175	25	0.10	14
	4	0.47	67	0.385	55	0.31	40	0.195	28
	6	0.61	87	0.505	72	0.42	60	0.28	40
8	—	—	0.56	80	0.47	67	0.35	50	
a = 0.80 29. XI. 1929 IV.	1	0.16	20	0.13	16	—	—	—	—
	2	0.305	38	0.23	29	0.15	19	0.08	10
	3	0.40	50	—	—	—	—	—	—
	4	0.455	57	0.32	40	0.29	37	0.16	20
6	0.54	67.5	0.40	50	0.41	52	0.235	27	
8	—	—	—	—	0.48	60	0.28	40	
a = 0.58 17. XII. 1929 V.	2	0.145	25	0.11	19	0.08	14	0.06	10
	4	0.29	50	0.203	35	0.157	27	0.104	18
	6	0.39	67	0.32	55	0.23	40	0.15	26
	8	0.464	80	0.39	67	0.3325	57	0.20	35

Tabela X.

Wpływ stężenia enzymu.  
Einfluss der Konzentration der Enzyme.

Data Datum	t	Względne stężenie enzymu Relative Konzentration der Enzyme					
		100		50		25	
		V <sub>x</sub>	%	V <sub>x</sub>	%	V <sub>x</sub>	%
a = 0.80 26. V. 1930 I.	0.5	30	14	12.8	6	6.4	3
	1	51.2	24	23.5	11	10.7	5
	1.5	68.3	32	32.0	15	17.0	8
	2.0	83.2	39	42.6	20	21.3	10
	2.5	96.0	45	51.2	24	25.7	12
a = 0.80 2. VI. 1930 II.	1	44.8	21	19.3	9	9.4	4.5
	2	74.0	36	40.5	19	19.2	9
	3	102.3	48	56.3	26	27.8	13
	4	—	—	66.1	31	34.9	16.3

wykazują większą stałość. Stała ta zależy od stężenia kw. moczowego, malejąc wraz ze wzrostem stężenia substratu. Zależność ta jest nieraz proporcjonalna.

Tabela XI.

Kinetyka reakcji. Wpływ stężenia  $\bar{U}$ .  
*Kinetik der Reaktion. Einfluss der  $\bar{U}$ -Konzentration.*

19. XII. 1929.

a	t	a - x	x	%	$K = \frac{1}{t} \log \frac{a}{a-x}$
0.1	0.5	0.067	0.033	33	0.35
	1	0.042	0.058	58	0.37
	1.5	0.025	0.075	75	0.40
0.2	0.5	0.15	0.05	25	0.26
	1	0.104	0.096	48	0.28
	2	0.05	0.15	75	0.30
0.4	0.5	0.32	0.08	20	0.20
	1	0.25	0.15	37	0.20
	2	0.164	0.236	59	0.20
	3	0.08	0.32	80	0.23
	4	0.04	0.36	90	0.25
0.5	1	0.45	0.15	25	0.125
	2	0.347	0.252	42	0.12
	3	0.245	0.355	59	0.13
	4	0.18	0.42	70	0.13
	5	0.12	0.48	80	0.14
0.8	1	0.625	0.175	22	0.11
	2	0.50	0.30	37.5	0.10
	3	0.41	0.39	49	0.10
	4	0.32	0.48	60	0.10
	6	0.17	0.63	80	0.11
	8	0.08	0.72	90	0.11

Wyniki, zebrane w tabeli XII, zostały otrzymane z pomocą metody gazometrycznej.  $V_c$  jest to ilość pobranego tlenu w  $\text{mm}^3$ . W naczynkach mamy po 4  $\text{cm}^3$  roztworu badanego i 0.5  $\text{cm}^3$  5% KOH w „b”, służącego do pochłaniania wydzielającego się dwutlenku węgla. Pomiary gazowe mogły być uskutecznione w krótszych odstępach czasu, gdyż nie wymagały wyjęcia naczyń doświadczalnych z termostatu.

Jak już zostało zaznaczone w „metodyce”, roztwory badane musiały być podczas doświadczeń wstrząsane. W tabeli XIII podane zostały pomiary rozpadu różnych stężeń kwasu moczowego, gdzie układy nie były wstrząsane. Mamy tu rozpad o wiele wolniejszy, a dla wyższych stężeń  $\bar{U}$  po pewnym czasie cał-

Tabela XII.

Kinetyka reakcji. Wpływ stężenia  $\bar{U}$ .Kinetik der Reaktion. Einfluss der  $\bar{U}$  — Konzentration.

31. V. 1930

Va	t	Vx	%	$K = \frac{1}{t} \log \frac{V_a}{V_a - V_x}$
50.0 (a = 0.1825)	0.5	9.9	20	0.19
	1	21.1	42	0.25
	1.5	27.6	55	0.23
	2	32.9	66	0.22
	2.5	37.8	75	0.24
	3	41.0	82	0.25
	4	46.1	92	0.26
100.0 (a = 0.375)	0.5	13.1	13	0.12
	1	24.1	24	0.12
	1.5	33.0	33	0.12
	2	44.6	44.5	0.13
	2.5	52.4	52	0.13
	3	61.8	61.5	0.14
	4	73.7	73.5	0.14
	5	83.8	84	0.16
6	91.6	91.5	0.17	
200.1 (a = 0.75)	0.5	17.1	8.5	0.078
	1	32.0	16	0.076
	1.5	46.1	23	0.076
	2	60.3	30	0.076
	2.5	72.2	36	0.078
	3	84.0	42	0.082
	4	104.1	52	0.080
	5	121.0	60.5	0.080
	6	139.9	70	0.087

kowe zahamowanie reakcji spowodowane tem, że zawiesina urikazy osiadła na dnie naczynia. Otrzymujemy stan pozornej równowagi. W układach tych zachodzi proporcjonalność rozpadu podczas pierwszych godzin trwania doświadczenia. Doświadczenia trwające dłużej, niż 12 godzin, zostały wykonane przez nakładanie. W tych warunkach stężenie  $\bar{U}$  w kontroli (zawierającej  $\bar{U}$  i  $H_2O$ ) również ulegało zmianie.

### c) Stała dysocjacji.

Obliczanie stałej dysocjacji  $K_m$  połączenia „enzym-substrat“ opiera się na wzorze (4), wyprowadzonym we wstępie:

$$V = \frac{[S]}{[S] + K_m} \quad (4)$$

## Tabela XIII.

Kinetyka reakcji. Układy nietrzęsione.  
*Kinetik der Reaktion. Nicht geschüttelte Systeme.*

18. VI. 1929.

a	t	a - x	x	%
0.1	1	0.068	0.032	32
	2	0.045	0.055	55
0.2	1	0.165	0.035	17.5
	2	0.125	0.075	37.5
	5	0.065	0.135	67.5
0.4	2	0.32	0.08	20
	4	0.25	0.15	37.5
	6	0.18	0.22	55
	8	0.12	0.28	70
	12	0.085	0.315	78
0.4	16	0.09	0.31	76
0.6	2	0.51	0.09	15
	4	0.42	0.18	30
	6	0.37	0.23	39
	8	0.30	0.30	50
0.56	16	0.29	0.27	48
0.8	2	0.72	0.08	10
	4	0.63	0.17	21
	8	0.45	0.35	44
0.78	12	0.38	0.40	51
0.80	20	0.39	0.41	51

Jeżeli na osi odciętych odkładać będziemy  $\log [S]$ , a na rzędnych  $V$  w dowolnej skali, to otrzymamy krzywą, jak na rys. 1. Jak wynika ze wzoru (4)

$$V \leq 1$$

i przy:

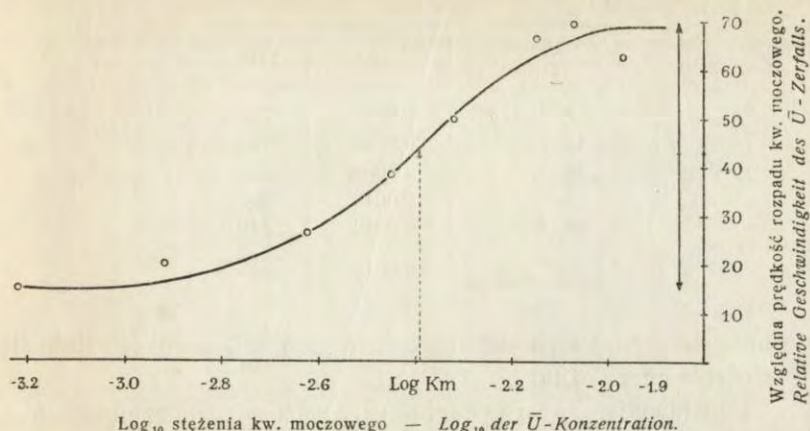
$$V = \frac{1}{2}$$

odpowiednia odcięta da

$$\log K_m = \log [S]$$

Jeżeli dane są punkty, pozwalające wyznaczyć całą krzywą, to wyznaczamy  $K$  graficznie, jak na rys. 1. Oznaczając  $AA = 1$ , znajdujemy połowę tego odcinka, skąd odpowiednia odcięta da  $\log K$ .

Odwrotność współczynnika dysocjacji daje miarę powinowactwa enzymu do substratu. Stała ta nie zależy od pH środowiska, byleby wszystkie badane stężenia substratu miały to samo pH. Dane, dotyczące urikazy, zostały zebrane w tabeli XIV. Pomiary wykonywano za każdym razem w 4-ch równoległych kolbkach. Jak widzimy, prędkość rozpadu zależy od stężenia  $U$ . Jednakże przy



Rys. 1 (tab. XIV). Stała dysocjacji połączenia „Urikaza — kw. moczowy“.  
Fig. 1 (Tab. XIV). Dissotiationskonstante der Verbindung: „Urikase-Harnsäure“.

### Tabela XIV.

Stała dysocjacji połączenia „Urikaza — kw. moczowy“.  
Dissotiationskonstante der Verbindung: „Urikase — Harnsäure“.

a) 13. I. 1930.

(S) = a		log (S) w molach in Molen	t w min. in Min.	x w mg in mg	V = $\frac{x}{t} \cdot 10^3$
mg w 1 cm <sup>3</sup> mg in ccm	w molach in Molen				
0.1	0.000595	-3.23	10	0.015	15.2
			20	0.031	
			30	0.046	
0.2	0.00119	-2.92	10	0.02	20.0
			20	0.04	
0.4	0.00238	-2.62	10	0.026	27.0
			20	0.054	
0.6	0.00357	-2.45	10	0.035	38.0
			20	0.078	
0.8	0.00476	-2.32	10	0.05	50.0
			20	0.10	
1.2	0.00713	-2.15	10	0.06	67.0
			20	0.128	
			30	0.20	
1.4	0.00832	-2.08	10	0.07	70.0
			20	0.14	
			30	0.22	
1.6	0.0107	-1.97	10	0.059	64.0
			20	0.128	
			30	0.184	

$K_m = 0.0045$     1 :  $K_m = 222.$



b)

Data Datum	$K_m$	1 : $K_m$
3. I. 1930	0.0040	250
13. I.	0.0045	222
14. I.	0.0039	255
14. I.	0.0048	209
18. I.	0.0042	240
Średnia Durchschnittlich	0.0043	243

stosunkowo już niewielkim stężeniu  $a > 1 \frac{\text{mg}}{\text{cm}^3}$  prędkość staje się od stężenia niezależna.

Podstawiając w równaniu (2) wartość znalezionej  $K_m$ , otrzymamy:

$$\varphi = \Phi \frac{[S]}{[S] + 0.0043}$$

Oznacza to np., że dla stężenia  $\bar{U} = 4.3$  milimola, co po przeliczeniu na mg daje  $a = \text{ok. } 0.7 \frac{\text{mg}}{\text{cm}^3}$ , połowa całkowitej ilości urikazy jest związana z kw. moczowym. W większym stężeniu kwasu wartość ta szybko wzrasta i praktycznie przy  $a \geq 1.0$ . Całkowita ilość enzymu jest związana z kw. moczowym, co tłumaczy stałą prędkość rozpadu.

#### 4. Wpływ alkoholi.

a) Przyspieszające i hamujące działanie alkoholi.

Doświadczenia nad wpływem alkoholi na urikazę zostały wykonane w ten sposób, że układy zawierały, jak zwykle, 40 cm<sup>3</sup> roztworu, z czego 20 cm<sup>3</sup> urikazy, 10 cm<sup>3</sup>  $\bar{U}$  o stężeniu czterokrotnie większym od stężenia początkowego układu i 10 cm<sup>3</sup> alkoholu + wody, tak aby otrzymać procentowość alkoholu, podaną w tabeli. Schemat układów był następujący:

	$\bar{U}$	urikaza	H <sub>2</sub> O	alkoh.	% alkoh.
1.	10	20	10	—	0
2.	10	20	9.8	0.2	0.5
3.	10	20	9.6	0.4	1
4.	10	20	9.2	0.8	2
5.	10	20	8.0	2.0	5
6.	10	20	6.8	3.2	8
7.	10	20	6.0	4.0	10

Tabela XV.

Wpływ alkoholu butylowego.  
Einfluss des Butylalkohols.

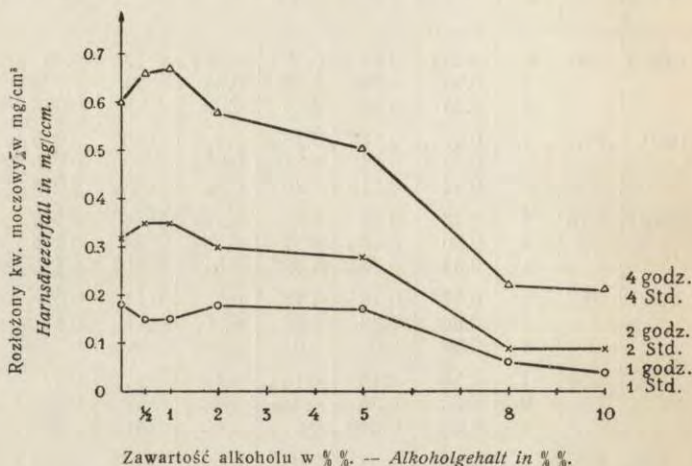
Data Datum	a	t	Procent alkoholu						
			Alkohol %						
			0	0.5	1	2	5	8	10
			x						
20. I. 1930	0.8	1	0.145	0.15	0.12	0.135	0.135	0.05	0.055
		2	0.25	0.265	0.23	0.25	0.24	0.095	0.08
		3	0.33	0.36	0.28	0.32	0.29	0.095	0.08
21. I. 1930	0.8	1	0.17	0.175	0.185	0.215	0.20	0.055	0.055
		2	0.30	0.32	0.31	0.295	0.30	0.095	0.08
		3	0.36	0.415	0.36	0.36	0.335	0.095	0.02
25. I. 1930	0.75	2	0.23	0.25	0.20	0.195	0.16	0.113	0.095
		3	0.30	0.30	0.27	0.265	0.23	0.113	0.09
		4	0.34	0.335	0.32	0.31	0.293	0.105	0.09
24. III. 1930	0.83	1	0.17	0.13	0.13	0.10	0.11	0.07	0.07
		2	0.30	0.32	0.32	0.20	0.29	0.12	0.12
		4	0.60	0.66	0.645	0.535	0.435	0.12	0.14
25. III. 1930	0.84	1	0.18	0.15	0.15	0.18	0.17	0.07	0.04
		2	0.33	0.35	0.35	0.30	0.29	0.09	0.10
		4	0.60	0.665	0.67	0.58	0.455	0.23	0.22
11. III. 1930 urikaza z żab. <i>Urikase</i> aus Fröschen.	0.35	2	0.065	0.05	0.055	0.06	0.045	0.042	0.01
		4	0.10	0.09	0.095	0.10	0.085	0.01	0.01
		6	0.14	0.145	0.14	0.145	0.093	0.02	0.01
12. III. 1930 urikaza z żab. <i>Urikase</i> aus Fröschen.		4	0.105	0.105	0.10	0.12	0.075	0.05	0.02
		8	0.195	0.20	0.225	0.213	0.13	0.05	0.02

Tabela XVI.

Wpływ alkoholu propylowego.  
Einfluss des Propylalkohols.

Data Datum	a	t	Procent alkoholu							
			Alkohol %							
			0	0.5	1	2	5	8	12	16
			x							
27. III. 1930 urikaza z nerek. <i>Urikase</i> aus Nieren.	0.41	2	0.07	0.065	0.065	0.065	0.065	0.06	0.025	0.025
		5	0.13	0.14	0.145	0.16	0.14	0.10	0.09	0.09
13. III. 1930 urikaza z żab. <i>Urikase</i> aus Fröschen.	0.4	4	0.12	0.12	0.12	0.13	0.14	—	0.08	0.05
		8	0.23	0.245	0.24	0.245	0.245	—	0.18	0.06
14. III. 1930 urikaza z żab. <i>Urikase</i> aus Fröschen.	0.4	4	0.145	0.145	0.135	0.16	0.15	0.095	0.065	0.04
		8	0.23	0.235	0.225	0.225	0.23	0.155	0.12	0.04

Tabele XV — XVI wykazują, że alkohol propylowy i butylowy działają w wyższych stężeniach hamująco. Całkowite hamowanie osiągamy dla 8% alk. butylowego i 16% alk. propylowego. Przy niższych stężeniach alkohole przyspieszają nieznacznie reakcję. Podobne zjawisko było obserwowane dla ureazy.



Zawartość alkoholu w % — Alkoholgehalt in %.

Rys. 2 (tab. XV). Wpływ alkoholu butylowego.

Fig. 2 (Tab. XV). Einfluss des Butylalkohols.

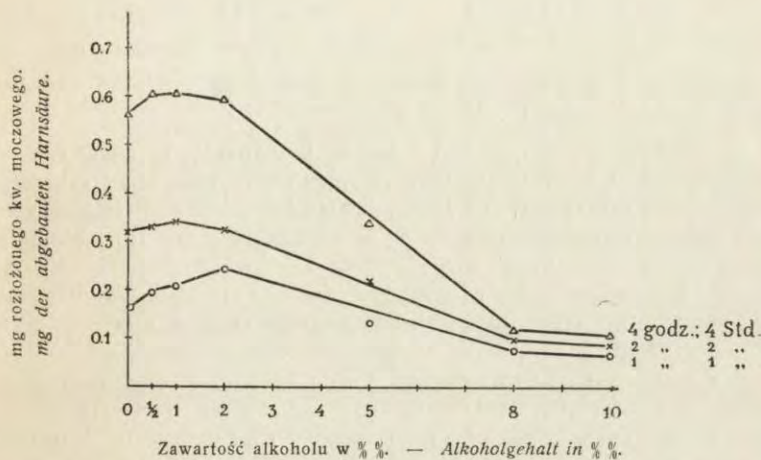
### Tabela XVII.

Wpływ alkoholu butylowego. Alkohol poprzednio w kontakcie z urikazą w temp. 37° przez 12 — 14 godzin.

*Einfluss des Butylalkohols. Alkohol, der sich zuerst im Kontakt mit der Urikase, bei der Temp. 37°, während 12 — 14 Tage befunden hatte.*

Data Datum	a	t	Procent alkoholu Alkohols %						
			0	0.5	1	2	5	8	10
			x						
25. III. 1930 I	0.84	1	0.13	0.13	0.14	0.10		0.06	0.06
		2.5	0.29	0.30	0.20	0.22	—	0.07	0.07
		4.5	0.585	0.59	0.60	0.45		0.07	0.07
28. III. 1930 II	0.41	0.75	0.06	0.06	0.06	0.065	0.03	0.02	0.02
		2	0.16	0.18	0.185	0.105	0.035	0.03	0.03
		3	0.26	0.25	0.245	0.21	0.04	0.03	0.03
III	0.80	1	0.17	0.20	0.21	0.25	0.14	0.08	0.07
		2	0.32	0.33	0.34	0.33	0.22	0.10	0.09
		4	0.56	0.604	0.616	0.604	0.34	0.12	0.11
20. III. 1930 urikaza z żab Urikase aus Fröschen	0.43	3	0.08	0.06	0.08	0.055	0.035	0.03	0.01
		5	0.135	0.135	0.125	0.115	0.04	0.04	0.01
		11	0.263	0.253	0.265	0.20	0.06	0.04	0.02

Działanie hamujące wzrasta w miarę trwania doświadczenia. Przez pierwsze godziny nieraz nie widać działania hamującego albo działanie to nie jest proporcjonalne do stężenia alkoholu. (Rys. 2). Mielibyśmy więc do czynienia z działaniem alkoholi na urikazę w czasie, co zostało rzeczywiście potwierdzone. Doświadczenia, podane w tabeli XVII, zostały wykonane jak powyższe, ale odpowiednie stężenie alkoholu znajdowało się poprzednio w kon-



Rys. 3 (tab. XVII). Wpływ alkoholu butylowego. Alkohol uprzednio był w kontakcie z urikazą przez 12—14 godz. w temp. 37°.

Fig. 3 (Tab. XVII). Einfluss des Butylalkohols. Der Alkohol war vorher mit der Urikase in Verlauf von 12—14 Std. in 37° im Kontakt.

### Tabela XVIII.

Wpływ małych stężeń alkoholu butylowego na różne stężenia  $\bar{U}$ .  
Einfluss von kleinen Alkoholmengen auf verschiedene  $\bar{U}$ -Konzentrationen.

		P r o c e n t   a l k o h o l u													
		A l k o h o l   %													
№	a	0				a	0				a	0			
		0.4	0.8	2.0	0.4		0.8	2.0	0.4	0.8		2.0			
		x				x				x					
I	0.2	0.11	0.14	0.145	0.14	0.4	0.16	0.145	0.145	0.17	0.8	0.22	0.17	0.16	0.18
II	0.2	0.13	0.144	0.15	0.14	0.4	0.185	0.16	0.14	0.195	0.8	0.23	0.21	0.18	0.16
III	0.197	0.135	0.14	0.17	0.16	0.395	0.225	0.215	0.16	0.20	0.79	0.30	0.23	0.18	0.28
IV	0.2	0.127	0.125	0.122	0.136	0.4	0.17	0.14	0.15	0.13	0.8	0.20	0.20	0.16	0.25

t = 1-godzina. No. I-3/2 1930. No. II-4/2 1930. No. III-5/3 1930. No. IV-6/3 1930.  
1 stunde.

takcie z urikazą przez 12 — 14 godz. w temp. 37°, poczem dopiero dodawano U. Proporcjonalna zależność hamowania od stężenia alkoholu staje się wtedy o wiele wyraźniejsza (rys. 3). Działanie przyspieszające jest zależne od stężenia kwasu i w niższych stężeniach U występuje ono wyraźniej. Tabela XVIII ilustruje to zjawisko. W wyższych stężeniach U przyspieszenie występuje wyraźniej pod koniec reakcji, wobec mniejszej ilości moczanu.

b) Odwracalność działania. Odwracalne działanie alkoholi, czyli wpływ alkoholu, który przez pewien czas był w kontakcie z urikazą, a później stężenie jego zostało zmniejszone, ilustrują tabele XIX — XX.

Doświadczenia wykonane zostały w ten sposób, że do 10 cm<sup>3</sup> urikazy dodawano taką ilość alkoholu, która zwykle dość silnie lub całkowicie hamowała reakcję. Po 12—24 godzinach w części erlenmayerek (c) rozcieńczano alkohol dwukrotnie, w pozostałej części (b) stężenie alkoholu nie ulegało zmianie. Poczem po 3—4 godzinach dodawano kw. moczowego, zachowując przez odpowiednie dodanie alkoholu i wody jednakową objętość w obydwu układach i poprzednie stężenia alkoholu. Teraz rozpoczynano właściwy pomiar. Układy zawierały, jak zwykle, 40 cm<sup>3</sup> roztworu, z czego tylko 10 cm<sup>3</sup> urikazy. Celem kontroli porównywano erlenmayerki (c) z takimi (d), w których przez cały czas wstępny alkohol miał stałe stężenie, równe stężeniu, otrzymanemu po rozcieńczeniu układu (c). Dokładny schemat doświadczeń jest umieszczony obok odpowiednich tabel. Każda liczba jest średnią 3-ch równoległych pomiarów.

Jak się okazało, działanie obydwu badanych alkoholi nie jest jednakowe. Działanie alkoh. propylowego nie jest odwracalne, natomiast alkoh. butylowy nawet po 24 godzinach działa odwracalnie.

Tabela XIX.

Odwracalne działanie alkoholu. Alkohol propylowy. Schemat doświadczeń.  
*Reversible Alkoholwirkung. Propylalkohol. Schema der Versuche.*

	A			alk.	B dodane po 12 g. nach 12 std. hinzugeg.			C dodane po 3—4 godz. nach 3—4 std. hinzugeg.			alk.
	urikaza w cm <sup>3</sup> Urikase in cm <sup>3</sup>				w cm <sup>3</sup> in cm <sup>3</sup>		g	w cm <sup>3</sup> in cm <sup>3</sup>			
	H <sub>2</sub> O	alk.			H <sub>2</sub> O	alkoh.	alk.	U	H <sub>2</sub> O	alk.	
b	10	1.25	1.25	10	11.25	1.25	(10)	10	3.5	1.5	10
c	10	1.25	1.25	10	12.5	—	5(10)	10	4.25	0.75	5(10)
d	10	1.88	0.62	5	11.87	0.63	5	10	4.25	0.75	5
e	10	2.37	0.13	1	12.38	0.12	1	10	4.85	0.15	1

Data Datum	a	t	Stężenie alkoholu w ‰‰ Alkohol ‰			
			10	5 (10)	5	1
			a - x			
			b	c	d	e
3. IV. 1930	0.4	4	0.173	0.172	0.12	0.08
4. IV. 1930	0.4	4	0.355	0.355	0.34	0.12
		8	0.235	0.23	0.18	0.11
5. IV. 1930	0.41	2	0.252	0.25	0.17	0.11
		5	0.16	0.155	0.103	0.05
7. IV. 1930	0.4	1.5	0.363	0.36	0.33	0.31
		4	0.295	0.30	0.265	0.21

Tabela XX.

Odwracalne działanie alkoholu. Alkohol butylowy. Schemat doświadczeń w tabeli XIX.  
Reversible Alkoholwirkung. Butylalkohol. Schema der Versuche in der Tab. XIX.

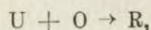
Data Datum	a	t	Stężenie alkoholu w ‰‰ Alkohol ‰			
			10	5 (10)	5	1
			a - x			
			b	c	d	e
8. IV. 1930 I.	0.40	2.5	0.395	0.315	0.31	0.30
		6	0.395	0.24	0.23	0.18
9. IV. 1930 II.	0.4	2	0.35	0.29	0.28	0.22
		5.5	0.355	0.195	0.195	0.135
11. IV. 1930 III.	0.4	3	0.405	0.30	0.29	0.22
		5	0.40	0.235	0.232	0.152
12. IV. 1930 IV.	0.43	2.5	0.40	0.33	0.325	0.30
		5	0.395	0.27	0.26	0.20

W ostatnim pomiarze (4) część „B” (tab. XIX) dodana została po 24 godzinach.

In dem letzten Versuche (4) der Teil „B” (Tab. XIX) war erst nach Ablauf von 24 Std. hinzugegeben.

### III. Dyskusja i wnioski.

1. Wpływ czynników zewnętrznych. a) Wpływ atmosfery jest bardzo wyraźny. W doświadczeniach, wykonanych w atmosferze tlenu, rozpad jest o wiele energiczniejszy, niż w powietrzu. Jeżeli kwas moczowy, utleniając się, daje produkt rozpadu R:



to mamy:

$$C(u) \cdot C(o) = K \cdot C(r),$$

gdzie C(u), C(o) i C(r) są stężeniami odpowiednich produktów

reakcji i zwiększenie stężenia tlenu powoduje zwiększenie rozpadu kwasu moczowego.

a) Dodanie do układu zagotowanej urikazy hamuje nieznacznie reakcję. Wpływ ten mógłby być tłumaczony adsorbcją substratu na kłaczkach utworzonych podczas zagotowania enzymu. Natomiast dodatek przesączu z zagotowanej urikazy nie ujawnia żadnego hamowania. Doświadczenia te dowodzą zarazem inaktywności zagotowanej urikazy.

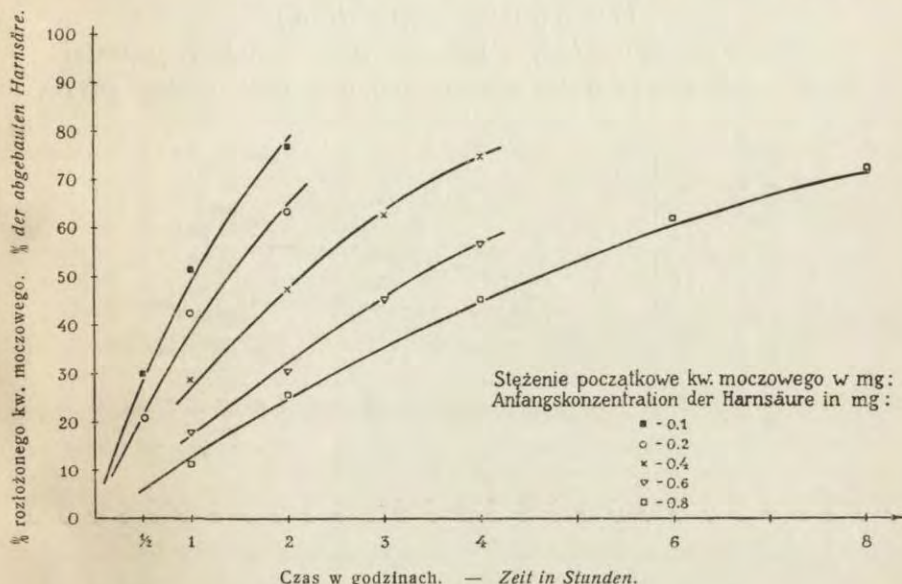
c) Alantoina nawet w dość dużym stężeniu (ok. 3 mg/cm<sup>3</sup> roztw.) nie ma zupełnie wpływu na szybkość reakcji. I to zjawisko może być również wytłumaczone prawem działania mas w sensie równania MICHAELISA. Alantoina nie jest, jak wiemy, bezpośrednim produktem utlenienia kwasu moczowego, ale — końcowym i na przebieg pierwszej części reakcji — właściwy rozpad U — może nie mieć żadnego wpływu.

2. Starzenie się urikazy. Doświadczenia, dotyczące zużycia się urikazy, wykazują, że enzym ten się nie zużywa, i po rozłożeniu dowolnych ilości U ma tę samą intensywność działania. Urikaza należy więc do katalizatorów idealnych.

Z zestawionych tabel VII — VIII wynika, że stosunek wydzielonego dwutlenku węgla do ilości pobranego tlenu równa się (dla świeżych preparatów urikolitycznych) teoretycznemu, t. j. 2. W starszych wyciągach stosunek ten opada. Natomiast pierwsza faza — rozbiecie U przy pobraniu tlenu — nie zależy zupełnie od świeżości enzymu (tab. VIII). Po siedmiu dniach wyciąg rozbija te same ilości kw. moczowego, co pierwszego dnia, kiedy został użyty bezpośrednio po przygotowaniu. Z rubryk 5 i 6 tej tabeli wynika, że utlenianie (pobranie tlenu) jest równoznaczne z rozbięciem kw. moczowego. Ilość wydzielonego dwutlenku jest wyraźnie zależna od starości fermentu. Przemawiałoby to za tem, że istnieje część dekarboksylująca urikazy, że część ta nie zależy od części utleniającej, i że ulega dość szybko zniszczeniu. Zgadzałoby się to z wynikami badań FELIXA, SCHEELA I SCHULERA, którzy badając zależność stosunku  $\frac{\text{CO}_2}{\text{O}_2}$  od pH środowiska również doszli do takiegoż wniosku.

3. Kinetyka. Szybkość reakcji jest w pewnych granicach proporcjonalna do stężenia enzymu, jeżeli uwzględnimy przy mniejszych stężeniach dłuższy okres trwania doświadczenia. Co się tyczy

wpływu stężenia substratu, to z zestawionych tabel widzimy, że rozpad w małych stężeniach kwasu (0.1 — 0.2 mg) jest proporcjonalny naogół do stężenia, po zwiększeniu stężenia prędkość wzrasta również, ale już proporcjonalność nie zachodzi, wreszcie przy dość dużych stosunkowo stężeniach prędkość rozpadu pozostaje bez zmiany. Rys. 4 (otrzymany jako średnia 5-u pomiarów) daje wykres krzywych rozpadu w zależności od 5-u stężeń. Rys. 5



Rys. 4. Rozpad kw. moczowego. Średnia 5-u pomiarów.

Fig. 4. Harnsäurezerfall. Durchschnittlich aus 5 Versuchen.

podaje również tę zależność. Na osi odciętych są odkładane stężenia  $\bar{U}$ , na osi rzędnych—odpowiednie ilości rozłożonego kwasu w dowolnych okresach czasu. Zaznacza się wyraźnie, że rozpad początkowo jest proporcjonalny do stężenia: krzywa ma kształt zbliżony do prostej, przechodzącej przez początek układu. Następnie przybiera kształt krzywej logarytmicznej, poczem znów prostej równoległej do osi stężeń. Odpowiada to niezależności rozpadu od stężenia.

Jak już zostało wspomniane we wstępie, niektórzy badacze uważają, że związek zachodzący między enzymem a substratem jest natury adsorbcyjnej i stężenie cząsteczek enzymu, biorących udział w reakcji, określają przez stopień adsorbcji. Krzywą ak-



tywności substratu uważają za izotermę adsorbcyjną. Ostatnio HEDIN ('25, '26) postawił szereg zarzutów równaniu MICHAELISA, dotyczącemu stałej dysocjacji.

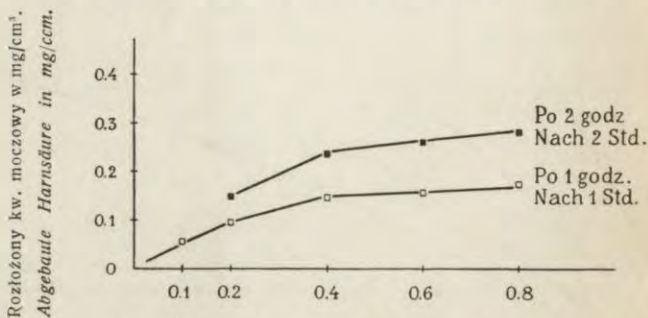
Jeżeli równanie to napiszemy w postaci poprawnej:

$$[S - \varphi] [\Phi - \varphi] = K \varphi$$

gdzie  $S$  — jest całkowitem stężeniem substratu, to zwiększając  $n$ -krotnie ilość fermentu, otrzymujemy:

$$[S - n\varphi] [n\Phi - n\varphi] = K \cdot n\varphi$$

Jak łatwo zauważyć, tylko przy  $n = 1$  stała  $K$  pozostaje w obydwu równaniach bez zmiany. Podobnie działoby się w przy-



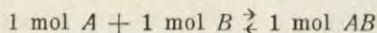
Stężenie początkowe kw. moczowego w mg/cm<sup>3</sup>.  
Anfangskonzentration der Harnsäure in mg/ccm.

Rys. 5 (tab. XI). Rozpad kw. moczowego.  
Fig. 5 (Tab. XI). Harnsäurezerfall.

padku zwiększenia stężenia substratu. Poza tem autor twierdzi, że nie mamy dostatecznych dowodów na to, że wielkość jest rzeczywiście mała, i że zamiast wielkości  $(S - \varphi)$  mamy prawo napisać  $S$ , jak w równaniu (1). MICHAELIS przyjmuje poza tem, że jedna cząsteczka substratu łączy się z jedną cząsteczką enzymu lub jedną grupą atomową czynną tego enzymu. HEDIN twierdzi, że tego nie wiemy i możliwe jest, że jedna cząsteczka substratu łączy się z większą ilością cząsteczek fermentu i wtedy już napewno zamiast wyrażenia  $(S - n\varphi)$  nie moglibyśmy stosować wielkości  $S$ . Ostatni ten zarzut, jak słusznie zaznacza MICHAELIS ('26), godzi nie w wyniki, ale w jedno z założeń teoretycznych, o czym powinien decydować eksperyment. Znaczenie doświadczenia będzie nieważne, o ile się odmieni jedno z założeń. Zarzuty, dotyczące zmienności stałej dysocjacji  $K$  przy zmianach ilości enzymu lub substratu, nie są zarzutami, godzącymi w sto-

sownalność prawa działania mas w stosunku do enzymów, ale godzą w prawo to w ogólności.

Jeżeli bowiem mol ciała  $A$ , łącząc się z molem ciała  $B$ , daje 1 mol ciała  $AB$ :



o prawo działania mas napisane w postaci:

$$\frac{C_A \cdot C_B}{C_{AB}} = k$$

(gdzie  $C_A$ ,  $C_B$  i  $C_{AB}$  są odpowiednimi stężeniami molarnymi) jest prawem granicznym, sprawdzającym się w przypadku małych stężeń, w których ciśnienie osmotyczne wynosi dokładnie  $RT$ . Teoria aktywności stara się te trudności ominąć przez wprowadzenie do wzoru GULDBERGA i WAAGEGO współczynników aktywności, zależnych od stężeń ciał wprowadzonych. Powyższy wzór przybrał więc postać:

$$\frac{\lambda_A \cdot C_A \cdot \lambda_B \cdot C_B}{\lambda_{AB} \cdot C_{AB}} = K$$

gdzie  $\lambda_A$ ,  $\lambda_B$  i  $\lambda_{AB}$  są odpowiednimi współczynnikami.

Sens ich byłby ten, że uwzględniają one siły międzycząsteczkowe, które w przypadku idealnym powinny być zaniedbane. To, że prawo działania mas naogół się zgadza, oznacza, że w praktycznie używanych stężeniach współczynniki te są równe jedności. Jest więc możliwe dobranie tych wielkości nie tylko dla układów jednolitych, ale również dla koloidów i enzymów.

Pomiary, dotyczące ciężarów cząsteczkowych enzymów, dają liczby dość wielkie ( $> 20.000$ ). Praktycznie więc stężenie enzymów jest nieznaczne i pozwala na stosowanie równania (1), w którym zamiast wielkości  $[S - \varphi]$  mamy  $[S]$ . W tych warunkach prawo proporcjonalności rozpadu do stężenia enzymu nie stoi w sprzeczności z prawem działania mas. W przypadkach kiedy stężenie substratu jest bardzo nieznaczne, odchylenia od prawa zostały stwierdzone.

W przypadku urikazy enzym jest zawarty w układzie jako zawiesina i prawa działania mas sprawdzą się wtedy, jeżeli układ będzie najbardziej zbliżony do układów jednolitych. Muszą więc być wyłączone czynniki dyfuzji i adsorpcji, zachodzące w makro-niejednolitych. Czynniki pierwsze wpływałyby wtedy na kinetykę

reakcji, gdyby prędkość, z jaką stykają się cząsteczki kw. moczowego z urikazą, była mniejsza, niż prędkość rozbicia kwasu.

Najwyraźniej to występuje, kiedy układ znajduje się w spoczynku i osad urikazy jest na dnie naczynia doświadczalnego. Z tabeli XIII widzimy, że w doświadczeniach, dotyczących układów nietrzęsionych, mamy rozpad o wiele wolniejszy. W wyższych stężeniach  $\bar{U}$  następuje po pewnym czasie całkowite zahamowanie reakcji, spowodowane tem, że zawiesina urikazy całkowicie opadła na dno naczynia. Wskutek trzęsienia czynnik ten został wyeliminowany. Jak wskazuje tabelka załączona w części metodycznej, stosowana przez nas szybkość trzęsienia jest wystarczająca i zwiększenie jej nie powoduje zmian w szybkości reakcji.

Czynnik sorbcji wpływałby wtedy, gdyby kwas moczowy sorbował się na urikazie, wskutek czego nie mielibyśmy jednolitego stężenia kwasu. Doświadczenia, wykonane z urikazą nieczynną, wykazały, że po oddzieleniu stałych części urikazy od roztworu stężenie kw. moczowego pozostało bez zmiany,  $\bar{U}$  nie sorbuje się na urikazie, albo sorbuje się w ilości nieznacznej, nie większej, niż w roztworach koloidalnych. Możemy więc zastosować prawa działania mas i zbadać kinetykę działania urikazy, wychodząc z układów jednolitych. Gdybyśmy bowiem chcieli zastosować prawa, dotyczące chemji koloidów, i uważać, że działają tu siły adsorbcyjne, to stałoby to w kolizji z tem, że szybkość reakcji wzrasta przy zwiększeniu stężenia substratu. Możemy więc z pewną dokładnością uważać, że zachodzi tutaj równowaga, zgodna z równaniem (4) MICHAELISA, dotyczącem stałej dysocjacji.

Ilość fermentu związanego z substratem zależy jednak od powinowactwa i trwałości połączenia „enzym-produkt rozpadu“. Z równania (7) na wstępie mamy:

$$K_R = \frac{[R] \cdot K_m}{[S] \left( \frac{\Phi}{\varphi} - 1 \right) - K_m} \quad (9)$$

gdzie  $K$  — jest stałą dysocjacji „produkt rozpadu — enzym“. Gdyby takie połączenie zachodziło dla alantoiny, to dodatek tej ostatniej powinienby spowodować zmniejszenie szybkości rozpadu. Istotnie: niech  $v$  i  $v_0$  będą stwierdzonymi prędkościami po-

czątkowemi po dodaniu alantoiny i bez niej; na zasadzie poprzedniego mielibyśmy:

$$v : v_0 = \varphi : \varphi_0$$

i równanie (2) należałoby poprawić na:

$$\varphi_0 = \Phi \frac{[S]}{[S] + K_m} \quad (10)$$

Skąd

$$\varphi = \frac{v}{v_0} \varphi_0 = \Phi \frac{v}{v_0} \cdot \frac{[S]}{[S] + K_m} \quad (11)$$

wstawiając wartość tę do równania (7) otrzymamy:

$$K_R = \frac{[R] \cdot K_m}{(S + K_m) \left( \frac{v}{v_0} - 1 \right)} \quad (12)$$

Jak wykazało doświadczenie, dodanie alantoiny nie obniża prędkości rozpadu i

$$v = v_0$$

skąd wypływa, że

$$K_R = \infty$$

i stała powinowactwa równa 1 :  $K_R = 0$ .

Wzór (4) mógłby więc być stosowany nietylko do prędkości początkowych i przyjąłby postać:

$$\frac{dx}{dt} = c \cdot \frac{a - x}{a - x + K_m} \quad (13)$$

gdzie  $a$  jest stężeniem początkowym substratu,  $x$  ilością rozbitego kwasu po czasie  $t$ , a  $c$  współczynnikiem proporcjonalności.

Rozwiązując równanie (13), mamy:

$$k = \frac{1}{K_m} \cdot \frac{x}{t} + \frac{1}{t} 2.303 \log \frac{a}{a-x} \quad (14)$$

gdzie

$$k = \frac{c}{K_m}$$

Teoretycznie równanie działania urikazy przedstawia się więc jako suma reakcyj stopnia pierwszego i zerowego. Przy małym  $K_m$  powinny przeważać pierwsza część równania, przy dużym — druga. Reakcji stopnia zerowego należałoby wtedy oczekiwać, gdy powinowactwo enzymu do substratu jest tak wielkie, że gdy większa część substratu zostanie rozbita, enzym

jest jeszcze całkowicie związany z substratem. Również powinno być małe powinowactwo enzymu do produktów reakcji.

Pozornie mamy te czynniki w stosunku do urikazy; należałoby więc oczekiwać rozpadu, zbliżonego do reakcji stopnia zerowego. Wartości na  $x$  wyrażone w miligramach po przeliczeniu na gramy powodują jednak zmniejszenie pierwszej części równania tysiąckrotnie. W rezultacie przeważa druga część równania i rozpad, jak zauważyliśmy, jest bardziej zbliżony do reakcji stopnia pierwszego. W wyższych stężeniach substratu zauważono, szczególnie pod koniec reakcji, wyraźne odstępstwa dla stałej  $k$  równej:

$$k = \frac{1}{t} \ln \frac{a}{a-x}$$

Są one spowodowane tem, że zostały rozbite większe ilości kwasu moczowego i czynnik  $\frac{x}{t}$  staje się coraz większy, co powoduje wzrost  $k$  wyliczonego dla reakcji pierwszostopniowej. Odstępstwa na  $k$  wyliczone na początku reakcji mogą być spowodowane błędami, wynikającymi z samej metody jak wskazuje poniższa dyskusja błędu.

$$k = \frac{1}{t} \ln \frac{a}{a-x}$$

$$k = f [t, a, (a-x)]$$

$$\Delta k = \left| \frac{\partial f}{\partial t} \right| \cdot \Delta t + \left| \frac{\partial f}{\partial a} \right| \cdot \Delta a + \left| \frac{\partial f}{\partial (a-x)} \right| \cdot \Delta (a-x)$$

$$\Delta k = \frac{1}{t^2} \ln \frac{a}{a-x} \cdot \Delta t + \frac{1}{t} + \frac{1}{a} \cdot \Delta a + \frac{1}{t} \cdot \frac{1}{(a-x)} \cdot \Delta (a-x)$$

$$\Delta k = k \frac{\Delta t}{t} + \frac{1}{t} \cdot \frac{\Delta a}{a} + \frac{1}{t} \cdot \frac{\Delta (a-x)}{(a-x)}$$

$\Delta t$  — błąd maksymalny w pomiarze czasu, spowodowany wyjęciem erlenmayerki z termostatu, wynieść może do 3 minut  $\Delta t = 3:60 = = 0.05$ .

$\Delta a$  — błąd maksymalny w pomiarze stężenia początkowego kwasu moczowego wynosi nie więcej, niż jedna podziałka kolorymetru, co dla średnich stężeń kwasu równych  $0.5 \frac{mg}{cm^3}$  wynosi  $1\% \frac{\Delta a}{a} = 0.01$ :

$\Delta (a-x)$  — maksymalny błąd podczas pomiarów wynieść może dwie podziałki skali kolorymetru = 0.01 mg. Wzór na  $k$  przyjmie więc postać:

$$\Delta k = \frac{k}{t} \cdot 0.05 + \frac{0.01}{t} + \frac{0.01}{t(a-x)} :$$

Przykład:  $a = 0.4$ ;  $t = 1$ ;  $a - x = 0.24$ ;  $k = 0.52$ ;

$$\Delta k \approx 0.08; \frac{\Delta k}{k} = \text{ca. } 0.16;$$

Błąd wyznaczonego  $k$  może więc dojść do 16%; drugi znak stałej jest więc niepewny; przy większych  $t$  błąd ten zmniejsza się proporcjonalnie i wzrostu stałej  $k$  nie można kłaść na karb błędu doświadczalnego.

4. Wpływ alkoholu. W niższych stężeniach alkoholu został stwierdzony niewielki wzrost szybkości rozpadu, osiągający dla 1% alkoholu butylowego i 2% — propylowego swoje maksimum. Późem następuje wraz ze wzrostem stężenia narkotyku zahamowanie reakcji proporcjonalne do stężenia, co wyraźnie daje się zauważyć po dłuższym czasie trwania doświadczenia. Z rys. 2 widzimy, że po 1—2 godzinach proporcjonalność nie uwidacznia się tak, jak po 4-ch. Mielibyśmy więc do czynienia z działaniem alkoholu w czasie, co rzeczywiście stało potwierdzone. W doświadczeniach, gdzie urikaza i alkohol były uprzednio przez dłuższy czas w kontrakcie, proporcjonalność występuje już po pierwszym pomiarze (rys. 3).

Zahamowanie całkowite zachodzi dla 8—10% alk. butylowego i 16% alk. propylowego. Byłoby to więc zgodne z dotychczasowymi badaniami nad hamującym wpływem alkoholu, gdzie wyższe człony homologiczne hamują intensywniej, niż niższe. Działanie hamujące alkoholu butylowego jest średnio dwa razy energiczniejsze, niż propylowego. W stężeniach, wywołujących całkowite hamowanie, mamy początkowo niewielki rozpad, ale później następuje całkowite zahamowanie. Zjawisko to tłumaczy się działaniem tych alkoholi na urikazę w czasie. Wpływ hamujący jest niezależny od stężenia substratu i enzymu, natomiast przyspieszenie reakcji, spowodowane małymi stężeniami kwasu moczowego, wyraźnie zależy od stężenia substratu. W niższych stężeniach kwasu działanie przyspieszające jest stosunkowo większe, niż w stężeniach wyższych.

Co się tyczy odwracalnego działania hamującego tych narkotyków, to zbadane alkohole zachowują się niejednakowo. Alkohol propylowy działa nieodwracalnie, butylowy natomiast na

wet po dwudziestu czterech godzinach zachowuje swe odwracalne działanie.

W myśl przyjętych założeń, prędkość reakcji enzymatycznej wyraża się wzorem (3):

$$V = C \cdot \varphi \quad (3)$$

Zależy wtedy od każdorazowego stężenia  $\varphi$  i współczynnika proporcjonalności  $c$ .

Zjawiska, polegające na zmianach prędkości reakcyj enzymatycznych, mogą więc być spowodowane przez zmianę jednego albo drugiego czynnika, albo obu jednocześnie. Przy zmianie  $\varphi$  narkotyk wiąże się chemicznie lub fizyko-chemicznie z częścią fermentu wskutek czego odciąża część enzymu, związanego ze substratem. Zmiana współczynnika  $c$  spowodowana jest przez zmianę środowiska reakcyjnego. Przy stałym stężeniu ciała hamującego nie powinna ona wtedy zależeć ani od stężenia substratu, ani fermentu.

Ponieważ przyjmujemy, że stężenie enzymu jest stosunkowo bardzo małe, więc całkowite hamowanie alkoholi dla różnych stężeń urikazy nie stałoby w sprzeczności z poglądami MAYERHOFA ('14) i WARBURGA i WIESLA (podanemi we wstępie), którzy przyjmują sorbcję alkoholu na enzymie, a więc zmianę  $\varphi$ . Pozostałaby niewyjaśniona kwestja przyspieszenia reakcji w małych stężeniach alkoholi.

Możnaby przypuścić, że nieznaczne ilości  $\bar{U}$ , które się sorbuja na tkance, zostają desorbowane przez alkohol i również rozłożone. W niewielkich stężeniach kwasu moczowego ta ilość wpływa na procent rozpadu.

Gdyby przyjąć zmianę współczynnika  $c$ , a więc środowiska reakcyjnego, to należałoby przyjąć, że małe stężenia alkoholi powodują wzrost, a większe zmniejszenie tego współczynnika. Należałoby wyjaśnić wpływ małych stężeń  $\bar{U}$  na działanie przyspieszające alkoholi. Obserwowaliśmy bowiem nieraz, że wzrost prędkości rozpadu w małych stężeniach kwasu jest bardziej wyraźny, niż w większych. Trzeba więc przyjąć, że na wzrost współczynnika proporcjonalności wpływa również samo stężenie kwasu w obecności alkoholi i w małych stężeniach jest on większy niż w dużych, w których osiąga wielkość stałą. Przypuszczenie to wyjaśniałoby dlaczego przyspieszenie obserwowane

w dużych stężeniach  $\bar{U}$ , daje się zauważyć pod koniec reakcji w stosunku o wiele większym, niż na początku, kiedy całkowita ilość kwasu jest jeszcze w roztworze. [Że kwas moczowy wpływa również na stan fizyko-chemiczny roztworu urikolitycznego, przemawiałoby zjawisko, obserwowane podczas doświadczenia, wykonanego w celu przekonania się o zużyciu urikazy, gdzie do układu  $B$  (tab. V) dodawano w części wstępnej nieznaczne ilości  $\bar{U}$ , ażeby się nie utworzyły kłaczkę, co zachodziło w czasie ogrzewania samego roztworu urikazy, bez kwasu w temp. 37°].

Prawdopodobnym jest, że występuje tu wpływ obydwu czynników:  $c$  i  $\varphi$ . Jednakże w obecnym stanie badań, dotyczących wpływu narkotyków na reakcje enzymatyczne, nie da się nic pewnego powiedzieć o stronie ilościowej, dotyczącej obydwu omówionych czynników.

Odwracalne działanie alkoholu butylowego mogłoby być wyjaśnione odpowiednim rozcieńczeniem roztworu, a więc zmianą środowiska i wzrostem współczynnika  $c$ . Przyjmując jednakże sorbcję alkoholu na enzymie, można również wyjaśnić zjawisko odwracalności, gdyż po rozcieńczeniu roztworu sorbcja alkoholu może być mniejsza i ilość wolnego fermentu jest większa.

Pozostałoby niewyjaśnione nieodwracalne działanie alkoholu propylowego. Możliwym jest, że jest ono spowodowane przez to, że alkohol propylowy w wyższych stężeniach ścina zawieszinę urikolityczną, powodując zamknięcie urikazy i nieodwracalność hamowania. W przypadku alkoholu butylowego ścinanie to w użytych stężeniach było mniej wyraźne.

#### Streszczenie wyników.

1°. W badanem środowisku (pH ok. 7.4) urikaza, enzym utleniający kwas moczowy do alantoiny, nie rozpuszcza się w wodzie i musi być użyta do doświadczeń jako zawieszina. W celu otrzymania jednolitego stężenia urikazy w roztworach badanych, układy muszą być podczas doświadczeń trzęsione.

2°. Rozpad w atmosferze tlenu zachodzi o wiele energiczniej, niż w powietrzu.

3°. Dodanie do układu urikazy zagotowanej obniża nieznacznie szybkość reakcji. Dodanie przesączu z zagotowanej urikazy nie wpływa zupełnie na prędkość rozpadu.



4°. Alantoina, nawet w bardzo stężonych roztworach, nie wpływa na kinetykę.

5°. Urikaza jest katalizatorem idealnym.

6°. Rozpad urikolityczny kwasu moczowego zachodzi przy pobraniu jednego atomu tlenu w stosunku do jednej cząsteczki  $\bar{U}$  i wydzieleniu jednej cząsteczki  $\text{CO}_2$ .

7°. Pobranie tlenu i rozpad kw. moczowego nie zależy od świeżości enzymu. Natomiast stosunek  $\frac{\text{CO}_2}{\text{O}_2}$  zrazu równy 2, t. j. teoretycznemu, później w miarę starzenia się fermentu opada.

8°. Powinowactwo „urikaza-kwas moczowy“ jest dość duże. Stała dysocjacji jest więc stosunkowo mała.

9°. Rozpad kwasu moczowego jest najbardziej zbliżony do reakcji stopnia pierwszego. W pierwszych okresach rozpad jest proporcjonalny do czasu trwania doświadczenia.

10°. Rozpad jest w pewnych granicach proporcjonalny do ilości urikazy.

11°. Rozpad jest zależny od stężenia  $\bar{U}$ , wzrastając wraz ze stężeniem kwasu. W większych stężeniach osiąga wartości stałe, niezależne od ilości substratu.

12°. W układach nietrzęsionych mamy w wyższych stężeniach po pewnym czasie pozorne zahamowanie reakcji.

13°. Alkohol propylowy i butylowy działają w małych stężeniach przyspieszająco, a w wyższych hamująco.

14°. Hamowanie to jest naogół proporcjonalne do stężenia użytego alkoholu i nie zależy ani od stężenia kwasu moczowego, ani od stężenia urikazy. Całkowite hamowanie osiągamy zawsze w tych samych stężeniach alkoholi.

15°. Hamujące działanie alk. butylowego jest odwracalne, a propylowego nieodwracalne.

Panu Prof. dr. St. J. Przyłęckiemu, pod którego kierunkiem została wykonana niniejsza praca, składam na tem miejscu jaknajserdeczniejsze podziękowanie.

#### Piśmiennictwo.

Ascoli. 1898. Według Wiechowskiego i Wienera. **Batelli** u. **Stern**. 1909. Untersuchung über die Uricase in den Tiergeweben. **Bioch. Zs.** 19 (219). **Bayliss**. 1914. Według Eulera. **Behrend** und **Schultz**.

1909. Oxydation von Harnsäure (II). Lieb. Ann. **365** (21). **Behrend** und **Zieger**. 1915. Oxydation von Harnsäure (III). Lieb. Ann. **410** (337). **Biltz** und **Herman**. 1921. Über die Salze der Harnsäure. Berichte. **54** (1676). **Biltz** und **Max**. 1920. Über den Mechanismus der Bildung von Uroxansäure. Berichte. **53** (1964). **Biltz** und **Max**. 1921. Allantoin und sein Methylderivate. Berichte. **54** (2451). **Biltz** und **Robl**. 1920. Über Uroxsansäure. Berichte. **53**, (1950). **Biltz** und **Schauder**. 1923. Über Oxydation von Harnsäure. Jour. f. prakt. Chemie. **106** (108). **Chassevant** et **Richet**. 1897. Według **Wiechowskiego** i **Wienera**. **Euler**. 1920. Chemie der Enzyme. Aufl. I. **Felix**, **Scheel** und **Schuler**. 1929. Die Uricolyse (I). Zs. physiol. Chem. **180** (90). **Galleoti**. 1911. Versuch einer Isolierung des uricolytischen Fermentes. Biochem. Zs. **30** (374). **Hedin**. 1925. Über die Anwendung des Massenwirkungsgesetzes auf den Verlauf der Enzymwirkung. Zs. physiol. Chem. **146** (122). **Hedin**. 1926. Zur Frage über die Anwendung etc. Zs. physiol. Chemie. **154** (252). **Jacoby**. 1899. Według **Oppenheimer** a. **Meyerhoff**. 1914. Über Hemmung von Fermentreaktionen durch indifferente Narcotica. Pflügers Archiv. **157** (257). **Michaelis**. 1926. Die Bedeutung des Massenwirkungsgesetzes für die Kinetik der Saccharase. Zs. physiol. Chem. **152** (183). **Michaelis** und **Menten**. 1913. Die Kinetik der Invertinwirkung. Biochem. Zs. **49**. (333). **Oppenheimer**. 1926. Die Fermente und ihre Wirkungen. V Aufl. **Piaux**. 1924. Catalyse par le cuivre et l'urate cuivreux. C. R. Acad. Sc. **179** (901). **Przyłęcki**. 1928. Urikaza i jej działanie. (I) Otrzymywanie. Acta Biologiae Experimentalis. **3** (1). **Przyłęcki**. 1929. Reaktionskinetik in makroheterogenem Medium. Biochem. Zs. **206** (60); 1930. Biochem. Journ. **24**. **Truszkowski** R. 1930. Acta Biol. Exp. **5** (257). **Schittenhelm**, 1905. Über die uricolytische Fermente. Zs. physiol. Chemie. **45** (161). **Stockwis**. 1859. Według **Wiechowskiego** i **Wienera**. **Warburg** O. 1926. Über den Stoffwechsel der Tumoren. **Warburg** und **Wiesel**. 1912. Über die Wirkung von Substanzen homologer Reihen auf Lebensvorgänge. Pflügers Archiv **144** (465). **Wiechowski**. 1906. Die Produkte der fermentativen Harnsäurezersetzung. Hofm. Beitr. **9** (265). **Wiechowski** und **Wiener**. 1906. Über die Eigenschaften und Darstellung des Harnsäurezerstörendes Fermentes der Rinderniere und Hundeleber. Hofm. Beitr. **9** (247). **Wiener**. 1905. Według **Oppenheimer** a.

The first part of the book is devoted to the history of the Polish state in the 19th century. It begins with the partitions of Poland in 1795 and ends with the restoration of Polish independence in 1918. The author discusses the political, social, and cultural changes that took place during this period. He also analyzes the role of the Polish state in the process of European integration and the development of the Polish economy. The second part of the book is devoted to the history of the Polish state in the 20th century. It begins with the restoration of Polish independence in 1918 and ends with the fall of the communist regime in 1989. The author discusses the political, social, and cultural changes that took place during this period. He also analyzes the role of the Polish state in the process of European integration and the development of the Polish economy. The third part of the book is devoted to the history of the Polish state in the 21st century. It begins with the fall of the communist regime in 1989 and ends with the present day. The author discusses the political, social, and cultural changes that took place during this period. He also analyzes the role of the Polish state in the process of European integration and the development of the Polish economy.

[Oddział Przemiany Materji przy II-giej Klinice Chorób Wewnętrznych  
Uniwersytetu Warszawskiego].

M. Wierzuchowski.

**Przetwarzanie cukrów, wprowadzanych dożylnie ze stałą prędkością. VI. Wpływ hormonów, głodu i czynników pokarmowych na przyswajanie galaktozy i glikozy.**

*Le métabolisme des sucres injectés par la voie intraveineuse à vitesse constante. VI. L'influence des hormones, du jeûne et des facteurs alimentaires sur l'assimilation du galactose et du glycose.*

Rękopis nadesłany w dniu 8. IV. 1931 r.

Au cours des expériences l'auteur introduisait des solutions de sucres à des chiennes normales par la voie intraveineuse à vitesse constante en quantité de 2 g de sucre pour 1 kg du poids de l'animal par heure et il examinait pendant l'injection heure par heure, la concentration du sucre sanguin et sa quantité dans l'urine, en soumettant les animaux de l'étude à différentes influences. Toutes les valeurs de glycosurie, que l'auteur présente dans la suite, ont rapport aux injections exécutées pendant 10 hrs. et sont notées en % de la quantité totale du sucre, qui avait été injecté.

Lors de l'introduction du galactose dans les conditions indiquées tout à l'heure, la quantité et la qualité de la nourriture, administrée juste avant l'expérience, de même que le jeûne de 10 jours, n'exercent aucune influence sur le degré d'assimilation du même sucre. Une chienne a éliminé 75.7 — 78.4% du sucre injecté, une autre, par contre, 69.4 — 76.0%. La courbe de la galactosurie reste toujours la même et elle peut être divisée en deux parties: a) la période d'accroissement et b) la période du plateau, qui se prolonge jusqu'à la fin de l'injection. L'uniformité du niveau de la galactosurie dans la période du plateau

ne va pas strictement de pair avec la stabilité constante du plateau dans la courbe du sucre sanguin, dont la concentration oscille, lors des différentes expériences chez un animal, entre 481—653 mg% et chez un autre entre 487—543 mg%.

L'adrénaline, à la dose de 0.03 mg/kg/hr. administrée soit par la voie intraveineuse, soit sous la peau, n'exerce aucune influence sur la galactosurie, qui à ce moment-là comporte chez un animal 74.5—75.7% et chez un autre 73.8—74.0%. La concentration du glycose dans le sang s'intensifie pendant que celle du galactose reste sans aucun changement. Dans une expérience aiguë la thyroxine n'a démontré aucune influence nette:—la galactosurie comportait 73.8%.

L'insuline fait baisser une galactosurie de 10 hrs. du niveau de 72.3 au 62.3%. C'est le seul de tous les agents déjà étudiés qui influe sur l'assimilation du galactose dans ces conditions-là et diminue, presque chaque heure, le taux de la galactosurie, et cela, plus ou moins, d'une manière régulière depuis le commencement jusqu'à la fin de l'injection.

Lors de l'administration du glycose par la voie intraveineuse le phénomène, que l'on peut rencontrer dans chaque expérience, est la période d'entrée de l'impuissance assimilatrice, caractérisée par un parcours plus élevé des courbes de sucre, autrement dit: — la première phase d'assimilation. Cette dernière doit être divisée en trois parties, notamment: a) la période d'accroissement des courbes de sucre (période ascendante), b) la période du sommet de l'impuissance assimilatrice, et, enfin c) la période de la baisse des courbes du sucre, c. à d., celle de la diminution de l'impuissance assimilatrice (période descendante).

Après le jeûne de 10 jours, la première phase se prolonge pendant quelques dizaines d'heures, mais pas de la même manière chez les différents individus; chez les uns, la période de baisse commence à apparaître déjà après 7 hrs. d'injection du glycose, chez d'autres, la même phase n'apparaît pas même après 30 hrs. La quantité du glycose éliminé dans ces conditions-là représente, en moyenne, 45.3%. L'insuline ne fait accélérer le processus d'assimilation du glycose, qu'uniquement dans la période d'accroissement de la première phase, c. à d., dans les 5 premières heures d'injection après le jeûne de 10 jours, en intensifiant l'assimilation lors de cette période plus ou moins de 10%

de la quantité simultanément injectée; mais elle n'augmente pas l'assimilation dans la période du plateau, dont la durée est plus étendue lors des expériences avec insuline et pour cette raison la période de la baisse des courbes de sucre n'apparaît que plus tard. Ainsi, la quantité du glycosé éliminé avec l'urine sous l'influence de l'insuline, durant 10 hrs. se présente comme une résultante de plusieurs actions et ne diminue que de quelques unités % de la quantité injectée. La première phase du jeûne reste donc, en principe, sous l'influence de l'insuline sans aucun changement, en ce qui concerne son maximum d'intensité. L'adrénaline à la dose de 0.03 mg/kg/hr. agit depuis le début sur chaque moment de la première phase du jeûne, en provoquant un accroissement, très également distribué, de chaque valeur du sucre, aussi bien dans le sang que dans l'urine (dans l'urine la valeur de la glycosurie à chaque heure est presque dédoublée), par suite de quoi la glycosurie se dédouble en sa totalité et comporte 79.6% de la quantité injectée. Dans la période du plateau de la première phase, l'impuissance assimilatrice devient complète sous l'influence de l'adrénaline, parce que la quantité totale du glycosé injecté à ce moment-là vient d'être éliminée avec l'urine. L'augmentation de la dose de l'adrénaline n'intensifie pas la glycosurie, car il arrive sous l'influence de l'adrénaline une diminution de la perméabilité rénale, accompagnée de manifestations d'un malaise général.

L'alimentation grasse, administrée durant toute une semaine, amène l'apparition de la première phase moins intense que celle succédant au jeûne; la glycosurie est, en conséquence, inférieure et représente 33.5%.

L'alimentation protéique, administrée durant une semaine, amène la phase première encore moins intense, que celle provoquée par l'alimentation grasse, et, en même temps, 25.1% du glycosé est éliminé avec l'urine. L'insuline agit dans un sens tout à fait homologue comme sur la réaction après le jeûne, et notamment:—elle intensifie considérablement l'assimilation dans le bras croissant de la première phase, elle laisse le sommet de la première phase à son niveau, mais elle prolonge sa durée et, enfin, elle retarde l'apparition de la troisième période — celle de la baisse. En somme, il se manifeste durant 10 hrs. une amélioration dans l'assimilation de 2—3% seulement. L'adrénaline,

injectée à la dose de 0.03 mg/kg/hr., augmente régulièrement chaque valeur des courbes du sucre de la première phase et la glycosurie s'élève jusqu'à 68.0%. La faculté d'assimiler le glycosure a descendu dans ces conditions-là au même degré inférieur, sur lequel reste continuellement l'assimilation du galactose. L'insuline agit dans les cinq premières heures sur la réaction assimilatrice du glycosure, ainsi affaiblie, et elle l'augmente de 19.8% de la quantité injectée, donc—plus considérablement qu'elle ne le fait, dans les premières cinq heures, pour le galactose et pour le glycosure dans les expériences sans adrénaline.

Le régime hydrocarboné, riche en amidon, fait diminuer la glycosurie jusqu'à 9.3% de la quantité injectée, et la phase première, dans ces cas, n'est que d'une durée très courte: une ou deux heures. Les courbes de sucre se tiennent au niveau inférieur jusqu'à la fin de l'expérience. Si l'on administre l'amidon de manière que le début de l'injection du glycosure ait lieu au sommet de la digestion d'amidon, la première phase disparaît complètement pendant l'injection. L'épuisant travail des muscles de plusieurs mois n'influe, ni sur la marche de la première phase, ni sur le degré d'assimilation du glycosure, tant que l'état de nutrition chez un animal ne subit à ce moment-là des changements plus importants.

L'alimentation riche en saccharose amène les résultats semblables à ceux provoqués par la nourriture riche en amidon; elle amène donc une faible glycosurie: — 9.7% et la première phase basse d'une courte durée. Pourtant, il existe une certaine différence dans la forme d'accroissement régulier des courbes du sucre, qui apparaît après cessation de la première phase, et se montre très résistant à l'action de l'insuline. Il faut noter ici, que ce dernier régime renfermait continuellement 10% de besoins caloriques sous forme de protéine de viande. L'adrénaline, administrée à la dose ordinaire, augmente le taux de la glycosurie jusqu'à 52.7% et change la réaction en une forme qui ressemble tout à fait à la réaction apparaissant après 10 jours de jeûne.

Si l'injection du glycosure à vitesse de 2g /kg/hr. est précédée par l'introduction intraveineuse du même sucre à vitesse de 0.7 g/kg/hr., la phase première disparaît pendant l'injection à vitesse de 2 g, mais elle apparaît très nettement pendant l'introduction à vitesse de 0.7 g. Si l'on augmente la vitesse d'in-

jection du glycose quelques fois pendant une même expérience, la phase première n'apparaît qu'une seule fois pendant la première introduction du glycose. Fructose ni galactose ne donne jamais une phase première, quelle que soit la vitesse d'injection: la phase première est un phénomène spécifique pour glycose.

En réalisant la nutrition par des mélanges d'hydrates de carbone et de la protéine, de même qu'en diminuant la nourriture de l'animal par l'administration de quantités de sucre successivement plus petites, comme unique nourriture, on peut créer des séries de transitions expérimentales, qui démontrent la continuité de l'évolution de la petite première phase en une grande et par là l'identité génétique de ces phénomènes apparemment très éloignés les uns des autres.

L'influence des mêmes doses de l'adrénaline, administrées à un seul et même animal aux différents „étages“ d'assimilation du glycose, donc, soit après celui des protéines, soit après le jeûne, de même qu'à un certain degré aux différents états de nutrition chez un animal, — cette influence reste plus ou moins la même.

En administrant l'adrénaline par la voie intraveineuse d'une manière adéquate, on peut faire apparaître toutes les formes de la première phase, citées plus haut.

L'intensité de la première phase dépend, en principe, de la quantité des molécules glycogénétiques de sucre, enfermés dans les flot alimentaire. La cause de son origine n'est pas le manque d'insuline. La genèse de la même phase pourrait être facilement expliquée plutôt par l'admission d'une réaction surrénale qui se manifesterait lors de l'introduction du glycose par la voie intraveineuse et consisterait en la production plus ou moins intense de l'adrénaline, — production directement proportionnelle à la durée et à l'intensité de la période de carence en hydrates de carbone; mais avant l'examen expérimental cette dernière possibilité ne peut être acceptée. Le sucre sur lequel adrénaline n'exerce aucune influence, notamment, — le galactose, ne réagit, ni contre le jeûne, ni contre des régimes.



### 1. Ekspozycja.

Odkąd wraz z moimi współpracownikami badam, jak się zachowuje organizm prawidłowy wobec cukru gronowego, wprowadzanego w sposób stały dożylnie, napotykam ciągle na niespodzianki, przejawiające się w zmiennych i niedających się przewidzieć postaciach krzywych cukrowych we krwi i w moczu, a zatem formach asymilacyjnych glikozy. Niniejsze studjum, w którym zestawiono wpływ banalnych, lecz bardzo wyraziście działających czynników, pozwala wniknąć w szereg utajonych sprężyn, które temi niespodziankami władają, a tem samem przybliża nas do jednego z celów, jakim było wytyczenie wzorcowej, prawidłowej postaci odczynu, od której ostro odcinałyby się jego odchylenia doświadczalne lub samoistnie patologiczne. W ten sposób rozwinęła się w obecnych badaniach fizjologia „fazy pierwszej“ przyswajania glikozy, okresu nieomogi asymilacyjnej, w którym zawarła się cała subtelna wrażliwość, z jaką reaguje organizm na wpływ rozmaitych prostych czynników przy dożylnem wprowadzaniu glikozy, i na którym wszystkie owe czynniki wyciskają swe charakterystyczne piętno, dając całą gamę zmian asymilacyjnych od najsilniejszych stopni przyswajania do zupełnego prawie obumarcia tej funkcji. Toteż niezwykle wydało się faktem, że istnieje cukier, który wprowadzany do organizmu w ten sam sposób, co cukier gronowy, nie sprawia badaczowi żadnych niespodzianek asymilacyjnych i na który organizm reaguje z godną uwagi stałością. Cukrem tym okazała się galaktoza. Częściowa antyteza zachowania się tych dwu heksoz w warunkach mniej lub więcej zbliżających się do fizjologicznych, stanowi powód, dla którego sposób ich przedtwarzania ujęto w jednym, wspólnym rozdziale.

### 2. Komentarz techniczny.

Jak we wszystkich dawniejszych badaniach, tak i w obecnych wstrzykiwano zawsze 2 g danego cukru na kg wagi zwierzęcia na godzinę. Sposób przygotowania roczynów cukrowych i wstrzykiwania został opisany w pierwszej części niniejszych badań ('30). Galaktoza była przetworem „Galaktose, Kahlbaum“, jak w naszych badaniach dawniejszych<sup>1)</sup>, natomiast glikoza była produkcji Mercka „Traubenzucker, rein“, dalej insulina

<sup>1)</sup> Acta Biol. Exper. 1930, 5 (95, 117).

i tyroksyna pochodziły z fabryki Scheringa-Kahlbauma, wreszcie adrenalina z zakładów Parke-Davisa. Całkowitą redukcję we krwi odbiałczącej wodorotlenkiem cynkowym, czyli cukier we krwi, oznaczano metodą HAGEDORNA i JENSENA<sup>1)</sup>, w moczu zaś, zbieranym zawsze co godzinę podczas wlewania cukrów, określano ilość glikozy, czy też galaktozy przy pomocy polarymetru, używając takich samych współczynników, jak w badaniach dawniejszych<sup>1)</sup> Prędkość asymilacyjną obliczano według wzoru I podanego w pracy ('30). Próbkę krwi pobierano zawsze z *v. jugularis externa* w połowie danej godziny doświadczalnej. Podczas wszystkich prawie doświadczeń mierzono co pewien czas temperaturę ciała w odbytnicy.

Na rysunkach i tabelach ilość cukru w moczu podawano zawsze w celach porównawczych wyrażoną na kg wagi ciała danego zwierzęcia na godz. Ponieważ takie ilości, oznaczone w g przedstawiałyby cyfry mające zawsze prawie zero na początku (przy wlewaniu glikozy), więc by tego uniknąć, wyrażano zawsze cukromocz w mg. Przy obfitym jednak cukromoczu dochodziło wtedy do cyfr 4-miejscowych, z których ostatnia w tych warunkach musiała być wątpliwa; jednak uważano za zbyt precyzyjne zaokrąglanie jej. Po ukończeniu wstrzykiwania cukru zawsze jeszcze mniejsza lub większa jego ilość była wydalana z moczem. Ilość tę zbierano w klatkach metabolicznych po ukończeniu wlewania. Z galaktozą zawsze zbierano tę porcję cukru; była to ilość pokaźna. Z glikozą również zbierano ją w niektórych wypadkach. Została ona podana w protokołach w ten sposób, jakgdyby cała ta ilość została wydalona w ciągu jednej godziny.

Wykonano 94 doświadczenia, o łącznej sumie 768 godzin wstrzykiwania, na 11 sukach prawidłowych. Do doświadczeń z glikozą służyły suki większe — od 16—21 kg wagi, natomiast do badań z galaktozą suki mniejsze od 6—8 kg, gdyż chodziło o to, by zużyć mniej tego kosztownego cukru. Ważną rzeczą okazało się ściśle określenie stanu odżywienia badanych zwierząt w rozmaitych warunkach. Pomocnymi tu się okazały badania COWGILLA i DRABKINA ('27), którzy oparli obliczenie współczynnika odżywczego na zasadzie *pelidisi* PIRQUETA. Na miejsce długości kadłuba w pozycji siedzącej przyjęli długość ciała psa od końca nosa do otworu stołcowego. Mierzono ją w obecnych badaniach zarówno w pozycji leżącej, jak i stojącej zwierzęcia. Ta wielkość (L), porównana z kubicznym pierwiastkiem wagi zwierzęcia (W), dawała wskaźnik odżywczy N, wymieniony w obecnych badaniach przy każdym doświadczeniu. Łatwo z niego obliczyć wagę zwierzęcia (której przy protokołach doświadczeń nie podawano), o ile jest znana długość zwierzęcia (tab. I), gdyż

$$N = \frac{W^{2/3} \text{ w g}}{L \text{ w cm}}, \text{ więc } W \text{ w kg} = \left( \frac{N \cdot L}{10} \right)^3.$$

Gdy wskaźnik odżywczy N wynosi od 0.29 — 0.31, zwierzęta znajdują się w średnio dobrym stanie odżywienia, wskaźnik wyższy znamionuje otyłość, niższy wychudzenie.

<sup>1)</sup> 1930. Acta Biol. Exper. 5 (117).

## Tabela I.

Długość ciała nosowo-odbytnicowa suk poddanych badaniom w tym zbiorze doświadczeń.  
*Longueur du corps du bout du nez jusqu'au l'orifice rectal des chiennes qui ont été examinées dans cette série d'expériences.*

Suka <i>Chienne</i>	Długość ciała <i>Longueur du corps</i> cm
Alm.	87.3
Aldo.	87.2
Laur.	82.4
Izo.	79.2
Walk.	92.5
Szarl.	81.9
Kas.	90.0
Car.	91.6
Kud.	79.8
Mus.	61.8
Lal.	56.2

Pomiar długości wykonywano rodzajem wielkiej drewnianej szublerki, która miała ramiona o długości około 40 cm, jedno z nich przesuwalne, dające się wodzić na płaskiej listwie 1.40 m długości, posiadającej podziałkę do 1.30 m, z zaznaczonymi odstępami milimetrowymi. Ramię nieruchome szublerki przystawiano jużto do końca nosa, jużto do otworu stolcowego, i dociągano ramię ruchome tak by dotknąć przeciwnego, końcowego punktu pomiaru. Brano średnią z licznych pomiarów, wykonanych w dość odmiennych pozycjach ciała (np. w pozycji leżącej raz na prawym boku, drugi raz na lewym). Pomiar, wykonane przez tego samego badacza w dłuższych odstępach czasu, były takie same u osobników dojrzałych. Przy wykonywaniu pomiaru należy dbać, by oś podłużna nozdrzy i kręgosłup stanowiły mniej więcej jedną linię prostą.

Djeta doświadczalne były planowane w ten sposób, by pokrywały dobowy wydatek kaloryczny zwierzęcia, będącego w miernym ruchu, przy czem osobno obliczano dla każdego pokarmu dodatek potrzebny dla pokrycia swoisto-dynamicznego działania danej strawy. Zasadnicza wartość kaloryczna pokarmu wynosiła 180% podstawowej produkcji ciepła. Obliczano powierzchnię ciała według COWGILLA i DRABKINA ('27), a według niej podstawową produkcję ciepła, przyjmując, że m<sup>2</sup> powierzchni ciała suk odpowiada 796 kcal. na dobę, co zostało stwierdzone w poprzednich badaniach autora ('30). Aby pokarm nie był zbyt sztucznie jednostronny włączono do djet tłuszczowych i węglowodanowych białko mięsa w takiej ilości, by stanowiło 10% zawartości kalorycznej danego pokarmu. Djeta białkowa składała się wyłącznie z chudego mięsa mielonego, które zwierzęta zjadały bardzo chętnie. Djeta tłuszczowa była mieszaniną 90% masła i 10% mięsa, którą zwierzęta spożywały same bardzo dokładnie. Na-

tomiast mieszaninę sacharozy w ilości 90% i mięsa 10% tylko niektóre zwierzęta pożerały same, innym natomiast podawano cukier przez sondę, a potem mięso do zjedzenia. Wreszcie użyto mieszaniny odpadków jedzenia szpitalnego, jako djety, mającej doprowadzić poziom przemiany materii do jednego i tego samego punktu wyjścia, od którego zaczynałaby każda djeta doświadczalna i głód. W diecie tej 90% stanowi skrobia, zawarta w ziemniakach, kaszy, ryżu i t. p., a resztę odpadki mięsne, kości, i t. d. Niewątpliwie jestto djeta pełnowartościowa w przeciwieństwie do poprzednich, gdyż zwierzęta trzymają się na niej w klatkach już 4-ty rok stale w tej samej wadze i najlepszym zdrowiu, lub nawet na niej znacznie tyją. Przerwa między doświadczeniami djetetycznymi trwała zawsze tydzień, podczas którego zwierzę karmiono dietą wspomnianą ostatnio. Po okresie głodu, który zawsze stosowano przez 10 dni doprowadzano zwierzę, przy pomocy takiejże djety, do tej wagi ciała, jaką miało przed głodem. Karmienie zwierząt odbywało się raz na dzień o godz. 13-tej w południe. W 20—21 godzin po ostatnim spożyciu pokarmu rozpoczynano wlewanie rozczywnów cukrowych.

Insulinę wprowadzano stale w ten sam sposób, który miał zapewnić od pierwszej chwili wstrzykiwania cukru jak najsilniejsze działanie, a m. dawkę godzinną 5 jedn./kg/godz. wprowadzano na początku każdej godziny wstrzykiwania cukru, jednakowoż w pierwszych 3-ch godzinach połowę jej wprowadzano śródżylnie, a drugą połowę podskórnice, w następnych zaś całą dawkę podskórnice.

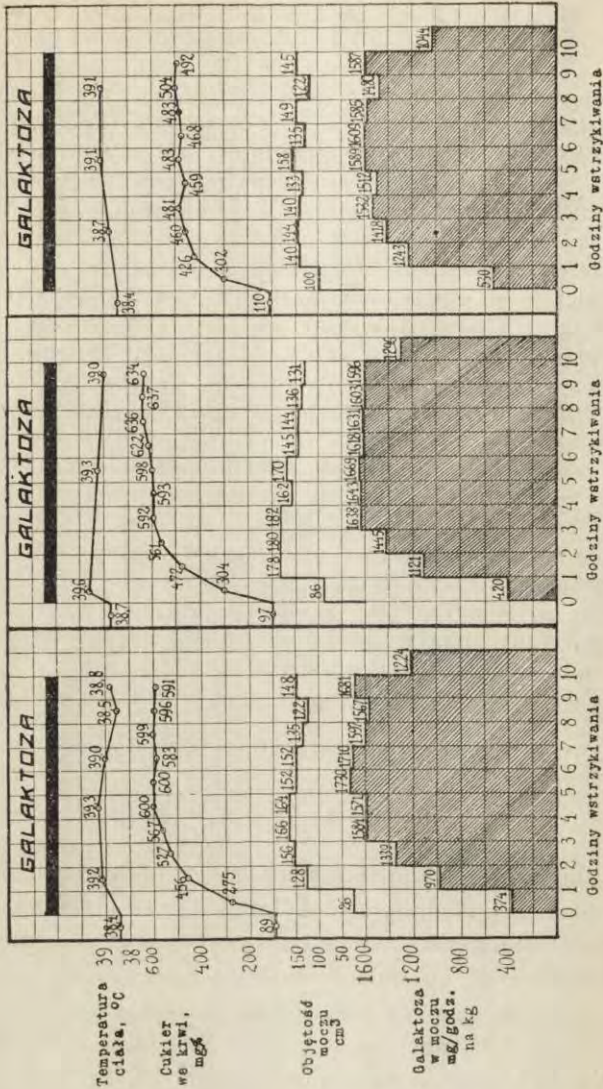
Adrenalinę podawano stale w ilości 0.03 mg/kg/godz., czyli 0.5  $\gamma$  na kg/min. przeważnie śródżylnie wraz z wstrzykiwanym cukrem.

### 3. Dane faktyczne.

#### A. Galaktoza.

Nigdy nie dostrzeżono najlżejszych nawet objawów działania trującego przy 10-godzinnym, dożylnym wprowadzaniu galaktozy. Zwierzęta opuszczały stolik doświadczalny w stanie najzupełniej prawidłowym, co się nie zmieniało przy wielokrotnym ponawianiu doświadczeń na tem samym zwierzęciu.

Pokarm i głód. — Spojrzenie rzucone na rys. 1 i 3a, jakoteż na tab IV—VII ujawnia nam uderzający fakt, że krzywe galaktozurji zarówno co do swego kształtu, jak i co do poszczególnych godzinnych wartości są najzupełniej do siebie podobne, zarówno po tygodniu podawania różnych diet, jak i po 10 dniach głodu. Krzywa galaktozurji składa się z dwu części: a) narastającej, podczas której trwania galaktoza coraz bogaciej wysyca ustrój, ulegając w nim częściowemu zastojowi, aż stę-



- a) Po 10 dniach głodu Dośw. 5. Wskaźnik odz. 0.305.  
 a) Après 10 jours du jeûne Exp. 5. Indice nutritif 0.305.
- b) Po tygodniu diety tłuszczowej. Dośw. 2. Wskaźn. odz. 0.317.  
 b) Après une semaine du régime gras. Exp. 2. Ind. nutr. 0.317.
- c) Po tygodniu diety białkowej. Dośw. 4. Wskaźn. odz. 0.326.  
 c) Après une semaine du régime protéiné. Exp. 4. Indice nutritif 0.326.

Rys. 1. Wprowadzono dożyłnie galaktozę w ciągu 10 godzin u sukki Mus.  
 Fig. 1. On a introduit du galactose par la voie endoveineuse pendant 10 hrs. chez la chienne Mus.

żenie tego cukru w organizmie dojdzie do takiego poziomu, że wszystkie procesy prowadzące do usuwania tego cukru uzyskają prędkość stałą, równoważącą ściśle stałą prędkość jego dowozu, i wtedy to pojawia się druga część krzywej, b) płaskowyż, który utrzymuje się u rozmaitych osobników zwierzęcych z gatunku

psa na wysokości 1600 mg galaktozy na kg/godz., czyli 80% ilości cukru wstrzykniętego w danym odcinku czasu wydostaje się na zewnątrz z moczem, a 20% zaledwie zostaje przyswojone. Po ukończeniu wstrzykiwania zalegający w ustroju cukier zostaje w części wydalony z moczem, w części zaś przyswojony i dopiero, gdy cały proces asymilacyjny jest ukończony można

Tabela II.

Wpływ pokarmu i głodu na śródzylnie przyswajanie galaktozy, wprowadzanej przez 10 godzin sukum Mus. i Lal. bez adrenaliny i z adrenaliną.

*Influence du jeûne et de l'alimentation sur l'assimilation endoveineuse du galactose qui a été introduit pendant 10 hrs. chez les chiennes Mus. et Lal., sans adrénaline ou avec celle-ci.*

Warunki doświad. <i>Conditions expérim.</i>	Suka <i>Chienne</i>	Bez adrenaliny <i>Sans adrénaline</i>			Z adrenaliną <i>Avec adrénaline</i>		
		Wskaźnik odżywczy <i>Indice nutritif</i>	Ilość galaktozy <i>Quantité du galactose</i>		Wskaźnik odżywczy <i>Indice nutritif</i>	Ilość galaktozy <i>Quantité du galactose</i>	
			Wydalona <i>Éliminée</i> %	Przyswojona <i>Assimilée</i> %		Wydalona <i>Éliminée</i> %	Przyswojona <i>Assimilée</i> %
10 dni głodu <i>10 jours du jeûne</i>	Mus. Lal.	0.305 0.304	76.9 69.9	23.3 30.1	0.310*) 0.303*)	74.5**) 73.8**)	25.5*) 26.2*)
Średnia — <i>Moyenne</i>		0.305	73.31	26.69	0.307	74.15	25.85
Djeta tłuszczowa <i>Régime gras</i>	Mus. Lal.	0.317 0.323	78.4 76.0	21.6 24.0			
Średnia — <i>Moyenne</i>		0.320	77.19	22.81			
Djeta białkowa <i>Régime de protéine</i>	Mus. Lal.	0.326 0.328	75.7 69.4	24.3 30.6			
Średnia — <i>Moyenne</i>		0.327	72.55	27.45			
Djeta węglowodan. <i>Régime hydrocarb.</i>	Mus. Lal.	0.321 0.319	77.8 74.3	22.1 25.7	0.321**) 0.323**)	75.7**) 74.0**)	24.3**) 26.0**)
Średnia — <i>Moyenne</i> Wielka średnia <i>Grande moyenne</i>		0.320	76.14 74.80	23.86 25.20	0.322	74.87	25.13

\*) Adrenalina podskórnice. — *Adrénaline, — par la voie subcutanée.*

\*\*\*) Adrenalina śródzylnie. — *Adrénaline, — par la voie intraveineuse.*

zestawić bilans, ile z wprowadzonej heksozy przyswoił organizm, ile zaś uронił w postaci galaktozurji, na którą składa się suma pozycji z 10 godzin wstrzykiwania i ilość, wydalona po jego ukończeniu (tab. II).

Z dwu zbadanych zwierząt zwłaszcza suka Mus. wykazała wyniki bardzo stałe, które należy uważać za wzorowe (tab. II), a m. w rozmaitych warunkach karmienia i przy głodzeniu ilość wydalonej z moczem galaktozy wahała od 75.7—78.4% ilości

wstrzykniętej, czyli przyswojeniu ulegało u tego zwierzęcia od 21.6—24.3% ilości wstrzykniętej. U drugiego zwierzęcia Lal. galaktozurja wahała od 69.4—76.0% ilości wprowadzonego cukru, zaś przyswajanie między 24.0—30.6%. Ponieważ obliczano według wagi ciała, ile cukru należało wstrzykiwać, wszystkie więc przypadkowe wychylenia wagi ciała, które nie były spowodowane istotną zmianą w wadze tkanek, musiały przy wlewaniu cukru tak trudno przyswajanego, jak galaktoza, odbijać się wybitnie na stopniu cukromoczu. To jednak, co leżało w mocy badacza, by wyniki ujednostajnić, zostało tu wypełnione. Zawsze przed decydującem ważeniem usuwano zwierzęciu stolec z *ampulla recti*, a przez masaż brzucha także i ze zstępującej części jelita grubego. Mocz wydostawano z pęcherza tuż po ważeniu i jego wagę odejmowano od wagi ciała. Wodę do picia podawano zwierzętom przed doświadczeniem dowoli, a podczas doświadczenia stałe ilości albo przez sondę żołądkową, lub przy pomocy flaszki z gumką, aby zwierzę mogło wydalic te stosunkowo olbrzymie ilości cukru, które przeliczone na człowieka wagi 70 kg wyniosłyby 1050 g w ciągu 10-godzinnego doświadczenia. Ponieważ roztwór galaktozy wprowadzany dożylnie był 20%-wy, a wydalany z moczem był najwyżej 10%-wy, przyczem około 75% wstrzykiwanego cukru zostawało wydalone, koniecznym był dodatkowy dowóz wody z zewnątrz, o ile galaktoza nie miała zalegać w ustroju. Wskaźnik odżywczy obu zwierząt nawet po 10 dniach głodu znajdował się jeszcze w sferze miernej dobrego odżywienia, co mogło się przyczynić do jednostajności wyników.

Już przy podawaniu wyłącznem pokarmu z przewagą skrobi w dawniejszych badaniach<sup>1)</sup> znaleźliśmy wybitną stałość stopnia galaktozurji przy 3-godzinnem wstrzykiwaniu galaktozy; ilość usunięta z moczem wahała od 68.4—70.2%, przyswojona zaś między 29.8—31.6% ilości wstrzykniętej u czterech różnych osobników zwierzęcych.

Tab. III w porównaniu z tab. II wskazuje na to, że mniejsze wydzielanie moczu nie zawsze szło w parze w mniejszem wydalaniem galaktozy. O ile bowiem u Mus. po tygodniu białkowym z niższą ilością wydzielonego moczu zeszło się istotnie

<sup>1)</sup> 1930. Acta Biol. Exper. 5 (117).

niższe wydalanie galaktozy — 75.7% ilości wstrzykniętej, o tyle u Lal. przeciwnie najniższa godzinno-kilogramowa ilość moczu (przeciętna) spotkała się z najwyższym wydalaniem galaktozy u tej suki, a m. 77.0%. W ten sposób osłabia się mocno argument, że te stosunkowo niewielkie wahania w galaktozurji, które zauważono przy wlewaniu galaktozy zostały wywołane głównie przez nieregularny lub niedostateczny dowóz wody z jelita.

Zupełnie inaczej zachowuje się przyswajanie galaktozy, jeżeli się ten cukier wprowadza zwierzętom *per fauces*. BODANSKY ('23) wprowadzał 3 g galaktozy na kg psa do żołądka i znalazł w moczu 34.3, 39.2 i 47.1% ilości wprowadzonej. REINHOLD i KARR ('27) znaleźli u królików, że 4-dniowy głód lub djeta białkowa (żelatyna) silnie upośledzają przyswajanie tego cukru, wprowadzonego do przewodu pokarmowego. Ostatnio HARDING i MOBERLEY ('30) podkreślają, że prawidłowe ludzkie osobniki wydalają galaktozę doustnie wprowadzoną częściowo z moczem, ale w nieregularnych, niestałych ilościach.

Tabela III.

Przeciętna ilość moczu na kg/godz. podczas 10-godzinnego wlewania galaktozy *per venam* u dwu suk, bez adrenaliny i z adrenaliną.

*Quantité moyenne de l'urine par kg/hr. pendant l'injection du galactose per venam durant 10 hrs. chez deux chiennes, sans adrénaline et avec celle-ci.*

Warunki <i>Conditions</i>	Bez adrenaliny <i>Sans adrenaline</i>		Z adrenaliną <i>Avec adrenaline</i>	
	Mus. cm <sup>3</sup>	Lal. cm <sup>3</sup>	Mus. cm <sup>3</sup>	Lal. cm <sup>3</sup>
10 dni głodu <i>10 jours de jeûne</i>	20.2	18.3	19.0	18.1
Djeta tłuszczowa <i>Régime gras</i>	20.1	16.6		
Djeta białkowa <i>Régime de protéine</i>	16.7	18.4		
Djeta węglowodanowa <i>Régime hydrocarboné</i>	19.1	18.6	21.5	18.7
Średnia <i>Moyenne</i>	19.0	18.0	20.3	18.4

Należałoby oczekiwać po danych cukromoczu, że krzywe cukru we krwi, a zwłaszcza te ich części, które odpowiadają płaskowyzłowi krzywej cukromoczu, będą się równie stale zachowywać w rozmaitych warunkach. Tak się jednak nie dzieje. Krzywa cukru we krwi (który tu jest wyrażony jako glikoza,



nie zaś jak w wyżej przytaczanych badaniach dawniejszych z tej pracowni, częściowo jako galaktoza), narastając podczas wlewania galaktozy tworzy linię, przypominającą hiperbolę, która osiąga płaskowyż w 4-tej do 5-tej godziny wlewania galaktozy i potem przebiega mniej lub więcej równoległe do osi odciętych (rys. 1 i 3-a, tab. IV—VII). W tej drugiej, płaskowyżowej części swego przebiegu utrzymuje się krzywa u sukki Mus. na poziomie od 481 — 633 mg% zaś u Lal. od 487 — 543 mg% (każda z tych krańcowych wartości jest średnią danych z 6—7 ostatnich godzin wstrzykiwania). Najniższy poziom u Mus. pojawia się w doświadczeniu z djetą białkową (rys. 1c) i wtedy też cukromocz jest nieco niższy, niż w innych doświadczeniach na tem samym zwierzęciu, najwyższy zaś w doświadczeniu z djetą węglowodanową (rys. 3a) na tem samym zwierzęciu. U Lal. najwyższy poziom płaskowyżu — 543 mg% — ukazuje się po tygodniu tłuszczowym (tab. IV), wtedy też i cukromocz jest najwyższy. W innym jednakowoż doświadczeniu na tem samym zwierzęciu, kiedy cukromocz jest taki sam, jak w wymienionem poprzednio, poziom płaskowyżu jest niższy (489 mg% w tab. V), a z drugiej strony przy podobnym poziomie (487 mg% w tab. VI, 493 mg% w tab. VII) pojawiają się w innych doświadczeniach niższe wartości cukromoczu. W ten sposób Lal., której krzywe cukru we krwi są dość stałe i mają mniejsze wahania, niż u drugiego zwierzęcia — Mus., posiada znacznie większe wahania cukromoczu, niż to drugie zwierzę, które znów naodwrot przy bardzo stałym cukromoczu wykazuje bardzo zmienną wysokość płaskowyżu, na jakiej się ustala cukier we krwi. W tych warunkach zatem badanie krzywej cukru we krwi nie prowadziłoby do wykrycia stałości, z jaką galaktoza jest przetwarzana. Rozstrzygającym był cukromocz.

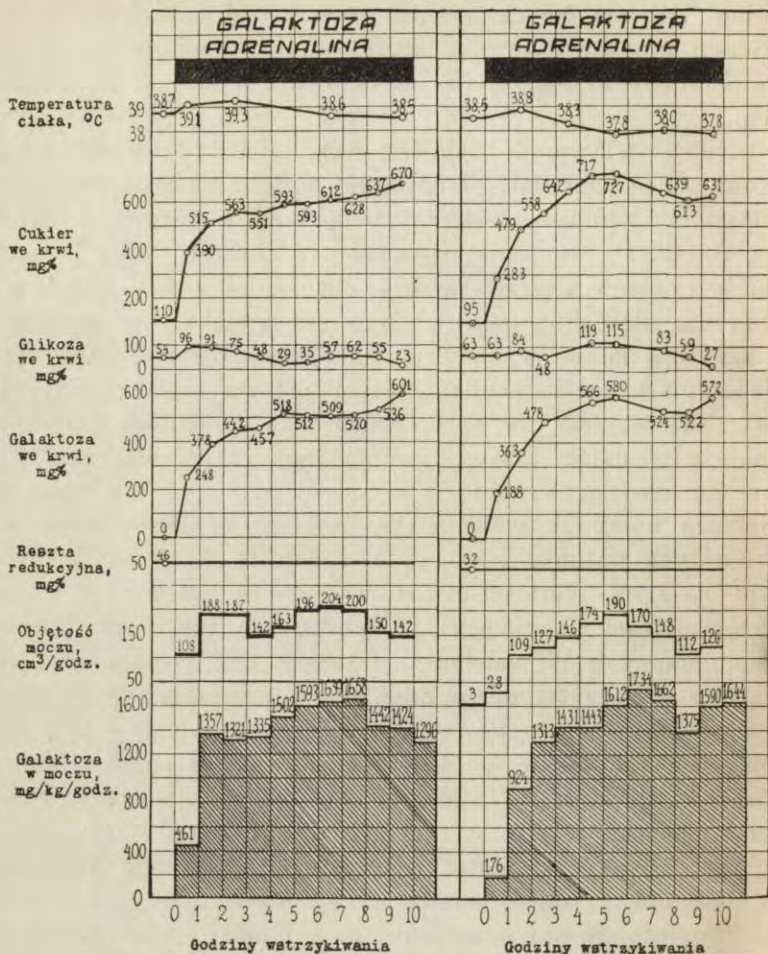
Nie ulega wątpliwości, że w obrębie czasu, objętego obecnymi doświadczeniami, płaskowyż był istotnie „płaskim“, t. zn. zarówno krzywa cukromoczu, jak i krzywa cukru we krwi utrzymywała się na poziomie równoległym do osi odciętych, przyjętej dla wyrażenia czasu. Wyjątek stanowią będą te okresy krzywych, w których następował lekki zastój galaktozy w organizmie. Dają się one po tem rozpoznać, że równocześnie, gdy poziom cukru we krwi się podnosi, cukromocz opada, czego przykład widzialny jest na rys. 1b w 7-mej do 10-tej godzinie wstrzy-

kiwania. Temperatura ciała podczas wlewania galaktozy wahała w granicach podobnych zarówno na rys. 1 i 3a, jak i w doświadczeniach, spisanych na tab. IV—VII; wyjątkowo tylko zanotowano wychylenia nieco wyższe niż  $1^{\circ}$  C ponad poziom wstępny.

**Adrenalina.** — Najpierw wykonano dwa doświadczenia, wprowadzając adrenalinę dożylnie w ilości 0.03 mg/kg/godz. po tygodniu karmienia zwierząt djetą węglowodanową z sacharozą. Galaktozę we krwi oznaczano różniczkowo przy pomocy drożdży.<sup>1)</sup> Doświadczenie wypadło naogół tak (rys. 2a), jak bez podawania adrenaliny (rys. 3a), a w szczególności krzywe cukru we krwi i w moczu wykazywały taki sam przebieg, jak w doświadczeniach bez adrenaliny z tym jednym zresztą przypadkowym szczegółem, że w ostatnich dwu godzinach wlewania galaktozy wystąpiły objawy zastoju tego cukru, przyczem stężenie we krwi się wznosiło, a w moczu ilość godzinna opadała. Galaktoza była, jak widać z rys. 2a, cukrem dominującym we krwi w tych warunkach i ona to nadawała kierunek krzywej cukru we krwi. Wartości glikozy we krwi są zwłaszcza w pierwszych godzinach doświadczenia wyższe, niż znalezione dawniej bez adrenaliny.<sup>1)</sup> W podobnym doświadczeniu, wykonanem na Lal., lecz nie przytoczonym tutaj, ponieważ niczem się nie różni od grupy doświadczeń na tem zwierzęciu w tab. IV—VII, wystąpiły również lekkie objawy zastoju cukrowego w ostatnich godzinach wlewania galaktozy. Całkowita ilość galaktozy wydalonej z moczem w tych warunkach wynosiła (tab. II) u Mus. 75.7%, a u Lal. 74.0% ilości wstrzykniętej. podobnie więc, jak bez adrenaliny w odpowiedniej parze doświadczeń.

Pojawiło się przypuszczenie, że być może adrenalina, wprowadzana wraz z galaktozą śródżylnie, traci swą zdolność działania. Wobec tego wlewano w następnych dwu doświadczeniach adrenalinę podskórnie w dokładnie tych samych, co uprzednio ilościach, w małych dawkach, co krótki odstęp czasu, w coraz to inne obszary tkanki podskórnej (z początku co 10 minut, po 3-ich godzinach co 20 minut). Zwierzę przedtem poddano 10-dniowemu głodowi i wobec tego zadziało dwoma tak potężnymi czynnikami, jakie doprowadzają organizm do zupełnej pra-

<sup>1)</sup> 1930. Acta Bio.. Exper. 5 (95).



- a) Po tygodniu diety cukrowej adrenalina dożylnie w sposób stały (0.03 mg/kg/godz.). Dośw. 6. Wskaż. odz. 0.321.
- b) Po 10 dniach głodu adrenalina podskórnice w często ponawianych dawkach (0.03 mg/kg/godz.). Dośw. 7. Wskażnik odz. 0.310.
- a) *Après une semaine du régime sucré, l'adrénaline par la voie intraveineuse à vitesse const. (0.03 mg/kg/hr.). Exp. 6. Indice nutritif 0.321.*
- b) *Après 10 jours du jeûne adrénaline par la voie sous-cutanée en doses fréquemment répétées (0.03 mg/kg/hr.). Exp. 7. Indice nutr. 0.310.*

Rys. 2. Wlewanie dożylnie galaktozy i dowód adrenaliny w rozmaitych warunkach u siki Mus.

Fig. 2. Injection intraveineuse du galactose et l'introduction de l'adrénaline dans les conditions différentes.

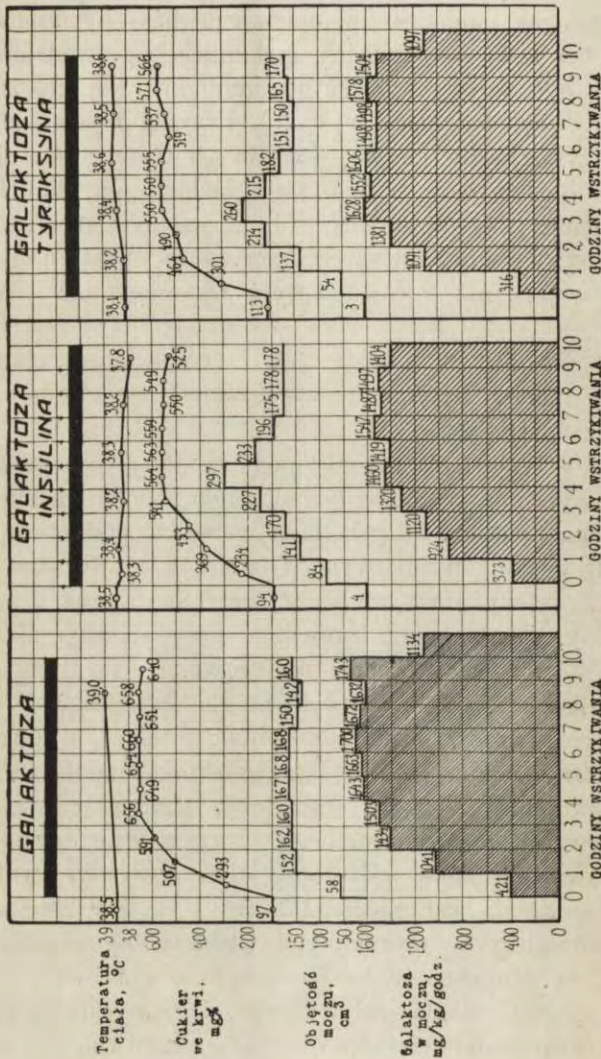
wie utraty zdolności przyswajania glikozy. Prawda, że w takich samych warunkach ilość glikozy wydalona z moczem nie jest wiele wyższa od tej, jaka się stale utrzymuje przy wlewaniu galaktozy, a m. wynosi 79.6% ilości wstrzykniętej. Można dostrzec w rys. 2b, że asymilacji galaktozy wyraźniej przez to nie zmieniono; podobnie wypadło doświadczenie na suce Lal. (tab. VIII), w którym również, jak i na rys. 2b, można zauważyć opadnięcie krzywej cukru we krwi w ostatnich godzinach wprowadzania cukru, dające się być może przypisać opadaniu krzywej glikozy we krwi w tych doświadczeniach (rys. 2b). Krzywa bowiem glikozy we krwi wykazywała znowu wartości wyższe, niżby się ich można było spodziewać na podstawie badań poprzednich. Całkowity cukromocz wyniósł u Mus. 74.5%, zaś u Lal. 73.8% ilości wstrzykniętej; u jednego więc zwierzęcia nieco mniej, u drugiego zaś nieco więcej, niż w równoległych badaniach bez adrenaliny (tab. II).

Zarówno wskaźnik odżywczy, jak i temperatura ciała, a także objętość moczu były w doświadczeniach z adrenaliną podobne, jak bez adrenaliny.

**Insulina.** — Wchodzić tu mogły pod uwagę tylko najwyższe dawki tego wyciągu. Wiadomo jednak z poprzednich naszych badań, wyżej wymienionych, że galaktoza w bardzo małym stopniu zapobiega drgawkom insulinowym. Dlatego należało rozważyć alternatywę, czy wykonać wlewanie galaktozy wraz z podawaniem insuliny, zapobiegając drgawkom przy pomocy jakiegoś innego cukru, czy też wykonać je, zezwalając na nieustające drgawki zwierzęcia, wśród których mogło ono zginąć. Wybrano pierwszą możliwość, licząc się jednak z tem, że dodatkowo doprowadzany cukier, nie będący galaktozą, mógł zamącić obraz przetwarzania wlewanej galaktozy, podnosząc stężenie cukru we krwi, stopień cukromoczu i wreszcie wpływając na stopień przyswajania samej galaktozy. Mimo wszystko wynik odnośnego doświadczenia jest niedwuznaczny i zgodny z rezultatem badań dawniejszych, wykonanych podczas 3-godzinnej wlewania galaktozy. Zupełnie wyraźnie każda wartość krzywej galaktozurji na rys. 3b. uległa pod wpływem insuliny obniżeniu w stosunku do równoległej wartości na rys. 3a zarówno w części narastającej, jak i płaskowyzowej. Najlepiej świadczy o tem cukromocz, który dla 10-ciu godzin wstrzykiwania wynosi:

bez insuliny 73.0% ilości wstrzykniętej.  
z insuliną 62.8% . . . . .

Insulina obniżyła cukromocz o 9.49% ilości wstrzykniętej galaktozy w zgodzie z dawniejszymi badaniami autora i współprac.,<sup>1)</sup> gdzie obniżenie wynosiło 11.5%, Drgawki w tem doświadczeniu



a) Galaktoza sama. Dośw. 3. Wsk. odz. 0.321.  
b) Z insulinią. Dośw. 9. Wsk. odz. 0.331.  
c) Z tyroksyną. Dośw. 8. Wsk. odz. 0.324.  
a) *Galactose seule. Exp. 3. Indice nutr. 0.321.*  
b) *Avec insuline. Exp 9. Indice nutr. 0.331.*  
c) *Avec thyroxine. Exp. 8. Indice nutr. 0.324.*

Rys. 3. Wprowadzanie dożylnie galaktozy po tygodniu karmienia dietą cukrową.  
Fig. 3. Introduction endoveineuse du galactose après une semaine du régime sucré.

<sup>1)</sup> 1930. Acta Biol. Exper. 5 (117).

pojawiły się przy końcu 3-ciej godziny wstrzykiwania, wtedy też zaczęto systematycznie podawać sacharozę w roztworze; na-przód podano 7 g, a później co godzinę po 3.7 g przez zgłębnik żołądkowy, co wystarczyło, aby zwierzę o wadze 8.55 kg utrzymać na granicy stanu drgawkowego. Być może, że część sacharozy mogła przejść do moczu i nieco, choć zapewne nieznacznie, zwiększyła cukromocz. W ciągu całego doświadczenia otrzymało zwierzę 29.2 g sacharozy. Szczególnemu oświetleniu podlega to doświadczenie, gdy je porównamy z odpowiednimi, badaniami, wykonanymi z glikozą, której przyswajanie doprowadzono do takiego samego stopnia, na jakim stale znajduje się przyswajanie galaktozy (por. rys. 11). Insulina okazała się jedynym czynnikiem, który wybitniej zadziałał na przyswajanie galaktozy.

Tyroksyna. — Tyroksynę podano w ilości 10 mg śród-  
żylnie suce Mus. na 48 godzin przed rozpoczęciem doświadcze-

Doświadczenia z 10-godzinnem wlewaniem  
roztworu galaktozy, wykonane na suce Lal.

*Expériences, consistant en injection intraveineuse du galactose pendant 10 hrs. chez la chienne Lal.*

Tabela IV.

Dośw. 2. Wskaźnik odżywczy 0.323. Po tygodniu diety tłuszczowej.  
*Exp. 2. Indice nutritif 0.323. Après une semaine du régime gras.*

Czas <i>Temps</i> godz. <i>hr.</i>	Mocz <i>Urine</i>			Cukier we krwi  <i>Sucre du sang</i>	Tempera- tura ciała  <i>Tempera- ture du corps</i>
	Objętość <i>Volume</i> na godz. <i>par hr.</i> cm <sup>3</sup>	Ilość galaktozy <i>Quantité de galactose</i>			
		Znaleziona <i>Trouvée</i> g	Na kg. na godz. <i>par kg/hr.</i> mg		<i>mg%</i>
Przed wstrzykiwaniem	—	—	—	124	38.5
1-sza godz. wstrzyk.	26	2.02	336	308	39.2
2-ga " "	84	6.50	1082	461	
3-cia " "	116	8.76	1461	512	
4-ta " "	122	9.81	1634	529	
5-ta " "	102	9.01	1502	523	
6-ta " "	104	9.21	1535	569	
7-ma " "	123	9.89	1647	534	
8-ma " "	104	9.76	1626	524	
9-ta " "	102	9.57	1595	562	
10-ta " "	115	10.03	1673	562	
		6.62	1103		

Tabela V.

Dośw. 3. Wskaźnik odżywczy 0.319. Po tygodniu diety węglowodanowej.  
*Exp. 3. Indice de nutrition 0.319. Après une semaine d'alimentation hydrocarbonée.*

Czas <i>Temps</i> godz. hr.	Mocz <i>Urine</i>			Cukier we krwi <i>Sucre du sang</i> mg%	Tempera- tura ciała <i>Tempéra- ture du corps</i> °C
	Objętość <i>Volume</i> na godz. <i>par hr.</i> cm <sup>3</sup>	Ilość galaktozy <i>Quantité de galactose</i>			
		Znaleziona <i>Trouvée</i> g	Na kg. na godz. <i>Par kg heure</i>		
Przed wstrzykiwaniem				99	39.5
1-sza godz. wstrzyk.	48	2.84	493	276	
2-ga " "	86	6.60	1144	435	
3-cia " "	91	8.09	1402	463	
4-ta " "	106	8.30	1438	473	
5-ta " "	114	9.19	1593	503	
6-ta " "	122	9.34	1619	506	
7-ma " "	138	9.23	1599	493	
8-ma " "	118	9.36	1622	480	39.5
9-ta " "	128	9.03	1564	472	
10-ta " "	122	9.00	1559	477	
		4.82	835		

Tabela VI.

Dośw. 5. Wskaźnik odżywczy 0.328. Po tygodniu karmienia białkiem.  
*Exp. 5. Indice de nutrition 0.328. Après une semaine du régime de protéine.*

Czas <i>Temps</i> godz. hr.	Mocz <i>Urine</i>			Cukier we krwi <i>Sucre du sang</i> mg%	Tempera- tura ciała <i>Tempéra- ture du corps</i> °C
	Objętość <i>Volume</i> na godz. <i>par hr.</i> cm <sup>3</sup>	Ilość galaktozy <i>Quantité du galactose</i>			
		Znaleziona <i>Trouvée</i> g	Na kg/godz. <i>Par kg/hr.</i> mg.		
Przed wstrzykiwaniem				111	38.6
1-sza godz. wstrzyk.	19	1.75	279	292	
2-ga " "	98	6.56	1045	451	
3-cia " "	104	8.47	1348	494	38.9
4-ta " "	108	9.31	1482	478	
5-ta " "	118	9.41	1498	474	
6-ta " "	117	9.18	1461	498	39.2
7-ma " "	116	9.16	1458	497	
8-ma " "	161	9.43	1501	477	
9-ta " "	132	9.29	1479	496	
10-ta " "	182	9.46	1506	483	38.9
		5.18	828		

Tabela VII.

Dośw. 6. Wskaźnik odżywczy 0.304. Po 10 dniach głodu.  
Exp. 6. Indice de nutrition 0.304. Après 10 jours du jeûne.

Czas Temps godz. hr.	Mocz Urine			Cukier we krwi Sucre du sang mg%	Tempera- tura ciała Tempé- rature du corps °C
	Objętość Volume na godz. par hr. cm <sup>3</sup>	Ilość galaktozy Quantité de galactose			
		Znaleziona Trouvée g	Na kg/godz. Par kg/hr. mg		
Przed wstrzykiwaniem				106	38.4
1-sza godz. wstrzyk.	4	1.27	255	279	
2-ga " "	70	5.39	1081	428	
3-cia " "	73	6.18	1240	486	39.2
4-ta " "	95	7.08	1419	485	39.6
5-ta " "	110	7.03	1409	479	
6-ta " "	95	7.34	1472	490	
7-ma " "	104	7.51	1505	492	38.8
8-ma " "	120	7.64	1532	499	38.9
9-ta " "	118	7.66	1536	504	
10-ta " "	126	7.66	1536	507	38.8
		4.91	990		

Tabela VIII.

Dośw. 8. Wskaźnik odżywczy 0.303. Wprowadzanie podskórne adrenaliny po 10 dniach głodu.

Exp. 8. Indice nutritif 0.303. Introduction souscutanée de l'adrénaline après 10 jours du jeûne.

Czas Temps godz. hr.	Mocz Urine			Cukier we krwi Sucre du sang mg%	Tempera- tura ciała Tempé- rature du corps °C
	Objętość Volume par hr. cm <sup>3</sup>	Ilość galaktozy Quantité de galactose			
		Znaleziona Trouvée g	Na kg/godz. Par kg/hr. mg		
Przed wstrzykiwaniem	5			87	38.2
1-sza godz. wstrzyk.	53	2.06	418	272	38.6
2-ga " "	40	4.83	979	425	
3-cia " "	66	5.89	1195	543	
4-ta " "	81	7.27	1474	550	39.2
5-ta " "	88	7.77	1577	571	
6-ta " "	112	8.16	1654	551	39.3
7-ma " "	111	8.36	1696	498	
8-ma " "	108	7.01	1422	470	39.8
9-ta " "	86	6.83	1392	498	
10-ta " "	146	8.85	1796	459	39.7
		5.75	1167		

nia. Prócz tego podawano ją śródżylnie wraz z galaktozą w ilości 1 mg/godz. Doświadczenie to, jak i doświadczenie z insuliną,



wykonano po tygodniu karmienia djetą węglowodonową z przewagą sacharozy (rys. 3c). Cukromocz jest nieco niższy, niż w odpowiednim doświadczeniu bez tyroksyny (rys. 3a), lecz nie jest decydująco niższy, gdyż zniżka wynosi 4.2% ilości wstrzykniętej:

bez tyroksyny	77.9% ilości wstrzykniętej
z tyroksyną	73.8% . . . . .

Już z adrenaliną zwierzę to wydalilo 74.5% (tab. II), cyfra więc 73.8% nie wydaje się wybitniej zmienioną. Przeciętna objętość cukromoczu na kg/godz. wynosiła 21.1 cm<sup>3</sup>, a więc o 2.0 cm<sup>3</sup> więcej niż bez tyroksyny (tab. III, 19.1 cm<sup>3</sup>), mimo że galaktozuria była z tyroksyną mniejsza, niż bez niej. Przemawia to znowu za tem, że stopień przepływu wody przez organizm nie był decydującym powodem wahań (wprawdzie nieznacznych) w wydalaniu omawianego cukru.

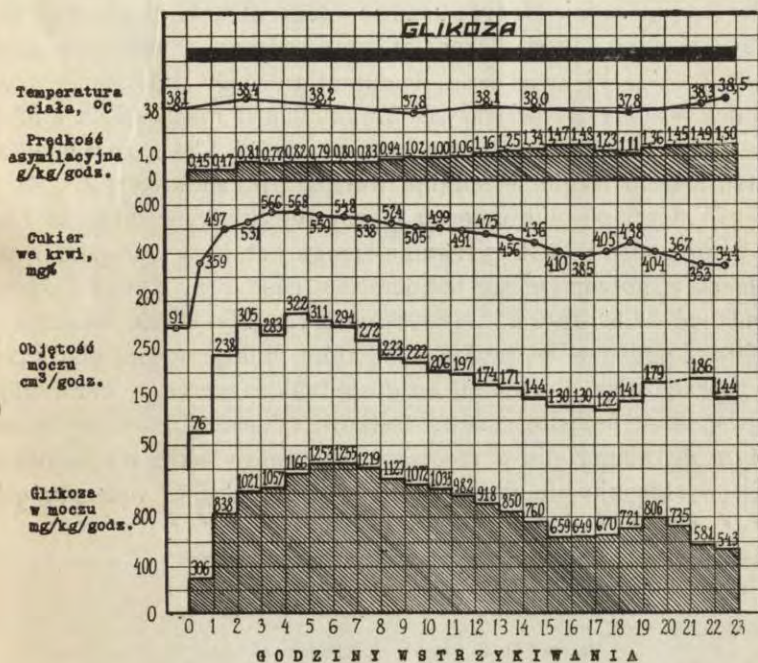
## B. Glikoza.

### Głód.

Dwa typy odczynu przy długotrwałem, dożylnem wlewaniu glikozy po 10-dniowym głodzie, przedstawione na rys. 4 i 5, ilustrują krańcowo przeciwne zjawiska, jakie mogą się wtedy wydarzyć.

W doświadczeniu na rys. 4 cukromocz podnosi się stopniowo w formie krzywej, podobnej jak przy wstrzykiwaniu galaktozy, i osiąga szczyt w 6-tej i 7-ej godzinie wlewania, uzyskując wysokość 1250 mg/kg/godz., następnie powoli opada, wykazując w godz. 19—21 wstrzykiwania przejściowe wzniesienie, poczem dalej obniża się aż do 543 mg/kg/godz., czyli 27% ilości glikozy równocześnie wprowadzonej. Nie ulega żadnej wątpliwości, że kresem opadania i ostatecznym punktem stałym krzywej cukromoczu byłaby wartość około 200 mg/kg/godz., gdyż to jest ilość glikozy, którą przeciętnie wydalą organizm z moczem po djecie cukrowej, a czemuże innem było stałe wlewanie glikozy, jak nie djetą cukrową, podaną z dokładną równomiernością (por. rozdział „Pokarm węglowodanowy“). Ten długotrwały okres zmian cukromoczu, którego znaczna część znajduje się na rys. 4, nazwijmy „fazą pierwszą“, podobnie jak ją nazwali WIERZUCHOWSKI i GADOMSKA ('27) w dawniejszych badaniach. Krzywa objętości moczu naśladuje bardzo dokładnie krzywą cukromoczu. Szczyt jej wyrasta w 5-tej godzinie doświadczenia,

wynosząc wtedy 322 cm<sup>3</sup>, poczem następuje stopniowy regularny spadek tej krzywej aż do 122 cm<sup>3</sup> w 18-tej godzinie. Ta znów krzywa jest wiernym odbiciem pragnienia zwierzęcia, gdyż chleptało ono chciwie wodę do 9-tej godziny doświadczenia, potem jednak zaczęło pić coraz mniej, a od godz. 16-tej piło tylko nieznaczne ilości z podstawionej mu bez przerwy miski.



Rys. 4. Suce Alm. (dośw. 9, wskaźnik odżywczy 0.300) wlewano dożylnie glikozę przez 23 godziny po 10 dniach głodu.

Fig. 4. On a injecté à la chienne Alm. (exp. 9, indice nutritif 0.300) du glucose par la voie intraveineuse pendant 23 hrs. après 10 jours de jeûne

Właściwego znaczenia nabiera krzywa cukromoczu dopiero wtedy, gdy się przekonywamy, że idzie ona ściśle równolegle do krzywej glikemicznej, która narasta podobnie, jak krzywa glikozurji, osiąga szczyt w 4-tej do 6-tej godzinie wlewania, stojąc na poziomie 559—568 mg%, poczem opada bardzo nieznacznie w formie linii mniej więcej prostej przeciągniętej od tego wyżu do wartości 344 mg%, znalezionej w ostatniej godzinie doświadczenia. Nawet małe wzniesienie cukromoczu przy końcu

doświadczenia znajduje swoje wytłumaczenie w odpowiednim wznesieniu krzywej cukru we krwi.

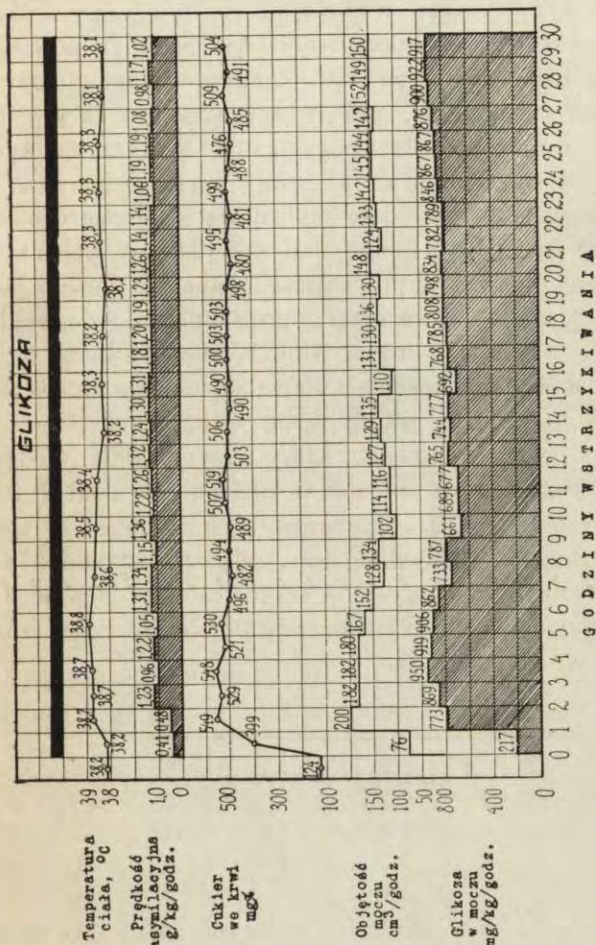
Prędkość asymilacyjna, jako pochodna obu krzywych cukrowych daje stężony wyraz zmian, jakie zachodzą w przetwarzaniu wprowadzonej glikozy. Od wartości 0.45 g w pierwszych dwu godzinach rośnie ona powoli do 1.50 g w ostatnich dwu i dorosłaby zapewne do wartości kresowej 1.80 g, gdyby można było doświadczenie doprowadzić do tego okresu. Mimo tak długiego trwania doświadczenia i wprowadzania znacznych ilości rozcynu do żył zwierzęcia, temperatura ciała mierzona w odbytnicy wahała w pierwszych 22 godzinach między 37.8 a 38.4°, a w ostatniej godzinie podniosła się do 38.5° C, obracając się w ten sposób ciągle w obrębie wartości prawidłowych.

Wzniesienie cukromoczu i krzywej cukru we krwi w 18-iej do 21-iej godzinie wstrzykiwania mogło stać w związku z powolnem wznoszeniem się temperatury ciała przy końcu doświadczenia od 37.8° do 38.5°, przyczem wystąpiły lekkie dreszczyki w 20-tej godzinie wstrzykiwania, które znikły w ostatniej. Przez 19 poprzedzających godzin leżało jednak zwierzę w bezwzględny spokojny bez dreszczów. Całkowita ilość glikozy, wydalona w tym doświadczeniu z moczem, wynosiła w okresach 5-godzinnych w stosunku do ilości glikozy równocześnie wstrzykniętej:

1-sze 5 godz.	2-gie 5 godz.	3-cie 5 godz.	4-te 5 godz.	Ostatnie 3 godziny
43.9%	59.3%	45.5%	35.1%	31.0%

Należało próbować ponownie osiągnąć na zwierzęciu głodzonem ustąpienie zupełne pierwszej fazy dla udowodnienia wyżej wzmiakowanego rozumowania. Dlatego wykonano doświadczenie na innym zwierzęciu — suce Izo, które zobrazowano na rys. 5. Otrzymano jednak rezultat odmienny od poprzedniego. Zwierzę bowiem badane wykazało wprawdzie opadnięcie przejściowe cukromoczu i cukru we krwi ze szczytu 548 mg% we krwi, a 950 mg/kg/godz. w moczu, osiągniętego w 4-tej godzinie wstrzykiwania do wartości 499 mg% we krwi, a 661 mg w moczu w 10-tej godzinie. Jednakowoż po tej godzinie, wbrew oczekiwaniom, począł się cukromocz wzmacniać i doszedł w 30-iej

do 917 mg; tymczasem zaś we krwi ustaliła się od 10-tej godziny cyfra około 500 mg%, dając niemal idealną linię prostą, równoległą do osi odciętych. Doświadczenie przerwano, ponieważ nie było nadziei, by krzywe cukrowe rychło zaczęły opa-



Rys. 5. Glikoza była wprowadzana po godzinie 10-dniowym przez 30 godzin. Suka Izo. Dośw. 6. Wskaż. odz. 0.311.

Fig. 5. *Glycose* introduit pendant 30 hrs., après 10 jours de jeûne. Chienne Izo. Exp. 6. Indice nutritif 0.311.

dać. Temperatura zwierzęcia badanego z początku doświadczenia podniosła się przejściowo z 38.2 do 38.8° C, poczem opadła powoli z powrotem do 38.2° i na tej mniej więcej wysokości trzymała się aż do końca doświadczenia. Nie wykazała zatem żadnej wartości anormalnej, gdyż u tego samego zwierzęcia

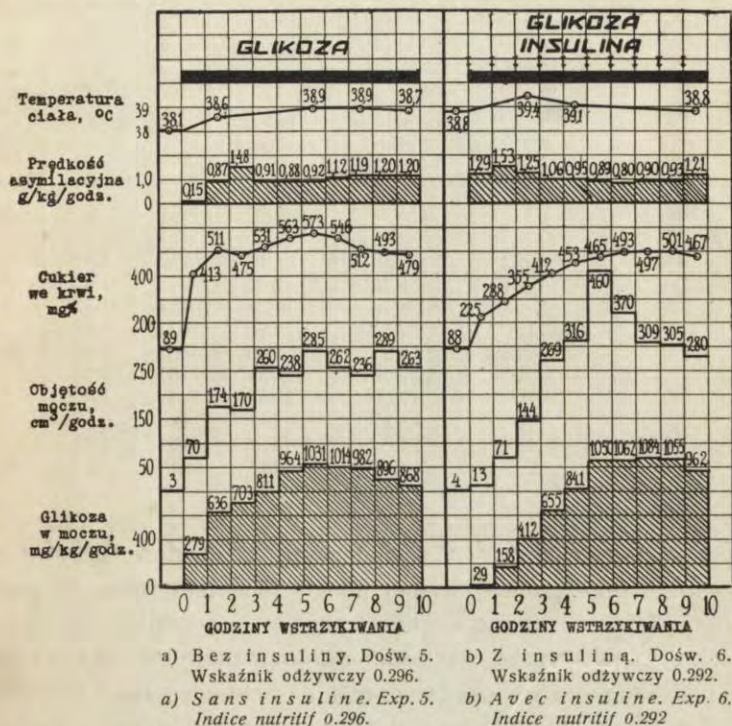
naczczo znaleziono w innych doświadczeniach cyfry od 38.3 do 38.8° C.

Prędkość asymilacyjna utrzymywała się do 15-tej godziny doświadczenia na wysokości około 1.30 g, poczem zmniejszała się powoli, aż wreszcie w ostatniej godzinie osiągnęła wartość 1.02 g. Krzywa objętości moczu wykazała wzniesienie w tym samym okresie, gdy krzywe cukrowe je wskazywały. Nie podobna powiedzieć, dlaczego w doświadczeniu na rys. 4 przyswajanie glikozy wykazywało stałe zwiększenie, zaś w oświadczeniu na rys. 5, przejściowym wzmożeniu, stałe pogarszanie. Wskaźnik odżywczy obu zwierząt był nieco odmienny: Alm. miała 0.300, zaś Izo. 0.311, odmienna też była ilość cukru we krwi naczczo u obu zwierząt: Alm. posiadała 91 mg%, Izo zaś 124 mg%, która to wartość jest dość niezwykła po okresie głodu. Na pewno jednak można stwierdzić, że oba zwierzęta po ukończeniu doświadczeń znajdowały się w stanie dobrym. Alm. bowiem zeskoczywszy ze stolika zjadła z wielkim apetytem kawałek suchego chleba, który się znalazł na jej drodze, jakgdyby te 461.3 g, czyli po starodawnemu funt cukru gronowego, który zasymilowała śródźylnie na dobę, był jeszcze zbyt szczupłym kąskiem, by pokryć jej potrzeby kaloryczne. Izo. zaś spacerowała koło miski z jabłkiem, lecz jeść nie chciała. Całkowita ilość glikozy, wydalona z moczem w okresach 5-godzinnych w ciągu całego doświadczenia, była w następującym stosunku procentowym do ilości równocześnie wstrzykniętej suce Izo. (rys. 5):

1-sze 5 godz.	2-gie 5 godz.	3-cie 5 godz.	4-te 5 godz.	5-te 5 godz.	6-te 5 godz.
37.3%	39.5%	36.5%	38.5%	41.2%	44.8%

**Insulina.**— Aby móc sobie należycie zdać sprawę z rodzaju działania insuliny na głodową fazę pierwszą, podzielmy przebieg krzywych cukrowych w ciągu trwania pierwszej fazy na 3 części: a) część wstępującą (narastanie niedomogi asymilacyjnej), b) płaskowyz, i c) część opadającą (zmniejszanie się niedomogi asymilacyjnej). Rys. 6 objaśnia, jak na te 3 części działa insulina.

Na rys. 6a znajduje się 10-godzinny fragment głodowej fazy pierwszej<sup>1)</sup>, przypominający część rys. 4 i 5. Na rys. 6b w tych samych warunkach zastosowano bardzo silne dawki insuliny (jak opisano w „Komentarzu technicznym“), w doświadczeniu wykonanem w 39 dni po poprzednim. Różnice między obu obrazami są następujące:



Rys. 6. Wsączenie dożylnie glikozy po 10 dniach głodu u suki Alm. i działanie insuliny.  
 Fig. 6. Injection endoveineuse du glyco se après 10 jours du jeûne chez la chienne Alm. et l'action de l'insuline.

W części wstępującej fazy pierwszej krzywa cukromoczu i cukru we krwi przebiega w doświadczeniu bez insuliny po łuku, zwróconym wypukłością do osi rzędnych, a znajdującym swój kres w płaskowyzu na poziomie 573 mg% we krwi,

<sup>1)</sup> W technicznym wykonaniu pewnej części wspomnianych tu doświadczeń z glikozą był autorowi pomocny p. Pieskow. W kilkunastu doświadczeniach pomagał p. Szynczewski wraz z p. Owsianym w karmieniu zwierząt i pilnowaniu ich podczas doświadczeń.

Tabela IX.

Suka Alm. Dośw. 8. Wskaźnik odżywczy 0.290. Jednostajne, dożylnie wprowadzanie glikozy po 10 dniach głodu. Podczas doświadczenia insulina śródżylnie i podskórnice w ilości 5 jedn./kg/godz.

*Chienne Alm. Exp. 8. Indice nutritif 0.290. Introduction intraveineuse du glycose à vitesse constante après 10 jours du jeûne. Pendant l'expérience insuline a été injectée par la voie intraveineuse et subcutanée en quantité de 5 unités/kg/hr.*

Czas <i>Temps</i> godz. hr.	Mocz <i>Urine</i>			Cukier we krwi <i>Sucré du sang</i> mg%	Prędkość asymila- cyjna <i>Taux d'assimi- lation p.kg/hr.</i> g	Tempera- tura ciała <i>Tempé- rature du corps</i> °C
	Objętość na godz. <i>Volume par hr. cm<sup>3</sup></i>	Ilość glikozy <i>Quantité de glycose</i>				
		Znaleziona <i>Trouvée</i> g	Na kg/godz. <i>Par kg/hr.</i> mg			
Przed wstrzykiwaniem				104		38.8
1-sza godz. wstrzyk.	22	0.49	30	215	1.42	
2-ga " "	34	4.16	257	273	1.45	
3-cia " "	88	8.49	524	344	1.12	
4-ta " "	186	12.35	762	427	0.82	
5-ta " "	248	15.97	986	462	0.84	38.9
6-ta " "	200	17.73	1094	461	0.91	
7-ma " "	200	17.09	1054	447	1.02	
8-ma " "	196	18.37	1133	446	0.87	
9-ta " "	188	17.04	1052	434	1.01	
10-ta " "	200	18.35	1133	417	1.05	38.6

a 1031 mg w moczu. W doświadczeniu z insuliną krzywe cukrowe przebiegają mniej więcej po cięciwie tego łuku. W pierwszych godzinach wstrzykiwania prędkość asymilacyjna wykazuje z insuliną wyższe wartości, niż bez niej. Insulina wzmacnia więc przyswajanie glikozy w części narastającej fazy pierwszej.

Płaskowyż fazy pierwszej trwa z insuliną przez 4 godziny w krzywej cukromoczu, przyczem pojawiają się wartości 1050—1084 mg, we krwi zaś 493—501 mg%, jest więc w moczu nieznacznie wyższy, we krwi zaś niższy, naogół jednak trwa znacznie dłużej, niż bez insuliny. Wraz z długiemi trwaniem płaskowyżu także niska prędkość asymilacyjna przewleka swoje istnienie, naogół jednak niema wybitniejszych różnic w prędkości asymilacyjnej w tym okresie między doświadczeniem bez insuliny i z insuliną, n. p., w 5-tej i 6-tej godzinie obu doświadczeń wartości są podobne.

Pojawienie się części zstępującej fazy pierwszej zostaje przez insulinę opóźnione. Wraz z jej pojawieniem się prędkość asymi-

lacyjna się powiększa w 10-tej godzinie wstrzykiwania, gdy bez insuliny czyniła to już w 7-mej godzinie wstrzykiwania.

Podobnie, lecz nie identycznie wypadło drugie doświadczenie z insuliną, wykonane na tym samym zwierzęciu (tab. IX) w 51 dni po tem, które znajduje się na rys. 6b. Krzywa cukromoczu i prędkości asymilacyjnej wypadła w niem podobnie jak na rys. 6b.

Insulina, wprowadzona w nadmiarze, nie usunęła więc fazy pierwszej, gdyż płaskowyż jej utrzymał się w całej pełni, a nawet się rozszerzył. Z punktu widzenia ryczałtowej asymilacji glikozy było rzeczą ważną stwierdzić, czy insulina w sumie kilku opisanych działań, które wywołała na rozmaite części fazy pierwszej, podniosła przyswajanie 10-godzinne. Ilości cukromoczu, wydalone w 5-godzinnych okresach zachowywały się następująco:

Warunki hormonalne	1-sze 5 godz.	2-gie 5 godz.	Data
Bez insuliny (rys. 6a)	33.9%	47.9%	20. XII. 1929
Z insuliną (rys. 6b)	21.0%	52.1%	29. I. 1930
Z insuliną (tab. IX)	25.6%	54.7%	21. III. 1930
Bez insuliny (rys. 4)	43.8%	59.3%	30. VI. 1930

W pierwszych pięciu godzinach insulina wzmaga przyswajanie glikozy, natomiast w drugich pięciu je ogranicza, w sumie w jednym z doświadczeń przyswajanie poprawiło się o 4.4% (rys. 6b), w drugim o znikomą ilość 0.7% (tab. IX). Tej ostatniej wartości należy poświęcić parę słów objaśnienia. Tab. X uczy nas o tem, że nawet u tego samego zwierzęcia ilość glikozy wydalonej z moczem w obecnych doświadczeniach po 10-dniowym głodzie może wahać od 40.9 do 51.6% ilości wstrzykniętej, jednakowoż trzeba zaznaczyć, że drugi wynik został otrzymany w 190 dni po pierwszym, a między temi oboma doświadczeniami zostały wykonane dwa z insuliną. Dlatego nawet ilość 40.2%, wydaloną z moczem w doświadczeniu z insuliną, w odległości 90 dni od pierwszego, a 100 dni od drugiego wyniku bez insuliny, można uważać za obniżoną w stosunku do wartości pośredniej między obu wynikami, któraby się być może wtedy ukazała, gdyby nie wprowadzano insuliny. Tab. X ustala średnią asymilacyjną dla glikozy w warunkach naszych doświad-



czeń głodowych na 54.7%, a średnią wydalania z moczem na 45.3%.

A drenalina. — Adrenalinę mieszano z roztworem glikozy, tak żeby zwierzę otrzymywało dożylnie 0.03 mg/kg/godz. wraz z 2 g glikozy na kg/godz. i wprowadzano oba ciała równocze-

Tabela X.

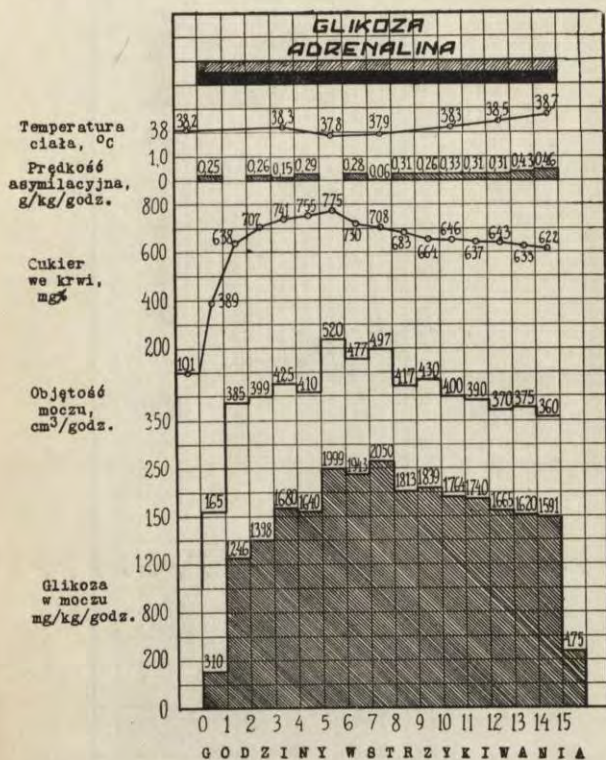
Wpływ 10-dniowego głodu na przyswajanie glikozy, wlewanej przez 10 godzin dożylnie.

*Influence du jeûne de 10 jours sur l'assimilation du glycose injecté pendant 10 hrs. par la voie intraveineuse.*

Suka <i>Chienne</i>	Bez insuliny <i>Sans insuline</i>			Z insulina <i>Avec insuline</i>		
	Wskaźnik odżywczy <i>Indice nutritif</i>	Wydalone z moczem <i>Éliminé avec l'urine</i> %	Przyswo- jone <i>Assimilé</i> %	Wskaźnik odżywczy <i>Indice nutritif</i>	Wydalone z moczem <i>Éliminé avec l'urine</i> %	Przyswo- jone <i>Assimilé</i> %
Aim. (rys. 6)	0.296	40.9	59.1	0.292	36.6	63.5
" (tab. IX)				0.290	40.2	59.8
" (rys. 4)	0.300	51.6	48.4			
Aldo.	0.298	45.2	54.8			
Izo. (rys. 5)	0.311	38.4	61.6			
Laur.	0.299	50.4	49.6			
Średnia <i>Moyenne</i>	0.301	45.28	54.72			

śnie po 10 dniach głodu, temu samemu zwierzęciu, na którym wykonano doświadczenia z rys. 4 i 6a. W tych warunkach (rys. 7) wszystkie wartości krzywych cukrowych wyolbrzymiły się w porównaniu z danymi, uzyskanymi bez adrenaliny. Cukromocz osiągnął szczyt w 6-tej do 8-mej godzinie wstrzykiwania, przyczem pojawiły się wartości zadziwiające tem, że dorównywały ilości glikozy, wprowadzanej równocześnie do żyły, a m. 2 g/kg/godz. Następnie poczęło się opadanie krzywej cukromoczu. W ten sposób kształt pierwszej fazy został zachowany ze wszystkimi jej częściami. Odpowiednio do cukromoczu ukształtowała się też krzywa objętości moczu. Krzywa cukru we krwi osiągnęła szczyt w 6 tej godzinie na wysokości 775 mg% i ta wartość była ważna, gdyż oznaczała przy prawidłowej nerce zupełną niemożność tkanek do zatrzymania wstrzykniętej glikozy. Odtąd krzywa cukru we krwi poczęła opadać, dając zstępującą część fazy pierwszej, idącą zgodnie z krzywą cukromoczu. Stała ilość adrenaliny

dowożona dożylnie nie zburzyła przebiegu fazy pierwszej, lecz tylko pogłębiła równomiernie niedomogę asymilacyjną każdej z jej części, podwajając niemal w każdej godzinie cyfrę cukromoczu w stosunku do doświadczenia na rys. 6a. Prędkość asymilacyjna znikoma w pierwszych godzinach wstrzykiwania i pod-



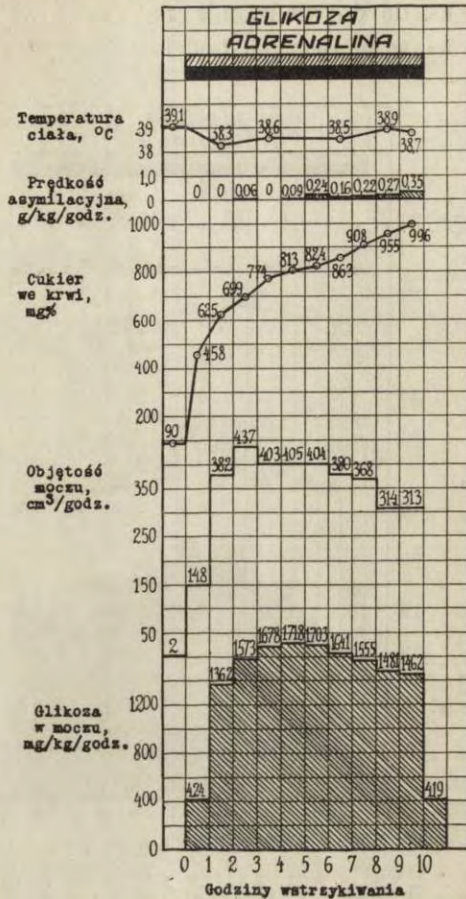
Rys. 7. Glikoza wraz z adrenaliną (0.03 mg/kg/godz.) dożylnie przez 15 godzin po 10 dniach głodu. Suka Alm. Dośw. 11. Wskaz. odz. 0.297.

Fig. 7. Glycose avec adrénaline (0.03 mg/kg/godz.)—par la voie intraveineuse pendant 15 hrs. après 10 jours de jeûne. Chienne Alm. Exp. 11. Indice nutritif 0.297.

czas trwania płaskowyzu, narasta nieznacznie wraz z nastaniem zstępującej części fazy pierwszej<sup>1)</sup> i dochodzi w końcu do 0.46 g.

<sup>1)</sup> Nie może być jednak wyłączone, że opadanie krzywych cukrowych w dalszych godzinach doświadczenia z adrenaliną zostało wywołane tem, że adrenalina ulegała z biegiem godzin rozpadowi w roztworze cukrowym, przygotowanym tuż przed rozpoczęciem wstrzykiwania.

Należało się przekonać, czy po 10 dniach głodzenia zwierzęcia przez zdwojenie dawki adrenaliny nie uzyska się trwałej, zupełnej niedomogi asymilacyjnej, t. zn., że uda się przedłużyć



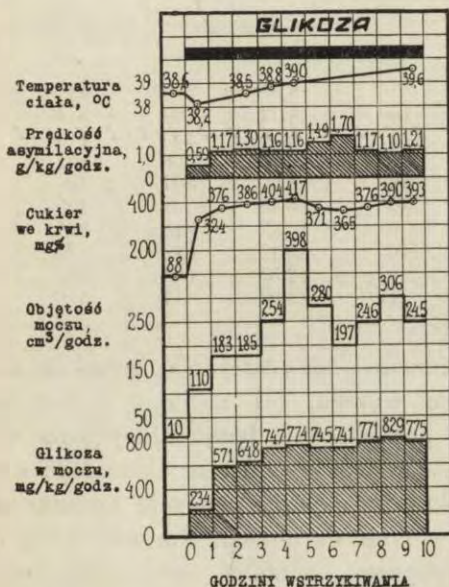
® Rys. 8. Wlewanie stałe, dożylna adrenaliny w ilości 0.06 mg/kg/godz. wraz z glikozą po 10 dniach głodu u suki Alm. (dośw. 13, wskaźnik odżywczy 0.298).

*Fig. 8. Injection intraveineuse de l'adrénaline à vitesse constante 0.06 mg/kg/hr. avec glycose après 10 jours de jeûne chez la chienne Alm. (exp. 13, indice nutritif 0.298).*

uzyskaną w poprzednim doświadczeniu zupełną niedomogę podczas trwania płaskowyzu fazy pierwszej. Dlatego zastosowano dawkę 0.06 mg adrenaliny na kg/godz. (rys. 8). Okazało się jednak, że takiego wysiłku nerki nie potrafią wytrzymać. Istotnie pod wpływem wzmożonej dawki pojawiły się w pierwszych czterech

godzinach wstrzykiwania znaczniejsze niż na rys. 7 ilości cukromoczu. Później jednakowoż krzywe cukromoczu przestały rósć, osiągając płaskowyż niższy nawet, niż przy wprowadzaniu słabszej dawki adrenaliny, natomiast stężenie cukru we krwi nieustannie, gwałtownie wzrastało się z godziny na godzinę, świadcząc o rosnącym zastoju glikozy nieprzetwarzanej w organizmie. Temperatura ciała była przytem prawidłowa. Jest rzeczą wielce prawdopodobną, że przyswajanie glikozy w tych warunkach zupełnie ustało, gdyż nie można w tak anormalnych warunkach powoływać się na obliczoną prędkość asymilacyjną, która wykazuje nieznaczne przyswajanie. Zwierzę w chwili ukończenia doświadczenia nie mogło się na nogach utrzymać; stan ten trwał przez kilkanaście godzin, co się nigdy nie zdarzyło temu i żadnemu innemu zwierzęciu przy wprowadzaniu samej glikozy.

Całkowita ilość glikozy wydalona z moczem wynosiła w doświadczeniu z dawką 0.03 mg/kg/godz. 79.6% ilości wstrzykniętej (bez adrenaliny 40.9%), zaś w doświadczeniu z dawką 0.06 mg/kg/godz. wynosiła 73.0%, czyli mniej niż z dawką dwa razy mniejszą.



Rys. 9. Wstrzykiwano glikozę po tygodniu diety tłuszczowej. Suka Aldo. Dośw. I, Wskaźnik odżywczy 0.302.

Fig. 9. On a injected le glycose après une semaine du régime gras. Chienne Aldo. Exp. 1. Indice nutritif 0.352.

## Pokarm tłuszczowy.

Przy wlewaniu glikozy po tygodniu karmienia zwierzęcia trójglicerydami kwasów tłuszczowych otrzymujemy obraz asymilacyjny przedstawiony na rys. 9. Cukromocz i stężenie cukru we krwi narastają w ciągu pierwszych czterech godzin i osiągną szczyt, począwszy od 5-tej godziny. W moczu znajduje się wtedy 774 mg/kg/godz., we krwi zaś 417 mg%. Taki stan trwa aż do końca doświadczenia. W doświadczeniu podobnym lecz wykonanem na innym zwierzęciu (tab. XI) krzywe cukrowe opa-

Tabela XI.

Suka Alm. Dośw. 2. Wskaźnik odżywczy 0.304. 10-godzinne wprowadzanie glikozy po tygodniu karmienia tłuszczem.

Chienne Alm. Exp. 2. Indice nutritif 0.304. Introduction du glycose pendant 10 hrs. après une semaine du régime gras.

Czas Temps godz. hr.	Mocz Urine			Cukier we krwi Sucre du sang mg%	Prędkość asymila- cyjna Taux d'assimila- tion p. kg/hr. g	Tempera- tura ciała Tempéra- ture du corps °C
	Objętość na godz. Volume par hr. cm <sup>3</sup>	Ilość glikozy Quantité de glycose				
		Znaleziona Trouvée g	Na kg/godz. Par kg/hr. mg			
Przed wstrzykiwaniem	1			91		38.2
1-sza godz. wstrzyk.	78	5.50	296	438	0	
2-ga " "	144	8.72	469	374	1.85	39.3
3-cia " "	57	9.95	535	415	1.26	40.2
4-ta " "	247	12.42	668	451	1.15	40.0
5-ta " "	380	15.00	807	434	1.28	39.6
6-ta " "	396	15.48	832	409	1.29	
7-ma " "	395	15.22	818	394	1.26	39.2
8-ma " "	405	15.15	813	392	1.20	38.9
9-ta " "	262	12.35	664	343	1.58	
10-ta " "	247	12.03	647	376	1.19	38.9

dają nieco ku końcowi doświadczenia, wysokość ich bezwzględna jest jednak nieco wyższa, niż na rys. 9. Jest rzeczą możliwą, że znaczniejsze powiększenie temperatury ciała w obu doświadczeniach, podczas wstrzykiwania, zmniejszyło nieco postać odczynu. Ilość cukru wydalona z moczem podczas całego doświadczenia wynosi w tych warunkach średnio 33.5% ilości wstrzykniętej, a ilość przyswojona 66.5% (tab. XII). Jest rzeczą prawdopodobną, że djeta tłuszczowa działa niemal jak głód na fazę pierwszą, i być może wynik doświadczenia po 7-dniowym głodzeniu byłby podobny do przedstawionego na rys. 9, lub tab. XI.

Tabela XII.

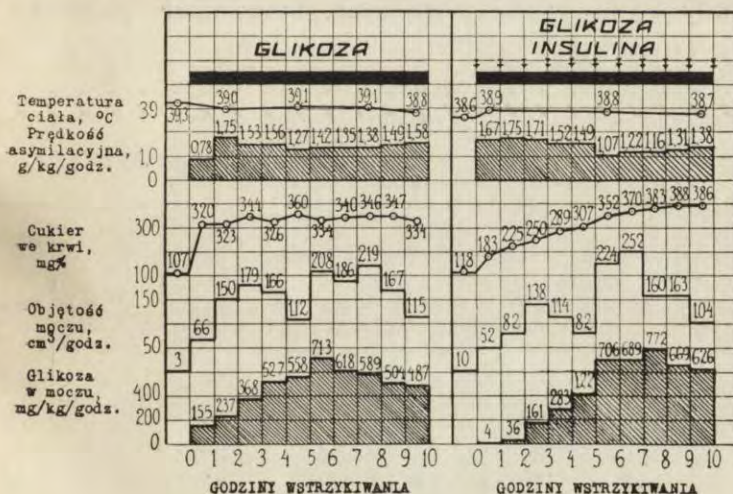
Wpływ diety tłuszczowej na przyswajanie śródżylnej glikozy wprowadzanej przez 10 godzin.

*Influence du régime gras sur l'assimilation intraveineuse du glycose qui a été introduit pendant 10 hrs.*

Suka Chienne	Wskaźnik odżywczy <i>Indice nutritif</i>	Ilość glikozy <i>Quantité de glycose</i>	
		Wydalona z moczem <i>Éliminée avec l'urine</i> %	Przyswojona <i>Assimilée</i> %
Alm. (tab. XI)	0.304	32.8	67.3
Aldo. (rys. 9)	0.302	34.2	65.8
Średnia <i>Moyenne</i>	0.303	33.46	66.54

## Pokarm białkowy.

W doświadczeniu, zobrazowanym na rys. 10a, a wykonanym po tygodniu karmienia mięsem, odnajdujemy rysy, przypominające doświadczenia, wykonane po głodzie z tą różnicą, że zarówno wartość cukromoczu, jak i cukru we krwi są znacznie niższe, niż w doświadczeniach głodowych, jak i z dietą tłuszczową, przeprowadzonych na tych samych zwierzętach. Cukromocz na rys. 10a posiada dobrze wykształcone ramię wstępujące,



- a) Bez insuliny. Dośw. 1. Wskaźnik odżywczy 0.315.  
 a) *Sans insuline. Exp. 1. Indice nutritif 0.315.*
- b) Z insuliną. Dośw. 7. Wskaźnik odżywczy 0.304.  
 b) *Avec insuline. Exp. 7. Indice nutritif 0.304.*

Rys. 10. Jednostajny dowóz glikozy po tygodniu diety białkowej u suki Laur.  
 Fig. 10. Introduction constante du glycose après une semaine de régime de protéine chez la chienne Laur.

plaskowyż i ramię opadające fazy pierwszej, a wraz z nimi idzie i krzywa godzinnej objętości moczu. Nie tak wyraźnie są te okresy w krzywej cukru we krwi, która narasta w pierwszej godzinie wstrzykiwania do 320 mg%, poczem nieznaczne wznie sienie w 5-tej godzinie wstrzykiwania do 360 mg% zaznacza szczyt fazy pierwszej, gdy w moczu ukazuje się w godzinie 6-iej, osiągając wartość 713 mg, wreszcie do końca doświadczenia utrzymuje się poziom około 340 mg%, nie wykazując tendencji do spadku.

Natomiast w doświadczeniu, zilustrowanem na tab. XIII, zarówno krzywa cukromoczu, jak i krzywa glikemiczna wyka zują bardzo wyraźny zarys pierwszej fazy. W 4-iej i 5-tej go dzinie występuje plaskowyż krzywej na wysokości 435 mg% cu kru we krwi, a 646 mg w moczu. Są to wartości we krwi nie znaczne, w moczu zaś wybitnie niższe niż w doświadczeniu, wy konanem u tego samego zwierzęcia po tygodniu łuszczowym (tab. XI).

Insulina. — Te same cechy, które wystąpiły przy działa niu insuliny w doświadczeniach po głodzie na rys. 6b. i tab. VIII, pojawiły się też w doświadczeniach, które doszły do skutku po

Tabela XIII.

Wlewanie 10-godzinne glikozy u sukli Alm. (wskaźnik odżywczy 0.312, dośw. 3) po ty godniu diety białkowej.

*Injection du glycose pendant 10 hrs. chez la chienne Alm. (indice nutritif 0.312 exp. 3), après une semaine du régime de protéine.*

Czas Temps godz. hr.	Mocz Urine			Cukier we krwi Sucre du sang mg%	Prędkość asymila- cyjna Taux d'assimila- tion p, kg/hr. g	Tempera- tura ciała Tempéra- ture du corps °C
	Objętość na godz. Volume par hr. cm <sup>3</sup>	Ilość glikozy Quantité de glycose				
		Znaleziona Trouvée g	Na kg/godz Par kg/hr. mg			
Przed wstrzykiwaniem	10			104		38.5
1-sza godz. wstrzyk.	85	4.54	225	378	0.41	
2-ga " "	190	8.56	424	367	1.63	38.5
3-cia " "	177	9.41	466	388	1.44	
4-ta " "	250	13.05	646	435	1.12	
5-ta " "	188	13.48	667	434	1.34	38.8
6-ta " "	187	12.71	629	388	1.60	
7-ma " "	175	11.40	564	378	1.49	38.8
8-ma " "	206	9.66	478	318	1.82	
9-ta " "	180	8.95	443	316	1.57	38.9

Tabela XIV.

10-godzinne wprowadzanie glikozy drogą dożylną i insuliny po tygodniu diety białkowej. Suka Alm. Dośw. 7. Wskaźnik odżywczy 0.305.  
*Injection du glycose par la voie intraveineuse et d'insuline après une semaine du régime de protéine. Chienne Alm. Exp. 7. Indice nutritif 0.305.*

Czas <i>Temps</i> godz. <i>hr.</i>	Mocz <i>Urine</i>			Cukier we krwi  <i>Sucré du sang</i>	Prędkość asymila- cyjna  <i>Taux d'assimila- tion pr. kg/hr.</i>	Tempera- tura ciała  <i>Tempéra- ture du corps</i>
	Objętość na godz.  <i>Volume par hr.</i> cm <sup>3</sup>	Ilość glikozy <i>Quantité de glycose</i>				
		Znaleziona <i>Trouvée</i> g	Na kg/godz. <i>Par kg/hr.</i> mg	<i>Sucré</i> mg%	<i>g</i>	<i>°C</i>
Przed wstrzykiwaniem	19			125		38.8
1-sza godz. wstrzyk	6	0.12	6	175	1.74	
2-ga " "	< 1	0.16	8	176	1.99	
3-cia " "	210	1.56	83	221	1.69	39.5
4-ta " "	208	4.59	244	264	1.54	
5-ta " "	330	9.45	503	307	1.28	
6-ta " "	196	11.88	632	312	1.34	39.1
7-ma " "	169	13.05	694			
8-ma " "	180	12.58	669	328		
9-ta " "	176	12.67	674	319	1.37	39.1
10-ta " "	146	11.83	629	330	1.32	

tygodniu białkowym (rys. 10b, tab. XIV). Krzywa cukromoczu, która bez insuliny była w ramieniu narastającym fazy pierwszej zbliżona do linii prostej, stała się pod wpływem insuliny wklęsłą ku osi rzędnych. (rys. 10b). W ciągu pierwszych pięciu godzin każda wartość wydalonego z moczem cukru obniżyła się pod wpływem insuliny. Niemniej jednak pojawił się płaskowyż fazy pierwszej w 6-tej godzinie wstrzykiwania na poziomie nie niższym niż bez insuliny, trwał przez 3 godziny i w dwu ostatnich godzinach począł się zmniejszać, przechodząc w część zstępującą fazy pierwszej. W przeciwieństwie do krzywej cukru we krwi bez insuliny (rys. 10a), krzywa ta z insuliną przedstawia się jak linia prosta, przeciągnięta od wartości, zaznaczającej się w pierwszej godzinie wstrzykiwania, do poziomu, uzyskanego w godzinie 8-iej, szczytowej — 383 mg%, którego stężenie utrzymuje się już do końca doświadczenia. Cukromocz na tab. XIV miał dokładnie takie same cechy, jak na rys. 10b, płaskowyż krzywej cukru we krwi uległ jednak pod działaniem insuliny wybitnemu obniżeniu w stosunku do danych tab. XIII, w której bez insuliny wbrew oczekiwaniu przy niższym cukromoczu na szczycie płaskowyżu wystąpiło wyższe stężenie cukru we krwi.



Tabela XV.

Działanie karmienia białkiem przez tydzień na śródżylną asymilację glikozy wprowadzanej przez 10 godzin w doświadczeniach z insuliną i bez niej.  
*Action d'alimentation riche en protéine pendant une semaine sur l'assimilation intraveineuse du glycose qui a été introduit dans les expériences avec insuline et sans celle-ci.*

Suka <i>Chienne</i>	Bez insuliny <i>Sans insuline</i>			Z insuliną <i>Avec insuline</i>		
	Wskaźnik odżywczy <i>Indice nutritif</i>	Ilość glikozy <i>Quantité de glycose</i>		Wskaźnik odżywczy <i>Indice nutritif</i>	Ilość glikozy <i>Quantité de glycose</i>	
		Wydalona z moczem <i>Éliminée avec l'urine</i>	Zasymilo- wana <i>Assimilée</i>		Wydalona z moczem <i>Éliminée avec urine</i>	Zasymilo- wana <i>Assimilée</i>
	%	%		%	%	
Alm. (tab. XIII i XIV)	0.312	25.2	74.8	0.305	20.7	79.3
Aldo.	0.310	26.3	73.7			
Laur. (rys. 10)	0.315	23.8	76.2	0.304	21.8	78.2
Średnia <i>Moyenne</i>		25.10	74.90		21.28	78.72

Prędkość asymilacyjna doznaje niewątpliwie pod wpływem insuliny przyspieszenia w pierwszych pięciu godzinach wstrzykiwania, lecz w dalszych pięciu staje się niższa niż bez insuliny, co w pewnej mierze wyrównywa przewagę pierwszych pięciu godzin. Interesującym będzie rezultat działania insuliny na nasilenie cukromoczu w okresach 5-godzinnych. Każda cyfra niżej podana stałowi procent ilości cukru równocześnie w danym okresie wstrzykniętej.

Warunki		1-sze 5 godz. %	2-gie 5 godz. %
Bez insuliny	{ rys. 10a	18.5	29.1
	{ tab. XIII	24.3	26.1
Z insuliną	{ rys. 10b	8.76	34.6
	{ tab. XVI	8.44	33.0

Pod wpływem insuliny cały ciężar niedomogi asymilacyjnej przenosi się z pierwszych pięciu godzin na następne, lecz nie znika, a więc nie znika pod działaniem insuliny nawet mniejsza niż głodowa faza pierwsza. Jak widać z tab. XV, ogólna wygra-

na przy pomocy insuliny jest niewielka i wynosi w jednej parze doświadczeń 4.5% czystego zysku asymilacyjnego, a w drugiej 1.9% ilości wstrzykniętej glikozy. Jest on, jak w doświadczeniach po głodzie, wypadkową następujących działań:

1) Wybitne wzmoczenie asymilacji w części wstępującej fazy pierwszej,

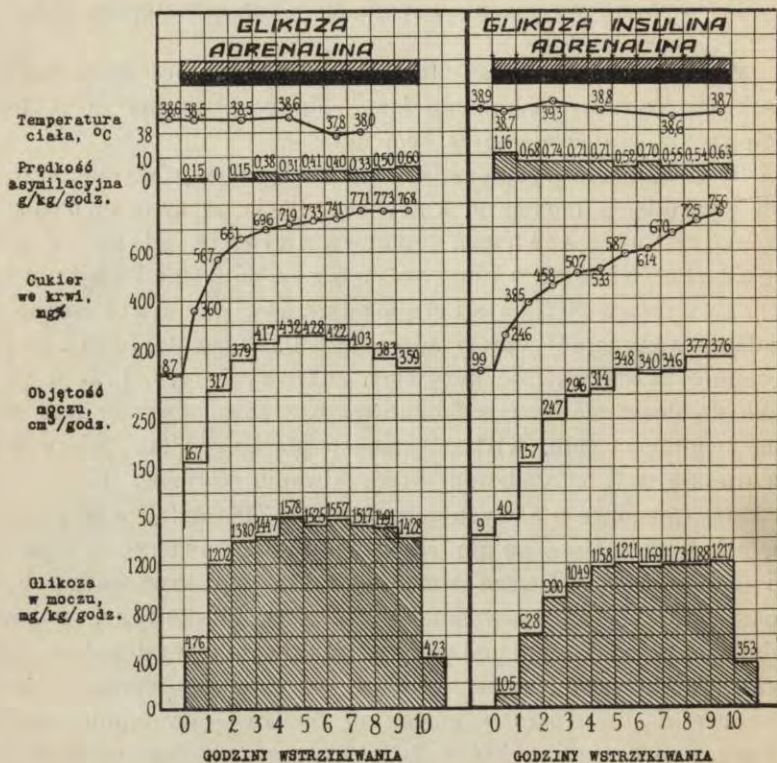
2) Przedłużenie czasu trwania i nieznaczne zwiększenie wysokości trwania płaskowyzu fazy pierwszej, co ma za skutek zmniejszenie przyswajania w tym okresie,

3) Opóźnienie wystąpienia części zastępującej fazy pierwszej, czyli wystąpienia momentu, kiedy asymilacja poczyną się nasilać.

Adrenalina obniża przyswajanie glikozy po tygodniu białkowym do poziomu galaktozy, wstrzykiwanej z tą samą prędkością, co glikoza.— Działanie zwyczajnej dawki adrenaliny 0.03 mg/kg/godz. wyogromniło każdą wartość krzywych cukrowych (rys. 11a) w stosunku do doświadczenia, wykonanego bez adrenaliny na tem samym zwierzęciu (tab. XIII). W moczu płaskowyz fazy pierwszej ukazuje się w 5-tej godzinie wstrzykiwania i wynosi 1579 mg, we krwi równocześnie występuje wartość 719 mg<sup>0</sup>/<sub>0</sub>, a więc niższa, niż z adrenaliną po głodzie u tego samego zwierzęcia (rys. 7, 755 — 775 mg<sup>0</sup>/<sub>0</sub>). Dalsze wartości cukru we krwi mogą być uznane jeszcze za prawomocne wartości płaskowyzu, jednak mniej więcej od 7-mej godziny wstrzykiwania występować zaczyna rys sztuczny: stężenie cukru we krwi się wzmacza, lecz równocześnie ilość jego w moczu się obniża — występuje zastój glikozy w organizmie, który tak często zjawia się w naszych doświadczeniach z adrenaliną. Cukromocz 10-godzinny — 68.0<sup>0</sup>/<sub>0</sub> (bez adrenaliny 25.2<sup>0</sup>/<sub>0</sub>) — jest niemal identyczny z 10-godzinnym cukromoczem (bez wliczenia ilości wydalonej po ukończeniu wstrzykiwania) przy wlewaniu dożylnem galaktozy, podobnie każda poszczególna cyfra na godzinę wydalonej glikozy na rys. 11a jest podobna do ilości, zanotowanych, n.p., na rys. 1c z galaktozą, a i krzywa cukru we krwi na rys. 11a niezbyt znacznie jest wyższa od tych, jakie się spotyka na rys. 1 i 3.

Wpływ insuliny na przyrost niedomogi asymilacyjnej, wywołany przez adrenalinę.— Do wypróbowania tego wpływu zostało wybrane „piętro“ białkowe przyswajania glikozy, gdyż 1<sup>0</sup> było pośredniem między „piętnem“

głodowem, a węglowodanowem, wyniki zatem byłyby też pośredkowe, 2<sup>o</sup> zaś dlatego, że natężenie przyswajania glikozy pod wpływem diety białkowej i adrenaliny upodabniało się do przy-



- a) Bez insuliny. Dośw. 12. Wskaźnik odżywczy 0,312.  
 a) Sans insuline. Exp. 12. Indice nutritif 0,312.  
 b) Z insulina. Dośw. 14. Wskaźnik odżywczy 0,311.  
 b) Avec insuline. Exp. 14. Indice nutritif 0,311.

Rys. 11. Wpływ insuliny na niedomogę asymilacyjną, wywołaną przez adrenalinę, wprowadzoną dożylnie z prędkością 0,03 mg/kg/godz. wraz z glikozą po tygodniu karmienia suki Alm. białkiem.

Fig. 11. Influence d'insuline sur l'insuffisance d'assimilation provoquée par l'adrénaline qui a été introduite par la voie endoveineuse à vitesse de 0,03 mg/kg/hr. avec glycose après une semaine d'alimentation riche en protéine chez la chienne Alm.

swajania galaktozy, co czyniło możliwym porównanie wpływu insuliny na oba cukry w równych warunkach przyswajania.

Doświadczenia na rys. 11b i na tab. XVI wypadły bardzo podobnie, pozwalając w porównaniu z danymi rys. 11a na pewne

Tabela XVI.

Suka Alm. Dośw. 15. Wskaźnik odżywczy 0.312. Jednostajne wlewanie glikozy wraz z adrenaliną (0.03 mg/kg/godz.) po tygodniu diety białkowej. Z początkiem każdej godziny wstrzykiwania po 5 jedn. insuliny na kg/godz.

Chienne Alm. Exp. 15. Indice nutritif 0.312. Injection constante du glycose avec adrénaline (0.03 mg/kg/godz.) après une semaine du régime de protéine. Au commencement de chaque heure d'injection 5 unités de l'insuline par kg/hr.

Czas <i>Temps</i>	Mocz <i>Urine</i>			Cukier we krwi  <i>Sucré du sang</i>	Prędkość asymila- cyjna  <i>Taux d'as- similation par kg/hr.</i>	Tempera- tura ciała  <i>Tempéra- ture du corps</i>
	Objętość na godz.  <i>Volume par hr.</i>	Ilość glikozy <i>Quantité de glycose</i>				
		<i>Volume par hr.</i> cm <sup>3</sup>	Znaleziona <i>Trouvée</i> g	Na kg/godz. <i>Par kg/hr.</i> mg	<i>Sucré du sang</i> mg%	<i>Taux d'as- similation par kg/hr.</i> g
Przed wstrzykiwaniem	12			102		38.5
1-sza godz. wstrz.	132	9.28	458	340	0.35	38.1
2-ga " "	166	15.03	742	466	0.63	38.1
3-cia " "	216	18.62	919	502	0.90	38.1
4-ta " "	266	22.20	1096	584	0.49	38.1
5-ta " "	293	23.57	1163	606	0.73	38.2
6-ta " "	319	24.51	1211	621	0.71	38.0
7-ma " "	345	23.82	1176	624	0.81	38.0
8-ma " "	340	23.33	1152	727	0.34	
9-ta " "	351	23.83	1177	757	0.67	38.1
10-ta " "	362	24.33	1201	767	0.75	38.0
		5.09	252			

wnioski. Działanie insuliny, zmniejszające cukromocz, zwiększony przez adrenalinę, zdaje się dotyczyć w obu doświadczeniach wartości jego w każdej godzinie doświadczalnej i to w doświadczeniu na tab. XVI równomiernie przez cały przeciąg trwania doświadczenia (w pierwszych pięciu godzinach cukromocz się zmniejsza o 17.1% ilości wstrzykniętej, w drugich o 16.0%), w doświadczeniu zaś na rys. 11b w pierwszych pięciu godzinach

Warunki hormonalne doświadczenia	Ilość glikozy wydalona z moczem	
	Pierwsze 5 godzin %	Drugie 5 godzin %
Adrenalina bez insuliny (rys. 11a)	60.8	75.2
Adrenalina z insuliną { (tab. XVI)	43.8	59.2
	(rys. 11b)	38.4

zmniejszenie cukromoczu jest większe (o 22.4% ilości wstrzykniętej), niż w dalszych pięciu (o 15.7%); wybitny bez insuliny

łuk cukromoczu w części narastającej przypłaszcza się mocno w obu doświadczeniach z insuliną, jak to zresztą spotykamy i w doświadczeniach bez adrenaliny (rys. 6b, 10b), poczem występuje płaskowyż krzywej.

Wyniki uzyskane z cukromoczem tracą jednak nieco ze swej jednoznaczności, gdy przyjrzymy się badaniom cukru we krwi, jakie równocześnie zostały przeprowadzone. Na rys. 11b w pierwszych pięciu godzinach wstrzykiwania każda cyfra cukru we krwi jest znacznie niższa, niż na rys. 11a; niższym też jest cukromocz, jak wspomniano. W dalszych jednak godzinach cukier we krwi ustawicznie rośnie z godziny na godzinę, a cukromocz utrzymuje się na stałym poziomie; wtedy przyrostowi cukru we krwi o 223 mg% nie towarzyszy żadna zmiana w natężeniu cukromoczu, co przemawia za tem, że zespół czynników, jakie biorą udział w tem doświadczeniu, nie sprzyja przepuszczalności nerkowej, powodując znaczny zastój glikozy. W tych warunkach musimy się więc zachować krytycznie przy ocenie wpływu insuliny na zmniejszenie przez nią cukromoczu w drugich pięciu godzinach wstrzykiwania. Jest to zresztą tylko spotęgowanie zjawiska, które widzimy i bez insuliny w doświadczeniu na rys. 11a. Dokładnie takie same zjawiska zaszły we krwi, gdy doświadczenie powtórzone (tab. XVI).

W takiej sytuacji winnaby dać pewne rozstrzygnięcie prędkość asymilacyjna, stapiająca zmiany w stężeniu cukru we krwi ze zmianami w cukromoczu na jedną wspólną wartość. Otóż nie ulega wątpliwości, że w ciągu pierwszych pięciu godzin wstrzykiwania insulina wybitnie wzmogła prędkość przyswajania w obu doświadczeniach, natomiast w drugich pięciu wzmoczenie nie jest już tak wybitne, choć zdaje się wyraźne. Jednakowoż należy pamiętać, że cukier zastojowy może się gromadzić w rozmaitej mierze w odmiennych tkankach, i wtedy upoważnienie nasze do użycia prostych wzorów, nieuwzględniających tej możliwości, zmniejsza się, a może nawet znika zupełnie. Wobec tego stwierdzić możemy, że w okresie pierwszych pięciu godzin insulina wzmaga wybitnie przyswajanie glikozy, upośledzone przez adrenalinę, wybitniej niż to czyni z galaktozą w analogicznych warunkach przyswajania; w drugich pięciu godzinach występują objawy zastojowego, nie pozwalając na zupełnie ścisłe zdefiniowanie wpływu insuliny.

## Pokarm węglowodanowy ze skrobią.

Był to pokarm, podawany w przerwach między jednym a drugim doświadczeniem, więc do pewnego stopnia pokarm ozdrowieńczy, który miał za zadanie wypełnić zapasy węglowodanowe organizmu po głodzie lub djeście tłuszczowej, zatrzeć przewagę metabolizmu białkowego, i sprowadzić poziom asymilacyjny dla glikozy w organizmie stale do tego samego punktu wyjścia. Należało się przekonać, jakim był wtedy odczyn organizmu na wlewanie glikozy.

Tabela XVII.

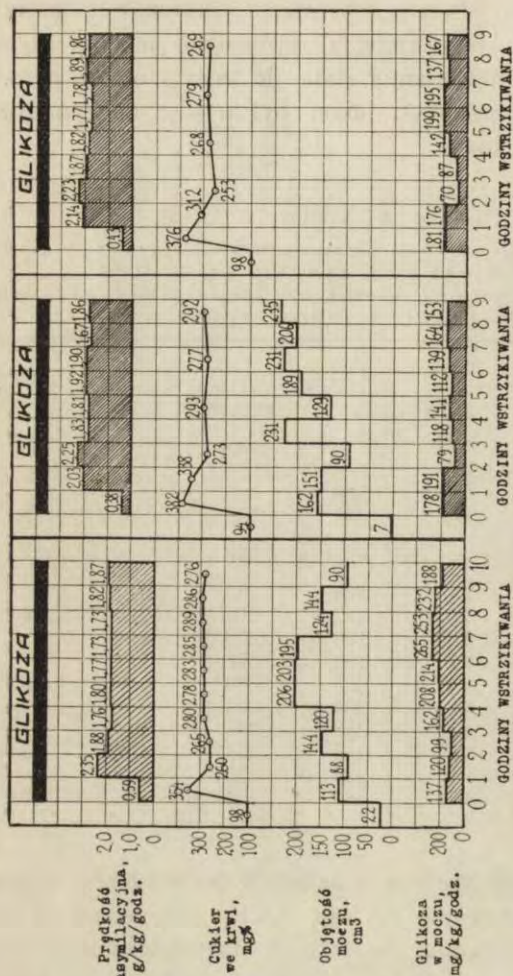
Suka Alm. Dośw. 4. Wskaźnik odżywczy 0.311. Dożylne wstrzykiwanie glikozy przez 10 godzin po tygodniu diety węglowodanowej ze skrobią.

Chienne Alm. Exp. 4. Indice nutritif 0.311. Injection intraveineuse du glycose pendant 10 hrs. après une semaine du régime hydrocarboné avec amidon.

Czas Temps godz. hr.	Mocz Urine			Cukier we krwi Sucre du sang mg%	Prędkość asymila- cyjna Taux d'as- similation pr. kg/hr. g	Tempera- tura ciała Tempéra- ture du corps °C
	Objętość na godz. Volume par hr. cm <sup>3</sup>	Ilość glikozy Quantité de glycose				
		Znaleziona Trouvée g	Na kg/godz. Par kg/hr. mg			
Przed wstrzykiwaniem				100		39.1
1-sza godz. wstrz.	179	4.48	225	382	0.37	
2-ga " "	80	3.62	182	270	2.38	39.2
3-cia " "	174	2.62	132	276	1.84	
4-ta " "	93	3.75	188	296	1.71	
5-ta " "	190	4.44	223	286	1.83	39.3
6-ta " "	190	4.05	204	299	1.73	
7-ma " "	257	5.73	288	288	1.77	
8-ma " "	160	5.27	265	273	1.81	39.0
9-ta " "	156	4.49	226	273	1.78	
10-ta " "	90	3.33	167	257	1.91	39.0

Rys. 12a, podający średnią z czterech doświadczeń, z których jedno jest przedstawione na tab. XVII, dobrze nas o tem poinformuje. Odrazu widzimy, że w tych doświadczeniach zbliżamy się do kresu naszych badań, którym są najwyższe formy przyswajania glikozy. Krzywa cukru we krwi da nam w nich orientację. Podnosi się ona w pierwszej godzinie wstrzykiwania do 354 mg<sup>0</sup>/<sub>0</sub> (rys. 12a), lecz zaraz w następnej opada do 260 mg<sup>0</sup>/<sub>0</sub>, w 4-tej podnosi się do 280 mg<sup>0</sup>/<sub>0</sub> i na tym poziomie trwa mniej więcej do końca doświadczenia. W moczu ilość glikozy wynosi

w 1-szej godzinie 137 mg, poczem opada w 3-ciej do poziomu 99 mg i następnie znów narasta do 265 mg i opada przy samym końcu doświadczenia. Ten przebieg średnich krzywych jest istotnym wyrazem tego, co się dzieje we wszystkich czterech doś-



wiadczeniach, jak to można stwierdzić, porównując rys. 12a z tab. XVII. Wzniesienie krzywych cukrowych w pierwszej godzinie wstrzykiwania to — miniaturowa faza pierwsza, jak to zostanie udowodnione w następnym rozdziale. Prędkość asymilacyjna, niska w pierwszej godzinie, podczas trwania fazy pierwszej,

a) Podatyszych 121 dniach pracy tego samego zwierzęcia. Wskaźnik odz. 0.314.  
c) *Continuation du travail pendant 121 jours, chez le même animal. Ind. nutr. 0.314.*

b) Po 107 dniach pracy. Suka Kas. Wskaźnik odżywczy 0.308.

b) *Après 107 jours de travail. Chienne Kas. Indice nutritif 0.308.*

Rys. 12. Wpływ pokarmu z przewagą skrobi na asymilację śródzylną glikozy, wprowadzanej przez 10 godzin po okresie dłuższego spoczynku lub pracy mięśniowej.  
*Fig. 12. Influence d'alimentation riche en amidon sur l'assimilation endovaineuse du glucose, qui a été introduit pendant 10 hrs. après une période d'un repos de longue durée, ou du travail musculaire.*

przekraczała 2 g w 2-giej godzinie wskutek wzrostu sił asymilacyjnych, poczem wahała między 1.88 a 1.76 g. Cała więc faza pierwsza z jej ramieniem wstępującem, płaskowyzem i ramieniem zstępującem mieściła się tu w jednej godzinie.

Tabela XVIII.

Przyswajanie śródżylne glikozy, gdy zwierzęta znajdowały się przez tydzień na diecie węglowodanowej z przewagą skrobi.

*Assimilation intraveineuse du glycose, quand les animaux se trouvaient lors du régime hydrocarboné riche en amidon.*

Suka <i>Chienne</i>	Wskaźnik odżywczy  <i>Indice nutritif</i>	Ilość glikozy <i>Quantité de glycose</i>	
		Wydalona z moczem <i>Éliminée avec urine</i> %	Przyswo- jona <i>Assimilée</i> %
Alm. (tab. XVI)	0.311	10.5	89.5
Aldo.	0.312	6.60	93.4
"	0.314	10.0	90.0
Laur.	0.310	9.98	90.0
Średnia	0.312	9.27	90.73

Całkowita ilość glikozy, wydalonej z moczem w ciągu 10 godzin wstrzykiwania, wynosiła średnio 9.27% ilości wstrzykniętej, reszta była przyswajana (tab. XVIII). Okazuje się z tej tabeli, że nawet tak pstra co do swego składu djeta, jak djeta złożona z odpadków jedzenia szpitalnego, może dać zgodność wyników przy dożylnem wlewaniu glikozy, o ile, między innymi, zwierzęta posiadają wskaźnik odżywczy, stojący w obrębie strefy średnio dobrego odżywienia, jak to się stało w czterech doświadczeniach, przytoczonych w tab. XVII.

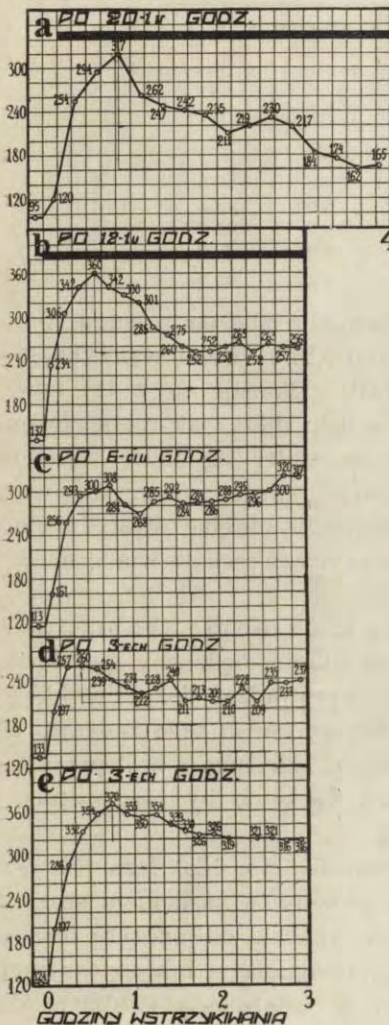
Faza pierwsza podczas trawienia skrobi.— Należało przypuszczać, że gdy podanie skrobi będziemy przybliżać do chwili, w której rozpoczynamy wprowadzać dożylnie glikozę, faza pierwsza ulegnie zmianom. Szereg badań tego rodzaju, zestawiony na rys. 13, został wykonany na suce Car., przyczem badano co 10 minut stężenie cukru we krwi, by nie przeoczyć form szczątkowych fazy pierwszej.

W 20 godzin po podaniu skrobi (rys. 13a) faza pierwsza trwała u tego zwierzęcia 3 i pół godziny z nasileniem szczytowem w 52 minucie wstrzykiwania. Spadek od szczytu do najniższego punktu wynosił 155 mg% i asymilacja tak się wzmogła po ustąpieniu fazy pierwszej, że w ostatniej półgodzinie do-



świadczenia, gdy cukier we krwi stał na poziomie 162—165 mg<sup>0</sup>/<sub>0</sub>, glikoza w moczu przestała się ukazywać.

W 12 godzin po podaniu skrobi (rys. 13b) rozpoznajemy po wysokości cukru we krwi przed rozpoczęciem wstrzykiwania— 132 mg<sup>0</sup>/<sub>0</sub> — że trawienie skrobi jeszcze się nie ukończyło. Szczyt fazy pierwszej pojawia się w 35 minucie wlewania cukru i wynosi 360 mg<sup>0</sup>/<sub>0</sub>, poczem następuje opadanie stężenia cukru we krwi do poziomu 252 mg<sup>0</sup>/<sub>0</sub>, czyli spadek fazy pierwszej wynosi 108 mg<sup>0</sup>/<sub>0</sub> w przeciągu 70 minut.



Rys. 13. Pierwsza faza podczas trawienia skrobi. Krzywe cukru we krwi wyrażone w mg% u sukki Car. (por. tab. XIX). Zwiększeniu, utrzymanemu na dziecie z przewagą skrobi, podawano 1 kg gotowanych ziemniaków wraz z 50 g mięsa, poczem rozpoczynano dożylnie wlewanie glikozy jużto w 3 godz. (dośw. d i e), jużto w 6 godz. (dośw. c), jużto w 12 godz. (dośw. b), albo wreszcie w 20 godz. (dośw. a).

Fig. 13. La première phase pendant la digestion d'amidon. Les courbes du sucre du sang exprimées en mg% chez la chienne Car. (cf. tab. XIX). A l'animal qui a été alimenté avec le régime riche en amidon on a fourni 1 kg de pommes de terre bouillies avec 50 g de la viande et on a commencé 3 hrs. (exp. d et e), ou 6 hrs. (exp. c), ou 12 hrs. (exp. b), ou, enfin 20 hrs. (exp. a) après une injection endoveineuse du glucose.

Obraz się zmienił w doświadczeniach, w których podawano skrobię na 6 lub na 3 godziny przed rozpoczęciem wstrzykiwania glikozy. W doświadczeniu na rys. 13c cukier we krwi przed rozpoczęciem wstrzykiwania był tylko nieznacznie wyższy, niż prawidłowo u tego zwierzęcia. Szczyt fazy pierwszej pojawił się po 45 minutach wstrzykiwania na poziomie 308 mg<sup>0</sup>/<sub>0</sub>, poczem w przeciągu 20 minut nastąpił spadek cukru we krwi o 40 mg<sup>0</sup>/<sub>0</sub>. Faza pierwsza była tu bardzo nieznaczna i tylko dlatego możemy stwierdzić jej istnienie, gdyż przypada w okresie czasu, odpowiadającym innym doświadczeniom.

W 3 godziny po podaniu skrobi nasilenie fazy pierwszej jest równie nieznaczne, jak w 6 godzin. Poziom cukru we krwi w obu doświadczeniach na rys. 13d i 13e przed rozpoczęciem doświadczenia świadczył o tem, że trawienie skrobi w tym czasie było w toku. Na rys. 13d szczyt fazy pierwszej występuje po 25 minutach wstrzykiwania, sięgając wartości 260 mg<sup>0</sup>/<sub>0</sub>, poczem ramię opadające trwa 80 minut i spadek wynosi 49 mg<sup>0</sup>/<sub>0</sub>. W drugim doświadczeniu tego samego rodzaju na rys. 13e szczyt występuje w 45 minucie wstrzykiwania, poczem opadanie trwa 80 minut i spadek wynosi 51 mg<sup>0</sup>/<sub>0</sub>. Faza pierwsza jest tu podobnych rozmiarów, jakkolwiek wszystkie wartości cukru we krwi są na rys. 13d znacznie niższe, niż na rys 13e. Wyjaśnienie być może leży w tem, że w drugim wypadku zwierzę nieco przytyło (z 21.1 na 21.8 kg). Dwa ostatnie doświadczenia nie są jednak bez zarzutu. Zwierzę miało podczas nich silne dreszcze i podniesienie temperatury ciała o więcej niż 1°, co mogło za sobą pociągnąć opadnięcie krzywych cukrowych, a zatem dać pozór, jak gdyby faza pierwsza jeszcze istniała.

Dlatego wykonano podobne doświadczenie na suce Kud., która podczas wlewania roztworu glikozy wykazała podniesienie temperatury ciała zaledwie o 0.3°, a podczas pierwszych dwu godzin wlewania, miarodajnych dla fazy pierwszej w tych warunkach, tylko o 0.1°. Przytaczamy wartości cukru we krwi w tem doświadczeniu: 118, 178, 252, 291, 287, 299, 292, 288, 279, 289, 282, 281, 282, 306, 306, 297, 310, 317, 323, z których trudnoby było wyodrębnić pierwszą fazę w sposób pewny.

Niewątpliwie im rozpoczęcie wstrzykiwania glikozy przybliża się do chwili podania skrobi, a zatem im obfitszy strumień węglowodanowy, płynący z jelita, tem mniejsza jest faza pierw-

sza, która kureczy się wreszcie tak, że już jej rozpoznać nie można. Dopiero w następnym rozdziale unaocznili się nam, czy po dawce węglowodanów faza pierwsza znika zupełnie, czy też tylko zmienia się jej lokalizacja.

Z tab. XIX niepodobna wyciągnąć żadnego wniosku co do wpływu trawienia skrobi na natężenie przyswajania glikozy, gdyż z jednej strony najniższy cukromocz pojawił się raz w 20 godzin po podaniu skrobi, drugi raz w 3 godz. po jej podaniu, a z drugiej strony najwyższy cukromocz wystąpił w bliźniaczym doświadczeniu w 3 godz. po skrobi. Autorowi nie powiodło się dotąd opanować tej zapewne sporej ilości czynników, które włączają przyswajaniem glikozy, gdy cukromocz wynosi od 10% do zera, podczas stale podawanej diety węglowodanowej (przy dwugramowej prędkości wstrzykiwania glikozy).

Tabela XIX.

Przyswajanie śródżylnie glikozy podczas trawienia skrobi. Suka Car.  
*Assimilation intraveineuse du glycose pendant la digestion d'amidon. Chienne Car.*

Skrobia podana przed wlewaniem glikozy na godzinę <i>Amidon administré avant l'injection du glycose hrs.</i>	Rys. 13 <i>Fig. 13</i>	Wskaźnik odżywczy <i>Indice nutritif</i>	Ilość glikozy <i>Quantité de glycose</i>	
			Wydalona z moczem <i>Éliminée avec l'urine</i> %	Przyswojona <i>Assimilée</i> %
20	a	0.300	2.12	97.9
12	b	0.302	6.27	93.7
6	c	0.303	8.35	91.7
3	d	0.302	2.84	97.2
3	e	0.305	12.6	87.1

Wpływ ruchu mięśniowego. — Chodziło o jego działanie na fazę pierwszą i na przyswajanie glikozy. Praca mięśniowa, która tu została zastosowana polegała na biegu zwierzęcia pod górę, o pochyłości 20%-wej, w bieżni obrotowej, stosowanym systematycznie przez szereg miesięcy. W miarę wzmaganiasię wprawy dochodziły zwierzęta do pewnej dziennej dawki pracy, po której były wieczorem miernie wyczerpane, tak jednak, że na drugi dopraszały się ponowienia biegów. Wykonywały przeciętnie 8 biegów dziennie, każdy po 1 km przez 10 minut. Po każdym biegu następował krótki odpoczynek. Podczas pracy trzymano zwierzęta na djecie z przewagą skrobi.

W 20 godzin po ostatnim biegu i ostatnim pokarmie rozpoczęto wlewanie glikozy. Przykład, jak działa najpierw 107 dni, a potem dalsze 121 dni takiej pracy, jest przedstawiony na rys. 12bc. W porównaniu z rys. 12a, średnią doświadczeń w spoczynku, nie można w doświadczeniach po wysiłku mięśniowym stwierdzić żadnego wpływu pracy na sposób przyswajania i wydalania glikozy w moczu. Zarówno faza pierwsza, jak i całkowita ilość przyswojonego cukru gronowego nie doznały pod wpływem pracy mięśniowej żadnych wyraźniejszych zmian.

Tabela XX.

Przyswajanie śródżylne glikozy po pracy mięśniowej.  
*Assimilation endoveineuse du glycose après le travail musculaire.*

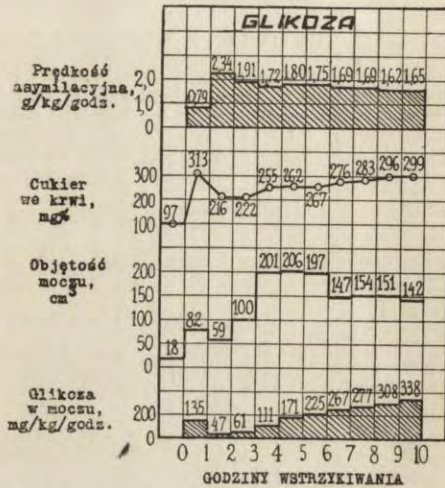
Warunki <i>Conditions</i>	Wskaźnik odżywczy <i>Indice nutritif</i>	Ilość glikozy <i>Quantité de glycose</i>	
		Wydalona z moczem <i>Éliminée avec urine</i> %	Przyswojona <i>Assimilée</i> %
<i>Suka Kas. — Chienne Kas.</i>			
Po 107 dniach pracy (rys. 12b) <i>Après 107 jours du travail (fig. 12b)</i>	0.308	7.09	92.9
Po dalszych 121 dniach pracy (rys. 12c) <i>Après 121 jours du travail continué (fig. 12c)</i>	0.314	<u>7.52</u>	<u>92.5</u>
Średnia — <i>Moyenne</i>		7.30	92.70
<i>Suka Szarl. — Chienne Charl.</i>			
Po 116 dniach pracy <i>Après 116 jours du travail</i>	0.336	11.8	88.2
Po dalszych 105 dniach pracy <i>Après 105 jours du travail continué</i>	0.339	13.5	86.5
Po dalszych 56 dniach pracy. <i>Après 56 jours du travail continué</i>	0.332	<u>10.7</u>	<u>89.3</u>
Średnia — <i>Moyenne</i>		11.99	88.01

Suka Kas. wydalala przeciętnie 7.30% (tab. XX), bardziej otyła Szarl. wydalala przeciętnie 12.0%, czyli obie średnio 9.65% ilości wstrzykniętej, co się zgadza z tem co wydalają zwierzęta w spoczynku względnym (tab. XVIII), jakim jest przebywanie w klatce. Kontynuowanie pracy nie poprawiało wyraźnie przyswajania.

Insulina. — Z odnośnych doświadczeń, opublikowanych dotąd przez autora i współpracowników, wynika, że insulina zupełnie usuwa miniaturową fazę pierwszą, jaka się pojawia po karmieniu djetą z przewagą węglowodanów.

### Pokarm węglowodanowy z sacharozą.

Rzut oka na rys. 14 przekonywa nas o pewnych różnicach odczynu, występującego po tygodniu karmienia sacharozą z drobnym dodatkiem mięsa, w stosunku do odczynu, jaki się zjawia po karmieniu djetą z przewagą skrobi (rys. 12a) Należy dodać, że obie te grupy doświadczeń zostały wykonane na tych samych zwierzętach. Obu grupom wspólna jest faza pierwsza podobnego



Rys. 14. Działanie stałego wlewania glikozy po tygodniu diety, oblitującej w sacharozę. Średnia z 3 doświadczeń (por. tab. XXI).

Fig. 14. Action de l'injection constante du glycose après une semaine du régime riche en saccharose. Moyenne des 3 expériences (cf. tabl. XXI).

nasilenia, po której jednak w doświadczeniach z sacharozą następuje znaczny spadek krzywych cukrowych w 2-giej godzinie wstrzykiwania, cechujący zakończenie fazy pierwszej i następnie, począwszy od godziny 3-ciej obie krzywe cukrowe poczynają się wspinać regularnie aż do końca doświadczenia, a wraz z tem zjawiskiem asymilacja staje się stopniowo coraz mniejsza. Rys ten został już zauważony w naszych dawniejszych badaniach (27), przyczem się okazało, że to zmniejszanie przyswajania, występujące stopniowo po przejściu przez organizm zjawiska pierwszej fazy, jest bezwzględnie odporne na działanie insuliny. Dla uzupełnienia całokształtu doświadczeń na zwierzęciu Alm, zostaje przytoczona tab. XXI.

Tabela XXI.

10-godzinne wlewanie glikozy u sukki Alm. (dośw. 1, wskaźnik odżywczy 0.305) po tygodniu diety węglowodanowej z sacharozą.

*Injection du glycose pendant 10 hrs. chez la chienne Alm. (exp. 1, indice nutritif 0.305) après une semaine du régime hydrocarboné avec saccharose.*

Czas Temps godz. hr.	Mocz Urine			Cukier we krwi  Sucre du sang	Prędkość asymila- cyjna  Taux d'assimila- tion p. kg/hr.
	Objętość na godz.  Volume par. hr.  cm <sup>3</sup>	Ilość glikozy Quantité de glycose			
		Znaleziona Trouvée g	Na kg/godz. Par kg/hr. mg	mg%	g
Przed wstrzykiwaniem				103	
1-sza godz. wstrzyk.	70	3.88	205	341	0.61
2-ga " "	6	0.61	32	201	2.67
3-cia " "	60	0.42	22	210	1.93
4-ta " "	240	0.92	49	256	1.72
5-ta " "	244	2.05	109	260	1.87
6-ta " "	262	3.59	190	259	1.82
7-ma " "	135	4.43	234	262	1.75
8-ma " "	182	4.97	263	274	1.68
9-ta " "	199	4.89	312	281	1.65
10-ta " "	170	8.21	434	288	1.53

W ryczałtowej wartości 10-godzinnego przyswajania (tabela XXII) ginie subtelna różnica między obu typami pokarmu, gdyż pod wpływem obu średnio 90% glikozy ulega związaniu w ustroju.

Tabela XXII.

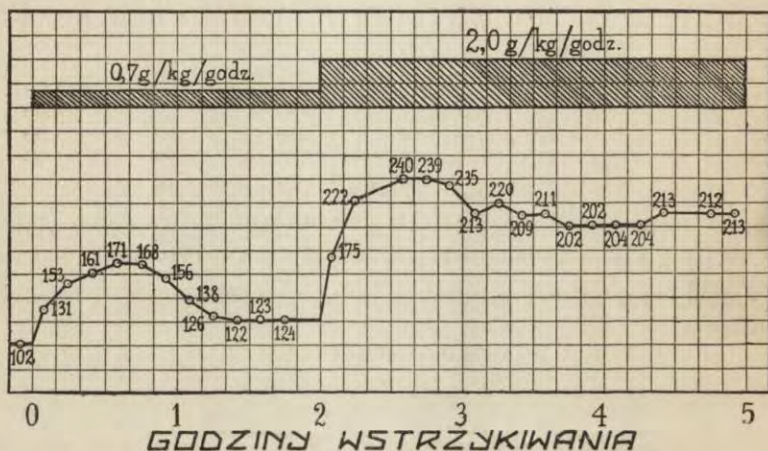
Wpływ diety węglowodanowej z sacharozą na śród-  
żylne przyswajanie glikozy, wprowadzanej w ciągu 10 godzin.

*Influence du régime hydrocarboné avec saccharose sur l'assimilation intraveineuse du glycose qui a été introduit pendant 10 hrs.*

Suka  Chienne	Wskaźnik odżywczy  Indice nutritif	Ilość glikozy Quantité de glycose	
		Wydalona z moczem Éliminée avec urine %	Przyswojona Assimilée %
Alm. (tab. XX)	0.305	9.25	90.8
Aldo.	0.310	4.15	95.9
Laur.	0.312	15.7	84.3
Średnia Moyenne	0.309	9.68	90.31

Umieszczenie pierwszej fazy, gdy wstrzykiwanie z prędkością 2-gramową jest poprzedzone wlewaniem z prędkością 0.7-gramową.—

Z danych JORDANA (\*27), uzyskanych pod kierunkiem R. M. WILDERA, wynika, że jeżeli wstrzykiwanie dożylne glikozy z prędkością 1.8 — 2.25 g/kg/godz. u psa poprzedzić dwugodzinnym wprowadzaniem tego samego cukru z prędkością 0.7 g, wtedy, wyrażając się językiem niniejszej pracy, asymilacja przy wstrzykiwaniu z prędkością 1.8 — 2.25 g często się poprawia, przyczem, jak widać z protokołów przytoczonego badacza, pierwsza faza znika albo zupełnie, albo prawie zupełnie. Powstaje pytanie, czy w tych warunkach faza pierwsza wogóle znika. Odpowiedź na nie dają następujące doświadczenia, w których wykonywano oznaczenie cukru we krwi w krótkich odstępach czasu, by wyłowić fazę pierwszą.



Rys. 15. Wstrzykiwanie glikozy przez 2 godz. z prędkością 0.7 g/kg/godz. a przez dalsze 3 z prędkością 2 g/kg/godz. u sukki Car., trzymanej na diecie obfitującej węglowodany. Wskaźnik odżywczy 0.307.

*Fig. 15. Injection du glycose à vitesse de 0.7 g/kg/hr. pendant 2 hrs. et pendant les suivantes 3 hrs. à vitesse de 2 g/kg/hr. chez la chienne Car. soumise au régime riche en hydrates de carbone. Indice nutritif 0.307.*

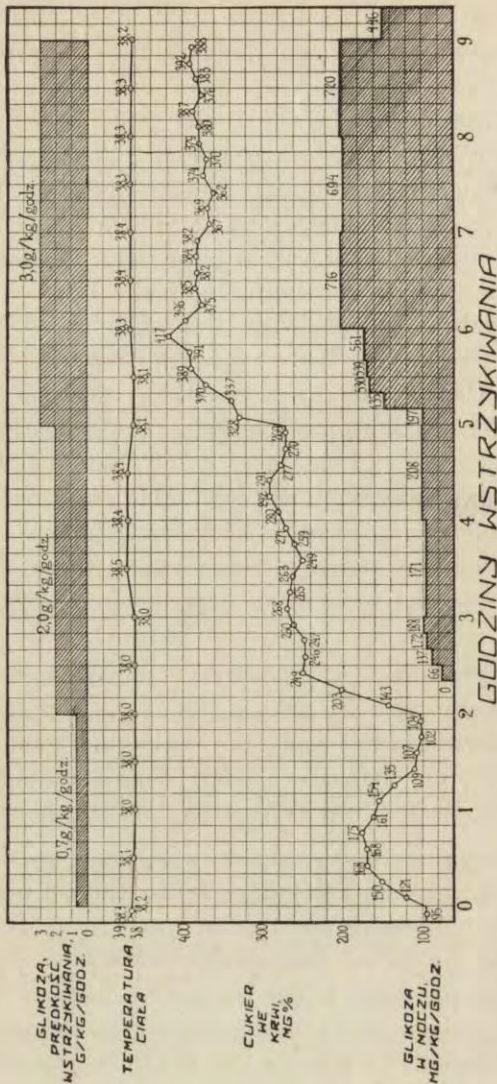
Z rys. 15 wynika, że w tego rodzaju warunkach faza pierwsza nie znika, lecz ukazuje się w całej pełni już przy wstrzykiwaniu z prędkością 0.7 g na kg/godz. Cukier we krwi podnosi się wtedy od 102 mg% po 35 minutach wstrzykiwania do 171 mg%, poczem opada w połowie drugiej godziny wlewania glikozy do poziomu 122 mg% i trwa tak do końca drugiej godziny, tworząc w ten sposób stały poziom drugiej fazy w tych warunkach, na którego tle, a zatem w ogniu przetwarzania glikozy, nagle prę-

kość dowozu cukru została wzmożona do 2 g/kg/godz. I przy tej prędkości, a zatem po raz wtóry, ukazało się zjawisko, które wydawałoby się mogło fazą pierwszą, a m. cukier we krwi narastał dopóki w trzecim kwadransie 3-ciej godziny wstrzykiwania nie pojawił się płaskowyż na poziomie 240 mg<sup>0</sup>/o, poczem w 4-tej do 5-tej cukier we krwi opadł do poziomu 202 — 213 mg<sup>0</sup>/o. Ponieważ jednak równocześnie z tem ostatniem zjawiskiem pojawiły się silne dreszcze i podniesienie temperatury ciała o 1.3° C, możemy stwierdzić na podstawie następných doświadczeń, że nie była to prawdziwa faza pierwsza, lecz tylko zjawisko opadnięcia krzywych cukrowych pod wpływem dreszczów. Należy dodać, że suka Car. (rys. 15) wydalila z moczem podczas wstrzykiwania z 0.7-gramową prędkością — 0.34<sup>0</sup>/o ilości wstrzykniętej, a przy prędkości 2 gramowej — 1.78<sup>0</sup>/o, która to cyfra nie może być u tego zwierzęcia tłumaczona jako wzmożenie przyswajania pod wpływem poprzedzającej małej dawki glikozy, gdyż z tab. XIX możemy odczytać, że suka ta nawet w 20 godzin po pokarmie zasobnym w skrobię wydalala 2.12<sup>0</sup>/o, a więc ilość podobną.

Należało się przekonać, czy pierwszym odczynem organizmu na każde przyspieszenie dowozu glikozy jest najpierw przyswajanie niedość szybkie (pierwsza faza), które przy dalszem trwaniu wstrzykiwania się wzmacnia, czy zatem w jednym doświadczeniu wystąpi tyle faz pierwszych, ile będzie przyspieszeń dowozu glikozy.

By to rozstrzygnąć, wykonano doświadczenie na innej suce (Kud.), wstrzykując glikozę kolejno z trzema różnymi prędkościami, coraz bardziej narastającymi. Jasnym jest z rys. 16, że faza pierwsza pojawiła się tylko przy wstrzykiwaniu z prędkością 0.7 g, a więc przy pierwszej prędkości zastosowanej. Przy prędkości 2-gramowej cukier we krwi stopniowo narastał przez 3 godziny, a przy prędkości 3-gramowej narósł do poziomu stałego, z wyjątkiem jednej cyfry wyższej (417 mg<sup>0</sup>/o) przy końcu 6-tej godziny wstrzykiwania; cyfra ta jednak samotna nie może stanowić fazy pierwszej. Tab. XXIII unaocznia nam zjawisko, że poprzedzające wstrzykiwanie małych dawek cukru nie wpłynęło w tym wypadku na zwiększenie przyswajania glikozy, wprowadzanej z 2-gramową prędkością: z poprzedzającą dawką cukru cukromocz wynosi 7.89<sup>0</sup>/o, bez niej zaś średnio 6.52<sup>0</sup>/o ilości



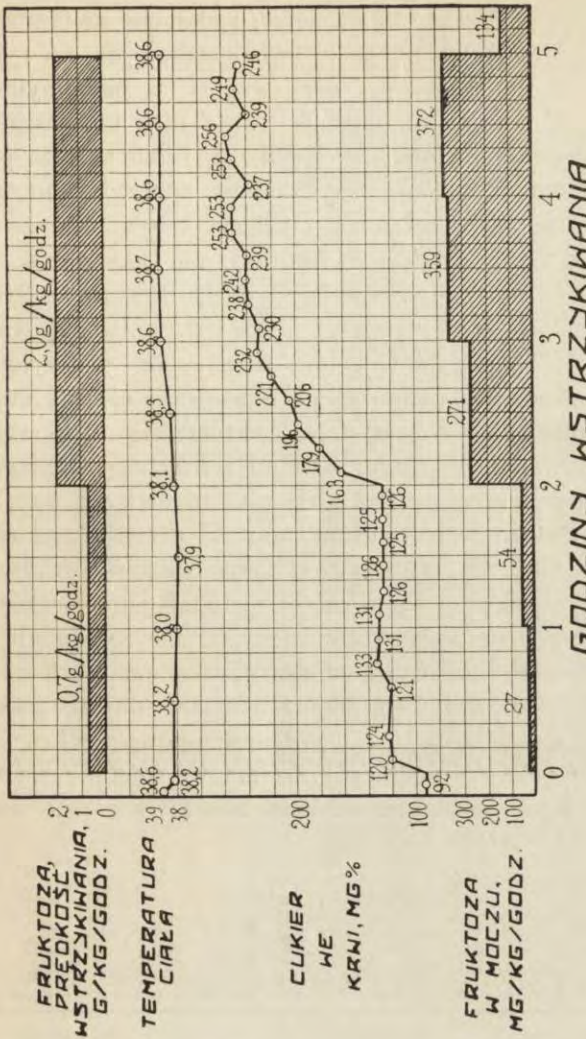


Rys. 16. Umiejscowienie fazy pierwszej przy stopniowo wzmagającej się prędkości wstrzykiwania glikozy u sukki Kud. (wskaźnik odżywczy 0.314).

Fig. 16. Localisation de la phase première, si l'on injecte du glucose, à vitesse graduellement croissante, chez la chienne Kud. (indice nutritif 0.314).

wstrzykniętej. Typ reakcji na rys. 16 należy uważać za regułę, zaś na rys. 15 za wyjątek, stojący w związku z czynnikami pobocznymi.

Mogłoby być rzeczą możliwą, że ten węglowodanowy szczyłek pierwszej fazy (przy 0.7-gramowej prędkości), który się okazał tak oporny na zabiegi djetetyczne, ma pochodzenie cał-



Rys. 17. Wstrzykiwanie śródżylnie fruktozy u sukli Kud. w warunkach analogicznych do tychże na rys. 16 (wskaznik odżywczy 0.316).  
 Fig. 17. Injection intraveineuse de fructose chez la chienne Kud. dans les conditions analogues à celles de la fig. 16 (indice nutritif 0.316).

kiem inne, niż dalsze wzrosty pierwszej fazy, które stały w najbliższym związku z odżywieniem. Byłoby to do pomyślenia, że śródżylnie wprowadzanie glikozy jest w pierwszej chwili związane z pewnym przejściowym zaburzeniem w rozmieszczeniu cukru: tymczasowo gromadziłoby się go więcej we krwi, do której dostaje się bezpośrednio i wtedy powstałaby faza pierwsza, która trwałaby dotąd, dopóki nadmiar glikozy przez stopniową dyfuzję do tkanek nie zostałyby usunięty.

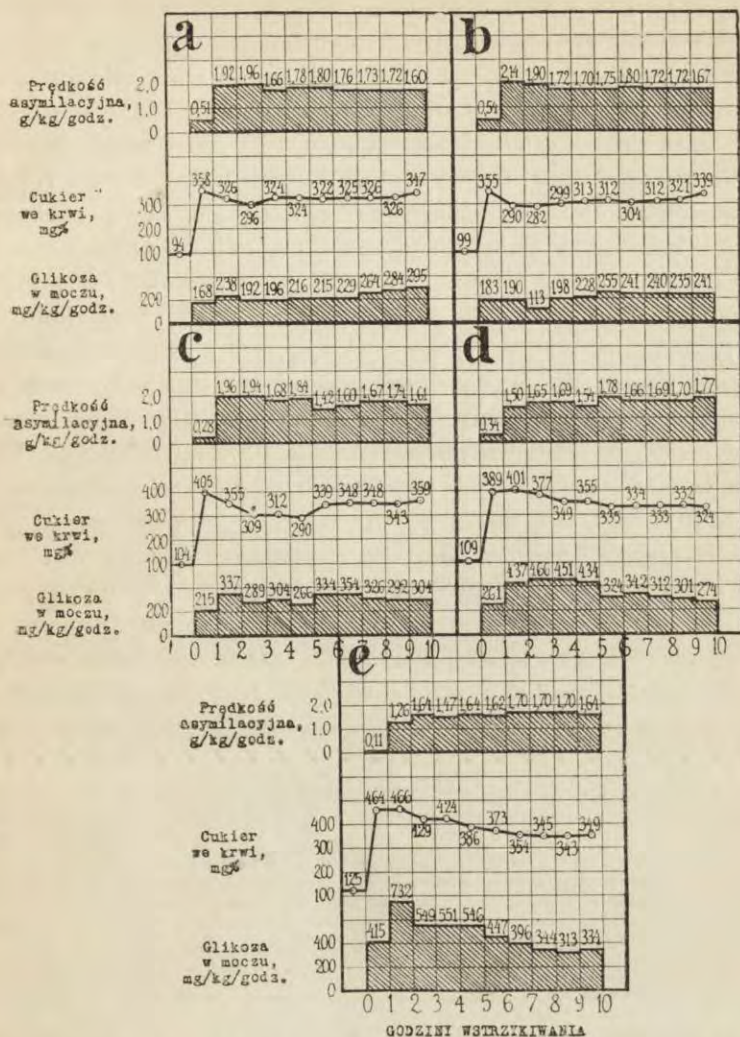
By poddać analizie to tłómaczenie, wykonano na tem samym zwierzęciu zupełnie analogiczne doświadczenie, jak na rys. 15, ale z innym cukrem, który jest przyswajany w podobnych ilościach, co glikoza, a m. z fruktozą (rys. 17). Cukier ten powinienby dawać fazę pierwszą podobnie, jak glikoza, jeżeli ta faza polega na niedość szybkim rozmieszczeniu cukru, wstrzykiwanego dożylnie. Można jednak stwierdzić niezbiecie z rys. 17, że przy żadnej prędkości wprowadzania fruktozy nie ukazuje się faza pierwsza, gdyż przy 0.7-gramowej prędkości krzywa cukru we krwi przebiega płasko od pierwszej chwili wstrzykiwania, wahając między 120 a 133 mg<sup>o</sup>/. Gdy się rozpoczyna wstrzykiwanie z 2-gramową prędkością krzywa cukru we krwi narasta stopniowo do poziomu mniej więcej stałego, który się utrzymuje do końca wstrzykiwania. W szeregu badań z fruktozą, wykonanych przez autora po spożyciu przez zwierzęta rozmaitych djet, okazało się, że fruktoza wprowadzana dożylnie przez długie okresy czasu, posiada taki sam typ krzywej cukru we krwi i fruktozurji, jak galaktoza, składający się z części narastającej i płaskowyzowej. W żadnym poprawnym doświadczeniu nie zauważył autor opadania krzywych cukrowych od raz uzyskanego poziomu płaskowyzowego. Pod wpływem poprzedzającej dawki fruktozy, wprowadzanej z prędkością 0.7 g, przyswajanie tego cukru, wprowadzanego następnie z prędkością 2-gramową, nie poprawiło się (tab. XXIII), gdyż bez poprzedzającej dawki wynosiło średnio 11.5<sup>o</sup>/, a z nią 17.8<sup>o</sup>/.

Tabela XXIII.

Przyswajanie cukrów, wprowadzanych suce Kud. z prędkością 2 g/kg/godz., gdy to wstrzykiwanie poprzedzała dawka 0.7 g/kg/godz., wlewana przez 2 godziny.

*Assimilation des sucres injectés chez la chienne Kud. à vitesse de 2 g/kg/hr. quand cette injection a été précédé par une dose de 0.7 g/kg/hr. introduite pendant 2 heures.*

Kolejna prędkość wstrzykiwania  Vitesse successive d'injection  g/kg/hr.	Glikoza — <i>Glycose</i>		Fruktoza — <i>Fructose</i>	
	Wydalanie z moczem, gdy dawka 0.7 g/kg/godz. <i>Elimination avec l'urine quand la dose est de 0.7 g/kg/hr.</i>		Wydalanie z moczem, gdy dawka 0.7 g/kg/godz. <i>Élimination avec urine quand la dose est de 0.7 g/kg/hr.</i>	
	Poprzedza <i>Précède</i> %	Nie poprzedza <i>Ne précède pas</i> %	Poprzedza <i>Précède</i> %	Nie poprzedza <i>Ne précède pas</i> %
0.7	—	—	5.77	—
2.0	7.89	5.92; 7.12;	17.8	11.8; 12.5; 10.2
3.0	21.7	—	—	—



Rys. 18. Wzwiązku z tab. XXII. Pierwsza faza przy przejściu od diety węglowodanowej do białkowej (a — e) u sukii Izo, na dziecie, pokrywającej w zupełności potrzeby kaloryczne. Por. tab. XXIV.

Fig. 18. En rapport avec tabl. XXII. Phase initiale lors du passage du régime hydrocarboné au régime de protéine (a — e) chez la chienne Izo., le régime fournissant toutes les calories nécessaires. Cf. tab. XXIV.

Ewolucja fazy pierwszej małych rozmiarów w fazę pierwszą dużą. — Nie tak łatwo pogodzić się z tem, że filigranowa faza pierwsza, występująca po pokarmie węgl-

wodanowym, jest tem samem zjawiskiem, co znaczna po białku, lub olbrzymia po głodzie. By to udowodnić wykonano serje doświadczeń, w których przesuвано się stopniowo od djety węglowodanowej, jużto do białka (rys. 18), jużto do głodu (rys. 19).

Jeśli do pokarmu, zawierającego tylko sacharozę, dodawać białka, jeszcze przy 25%-wym dodatku nie widać żadnej różnicy w stosunku do doświadczeń po odżywianiu samą sacharozą (rys. 18ab). Szczyt fazy pierwszej występuje w połowie pierwszej godziny wstrzykiwania i wynosi we krwi około 360 mg<sup>0</sup>/<sub>0</sub>, koniec zaś fazy pierwszej znaczy się we krwi cyfrą około 290 mg<sup>0</sup>/<sub>0</sub>, która się pojawia jużto w 2-giej, jużto w 3-ciej godzinie wstrzykiwania. W obu doświadczeniach występuje to samo na-tężenie przyswajania (tab. XXIV). Mamy tu do czynienia z małą fazą pierwszą. Pod wpływem dodatku 50% białka faza pierwsza zmienia się wyraźnie (rys. 18c): we krwi stężenie cukru wznosi się do 405 mg<sup>0</sup>/<sub>0</sub> w pierwszej godzinie, w moczu zaś w drugiej występuje wartość 337 mg, poczem obie krzywe spadają i dopiero w 5-tej godzinie wartość 290 mg<sup>0</sup>/<sub>0</sub> we krwi zwiastuje koniec fazy pierwszej. Przystawianie zmniejszyło się do 85% (tab. XXIV). Dalsze zmiany w fazie pierwszej wywołał dalszy dodatek białka, razem 75% (rys. 18d). Szczyt fazy pierwszej we krwi zjawił się w 2-giej godzinie wstrzykiwania — 401

Tabela XXIV.

Asymilacja śródżylna glikozy przy przejściu od djety węglowodanowej (sacharoza) do białkowej (mięso) u sukki Izo. Glikozę wprowadzano przez 10 godzin. *Assimilation intraveineuse du glycose lors du passage du régime hydrocarboné (saccharose) au régime de protéine (la viande) chez la chienne Izo. On a introduit du glycose pendant 10 hrs.*

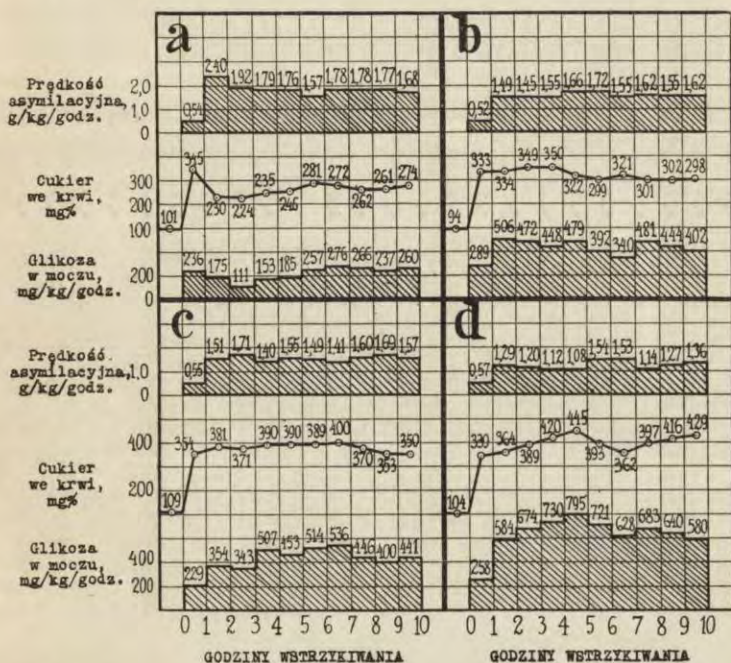
Rysunek Figure	Skład pokarmu <i>Composition du régime</i>		Trwanie djety <i>Durée du régime</i> dni — jours	Wskaźnik odżywczy <i>Indice nutritif</i>	Ilość glikozy <i>Quantité du glycose</i>	
	Węglowodany <i>Hydrocarbonés</i> % kcal	Białko <i>Protéine</i> % kcal			Wydalona <i>Eliminée</i> %	Przystwojona <i>Assimilée</i> %
18a	100	0	5	0.317	11.5	88.5
18b	75	25	4	0.323	10.6	89.4
18c	50	50	4	0.324	15.1	84.9
18d	25	75	4	0.325	18.0	82.0
18e	0	100	4	0.330	23.1	76.9

mg<sup>0</sup>/<sub>0</sub> —, poczem począł cukier we krwi opadać, lecz nawet przy końcu doświadczenia nie osiągnął końca fazy pierwszej. W moczu szczyt płaskowyzu wystąpił w 3-ciej do 4-tej godzinie, sięgając wartości 466 mg, poczem cukromocz opadał aż do końca

doświadczenia, a naogół asymilacja pogorszyła się o dalszych parę procent (tab. XXIV). Wreszcie, gdy podano wyłącznie białko (rys. 18e), w tym samym okresie czasu, w którym występowała mała faza pierwsza na rys. 18a, wystąpiła znaczna faza pierwsza ze stężeniem cukru we krwi 466 mg<sup>o</sup>/<sub>o</sub> i ilością cukromoczu 732 mg w 2-giej godzinie doświadczenia. Ramię opadające nawet na końcu doświadczenia jeszcze było spory kawałek oddalone od osiągnięcia końca fazy pierwszej.

W doświadczeniu tem przyswajanie glikozy osłabło do 76.9%, która to cyfra je legitymuje i stawia je w rzędzie innych po dziecie białkowej, choć tamte (tab. XV) były wykonane po tygodniowem karmieniu białkiem.

Inny sposób przekształcenia pierwszej fazy małej w wielką można spostrzegać na rys. 19. W tych doświadczeniach jedyny pokarm stanowiła sacharoza, podawana w coraz mniejszej ilości,



Rys. 19. Faza pierwsza przy przejściu od diety cukrowej do głodu (a — d) u suki Walk. Szczegóły w tab. XXV.

Fig. 19 Phase initiale pendant le passage du régime sucré au jeûne (a — d) chez la chienne Walk. Les détails dans le tabl. XXV.

by można było śledzić przejście od pełnej diety węglowodanowej do częściowego niedokarmiania węglowodanowego. O ile 50% potrzeb kalorycznych zwierzęcia pokryć sacharozą przez parę dni, nie wywiera to wpływu na typ odczynu — jest on taki, jak po pełnokalorycznej diecie węglowodanowej (rys. 19a, tab. XXV). Jednakowoż gdy dawkę zmniejszyć do 25%-wego pokrycia potrzeb sacharozą, wtedy już po jednodobowym zadzia-  
łaniu zmniejszonej dawki węglowodanów płaskowyż fazy pierwszej we krwi rozrasta się na poziomie płaskowyżu fazy pierwszej, jaka zwykła się zjawiać po diecie węglowodanowej (rys. 19b) — 333 — 350 mg<sup>o</sup>/<sub>o</sub> i trwa przez kilka godzin, równocześnie zaś w moczu pojawiają się wartości, dochodzące do 500 mg. Obie krzywe cukrowe opadają ku końcowi doświadczenia, lecz daleko im do poziomu, który w dośw. na rys. 19a zapowiadał koniec pierwszej fazy, a m. 224 mg<sup>o</sup>/<sub>o</sub> we krwi, zaś 111 mg/kg/godz. w moczu. Jednodniowe niedokarmienie, choćby ten pokarm, który zwierzę dostaje w zmniejszonej ilości, był czystym węglowodanem, upośledza śródżylne przyswajanie glikozy niemal tak, jak to czyni kilka dni pełnokalorycznej diety przeważająco białkowej, a m., 21.3% ilości wstrzykniętej odchodzi nieużyte z moczem (tab. XXV). Trzy dni niedokarmiania węglowodanowego jeszcze

Tabela XXV.

Wpływ postępującego niedokarmiania węglowodanowego (sacharozą) na śródżylną asymilację glikozy, wprowadzanej przez 10 godzin u sukki Walk.  
*Influence d'une sous-alimentation progressive hydrocarbonée (saccharose) sur l'assimilation intraveineuse du glucose qui avait été introduit pendant 10 hrs. chez la chienne Walk.*

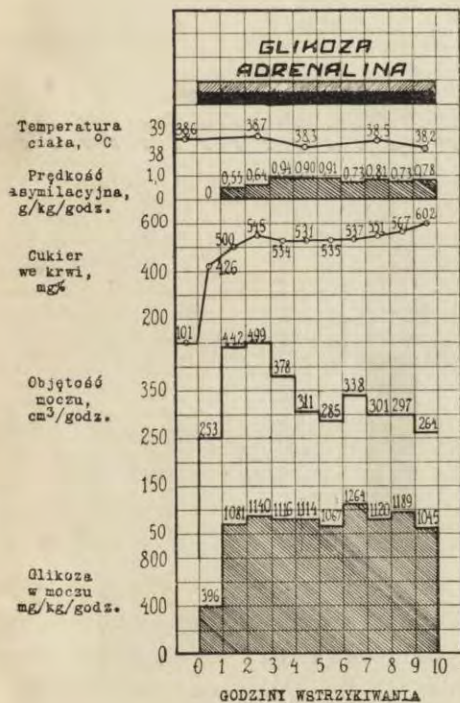
Rysunek <i>Figure</i>	Procent potrzeb kalorycznych zaspokojony sacharozą <i>Pourcentage des besoins caloriques satisfaits par saccharose</i> % kcal	Trwanie diety <i>Durée du régime</i> dni <i>jours</i>	Wskaźnik odżywczy <i>Indice nutritif</i>	Ilość glikozy <i>Quantité de glycose</i>	
				Wydalona z moczem <i>Éliminée avec urine</i> %	Przyswojona <i>Assimilée</i> %
—	100	4	0.300	10.7	89.3
19a	50	4	0.295	10.8	89.2
19b	25	1	0.294	21.3	78.7
19c	25	3	0.292	21.1	78.9
19d	25	5	0.293	31.5	68.5

bardziej rozszerzają płaskowyż fazy pierwszej i we krwi i w moczu, i podnoszą go we krwi do wysokości 390—400 mg<sup>o</sup>/<sub>o</sub> (rys. 19c). Wreszcie po 5 dniach niedokarmiania krzywa cukromoczu przypomina odczyn po diecie tłuszczowej (rys. 19d), całkowita

zaś ilość cukromoczu wynosi 31.5% ilości wstrzykniętej (tab. XXV). Jest widoczne z tej tabeli, że wskaźnik odżywczy w miarę trwania niedokarmiania był coraz niższy.

Czy istnieje różnica między odczynem, występującym przy niedokarmianiu węglowodanowym czystym, a takim, przy którym resztę potrzeb kalorycznych zaspokajamy białkiem? Odpowiedź dają nam rys. 18d w porównaniu z rys. 19c i 19d. Czas trwania karmienia nie był zupełnie jednakowy w obu wypadkach, lecz pośredni wynik między przedstawionym na rys 19c i 19d może być przeciwstawiony rys. 18d, gdyż wtedy wpływ 4 dni karmienia (tab. XXIV) będzie odpowiadał wartościom pośrednim między 3-ma a 5-ma dniami karmienia (tab. XXV). Jeżeli zważyć, że te dwie grupy doświadczeń zostały wykonane na dwu różnych osobnikach, należy stwierdzić, że wybitniejszej różnicy w tych warunkach stwierdzić nie można. Dodatek białka większego znaczenia tu nie posiada.

**Adrenalina.** — Przy wstrzykiwaniu adrenaliny ze zwyczajną prędkością 0.03 mg/kg/godz. okazało się, że odczyn (rys. 20)



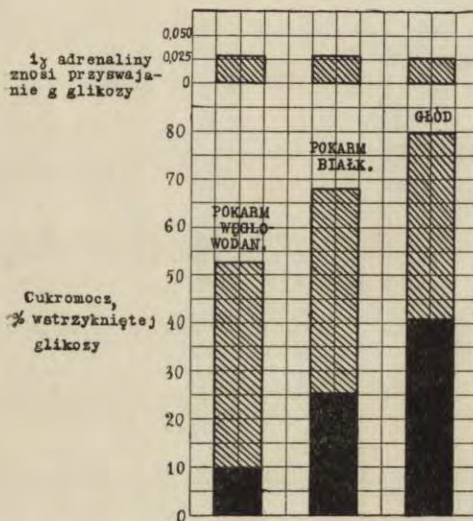
Rys. 20. Wprowadzanie dożylnie glikozy wraz z adrenaliną (0.03 mg/kg/godz.) po tygodniu diety cukrowej u suki Alm. (dośw. 10, wskaźnik odżywczy 0.306).

Fig. 20. Introduction endoveineuse du glucose avec adrénaline (0.03 mg/kg/hr.) après une semaine du régime sucré chez la chienne Alm. (exp. 10; indice nutritif 0.306).



przybrał cechy takie, jakie posiadał na tem samym zwierzęciu w jednym z doświadczeń głodowych (rys. 4), a jednak to zwierzę przez tydzień przed doświadczeniem otrzymywało djetę węglowodanową z przewagą sacharozy. Podnoszenie się krzywej cukru we krwi przy końcu doświadczenia należy prawdopodobnie przypisać zastojowi glikozy, gdyż idzie ono w parze ze zmniejszaniem się cukromoczu. Ilość glikozy wydaloną z moczem osiągnęła w tem doświadczeniu cyfrę 52.7%. Przez dodatek adrenaliny przekształcono odczyn djetę węglowodanowej na odczyn głodowy.

Stała działania adrenaliny.—Jeżeli porównujemy działanie tych samych ilości adrenaliny, dowiezionych na rozmaitych „piętrach“ asymilacyjnych i na rozmaitych płaszczyznach odżywczych cukru gronowego, wychodzi na jaw, że przyrost niedomogi asymilacyjnej pod wpływem adrenaliny jest u tego samego zwierzęcia zawsze mniej więcej tej samej wielkości (tab. XXVI, rys. 21) bez względu na to, czy adrenalina działa po okresie głodu, czy też po rozmaitych djetach. W opisanych warunkach



Rys. 21. Działanie adrenaliny na cukromocz na rozmaitych „piętrach“ asymilacyjnych podczas 10-godzinnej wstrzykiwania glikozy u sukii Alm. Czarne prostokąty — cukromocz bez adrenaliny, kreskowane — przyrost cukromoczu pod wpływem adrenaliny.

Fig. 21. L'action de l'adrénaline sur la glycosurie aux différents „étages“ d'assimilation pendant l'injection intraveineuse de glycose durant 10 hrs. chez la chienne Alm. Rectangles noirs: — glycosurie sans adrénaline, rectangles rayés — l'accroissement de la glycosurie sous l'influence de l'adrénaline.

doświadczalnych przyrost cukromoczu wynosił przeciętnie 41.6% ilości wstrzykniętej, pod wpływem dawki 0.03 mg/kg/godz., a zatem 1  $\gamma$  adrenaliny, wprowadzony do organizmu psa w prze-

ciągu godziny, gdy równocześnie się dowozi glikozę z 2-gra-  
mową prędkością w 10-godzinnych doświadczeniach, upośledza  
przeciętnie przyswajanie 0.0278 g glikozy (tab. XXVI), a zatem  
1 mg adrenaliny upośledza średnio asymilację 27.8 g glikozy.  
Zgodność wskaźnika odżywczego w doświadczeniach bez adre-  
nalin i z nią przyczyniła się wydatnie do ujednostajnienia wy-  
ników tab. XXVI i rys. 21.

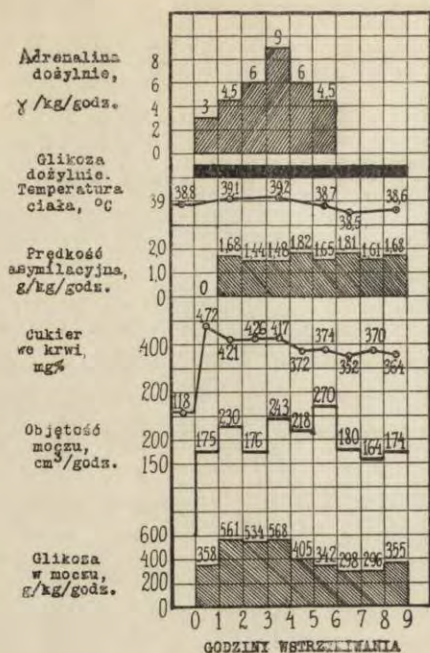
Tabela XXVI.

Tożsamość działania adrenaliny na przyswajanie glikozy w rozmaitych warunkach. Suka Alm  
Por. rys. 21.

*Identité d'action de l'adrénaline sur l'assimilation de glycose dans les conditions différentes.*  
Chienne Alm. Cf. fig. 21.

Warunki <i>Conditions</i>	Bez adrenaliny <i>Sans adrénaline</i>				Z adrenaliną <i>Avec adrénaline</i>				Zmniejszenie przyswajania <i>Diminution d'assimilation</i> %	17 adrenaliny znosi przyswajanie 17 de l'adré- naline annule l'assimilation de g
	Protokół <i>Protocole</i>	Wskaźnik odżywczy <i>Indice nutr.</i>	Ilość glikozy <i>Quant. de glyc.</i>		Protokół <i>Protocole</i>	Wskaźnik odżywczy <i>Indice nutr.</i>	Ilość glikozy <i>Quant. de glyc.</i>			
		Wydal. <i>Elimin.</i> %	Przysw. <i>Assimil.</i> %			Wydal. <i>Elimin.</i> %	Przysw. <i>Assimil.</i> %			
Pokarm węglowod. <i>Régime hydrocarb.</i>	tab. XX	0.305	9.25	90.8	rys. 17	0.306	52.8	47.3	43.4	0.0289
Pokarm białkowy <i>Régime de protéine</i>	tab. XIII	0.312	25.2	74.8	rys. IIa	0.312	68.0	32.0	42.8	0.0286
10 dni głodu <i>10 jours du jeûne</i>	rys. 6a	0.296	40.9	59.1	rys. 8	0.297	79.6	20.4	38.7	0.0258
Średnia <i>Moyenne</i>									41.63	0.0278

Możliwość wywołania wszelkich postaci fazy  
pierwszej przy pomocy stosownego wlewania do-  
żylnego adrenaliny.—Ponieważ z badań COLWELLA i BRIGHTA  
(30) było wiadome, że adrenalina czyto wstrzyknięta w spo-  
sób krótkotrwały podczas stałego, dożylnego wprowadzania gli-  
kozy, czy też wraz z glikozą, wywołuje przyrost cukromoczu  
u kotów uspiionych amytałem, postanowił autor spróbować  
wywołania przy pomocy adrenaliny rozmaitych postaci faz  
pierwszych. To się w zupełności udało. Przykład znajduje się  
na rys. 22. Przekształcono w nim typowy odczyn po djecie cu-  
krowej (rys. 18a) na odczyn, przypominający odczyn, który się  
zjawia po djecie białkowej. Sukę Izo. trzymano przez 5 dni na  
pokarmie czysto cukrowym. Następnie rozpoczęto dożylnie wle-



Rys. 22. Sztuczne wywołanie fazy pierwszej, odpowiadającej około 90% kcal. białkowych, a 10% węglowodanowych (por. rys. 15), dostarczonych w ciągu 4 dni. Aby uzyskać ten obraz wstrzykiwano dożylnie adrenalinę w ilościach zaznaczonych na rysunku.

Fig. 22. Provocation artificielle d'une phase initiale, qui correspond aux 90% kcal. de protéine et 10% des hydrocarbonés (cf. fig. 15). Dans ce but on a injecté l'adrénaline par la voie intraveineuse en quantités notées sur la figure.

wanie glikozy, podczas którego drugą strzykawką, pracującą również przy pomocy silnika elektrycznego, poczęto wlewać roztwór adrenaliny w roztworze fizjologicznym, wbiwszy kanjule adrenaliniową w wężyk gumowy, doprowadzającego glikozę do żyły. Rozpoczęto wlewanie adrenaliny od 3  $\gamma$  na kg/godz., doprowadzono stopniowo do 9 w 4-tej godzinie, poczem powoli zaprzestano przy końcu 6-tej godziny. Odczyn, który wystąpił, może być łatwo sklasyfikowany przy pomocy doświadczeń szeregowych, wykonanych na tym zwierzęciu, i zestawionych na rys. 18. Odczyn z rys 22 przypasęby musiał pośrodku między doświadczeniem d) i e) rysunku 18. Z tem zgadza całkowita ilość cukru wydalonego z moczem, która wynosi 20.5% (bez adrenaliny byłoby 11.5%, a więc również wartość pośrednia między d) i e) (tab. XXIV). Odczyn zatem wypadł, jak gdyby zwierzę przez 4 dni otrzymywało 90% pokrycia kalorycznego w postaci mięsa, a 10% w postaci węglowodanów. Ponieważ przy pomocy dawki 30  $\gamma$  adrenaliny na kg/godz. udało się na innym zwierzęciu uzyskać przejście odczynu węglowodanowego

w odczyn głodowy, jak już zostało przedstawione (rys. 17), można stwierdzić, że adrenaliną można wywołać wszelkie postaci faz pierwszych i że wobec tego dokładnie są znane ilości adrenaliny, któreby miały wydzielać nadnercza, gdyby one były przyczyną występowania pierwszej fazy.

#### 4. Geneza fazy pierwszej.

Zjawiskiem, które w niniejszych badaniach wysuwa się na czoło, jest faza pierwsza. Samo ono zostało zauważone przez szereg badaczy, którzy wstrzykiwali dożylnie glikozę. Dotąd jednak nie zostało zbadane, od czego ono zależy, jakim wpływom podlega i jakie jest jego pochodzenie. Obecne badania są pierwszym szkicem odpowiedzi na te pytania i dotyczą przedewszystkiem fizjologii tego zjawiska, o jego patologii jeszcze prawie nic nie wiadomo. W przyszłości będzie musiało zostać określone stanowisko każdego czynnika, działającego na węglowodanową przemianę materji, wobec fazy pierwszej, która jest zjawiskiem stałym, występującem przy dożylnem wlewaniu glikozy. Cechą charakterystyczną obecnych badań jest, że wpływ szeregu rozmaitych czynników na fazę pierwszą przebadano na tych samych zwierzętach, gdyż w ten sposób zwiększa się uprząwnienie do porównywania ze sobą wyników. Autor przytoczył jedną całkowitą serję badań, wykonanych z glikozą na suce Alm., która wytrzymała 168 godzin wstrzykiwania w 15 wykonanych na niej doświadczeniach, bez żadnego widocznego uszczerbku dla swego zdrowia.

Wielkość fazy pierwszej zależy przedewszystkiem od ilości równoważników cukru gronowego, zawartych w dopływającym z zewnątrz strumieniu pokarmowym. Im bardziej dany pokarm oddala się swemi własnościami cukrotwórczemi od cukru, tem bardziej działanie jego na fazę pierwszą upodabnia się do działania głodu i tem dłużej z wpływem tym, osłabiającym przyswajanie musi walczyć glikoza, wprowadzana *per venam*, aż wreszcie go przełamie i wtedy pojawia się taki typ przyswajania glikozy, jaki następuje po dłuższym karmieniu pokarmem węglowodanowym *per fauces*. Nie zawahamy się nazwać fazę pierwszą występującą po głodzeniu wypadkiem „cukrzyca głodowej“, wykrytej przez HOFMEISTRA, ale wobec tego musimy

uznać w następstwie, że każda faza pierwsza, nawet najdrobniejsza jest załączkiem zjawiska potężnego, objawiającego się po głodzie. Wobec tego możemy stwierdzić z całą pewnością, że nawet w pełni jak najlepszej asymilacji, przy używaniu pokarmu węglowodanowego, organizm prawidłowy kryje w sobie skazę „cukrzycowatą“, która oscyluje pod wpływem zmian w składzie strumienia pokarmowego i pod wpływem braku zupełnego tego strumienia przerodzić się może w głębokie zaburzenie. Nie udało się dotąd autorowi wywołać zupełnego zniknięcia fazy pierwszej przy pomocy czynników djetetycznych. Udaje się to tylko pozornie, gdy poprzedzić wstrzykiwanie glikozy z dwugramową prędkością — wstrzykiwaniem z prędkością niemal 3 razy mniejszą, a m. 0.7-gramową, t. zn. gdy poprzedzić je małą dawką cukru, Okazuje się wtedy jednakowoż, że już ta mała poprzedzająca dawka glikozy spowodowała wyładowanie fazy pierwszej i dlatego przyspieszenie dowozu cukru już jej nie wywołuje.

Upóźnienie przyswajania glikozy, wprowadzonej po dłuższej nieobecności węglowodanów w pokarmie z zewnątrz dochodzącym, jest dobrze znane przy podaniu glikozy wzgl. pokarmu węglowodanowego *per os*, lub dożylnie, lecz w ciągu krótkiego czasu. O ile jednak wtedy możemy badać tylko niejako jeden punkt zaburzenia asymilacyjnego, o tyle przy wlewaniu stałem glikozy możemy je obserwować z godziny na godzinę, mierzyć jego poszczególne okresy, wpływać na każdy z nich i najdowolniej zmieniać, studjując.

Na podstawie badań dawniejszych autora ('26), jak również na podstawie pracy II i III niniejszej serji, a wreszcie badań nowych jeszcze nie ogłoszonych można stwierdzić, że fruktoza, wstrzykiwana w tych warunkach, jak glikoza, fazy pierwszej nie daje. Podobnie nie daje jej galaktoza, co można odnaleźć w niniejszej pracy i co wynika z badań obecnie przez nas wykonywanych. To zjawisko, że pierwsza faza jest swoista dla glikozy, może posłużyć jako argument w poniższem rozumowaniu:

Nawet gdy pierwsza faza jest nieznaczna, nie można jej powstania wytłumaczyć nierównomiernością rozmieszczenia glikozy, któraby się nagromadzała obficie w krwi, nie dochodząc dość szybko do tkanek, ponieważ cukier, który jest przyswajany z tą samą prędkością, co glikoza, a m. fruktoza, nigdy nie wy-

kazuje fazy pierwszej, w tych samych warunkach w jakich ona stale występuje przy wlewaniu glikozy.

Również „odzwyczajanie“ wysepek od wydzielania insuliny, wzgl. osłabienie dokrewnej czynności wydzielniczej trzustki wskutek bezczynności, wywołanej brakiem cząsteczek cukrotwórczych w pożywieniu, nie może być przyczyną występowania fazy pierwszej; tłumaczenie to musi upaść wskutek argumentów, przytoczonych w niniejszej pracy. Jak bowiem działa maksymalna dawka insuliny podczas wlewania glikozy ze stałą prędkością? Działanie jej możemy śledzić w przytoczonych doświadczeniach do końca 5-tej godziny wstrzykiwania cukru gronowego, później nie działa już ilościowo na asymilację glikozy (co nie przesądza kwestji, że działać może na jakość przetwarzania). O ile cała faza pierwsza leży w tych granicach czasowych zasięgu insuliny, wtedy cała faza pierwsza może ulec zmniejszeniu, może nawet do pewnego stopnia zniesieniu przez insulinę (WIERZUCHOWSKI i GADOMSKA '27). Gdy jednak faza pierwsza rośnie, znaczne jej połacie poczynają się wymykać z pod wpływu insuliny, a w przytoczonych wyżej doświadczeniach zdarzyło się, że tylko ramię narastające fazy pierwszej znajdowało się w promieniu działania tego wyciągu trzustkowego, dowożonego z zewnątrz i wskutek tego w czasie jego trwania asymilacja się wzmogła, ale nie więcej pozatem. Dalszy okres fazy pierwszej — jej płaskowyz — pojawił się w pełnej, niepohamowanej postaci i trwał nawet dłużej, niż bez insuliny, czyli przyswajanie w tym okresie uległo pod wpływem insuliny pogorszeniu, a w ten sposób pojawienie się trzeciej części fazy pierwszej — opóźnieniu, — co również musi oznaczać pogorszenie przyswajania, ponieważ pojawienie się części trzeciej fazy pierwszej oznacza polepszenie się przyswajania. W ten sposób na wielkich fazach pierwszych objawiła się bezsiła asymilacyjna insuliny w tych warunkach i wobec tego odpaść musi ta możliwość tłumaczenia genezy fazy pierwszej. Z danych DANNA i CHAMBERSA ('30) wynika, że insulina nie usuwa głodowego upośledzenia utleniania glikozy.

Wobec tego należało przy wyjaśnianiu genezy fazy pierwszej wziąć z kolei pod uwagę adrenalinę — hormon, hamujący przyswajanie glikozy z ogromną siłą, tembardziej, że w fazie pierwszej mamy właśnie do czynienia ze zjawiskiem zahamowania asymilacji. Istotnie na podstawie dotychczasowych naszych

badań nie można wyłączyć roli adrenaliny w genezie fazy pierwszej, adrenaliny — która, wstrzyknięta na rozmaitych piętrach asymilacyjnych, działa nie kapryśnie, lecz w sposób stały i ścisły, tak że 1 mg adrenaliny znosi przyswajanie 27.7 g glikozy, a zatem mogłaby działać przy rozmaitym stanie odżywienia a i przy rozmaitych napięciach asymilacyjnych. Prócz tego posiada ona jeszcze luz działania aż do zupełnego lub prawie zupełnego zniesienia przyswajania. Wymagane tu ilości adrenaliny stoją ściśle w granicach fizjologicznych, a m. żeby przemienić fazę pierwszą węglowodanową na prawie czysto białkową potrzeba na szczycie płaskowyzu fazy pierwszej 0.15  $\gamma$  adrenaliny na kg/min, na szczycie zaś fazy pierwszej głodowej potrzeba 0.5  $\gamma$  na kg/min. w stosunku do węglowodanowej. Należy się oczywiście zastrzec, że mowa tu o przyroście wyrzucania adrenaliny przez nadnercza, a nie o całkowitem, w danej chwili koniecznym, wydzielaniu adrenaliny przez te narządy. Jeżeli zważymy, że przy pracy w bieżni obrotowej oddawanie adrenaliny przebiega z prędkością 1.3 — 2.9  $\gamma$  na kg/min. (HARTMAN i WSPÓLPRAC. '22), a przy bólu z prędkością 3.5  $\gamma$  (CANNON i RAPPORT '21), zrozumiemy, że wprowadzenie do krążenia dawek adrenaliny z jakimi organizm miałby do czynienia podczas wlewania glikozy, przy wyrastaniu rozmaitej wielkości faz pierwszych, nie stanowiłoby dla nadnerczy obciążenia niefizjologicznego, przekraczającego ich wydolność.

Jako pozorna konsekwencja ostatniego tłumaczenia (które usiłujemy rozstrzygnąć doświadczeniami, jakie są obecnie przez nas wykonywane), wysuwa się myśl, że cukier, który nie reaguje na działanie adrenaliny, nie powinienby także oddziaływać na brak węglowodanów w pokarmie i na głód. Takim cukrem okazała się galaktoza, która posiada niektóre cechy wspólne z glikozą, drzewdzewszystkiem bowiem podlega działaniu insuliny, jednakowoż zachowuje się biegunowo przeciwnie w stosunku do glikozy w rozmaitych warunkach pokarmowych i podczas głodu, jak widać z poniższego zestawienia (p. str. 319).

Jednakowoż ostatnie badania nasze, jeszcze nieogłoszone, wskazują na to, że istnieje węglowodan, który w swoisty, subtelny sposób, odmienny od typu pierwszej fazy, reaguje asymilacyjnie na cukrotwórczość pokarmu i na głód, pozostaje natomiast zupełnie obojętny na działanie adrenaliny.

C z y n n i k	Asymilację śródżylną przy 2-gramowej prędkości wstrzykiwania	
	G l i k o z y	G a l a k t o z y
Pełnokalor. pokarm węglowodanowy	wzmaga aż do blisko 100% ilości wstrzykniętej	bez zmian
„ „ białkowy	obniża do 75% ilości wprowadzonej	„ „
„ „ tłuszczowy	zmniejsza do 67% ilości dowieżłonej	„ „
10-dniowy głód	upośledza do 55% ilości wprowadzonej cukru	„ „
Adrenalina 0.5γ /kg/min.	obniża asymilację na każdym z poziomów o średnio 42% w sposób równomierny w ciągu całego czasu wstrzykiwania	„ „
Insulina 5 jedn. /kg/godz.	wzmaga asymilację w ciągu pierwszych pięciu godzin wstrzykiwania, później bez wpływu.	wzmaga asymilację równomiernie przez cały czas wstrzykiwania

Wyrażam niniejszem podziękowanie firmie Schering-Kahlbaum za bezinteresowne dostarczenie insuliny i tyroksyny, jakoteż firmie Sair za także oddanie nam adrenaliny Parke-Davisa, potrzebnej do obecnych badań.

##### 5. Przegląd ważniejszych danych w formie streszczonej.

1°. Gdy spoczywającemu zwierzęciu wprowadzać glikozę dożylnie w sposób stały, organizm przyswaja ten cukier z początku w sposób niedostateczny, później dopiero natężenie asymilacji się wzmacnia. Zjawisko to cechuje się w krzywych cukrowych t. zw. fazą pierwszą: krzywe te z początku narastają, dochodzą do pewnego poziomu i potem opadają wśród silnego spotęgowania asymilacji. Ostatecznym kresem fazy pierwszej jest taki poziom krzywych cukrowych, a zatem i przyswajania, jaki występuje po stale doustnie podawanym pokarmie węglowodanowym. Działanie zatem pokarmu doustnego nie różni się w tym wypadku w swem działaniu od pokarmu dożylnego.

2°. Jeżeli nasilać wielokrotnie wstrzykiwanie glikozy w ciągu jednego doświadczenia, zjawisko fazy pierwszej pojawia się tylko raz — na początku wstrzykiwania, jakkolwiekby wtedy była prędkość dowozu.

3°. Wielomiesięczna, systematyczna i dość nasilona praca mięśniowa nie usuwa w okresie spoczynkowym po wykonaniu pracy najmniej nawet rozwiniętej fazy pierwszej.



4°. Istnienie fazy pierwszej jest związane ze swoistą strukturą chemiczną glikozy, gdyż ani fruktoza, ani galaktoza przy jakiegokolwiek prędkości dowozu nie dają fazy pierwszej. Natomiast przy wstrzykiwaniu glikozy faza pierwsza występuje bardzo wybitnie przy bardzo niskich nawet prędkościach dowozu tego cukru, tak niskich, że po wygaśnięciu fazy pierwszej nie wywołują nawet wyraźniejszego wzniesienia poziomu cukru we krwi ponad poziom spotkany naczeczno.

5°. O ile wprowadzić glikozę śródżylnie w parę godzin po podaniu pokarmu węglowodanowego, faza pierwsza się nie ukazuje. W miarę jednak, jak oddalać chwilę ostatniego podania węglowodanów od chwili wlewania dożylnego glikozy, faza pierwsza się pojawia i trwa godzinę, a wzniesienie jej szczytu w krzywej cukru we krwi wynosi kilkadziesiąt mg<sup>0</sup>/<sub>0</sub> ponad poziom „fazy drugiej“. Im mniej cukrotwórczym staje się pokarm, tem bardziej wzrasta faza pierwsza, aż wreszcie tłuszcz działa niemal jak głód i wtedy faza pierwsza trwa kilkadziesiąt godzin, a stężenie cukru we krwi na jej szczycie przerasta o kilkaset mg<sup>0</sup>/<sub>0</sub> ten poziom, jaki zostanie osiągnięty po przebrzmieniu całego zjawiska.

6°. Wpływ insuliny na przyswajanie śródżylnie glikozy, przy 2-gramowej prędkości wstrzykiwania tego cukru, jest swoisty. Insulina znosi fazę pierwszą, gdy ona jest mała, jednogodzinna; zmniejsza fazę pierwszą, gdy ona trwa kilka godzin; ale gdy faza pierwsza olbrzymieje, insulina potrafi tylko pobudzić asymilację w okresie jej narastania. Jakkolwiek się wprowadza maksymalne dawki insuliny w sposób stały, jednak czynną ona jest zaledwie w ciągu pierwszych pięciu godzin wstrzykiwania glikozy i to w sposób ograniczony. Insulina więc nie wyrównywa niedomogi asymilacyjnej, charakterystycznej dla fazy pierwszej.

7°. W przeciwieństwie do insuliny — hormonu przeważnie pobudzającego przetwarzanie glikozy — działa adrenalina — hormon hamujący — w sposób nadzwyczaj silny, bardzo jednostajny na rozmaitych poziomach asymilacyjnych i odżywczych, i równomierny w ciągu trwania śródżylnego dowozu glikozy. Jedna część wagowa adrenaliny upośledza przyswajanie 28 tysięcy razy większej ilości glikozy, działanie jest więc rzędu akcji enzymatycznych. Wszystkie postaci fazy pierwszej dadzą się wywołać przy pomocy wstrzykiwania takich ilości adrenaliny, które stoją w granicach fizjologicznej wydolności nadnerczy.

8°. Wprost przeciwnie zachowuje się drugi z badanych cukrów — galaktoza — wprowadzany w takich samych warunkach, jak glikoza:

Nie posiada fazy pierwszej i wobec tego krzywe cukrowe w swym przebiegu składają się podczas wstrzykiwania galaktozy z dwu części: narastającej i płaskowyzłowej, która trwa tak długo, jak długo się wstrzykuje. Na natężenie przyswajania tego cukru ani cukrotwórczość pokarmu, ani głód, ani adrenalina, nie posiadają najmniejszego wpływu, przyczem uderza nadzwyczajna stałość asymilacji w rozmaitych warunkach. Nawet w działaniu insuliny na przyswajanie galaktozy, któremu ten cukier podlega, zdaje się istnieć różnica między glikozą a galaktozą: działanie insuliny na przyswajanie galaktozy trwa bez ograniczenia przez cały czas dowozu tego cukru.

#### Piśmiennictwo.

- Bodansky M. 1923. Journ. biol. Chem. 56 (387). Cannon W. B and D. Rapport. 1921, Am. Journ. Physiol. 58 (308). Colwell A. R. and E. M. Bright. 1930. Am. Journ. Physiol. 92 (543, 555). Cowgill G. R. and D. L. Drabkin. 1927. Am. Journ. Physiol. 81 (36). Dann M. and W. H. Chambers. 1930. Journ. biol. Chem. 89 (675). Harding V. J. and O. Morberley. 1930. Journ. biol. Chem. 89 (535). Hartman F. A., Waite and McCormick. 1922. Am. Journ. Physiol. 62 (225). Jordan E. M. 1927. Am. Journ. Physiol. 80 (441). Reinhold J. S. and W. G. Karr. 1927. Journ. biol. Chem. 72 (345). Wierzuchowski M. 1926 Journ. biol. Chem. 68 (631). Wierzuchowski M. 1930. Acta biol. exper. 5 (87, 161). Wierzuchowski M. i H. Gadowska. 1927 Biochem. Zeitschr. 191 (198, 398).





## ARCHIWUM HYDROBIOLOGJI I RYBACTWA.

Tom IV, zeszyty 1—2, 1930 (cena tomu w prenumeracie 10 zł.).

F. SPICZAKOW: Obserwacje i badania nad *Gyrodactylus* i *Dactylogyrus*. — C. KS. STARK: Wioślarki jeziora Bytyńskiego. — J. VIEWEGEROWA: Badania nad mnożeniem się *Colpidium colpoda* w rozmaitych środowiskach. J. WOŁOSZYŃSKA: przyczynek do znajomości fitoplanktonu jezior tropikalnych.

Adres redakcji i administracji: Suwałki, Stacja Hydrobiologiczna na Wigrach (Instytut im. Nenckiego).

---

## FOLIA MORPHOLOGICA.

(Organ Polskiego Towarzystwa Anatomiczno-Zoologicznego).

Tom I, zeszyt 4, 1929.

I. ZWEIBAUM i A. ELENER: Struktury cytoplazmatyczne a aparat Golgi'ego w komórkach hodowanych in vitro. — J. S. ALEXANDROWICZ: Badania nad unerwieniem serca raka. — Bibliografja Polska za rok 1928.

Adres redakcji i administracji: Warszawa, Chałubińskiego 5.

---

## MEDYCYNA DOŚWIADCZALNA I SPOŁECZNA.

Tom XIII, zeszyty 5—6, 1931.

L. HIRSZFELD i R. AMZELÓWNA: O sposobach i technice stwierdzania własności grupowych w plamach krwi i płynach ustroju. — F. GOEBEL: O wzajemnem zachowaniu się cukru i cholesteryny we krwi. — S. SIERAKOWSKI i B. ZABŁOCKI: Ph a odczyny serologiczne w kile. — Z. JUDOWICZÓWNA i H. PIOTROWSKA: Badania porównaweze fermentowania wodoru węgla w t. 37 i 46° przez szczepy jelitowe grupy okrężnicowej. — S. ZYLBERTAL: Aglutynacje kwaśne szczepów S i R. — Z. BOHDANOWICZÓWNA i H. PIOTROWSKA: O bakterjach beztlenowych w wodzie. — J. HANO: Z badań nad farmakologicznemi właściwościami syntetycznej pochodnej lobeliny. — R. KALECKA: O wpływie upustu krwi na poziom cholesteryny we krwi. — F. PRZESMYCKI: Metodyka badań oraz oficjalne przepisy określania wartości surowic leczniczych i produktów bakteryjnych.

Adres redakcji: Warszawa, Chocimska 24.

---



Drukarnia i Litografia  
„JAN COTY”  
w Warszawie, Kapucyńska 7.