

WANDA MEJBAUM-KATZENELLENBOGEN, STANISŁAW KARPIAK,  
BARBARA KOWAL i ELŻBIETA ROMANOWSKA

## W PŁYW ŚRÓDSKÓRNEGO PODANIA HORMONU ADRENOKORTYKOTROPOWEGO NA METABOLIZM LUDZI ZDROWYCH\*)

Z Zakładu Chemii Fizjologicznej Akademii Medycznej we Wrocławiu  
Kierownik: prof. dr T. Baranowski

### I. Wstęp

Adrenokortykotropina (ACTH) po 30 minutowej hydrolizie w rozcieńczonym kwasie solnym staje się prawie dwukrotnie aktywniejsza aniżeli przed hydrolizą. Takie częściowe hydrolizaty ACTH w porównaniu do „pełnych” preparatów stosowane śródskórnym dają efekt leczniczy już w dwudziestokrotnie mniejszych dawkach [1]. Fakt ten ma nie tylko duże praktyczne znaczenie, ale ciekawy jest również ze względu na swój mechanizm.

Celem porównania działania ACTH w zależności od sposobu podania, przebadaliśmy szereg składników krwi u ludzi zdrowych po jednorazowym zastrzyku 2 mg śródskórnym lub 40 mg domięśniowo. Badaliśmy zmiany w składzie krwi w zależności od czasu, jaki upłynął od podania hormonu jak i od warunków doświadczenia. Wykazaliśmy, że zmiany we krwi wywołane jednorazowym podaniem częściowego hydrolizatu ACTH są takie same, bez względu na sposób podania, a uzyskane efekty zależą od warunków doświadczenia, co jest zgodne z zapatrywaniem na znaczenie ACTH w adaptacji ustroju do zmian środowiska.

### II. Metody

1. Częściowy hydrolizat ACTH i jego dawkowanie. Adrenokortykotropinę<sup>1</sup> hydrolizowano w 100°, przez 30 minut w 0,025 N

\*) Praca wykonana z dotacji Komitetu Biochemicznego PAN.

<sup>1</sup> Izołowano z przysadek wieprzowych w naszym Zakładzie wg T. Baranowskiego.

HCl i przechowywano w postaci suchego proszku [1]. Aktywność biologiczną takiego hydrolizatu oznaczano testem Sayersa [17]. Stosowany przez nas preparat zawierał 2,5 międzynarodowych jednostek w miligramie. Nie stwierdzono obecności innych ciał czynnych przedniego i tylnego płata przysadki.

40 mg suchego hydrolizatu ACTH rozpuszczano w 4 ml 5% glikozy (*pro injectione*), sterylizowano przez trzykrotne zagotowanie i wstrzykiwano domięśniowo 4 ml (100 jedn.) lub śródskórnie 0,2 ml (5 jedn.) w dwóch bąbelkach.

2. Warunki doświadczenia. Badania przeprowadzono na ludziach zdrowych, w wieku 20 do 40 lat, pracownikach Zakładu Chemii Fizjologicznej i studentach A.M. we Wrocławiu. Badanych podzielono na dwie grupy: „śniadaniową” i „czczo”. W grupie „śniadaniowej” badani spożywali około 300 ml herbaty, 30 g cukru, 200 g bułki, 50 g masła i 200 g jabłek. Po śniadaniu otrzymywali zastrzyk hydrolizatu ACTH w glikozie śródskórnie lub domięśniowo, względnie dla kontroli śródskórnie zastrzyk 5% glikozy. W grupie czczej badani pozostawali w czasie doświadczenia na czczo i otrzymywali hydrolizat ACTH lub 0,2 ml 5% roztworu glikozy (10 mg glikozy). Badani nie byli informowani o zawartości zastrzyków. W czasie doświadczenia nie wykonywali żadnych czynności połączonych z wysiłkiem fizycznym lub umysłowym.

### 3. Pobieranie krwi.

Przy domięśniowym podawaniu hydrolizatu ACTH pobierano krew z opuszki palca i z żyły dwa razy, na czczo i po 3 godzinach od zastrzyku. Przy śródskórnym podawaniu, krew z palca pobierano na czczo (o godz. 9) i po zastrzyku w odstępach godzinnych — w grupie „śniadaniowej” przez 5 godzin, a w grupie „czczej” przez 3 godziny. Krew z żyły pobierano dwukrotnie: na czczo i w 3 godziny po zastrzyku.

Z opuszki palca pobierano około 1 ml krwi, z żyły 10 ml. Krzepnięcie krwi wstrzymywano heparyną<sup>2</sup> (1 jedn./ml). Natychmiast po pobraniu, część krwi wirowano przez 10 min. przy 2000 obrotach na minutę i oddzielano osocze.

4. Przebadane składniki i stosowane metody analityczne. Krew pobrana z żyły: w pełnej krwi oznaczano glutation manometrycznie metodą gliksylazową [21] (metylogliksal otrzymywano z dwuhydroksyacetonu [14], gliksalazę z drożdży [18], standard glutationu<sup>3</sup> był chromatograficznie jednorodny). W osoczu oznaczano potas poligraficznie [15] oraz fosfatazę zasadową według Bodansky'ego [2].

<sup>2</sup> Otrzymałiśmy od J. Rugego.

<sup>3</sup> Otrzymałiśmy od mgr B. Morawieckiej.



Krew z opuszki palca: w pełnej oznaczano eozynofile według Thor-  
na [20] i cukier kolorymetrycznie [7]. Azot aminowy aminokwasów w oso-  
czu oznaczano kolorymetrycznie kwasem  $\beta$ -naftochinonosulfonowym  
[16], białka metodą taninową [11], globuliny po strąceniu 22%  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  me-  
todą taninową [12], cholesterol kolorymetrycznie [6], cholinesterazę oso-  
cza wg Nachmansohna [13]. Aktywność cholinesterazy wyrażano  
w mg rozłożonej acetylocholinie (firmy la Roche) po 20 minutach, w tem-  
peraturze 37°, w moderatorze dwuwęglanowym o pH 7,4, po przeliczeniu  
na 1 ml osocza.

### III. Wyniki i ich omówienie

#### A. GRUPA „SNIADANIOWA”

#### 1. Do mięśniowe podanie 40 mg częściowego hydrolizatu ACTH

Siedem osób, po pierwszym pobraniu krwi na czczo, otrzymało do-  
mięśniowo po 40 mg częściowego kwaśnego hydrolizatu ACTH i śniada-  
nie o wyżej podanym składzie. W tabelicy 1 przedstawiono średnie ary-  
metyczne z wykonanych oznaczeń wraz z odchyleniem standardowym  
i średnie zmiany stężeń danych składników krwi po 3 godzinach. Obli-  
czony współczynnik „t” podawano w tabeli wyłącznie w przypadkach, gdy  
wyznaczał prawdopodobieństwo ( $P$ ) istotności zmiany stężenia równe lub  
większe od 95% [19]. Statystycznie istotną zmianę stężenia stwierdziliś-  
my tylko dla potasu i aktywności cholinesterazy osocza. Stężenie potasu  
spadało o 2,35  $\text{mg}\%$  ( $t = 3,4$ ;  $P = 98,5\%$ ), aktywność cholinesterazy  
wzrastała o 1,7 jedn. ( $t = 3,6$ ;  $P = 97\%$ ). Prawdopodobieństwo istotności  
zmian stężenia dla pozostałych składników krwi wymienionych w tabli-  
cy 1 jest mniejsze od 95%.

Nie spotkaliśmy w piśmiennictwie danych odnośnie zachowania się  
cholinesterazy osocza po podaniu ACTH. Trudno więc brać obserwowan-  
y przez nas wzrost aktywności tego enzymu za wynik działania ACTH.  
Stwierdziliśmy wprawdzie typową dla działania ACTH obniżkę poziomu  
potasu w surowicy, ale nie znaleźliśmy innych charakterystycznych zmian.  
Na podstawie takiego wyniku doświadczenia można przyjąć, że jednoraz-  
owe podanie 40 mg hydrolizatu ACTH nie wpływa na skład krwi, a zmia-  
na stężenia jest wywołana innymi czynnikami zawartymi w warunkach  
doświadczenia (np. spożycie śniadania). Ale również można przyjąć, że  
zmiana stężenia potasu wynika właśnie z działania ACTH, a brak zmian  
w stężeniu innych składników krwi świadczy o nieodpowiednio dobran-  
ym czasie analizy, lub o niewłaściwych warunkach doświadczenia. Przy

Tablica 1

Skład krwi ludzi zdrowych przed i w 3 godziny po podaniu śniadania i domięśniowym zastrzyku 40 mg częściowego hydrolizatu ACTH

Składniki krwi	n	Średni poziom $\pm \sigma$ po		Różnica poziomów ( $\bar{x}$ ) po 3 godz.
		0	3 godz.	
Potas (mg%)	4	16,4 $\pm$ 1,15	14,0 $\pm$ 1,18	-2,35** (6) (t = 3,4)
N-NH <sub>2</sub> aminokwasów (mg%)	4	5,8 $\pm$ 0,24	5,5 $\pm$ 0,57	-0,3 (6)
Cukier (mg%)	6	75,0 $\pm$ 8,3	74,0 $\pm$ 2,0	-1,0 (6)
Białko całkowite (g/100 ml)	7	7,9 $\pm$ 1,0	7,9 $\pm$ 0,8	0,0 (12)
Albuminy (g/100 ml)	7	5,7 $\pm$ 0,56	5,4 $\pm$ 0,9	-0,3 (12)
Globuliny (g/100 ml)	7	2,2 $\pm$ 1,13	2,5 $\pm$ 0,64	+0,3 (12)
Cholinesteraza osocza (jed. aktyw./1 ml)	3	5,1 $\pm$ 0,6	6,8 $\pm$ 0,5	+1,7* (4) (t = 3,6)
Fosfataza zasadowa (jed. Bodansky'ego)	5	3,7 $\pm$ 1,9	4,2 $\pm$ 2,14	0,5 (8)
Cholesterol (mg%)	7	132,0 $\pm$ 25	124,0 $\pm$ 25	-7,3 (12)
Glutation (mg%)	5	24,2 $\pm$ 8,8	15,8 $\pm$ 5,8	-8,3 (8)

Cyfry w nawiasach podają stopnie swobody i współczynnik „t”, który podano wyłącznie w przypadkach, gdy prawdopodobieństwo istotności różnicy (P) jest równe lub większe od 95%. \*) 95%  $\leq$  P < 98%; \*\*) 98%  $\leq$  P < 99%; \*\*\*) 90%  $\leq$  P.

n = liczebność grup

$\sigma = \pm \sqrt{\frac{\sum(a - A)^2}{(n - 1)}}$  = odchylenie standardowe; a = pojedynczy pomiar, A = średnia arytmetyczna

$\bar{x}$  = średnia różnica pomiarów po 3 godzinach

$t = \bar{x} \sqrt{\frac{n(n - 1)}{\sum(a - A)^2}}$  = współczynnik braku istotnej różnicy dla grup o równej liczebności

tej drugiej możliwości zarówno spadek stężenia potasu jak i brak zmian w innych składnikach krwi mogą służyć do porównania działania ACTH w zależności od sposobu podania.

Dla ustalenia, która z dwóch wymienionych ewentualności ma miejsce, zmieniliśmy postępowanie w dalszej części naszej pracy wprowadzając grupy kontrolne, tzn. nie otrzymujące ACTH, oraz oznaczanie w okresach wcześniejszych i późniejszych niż 3 godziny. Interpretację wyników oparliśmy na różnicach stężeń pomiędzy grupą właściwą a kontrolną.

## 2. Śródskórne podanie 2 mg hydrolizatu ACTH

Po śródskórnym podaniu hydrolizatu ACTH oznaczaliśmy potas po 3 godzinach, zaś inne składniki co godzinę przez 5 godzin. Ze związków, których stężenie według znanych efektów działania ACTH powinno się



Tablica 2

Wpływ śródskórnego podania 2 mg częściowego hydrolizatu ACTH na poziom składników krwi ludzi zdrowych po śniadaniu i na czczo

P o ś n i a d a n i u							N a c z c z o					
	n	średni poziom początkowy $\pm \sigma$	średnia zmiana stężenia $\pm \sigma$ po upływie godzin					n	średni poziom początkowy $\pm \sigma$	średnia zmiana stężenia $\pm \sigma$ po upływie godzin		
			1	2	3	4	5			1	2	3

N—NH<sub>2</sub> a m i n o k w a s ó w: mg w 100 ml o s o c z a

kontrola bez ACTH	5	6,26 ± 0,75	+ 1,5 ± 0,22	+ 1,5 ± 3,0	- 0,94 ± 0,97	- 0,18 ± 1,7	0,0 ± 1,8	3	5,9 ± 0,6	- 0,10 ± 0,17	- 0,30 ± 0,36	- 0,35 ± 0,37
po ACTH	6	5,70 ± 1,90	- 0,05 ± 0,60	+ 0,08 ± 0,90	+ 0,25 ± 1,60	+ 1,40 ± 1,55	- 0,7 ± 0,8	13	5,7 ± 1,3	- 0,64 ± 0,33	- 0,80 ± 0,33	- 1,0 ± 0,40
Różnica zmian stężenia pomiędzy grupami: ACTH i kontrola			- 1,55***)	- 1,42	+ 1,14	+ 1,58	- 0,7			- 0,54**)	- 0,50*)	- 0,65**)
			(11; t = 5,4)	(11)	(11)	(11)	(11)			(14; t = 2,6)	(14; t = 2,45)	(14; t = 2,8)

B i a ł k o c a ł k o w i t e: g w 100 ml o s o c z a

kontrola bez ACTH	4	7,4 ± 0,24	+ 0,90 ± 1,1	- 0,12 ± 0,53	+ 0,55 ± 0,95	+ 0,45 ± 0,13	0,0 ± 0,89	4	6,35 ± 0,95	0,0 ± 0,7	+ 0,15 ± 0,20	0,0 ± 0,24
po ACTH	4	6,8 ± 1,48	- 0,4 ± 1,12	+ 0,20 ± 1,48	- 0,10 ± 1,1	+ 0,20 ± 0,84	- 0,1 ± 1,0	4	6,30 ± 0,57	+ 0,90 ± 0,25	+ 0,75 ± 0,50	+ 0,90 ± 0,83
Różnica zmian stężenia pomiędzy grupami: ACTH i kontrola			- 1,3***)	+ 0,32	- 0,65	- 0,25	- 0,10			+ 0,90*)	+ 0,60	+ 0,90
			(6; t = 5,2)	(6)	(6)	(6)	(6)			(6; t = 2,45)	(6)	(6)

A l b u m i n y: g w 100 ml o s o c z a

kontrola bez ACTH	4	5,4	- 0,30 ± 0,14	- 1,30 ± 1,3	- 1,40 ± 0,64	- 1,1 ± 0,14	- 1,0 ± 1,2	4	4,7 ± 0,24	- 0,10 ± 0,20	+ 0,10 ± 0,14	+ 0,10 ± 0,10
po ACTH	4	4,7	- 0,40 ± 0,8	- 0,10 ± 1,0	- 0,3 ± 1,1	- 0,1 ± 0,8	- 0,3 ± 1,1	4	4,4 ± 0,7	0,0 ± 0,50	- 0,10 ± 0,50	- 0,10 ± 0,75
Różnica zmian stężenia pomiędzy grupami: ACTH i kontrola			- 0,1	+ 1,2	+ 1,1	+ 1,0*)	+ 0,7			+ 0,10	- 0,20	- 0,20
			(6)	(6)	(6)	(6; t = 2,4)	(6)			(6)	(6)	(6)

G l o b u l i n y: g w 100 ml o s o c z a

kontrola bez ACTH	4	1,7	+ 1,1 ± 0,13	+ 1,1 ± 0,7	+ 2,0 ± 0,9	+ 1,2 ± 0,28	- 1,0 ± 1,13	4	1,6	+ 0,05 ± 0,07	+ 0,10 ± 0,14	+ 0,10 ± 0,14
po ACTH	4	1,7	0,0 ± 0,48	+ 0,1 ± 0,7	+ 0,26 ± 0,46	+ 0,40 ± 0,17	+ 0,25 ± 0,73	4	1,6	+ 0,90 ± 1,26	+ 0,70 ± 0,46	+ 1,10 ± 0,89
Różnica zmian stężenia pomiędzy grupami: ACTH i kontrola			- 1,1***)	- 1,0	- 1,8**)	- 0,8*)	+ 0,75			+ 0,85	+ 0,60*)	+ 0,90
			(6; t = 4,3)	(6)	(6; t = 3,6)	(6; t = 2,44)	(6)			(6)	(6; t = 2,7)	(6)

C u k i e r: mg w 100 ml p e ł n e j k r w i

kontrola bez ACTH	4	80 ± 14	+ 22,7 ± 11	+ 26,5 ± 33	+ 14,5 ± 35	+ 1,5 ± 27,0	- 0,5 ± 1,0	4	66 ± 10	- 9,0 ± 10,0	- 9,0 ± 10,0	- 10 ± 18
po ACTH	4	73 ± 10	+ 26 ± 14	+ 17,5 ± 7,0	+ 2,8 ± 22	+ 10 ± 20	+ 4,5 ± 17	4	73 ± 20	+ 11 ± 13	+ 3 ± 2,8	- 1 ± 10
Różnica zmian stężenia pomiędzy grupami: ACTH i kontrola			+ 3	+ 9	- 11,5	+ 8,5	+ 5			+ 20*)	+ 12	+ 9
			(6)	(6)	(6)	(6)	(6)			(6; t = 2,4)	(6)	(6)

C h o l i n e s t e r a z a w j e d n. a k t y w n o ś c i n a 1 m l o s o c z a

kontrola bez ACTH	4	4,9 ± 0,38	- 0,10 ± 0,81	- 0,50 ± 1,3	- 0,60 ± 0,68	- 0,30 ± 0,75	- 0,30 ± 1,18	4	4,4 ± 0,12	- 0,30 ± 0,7	- 0,30 ± 0,75	- 1,0 ± 0,83
po ACTH	5	4,4 ± 0,64	+ 0,50 ± 0,24	+ 0,30 ± 0,47	- 0,5 ± 0,86	- 0,10 ± 0,98	+ 0,50 ± 0,49	9	3,6 ± 0,93	+ 0,10 ± 0,22	+ 0,30 ± 0,30	- 0,10 ± 0,12
Różnica zmian stężenia pomiędzy grupami: ACTH i kontrola			+ 0,60	+ 0,80	+ 0,1	+ 0,20	+ 0,8			+ 0,40	+ 0,60	+ 0,90*)
			(7)	(7)	(7)	(7)	(7)			(11)	(11)	(11; t = 3,4)

E o z y n o f i l e: % c i a ł e k b i a ł y c h

kontrola bez ACTH	5	2,2 ± 0,7	- 1,0 ± 0,7	- 0,7 ± 0,7	- 0,5 ± 1,1	- 0,4 ± 0,8	- 0,4 ± 0,7	3	3,0 ± 0,0	+ 0,3 ± 0,8	+ 0,3 ± 0,50	+ 0,3 ± 0,5
po ACTH	6	2,7 ± 1,0	- 0,05 ± 0,7	- 0,9 ± 0,9	- 0,8 ± 0,6	- 0,10 ± 0,8	- 0,2 ± 0,8	10	2,8 ± 0,9	- 0,2 ± 0,4	0,0 ± 0,40	- 0,5 ± 0,6
Różnica zmian stężenia pomiędzy grupami: ACTH i kontrola			+ 0,95*)	- 0,2	- 0,3	+ 0,3	+ 0,2			- 0,5	- 0,3	- 0,8
			(9; t = 2,33)	(9)	(9)	(9)	(9)			(11)	(11)	(11)

P o t a s: mg w 100 ml o s o c z a

kontrola bez ACTH	6	17,8 ± 0,96			0,0 ± 0,43			6	17,1 ± 1,15			+ 0,7 ± 0,97
po ACTH	5	17,8 ± 0,80			- 1,6 ± 0,80			8	18,36 ± 1,7			- 0,84 ± 0,60
Różnica zmian stężenia pomiędzy grupami: ACTH i kontrola					- 1,6***)							- 1,54***)
					(9; t = 4,0)							(14; t = 3,7)

Opis jak w tabl. 1, z tym że:

$$t = \bar{x} \sqrt{\frac{(n_1 \cdot n_2) \cdot (n_1 + n_2 - 2)}{(n_1 + n_2) \cdot \Sigma(a - A)^2}} = \text{współczynnik braku istotnej różnicy dla grup o różnej liczebności,}$$

$\bar{x}$  = średnia różnica zmian stężenia pomiędzy grupami: „ACTH” i „kontrola”



zmienić, a nie zmieniało się po jednorazowym wprowadzeniu hormonu domięśniowo, wybraliśmy do oznaczania białka osocza; aminokwasy i cukier. Zachowaliśmy oznaczanie aktywności cholinesterazy i ponadto badaliśmy jeszcze zmiany w stężeniu eozynofili, pomimo kwestionowanego przez nas [4] jak innych autorów [3] znaczenia testu Thorna w ocenianiu wydolności kory nadnerczy.

W tabelicy 2 zestawiono wyniki oznaczeń przeprowadzonych po śródskórnym podaniu hydrolizatu ACTH, lub samej glikozy (doświadczenia kontrolne) w zależności od czasu i warunków doświadczenia. W tabelicy podano dla danego składnika krwi średni poziom początkowy wraz z odchyleniem standardowym, średnie zmiany stężenia (wzrost lub spadek) wraz z odchyleniem standardowym, w kolejnych godzinach upływających od wykonania zastrzyku. Po każdej godzinie obliczano różnicę zmian stężenia pomiędzy grupą otrzymującą ACTH i kontrolną. Współczynnik  $t$  podano podobnie jak w tabelicy 1, w przypadkach, gdy wyznaczał prawdopodobieństwo istotności różnicy zmian równe lub większe od 95% [19].

W lewej połowie tabelicy 2 w kolumnach poziomych oznaczonych jako „kontrola bez ACTH” przedstawiono wyniki uzyskane po podaniu śniadania i śródskórnym glikozy. Jak widać, znacznym wahaniami ulega stężenie aminokwasów, białka całkowitego osocza, globulin, albumin, cukru, cholinesterazy i eozynofili. Po 3 godzinach stężenie wszystkich badanych składników krwi z wyjątkiem potasu wyraźnie odbiega od poziomu początkowego.

Po podaniu ACTH przebieg zmian w czasie dla poszczególnych składników krwi jest wyraźnie odmienny niż w kontroli (tabl. 2, kolumny poziome oznaczone „po ACTH”). Zmiany poziomów składników krwi stwierdzone w kontroli, po podaniu ACTH cofają się całkowicie lub częściowo, z wyjątkiem cukru i cholinesterazy osocza. Okres trwania tego efektu jest różny dla poszczególnych związków. Stężenie aminokwasów przez 3 godziny utrzymuje się na poziomie początkowym, po 4 godzinie wzrasta, a w 5 spada poniżej poziomu początkowego. Stężenie białek krwi do 5 godzin nie zmienia się. Eozynopenia rozpoczyna się dopiero w drugiej godzinie. W przeciwieństwie do zachowania się białek, aminokwasów i eozynofili, poziom potasu, który w kontroli nie zmieniał się, po podaniu ACTH spada o 1,6 mg%.

Przy porównaniu grupy właściwej, tzn. otrzymującej ACTH z grupą kontrolną, widać różnice — statystycznie istotne — występujące po różnych czasach dla aminokwasów, białka całkowitego, albumin, globulin, eozynofili i potasu (tabl. 2, kolumny poziome oznaczone „Różnica zmian stężenia między grupami”). Tylko dla cukru i cholinesterazy osocza nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic. Kolejność występowania różnic między grupami przedstawia się następująco: po pierwszej godzinie



dla aminokwasów 1,5 mg<sup>0</sup>/o ( $t=5,4$ ;  $P=99\%$ ), dla białka całkowitego 1,3<sup>0</sup>/o ( $t=5,2$ ;  $P>99\%$ ), dla globulin 1,1<sup>0</sup>/o ( $t=4,3$ ;  $P>99\%$ ). Różnice te są wysoce istotne. Po drugiej godzinie różnice dla wszystkich badanych składników krwi są nieistotne statystycznie. Po trzeciej godzinie różnica dla potasu wynosi 1,6 mg<sup>0</sup>/o ( $t=4,0$ ;  $P>99\%$ ), dla globulin 1,8<sup>0</sup>/o ( $t=3,6$ ;  $P=99\%$ ). W czwartej godzinie różnica dla globulin wynosi 0,8<sup>0</sup>/o ( $t=2,4$ ;  $P=95\%$ ) i dla albumin 1,0<sup>0</sup>/o ( $t=2,4$ ;  $P=95\%$ ).

Na podstawie istotności różnic występujących pomiędzy grupą właściwą i kontrolną przebadane składniki krwi można podzielić na reagujące na podanie ACTH i na niereagujące. Do składników krwi reagujących na podanie ACTH należy potas, którego stężenie zmienia się w grupie właściwej a nie zmienia w kontroli, oraz białka osocza, albuminy, globuliny, eozynofile i aminokwasy, które chociaż po podaniu ACTH nie wykazują zmian, ale zmieniają się w kontroli. Do składników krwi nie reagujących na ACTH należy cukier i cholinesteraza osocza, ponieważ ich stężenia zmieniają się w grupie właściwej i w kontroli.

Po przeprowadzonej w ten sposób analizie zachowania się składników krwi w grupie „śniadaniowej” po jednorazowym podaniu śródskórnie 2 mg częściowego kwaśnego hydrolizatu ACTH, można twierdzić, że zarówno zmiana stężenia potasu jak i brak zmian w stężeniu aminokwasów, białek krwi i eozynofili wynika z działania ACTH, a nie z warunków doświadczenia (podanie śniadania, śródskórny zastrzyk glikozy). Ponadto wykazaliśmy, że sztywny czas trzech godzin nie jest optymalnym okresem dla wykazania efektu działania ACTH, ponieważ już po godzinie występują istotne różnice w stężeniu niektórych badanych składników krwi w grupie właściwej i kontrolnej.

### 3. Porównanie wyników po domięśniowym i śródskórnym podaniu hydrolizatu ACTH

Po upływie 3 godzin od śródskórnego podania ACTH i śniadania nie występują istotne zmiany stężenia cholinesterazy osocza, białka całkowitego, albumin, globulin, cukru i eozynofili; jedynie istotnie spada stężenie potasu z 17,8 mg<sup>0</sup>/o na 16,2 mg<sup>0</sup>/o  $\pm$  0,8. Zmiana stężenia wynosi 1,6 mg<sup>0</sup>/o ( $t=2,48$ ;  $P=96\%$ ). Wprowadziliśmy oznaczanie zmienności składników krwi po różnych czasach, podejrzewając, że statystycznie istotne zmiany stężenia mogą występować dla wymienionych składników krwi w innych czasach. I tak stwierdziliśmy, że dla cukru istotna zmiana stężenia występuje tylko w pierwszej godzinie, z 73 na 99 mg<sup>0</sup>/o  $\pm$  13. Zmiana stężenia wynosi 26 mg<sup>0</sup>/o ( $t=3,2$ ;  $P=98\%$ ), wywołana jest jednak podaniem śniadania. Zaś stężenie eozynofili zmienia się w drugiej godzinie i spada z 2,7<sup>0</sup>/o na 1,7<sup>0</sup>/o  $\pm$  0,4; zmiana stężenia wynosi 1<sup>0</sup>/o ( $t=2,2$ ;  $P=95\%$ ) i wywołana jest również podaniem śniadania.

Porównując zatem wyniki otrzymane po domięśniowym podaniu 40 mg ACTH (tabl. 1) z danymi otrzymanymi po podaniu zaledwie 2 mg tego samego hydrolizatu ACTH śródskórnie (tabl. 2: grupa „śniadaniowa” po ACTH, czas 3 godziny) widać, że w obu przypadkach istotnie spada stężenie potasu i nie występują zmiany w stężeniu cukru, aminokwasów, białka całkowitego, albumin i globulin. W odróżnieniu jednak do grupy otrzymującej hydrolizat ACTH domięśniowo, po podaniu śródskórnym nie stwierdza się wzrostu aktywności cholinesterazy osocza. Przeprowadzona poprzednio analiza różnic pomiędzy grupą otrzymującą ACTH śródskórnie a odpowiednią kontrolą rozstrzygnęła wątpliwości odnośnie tak wpływu śniadania jak i czasu pobierania krwi na uzyskane efekty działania ACTH.

Ponieważ wyniki uzyskane u ludzi zdrowych po podaniu domięśniowo lub śródskórnie różnych dawek tego samego częściowego kwaśnego hydrolizatu ACTH, w jednakowych czasach (3 godziny) są równorzędne, to można przyjąć, że w obu przypadkach uzyskany efekt biologiczny jest taki sam, pomimo dużej różnicy wysokości dawek. Oznacza to, że przez podanie drogą śródskórną zyskuje się około dwudziestokrotnie na aktywności hormonu.

#### B. GRUPA „CZCZO”

Po wykazaniu w grupie „śniadaniowej”, że efekt działania hydrolizatu ACTH zależy od warunków doświadczenia (jak śniadanie, glikoza śródskórnie), wpływających na zmienność składników krwi, należało przekonać się, czy w warunkach zapewniających ich niezmienną wystąpi efekt działania ACTH i jaki będzie jego charakter. Szczególnie ciekawym pod tym kątem widzenia będzie zachowanie się aminokwasów, cukru, eozynofili, białek i cholinesterazy, gdyż te składniki krwi w grupie kontrolnej „śniadaniowej” odznaczały się dużą labilnością stężeń i przeważnie reagowały na podanie ACTH stabilizacją poziomu początkowego.

W drugiej (prawej) części tablicy 2 przedstawiliśmy wyniki uzyskane po podaniu śródskórnym hydrolizatu ACTH w glikozie lub samej glikozy ludziom zdrowym pozostającym w czasie doświadczenia na czczo. Podanie śródskórne glikozy (grupa kontrolna) nie wpływa do 3 godzin na stężenie białek, aminokwasów, cukru i eozynofili. Dopiero w 3 godzinie uzyskano wzrost stężenia potasu o 0,7 mg<sup>0/0</sup>, ale statystycznie nieistotny. Równocześnie spada aktywność cholinesterazy osocza, i to statystycznie istotnie, z poziomu początkowego wynoszącego 4,4 jedn. na 3,4 jedn.  $\pm \pm 0,75$ . Spadek aktywności wynosi zatem 1,0 jedn. przy czym  $t = 2,86$  a  $P = 97\%$ .

Podanie hydrolizatu ACTH na czczo zmienia stężenie aminokwasów białka całkowitego, globulin, cukru i potasu, nie wpływa natomiast na



stężenie albumin, eozynofili i cholinesterazy osocza. Podobnie, jak w grupach „śniadaniowych” podanie ACTH wywołuje spadek stężenia potasu. W odróżnieniu jednak od grup „śniadaniowych” w tej grupie spada również stężenie N-NH<sub>2</sub> aminokwasów o 1 mg<sup>0</sup>/<sub>0</sub> ( $t = 2,45$ ;  $P = 98^0/0$ ) z poziomu początkowego wynoszącego 5,7 mg<sup>0</sup>/<sub>0</sub> do 4,7 mg<sup>0</sup>/<sub>0</sub> ± 0,75.

W doświadczeniach na czczo porównanie zachowania się poszczególnych składników krwi grupy właściwej z grupą kontrolną wykazuje, że statystycznie istotne różnice zmian stężeń występują w różnych czasach w następującej kolejności: po pierwszej godzinie różnica dla N-NH<sub>2</sub> aminokwasów wynosi 0,54 mg<sup>0</sup>/<sub>0</sub> ( $t = 2,6$ ;  $P = 98^0/0$ ), dla cukru 20 mg<sup>0</sup>/<sub>0</sub> ( $t = 2,4$ ;  $P = 95^0/0$ ), dla białka całkowitego 0,9<sup>0</sup>/<sub>0</sub> ( $t = 2,4$ ;  $P = 95^0/0$ ). W drugiej godzinie różnica dla N-NH<sub>2</sub> aminokwasów wynosi nadal 0,5 mg<sup>0</sup>/<sub>0</sub> ( $t = 2,45$ ;  $P = 97^0/0$ ), dla globulin 0,6<sup>0</sup>/<sub>0</sub> ( $t = 2,7$ ;  $P = 97^0/0$ ). W trzeciej godzinie dla N-NH<sub>2</sub> aminokwasów różnica wynosi 0,65 mg<sup>0</sup>/<sub>0</sub> ( $t = 2,8$ ;  $P = 98,7^0/0$ ), dla potasu 1,5 mg<sup>0</sup>/<sub>0</sub> ( $t = 3,7$ ;  $P > 99^0/0$ ) i dla cholinesterazy osocza 0,9 jedn. ( $t = 3,4$ ;  $P > 99^0/0$ ). Tylko dla albumin i eozynofili w wymienionych czasach istotne różnice pomiędzy grupami nie występują (tabl. 2).

Na podstawie tych wyników przebadane składniki krwi u osób pozostających na czczo można również podzielić na reagujące i niereagujące na podanie ACTH. Reagują zmianą aminokwasów, białko całkowite, globuliny, cukier i potas, natomiast cholinesteraza osocza reaguje cofnięciem zmian, które występują w kontroli. Nie reagują na podanie ACTH albuminy i eozynofile, przy czym zmiany nie występują ani w grupie właściwej ani kontrolnej.

#### C. PORÓWNANIE DZIAŁANIA HYDROLIZATU ACTH W GRUPIE „ŚNIADANIOWEJ” I „CZCZEJ”

Porównanie zachowania się składników krwi po podaniu ACTH w zależności od tego czy podano go wraz ze śniadaniem czy też na czczo wskazuje na to, że efekt i zakres działania ACTH zależy od warunków doświadczenia. W przypadkach, gdy warunki doświadczenia zapewniają niezmiennosć stężenia danego składnika krwi, po podaniu ACTH może wystąpić aktualna zmiana jego stężenia, zaś w warunkach, które już same przez się powodują zmianę stężenia, działanie ACTH może sprowadzić się do zahamowania wpływu takich czynników ubocznych, jak śniadanie lub glikoza śródskórnica; zaznacza się to wtedy całkowitym lub częściowym cofnięciem zmiany po podaniu ACTH. Zakres działania ACTH w grupie „śniadaniowej” i „czczej” jest odmienny, gdyż występują różnice w zachowaniu się poszczególnych składników krwi w obu grupach. W obu grupach działają jednak takie same mechanizmy powodujące, że pod wpływem ACTH występuje albo aktualna zmiana poziomu dla pewnych

składników krwi, albo też brak zmian aktualnych przy składnikach labilnych w kontroli.

W grupie „śniadaniowej“ z badanych składników krwi aktualna zmiana dotyczy jedyne go stabilnego w kontroli składnika, a mianowicie potasu, natomiast utrzymanie stężenia na poziomie początkowym obejmuje, ze składników labilnych w kontroli, aminokwasy, białko całkowite, albuminy, globuliny i eozynofile, a nie odnosi się do cukru i cholinesterazy. W grupie „czczej“ aktualna zmiana poziomu ze składników stabilnych w kontroli dotyczy nie tylko potasu, ale również aminokwasów, białka całkowitego, globulin i cukru, nie obejmuje zaś albumin i eozynofili, natomiast utrzymanie stężenia na poziomie początkowym ogranicza się do jedyne go labilnego w kontroli składnika krwi, a mianowicie do cholinesterazy.

W obu grupach 3-godzinny okres działania ACTH nie jest optymalnym dla uchwycenia wszystkich efektów działania ACTH. Istotne różnice najczęściej występują po pierwszej godzinie. Szybkość występowania zmian i ich krótkotrwałość nie jest wywołana przemianami działania ACTH, gdyż odpowiedź ze strony różnych składników krwi mieści się w przedziale czasowym od 1—4 godzin.

W doświadczeniach naszych potwierdziliśmy wielostronność działania częściowych hydrolizatów ACTH, występującą już po jednorazowym podaniu preparatu tak śródskórnie jak i domięśniowo, znajdując niezależnie od warunków doświadczenia spadek poziomu potasu, a jedynie w grupie „czczej“ wzrost poziomu cukru (po 1 godz.), białka całkowitego (po 1 godz.), globulin (po 2 godz.) i spadek poziomu aminokwasów (po 1, 2 i 3 godzinie).

#### IV. Dyskusja

Dobrze znana jest wielostronność działania ACTH wyrażająca się poprzez hormony kory nadnercza wpływem na liczne składniki krwi, jak również jego ogólnie biologiczne znaczenie w dostosowywaniu się organizmów zwierzęcych do zmian środowiska. Badając zachowanie się składników krwi w różnych warunkach eksperymentalnych, po jednorazowym podaniu ACTH tak domięśniowo jak i śródskórnie, wykazaliśmy występowanie obu tych efektów. Wielostronność działania ACTH można wykazać tylko w warunkach zapewniających niezmiennosc danych składników krwi, a udział jego w procesach adaptacyjnych tylko w warunkach wywołujących zmienność stężenia składników krwi.

W pierwszym przypadku mamy do czynienia z działaniem stymulującym, gdyż ACTH wywołuje aktualną zmianę, w drugim z działaniem stabilizującym, gdyż nie dopuszcza do wystąpienia aktualnej zmiany, której przyczyna znajduje się poza sferą działania ACTH. Ten sposób



działania ACTH można wykazać u ludzi zdrowych jedynie przez porównanie z odpowiednią grupą kontrolną, w której działają takie same czynniki dodatkowe, jak w grupie poddanej działaniu ACTH. Działanie stabilizujące jest szersze, gdyż daje się wykazać dla takich składników krwi, dla których nie stwierdza się działania stymulującego, jak np. dla albumin i eozynofili po śniadaniu, lub na czczo dla cholinesterazy osocza. ACTH nie wpływa na poziom eozynofili, przy ich nie zmieniającym się poziomie w grupie „czczej”, w grupie „śniadaniowej” działanie stabilizujące pojawia się tylko w pierwszej godzinie i powoduje właściwie zwiększenie stężenia eozynofili nie dopuszczając do wystąpienia eozynopenii trawiennej. Efekt stabilizujący jest zatem antagonistyczny do działania bodźca dodatkowego. W zależności od warunków doświadczenia wykazaliśmy występowanie obu efektów działania ACTH dla aminokwasów, białka całkowitego i globulin. Weźmy za przykład zachowanie się aminokwasów i globulin po podaniu ACTH w grupie „czczej” i „śniadaniowej”. W grupie „czczej” ACTH obniża poziom aminokwasów o 0,5 mg<sup>0</sup>/<sub>0</sub> w porównaniu do kontroli, w której stężenie ich nie zmienia się, natomiast w grupie „śniadaniowej” ACTH obniża wprawdzie w porównaniu do kontroli poziom aminokwasów o 1,5 mg<sup>0</sup>/<sub>0</sub>, lecz obniżka ta prowadzi tylko do utrzymania poziomu początkowego obserwowanego przed podaniem ACTH i śniadania. Oba efekty działania ACTH są w tym przypadku zgodne. Ale przy nie zmieniającym się poziomie aminokwasów podanie ACTH wywołuje aktualny spadek stężenia i działanie jego jest od razu widoczne, a przy podwyższonym poziomie obniża go do wartości początkowej i jest bezpośrednio niewidoczne, a można go wykazać tylko przez porównanie z równoległą kontrolą. Rozpatrując zachowanie się globulin widać, że na czczo ACTH podwyższa w drugiej godzinie ich stężenie, natomiast po śniadaniu obniża do poziomu początkowego nie dopuszczając do wystąpienia po pierwszej, trzeciej i czwartej godzinie zwyżki pośniadaniowej. Oba efekty działania ACTH są w przypadku globulin sprzeczne i rozkojarzone w czasie.

Odmienny zakres działania obu efektów i ich niezależność w czasie przemawia za innym mechanizmem działania ACTH w obu przypadkach. Stan ustroju decyduje o tym, który z tych mechanizmów dochodzi do głosu.

Zależność efektów działania ACTH od stanu ustroju dobrze wyjaśnia rozbieżności badań nad biologicznym działaniem ACTH. Za przykład może służyć przegląd piśmiennictwa odnośnie zachowania się aminokwasów we krwi i ich zmian po podaniu ACTH. Long [9] podaje, że ACTH obniża poziom aminokwasów, inni autorzy nie znajdują wpływu [10], lub podają, że poziom aminokwasów wzrasta [8]. Wyniki te w świetle przedstawionych w tej pracy dowodów są tylko pozornie sprzeczne, gdyż praw-

dopodobnie w pierwszym przypadku obserwowano działanie stymulujące ACTH, w drugim stabilizujące, a w trzecim wpływ innych czynników, których działanie było w pierwszych godzinach hamowane przez podanie ACTH. Istotny spadek poziomu aminokwasów stwierdzaliśmy wyłącznie w grupie „czczo”, natomiast w grupie „śniadaniowej” przez trzy godziny brak zmian, a w czwartej znaczny wzrost stężenia aminokwasów, polegający prawdopodobnie na przesunięciu efektu bodźcowego śniadania na dalsze godziny.

Przekonywujące dowody na przyjęte przez nas stabilizujące działanie ACTH znajdują się również w pracach związanych z działaniem ACTH u ludzi chorych z patologicznie zmienionymi składnikami krwi. Podawanie ACTH w doświadczeniach klinicznych powoduje szybki powrót do normy globulin i albumin lub cholesterolu i jego estrów [5], podczas gdy przy prawidłowym stosunku albumin do globulin, lub cholesterolu do jego estrów ACTH nie wywołuje zmian.

Biologiczne działanie ACTH przejawia się w dwóch niezależnych od siebie efektach polegających albo na wywoływaniu zmian w składzie krwi lub na cofaniu zmian wywołanych innymi czynnikami — fizjologicznymi lub patologicznymi.

### Streszczenie

1. Przebadano zmiany składników krwi ludzi zdrowych w odstępach godzinnych po śniadaniu — przez 5 godzin, i na czczo — przez 3 godziny, występujące po jednorazowym podaniu śródskórnie 2 mg (5 jedn.) hydrolizatu ACTH w glikozie (warunki hydrolizy: temp. 100°, 30 min, w 0,025 N HCl) lub samej glikozy (grupy kontrolne). Dla wykazania wpływu ACTH porównywano wyniki oznaczeń nie tylko ze stanem początkowym, lecz również ze zmianami w grupach kontrolnych. Uwzględniono tylko różnice statystycznie istotne.

2. Przebadano zachowanie się potasu, aminokwasów, białka całkowitego, albumin, globulin, cukru, eozynofili i cholinesterazy osocza.

3. Wykazano, że zakres działania ACTH i uzyskane efekty zależą od warunków doświadczenia (śniadanie lub stan na czczo) i od okresu upływającego od podania zastrzyku.

4. Efekt działania ACTH występuje dla różnych składników krwi w różnych okresach czasu (od 1 do 4 godzin).

5. Na czczo ACTH obniża poziom aminokwasów i potasu, zwiększa stężenie cukru, białka całkowitego i globulin, cofa spadek aktywności cholinesterazy osocza obserwowany w grupie kontrolnej, nie wpływa na poziom eozynofili i albumin.



6. Po śniadaniu ACTH obniża poziom potasu, cofa zmiany w poziomie aminokwasów, białka całkowitego, globulin i albumin obserwowane w kontroli, nie wpływa na poziom cukru i aktywność cholinesterazy osocza.

7. W 3 godziny po śniadaniu i domięśniowym wprowadzeniu 40 mg (100 jedn.) hydrolizatu ACTH występują takie same efekty działania ACTH jak po podaniu 2 mg śródskórnice.

8. Wyciągnięto wniosek, że ACTH działa w dwojaki sposób: (a) wywołuje zmiany — efekt stymulujący, (b) cofa zmiany wywołane innymi czynnikami — efekt stabilizujący; a przez podanie sposobem śródskórnym uzyskuje się przynajmniej dwudziestokrotnie zwiększenie aktywności hormonu.

#### LITERATURA

- [1] Baranowski T., Gibiński K., *Bull. l'Acad. Pol. Sc. Lettr., Cl. Med.* 171, 1952.
- [2] Bodansky A., *J. Biol. Chem.* 101, 93, 1933.
- [3] *Conference on ACTH, Brit. Med.* 790, 1951.
- [4] Gibiński K., Baranowski T., Mejbaum-Katzenellenbogen W., Bogdanikowa B., Kowal B., *Pol. Tyg. Lek.* 7, 997, 1952.
- [5] Gibiński K., Baranowski T., Mejbaum-Katzenellenbogen W., Bogdanikowa B., Kowal B., *Spr. Wrocl. Tow. Nauk.* 7, dod. 3, 1952.
- [6] King E. J., *Microanalysis in Medical Biochemistry*, Ed. II Churchill, London, 1951.
- [7] King E. J., Garner R. J., *J. Clin. Path.* 3, 248, 1947.
- [8] Li C. H., Geschwind J., Evans H. M., *J. Biol. Chem.* 177, 91, 1949.
- [9] Long C. N. H., *Fed. Proc.* 6, 461, 1947.
- [10] Luck J. M., Griffin A. C., Boer G., Wilson M., *J. Biol. Chem.* 206, 767, 1954.
- [11] Mejbaum-Katzenellenbogen W., *Bull. Acad. Polon. Sci., Cl. II*, 3, 171, 1955.
- [12] Mejbaum-Katzenellenbogen W., w przygotowaniu do druku.
- [13] Nachmansohn D., Rottenberg M. A., *J. Biol. Chem.* 158, 653, 1945.
- [14] Neuberg C., Faiker E., Levite A., *Bioch. Z.* 83, 244, 1917.
- [15] Romanowska E., *Acta Biochim. Polon.*, 2, 383, 1955.
- [16] Russel J. A., *J. Biol. Chem.* 156, 467, 1944.
- [17] Sayers G., Sayers M. A., Woodbury, *Endocrinology* 42, 379, 1948.
- [18] Schroeder E. F., Woodward G. E., *J. Biol. Chem.* 129, 233, 1933.
- [19] Snedecor G. W., *Statistical Methods*. Ed. IV. Iowa State College Press. 1946.
- [20] Thorn G. W., Forsham P. H., Prunty F. T. G., Hills A. G., *J. Am. Med. Ass.* 137, 1005, 1948.
- [21] Woodward G. E., *J. Biol. Chem.* 109, 1, 1935.



## ВЛИЯНИЕ ИНТРАДЕРМАЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ АДРЕНОКОРТИКОТРОПНОГО ГОРМОНА НА ОБМЕН ВЕЩЕСТВ У ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ

## Резюме

1. Исследовались биохимические изменения состава крови здоровых людей после интрадермального введения 2 мг (5 единиц) гидролизата АСТН в глюкозе (условия гидролиза: темп. 100°, 30 мин, в 0,025 N HCl) и самой глюкозы (контрольные группы). Исследования производились каждый час после завтрака в течение 5 часов и натошак в течение 3 часов. Для определения влияния АСТН результаты сравнивались не только с исходными данными, но и с изменениями в контрольных группах. Принимались во внимание только статистически достоверные результаты.

2. Исследовались изменения содержания калия, аминокислот, общего белка, альбуминов, глобулинов, сахара, эозинофилов и холинэстеразы плазмы.

3. Показано, что действие АСТН и достигаемые эффекты зависят от условий опыта (натошак или после завтрака) и от времени прошедшего от момента его введения.

4. Эффект действия АСТН наблюдается для различных составных частей крови в разных промежутках времени (от 1 до 4 часов после введения).

5. Натощак АСТН снижает содержание аминокислот и калия; увеличивает содержание сахара, общего белка и глобулинов; предотвращает падение активности холинэстеразы наблюдаемое в контрольных группах; не влияет на содержание альбуминов и количество эозинофилов.

6. После завтрака АСТН снижает содержание калия; предотвращает изменения в содержании аминокислот, общего белка, глобулинов и альбуминов, наблюдаемые в контрольных группах, не влияет на содержание сахара и активность холинэстеразы плазмы.

7. Через три часа после завтрака и после внутримышечного введения 40 мг (100 единиц) гидролизата АСТН получают такие же результаты действия АСТН, как после интрадермального введения 2 мг.

8. Авторы приходят к выводу, что АСТН оказывает двоякое действие: (а) вызывает определенные изменения — стимулирующий эффект, (б) предотвращает иные изменения, вызванные другими факторами — стабилизирующий эффект. При интрадермальном введении достигается, по крайней мере, двадцатикратное усиление гормональной активности.



THE EFFECT OF INTRACUTANEOUS ADMINISTRATION  
OF ADRENOCORTICOTROPIC HORMONE ON THE METABOLISM OF HEALTHY  
MEN

Summary

1. An hourly survey was made of changes in blood components of healthy men following a single administration — postprandial, 5 hours, and on empty stomach, 3 hours — of 2 mg. (5 units) of ACTH hydrolysate in glucose (conditions of hydrolysis: 100°C, 30 min., in 0.025 N HCl) or glucose alone (control groups). In order to show the effects of ACTH, the results of determinations were compared not only with the original conditions, but also with the changes found in control groups. Only differences statistically significant were taken into account.

2. The behaviour was examined of potassium, amino acids, total protein, albumin, globulin, sugar, eosinophils, and serum cholinesterase.

3. It was demonstrated that the scope of action of ACTH and the effects obtained depend on the conditions in which the experiment is carried out, before or after a meal, and on the time elapsed since the injection.

4. The effects of ACTH with regard to various blood components take various intervals, from 1 to 4 hours, to become manifest.

5. Injected on empty stomach, ACTH reduces the level of amino acids and potassium: it raises the concentration of sugar, total protein and globulin: it compensates the lowering of serum cholinesterase activity observed in the control group and has no effect on the level of eosinophils and albumins.

6. Postprandial injections of ACTH reduce the level of potassium; they compensate the changes in the levels of amino acids, total protein, globulins and albumins observed in controls: they fail to affect the level of sugar and the activity of serum cholinesterase.

7. Three hours after a meal and intramuscular administration of 40 mg., (100 units) of ACTH hydrolysate, the effects are like those following intracutaneous administration of 2 mg. of ACTH.

8. The conclusion was drawn that ACTH effects are twofold: a) it causes changes — stimulating effects, b) it compensates changes due to the action of other agents — stabilizing effects; administered by the intracutaneous route, the hormone gains at least twenty times in activity.

Otrzymano 25.1.1957 r.

E. BOROWSKI

**ULEPSZONA METODA OTRZYMYWANIA  
ANTYBIOTYKU TETAINY****II. OTRZYMYWANIE CZYSTEGO ANTYBIOTYKU\*)\*\*)**

*Z Pracowni Biochemicznej Instytutu Medycyny Morskiej w Gdańsku  
Kierownik pracowni: doc. kandyd. n. inż. E. Borowski*

Tetaina, czynny antybiotycznie niskocząsteczkowy polipeptyd, wyizolowana została w stanie czystym z kultury szczepu „Ø” *B. pumilus* [1, 5, 7]. Stosowano metodę rozdziału przeciwprądowego i preparatywną chromatografię bibułową. Ponieważ ilości antybiotyku otrzymywane tą drogą były znikome, konieczne było opracowanie metody umożliwiającej otrzymywanie tej substancji w większej skali. Zadanie to bardzo utrudnia fakt, że tetaina występuje w obecności złożonego kompleksu nieczynnych polipeptydów o własnościach bardzo zbliżonych do samego antybiotyku [5].

W pierwszej części pracy dotyczącej ulepszonej metody otrzymywania tetainy podano metodę otrzymywania uwolnionego od pozostałych zanieczyszczeń kompleksu peptydowego zawierającego antybiotyk [2]. Do pracy użyto wysokoaktywny wyselekcjonowany szczep „Ø” Bn-180. Jako podłoże stosowano pożywkę syntetyczną Andersona M-9 zawierającą ponadto kwas cytrynowy oraz wyciąg wodny z ziemniaka, który — jak stwierdzono — zawiera stymulatory wytwarzania tetainy [3, 4]. Kompleks peptydowy uzyskiwano przez adsorpcję na węglu aktywnym, elucję roztworem butanolu i następnie poddanie otrzymanego surowego materiału ciągłej ekstrakcji przeciwprądowej według Verzelego [8] w układzie fenol woda.

W ten sposób otrzymano z dobrą wydajnością wysokoaktywny preparat zawierający znaczny procent tetainy. Jak wykazała chromatografia bibułowa, uzyskany preparat stanowi kompleks kilku, około sześciu, pep-

\*) I część: Otrzymywanie kompleksu peptydowego [2].

\*\*\*) Praca wykonana częściowo z dotacji Komitetu Biochemicznego PAN.



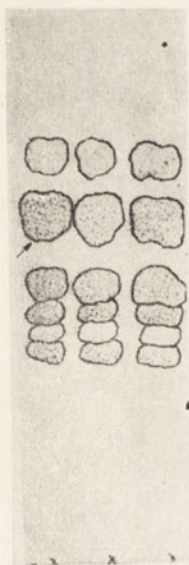
tydów. Opracowana metoda nadaje się do zastosowania w skali wielkolaboratoryjnej i półtechnicznej.

Celem niniejszej pracy jest opracowanie metody wyodrębnienia z kompleksu peptydowego czystej tetainy. W toku pracy aktywność poszczególnych próbek oznaczana była metodą cylinderkową z zastosowaniem szczepu *Shigella shigae* jako drobnoustroju wzorcowego. Stężenie antybiotyku 1 jedn./ml daje strefę zahamowania wzrostu o średnicy 23 mm. Z danych chromatografii bibułowej wynika, że jedna jednostka odpowiada ok. 1  $\mu\text{g}$  czystej tetainy [5]. Miareczkowanie tetainy wykonuje się według krzywej wzorcowej opartej na pomiarach stref zahamowania przy użyciu czystej tetainy. Standardów nie stosowano ze względu na trudności w przechowywaniu antybiotyku przez dłuższy czas (niezbyt duża trwałość). Przy przestrzeganiu ściśle standardowych warunków praktycznie nie mieliśmy rozbieżności w wynikach. Krzywe wykonane kilkakrotnie w dużych odstępach czasu pokrywały się ze sobą. Szczegóły metody biologicznej oznaczania tetainy będą przedmiotem innego doniesienia (S. Kryński — w przygotowaniu do druku).

Użyty w obecnej pracy materiał (kompleks peptydowy) otrzymywano według metody podanej w pierwszej części pracy [2]. Uzyskiwany początkowo z bardzo aktywnych hodowli (1000 jedn./ml) preparat miał aktywność wynoszącą 700—1000 jedn./mg. W dalszej pracy ze względu na to, że stosowany do pożywki ziemniak miał znacznie mniejszą aktywność stymulacyjną (aktywności stymulacyjne ziemniaków ze zbiorów z różnych lat nie są jednakowe) otrzymywano hodowle o poziomie nie przekraczającym 400 jedn./ml, z których uzyskiwano preparat kompleksu peptydowego o aktywności 250—500 jedn./mg. Otrzymywane w toku pracy porcje preparatu przechowywane były w lodówce w roztworze wodnym. Roztwory te używano bez wydzielania suchej substancji. W preparacie można wykazać metodą chromatografii bibułowej obecność kilku składników dających pozytywną reakcję ninhydrynową. Chromatogram preparatu pokazany jest na rys. 1.

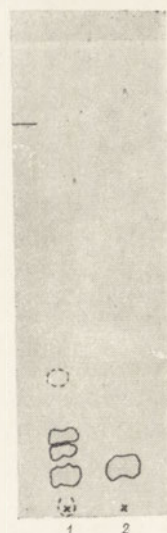
Ze względu na wielkie podobieństwo własności wszystkich składników kompleksu, tetaina nie może być z niego wyodrębniona przez zastosowanie prostych metod: ekstrakcji, wytrącania i in. W pracy oparto się na wykorzystaniu niewielkich różnic współczynników rozdziału poszczególnych składników kompleksu między dwa rozpuszczalniki (woda-rozpuszczalnik organiczny). Wydaje się, że jest to praktycznie jedyna droga prowadząca do wydzielenia aktywnego składnika kompleksu.

Wykorzystano chromatografię rozdzielczą na bibule jako test dla opracowania warunków wydzielenia tetainy. Zbadano w ten sposób około 60 różnych układów rozpuszczalników. Najlepsze własności rozdzielcze wykazywał wspomniany wyżej układ (Rys. 1) zastosowany uprzednio do



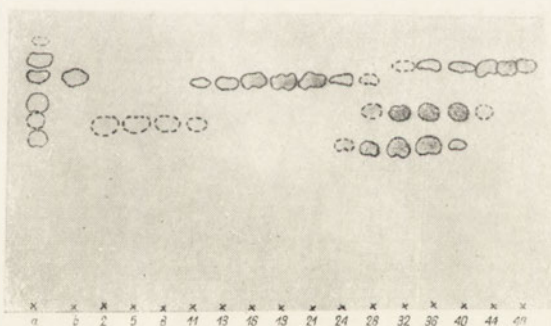
Rys. 1. Chromatografia bibułowa jednowymiarowa preparatu tetainy (kompleks peptydowy).

Bibuła Whatmana Nr 3. Rozpuszczalnik: III-rzędowy butanol (695)-kwas mrówkowy (10)-woda (295). Barwienie izaty-ną. Plama aktywna oznaczona strzałką



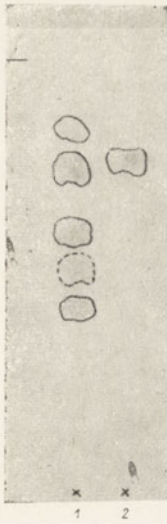
Rys. 2. Chromatogram bibułowy preparatu tetainy (kompleks peptydowy)  
Układ: n-butanol (50)-woda (50)-meta-nol (5). Barwienie ninhydrną.

1 — kompleks peptydowy. 2 — tetaina czysta



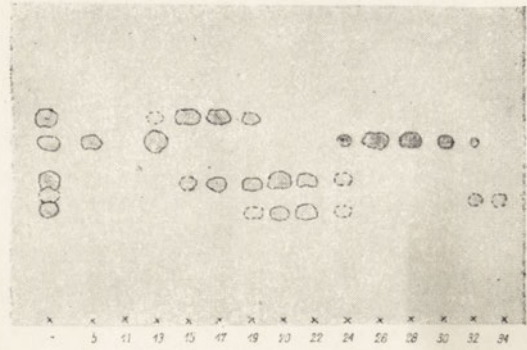
Rys. 3. Chromatografia bibułowa frakcji z rozdzielu przeciwpądowego tetainy. Naniesione dolne warstwy ( $50\mu\text{l}$ ). Rozpuszczalnik: III-rzędowy butanol (695) - kwas mrówkowy (10) - woda (295). Bibuła Whatmana Nr 1. Barwienie ninhydrną. Cyfry oznaczają numery elementów z aparatu Craiga, a — preparat rozdzielany, b — czysta tetaina





Rys. 4. Chromatogram bibuły tetainy przed i po rozdziale przeciwprądowym.

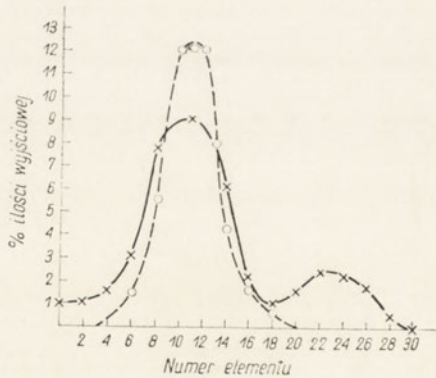
Bibuła, rozpuszczalniki i barwienie jak w rys. 3. 1 — preparat przed rozdzielaniem. 2 — tetaina czysta po rozdziale



Rys. 5. Chromatogram bibuły frakcji z kolumny celulozowej.

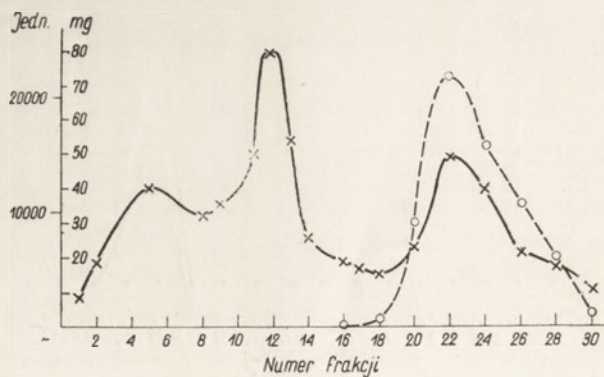
Warunki chromatografii jak w rys. 3. Cyfry oznaczają numery frakcji wychodzących z kolumny

a — preparat rozdzielany, b — czysta tetaina



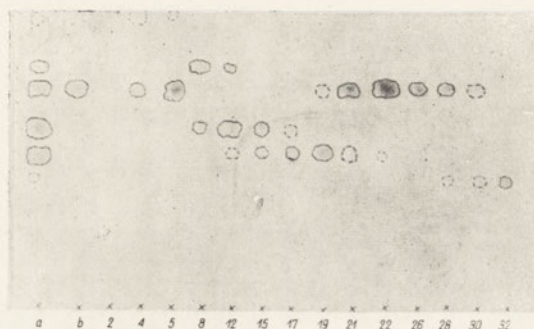
Rys. 6. Rozdział przeciwprądowy preparatu po chromatografii kolumnowej na celulozie

× ——— × substancja sucha  
 ○ — — — ○ aktywność względem *Shigella shigae*



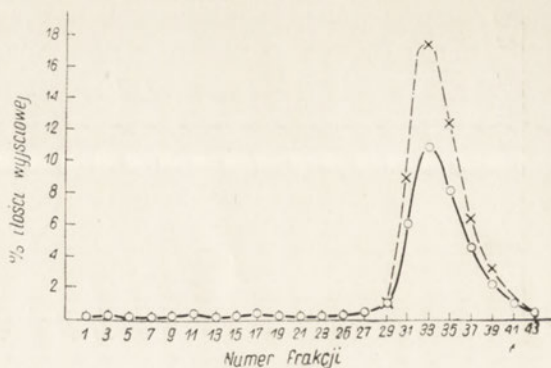
Rys. 7. Chromatografia rozdzielcza na silicagelu preparatu tetryny  
 Układ: n-butanol (50)-woda (50)-metanol (5). Frakcje eluatu po 100 ml.

x — x substancja sucha  
 o — o aktywność względem *Shigella shigae*



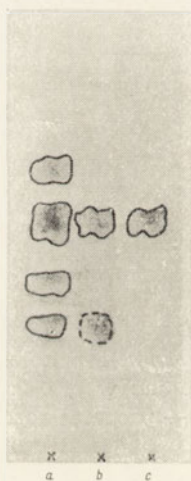
Rys. 8. Chromatografia bibułowa frakcji z kolumny silicagelowej (patrz rys. 7).  
 Rozpuszczalnik, bibuła i barwienie jak w rys. 3. Cyfry oznaczają numery frakcji  
 wychodzących z kolumny, a — preparat rozdzielany, b — czysta tetryna





Rys. 9. Powtórna chromatografia kolumnowa tetainy na silicagelu. Układ: n-butanol (50)-woda (50)-metanol (5). Objętości frakcji po 50 ml.

○ ——— ○ substancja sucha  
 × ——— × aktywność względem *Shigella shigae*



Rys. 10. Porównanie obrazów chromatograficznych preparatów tetainy przed pierwszą chromatografią na silicagelu (a), po chromatografii (b) i po rechromatografowaniu (c). Rozpuszczalnik, bibuła i barwienie jak w rys. 3

preparatywnej chromatografii bibułowej tetainy [5]. Nie mógł on jednak być zastosowany do otrzymywania antybiotyku w większej skali ze względu na wysoki koszt trzeciorzędowego butanolu. Ponadto obecność kwasu może powodować przy większych porcjach przerabianego materiału, a więc i dłuższym czasie trwania procesu, częściową inaktywację antybiotyku. Idealny układ winien być łatwo dostępny, tani, możliwie nie zawierać kwasów i zasad i wreszcie dawać dostatecznie dobry rozdział. Układem, który najbardziej zbliża się do tych warunków, jest: n-butanol (50)-woda (50)-metanol (5) (części objętościowe). W układzie tym na chromatogramie bibułowym (użyta górna warstwa) nie następuje całkowite rozdzielanie wszystkich składników kompleksu, jednakże plama antybiotyku dobrze oddziela się od pozostałych składników już przy małej drodze wędrówki plam. Wadą układu jest bardzo wolne wędrowanie plam (mała rozpuszczalność składników kompleksu). Stwarza to konieczność użycia — już na kolumnie — względnie dużych ilości rozpuszczalnika. Zwiększenie rozpuszczalności substancji, np. przez zwiększenie zawartości metanolu, nie prowadzi do celu, gdyż chociaż szybkość wędrówki wówczas wybitnie wzrasta, maleje stosunek  $R_f$  składników.

Obraz chromatograficzny kompleksu peptydowego w tym układzie pokazany jest na rys. 2. W układzie tym zwraca uwagę odwrotna kolejność wędrówki plam w porównaniu z układem z rys. 1. Tetaina wędruje tu jako ostatnia, podczas gdy poprzednio szła jako jedna z pierwszych plam. Decydujący wpływ na odwrócenie kolejności wędrówki wywiera — jak stwierdzono — zawartość kwasu.

Opracowany — przy zastosowaniu jako testu chromatografii bibułowej — układ rozpuszczalników użyto do wydzielenia w skali preparatywnej czystej tetainy. Wydzielanie antybiotyku przeprowadzono — wykorzystując różnice współczynników rozdziału składników kompleksu — kilkoma sposobami: metodą rozdziału przeciwprądowego oraz metodą chromatografii rozdzielczej na kolumnie celulozowej i silicagelowej.

Wydzielenie tetainy z kompleksu peptydowego metodą rozdziału przeciwprądowego przy użyciu układu n-butanol (50)-woda (50)-metanol (5) przeprowadzono stosując aparaturę systemu Craiga [6]. Pojemność elementów wynosiła po 4,5 ml każdej fazy. Aparat napełniano dolną warstwą otrzymaną z wyżej wymienionej mieszanki rozpuszczalników, zaś górna warstwa była fazą wędrującą. Przy podanych wymiarach elementów dopuszczalne obciążenie aparatury wynosi ok. 100 mg rozdzielanego jednorazowo preparatu. Większe ilości wprowadzonej do aparatu substancji na skutek niewielkiej jego rozpuszczalności w górnej fazie nie dają dobrego rozdziału, rozdzielane składniki w znacznym stopniu zachodzą na siebie.

Rozdział przeciwprądowy prowadzono na 50 elementach. Stosowano usuwanie fazy wychodzącej z ostatniego elementu. Po dokonaniu 200



przejsć rozdział prowadzono dalej metodą przepływu kołowego. Ogółem dokonano 350 przejsć. Stopień oddzielenia tetainy od pozostałych składników kompleksu zbadano metodą chromatografii bibułowej. Na rys. 3 pokazany jest chromatogram bibułowy dolnych warstw poszczególnych frakcji naniesionych na arkusz w jednakowej ilości (50  $\mu$ l). Wynika z niego, że w rezultacie przeprowadzonego rozdziału przeciwprądowego nastąpiło oddzielenie tetainy od pozostałych składników kompleksu. Jednakże jeden ze składników częściowo zachodzi na frakcje, w których znajduje się antybiotyk. Nie stanowi to jednak poważniejszej przeszkody, gdyż zakres wzajemnego nakładania się obu substancji nie jest duży. Po skończonym rozdziale wybierano frakcje zawierające czysty antybiotyk, usuwano z nich butanol i roztwór zagęszczano w próżni. Jak wynika z porównania obrazów chromatograficznych przed i po rozdziale przeciwprądowym (Rys. 4), otrzymana substancja jest wolna od pozostałych składników kompleksu.

Podana metoda nadaje się dobrze do otrzymywania niewielkich, kilkudziesięcimiligramowych ilości czystego antybiotyku. Jednakże przy większej skali jest niewystarczająca ze względu na dużą pracochłonność (potrzebne duże ilości rozpuszczalnika) i małą przelotowość aparatury. Z tego względu dwie dalsze opracowane metody: kolumnowa chromatografia rozdzielcza na celulozie, a w szczególności chromatografia na sili-cagelu, przewyższają podaną metodę.

Chromatografię na kolumnie celulozowej przeprowadzono stosując proszek celulozowy Whatmana Nr 1. Spomiędzy 60 układów rozpuszczalników przebadanych w chromatografii na arkuszach bibuły wybrano osiem najkorzystniejszych układów i zbadano przydatność ich w chromatografii kolumnowej. Najkorzystniejszym okazał się znów układ n-butanol (50)-woda (50)-metanol (5). Rozdział preparatywny prowadzono na kolumnie o średnicy 7 cm zawierającej 1 kg proszku celulozowego. Wysokość słupa celulozy po uformowaniu kolumny wynosi około 80 cm. Kolumnę formowano z zawiesziny w użytym do chromatografii rozpuszczalniku. Ustalono empirycznie, że maksymalne obciążenie kolumny wynosi 1 mg rozdzielanego preparatu na 1 g celulozy. W ten sposób jednorazowo na kolumnie można rozdzielić 1 g substancji. Substancję наносzono z 10% roztworu wodnego, po czym przepychano rozpuszczalnik tak regulując nadciśnienie, aby ustaliła się optymalna szybkość wypływu eluatu wynosząca 100 ml/godz. Zbierano frakcje po 200 ml. W wychodzącym eluacie badano zawartość substancji suchej, aktywność oraz obraz chromatograficzny. Chromatogram bibułowy poszczególnych frakcji wychodzących z kolumny obrazujący przebieg rozdzielania składników kompleksu przedstawiony jest na rys. 5. Widoczne jest z niego, że

tetajna idzie jako ostatni składnik. Stopień wydzielenia tetajny z pozostałych składników mieszaniny jest dobry. Dla dokonania całego procesu należy przepuścić przez kolumnę około 7 litrów rozpuszczalnika. Z połączonych frakcji zawierających antybiotyki wolny od pozostałych składników kompleksu ekstrahowano ciało czynne małymi porcjami wody do zaniku reakcji ninhydrynowej, po czym ekstrakt zagęszczano w próżni.

Chromatografia kolumnowa na celulozie prowadzi do całkowitego oddzielenia tetajny od pozostałych składników kompleksu peptydowego. Jednakże otrzymany preparat jest wtórnie zanieczyszczony substancjami wypłukującymi się z samej celulozy. Nawet najdłuższe wstępne przepłukiwanie kolumny czystym rozpuszczalnikiem nie doprowadza do otrzymania eluatu nie zawierającego substancji suchej. Jednakowoż ciała wypłukiwane z celulozy dają się łatwo oddzielić od antybiotyku przez podanie materiału niewieloprzejęciowemu (30 przejęć) rozdzielowi przeciwpłądowemu w układzie fenol-woda. Dwukrotny rozdział przeciwpłądowy w tych warunkach z wybraniem aktywnych frakcji prowadzi do otrzymania jednorodnej substancji dającej charakterystyczną krzywą rozdzielu przeciwpłądowego i jedną plamę na chromatogramie bibułowym. Skład preparatu otrzymanego w wyniku chromatografii kolumnowej jest zobrażony na krzywych rozdzielu przeciwpłądowego (Rys. 6).

Trzecią metodą zastosowaną do wyodrębnienia czystej tetajny jest chromatografia kolumnowa na silicagelu. Uzyskano tutaj najkorzystniejsze wyniki. Kolumnę silicagelową można doprowadzić do takiego stanu, że eluat nie będzie zawierał substancji suchej. Ponadto silicagel jest — w naszym wypadku — wielokrotnie aktywniejszy od celulozy tak, że na kolumnie zawierającej tę samą ilość adsorbenta można w wypadku silicagelu chromatografować do 10 razy większą ilość preparatu tetajny aniżeli na celulozie. W pracy użyto silicagelu do chromatografii przesiany przez sito 100/200. Stosowano tę samą co wyżej mieszanekę rozpuszczalników. Wyodrębnienie czystej tetajny prowadzono w dwóch etapach, poddając dwukrotnie chromatografii kolumnowej. W pierwszej chromatografii, wstępnej, otrzymano substancję już wysoce oczyszczoną zawierającą jednak jeszcze niewielkie ilości zanieczyszczeń. Z preparatu tego usuwano resztę zanieczyszczeń przez rechromatografowanie.

Kolumnę do chromatografii wstępnej formowano z zawiesiny silicagelu w wymienionym rozpuszczalniku, po czym przepłukiwano ją jeszcze pewną ilością rozpuszczalnika. Empirycznie ustalono, że dopuszczalne obciążenie kolumny wynosi 5—10 mg rozdzielanego preparatu na 1 g adsorbenta. Stosowano kolumnę zawierającą 200 g silicagelu. Średnica kolumny wynosiła 30 mm, zaś wysokość słupa adsorbenta 48 cm. Na kolumnę nanoszono 1—2 g preparatu tetajny w roztworze wodnym (2—3 ml), po



czym przepuszczano rozpuszczalnik przez pewien czas bez nadciśnienia, później zaś włączano ciśnienie. Optymalną szybkość wypływu eluatu ustalono na około 65 ml/godz. Zbierano frakcje po 100 ml. Przebieg chromatografii przedstawiają krzywe substancji suchej i aktywności (Rys. 7) oraz obraz chromatograficzny poszczególnych frakcji (Rys. 8). Jak widać, w procesie tym następuje prawie całkowite oddzielenie tetainy od pozostałych składników kompleksu. Frakcje zawierające antybiotyki są jedynie nieznacznie zanieczyszczone. Do dalszego przerobu brano frakcje aktywne (20—28), z których wydobywano antybiotyki przez kilkakrotną ekstrakcję wodą do zaniku reakcji ninhydrynowej. Roztwór wodny zagęszczano w próżni. Porównanie obrazów chromatograficznych substancji przed i po rozdziale na kolumnie pokazane jest na rys. 10.

Ilości otrzymanego w wyniku chromatografii kolumnowej preparatu zależne są od aktywności wyjściowego materiału. Na przykład z 1,2 g preparatu o aktywności 1 jedn. w 5—6  $\mu\text{g}$  otrzymywano 160—200 mg substancji, zaś z tej samej ilości preparatu o aktywności 1 jedn. w 3  $\mu\text{g}$  otrzymywano około 400 mg. Aktywności otrzymanych substancji wahają się od 1,2—1,5  $\mu\text{g}$  dla jednej jednostki.

Chromatografię wstępną prowadzić można nieograniczenie długo na tej samej kolumnie. Tetaina wychodzi jako przedostatnia substancja. Jeśli po skończeniu chromatografii rozpocząć przerabianie następnej porcji, to zanim antybiotyki z tej porcji zaczną przechodzić do eluatu, ostatnia substancja z poprzedniej zdąży już opuścić kolumnę. W trakcie pracy używaliśmy tę samą kolumnę kilkanaście razy bez zmiany adsorbenta, przy czym nie zauważyliśmy jakiegokolwiek zmiany zdolności rozdzielczych. Podobnie i zużycie rozpuszczalnika jest ekonomiczne. Można używać stale te same porcje rozpuszczalnika regenerując go za każdym razem przez wypłukanie — do zaniku reakcji ninhydrynowej — zawartych w nim substancji wodą zawierającą pewne ilości metanolu i butanolu będące w równowadze z górną warstwą układu n-butanol (50)-woda (50)-metanol (5).

Usunięcie ostatnich śladów zanieczyszczeń z otrzymanego preparatu tetainy osiągnięto przez poddanie kilku połączonych porcji antybiotyku powtórnej chromatografii. Do rechromatografowania stosowano kolumnę na szlifach i z dnem ze szkła porowatego (wykluczenie śladów zanieczyszczeń z korków i węży, z tego samego względu wszystkie rozpuszczalniki destylowano z aparatury szlifowej). Stosowano także nieco dłuższą drogę rozdziału i mniejsze obciążenie kolumny. Średnica kolumny wynosiła 20 mm długości, zaś słupa adsorbenta 78 cm. Kolumna zawierała 150 g silicagelu. Stosowano obciążenie około 500 mg preparatu jednorazowo na kolumnę.

W tym etapie oczyszczania silicagel poddawano wstępnej elucji rozpuszczalnikiem usuwającym zawarte w nim pewne ilości soli mineralnych. Kolumnę formowano z zawiesiny silicagelu w wodnym 85% metanolu, po czym przepłukiwano ją jeszcze dwoma litrami tego rozpuszczalnika, aż do uzyskania eluatu zupełnie nie zawierającego substancji suchej. Następnie przepuszczano przez kolumnę 1 liter właściwego rozpuszczalnika, po czym nanoszono roztwór wodny antybiotyku (500 mg w 1 ml) i chromatografowano. Stosowano ten sam rozpuszczalnik co w chromatografii wstępnej. Optymalna szybkość wypływu eluatu wynosi 50 ml/godz. Zbierano frakcje po 50 ml. tak jak i poprzednio określano frakcje aktywne metodą chromatografii bibułowej. Wykreślano także krzywą substancji suchej i aktywności. Przebieg powtórnej chromatografii przedstawiają krzywe (Rys. 9).

Podobnie jak i poprzednio z wybranych frakcji aktywnych wydobywano antybiotyki przez ekstrakcję wodą do zaniku reakcji ninhydrynowej. Ekstrakt wodny zagęszczano w próżni. Otrzymany preparat jest już wolny od zanieczyszczeń. Na obrazie chromatograficznym jest już tylko jedna plama (rys. 10). Z 500 mg chromatografowanego preparatu otrzymuje się około 300—400 mg czystego antybiotyku. Aktywność preparatu wynosi 770—1000 jednostek w miligramie (granica powtarzalności biologicznej metody oznaczania).

Na tej samej kolumnie można chromatografować po kolei dwie porcje preparatu, po czym kolumnę należy oczyścić przez przepłukiwanie 85% wodnym metanolem (2 litry) i następnie 1 litrem użytego do chromatografii rozpuszczalnika, po czym kolumnę można znów dwukrotnie użyć itd. Oczyszczanie kolumny jest konieczne z tego względu, że — jak to widać z rys. 9 — zostaje na niej zatrzymana pewna część (ponad 20%) chromatografowanych substancji (krzywa substancji suchych splanimetrywana daje poniżej 80% ilości wyjściowej substancji). Substancje te z czasem mogą się dostać do eluatu.

Otrzymany czysty antybiotyk daje na chromatogramie bibułowym (Rys. 10c) jedną plamę. Przebadano go na jednorodność stosując też i kilkanaście innych rozpuszczalników: mieszanki zawierające n-butanol, różne kwasy, metanol, metyloetyloketon, alkohole propylowe, alkohol benzylowy, alkohol izoamylowy, fenol, kolidyna, lutydyna, octan etylu i niektóre inne. We wszystkich wypadkach otrzymano ten sam wynik.

Czysta tetaina otrzymana w roztworze wodnym jest dość trwała i może być w tym stanie przechowywana przez szereg tygodni w lodówce. Jednakże znacznie wygodniej jest otrzymać ją w stanie suchym. Wydzielenie antybiotyku z roztworu wodnego przeprowadzić można bądź przez wytrącenie go acetonem, bądź też osuszenie roztworu w próżni wprost lub najlepiej stosując liofilizację. Wytrącenie acetonem przeprowadza się



z 15% roztworu wodnego dodając powoli przy energicznym wstrząsaniu 24-krotną objętość acetonu. Wydziela się bezbarwna substancja początkowo lekko kleista, która po dokładnym roztarciu szpatelką z acetonem staje się zupełnie krucha i sypka. Po odwirowaniu, przemyciu acetonem i usunięciu resztek rozpuszczalnika w próżni otrzymuje się bezbarwną, bezpostaciową substancję. Wytrącona zostaje cała ilość antybiotyku zawartego w roztworze wodnym. Ten sposób osuszania tetainy, chociaż prosty i szybki, ma tę niedogodność, że następuje przy tym pewna utrata aktywności, wynosząca około 30%. Metodą osuszania nie dającą praktycznie strat aktywności jest liofilizacja roztworu wodnego. Otrzymany tą drogą produkt posiada pełną aktywność użytego do osuszania materiału. Dotyczy to tylko czystego antybiotyku. Preparaty zanieczyszczone, otrzymane w toku poprzednich prac, traciły w czasie liofilizacji znaczną część aktywności. Otrzymaną w stanie suchym tetainę przechowywano w eksykatorze nad chlorkiem wapnia w temperaturze pokojowej.

Czysty antybiotyk w odróżnieniu od otrzymanych uprzednio zanieczyszczonych preparatów nie jest zupełnie higroskopijny. Wilgotność preparatu przechowywanego nad chlorkiem wapnia wynosi 4,7% w stosunku do suszonego nad pięciotlenkiem fosforu. Tetaina nie posiada określonej temperatury topnienia. Preparat rozkłada się ze zbrunatnieniem i obfitym wydzielaniem gazu w temperaturach 100—200° w zależności od warunków ogrzewania (szybkość, początkowa temperatura aparatu). Antybiotyk jest doskonale rozpuszczalny w wodzie tworząc w trakcie odparowywania syrop. Rozpuszcza się też dobrze w lodowatym kwasie octowym, glikolu i nasyconym wodą fenolu, częściowo rozpuszcza się w metanolu; roztwór nasycony w temperaturze pokojowej jest 1,4%. Nie rozpuszcza się zupełnie w rozpuszczalnikach tłuszczowych, bezwodnym butanolu, estrach i acetonie.

Nie udało się otrzymać tetainy w stanie krystalicznym. Nie krystalizuje ona z roztworów wodnych nasyconych siarczanem amonu, siarczanem magnezu i chlorkiem sodu pomimo kilkutygodniowego pozostawiania w lodówce (+3°). Wytrącanie z roztworu acetonem, metanolem i in. rozpuszczalnikami daje produkt bezpostaciowy. Oziębianie nasyconego roztworu metanolowego mieszaniną stałego dwutlenku węgla i alkoholu (różnica temperatur około 100°) również nie powoduje wydzielenia substancji. Także powolne odparowywanie roztworu metanolowego prowadzi do powstania szkliwa. Być może, że krystalizacja z odpowiednio dobranej mieszanki rozpuszczalników doprowadziłaby do celu. Jednakże mieszanek takich nie badano w tym kierunku ze względu na zbyt małą ilość antybiotyku, którą dysponowano.

W zakończeniu pracy poczuwam się do obowiązku wyrażenia podziękowania prof. dr S. Kryńskiemu za zbadanie aktywności próbek antybiotyku, a także mgr inż. Z. Borowskiej za pomoc przy opracowaniu niniejszego zagadnienia.

### Streszczenie

Opracowano metodę wyodrębnienia czystego antybiotyku peptydowego tetainy — wytwarzanego przez szczep „*θ*” *B. pumilus* — z kompleksu peptydowego, w którym ta substancja występuje przy preparatyce.

Antybiotyk izolowano z kompleksu — otrzymanego przez adsorpcję z kultury na węglu i następnie poddanie ciągłemu rozdzielaniu przeciuprądowemu — stosując chromatografię kolumnową na celulozie i silicagelu oraz 350 przejściowy rozdział przeciuprądowy. W metodach tych stosowano układ rozpuszczalników n-butanol (50)-woda (50)-metanol (5). Najlepszą jest metoda chromatografii rozdzielczej na kolumnie silicagelowej.

Czysty antybiotyk otrzymano w stanie suchym przez wytrącenie acetonem lub liofilizację. Określono podstawowe własności czystej substancji. Jednorodność preparatu wykazano metodą chromatografii bibułowej. Aktywność preparatu wynosi 770—1000 jednostek w miligramie.

### LITERATURA

- [1] Borowski E., *Przemysł Chemiczny* 9, 503, 1953.
- [2] Borowski E., Borowska Z., Kryński S., Wasielewska D., *Biul. Instyt. Med. Morskiej* 8 Nr 1/2, 75, 1957.
- [3] Borowski E., *Biul. Instyt. Med. Morskiej* 5, 234, 1953.
- [4] Borowski E., Kryński S., *Biul. Instyt. Med. Morskiej* 8 Nr 1/2, 89, 1957.
- [5] Borowski E., Borowska Z., *Biul. Instyt. Med. Morskiej* 8 Nr 1/2, 69, 1957.
- [6] Craig L. C., *Fortschritte der chem. Forsch.* 1, 512, 1949.
- [7] Kryński S., Borowski E., Kuchta A., Borowski J., Becla E., *Biul. Instyt. Med. Morskiej* 3, 301, 1952.
- [8] Verzeli, *Nature* 174, 702, 1954.

### УСОВЕРШЕНСТВОВАННЫЙ МЕТОД ПОЛУЧЕНИЯ АНТИБИОТИКА ТЕТАИНА.

#### II. Выделение чистого антибиотика.

#### Резюме

Разработан метод выделения чистого пептидного антибиотика тетаина, — синтезируемого штаммом „*θ*” *B. pumillus* — из пептидного комплекса, с которым тетаин выделяется во время препаративного получения.



Антибиотик выделяется из комплекса, полученного путем адсорбции из культуральной жидкости на активированном угле и противоточного распределения, путем хроматографии на колонках с целлюлозой и силикагелем, а также 350-переносного противоточного распределения. Применялась система растворителей *n*-бутанол (50)-вода (50)-метанол (5). Наилучшие результаты были получены методом распределительной хроматографии на колонке из силикагеля.

Чистый антибиотик был получен в сухом виде при помощи осаждения ацетоном или при помощи лиофилизации. Были определены основные свойства чистого вещества. Однородность препарата была доказана при помощи бумажной хроматографии. Активность препарата составляла 770-1000 единиц на миллиграмм.

## AN IMPROVED METHOD OF PREPARING THE ANTIBIOTIC TETAINE

### II. PREPARATION OF THE ANTIBIOTIC IN PURE STATE

#### Summary

A method was devised for obtaining in pure state the peptide antibiotic tetaine — produced by strain "9" of *B. pumilus* — from a peptide complex in which the substance occurs during the isolation process.

The antibiotic was isolated from the complex — obtained by adsorption on carbon from the culture and subsequent continuous counter-current distribution — by using cellulose and silicagel column chromatography and 350 transfer counter-current separations. The system of solvents used was: *n*-butanol (50)-water (50)-methanol (5). Silicagel column partition chromatography was most successful.

The pure antibiotic was obtained in dry state by precipitation with acetone or by freeze-drying. The basic properties of the pure substance were determined. The homogeneity of the preparation was proved by paper chromatography. Activity of the preparation was 770—1000 units per miligram.

Otrzymano 7.5.1957 r.

E. BOROWSKI i J. KONOPA

## BADANIA NAD BUDOWĄ CHEMICZNĄ TETAINY

## I. STUDIA ELEKTROFORETYCZNE \*)

Z pracowni Biochemicznej Instytutu Medycyny Morskiej w Gdańsku  
Kierownik pracowni: doc. kand. n. inż. E. Borowski

Tetaina jest niskocząsteczkowym termostabilnym małotoksycznym antybiotykiem wytwarzanym przez szczep „*θ*” — *B. pumilus*. Antybiotyk ten został otrzymany w czystym stanie [1—4, 8]. Wstępne badania nad charakterem chemicznym tej substancji wykazały, że tetaina jest polipeptydem. W kwaśnym hydrolizacie antybiotyku znaleziono dwa aminokwasy: tyrozynę i alaninę (w przygotowaniu do druku). Na szczególną uwagę zasługuje fakt, że w skład cząsteczki wchodzi tylko dwa różne aminokwasy. Cząsteczka antybiotyku zawiera być może ponadto także część niepeptydową.

Celem obecnej pracy jest zbadanie — przez zastosowanie elektroforezy bibułowej — czy tetaina posiada wolną końcową grupę aminową lub karboksylową lub też wolne obie te grupy jednocześnie. Ponadto, przez wyznaczenie punktu izoelektrycznego można w przybliżeniu określić stosunek wzajemny ilości wolnych grup karboksylowych do grup aminowych.

W pracy stosowano preparat czystej tetainy otrzymanej według podanej uprzednio metody [2, 4]. Do zasilania aparatury elektroforetycznej zastosowano stabilizator napięcia sieciowego dający stabilizację napięcia do kilku procent. Na wstępie dokonano wyboru odpowiedniej aparatury nadającej się do przeprowadzania dokładnych pomiarów ruchliwości elektroforetycznej substancji. Opierając się na danych literaturowych przeprowadzono próby pomiaru ruchliwości na różnego rodzaju aparaturach. Jako substancji wzorcowych użyto aminokwasy, a także tetainę. Stwierdzono, że do naszego celu nie nadaje się aparatura z paskami bibuły umieszczonymi w komorze wilgotnej. Otrzymywane wyniki są mało

\*) Praca wykonana częściowo z dotacji Komitetu Biochemicznego PAN.

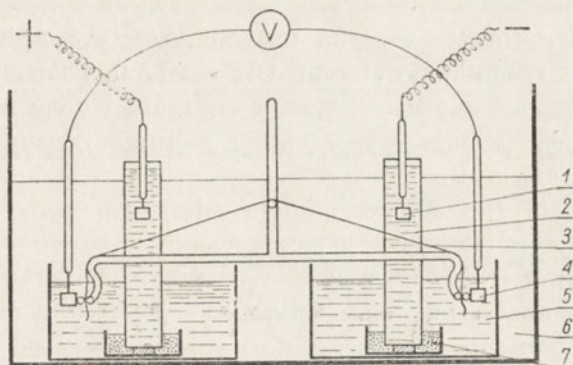


powtarzalne. Ponadto trudno jest uwzględnić i wyeliminować szereg dodatkowych czynników występujących w tej metodzie i wpływających na wynik pomiaru ruchliwości, a wynikających z grzania się i parowania pasków. Metoda ta nadaje się dobrze do rozdzielania substancji drogą elektroforezy, jednakże nie jest odpowiednia dla dokonywania precyzyjnych pomiarów ruchliwości. Inną metodą przeprowadzenia elektroforezy w podobnych warunkach (paski w powietrzu), lecz z wyeliminowaniem grzania się i parowania jest metoda, w której paski umieszcza się między dwie płytki szklane odprowadzające wydzielane ciepło i uniemożliwiające parowanie. Jednakże — jak stwierdziliśmy — i tutaj dokładność pomiarów ruchliwości jest utrudniona na skutek rozmazywania się plam na pasku powodowanego bardzo silnym wciąganiem elektrolitu między płytki. Nawet bardzo znaczne obciążenie płytki ciężarkiem nie wiele tu pomaga. Według Kunkela i Tiseliusa [9] posmarowanie płytek smarem silikonowym ma zmniejszać rozmiar tego zjawiska. W naszych doświadczeniach stosowaliśmy powlekanie płytek innymi substancjami hydrofobowymi: parafiną i olejem parafinowym (smar silikonowy nie był dla nas dostępny). Okazało się, że nawet całkowite zalanie przestrzeni między płytkami i bibułą olejem parafinowym nie zapobiegało sączeniu się elektrolitu i znacznemu powiększaniu plam.

Metodą, która okazała się odpowiednia dla dokonywania pomiarów ruchliwości elektroforetycznej, było umieszczenie pasków bibuły w kąpeli niepolarnego rozpuszczalnika. Jest to niewątpliwie najdokładniejsza i najlepsza metoda elektroforezy bibułowej pozbawiona tych wszystkich niedoskonałości i wad, które posiadają pozostałe metody. Najczęściej stosowanym przez autorów środowiskiem do kąpeli jest chlorobenzen. Ma on jednak tę niedogodność, że będąc cięższym od wody stwarza konieczność stosowania bardziej skomplikowanych i mniej dogodnych w użyciu aparatów elektroforetycznych. Spotykane z kolei w literaturze media lżejsze od wody (toluen, heksan i in.) nie mogły być w naszym wypadku zastosowane ze względu na pewną rozpuszczalność w nich kwasu octowego (stosowano bufor octanowy). Stwierdziliśmy, że substancją dobrze spełniającą rolę jako środowisko dla kąpeli i w naszym wypadku nadającą się do zastosowania jest olej parafinowy. Środowisko to — nie stosowane dotąd przez autorów — używaliśmy w toku całej pracy.

Schemat stosowanej przez nas aparatury przedstawiony jest na rys. 1. Pasek bibuły Whatmana Nr 1 o szerokości 7 cm i długości 34 cm rozpięty jest na rusztowaniu sporządzonym z rurek szklanych. Pasek wraz z rusztowaniem umieszczony jest w dwóch naczyniach elektrodowych z buforem. Objętość buforu w każdym naczyniu wynosi po 1 l. Przestrzeń elektrodowa — dla wyeliminowania kontaktu z produktami elektrolizy — oddzielona jest od reszty buforu znajdującego się w naczyniu elektrodo-

wym. Elektrody platynowe umieszczone są w rurach napełnionych tym samym co całe naczynie buforem. Rury te u dołu są zanurzone w znajdującym się w małych szalkach Petriego 3% agarze sporządzonym również na użytych do elektroforezy buforze. Pomiar napięcia dokonywany jest za pośrednictwem elektrod platynowych umieszczonych w zewnętrznym naczyniu z buforem w pobliżu miejsca zanurzenia paska bibuły.



Rys. 1. Aparat do elektroforezy bibułowej

1 — elektrody; 2 — przestrzeń elektrodowa; 3 — pasek bibuły Whatmana Nr 1 rozpięty na rusztowaniu z rurek szklanych; 4 — elektrody służące do pomiaru napięcia na końcach paska; 5 — naczynia elektrodowe z buforem (1 l.); 6 — olej parafinowy; 7 — szalki Petriego z 3% agarzem sporządzonym na użytych do elektroforezy buforze

Całe to urządzenie umieszczone jest w większej komorze szklanej i zalane — aż do pokrycia paska bibuły — olejem parafinowym. Przed zanurzeniem paska wyrównywuje się poziom buforów w obu naczyniach elektrodowych.

Pomiary ruchliwości elektroforetycznej tetajny przeprowadzono stosując bufony o sile jonowej  $\mu = 0,1$ . Stwierdzono, że dalsze zmniejszanie siły jonowej nie zwiększa już ruchliwości antybiotyku w sposób widoczny zmniejszając jedynie pojemność buforu, co może wywrzeć niekorzystny wpływ na dokładność pomiarów. Ruchliwość elektroforetyczną tetajny zbadano w zakresie pH 3,5—8,5. Dla różnych zakresów stosowano bufony octanowe, fosforanowe i weronalowe sporządzone według Boyda [5] i Millera i Goldeny [7]. Pomiary przeprowadzono w temp. pokojowej (stwierdzono, że w temp.  $+2^\circ$  nie uzyskuje się większych ruchliwości). Ze względu na to, że bufony Millera i Goldeny przewidziane są dla temp.  $+2^\circ$  oraz dla wykluczenia małych niedokładności mogących powstać z niedostatecznej czystości odczynników, przyjęto nie nominalne wartości pH buforów, lecz wartości otrzymane w wyniku pomiaru potencjometrycznego. Jako punkt odniesienia przy pomiarze ruchliwości (wielkość elektroosmozy) stosowano glikozę nanoszoną na pasek w ilości 0,1 mg. Próbowano stosować też i inne substancje (wo-



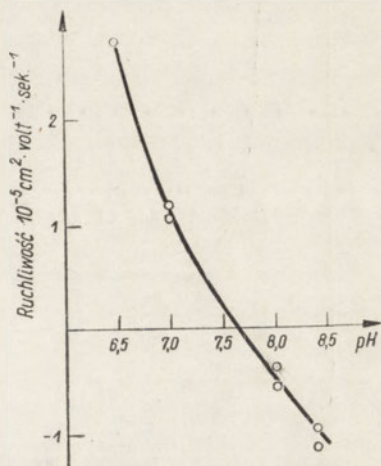
da utleniona), jednakże glikoza jest najdogodniejsza. Glikozę наносono na środek paska, zaś po obu jej stronach (w kierunku szerokości paska) dawano badaną substancję. Po wysuszeniu w strumieniu powietrza pasek nasycano buforem po obu stronach linii naniesienia, czekano chwilę aż bufor podsiąkając zwilży i miejsce z naniesionymi substancjami, po czym pasek rozpinano na rusztowaniu i całość zanurzano do komory elektroforetycznej zalanej uprzednio olejem parafinowym i włączano prąd. Po skończonej elektroforezie z paska usuwano reszty znajdującego się na nim oleju przez wypłukanie eterem. Dla ustalenia położenia plam pasek rozcinano wzdłuż na trzy części (jedna z glikozą i dwie zawierające badaną substancję). Glikozę wywoływano stosując odczynnik Patridge'a (kwaśny ftalan aniliny).

Położenie plamy tetainy początkowo ustalano barwiąc ją przez spryskiwanie roztworem ninhydryny i ogrzewanie w suszarce. Jednakże dla otrzymania plamy o dostatecznie silnym zabarwieniu koniecznym było użycie do elektroforezy dużych ilości substancji (ok. 0,15 mg). Ilość ta powoduje wyczerpanie pojemności buforowej na obszarze zajęтым przez plamę tak, że przy pH bliskim punktowi izoelektrycznemu substancja nie stykając się prawie z nowymi porcjami buforu (mała ruchliwość) daje błędne (za niskie) wartości ruchliwości. Konieczne w takim wypadku wstępne doprowadzenie наносzonej próbki do pH odpowiadającego użytemu buforowi wymagałoby zużycia znacznie większych ilości preparatu. Z tego względu konieczne było poddawanie elektroforezie nieznacznych ilości antybiotyku i stosowanie do wykrywania jego położenia czulszego testu — biologicznego. Pasek po usunięciu zeń oleju wkładano na ok. 1 godz. do wanny z eterem w celu wyekstrahowania kwasu octowego (w wypadku stosowania buforu octanowego). Wysuszony od eteru pasek kładziono następnie na płytkę Petriego z agarem drożdżowym, na który posiano uprzednio szczep *Shigella shigae*. Po dobie inkubowania w temperaturze wyznaczano położenie antybiotyku na podstawie powstałej strefy zahamowania wzrostu drobnoustroju wzorcowego. W celu uzyskania strefy zahamowania o odpowiedniej wielkości na pasek nanosić należy po 0,005 mg antybiotyku.

Pomiary ruchliwości elektroforetycznej tetainy przeprowadzono stosując napięcie 250 V (= 9,3 V/cm). Przez pasek w czasie elektroforezy płynie prąd 3—4 mA. Czas trwania elektroforezy potrzebny dla dostatecznego przesunięcia plamy wynosił 12 godzin dla pH dających małą ruchliwość i 6 godzin dla pH, przy których ruchliwość były większe. W celu sprawdzenia stopnia dokładności obranej metody i stwierdzenia czy przyjęte warunki są odpowiednie, przeprowadzono pomiary ruchliwości i wyznaczono punkt izoelektryczny histydyny i uzyskane wyniki porównano z danymi z literatury [6]. Elektroforezę (jonoforezę) tej wzor-

cowej substancji przeprowadzono stosując napięcie 350 V i czas trwania procesu 6 godz. i 12 godzin. Położenie plamy aminokwasu określano barwiąc ją acetonowym roztworem izatyny (ogrzewanie w  $100^{\circ}$ ). Dla uzyskania wyraźnej plamy należało nanosić na bibułę ok.  $100 \mu\text{g}$  aminokwasu. Z uwagi na znaczną ilość substancji roztwór tej ostatniej doprowadzono, przed daniem na pasek, do pH takiego, jakie było w użytym do elektroforezy buforze. Otrzymana krzywa ruchliwości histydyny (rys. 2) wyznacza wartość punktu izoelektrycznego równą pH 7,6. Cyfra ta odpowiada dokładnie wartości podanej przez Mc Donald a i współautorów [6]. Przebieg samej krzywej dawał niższe wartości ruchliwości dla poszczególnych pH niż otrzymane przez wymienionych autorów. Jest to zrozumiałe ze względu na to, że autorzy ci stosowali nieco inne warunki elektroforezy, przede wszystkim znacznie mniejszą siłą jonową buforów (ruchliwość maleje ze wzrostem siły jonowej buforu). Różnorodność warunków w zasadzie nie powinna — poza kształtem krzywej — wpływać na punkt przecięcia jej z osią pH tzn. na wyznaczaną wartość punktu izoelektrycznego. Zgodność uzyskanych wyników z danymi literatury świadczy o dostatecznej dokładności obranej metody.

Krzywa ruchliwości elektroforetycznej tetajny przedstawiona jest na rys. 3. Antybiotyk porusza się w polu elektrycznym przy pH wyższych od 4,4 w kierunku anody, zaś poniżej tej wartości w kierunku katody. Przy  $\text{pH} = 4,4$  substancja pozbawiona jest ładunku elektrycznego (punkt izoelektryczny tetajny). Dane powyższe świadczą o tym, że cząsteczka antybiotyku posiada wolne grupy końcowe zarówno karboksylową jak i aminową. Trudniej jest określić — na podstawie otrzymanych wyników — czy stosunek obu końcowych wolnych grup jest jak 1 : 1, czy też jakiś inny. Z całą pewnością można jednak stwierdzić, że stosunek ten nie jest na korzyść grup aminowych, antybiotyk nie jest zasadowym. W takim wypadku wartości punktu izoelektrycznego dla aminokwasów zasadowych wahają się około  $\text{pH} = 10$ . Również zasadowe peptydy (np. wazopresyna) mają wysoki punkt izoelektryczny.

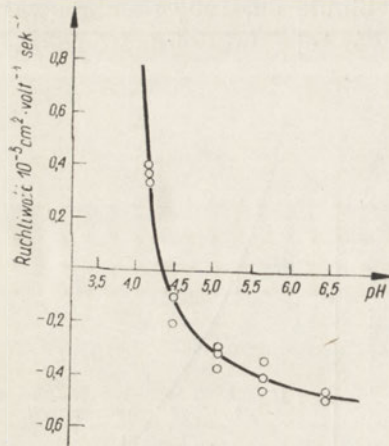


Rys. 2. Krzywa ruchliwości elektroforetycznej histydyny

Elektroforeza bibułowa. Bibuła Whatmana Nr 1. Bufor fosforanowy i octanowy o sile jonowej  $\mu = 0,1$ . Napięcie 13 V/cm. Krzywa wyznacza wartość punktu izoelektrycznego = 7,6.



Trudniej jest wywnioskować czy tetaina nie jest peptydem kwaśnym. Jej punkt izoelektryczny jest za wysoki jak na kwaśny peptyd lecz i za niski nieco jak na peptyd obojętny. Jednakże aminokwasy kwaśne posiadają wartości punktu izoelektrycznego zdecydowanie niższe, leżące w pobliżu  $\text{pH} = 3$ . Także i punkty izoelektryczne kwaśnych peptydów (np. glutation) znajdują się w tym zakresie. Antybiotyk mógłby być kwaśnym peptydem przy wartości punktu izoelektrycznego  $= 4,4$  w tym przypadku, jeśliby posiadał duży ciężar cząsteczkowy i niewielki nadmiar wolnych grup karboksylowych w stosunku do aminowych. Jednakże dane otrzymane uprzednio przemawiają za niskocząsteczkowym charakterem antybiotyku. Najbardziej prawdopodobnym wydaje się przypuszczenie, że wolne grupy końcowe w cząsteczce antybiotyku: karboksylowa i aminowa pozostają w stosunku równoważnym z tym jednakże, że jakieś dodatkowe ugrupowanie wywiera wpływ na grupę



Rys. 3. Krzywa ruchliwości elektroforetycznej tetaininy

Elektroforeza bibułowa. Bibuła Whatmana Nr 1. Bufor octanowy, fosforanowy i weronalowy o sile jonowej  $\mu = 0,1$ . Napięcie  $9,3 \text{ V/cm}$ . Krzywa wyznacza wartość punktu izoelektrycznego  $= 4,4$ .

karboksylową w kierunku pewnego zwiększenia jej kwasowości (lub zmniejsza zasadowość grupy aminowej).

W zakończeniu pracy wyrażamy podziękowanie prof. S. K r y ń s k i e m u za przygotowanie płytek ze szczepem *Shigella shigae*.

### Streszczenie

Stosując metodę elektroforezy bibułowej zbadano obecność wolnych końcowych grup aminowej i karboksylowej w tetainie, polipeptydowym niskocząsteczkowym antybiotyku wytwarzanym przez szczep „*ø*” — *B. pumilus*.

Elektroforezę prowadzono w łaźni z olejem parafinowym. Stosowano bufory: octanowy, fosforanowy i weronalowy o sile jonowej  $\mu = 0,1$ . Napięcie wynosiło  $9,3 \text{ V/cm}$ . Dla kontroli metody przeprowadzono pomiar punktu izoelektrycznego histydyny, uzyskując dane zgodne z literaturą. Zbadano ruchliwość elektroforetyczną tetainy w zakresie  $\text{pH} 3,5\text{--}8,5$ .

Uzyskana krzywa wyznacza punkt izoelektryczny tetainy przy  $pH = 4,4$ . Jest to dowodem, że tetaina posiada wolne końcowe grupy aminową i karboksylową. Wartość punktu izoelektrycznego wskazuje ponadto na to, że stosunek wzajemny tych grup w cząstce peptydu jest prawdopodobnie jak 1 : 1.

#### LITERATURA

- [1] Borowski E., *Przemysł Chemiczny* 9, 503, 1955.
- [2] Borowski E., *Acta Biochim. Polon.*, 4, 231, 1957.
- [3] Borowski E., Borowska Z., *Biul. Instyt. Medyc. Morskiej* 8, Nr 1/2, 69, 1957.
- [4] Borowski E., Borowska Z., Kryński S., Wasielewska D., *Biul. Instyt. Medyc. Morskiej* 8, Nr 1/2, 1957.
- [5] Boyd W. C., *J. Am. Chem. Soc.* 67, 1035, 1945.
- [6] Mc Donald H. J., Urbin M. C., Williamson M. M., *J. Colloid Sci.* 6, 236, 1951.
- [7] Miller G. L., Golden R. H., *Arch. Biochem.* 29, 420, 1950.
- [8] Kryński S., Borowski E., Kuchta A., Borowski J., Becla E., *Biul. Instyt. Medyc. Morskiej* 3, 301, 1952.
- [9] Kunkel H. G., Tiselius A., *J. Gen. Physiol.* 35, 89, 1951.

#### ИССЛЕДОВАНИЯ ХИМИЧЕСКОГО СТРОЕНИЯ ТЕТАИНА.

##### I. ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

##### Резюме

При помощи электрофореза на бумаге авторы произвели определения свободных аминных и карбоксильных групп тетина — низкомолекулярного полипептидного антибиотика, выделяемого штаммом „9” — *V. pumilus*.

Электрофорез проводился на парафиновой бане. Применялись ацетатный, фосфатный и вероналовый буферные растворы с ионной силой  $\mu = 0,1$ . Напряжение тока равнялось 9,3 в/см. Для контроля метода было произведено определение изоэлектрической точки гистидина. Полученные результаты совпадали с литературными данными.

Определялась электрофоретическая подвижность тетина при  $pH$  3,5—8,5. Из полученной кривой следует, что изоэлектрическая точка тетина лежит при  $pH = 4,4$ . Это является доказательством наличия в тетине свободных крайних групп — карбоксильной и аминной.

Изоэлектрическая точка тетина показывает также, что взаимное отношение этих групп в молекуле пептида составляет, повидимому, 1:1.



## STUDIES ON THE CHEMICAL STRUCTURE OF TETAINE

## I. ELECTROPHORETIC INVESTIGATIONS

## Summary

By means of paper electrophoresis free terminal amine and carboxylic groups have been found in tetaine, the low-molecular weight polypeptide antibiotic substance produced by strain "6" of *B. pumilus*.

Electrophoresis was carried out in a paraffin oil bath. Acetate-, phosphate-, and veronal buffers of ionic strength  $\mu = 0.1$  were used. The voltage applied was 9.3 V/cm.

The method was checked by determining the isoelectric point of histidine, and the data obtained were in agreement with those found in literature. The electrophoretic mobility of tetaine was determined within the range of pH. 3.5—8.5. The curve obtained shows the isoelectric point to be at pH = 4.4. It proves that tetaine possesses the free terminal amine and carboxylic groups. Moreover, the value of the isoelectric point shows that the ratio of the two groups in the peptide molecule is probably 1 : 1.

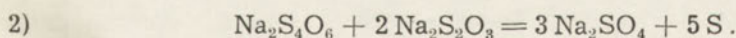
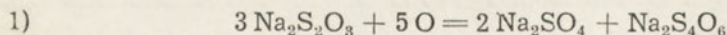
Otrzymano 7.5.1957 r.

W. OSTROWSKI i A. KRAWCZYK

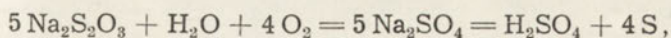
## BIOCHEMIA SAMOŻYWNYCH BAKTERII SIARKOWYCH

IV. BADANIA NAD PRZEMIANĄ SIARKI W *THIOBACILLUS THIOPARUS*  
PRZY ZASTOSOWANIU  $^{35}\text{S}$ Z Zakładu Chemii Fizjologicznej A. M. w Krakowie  
Kierownik: prof. dr B. Skarżyński

Jednym z podstawowych zagadnień dotyczących metabolizmu tlenowego autotrofa, *Th. thioparus*, jest mechanizm utleniania tiosiarczanu przez ten drobnoustrój, a więc mechanizm procesu będącego źródłem energii dla przyswajania  $\text{CO}_2$ . Dotychczas zagadnienie to rozpatrywano na podstawie bilansu między rozłożonym przez drobnoustrój tiosiarczanem i ostatecznymi produktami tego rozkładu, którymi są jon  $\text{SO}_4^-$  oraz pierwiastkowa siarka. Nathanson [1], który pierwszy zajmował się tą sprawą, przyjmował, że utlenienie tiosiarczanu przebiega przez stadium tetratioanenu, powstająca w toku tej reakcji wolna siarka miała być wg Nathansona produktem reakcji wtórnej między tetratioanem a tiosiarczanem. Proces ten Nathanson ujmował następującymi równaniami:



Starkey [5] stwierdzając, że w toku utleniania tiosiarczanu przez *Th. thioparus* 60% siarki zamienia się na jon siarczanowy, a 40% na siarkę pierwiastkową, sformułował przebieg reakcji w poniższy sposób:

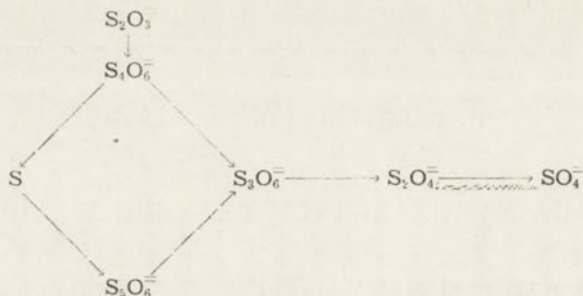


nie usiłując wytłumaczyć poszczególnych etapów tej reakcji.

Vishniac [9] twierdzi, że utlenianie tiosiarczanu przebiega przez stadia politionianów, a to na tej podstawie, iż wykazał on, że *Th. thio-*



*parus* utlenia nie tylko tiosiarczany, lecz również di-, tri- i tetrationian. Poglądy Vishniaca można ująć schematycznie w poniżej podany sposób:



Prowadzone od szeregu lat w naszym Zakładzie badania [2, 4, 6] skłoniły nas do prób mających na celu wyjaśnienie powyżej przedstawionego spornego zagadnienia. W tym celu posłużyliśmy się tiosiarczaniem znaczącym  $^{35}\text{S}$ , co pozwoliło nam również śledzić losy siarki tiosiarczaniu w obrębie samej komórki drobnoustroju, a więc przede wszystkim jej wbudowywanie w połączenia organiczne wytwarzane przez *Th. thioparus*.

## Metody

### ZAPASOWA HODOWLA *TH. THIOPARUS*

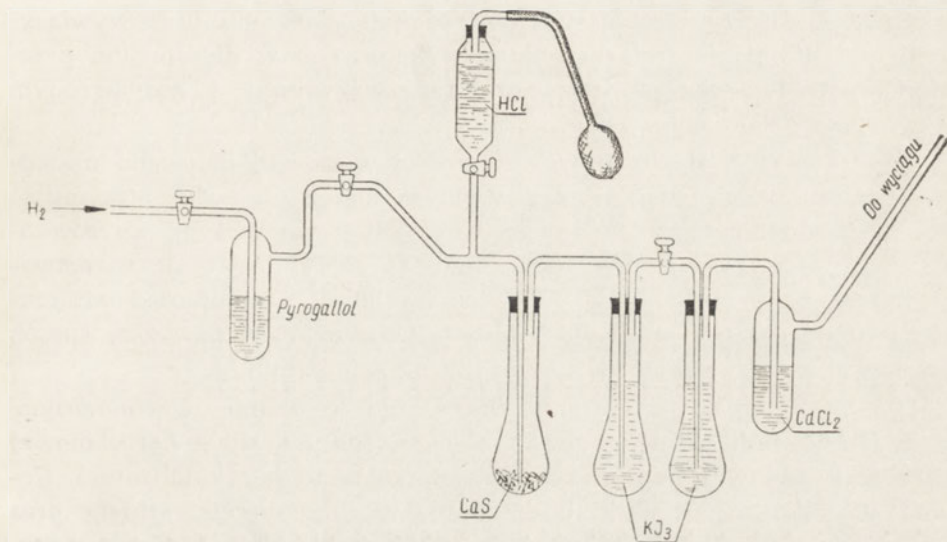
Szczep *Th. thioparus* wyizolowany ze źródła siarczanego w Swoszowicach k. Krakowa przenoszono w trzydniowych odstępach na pożywkę płynną o składzie: 5 g  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 1 g  $\text{NaHCO}_3$ , 0,2 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,1 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0,05 g  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , ślady soli Mohra, kobaltu i manganu rozpuszczone w 1 litrze wody destylowanej. Celem otrzymania większej ilości komórek bakteryjnych szczepiono 200 do 400 l pożywki o powyższym składzie pozostawiając w temperaturze pokojowej przy równoczesnym przepuszczaniu powietrza przez hodowlę dla zwiększenia stężenia tlenu w pożywce. Po trzydniowym okresie wzrostu (bakterie znajdują się wówczas w logarytmicznej fazie wzrostu) komórki sączone przez świecę Berkefelda, oddzielano od elementarnej siarki przez różnicowe wirowanie, (siarka oddziela się od zawiesiny bakterii przy 1000 obr./min. w ciągu 2 min. wirowania, natomiast bakterie odwirowywano przy 10 tys. obr./min.), przemywano wodą destylowaną otrzymując czysty materiał do badania.

### SYNTEZA TIOSIARCZANU ZNACZONEGO $^{35}\text{S}$

Dla wyjaśnienia zagadnienia, który z dwu atomów siarki tiosiarczaniu jest wbudowywany w organizm komórki, konieczne było otrzymanie na

drodze syntezy tiosiarczanu znaczonego z osobna w atomie zewnętrznym (grupa -SH) i wewnętrznym (grupa  $-\text{SO}_3\text{H}$ ). Ponieważ dysponowaliśmy  $^{35}\text{S}$  w postaci siarczanu sodu, zaistniała konieczność opracowania metody redukcji siarczanu do wolnej siarki, z której można by było otrzymać jedną lub drugą odmianę znaczonego tiosiarczanu. Metoda opracowana przez nas polega na ogrzewaniu suchego siarczanu sodu z wodorkiem wapnia. Otrzymany siarczek rozkładano przy pomocy HCl, a wytworzony  $\text{H}_2^{35}\text{S}$  utleniano roztworem jodu do wolnej siarki.

Do ok. 0,5 g nieradioaktywnego siarczanu sodu umieszczonego w moździerzu dodawano zależnie od potrzeby określoną objętość roztworu



Rys. 1. Aparatura do wywiązywania i utleniania  $\text{H}_2^{35}\text{S}$

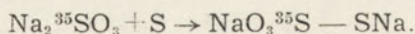
$\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$  odpowiadającą zwykle 1—3 mC, po czym odparowywano do sucha promieniami podczerwonymi. Bezwodny siarczan rozcierano następnie z ok. 0,5 g wodorku wapnia bardzo dokładnie, otrzymując silnie sproszkowaną mieszaninę. Proszek przenoszono do kolbki z trudnotopliwego szkła. Ponieważ reakcja przebiega bardzo gwałtownie, co się objawia m. in. wyrzuceniem z kolby dużej ilości dymu wraz z grudkami zawartości kolby, wskazane jest nałożenie na szyjkę kolby długiej rury szklanej, której drugi koniec skierowany jest do wyciągu, usuwającego radioaktywny pył. Przy możliwie szybkim ogrzewaniu palnikiem o wysokiej temperaturze, w pewnym momencie mieszanina w kolbie rozżarza się gwałtownie, co świadczy o zakończeniu reakcji. Kolbę z tak otrzymanym siarczkiem wapnia przenoszono do aparatury (Rys. 1) do wywiązywania siarkowodoru i jego równoczesnego utleniania. Aparatura



ture napelniano najpierw wodorem, a następnie bardzo powoli kroplami dodawano HCl do kolby z siarczkiem. Wywiązujący się siarkowódor przechodził następnie do płuczki z roztworem jodu w jodku potasu zakwaszonym HCl, gdzie ulegał utlenieniu. W razie wyczerpania jodu w pierwszej płuczce, siarkowódor był utleniany w następnej. Dla całkowitego zabezpieczenia załączono jeszcze płuczkę z roztworem chlorku kadmu, do której dołączono rurę skierowaną wprost do kanału wyciągu. Po wyparciu siarkowodoru, przez aparaturę przepuszczano jeszcze przez dłuższy czas wodór celem całkowitego wypłukania siarkowodoru, a następnie płuczkę z koloidalną siarką po uprzednim zredukowaniu nadmiaru jodu stężonym roztworem siarczku sodu, pozostawiano na całą noc. Całość prac związanych z redukcją siarczanu oraz wywiązywaniem i utlenianiem siarkowodoru wykonywano w digestorium przeznaczonym do prac z izotopami radioaktywnymi i zaopatrzonym w sprawnie działający wyciąg.

Odwirowaną siarkę o dużej aktywności właściwej gotowano następnie pod chłodnicą zwrotną z roztworem siarczynu sodu, otrzymując w ten sposób tiosiarczan znaczonej w atomie zewnętrznym, wg równania:  $^{35}\text{S} + \text{Na}_2\text{SO}_3 \rightarrow \text{NaO}_3\text{S} - ^{35}\text{SNa}$ . Radioaktywny tiosiarczan z roztworu wytrącano przez dodanie odpowiedniej ilości etanolu, osad odsączano i suszono grzejnikiem podczerwonym. Otrzymany w powyższy sposób tiosiarczan wykazywał od 100 tys. do 1 250 tys. imp./min./g.

Dla otrzymania tiosiarczanu znaczonego w atomie wewnętrznym, umieszczano radioaktywną siarkę elementarną na łożdce porcelanowej w rurze kwarcowej i spalano w atmosferze tlenu bez katalizatora. Celem zatrzymania par siarki umieszczano w rurze perełki szklane oraz azbest, gdzie zatrzymana nie spalona siarka mogła być powtórnie ogrzana do temperatury reakcji z tlenem. Dwutlenek siarki chwymano w roztworze wodorotlenku sodu. Otrzymany siarczyn wytrącano alkoholem, sączono, przemywano alkoholem i rozpuszczano w wodzie. Gotując radioaktywny siarczyn z tzw. siarką strąconą nieradioaktywną, otrzymywano tiosiarczan znaczonej w atomie wewnętrznym w myśl równania:



#### POMIAR RADIOAKTYWNOŚCI

Wszystkie pomiary radioaktywności wykonywano przy pomocy licznika Geigera-Müllera typu kielichowego z okienkiem mikowym o grubości 2 mg/cm<sup>2</sup> o śr. 25 mm<sup>1</sup> połączonym z przelicznikiem binarnym

<sup>1</sup> Posługiwano się licznikami produkowanymi przez Zakład Fizyki Ogólnej AGH w Krakowie, kierowany przez prof. dr Mięsołowicza.

z mechanicznym rejestratorem co 256 impulsów. Tło licznika nieosłoniętego wynosiło 18—25 imp./min. Pomiaru roztworów dokonywano na szklanej płytce Petriego, próbki stałe mierzono na miseczkach aluminiowych o śr. 20 mm, głębokości 3 mm i grubości 1 mm. Miseczki umieszczano pod licznikiem w stałym położeniu na podstawie z pleksiglasu w odległości 3 mm od okna licznika.

#### a) Pomiar radioaktywności pożywki

Próbkę hodowli wirowano przy 10 tys. obr./min. celem oddzielenia bakterii i wolnej siarki, a następnie oznaczano aktywność w próbce nieoskóńczenie grubej. W niektórych przypadkach aktywność pożywki oznaczano przez odparowanie 0,1 ml na miseczce aluminiowej i mierzono aktywność suchej pozostałości.

#### b) Pomiar radioaktywności wolnej siarki

Elementarną siarkę z pożywki odwirowywano przy 1000 obr./min. w ciągu 2 min. Osad przemyto wodą i w postaci gęstej papki przenoszono na parowniczkę, po czym odparowywano do sucha w podczerwieni. Osad rozpuszczano w  $CS_2$ , roztwór przelewano na inną parowniczkę i znów odparowywano do sucha. (W ten sposób usuwa się różne zanieczyszczenia i nieliczne komórki bakteryjne, które zostały odwirowane wraz z siarką). Pozostałą grudkę czystej siarki rozpuszczano w 2—5 ml  $CS_2$ , odpipetowywano 0,025—0,15 ml na krążek bibuły, a po odparowaniu  $CS_2$  bibułę umieszczano na podstawie z pleksiglasu i mierzono aktywność.

#### c) Pomiar radioaktywności bakterii

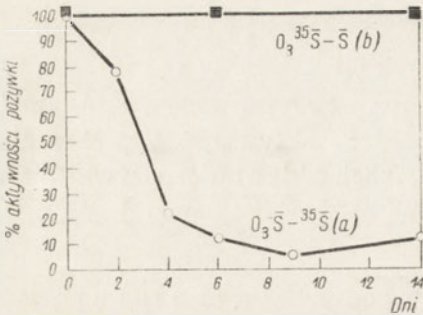
Aktywność bakterii oznaczano na miseczce aluminiowej w postaci suchej próbki. W pomiarach, przy których było to konieczne, uwzględniano poprawkę na samoabsorpcję. W doświadczeniach, których czas wynosił więcej niż jeden dzień, uwzględniano poprawkę na fizyczny zanik pierwiastka obliczając ją ze wzoru:  $I = I_0 \times 0,5^{t/87}$ , gdzie  $I$  — jest aktywnością w czasie  $t$ ,  $I_0$  — aktywność w czasie 0. Wszystkie doświadczenia z wbudowywaniem  $^{35}S$  do komórek przeprowadzano w temp.  $35^\circ$ , używając łaźni wodnej podczas inkubacji.

## Wyniki

Pierwsze nasze doświadczenia miały na celu wyjaśnienie losów pojedynczych atomów siarki zawartych w cząsteczkach tiosiarczanu. Chodziło o stwierdzenie czy siarka grupy SH i siarka grupy siarczanowej w tym samym stopniu zostaje wykorzystana przez *Th. thioparus*, czy też jeden tylko z tych atomów bierze udział w metabolizmie drobnoustroju.



W tym celu do pożywki dodawano tiosiarczan znaczonej w atomie wewnętrznym ( $O_3^{35}\bar{S} - \bar{S}$ ), uzyskując roztwór, którego 1 ml dawał ok. 6 600 imp./min. Po zaszczepieniu zawiesiną *Th. thioparus* co kilka dni kontrolowano aktywność pożywki oraz siarki pierwiastkowej wydzielonej podczas utleniania tiosiarczanu.



Rys. 2. Zmiany radioaktywności pożywki podczas hodowli bakterii na obu typach znaczonego tiosiarczanu

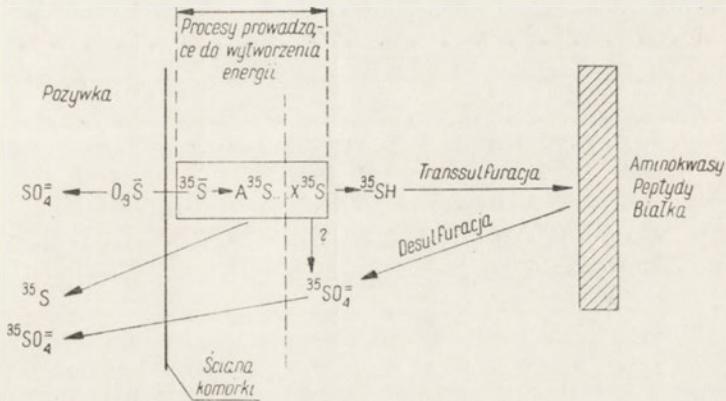
Rys. 2 przedstawia zmiany aktywności w pożywce podczas dwutygodniowego okresu wzrostu bakterii. Jak widać z krzywych, aktywność pożywki zmieniała się tylko w przypadku hodowania bakterii na pożywce z tiosiarczanem znaczonej w grupie SH. Aktywność natomiast nie ulegała zmianie w przypadku tiosiarczanu znaczonego w atomie wewnętrznym. Wolna siarka wydzielona podczas wzrostu bakterii nie wykazywała żadnej aktywności. Pod koniec inkubacji bakterie odwirowano, przemyto kilkakrotnie wodą i badano na obecność radioaktywnej siarki. I w tym przypadku nie wykryto żadnej aktywności w granicach błędów metody pomiaru.

Z powyższych danych wynika, że wewnętrzny atom siarki tiosiarczanu nie wchodzi do komórki bakteryjnej i nie jest zużywany do procesów biologicznych. Wolna siarka wydzielona w czasie utleniania tiosiarczanu musi więc pochodzić z odszczepienia zewnętrznego atomu wg równania  $O_3^{35}\bar{S} - \bar{S} \rightarrow ^{35}SO_4 + S$ . Analogiczne doświadczenie przeprowadzono dodając do pożywki tiosiarczan znaczonej w atomie zewnętrznym ( $O_3\bar{S} - ^{35}\bar{S}$ ). Krzywa a na rys. 2 przedstawia zmiany radioaktywności podczas wzrostu bakterii po odwirowaniu siarki i bakterii. Po sześciu dniach inkubacji w pożywce pozostaje zaledwie 10% pierwotnej aktywności, ok. 90% aktywności zostaje natomiast wydzielone w postaci elementarnej siarki, względnie wbudowane do bakterii, które wykazują w tym czasie wysoką aktywność właściwą. Z doświadczeń należy wnioskować, że utlenienie tiosiarczanu odbywa się na powierzchni komórki, przy czym poprzez ścianę komórki przedostaje się tylko zewnętrzny atom siarki, natomiast pozostała część cząsteczki tiosiarczanu pozostaje w pożywce (patrz schemat na rys. 3).

Należy również zwrócić uwagę na fakt, że aktywność pożywki od dziewiątego dnia inkubacji zaczyna wzrastać. Jest to spowodowane wydalaniem do pożywki jonu  $^{35}SO_4^-$ , który wykazano przez wytrącenie w postaci  $Ba^{35}SO_4$  i oznaczono aktywność. Jak wskazują dalsze wyniki zawarte w tej pracy, ok. 25% aktywności zawartej w bakteriach wydziela się

w postaci jonu  $^{35}\text{SO}_4^-$ . Z uwagi na powyższe wyniki, wszystkie następne doświadczenia przeprowadzano z tiosiarczanem znaczoneym w atomie zewnętrznym.

Celem zbadania szybkości przemiany  $^{35}\text{S}$  w obrębie komórek drobnoustroju, bakterie hodowano przez 3 dni na pożywkę radioaktywnej, następnie oddzielono je od siarki i przemyto 3-krotnie wodą. Następnie



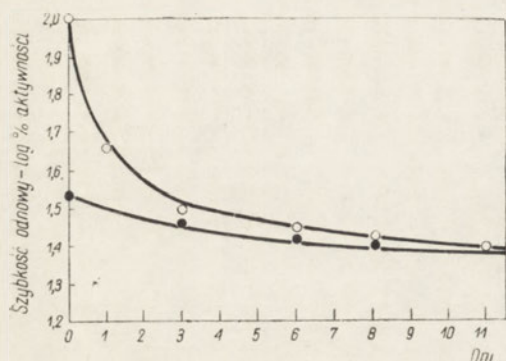
Rys. 3. Schemat przemian  $^{35}\text{S}$ -tiosiarczanu u *Th. thioparus*

przeniesiono komórki do pożywki nieradioaktywnej zawierającej wszystkie składniki zabezpieczające optymalny wzrost. Podczas wzrostu pobierano próbki odpowiedniej objętości, odwirowywano bakterie i oznaczano aktywność w całych bakteriach. Przebieg zmiany aktywności w zależności od czasu inkubacji przedstawia krzywa na rys. 4 (punkty jasne). Z rysunku tego widać, że w początkowym okresie krzywa szybko zbliża się do osi odciętych i po trzech dniach inkubacji w bakteriach pozostaje ok. 30% pierwotnej aktywności. Dalszy spadek aktywności jest coraz powolniejszy i po 11 dniach hodowania w bakteriach pozostaje ok. 25%  $^{35}\text{S}$ .

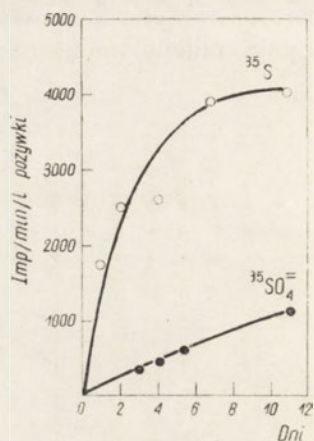
Przebieg krzywej (punkty jasne) na rys. 4 pozwala na wysunięcie wniosku, znajdującego zresztą poparcie w wynikach badań nad rozmieszczeniem aktywności zawartej w komórkach siarki w poszczególnych frakcjach chemicznych. Mamy tu do czynienia z dwoma radioaktywnymi składnikami komórki; jednym odnawiającym się bardzo szybko, z czasem biologicznym półdnym ok. 1 dzień i drugim cechującym się biologicznym czasem półdnym ok. 10—11 dni. Szybko odnawiający się składnik reprezentowany jest przez wolną siarkę, na którą przypada ok. 60% całkowitej zawartości  $^{35}\text{S}$  w komórce. Szybkie wydalenie wolnej siarki związane jest z intensywnym utlenianiem tiosiarczanu zachodzącym w obwodowych częściach komórki lub w samej ścianie.



Druga krzywa na rys. 4 (punkty ciemne) przedstawia zanik aktywności we frakcji białkowej komórek, pozostającej po ekstrakcji bakterii etanolem i kwasem trójchlorooctowym (patrz niżej). Frakcja ta początkowo zawiera ok. 30% aktywności  $^{35}\text{S}$  zawartej w komórce i wymiana siarki



Rys. 4. Szybkość odnowy  $^{35}\text{S}$ : O — O w całych bakteriach, ● — ● we frakcji białkowej



Rys. 5. Krzywe wydalenia  $^{35}\text{S}$  z bakterii do pożywki w postaci elementarnej siarki: O — O oraz jonu  $\text{SO}_4^-$ : ● — ●

w tej frakcji przebiega bardzo powoli. Po 11 dniach wzrostu bakterii ok. 5% siarki zostało wydalone z białek, przy czym w tym też czasie obie krzywe nakładają się, co wskazuje, że pozostała radioaktywność w komórkach zawarta jest jedynie w składnikach wielkocząsteczkowych.

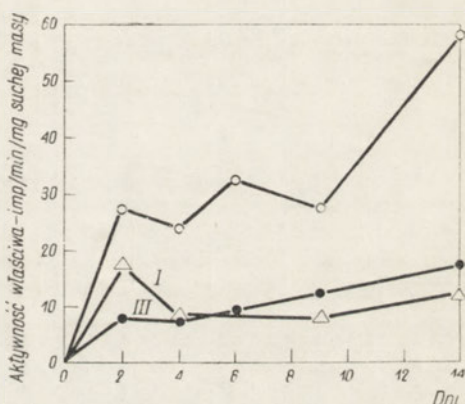
Dla określenia stosunku wydzielonej aktywności w postaci elementarnej siarki i w postaci jonu  $\text{SO}_4^-$ , hodowane uprzednio bakterie na pożywce radioaktywnej (ok. 0,5 g wilgotnej masy) przeniesiono do dwu litrów pożywki nieradioaktywnej i codziennie z całej hodowli odwirowywano siarkę, a bakterie z pozostałą pożywką pozostawiano do dalszej inkubacji w termostacie. Małą ilość pożywki odwirowywano od bakterii i po zadaniu  $\text{BaCl}_2$  badano aktywność osadu. Aktywność siarki elementarnej badano, jak podano w opisie metody. Rys. 5 przedstawia przyrost aktywności w pożywce na skutek wydzielania siarki oraz jonu  $\text{SO}_4^-$ . Jak widać, ok. 4 razy więcej aktywności wydala się w postaci wolnej siarki niż w postaci  $\text{SO}_4^-$ . Wydzielanie radioaktywnej siarki kończy się po ok. 7 dniach inkubacji i krzywa w dalszym swym przebiegu jest równoległa do osi odciętych. Przyrost aktywności w postaci  $\text{SO}_4^-$  natomiast ciągle wzrasta. Czas zakończenia wydalenia wolnej siarki przypadający na okres 7 dni jest zapewne nieco dłuższy niż w rzeczywistości, ponieważ trudno-

ści techniczne nie pozwalają na całkowite oddzielenie siarki zaokludowanej na bakteriach, stąd radioaktywność daje się oznaczać przez czas dłuższy niżby to miało miejsce w wypadku całkowitego usunięcia siarki z pożywki.

Krzywa wzrostu *Th. thioparus* w ciągu kilkunastodniowej inkubacji przedstawia charakterystyczny przebieg. Po 2—3 dniach szybkiego podziału kcmórek następuje kilkunastodniowy okres stacjonarny. Podczas tego okresu tiosiarczan zostaje zużywany z pożywki, ale wyzwolona w procesie utlenienia energia nie jest wykorzystywana na budowę masy bakterii. Po okresie zatrzymania podziału komórek znów rozpoczyna się okres dzielenia się bakterii, jakkolwiek powolniejszy niż bezpośrednio po przeniesieniu bakterii do świeżej pożywki.

W celu zbadania rozmieszczenia przyswojonej siarki we frakcjach chemicznych składników komórek, odwirowaną z płynnej części hodowli radioaktywnej masę bakterii, po uprzednim oddzieleniu od siarki i przemyciu 3-krotnym wodą, ekstrahowano najpierw 60% wrzącym etanolem [8] w ciągu 15 min. (frakcja I). Po odwirowaniu pozostałość wyciągano następnie 5% roztworem kwasu trójchlorooctowego w temp. +2° przez 15 min. [3] (frakcja II), w końcu wytrącony osad przemywano i zawieszano go w odpowiedniej objętości 50% formamidu [7] (frakcja III). Frakcję rozpuszczalną w kwasie trójchlorooctowym przemywano trzykrotnie eterem celem usunięcia z roztworu kwasu trójchlorooctowego. Z każdej frakcji odpipetowywano na miseczkę aluminiową określoną objętość roztworu (0,2—0,5 ml) i po odparowaniu lampą podczerwoną mierzono aktywność, ważono i przeliczano w imp./min./mg suchej masy.

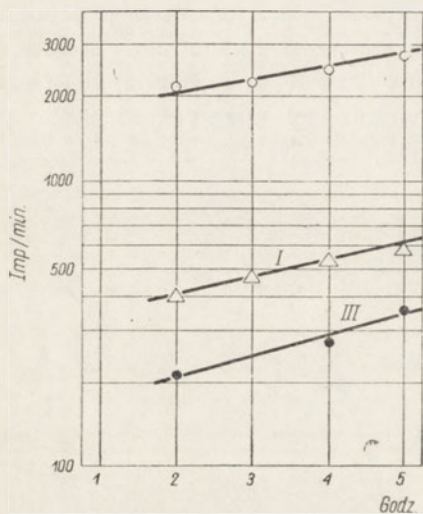
Rys. 6 przedstawia zmiany aktywności właściwej podczas 14-dniowej inkubacji w całych bakteriach, we frakcji rozpuszczalnej w alkoholu oraz we frakcji nierozpuszczalnej w alkoholu i kwasie trójchlorooctowym, czyli w białkach. Frakcja II praktycznie nie zawiera radioaktywności (patrz niżej), dlatego na rysunku nie jest reprezentowana. Krzywa zmian aktywności w pełnych bakteriach odpowiada mniej więcej krzywej wzrostu.



Rys. 6. Zmiany aktywności właściwej we frakcjach chemicznych komórek hodowanych na pożywce radioaktywnej: ○—○ cała komórka, Δ—Δ frakcja rozpuszczalna, ●—● frakcja białkowa



W pierwszym okresie wzrostu dużą aktywność właściwą wykazuje frakcja I, podczas fazy stacjonarnej aktywność właściwa frakcji rozpuszczalnej w alkoholu spada, natomiast aktywność frakcji białkowej powoli wzrasta. Z chwilą rozpoczęcia się ponownego okresu szybkiego wzrostu, znów wzrasta aktywność frakcji I i III, lecz wolniej niż aktywność całych komórek bakteryjnych. Można stąd wyciągnąć wniosek, że w tym okresie wzrostu mikroorganizmu zahamowany jest proces wydalania siarki pierwiastkowej. Po rozbiciu bakterii działaniem wrzącego alkoholu zostaje ona usunięta z obrębu komórek.



Rys. 7. Rozmieszczenie radioaktywności we frakcjach komórek w okresie stanu równowagi: O — O całe bakterie, Δ — Δ frakcja białkowa, ● — ● frakcja rozpuszczalna w alkoholu

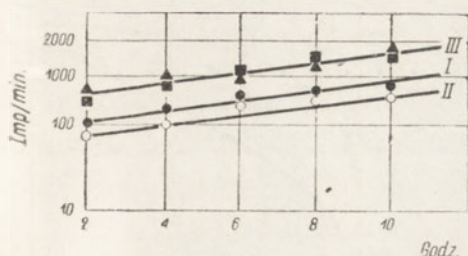
Po rozbiciu bakterii działaniem wrzącego alkoholu zostaje ona usunięta z obrębu komórek.

Odmienne przedstawia się natomiast sytuacja w logarytmicznej fazie wzrostu. Przyrost radioaktywności we frakcji rozpuszczalnej w 60% wrzącym etanolu jak i we frakcji białkowej jest proporcjonalny do wzrostu radioaktywności w całych komórkach. Rys. 7 przedstawia rozmieszczenie siarki we frakcjach bakterii podczas inkubacji na pożywce z radioaktywnym tiosiarczanem. Co godzinę pobierano 25-ml próbki zawiesiny i po odwirowaniu i przemyciu komórek, poddawano je frakcjonowaniu jak poprzednio. Frakcja rozpuszczalna w alkoholu zawiera ok. 10% radioaktywnej siarki. Przy badaniu chromatograficznym niehydrolizowana frakcja wykazuje kilka plam

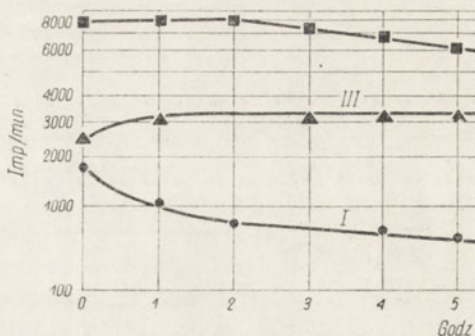
barwiących się ninhydriną i wykazujących radioaktywność, poza tym stwierdza się kilka plam radioaktywnych nie barwiących się ninhydriną. Frakcja białkowa, nierozpuszczalna w alkoholu i kwasie trójchlorooctowym zawiera ok. 30% siarki w stosunku do ogólnej radioaktywności. Reszta radioaktywności, tj. ok. 60% znajduje się w postaci elementarnej siarki zawartej w komórkach, która po rozbiciu bakterii zostaje oddzielona od pozostałych składników.

Aby porównać rozpuszczalność składników komórkowych w 60% alkoholu i w 5% zimnym roztworze kwasu trójchlorooctowego, bakterie inkubowano na pożywce radioaktywnej i w określonych odstępach czasu pobierano próbki zawiesiny, które dzielono na dwie różne części. Jedną ekstrahowano alkoholem, a drugą kwasem trójchlorooctowym. Rys. 8 przedstawia rozmieszczenie radioaktywnej siarki we frakcjach I, II i III.

Z wykresu widać, że aktywność frakcji rozpuszczalnej w kwasie trójchlorooctowym jest nieco niższa niż aktywność frakcji rozpuszczalnej w alkoholu. Jest to prawdopodobnie spowodowane stratą aktywności podczas ekstrakcji tej frakcji eterem przed oznaczeniem, dla usunięcia kwasu trójchlorooctowego z roztworu. Wskazuje również na to, że aktywność frakcji



Rys. 8. Porównanie radioaktywności frakcji chemicznych komórek rozpuszczalnych w 60% etanolu: ●—● i 5% kwasie trójchlorooctowym: ○—○, frakcja białkowa po ekstrakcji kwasem trójchlorooctowym: ▲—▲, frakcja białkowa po ekstrakcji etanolem: ■—■



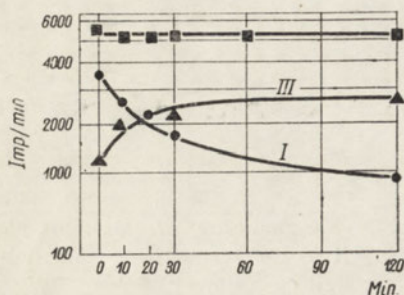
Rys. 9. Metaboliczne przeniesienie  $^{35}\text{S}$  z frakcji rozpuszczalnej w alkoholu do frakcji białkowej: ●—●, po 15-min. zanurzeniu bakterii w pożywce radioaktywnej: ▲—▲, radioaktywność w całych komórkach: ■—■

białkowych, jako pozostałości po obu zabiegach, jest w obu przypadkach taka sama, gdyż punkty oznaczeń uzyskane po ekstrakcji etanolem i kwasem trójchlorooctowym leżą na tej samej linii, w granicach błędu doświadczenia.

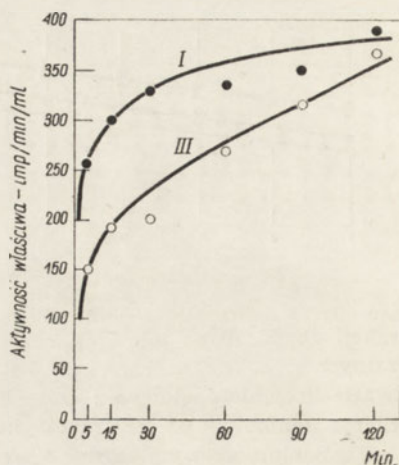
Należało przypuszczać, że frakcja rozpuszczalna w alkoholu lub w kwasie trójchlorooctowym jest zbiorem substancji wykorzystywanych podczas rozwoju bakterii do syntezy innych frakcji, np. syntezy połączeń wielkocząsteczkowych. Dla zbadania tego zagadnienia konieczne było otrzymanie komórek zawierających najwięcej radioaktywnej siarki we frakcji rozpuszczalnej w alkoholu. W tym celu komórki znajdujące się w log fazie wzrostu zanurzano na 15 min. do pożywki radioaktywnej zawierającej tiosiarczan o aktywności ok. 1 000 000 imp./min., a następnie po szybkim odwirowaniu i przemyciu bakterii, przenoszono je do pożywki nieradioaktywnej o takim samym składzie. Podczas dalszej inkubacji pobierano 25-ml próbki zawiesiny, które po odwirowaniu i przemyciu poddano chemicznemu frakcjonowaniu. Rys. 9 przedstawia zmiany radioaktywności w poszczególnych frakcjach podczas pięciogodzinnego okresu inkubacji. Radioaktywność w całych bakteriach przez pierwsze dwie godziny inkubacji utrzymuje się na tym samym poziomie i następnie zaczy-



na się zmniejszać na skutek rozpoczęcia się wydalania elementarnej siarki z obrębu komórek. Frakcja rozpuszczalna w alkoholu, zawierająca początkowo ok. 25% ogólnej radioaktywności, wykazuje szybki spadek aktywności, natomiast aktywność we frakcji białkowej wzrasta. Z przebiegu krzywych wynika, że frakcja białkowa otrzymuje radioaktywność z puli frakcji rozpuszczalnej w alkoholu.



Rys. 10. Metaboliczne przeniesienie  $^{35}\text{S}$  z frakcji rozpuszczalnej w alkoholu do frakcji białkowej po 3 min. zanurzeniu bakterii w pożywkę radioaktywną; oznaczenia jak na rys. 11.



Rys. 11. Krzywe wbudowywania  $^{35}\text{S}$  do frakcji rozpuszczalnej w alkoholu: ●—● i do frakcji białkowej: ○—○

Analogiczne doświadczenie wykonane w znacznie krótszych odcinkach czasu ilustruje rys. 10. K komórki zanurzone do pożywki radioaktywnej tylko na 3 min. i po ich odwirowaniu i przemyciu przeniesiono do pożywki nieradioaktywnej. Podczas dwugodzinnego okresu inkubacji radiaktywność w całych bakteriach utrzymuje się na tym samym poziomie. Początkowa aktywność frakcji rozpuszczalnej w alkoholu wynosi ok. 70% ogólnej aktywności, podczas gdy aktywność frakcji białkowej wynosi ok. 15%. Po kilkunastu minutach inkubacji obie krzywe przecinają się, co jest dostatecznym dowodem przechodzenia radioaktywności z frakcji alkoholowej do frakcji białkowej.

Potwierdzenie powyższych danych wymagało zbadania szybkości wbudowywania  $^{35}\text{S}$  do poszczególnych frakcji komórki. Bakterie znajdujące się w wykładniczej fazie wzrostu inkubowano w pożywkę radioaktywną o aktywności ok. 10 000 imp./min./ml i w krótkich odstępach czasu pobierano próbki zawiesiny. Po odwirowaniu i przemyciu bakterii ekstrahowano je jednakową objętością 60% alkoholu, a frakcję białkową zawieszano w takiej samej objętości 50% formamidu. Aktywność wła-

ściwą przeliczano w imp./min./ml. Przebieg zachodzących zmian przedstawiają krzywe na rys. 11. Mają one charakter prostych funkcji wykładniczych. Jak widać, szybkość wbudowywania siarki we frakcję rozpuszczalną w alkoholu jest znacznie wyższa niż szybkość wbudowywania we frakcję białkową. Frakcja alkoholowa jest zatem metaboliczną pulą dla frakcji białkowej, przy czym ta ostatnia w początkowym okresie wzrostu budowana jest jeszcze ze związków nieradioaktywnych, stąd jej aktywność właściwa jest niższa. Krzywe po dłuższym czasie inkubacji zbliżają się do stanu równowagi, w którym aktywność właściwa siarki w poszczególnych frakcjach jest taka sama.

### Omówienie wyników

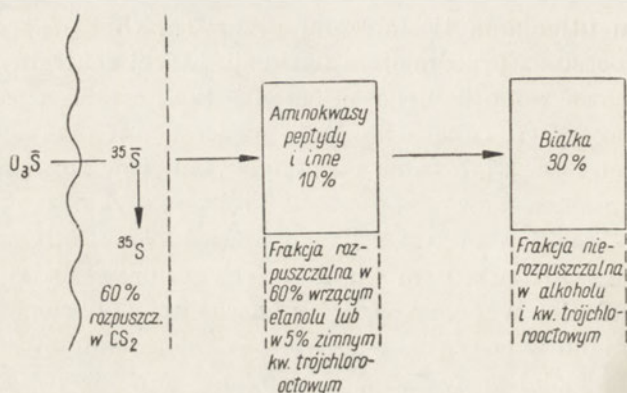
Mechanizm utleniania tiosiarczanu przez *Th. thioparus* oraz kolejne etapy tego procesu są przedmiotem dyskusji, której centralnym zagadnieniem jest sprawa ewentualnego utleniania tiosiarczanu przez pośrednie stadia politionianów. Taką drogę dla procesu utleniania tiosiarczanu kreśli Vishniac [9], a to na podstawie pomiarów zużycia tlenu przez bakterie utleniające tiosiarczan. Vishniac wykazał przy tym, że istotnie tetra- i tritionian jest utleniany przez *Thiobacilli*, na co zresztą zwracało uwagę już przedtem kilku innych autorów badających to zagadnienie. Niemniej w pracy Vishniaca nie wykazano nigdy obecności tetracionianu w pożywce, w której bakterie utleniają tiosiarczan, podobnie jak nie zdołał go wykazać Starkey [5], jak i nigdy nie udało się wykazać tetracionianu w toku innych niepublikowanych jeszcze badań, dotyczących tego zagadnienia, a prowadzonych w naszym Zakładzie.

Opisane w części doświadczalnej wyniki wykazują zdecydowanie, że *Th. thioparus* utlenia tylko atom siarki siarczkowej tiosiarczanu nie naruszając w ogóle reszty cząsteczki tego związku. Fakt ten przemawia przeciw pogładowi, który przypisuje zasadniczą rolę zamiany tiosiarczanu na tetracionian w mechanizmie utleniania tiosiarczanu. W jaki sposób zostaje utleniona biologicznie siarka grupy SH tiosiarczanu, czy w tym procesie powstaje tiosiarczan a potem tetracionian, tego na podstawie naszych dotychczasowych doświadczeń wykazać nie jesteśmy w stanie. W każdym razie możemy wykluczyć przypuszczenie, żeby tetracionian powstawał przy utlenianiu tiosiarczanu pożywki. Zdolność utleniania tetracionianu przez bakterie siarkowe nie może być użyta jako dowód popierający hipotezę Vishniaca, gdyż tetracionian zachowuje w dalszym ciągu zasadniczą strukturę tiosiarczanu, tzn. posiada dwa siarczkowe atomy siarki.



Z doświadczeń naszych wynika również, że siarka grupy siarczanej tiosiarczanu w ogóle nie wnika do wnętrza komórki drobnoustroju. Fakt ten, jak również wielka szybkość, z jaką *Th. thioparus* utlenia tiosiarczan, przemawia za tym, że proces utlenienia siarczkiego atomu siarki w tiosiarczan zachodzi w najbardziej powierzchniowych warstwach komórki. O losach pozostałej reszty cząsteczki tiosiarczanu nie można na razie niczego powiedzieć. Prawdopodobnie nie wchodzi ona już poza obręb komórki, w pożywkę, we wtórne reakcje z niez użytym jeszcze tiosiarczaniem, rezultatem których jest powstawanie siarki i jonu siarczowego, za czym przemawiają przygotowane do publikacji nasze doświadczenia.

Siarka radioaktywna wprowadzona w obręb komórek *Th. thioparus* rozmieszcza się w związkach organicznych dających się oddzielić od sie-



Rys. 12. Schemat rozmieszczenia i przeniesienia metabolicznego <sup>35</sup>S w obrębie komórek *Th. thioparus*

bie przez ekstrahowanie komórek wrzącym 60% etanolem. W ekstrakcie tym znajdują się związki zawierające siarkę, z których część reprezentowana jest przez peptydy i substancje dające odczyn z ninhydriną. Połączenia pozostałe po ekstrakcji, zawierające radioaktywną siarkę, przypadają na składniki białkowe. Poza tym pokaźna część radioaktywności reprezentowana jest przez siarkę pierwiastkową. Po osiągnięciu równowagi metabolicznej między komórkami a pożywką, 10% siarki zawartej w komórkach przypada na organiczne związki niskocząsteczkowe, 30% na białka i 60% na siarkę elementarną (patrz schemat na rys. 12).

Krzywe szybkości wbudowywania siarki do frakcji alkoholowej i białkowej wskazują na to, że frakcja alkoholowa jest pierwotnym zbiorem organicznych połączeń siarki, frakcja białkowa stanowi lokalizację wtórną. Opisane w części doświadczalnej krzywe przemawiają za tym, że frak-

cja związków siarkowych, rozpuszczalnych w 60% etanolu, jest metaboliczną pulą wykorzystywaną do wytwarzania frakcji białkowej. Dalszym zadaniem naszym będzie identyfikacja produktów zawartych we frakcji alkoholowej i wyjaśnienie ich roli w mechanizmie utleniania tiosiarczanu. Badania idące w tym kierunku są w toku.

### Streszczenie

Przeprowadzono badania nad mechanizmem utleniania i wbudowywania tiosiarczanu do komórek *Thiobacillus thioparus*. Autorzy zastosowali w badaniach tiosiarczan ze znaczoną  $^{35}\text{S}$ , przy czym cechowano albo siarkę siarczanową, albo siarkę grupy sulfhydrylowej tiosiarczanu.

W badaniach wykazano, że utlenieniu oraz wbudowywaniu w składniki komórki ulega tylko atom siarki zewnętrzny (grupy  $-\text{SH}$ ) tiosiarczanu. Atcm wewnętrzny ( $-\text{SO}_3\text{H}$ ) najprawdopodobniej nie wchodzi w obręb komórki. Grupa siarczkowa tiosiarczanu jest zarazem jedynym źródłem siarki związanej organicznie w komórkach tego drobnoustroju. Po chemicznym frakcjonowaniu komórek *Th. thioparus* stwierdzono, że ok. 10% radioaktywnej siarki pochodzącej z grupy siarczkowej tiosiarczanu znajduje się we frakcji rozpuszczalnej w 60% wrzącym etanolu, 30% we frakcji białkowej, pozostałą aktywność odnaleziono w elementarnej siarce, uwolnionej z utlenionego tiosiarczanu.

W badaniach kinetycznych wykazano, że frakcja alkoholowa jest budowana jako pierwsza i stanowi metaboliczną pulę dla frakcji białkowej.

### LITERATURA

- [1] Nathanson, A., *Ztschrift. Bakt.* **11**, 109, 1904.
- [2] Ostrowski W., Skarżyński B. i Szczepkowski T. W., *Acta Microbiol. Polon.* **3**, 351, 1954.
- [3] Schneider W. C., *J. Biol. Chem.* **161**, 295, 1945.
- [4] Skarżyński B., Klimek R. i Szczepkowski T. W., *Bull. Acad. Polon. Sci., Cl. II*, **4**, 299, 1956.
- [5] Starkey R. L., *J. Bact.* **28**, 387, 1934.
- [6] Szczepkowski T. W. i Skarżyński B., *Acta Microbiol. Polon.* **1**, 93, 1952.
- [7] Tabern D. L. i Lahr T. N., *Science* **119**, 739, 1954.
- [8] Turba F. i Esser H., *Biochem. Z.* **327**, 93, 1955.
- [9] Vishniac W., *J. Bact.* **64**, 363, 1952.



## БИОХИМИЯ АВТОТРОФНЫХ СЕРНЫХ БАКТЕРИИ.

IV. ИССЛЕДОВАНИЯ НАД МЕТАБОЛИЗМОМ СЕРЫ В *THIOBACILLUS THIOPARUS*  
ПРИ ПРИМЕНЕНИИ  $^{35}\text{S}$ .

## Резюме

Производились исследования над механизмом окисления и вхождения тиосульфата и клетки *Thiobacillus thioparus*. Авторы применили в исследованиях тиосульфат, меченный  $^{35}\text{S}$ , причем применялась метка серы на сульфитной или сульфгидрильной группе тиосульфата.

Авторы нашли, что окислению и внедрению в клеточную структуру подвергается лишь внешний атом серы (группы  $-\text{SH}$ ) тиосульфата. Внутренний атом (группы  $-\text{SO}_3\text{H}$ ), повидимому, не проникает в клетку. Сульфидная группа тиосульфата является в то же время единственным источником органически связанной серы в клетках этого микроорганизма. При химическом фракционировании клеток *Th. thioparus* установлено, что приблизительно 10% радиоактивной серы сульфидной группы тиосульфата содержится во фракции растворимой в кипящем 60% этаноле, 30% в белковой фракции, а остальная активность была найдена в элементарной сере, происходящей из окисленного тиосульфата.

При кинетических исследованиях было показано, что спирторастворимая фракция синтезируется первой и составляет источник для белковой фракции.

## BIOCHEMISTRY OF AUTOTROPHIC SULPHUR BACTERIA

IV. INVESTIGATIONS INTO THE SULPHUR METABOLISM IN *THIOBACILLUS THIOPARUS*  
WITH THE AID OF  $^{35}\text{S}$ 

## Summary

The investigations concerned oxydation, and incorporation into the cells of *Thiobacillus thioparus*, of thiosulphate. The authors used  $^{35}\text{S}$  for labelling which involved either sulphate sulphur or the sulphur of the thiol of the thiosulphate.

In the course of the investigations it was revealed that oxydation, and incorporation into the cell components, involve merely the outer sulphur atom (of the group  $-\text{SH}$ ) of thiosulphate. The inner atom ( $-\text{SO}_3\text{H}$ ) most likely fails to enter into the cell. The sulphide group is at the same time the only source of the sulphur organically combined in the cells of

the micro-organism. After chemical fractionation of *Th. thioparus* cells, about 10 per cent of the labelled sulphur from the sulphide group of the thiosulphate was found to be present in the fraction soluble in boiling 60 per cent ethanol, and 30 per cent was found in the protein fraction: the remaining part was found in elementary sulphur released from oxydised thiosulphate.

Kinetic investigations revealed that the alcohol fraction is the first one to be built up and that it represents a metabolic pool for the protein fraction.

Otrzymano 27.5.1957 r.



The first part of the document is a list of names and titles, followed by a list of dates and times. The text is very faint and difficult to read, but it appears to be a record of some kind of activity or event. The names and titles are listed in a column, and the dates and times are listed in another column. The text is arranged in a table-like format, with the names and titles on the left and the dates and times on the right. The text is very faint and difficult to read, but it appears to be a record of some kind of activity or event.

A. MANITIUS

## O TAK ZWANEJ HEMOLIZIE ODWRACALNEJ

## I. ZMIANY STĘŻEŃ JONÓW NIEORGANICZNYCH. ISTOTA REWERSJI

*Z Zakładu Chemii Fizjologicznej Akademii Medycznej w Gdańsku  
Kierownik: prof. dr W. Mozołowski*

Pod pojęciem rewersji albo odwrócenia hemolizy rozumieć należy proces charakteryzujący się tym, że hemoglobina, która przeszła z krwinek do roztworu i znajduje się w nim w stanie wolnym, ulega ponownemu, częściowemu związaniu ze stromatą krwinek. Ponadto w procesie tym ani hemoglobina ani stromata nie zostają zdenaturowane.

Już w r. 1897 Spiro (cytowane według [17]) zwrócił uwagę na zjawisko, które wielu autorów uważało za „rewersję” hemolizy w podanym powyżej znaczeniu. Jeśli zhemolizować czerwone krwinki przez dodanie do nich wody destylowanej w ilości przekraczającej nawet wielokrotnie ich objętość, to po zadaniu takiego zupełnie zlakowanego płynu roztworem soli, w ilości potrzebnej do doprowadzenia jego stężenia do izotonicznego z krwią, płyn ulega zmętnieniu i makroskopowo przypomina zawiesinę krwinek prawidłowych. Zjawisko to wywołało duże zainteresowanie wśród wielu badaczy w latach dwudziestych i trzydziestych bieżącego stulecia, dowodem czego były nie tylko badania nad mechanizmem samego zjawiska, ale również badania porównawcze przeprowadzane na krwinkach ludzi chorych [np. 4, 5, 7, 9, 12]. Proces ten określać będą w dalszym ciągu jako „rewersję” hemolizy.

Poglądy różnych autorów na istotę mechanizmu „rewersji” były różne. Na ogół jednak wszyscy zajmujący się tym zagadnieniem byli zgodni co do tego, że „rewersja” zachodzi wówczas, gdy nastąpiła tylko chromoliza bez stromatolizy. Natomiast co do tego, czy zjawisko to jest prawdziwą czy też „pseudo-rewersją”, poglądy były sprzeczne. Jedni autorzy, między innymi Brinkman i Szent-Györgyi [6], w szczególności zaś Starlinger [16—24] uważali, że opisany proces jest rzeczywistym odwróceniem hemolizy. Druga grupa autorów — liczniejsza—



reprezentowana m. in. przez Barona [1, 2], traktowała to zjawisko jako pozorną „rewersję” i tłumaczyła je tym, że w roztworze hypotonicznym krwinki pęcznieją tracąc równocześnie część swojej hemoglobiny; po doprowadzeniu płynu do izotonii następuje kurczenie się krwinek z równoczesnym zagęszczeniem pozostałego w ich wnętrzu barwika. Badania przeprowadzone nad zawartością hemoglobiny w płynie i krwinkach w czasie hemolizy i po jej „rewersji” dawały sprzeczne wyniki, a nawet te same wyniki były różnie interpretowane przez różnych autorów [np. 1, 2, 21]. Wyniki badań mikroskopowych były również niejednokrotnie sprzeczne.

W ostatnich latach Straub i współpracownicy [25, 26, 27] podjęli badania nad „rewersją” hemolizy i opierając się na stwierdzonych przez siebie własnościach przepuszczalności otoczki krwinek w czasie hemolizy i po jej „rewersji”, przeprowadzili szereg doświadczeń nad metabolizmem krwinek czerwonych, posługując się w tych badaniach krwinkami „rewertowanymi”. Ponieważ możliwość zastosowania tych krwinek dla badań nad przepuszczalnością wydawała się bardzo korzystna, postanowiłem opierając się na doświadczeniach Strauba i współpracowników zbadać wpływ różnych czynników na „rewersję” hemolizy, by ewentualnie móc później użyć krwinki „rewertowane” do badań nad przepuszczalnością błon komórkowych.

Poza badaniami nad wpływem różnych czynników na proces „rewersji” usiłowałem również przeprowadzić doświadczenia mające na celu stwierdzenie, czy cały proces jest rzeczywistą czy też pseudorewersją hemolizy. Ponadto badaliśmy obraz mikroskopowy „rewersji” hemolizy. Wyniki tych ostatnich badań przedstawione są w oddzielnym komunikacie [11].

## Metody

### 1. OTRZYMYWANIE KRWINEK

Krwinki przeznaczone do hemolizy otrzymywano z krwi żyłnej ludzi zdrowych, którą bezpośrednio po pobraniu odwłókniano, wytrząsając ją przez 15 minut z kulkami szklanymi. Następnie odwłóknioną krew sączono przez watę i przesącz wirowano przez 15 minut z szybkością około 3000 obrotów na minutę. Po odwirowaniu płyn z nad osadu krwinek lewarowano wraz z górną warstwą krwinek, w celu usunięcia leukocytów. Otrzymaną masę krwinkową używano do dalszych badań. Nigdy nie mieszano ze sobą krwinek pochodzących od różnych osobników.

### 2. OZNACZANIE SKŁADU JONOWEGO KRWINEK

a) Hemoliza krwinek i ich „rewersja”. Do odmierzonych objętości krwinek dodawano lodowatą wodę w ilości różnej, w zależności

od jakości wykonywanych badań. Czas trwania hemolizy wynosił na ogół 15 minut; tylko w jednej serii doświadczeń był przedłużony do 48 godzin. Przez cały czas trwania hemolizy płyn trzymano w temperaturze  $0^{\circ}$ . „Rewersję” zhemolizowanych krwinek przeprowadzono dodając do zlakowanego płynu takie ilości różnych roztworów, które doprowadzały stężenie środowiska do izotonicznego z surowicą krwi. „Rewersję” przeprowadzano przy użyciu następujących płynów: 1,8‰ i 9‰ NaCl, 2,2‰ CaCl<sub>2</sub>, 10,8‰ glikoza i 20,6‰ sacharoza. „Rewertowane” krwinki odwirowywano i płyn znad osadu lewarowano. Do wszelkich analiz używano krwinki „rewertowane” przemyte. Przemywanie przeprowadzano izotonicznymi roztworami NaCl lub cukrów tak długo, dopóki płyn z przemycia nie był zupełnie bezbarwny. Do badań kontrolnych używano krwinki tego samego osobnika, niehemolizowane i przemyte płynem izotonicznym tyle razy, ile razy robiono to z krwinkami „rewertowanymi”.

b) Oznaczanie sodu, potasu i wapnia w krwinkach. Do określonej objętości krwinek przemytych („rewertowanych” lub kontrolnych) dodawano odmierzoną ilość wody i w otrzymanym płynie oznaczano zawartość Na, K i Ca przy użyciu fotometru płomieniowego firmy Zeiss, model III. Standardy zawierały NaCl, KCl i CaCl<sub>2</sub> w różnych stężeniach. Przy sporządzaniu standardów uwzględniano znany wpływ jednych jonów na wielkość emisji świetlnej innych jonów [np. 13]. M'imo uwag Hald [10] mówiących o wpływie obecności żelaza na wynik oznaczania sodu przy użyciu fotometru płomieniowego, standardy nie zawierały jonów żelaza, ponieważ, jak się okazało, wpływ ich był niewielki i w przeprowadzanych badaniach mógł być pominięty.

c) Sposób przedstawienia wyników. Ponieważ wyniki uzyskane w poszczególnych doświadczeniach, przeprowadzanych w podobny sposób, różniły się między sobą niejednokrotnie bardzo znacznie, wyników nie przedstawiono w postaci wartości średnich, ale podano wyniki dwóch najbardziej między sobą różniących się prób, zaznaczając jedynie ilość wykonanych doświadczeń danego rodzaju. Wartości przedstawione w tablicach są średnimi z dwóch równoległych oznaczeń.

### 3. BADANIA NAD WIĄZANIEM HEMOGLOBINY PRZEZ STROMATA W CZASIE „REWERSJI”

Dla przekonania się czy w procesie „rewersji” hemoglobina wiąże się ponownie ze stromata krwinek, postanowiono wykorzystać hemoglobinę płodową, którą można odróżnić od hemoglobiny dorosłego na skutek, między innymi, jej odmiennej szybkości wędrowania w polu elektrycznym oraz różnej podatności na denaturację wodorotlenkiem sodowym.

a) Otrzymywanie hemoglobiny płodowej. Około 10‰ roztwór hemoglobiny płodowej otrzymywano sposobem podanym przez



Blocka i współpracowników [3], hemolizując krwinki otrzymane z krwi pępowinowej.

b) Różnicowanie hemoglobiny. Ponieważ w naszych warunkach rozdział elektroforetyczny hemoglobiny płodowej i dorosłego nie był zadowalający, rozróżnianie obu rodzajów hemoglobiny przeprowadzono metodą Springera [15]. Metoda ta, oparta na reakcji Kruegera, polega na tym, że N/12 NaOH nie denaturuje w ciągu jednej minuty hemoglobiny płodowej, denaturując w tym samym czasie hemoglobinę dorosłego.

c) Przebieg doświadczeń. Do badań używano krwinki człowieka dorosłego, które przygotowywano sposobem podanym w punkcie 1. Krwinki te hemolizowano 1,2 objętością wody, a następnie cienie krwinek odwirowywano przy 12—14 tysiącach obrotów na minutę przez 20 minut. Po odwirowaniu odpipetowywano górną warstwę płynu i na jej miejsce dawano tę samą objętość wodnego roztworu hemoglobiny płodowej. Po dokładnym wymieszaniu całego roztworu przeprowadzano „rewersję”, używając do tego celu 5% NaCl. Otrzymane krwinki „rewertowane” przemywano izotonicznym roztworem NaCl i otrzymywano z nich hemoglobinę sposobem podanym w punkcie 3a. Otrzymany roztwór badano na obecność hemoglobiny płodowej metodą Springera, której zasada podana została powyżej (pkt. 3b).

## Wyniki

### 1. SPOSTRZEŻENIA OGÓLNE

Potwierdzono spostrzeżenia innych autorów, że „rewersję” można przeprowadzić nie tylko na krwinkach zhemolizowanych wodą, ale także po hemolizie wywołanej zamrażaniem i odmrażaniem krwinek, natomiast hemoliza wywołana rozpuszczalnikami organicznymi, takimi jak eter czy toluen, nie podlega „rewersji”. Słuszne również okazały się dawniej notowane spostrzeżenia, że czynnikami wywołującymi „rewersję” są takie substancje jak: KCl, NaCl, CaCl<sub>2</sub>, sacharoza i glikoza, natomiast mocznikiem „rewersji” przeprowadzić nie można. Obraz makroskopowy „rewersji” jest podobny, jeśli używa się do jej przeprowadzenia KCl, NaCl, sacharozę czy glukozę. Otrzymuje się wówczas zawiesinę krwinek, które z łatwością można odwirować. Po odwirowaniu krwinki „rewertowane” układają się w dwie warstwy: dolną — ciemniejszą i bardziej zbitą oraz górną — jaśniejszą i mniej zbitą. Obraz ten jest wyraźniejszy, jeśli do hemolizy użyje się wody w ilości 5—10 krotnie większej aniżeli objętość krwinek. Krwinki „rewertowane” dają się przemyć izotonicznymi roztworami soli lub cukrów, przy czym najłatwiej uzyskuje się całkowite ich przemycie używając izotoniczny roztwór sacharozy. Obraz „rewersji”

przy użyciu  $\text{CaCl}_2$  jest odmienny. Otrzymuje się wówczas zbitą masę krwinkową, trudną do przemycia. „Rewersję” daje się przeprowadzić nie tylko wówczas, gdy hemolizę przeprowadza się w temperaturze  $0^\circ$ , ale również wtedy, gdy hemolizuje się krwinki w temperaturze pokojowej. Stwierdzono także, że „rewersję” daje się z łatwością przeprowadzić nawet po kilkadziesiąt godzin trwającej hemolizie. Krwinki „rewertowane” są znacznie oporniejsze na hemolizę osmotyczną aniżeli prawidłowe; po zadaniu ich nawet 50-krotną objętością wody tworzą zawiesinę, z której z łatwością daje się odwirować składniki upostaciowane. Natomiast eterem lub toluenem można bez trudu zhemolizować krwinki „rewertowane”.

## 2. SKŁAD JONOWY KRWINEK „REWERTOWANYCH”

Otrzymane wyniki zestawiono w tablicach, z których wynika, że skład jonowy krwinek „rewertowanych” zależy od: a) rodzaju substancji, której roztwór użyto do przeprowadzenia „rewersji” (tablica 1), b) stężenia roztworu  $\text{NaCl}$  użytego do „rewersji” (tablica 1), c) objętości wody użytej do hemolizy (tablica 2), d) czasu trwania hemolizy (tablica 3).

Tablica 1

Zawartość sodu, potasu i wapnia w krwinkach „rewertowanych” roztworami różnych substancji

Krwinki hemolizowano 1,2 obj. wody, przez 15 min., w temp.  $0^\circ$ .

Krwinki kontrolne i „rewertowane” przemywano 10,3% roztworem sacharozy.

W krwinkach kontrolnych (nie hemolizowanych) zawartość potasu wahała się w granicach 305—355  $\text{mg}\%$ , a zawartość sodu w granicach 18—29  $\text{mg}\%$ .

(W tablicy podano wyniki dwóch doświadczeń, najbardziej odbiegające od siebie).

Ilość przeprowadzonych doświadczeń	Roztwór użyty do „rewersji” hemolizy	Nr doświadczenia	mg%			Stosunek Na : K
			Na	K	Ca	
11	1,8% $\text{NaCl}$	I	100	100	—	1,0
		II	174	95	—	1,9
6	9,0% $\text{NaCl}$	I	120	140	—	0,86
		II	100	105	—	0,95
5	2,2% $\text{CaCl}_2$	I	15	48	15	0,31
		II	22	46	21	0,48
9	20,6% sacharoza	I	18	126	—	0,14
		II	17	77	—	0,22
7	10,8% glikoza	I	21	101	—	0,20
		II	25	98	—	0,24

Z przedstawionych wyników widać, że przy przeprowadzaniu „rewersji” chlorkiem wapnia, krwinki „rewertowane” zawierają tylko niewielką ilość jonów wapnia. Odnosi się wrażenie, że w odróżnieniu od sodu i po-



Tablica 2

Wpływ objętości wody użytej do hemolizy na zawartość sodu i potasu w krwinkach „rewertowanych”

Krwinki hemolizowano przez 15 min., w temp. 0°. „Rewersję” przeprowadzano 1,8% NaCl. Po „rewersji” krwinki przemywano 10,3% roztworem sacharozy.

Krwinki kontrolne, nie hemolizowane zawierały 300—343 mg% potasu i 20—26 mg% sodu

Nr doświadczenia	Objętość wody w stosunku do objętości krwinek	mg%	
		Na	K
I	1,2	165	91
	5,0	120	58
	10,0	80	20
II	5,0	130	60
	10,0	100	25
III	1,2	148	95
	5,0	110	60
	10,0	95	32
IV	1,2	105	88
	5,0	76	62
	10,0	60	39

Tablica 3

Wpływ czasu trwania hemolizy na zawartość sodu i potasu w krwinkach „rewertowanych”

Krwinki hemolizowano 1,2 obj. wody w temp. 0°. „Rewersję” przeprowadzano 1,8% NaCl. Krwinki kontrolne i „rewertowane” przemywano 10,3% roztworem sacharozy.

Krwinki kontrolne, nie hemolizowane zawierały 230—344 mg% potasu i 18—29 mg% sodu

Nr doświadczenia	Czas trwania hemolizy	mg%		Stosunek Na : K
		Na	K	
I	15 min.	174	95	1,9
	24 godz.	105	208	0,5
	48 godz.	80	192	0,4
II	15 min.	158	104	1,5
	48 godz.	99	206	0,5
III	15 min.	160	114	1,4
	24 godz.	105	278	0,4
IV	15 min.	127	92	1,4
	48 godz.	82	250	0,3

tasu wapń nie wnika w czasie „rewersji” do wnętrza krwinek, a znajdowane niewielkie jego ilości pochodzą z tych jonów, które uległy ad-

sorpcji na powierzchni krwinek i podczas przemywania nie zostały usunięte; tym bardziej, że jak już wspomniano, krwinki „rewertowane” chlorkiem wapnia są trudne do przemycia.

### 3. BADANIA NAD WIĄZANIEM HEMOGLOBINY W CZASIE „REWERSJI”

W żadnej z przeprowadzanych pięciu prób nie udało się stwierdzić obecności hemoglobiny płodowej w krwinkach „rewertowanych”, otrzymanych z „rewersji” cieni krwinek osobnika dorosłego, do których dodano roztwór hemoglobiny płodowej.

### Dyskusja

Przedstawione powyżej wyniki wskazują, że bezwzględna zawartość sodu i potasu w krwinkach „rewertowanych” w ten sam sposób w różnych doświadczeniach, wykazuje dość duże różnice. Można jednak dopatrywać się pewnej stałości stosunku Na : K w tychże krwinkach. Większość z wyżej podanych wyników dałoby się wytłumaczyć tym, że w czasie trwania hemolizy otoczki krwinek stają się przepuszczalne dla jonów sodowych i potasowych, które rozmieszczają się równomiernie między krwinkami a płynem otaczającym, zaś po doprowadzeniu płynu do izotonii otoczki te stają się ponownie nieprzepuszczalne dla tych jonów. Nie daje się jednak w ten sposób wyjaśnić wyniku doświadczeń, w których krwinki w stanie zhemolizowanym przechowywano w temperaturze 0° przez różny okres czasu (15 min. 24 i 48 godz.); po „rewersji” tych krwinek chlorkiem sodowym zawierają one zupełnie różne ilości Na i K, a mianowicie stwierdza się, że przedłużenie okresu trwania hemolizy powoduje zwiększenie zawartości potasu a zmniejszenie ilości sodu w krwinkach „rewertowanych”.

Badania nad możliwością wiązania hemoglobiny płodowej przez zhemolizowane krwinki dorosłego w czasie ich „rewersji” dały wyniki negatywne. W krwinkach „rewertowanych” nie znajdowałem hemoglobiny płodowej. Tak więc należy sądzić, że hemoglobina płodowa nie wiąże się w procesie „rewersji” ze stromatą krwinek osobnika dorosłego. Wynik tych doświadczeń nie rozstrzyga wprawdzie tego czy zjawisko „rewersji” hemolizy jest pozornym, czy też prawdziwym odwróceniem hemolizy, niemniej jednak przemawia on raczej za poglądem tych autorów, którzy traktują całe zjawisko jako „pseudo-rewersję”.

Praca była subsydiowana przez Komitet Biochemiczny Polskiej Akademii Nauk.



## Streszczenie

Krwinki otrzymane w procesie „rewersji” hemolizy badano na zawartość jonów Na, K i Ca. Stwierdzono, że zawartość tych jonów zależy od rodzaju substancji, której roztwór użyto do przeprowadzenia „rewersji”, od objętości wody użytej do hemolizy oraz od czasu trwania hemolizy.

Stwierdzono, że hemoglobina płodowa nie wiąże się z krwinkami dorosłego w czasie „rewersji” hemolizy.

## LITERATURA

- [1] Baron J., *Klin. Wschr.* **10**, 263, 1931.
- [2] Baron J., *Z. ges. exp. Med.* **78**, 353, 1931.
- [3] Block R. J., Durrum E. L., Zweig G., *A Manual of Paper Chromatography and Paper Electrophoresis*, Academic Press Inc. Publishers, New York, 1955.
- [4] Bogendorfer L., Halle B., *Klin. Wschr.* **3**, 2102, 1924.
- [5] Bogendorfer L., Halle B., *Biochem. Z.* **160**, 199, 1925.
- [6] Brinkman R., Szent-Györgyi A., *J. Physiol.* **58**, 204, 1923, według Rona's Ber. **33**, 394, 1926.
- [7] Deniche G., *Klin. Wschr.* **5**, 912, 1926.
- [8] Endres G., *Z. ges. exp. Med.* **55**, 266, 1933.
- [9] Erben F., *Z. Kinderhkl.* **55**, 609, 1933.
- [10] Hald P., *J. biol. Chem.* **167**, 499, 1947.
- [11] Hiller S., Manitius A., *Acta Biochim. Polon.* **4**, 277, 1957.
- [12] Landa E., Starlinger W., *Z. ges. exp. Med.* **51**, 213, 1926.
- [13] Manitius A., *Acta Biochim. Polon.* **2**, 231, 1955.
- [14] Nieden H., Schneider H., *Dtsche Z. Chir.* **235**, 1, 1932.
- [15] Springer K., *Am. J. Med.* **18**, 633, 1955.
- [16] Starlinger W., *Wiener Klin. Wschr.* **37**, 1208, 1924.
- [17] Starlinger W., *Z. ges. exp. Med.* **47**, 406, 1925.
- [18] Starlinger W., *Z. ges. exp. Med.* **47**, 420, 1925.
- [19] Starlinger W., *Dtsche med. Wschr.* **52**, 25, 1926.
- [20] Starlinger W., *Z. ges. exp. Med.* **54**, 464, 1927.
- [21] Starlinger W., *Klin. Wschr.* **10**, 2264, 1931.
- [22] Starlinger W., Strasser W., *Z. ges. exp. Med.* **47**, 434, 1925.
- [23] Starlinger W., Strasser W., *Z. ges. exp. Med.* **47**, 447, 1925.
- [24] Starlinger W., Strasser W., *Z. ges. exp. Med.* **51**, 198, 1926.
- [25] Straub F. B., *Acta Physiol. Hung.* **4**, 235, 1953.
- [26] Straub F. B., *Postępy Biochemii* **2**, 100, 1954.
- [27] Szekely M., Manyai S., Straub F. B., *Acta Physiol. Hung.* **3**, 571, 1952.

## О ТАК НАЗЫВАЕМОМ ОБРАТИМОМ ГЕМОЛИЗЕ

## I. ИЗМЕНЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ НЕОРГАНИЧЕСКИХ ИОНОВ. СУЩНОСТЬ РЕВЕРСИИ.

## Резюме

В эритроцитах, полученных в процессе „реверсии” гемолиза, определялось содержание ионов Na, K и Ca. Обнаружено, что содержание этих ионов зависит от природы вещества, раствор которого применялся для достижения „реверсии”, от объема воды, примененной для гемолиза и от продолжительности гемолиза.

Оказалось, что гемоглобин эмбрионов не связывается с эритроцитами взрослых в процессе „реверсии” гемолиза.

## ON THE SO CALLED REVERSIBLE HAEMOLYSIS

I. CHANGES IN THE CONCENTRATION OF INORGANIC IONS.  
THE NATURE OF REVERSION

## Summary

Red cells obtained in the course of haemolysis's "reversion" were examined in respect of their content of Na K and Ca ions, which was found to depend on the kind of substance used as a solute in carrying out "reversion", on the volume of water used in haemolysis, and on the duration of the latter.

It was found that during haemolysis's "reversion" foetal haemoglobin fails to combine with the red cells of adults.

Otrzymano 6.7.1957 r.



OFFICE OF THE SECRETARY OF DEFENSE

MEMORANDUM FOR THE SECRETARY OF DEFENSE

DATE: 1954

Reference is made to the report of the Special Agent in Charge, [Name], dated [Date], and to the report of the Special Agent in Charge, [Name], dated [Date]. The report of the Special Agent in Charge, [Name], dated [Date], contains information regarding the activities of [Name] and [Name] in the [Location]. The report of the Special Agent in Charge, [Name], dated [Date], contains information regarding the activities of [Name] and [Name] in the [Location].

ON THE BASIS OF THE ABOVE INFORMATION

IT IS CONCLUDED THAT THE INFORMATION CONTAINED IN THE ABOVE REPORTS IS RELIABLE AND ACCURATE.

RECOMMENDATION

It is recommended that the information contained in the above reports be disseminated to the [Agency] and the [Agency] for their information and guidance. It is further recommended that the information contained in the above reports be disseminated to the [Agency] and the [Agency] for their information and guidance. It is further recommended that the information contained in the above reports be disseminated to the [Agency] and the [Agency] for their information and guidance.

Very truly yours,

[Signature]

1954

S. HILLER i A. MANITIUS

## O TAK ZWANEJ HEMOLIZIE ODWRACALNEJ

### II. BADANIA MORFOLOGICZNE

Z Zakładu Histologii i Embriologii

Kierownik: prof. dr S. Hiller

i z Zakładu Chemii Fizjologicznej Akademii Medycznej w Gdańsku

Kierownik: prof. dr W. Mozołowski

W części I pracy [6] podano, że mechanizm tzw. „odwrócenia” („rewersji”) hemolizy nie został dotąd wyjaśniony. Niektórzy autorzy, między innymi Brinkman i Szent-Györgyi [4], traktują to zjawisko jako właściwe odwrócenie hemolizy, podczas którego erythrocyty zhemolizowane w procesie „rewersji” po przeniesieniu ich do środowiska izotonicznego z krwią prawidłową wiążą hemoglobinę z tego środowiska. Inni, jak Baron [1], Ponder [7] i Bessis [2] zwracają uwagę na towarzyszące zjawisku „rewersji” zmniejszenie się objętości krwinek i tylko tym tłumaczą zwiększenie stężenia hemoglobiny w krwinkach „rewertowanych”; zjawisko to traktują więc jako pozorne odwrócenie hemolizy. Do tych argumentów autor pierwszej części tej pracy dodał argument nowy: niemożność związania przez „rewertowane” krwinki dorosłego osobnika hemoglobiny płodowej. Argumentu tego nie można uznać jednak za rozstrzygający, ze względu na możliwość odmiennego zachowania się hemoglobiny płodowej, w porównaniu z hemoglobiną dorosłego. Z tych względów przeprowadzono dalsze badania nad zjawiskiem „rewersji” na drodze badań morfologicznych, przy użyciu mikroskopu fazowo-kontrastowego, podobnie jak przeprowadzili to w nowszych pracach Ponder [9] i Bessis [2]. Dla wywołania hemolizy i jej „rewersji” postępowano jak w części I.

### Wyniki badań

#### I. „REWERSJA” PO HEMOLIZIE WYWOŁANEJ 1,2-KROTNA OBJĘTOŚCIĄ WODY

A. Krwinki kontrolne. W mikroskopie fazowo-kontrastowym przy użyciu filtra ciemnozielonego, krwinki prawidłowe wykazują silne



ściemnienie w grubszej części przybrzeżnej i ściemnienie słabsze w cieńszych częściach centralnych. Krawędź krwinki silnie załamuje światło, dokoła niej powstaje w środowisku obraz jasnego halo (Fot. 1).

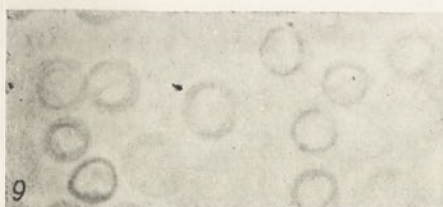
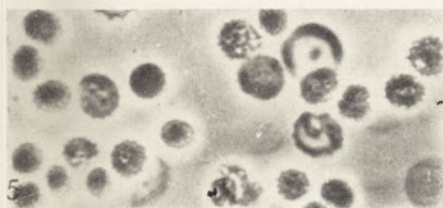
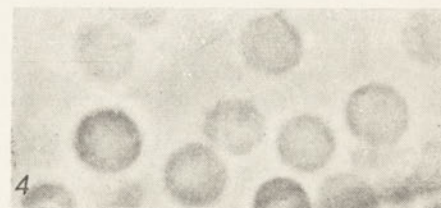
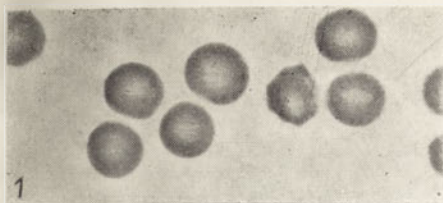
B. Hemoliza. W hipotonicznym roztworze krwinki pęczniają i po przekroczeniu krytycznej objętości ulegają hemolizie, tracąc część swej hemoglobiny, różną w różnych ciałkach. Współczynnik załamania światła przez krawędź krwinki (jej błonkę plazmatyczną) zbliża się do współczynnika środowiska, toteż krwinka odróżnia się od środowiska głównie różnicą stężenia hemoglobiny (Fot. 2).

C. „Odwrocenie” hemolizy. Dodanie hipertonicznego roztworu soli do krwi zhemolizowanej powoduje następujące zmiany w wyglądzie krwinek. Część ich przyjmuje kształt zbliżony do kulistego, równocześnie zmniejsza się ich średnica i zwiększa znacznie wysycenie ich hemoglobina. Inne krwinki przyjmują kształt krążków lub dzwoneczków. Zgrubiałe brzegi krwinek są silnie wysycone hemoglobina, natomiast części centralne są prawie bezbarwne. Krwinki w tym stanie zawierają mniej barwika niż ciałka prawidłowe, wyraźnie więcej jednak, niż zawierały w stanie zhemolizowania (por. Fot. 1, 2 i 3). Część krwinek ma brzegi, lub całą powierzchnię, pokryte stożkowatymi wypustkami również silnie wysyconymi barwikiem. Kontury wszystkich krwinek, podobnie jak krwinki kontrolne, silnie załamują światło. Obraz więc krwinek „rewertowanych” po hemolizie 1,2-krotną objętością wody destylowanej, wskazywać się zdaje na przywrócenie pierwotnych optycznych właściwości błonki plazmatycznej i na zaabsorbowanie hemoglobiny ze środowiska. Ten drugi czynnik przemawia za możliwością występowania w tych warunkach rewersji właściwej.

## II. „REWERSJA” PO HEMOLIZIE WYWOŁANEJ 5, 10 I 30-KROTNA OBJĘTOŚCIĄ WODY

A. Hemoliza. Krwinki zhemolizowane 5, 10 i 30-krotną objętością wody destylowanej dają w mikroskopie fazowo-kontrastowym obraz podobny (Fot. 4, 6 i 9), jak w eksperymencie poprzednim: napęcznienia do objętości krytycznej, zaniku zdolności błonki plazmatycznej do silnego załamywania światła i utraty hemoglobiny.

B. „Odwrocenie” hemolizy. Po dodaniu do krwinek zhemolizowanych hipertonicznego roztworu zawieszona krwinek przypomina makroskopowo tak samo rozcieńczoną zawiesinę krwinek prawidłowych w roztworze fizjologicznym. Krwinki w mikroskopie fazowo-kontrastowym załamują światło podobnie jak prawidłowe (Fot. 5, 7, 8, 10). Część ich przyjmuje kształt kulisty. Te mają średnice mniejsze niż krwinki „rewertowane” po hemolizie 1,2 objętością wody i powierzchnia ich jest najeżona drobnymi stożkowatymi wypustkami. Nasylenie hemoglobina



Mikrografie od 1—10 wykonano w mikroskopie „Lumipan“ Zeissa przy użyciu imersji olejowej, fazowo-kontrastowej  $90\times$ , A-1,25 i filtru ciemnozielonego Zeissa. Mikrografie przedstawiają krwinki czerwone: 1. Prawidłowe. 2. Zhemolizowane 1,2-krotną ilością wody destylowanej. 3. Krwinki zhemolizowane 1,2-krotną ilością wody i „rewertowane” w 0,9% NaCl. 4. Krwinki zhemolizowane 5-krotną ilością wody i „rewertowane” w 0,9% NaCl. 5. Krwinki zhemolizowane 5-krotną ilością wody i „rewertowane” w 0,9% NaCl. 6. Krwinki zhemolizowane 10-krotną ilością wody i „rewertowane” w 0,9% NaCl. 7. i 8. Krwinki zhemolizowane 10-krotną ilością wody i „rewertowane” w 0,9% NaCl. 9. Krwinki zhemolizowane 30-krotną ilością wody destylowanej. 10. Krwinki zhemolizowane 30-krotną ilością wody i „rewertowane” w 0,9% NaCl.





jest również mniejsze: małe w części centralnej, silniejsze w części przybrzeżnej ciała i wypustkach. Różnice lokalne w nasyceniu ciała hemoglobina występują najwyraźniej w krwinkach przyjmujących kształt płaskich krążków. Ściemnienie przez hemoglobinę jest w nich widoczne tylko w wypustkach i wąskim rąbku przybrzeżnym i to w tym węższym, im silniejszym rozcieńczeniu hemoliza została wywołana. Warto nadmienić, że, według P o n d e r a [9], w rąbku przybrzeżnym hemoglobina znajduje się wśród silnie zorientowanych cząsteczek lipoproteidowych i najtrudniej poddaje się wyługowaniu przy hemolizie.

Celem wyjaśnienia, czy tak znaczne zubożenie w hemoglobinę tych „rewertowanych“ krwinek nie jest następstwem znacznego jej rozcieńczenia w środowisku, w części doświadczeń, w których hemolizowano krew 10 i 30-krotną ilością wody destylowanej, przed dodaniem do zhemolizowanej krwi hipertonicznego roztworu soli, dodano roztworu hemoglobiny uzyskanej z krwi tego samego osobnika. Obraz krwinek „rewertowanych” podobnie jak w analogicznych eksperymentach P o n d e r a [7] nie zmienił się jednak w porównaniu do poprzedniego. Na podstawie powyższych obserwacji należy wnioskować, że krwinki zhemolizowane 5, 10 i 30-krotną objętością wody nie wydają się być zdolne do zwiększenia stężenia hemoglobiny kosztem środowiska; zachowują jednak zdolność do odzyskania prawidłowej łamliwości światła przez błonkę plazmatyczną. „Rewersja” w tych eksperymentach ma najprawdopodobniej charakter rewersji pozornej, takiej jaką opisywał P o n d e r [7—9] oraz ilustrował B e s s i s [2] zdjęciami w mikroskopie fazowo-kontrastowym.

### III. ZMIANY KSZTAŁTU KRwinek „REWERTOWANYCH”

J o l l y [5], P o n d e r [7—9], B e s s i s, B r i c k a [2, 3] i inni podali, że krwinki pozostawione między szkiełkiem podstawowym i nakrywkowym po kilku godzinach często przyjmują kształt kuli pokrytej licznymi cienkimi wypustkami (postać jeżowca). Proces ten można przyspieszyć przez kilkakrotne przemycie izotonicznym roztworem chlorku sodu lub potasu, lub przez dodanie lecytyny albo taurocholanu. To samo zjawisko obserwowaliśmy w krwinkach „rewertowanych“, szybko w krwinkach poprzednio hemolizowanych 5, 10, 30 i 100-krotną objętością wody destylowanej, wolniej, gdy krwinki były hemolizowane 1,2-krotną objętością wody. P o n d e r [7] przypisuje to zjawisko w krwinkach (nie hemolizowanych i „nie rewertowanych“) utracie zaadsorbowanej na ich powierzchni substancji przeciwdziałającej kulistości kształtu (antispheric substance) związanej z albuminą surowicy, gdyż przeniesienie kulistych krwinek do surowicy, lub dodanie albuminy przywraca krwinkom kształt prawidłowy. Podobny efekt można zdaniem P o n d e r a [7] wywołać



