

R939

P O L S K A A K A D E M I A N A U K  
K O M I T E T B I O C H E M I C Z N Y

# POSTĘPY BIOCHEMII

ROK II

PAŃSTWOWY ZAKŁAD WYDAWNICTW LEKARSKICH  
WARSZAWA

1 9 5 4



<http://rcin.org.pl>



P O L S K A   A K A D E M I A   N A U K  
K O M I T E T   B I O C H E M I C Z N Y

# POSTĘPY BIOCHEMII

ROK II

PAŃSTWOWY ZAKŁAD WYDAWNICTW LEKARSKICH  
WARSZAWA

1 9 5 4

„POSTĘPY BIOCHEMII” WYDAJE KOMITET BIOCHEMICZNY  
PAN  
POD REDAKCJĄ JÓZEFA HELLERA

SKŁAD  
KOMITETU BIOCHEMICZNEGO  
POLSKIEJ AKADEMII NAUK

\*

PRZEWODNICZĄCY  
JÓZEF HELLER, *Warszawa*

\*

SEKRETARZ  
JERZY MEDUSKI, *Warszawa*

\*

CZŁONKOWIE

TADEUSZ BARANOWSKI, *Wrocław* — ANTONI  
DMOCHOWSKI, *Łódź* — WŁODZIMIERZ MOZO-  
ŁOWSKI, *Gdańsk* — WŁODZIMIERZ NIEMIERKO,  
*Łódź* — JANINA OPIEŃSKA-BLAUTH, *Lublin* —  
IGNACY REIFER, *Warszawa* — BOLESŁAW SKAR-  
ZYŃSKI, *Kraków* — ZDZISŁAW STOLZMANN,  
*Poznań*

Redaktor odpowiedzialny: mgr H. PAWŁOWSKA  
Redaktor techniczny: MIECZYŚLAW NITECKI  
Korektor techniczny: SYLWIA ZBIĘCIOWA

\*

PAŃSTWOWY ZAKŁAD WYDAWNICTW LECYNSKICH \* 1954

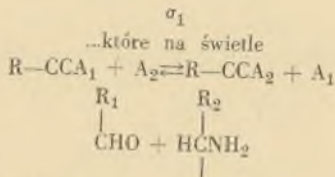
Wydanie I \* Nakład 860 egz. \* Objętość: 7 a. d. = 10,5 a. w. \*  
Papier ilustracyjny V kl., 70 g, 70×100/16 \* Oddano do składania  
dn. 8. 8. 54 \* Podpisano do druku dn. 8. 10. 54 \* Druk ukończono  
dn. 11. 10. 54 \* Zamówienie nr 625 \* E-5-44342

TORUŃSKA DRUKARNIA DZIEŁOWA, TORUŃ, KATARZYNY 4  
Cena zł 21,—

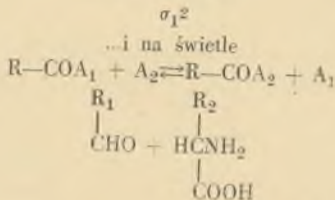
## ERRATA

Strona:      Wiersz:  
 13    po tabeli 1 od góry  
 51    13 od dołu  
 55    wzór od dołu  
 63    ostatni człon 1 wzoru od góry

Wydrukowano:



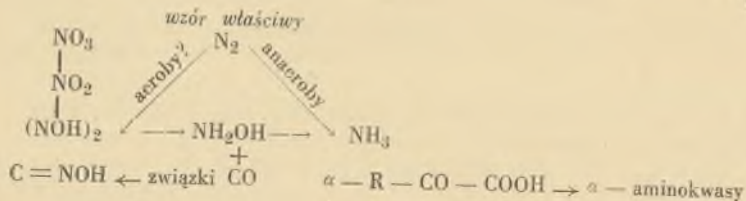
Powinno być:



Z czyjej winy:

kor. techn.  
red. odp.  
red. odp.  
red. odp.

80



red. odp.

<http://rcin.org.pl>

## SPIS TREŚCI

	Str.
W dwulecie działalności Komitetu Biochemicznego II Wydz. PAN . . . . .	4

### SYMPOZJUM III

<i>Włodzimierz Mozolowski</i> : Pojęcie normy i liczbowe ujęcie wyników w biochemii klinicznej . . . . .	8
<i>Zdzisław Stolzmann</i> : Metody biochemii klinicznej, ich swoistość i sposób interpretacji . . . . .	21
<i>Edward Kowalski</i> : O sytuacji w biochemii klinicznej . . . . .	31
<i>Jerzy Krawczyński</i> : Charakterystyka stanu chemii klinicznej w Czechosłowacji . . . . .	38

### SYMPOZJUM IV

<i>Józef Heller</i> : Podstawowe reakcje w oddychaniu roślin i zwierząt . . . . .	44
<i>Ignacy Reifer</i> : Przemiana asparaginy, glutaminy i glutationu . . . . .	49
<i>Jerzy Meduski</i> : Reakcje transaminacji w roślinach . . . . .	59
<i>Anna Nowotny-Mieczyska</i> : O mechanizmie wiązania wolnego azotu . . . . .	77
<i>M. Kański, O. Sakławska-Szymonowa, M. Szymona</i> : Transaminacja asparaginowo-alfa-ketoglutarowa (asparaginowo-glutaminowa) u <i>Mycobacterium phlei</i> . . . . .	83
<i>Maria Bielińska</i> : Zmiany chemiczne towarzyszące przemienemu owocowaniu jabłoni . . . . .	85
<i>Zofia Wysokińska</i> : Sprawozdanie z prac Zakładu Biochemii Instytutu Matki i Dziecka w zakresie biochemii roślin . . . . .	87
<i>Krystyna Michalska</i> : Prace z zakresu biochemii grzybów i mykobakterii w Zakładzie Biochemii Instytutu Gruźlicy w Warszawie . . . . .	90

\*                      \*

\*

<i>F. B. Straub</i> : O enzymatycznej syntezie glutaminy . . . . .	93
<i>F. B. Straub</i> : O metabolizmie czerwonych ciałek krwi . . . . .	100

## W DWULECIE DZIAŁALNOŚCI KOMITETU BIOCHEMICZNEGO II WYDZ. PAN

Dziesięciolecie poprzedzające drugą wojnę światową było świadkiem burzliwego rozwoju biochemii, nauki powstałej dopiero w ostatnim ćwierćwieczu XIX wieku.

Biochemia XIX wieku i pierwszych 30 lat wieku XX nie była nauką jednolitą. Składały się na nią z jednej strony badania chemiczne składu żywych ustrojów, z drugiej — badania prowadzone przez fizjologów posługujących się metodyką chemiczną. Łącznie oba te kierunki dawały obraz struktury chemicznej ustroju i tłumaczyły chemizm procesów raczej pozatkankowych, jak np. trawienie.

Dopiero badania lat trzydziestych pozwoliły głęboko wniknąć w chemizm przemian mięśniowych. Pionierskie te badania, w których wybitną rolę odegrała biochemia polska, stały się modelem badań nad wszelkimi rodzajami żywej substancji. Wprowadzenie do arsenału metod badawczych znakowania za pomocą izotopów pozwoliło śledzić losy indywidualnych cząsteczek w obrębie ustroju.

W latach czterdziestych bezpośrednim celem badań biochemicznych staje się już wyświetlenie przemian chemicznych żywej substancji. Biochemia odkrywa zasadniczą jedność podstawowych przemian całego świata żywego. Przestaje być chemią składników świata ożywionego albo fizjologią używającą metod chemicznych. Staje się nauką odrębną, o własnych problemach, własnych metodach badawczych i własnym, uporządkowanym ukladzie pojęć. Granice dzielące dotąd specjalności biochemiczne, takie jak biochemia człowieka, zwierząt, roślin czy drobnoustrojów, zatarły się w zupełności.

Wprowadzając pojęcie stanu dynamicznego ustroju i wyjaśniając mechanizm powiązania przemian energetycznych, biochemia głęboko zmodyfikowała przyrodniczy sposób patrzenia na świat.

Rozwój biochemii zdyskredytował ostatecznie i usunął z biologii pojęcia mechanistyczne, podobnie jak swego czasu narodziny biochemii usunęły resztki witalizmu. Biochemia dzisiejsza stała się dla wszystkich nauk biologicznych taką podstawą, jaką dla nauk o świecie nieożywionym są łącznie fizyka i chemia. Stąd jej niezmiernie doniosłe znaczenie.

Podstawowe pojęcia biochemii „metabolizm“ i „równowaga dynamiczna“ spotykamy dziś na każdym kroku w rozważaniach każdego biologa, czy nim będzie zoolog, botanik, mikrobiolog, czy też patolog.

Szerokie praktyczne zastosowanie znajduje dziś biochemia we wszystkich dziedzinach nauk lekarskich: w agrobiologii, nauce o żywieniu, przemyśle leków i spożywczym. Biochemia jest zatem nie tylko odrębną nauką, ale nauką o fundamentalnym znaczeniu.

W okresie międzywojennym biochemia polska zajęła poczesne miejsce dzięki tak wybitnym przedstawicielom, jak Białaszewicz, Marchlewski, Parnas, Przyłęcki i liczna plejada ich uczniów.

W chwili wyzwolenia biochemia polska znajdowała się w bardzo ciężkiej situa-

cji. Zabrakło tych świetnych uczonych, którzy przed wojną nadawali charakter pracy badawczej w tej dziedzinie. Wszystkie niemal laboratoria biochemiczne zostały zniszczone, a równocześnie rozrastające się potężnie nauki biologiczne i medyczne wymagały coraz to wydajniejszej i owocniejszej współpracy tej podstawowej dyscypliny. W ciągu wyjątkowo krótkiego czasu większość pracowników została uruchomiona, zaczęto kształcić młode kadry biochemiczne, rozwiązywać aktualne problemy i w ciągu kilku pierwszych lat powojennych biochemia polska przeżyła najtrudniejszy okres powojennej regeneracji. Badacze pracujący w tej dziedzinie zrozumieli od razu konieczność koordynacji swoich wysiłków, pracy zespołowej i planowania, toteż już na początku r. 1950 kierownicy ważniejszych placówek biochemicznych w Polsce Ludowej samorzutnie zorganizowali konferencję mającą na celu stworzenie wspólnej platformy porozumienia i współpracy. Konkretnie formy znalazło to porozumienie w postaci powołanej przez Ministerstwo Zdrowia w r. 1951 Komisji Biochemicznej przy Radzie Naukowej tegoż Ministerstwa. Komisja ta, jakkolwiek skupiła tylko reprezentantów biochemii człowieka, przeprowadziła pod kierunkiem prof. T. Baranowskiego pierwsze próby planowania pracy badawczej w placówkach podległych Ministerstwu Zdrowia i przyzwała reprezentantów biochemii do zespołowego dyskusowania aktualnych problemów.

Z chwilą powstania Polskiej Akademii Nauk rozszerzył się znacznie zakres możliwości skoordynowanej pracy w dziedzinie biochemii. Wyrazem zrozumienia potrzeb tej gałęzi nauki przez najwyższą instancję naukową Polski Ludowej było powołanie do życia w kwietniu r. 1952 Komitetu Biochemicznego, jako jednego z pierwszych komitetów PAN.

W skład Komitetu wchodzi: prof. Tadeusz Baranowski (Wrocław), prof. Antoni Dmochowski (Łódź), prof. Józef Heller (Warszawa), dr Jerzy Meduski (Warszawa), prof. Włodzimierz Mozołowski (Gdańsk), prof. Włodzimierz Niemierko (Łódź), prof. Janina Opieńska-Blauth (Lublin), prof. Ignacy Reifer (Warszawa), prof. Bolesław Skarżyński (Kraków), prof. Zdzisław Stolzmann (Poznań). Przewodniczącym Komitetu został prof. Józef Heller, a sekretarzem dr Jerzy Meduski.

Poza tym w razie potrzeby Komitet zaprasza na swe posiedzenia również innych przedstawicieli biochemii.

W wyżej wymienionym składzie Komitet Biochemiczny przestał być zespołem specjalistów, zajmującym się głównie biochemią lekarską, ale objął swym zakresem pracy również biochemię roślin i biochemię porównawczą.

Jednym z podstawowych zadań, jakich podjął się Komitet Biochemiczny, była organizacja biochemii w Polsce — jako nauki.

Ponieważ w pierwszych latach powojennych nie było najwyższego ośrodka koordynującego rozwój nauki polskiej, poszczególne placówki biochemiczne były podporządkowane różnym resortom i rozwijały się w kierunkach rozbieżnych.

Sprawy te poddano szczegółowym dyskusjom, których odbiciem jest wstęp do niniejszego artykułu, i stwierdzono jedność biochemii jako nauki. Realnym wyrazem tego było osiągnięcie przez Komitet Biochemiczny w Państwowej Komisji Planowania Gospodarczego decyzji uznającej biochemię za odrębną gałąź zawodową. Fakt ten ma doniosłe znaczenie, gdyż umożliwia ustalenie potrzebnej liczby biochemików i stwarza ramy dla budowy Studium Biochemicznego.

Komitet Biochemiczny wypracowując stopniowo formy swej działalności zajął się: planowaniem i organizacją badań naukowych, organizacją dyskusji naukowej, organizacją wydawnictw biochemicznych, sprawą kształcenia i doskonalenia kadr naukowych, popularyzacją biochemii, kontaktami z biochemią zagraniczną.

Posiedzenia Komitetu odbywały się zazwyczaj co miesiąc (z wyjątkiem okresów



wakacyjnych). Członkowie Komitetu nie oszczędzili trudów w pracy, o czym wymownie świadczą wysoka frekwencja na wszystkich posiedzeniach.

Ponadto Komitet zorganizował 4 sympozja: na wiosnę roku 1952 w Łodzi na temat biochemii związków fosforowych, w październiku 1952 r. w Rokietnicy Bytomskiej — o biochemii nowotworów, w kwietniu 1953 w Poznaniu (biochemia kliniczna) i we wrześniu 1953 w Białymstoku sympozjum omawiające zagadnienie związków azotowych w roślinach.

Do roku 1953 planowanie w zakresie biochemii było mechanicznym spisywaniem indywidualnych planów zgłaszanych przez różne ośrodki badawcze. W r. 1953 plan powstał w wyniku realizowania wytycznych Komitetu i w związku z tym, po raz pierwszy w roku sprawozdawczym, propozycje tematyczne i opiniowanie prośb o dotacje opierały się na ustalonych przez Komitet planach problemowych. Na rok 1954 Komitet wybrał i przekazał ośrodkom w terenie następujące problemy biochemiczne uznane za najważniejsze:

- 1) biochemia białek z uwzględnieniem nukleoproteidów,
- 2) biochemia ewolucyjna (problem ten potraktowano jako długofalowy, a w r. 1954 wskazano na tematy z zakresu biochemii ewolucyjnej drobnoustrojów i owadów),

- 3) aspekt biochemiczny bazy żywnościowej państwa.

Prócz tego Komitet opierając się na dyrektywach I Sesji Problemowej Wydz. II PAN, poświęconej zagadnieniu regeneracji, zalecił biochemikom zapoznanie się z tym zagadnieniem i, jeśli okaże się to możliwe, włączanie się w opracowywanie tematyki związanej z zagadnieniem regeneracji.

Jednym z zadań realizowanych obecnie przez Komitet jest opracowanie długofalowego planu rozwoju biochemii polskiej. Założeniem jego jest taki rozwój naszej biochemii, by możliwe stało się opracowanie każdego problemu wynikającego z udziału biochemii w procesie przebudowy społecznej i gospodarczej kraju. Podstawą planu będą opracowywane obecnie następujące zagadnienia: organizacja biochemii, przeszłość i osiągnięcia światowe biochemii polskiej, sytuacja biochemii polskiej po wyzwoleniu i stan obecny naszej biochemii.

Plan uwzględni następujące zagadnienia:

- 1) planowanie kierunków badań, a w szczególności a) problemów wynikających z całości planu PAN, b) problemów wynikających z kierunków rozwoju biochemii i c) problemów zmierzających do właściwego rozplanowania specjalizacji;

- 2) organizację planowania badań przez Komitet Biochemiczny. Tu weszłyby sprawy takie, jak: zakres inicjatywy, metody kontroli wykonania, powiązanie z resortami;

- 3) organizację warunków pracy — Instytut Biochemiczny, wyposażenie i zaopatrzenie ośrodków biochemicznych;

- 4) zagadnienia kadr — gdzie chodziłoby o studium biochemiczne na poziomie szkoły wyższej, studium aspirantki i kierunki kształcenia asystentów;

- 5) sprawy popularyzacji biochemii.

Sprawa dotacji na prace biochemiczne została obecnie uregulowana. Komitet przejął opiniowanie w sprawach dotacji udzielanych przez PAN, jak i dotacji udzielanych przez Min. Szkół Wyższych. Kontrolując dotowanie badań biochemicznych w różnych resortach Komitet będzie mógł wpływać na realizację swoich planów.

Sympozja organizowane systematycznie przez Komitet mają charakter konferencji roboczych. Są one pomyślane jako dyskusje metodyczne ułatwiające planowanie naukowe przez krytyczne naświetlanie zagadnień, pomoc do przejścia od ogólnie formułowanych problemów do ścisłego tematu roboczego, ułatwienie doboru metod i scharakteryzowanie głównych trudności, z którymi należy się liczyć

przy stosowaniu tych metod. Wydrukowane materiały sympozjów będą służyć młodym pracownikom nauki i studentom za lekturę uzupełniającą. Sympozja ponadto służyć niekiedy celom specjalnym, związanym z kręgiem osób interesujących się daną tematyką sympozyjną. Celem np. symposium III, odbytego w Poznaniu, było znalezienie wspólnej platformy pracy między biochemikami a klinicystami. Jedną z najpoważniejszych trudności był tutaj brak zorientowania klinicystów w tym, co biochemia może dać klinice. Obrady wykazały konieczność ustalenia szeregu polskich norm klinicznych, wytypowania metod standardowych dla dużych pracowni usługowych, potrzebę rewizji sposobu specjalizacji lekarzy w dziedzinie analityki i konieczność rozwiązania szeregu innych zagadnień; w tym celu Komitet powołał Komisję Biochemii Klinicznej.

Celem specjalnym symposium IV było spopularyzowanie wśród biochemików zagadnień związanych z materiałem roślinnym oraz zbliżenie botaników do zagadnień biochemicznych.

Komitet Biochemiczny zainicjował i współorganizował (razem z Sekretariatem Wydziału II PAN) konferencję problemową pt.: „Biochemia a baza żywienia”. Konferencja ta odbyła się 12 i 13 lutego 1954 r. w Warszawie. Na konferencji tej przedstawiciele przemysłu spożywczego wystąpili przed zebranymi biochemikami ze swymi trudnościami w zakresie takich zagadnień jak biochemiczna przeróbka niektórych produktów ubocznych i odpadków przemysłu rolnego oraz spożywczego, celulozowego i włókienniczego czy straty produktów spożywczych.

W wyniku tej konferencji biochemicy polscy podejmą niewątpliwie szereg prac w zakresie omawianej tematyki.

Wzrastająca produkcja placówek biochemicznych w Polsce uczyniła aktualną sprawę własnych periodyków. Zamierzenia Komitetu Biochemicznego były następujące: pierwsze — to stworzenie periodyku o charakterze referatowym, informującym o aktualnym stanie wiedzy biochemicznej w różnych dziedzinach. Periodyk ten będzie zamieszczał materiały sympozyjne. Realnym owocem tego zamierzenia są właśnie „Postępy Biochemii”, redagowane przez prof. J. Hellera, których numer 2 zostaje oddany do rąk czytelników. Drugie — to realizacja periodycznego wydawnictwa, przeznaczonego do publikacji prac oryginalnych. Wydawnictwo to wychodzi jako kwartalnik pod nazwą: *Acta Biochimica Polonica*. Wreszcie trzecie — to seria monograficznych publikacji książkowych, poświęconych metodykom specjalnym w biochemii, o których zatwierdzenie wystąpił ostatnio Komitet Biochemiczny.

Najważniejszym obecnie sposobem kształcenia kadr biochemicznych są aspirantury krajowe, utrzymywane przez: PAN, Ministerstwo Szkolnictwa Wyższego i Ministerstwo Zdrowia. Zagadnieniem aspirantur biochemicznych kieruje obecnie w całości Komitet.

Wyjazd członka Komitetu prof. Baranowskiego na Węgry zapoczątkował nasz kontakt z biochemią węgierską. Dzisiaj, po wizycie w Polsce prof. F. B. Strauba, członka prezydium Węgierskiej Akademii Nauk, nabrał on cech trwałości. Ostatnio przewodniczący Komitetu prof. J. Heller w ramach wymiany kulturalnej wyjechał do NRD i zapoznał się tam ze stanem biochemii.

W wyniku nawiązanych kontaktów przebywało na Węgrzech trzech biochemików polskich, a w Czechosłowacji jeden.

Warto wspomnieć również, że przedstawiciele biochemii polskiej brali udział w I i II Światowym Kongresie Biochemii, odbytym w Cambridge (1949) i w Paryżu (1952).

Obecne tempo rozwoju biochemii polskiej gwarantuje, że ambitne zamierzenia i plany Komitetu zostaną zrealizowane.

WŁODZIMIERZ MOZŁOWSKI

POJĘCIE NORMY I LICZBOWE UJĘCIE WYNIKÓW W BIOCHEMII  
KLINICZNEJ

Rozwój medycyny jako nauki wymaga ilościowego ujmowania zjawisk chorobowych. Zrozumienie konieczności takiego ujmowania jest niezbędne dla postępu medycyny w ogóle, a biochemii klinicznej w szczególności. I do patologii daje się zastosować powiedzenie lorda *Kelwina*: „Jeżeli to, o czym mówicie, możecie zmierzyć i wyrazić liczbą, to już coś niecoś o tym wiecie; jeżeli tego nie możecie wyrazić liczbą, to wasze wiadomości w tej sprawie są skąpe i niewystarczające“. Przekonującym przykładem jest pomiar temperatury ciała, ale także dane biochemiczne dotyczące poziomu cukru glukozy we krwi, zawartości azotu niebiałkowego w surowicy, wielkości przemiany podstawowej itd. są ilustracją słuszności wyżej zacytowanego zdania. Liczbowe wyniki otrzymywane w biochemii klinicznej najczęściej mają na celu porównanie danych uzyskanych u ludzi chorych z wartościami normalnymi. Pojęcie „normalny“ używamy w różnym znaczeniu: przeciętny, najczęstszy, typowy, zdrowy, idealny. W medycynie za osobę normalną uważa się taką, u której nie możemy stwierdzić klinicznych objawów choroby lub jakichś szczególnych braków.

Określenie to nie jest ścisłe, jednak w braku ściślejszego musi nam wystarczyć. Dla ustalenia „normy“ wybiera się dostatecznie wielką grupę osób, które można uważać za zdrowe i które są pod względem cech nie będących przedmiotem badania możliwie podobne do osób badanych. Podobieństwo to dotyczy: wieku, płci, rasy, stanu fizjologicznego (np. ciąży), diety, warunków otoczenia itd. Dane uzyskane u osób zdrowych będą „normą“ dla danej cechy. Ale żadnej właściwości biologicznej nie można wyrazić jedną liczbą: wszystkie one są zmienne, rozmaite, tak jak różne są twarze różnych ludzi; nawet wśród miliona ludzi nie znajdziemy twarzy zupełnie jednakowych. A więc i wartości normalne są zmienne, dlatego ściślej jest mówić o „normalnej zmienności“ niż o normie jako o wielkości dającej się wyrazić jedną liczbą. Prócz tego musimy pamiętać, że każdy pomiar wymaga posługiwania się i naszymi zmysłami, i aparaturą pomiarową. Czynności naszych zmysłów są przecież i w fizjologicznych warunkach zmienne, a i aparatura pomiarowa ma granice dokładności i jest stale obciążona pewnym błędem. Sposoby wyrażania tej „normalnej zmienności“ zależą od badanych właściwości biologicznych: jedne z nich możemy wyrazić ściśle posługując się średnią arytmetyczną i średnim odchyleniem, do innych nie możemy stosować tych pojęć, lecz ograniczamy się do podania granic zmienności, w innych wreszcie, przy bardzo wielkiej zmienności fizjologicznej, musi nam wystarczyć podanie jedynie rzędu wielkości ich występowania. W wykładzie chcę omówić te trzy sposoby wyrażania normy, a przy pierwszym z nich będę się starał objaśnić podstawowe pojęcia sta-

tystyki \*. Statystyka lekarska posiada podręczniki, które wyjaśniają i najważniejsze pojęcia, i sposób ich stosowania bez uciekania się do matematycznych wywodów niedostępnych ogółowi lekarzy (1), ale na ogół brak w nich przykładów potrzebnych do zrozumienia postępowania w biochemii klinicznej. Po omówieniu i zilustrowaniu przykładami tych trzech sposobów wyrażania normy będę się starał — również na przykładach — przedstawić obecny stan naszych wiadomości o normach w biochemii klinicznej oraz wykazać, jakie są istotne braki w tej dziedzinie, a wreszcie podać drogi postępowania, które tym brakom mogłyby zaradzić. Chodzi o doprowadzenie do tego, byśmy w możliwie niedługim czasie mieli dane liczbowe określające normalną zmienność ważnych w biochemii klinicznej właściwości dotyczących ludzi żyjących w Polsce.

## I

Dla wyrażenia zmienności w liczbowej ocenie wyników doświadczalnych, a w szczególności przy porównywaniu z wartościami normalnymi, stosuje się na ogół pojęcia: średnia arytmetyczna, średnie odchylenie oraz średnie odchylenie średniej arytmetycznej. Najwłaściwszą drogą uprzyśtępnienia tych pojęć wydaje się omówienie odpowiednich przykładów. Niech za pierwszy posłuży nam przykład, w którym znamy wartość prawdziwą, a wykonywane pomiary będą wykazywały zmienność zależną zarówno od aparatury, jak i od pracownika wykonującego pomiar. Posłużmy się pomiarem skręcalności światła spolaryzowanego przez roztwór glikozy o znanym stężeniu (2). Przez dokładne odważenie określonej ilości glikozy sporządzono roztwór, który w rurze o określonej długości skręca światło spolaryzowane o  $1,00^\circ$ . Wykonano dwa szeregi pomiarów: I szereg — sto oznaczeń — wykonał pracownik mniej wprawny, II szereg — również sto oznaczeń — pracownik bardziej wprawny w polarymetrii.

Tabela 1

Pomiar skręcalności płaszczyzny światła spolaryzowanego przez roztwór glikozy o znanym stężeniu (wg *Michaelis L.*, 2)

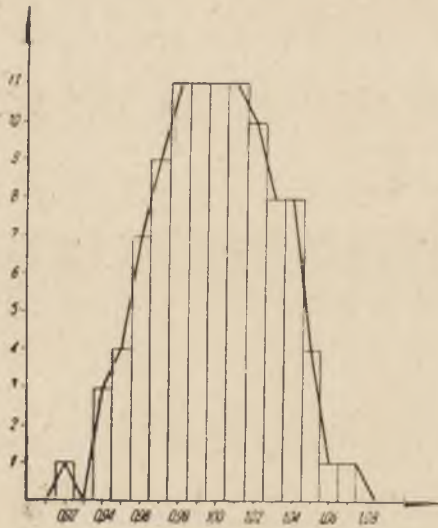
Odczytana podziałka	Liczba odczytań	
	Szereg I	Szereg II
0,91	0	0
0,92	1	0
0,93	0	0
0,94	3	0
0,95	4	1
0,96	7	2
0,97	9	8
0,98	11	14
0,99	11	16
1,00	11	17
1,01	11	16
1,02	10	15
1,03	8	6
1,04	8	4
1,05	4	1
1,06	1	0
1,07	1	0
1,08	0	0

\* Prof. dr *Hugo Steinhaus* z Wrocławia udzielił mi wielu rad, które pozwoliły mi podać w tym wykładzie objaśnienie podstawowych pojęć statystyki; dziękuję Mu za to i na tym miejscu.

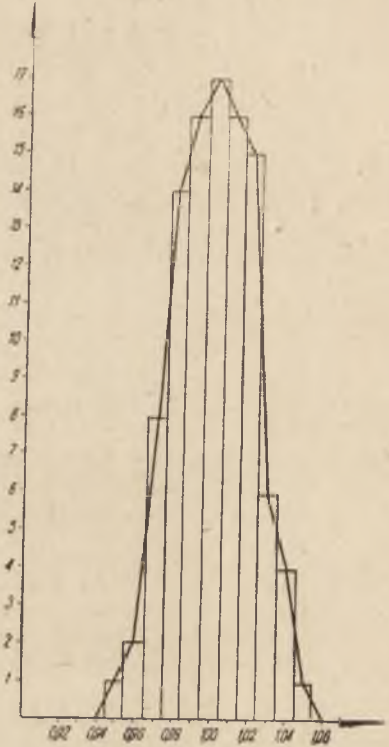
Pragnę jednak z naciskiem zaznaczyć, że za ewentualne błędy tylko ja jestem odpowiedzialny.

Tabela 1 zawiera uporządkowane wyniki pomiarów obydwu szeregów. Pierwsza kolumna podaje odczytaną podziałkę polarymetru z dokładnością do setnej części stopnia, gdyż dany polarymetr pozwalał na odczytanie podziałki z taką dokładnością.

W kolumnach drugiej i trzeciej podano, ile razy odczytano poszczególne kąty w obydwu szeregach. Liczby tabeli 1 można przedstawić graficznie (ryc. 1 i 2) od-



Ryc. 1. Pomiar skręcalności płaszczyzny światła spolaryzowanego roztworu glikozy (szereg I). Odcięte podają odczytaną podziałkę; rzędne — liczbę odczytów. Według *L. Michaelisa* (2).

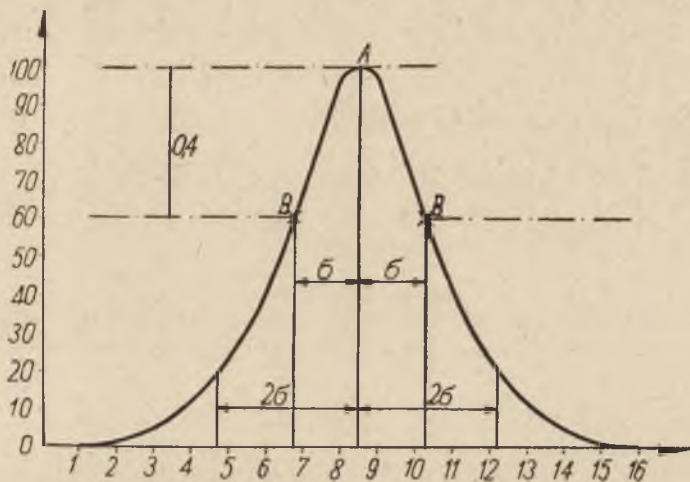


Ryc. 2. Pomiar skręcalności płaszczyzny światła spolaryzowanego roztworu glikozy (szereg II). Odcięte podają odczytaną podziałkę; rzędne — liczbę odczytów według *L. Michaelisa* (2).

mierzając na osi odciętych odstępów odpowiadające jednej setnej stopnia, a na rzędnych liczbę poszczególnych oznaczeń. Największą częstość wykazują wartości leżące w pobliżu wartości prawdziwej; wartości odbiegające od niej są rozmieszczone mniej więcej równomiernie z obydwu stron. Im dalej od prawdziwej wartości, tym częstość odczytań jest mniejsza. Gdybyśmy mieli możliwość zwiększenia dokładności odczytań (np. do  $0,001^{\circ}$ ) oraz znacznego zwiększenia liczby pomiarów, otrzymalibyśmy zamiast linii schodkowej krzywą ciągłą o kształcie dzwonu, podobną do krzywej podanej na ryc. 3.

Linia taka, nosząca nazwę krzywej Gaussa lub normalnej krzywej rozkładu, jest właściwa dla pomiarów podległych przypadkowi, losowi. W tego rodzaju zjawiskach działają liczne czynniki związane zarówno ze zmiennymi właściwościami obserwatora, jak i aparatu pomiarowego. Te bardzo liczne czynniki działają zarówno w kierunku odczytania wartości wyższej od „prawdziwej“, jak i niższej od

niej. Ponieważ jest mniej prawdopodobne, że czynniki powodujące odchylenia będą przeważnie skierowane zgodnie, niż to, że liczba czynników działających w kierunku zmniejszenia będzie mniej więcej taka sama jak liczba działających w kierunku zwiększenia odczytań, przeto częstość odczytań odległych od prawdziwej wartości będzie mniejsza od częstości bliskich tej prawdziwej wartości. Rycina 3 przedstawia taką krzywą Gaussa: na osi odciętych są podane jednostki, w których wyrażamy pomiar, na osi rzędnych zaś liczba przypadków wykazujących taką samą wartość.



Ryc. 3. Normalna krzywa rozkładu.

Taka krzywa:

a) wykazuje największą liczbę przypadków dla średniej arytmetycznej, tj. sumy wszystkich pomiarów podzielonej przez liczbę przypadków; na ryc. 3 jest ona oznaczona literą  $A$ ;

b) jest symetryczna, tj. po obydwu stronach maksymalnej wartości w równych odległościach od niej znajdują się równe liczby przypadków;

c) przebiega w ten sposób, że punkt przegięcia krzywej, oznaczony literą  $B$  na ryc. 3, leży w odległości równej  $0,6$  wartości maksymalnej od osi odciętych; odległość rzutu punktu przegięcia  $B$  na oś odciętych od średniej arytmetycznej nazwano średnim odchyleniem (dyspersją) i oznacza się je literą  $\sigma$ .

Pomiary różnych zjawisk, a także pomiary tego samego zjawiska, przez różnych obserwatorów i przy użyciu różnej aparatury dadzą krzywe odmienne od siebie, tj. o innej maksymalnej liczbie przypadków przypadających na średnią arytmetyczną, a także o innym przegięciu krzywej, wyrażającym się średnim odchyleniem; jeżeli jednak zjawiska te zależą jedynie od przypadku, to krzywe przedstawiające częstość występowania będą miały wspólne cechy właściwe normalnej krzywej rozkładu, wymienione wyżej pod  $a$ ,  $b$  i  $c$ . Poszczególne takie krzywe są jednoznacznie scharakteryzowane przez dwie liczby: średnią arytmetyczną  $A$  oraz średnie odchylenie  $\sigma$ , czyli dyspersję. Jeżeli powierzchnię zawartą między taką krzywą Gaussa a osią odciętych podzielimy w ten sposób, że poprowadzimy prostopadłe do osi odciętych przy podziałkach odległych o jedno sigma w jedną i drugą stronę od średniej arytmetycznej, to otrzymamy trzy pola: jedno środkowe oraz dwa boczne, równe sobie. W normalnej krzywej Gaussa środkowa powierzchnia stanowi dwie trzecie (dokładnie 68,27%) całej powierzchni, a ponieważ wielkość powierzchni wyraża liczbę przypadków, możemy wnioskować, że w razie normalnego rozkładu

wartości dwie trzecie wszystkich oznaczeń znajdują się w polu objętym zakresem dyspersji  $\sigma$  w jedną i drugą stronę od średniej, natomiast jedna trzecia (dokładnie 31,73%) będzie leżała poza tym zakresem wielkości. Powierzchnia ograniczona odległością dwóch sigma w jedną i drugą stronę obejmuje  $\frac{19}{20}$  całego pola (dokładnie 95,45%), a powierzchnia wyznaczona przez potrójne średnie odchylenie sigma — w obydwie strony od średniej  $\frac{399}{400}$  całego pola (dokładnie 99,73%). Na otrzymanie takich wyników możemy jednak liczyć jedynie wtedy, gdy dany rozrzut jest spowodowany tylko przypadkiem, a nie jakimś systematycznym błędem, oraz gdy mamy do czynienia z bardzo dużą liczbą przypadków. Przy mniejszej liczbie oznaczeń (jak to jest zwykle w chemii klinicznej) musimy się liczyć z większym lub mniejszym odstępstwem od przewidywanych wyników.

Powracając do charakterystyki krzywych ryc. 1 i 2 należy obliczyć dane odpowiadające idealnym krzywym, do których zbliżalibyśmy się przy znacznym zmniejszeniu podziałki i zwiększeniu liczby oznaczeń. Ponieważ każda taka krzywa jest jednoznacznie określona przez średnią arytmetyczną i średnie odchylenie sigma, należy obliczyć te wielkości.

Tabela 2

Obliczanie średniej arytmetycznej  $A$  obydwu szeregów pomiarów podanych w tabeli 1

Szereg I	Szereg II
1 × 0,92 = 0,92	1 × 0,95 = 0,95
3 × 0,94 = 2,82	2 × 0,96 = 1,92
4 × 0,95 = 3,80	8 × 0,97 = 7,76
7 × 0,96 = 6,72	14 × 0,98 = 13,72
9 × 0,97 = 8,73	16 × 0,99 = 15,84
11 × 0,98 = 10,78	17 × 1,00 = 17,00
11 × 0,99 = 10,89	16 × 1,01 = 16,16
11 × 1,00 = 11,00	15 × 1,02 = 15,30
11 × 1,01 = 11,11	6 × 1,03 = 6,18
10 × 1,02 = 10,20	4 × 1,04 = 4,16
8 × 1,03 = 8,24	1 × 1,05 = 1,05
8 × 1,04 = 8,32	
4 × 1,05 = 4,20	
1 × 1,06 = 1,06	
1 × 1,07 = 1,07	
	Razem = 100,04
Razem = 99,86	
$A_1 = \frac{\sum X_n}{n} = \frac{99,86}{100} = 0,9986$	$A_2 = \frac{\sum X_n}{n} = \frac{100,04}{100} = 1,0004$
Po zaokrągleniu:	Po zaokrągleniu:
$A_1 = 1,00$	$A_2 = 1,00$

Na tabeli 2 obliczono średnie arytmetyczne dla obydwu szeregów; wyniki zaokrąglono do drugiego miejsca dziesiątego, zgodnie z powyższą dokładnością pomiaru. Obydwie średnie arytmetyczne są równe wartości prawdziwej, tj. takiej, jaką nadało się roztworowi przez odważenie glikozy. Mimo to wyżej cenimy pojedyncze wyniki drugiego szeregu, są one bowiem bardziej zwarte około średniej: ich rozrzut jest mniejszy. Miarą wielkości rozrzutu jest średnie odchylenie. Oblicza się je w ten sposób, że dla każdej poszczególniej wartości znajduje się różnicę od średniej, wielkość tę podnosi się do kwadratu, a sumę wszystkich kwadratów dzieli się

przez liczbę wszystkich oznaczeń, tj.  $n$  (a przez  $n-1$ , gdy liczba wszystkich przypadków jest mniejsza niż 30). Z uzyskanej liczby bierze się pierwiastek kwadratowy.

Tabela 3

Obliczenie średniego odchylenia  $\sigma$  obydwu szeregów pomiarów podanych w tabeli I

Odczytana podziałka	$(X-A)$	$(X-A)^2$	Szereg I		Szereg II	
			Liczba odczytań ( $m$ )	$(X-A)^2 \cdot m$	Liczba odczytań ( $m$ )	$(X-A)^2 \cdot m$
0,91	-0,09	0,0081	0	0	0	0
0,92	-0,08	0,0064	1	0,0064	0	0
0,93	-0,07	0,0049	0	0	0	0
0,94	-0,06	0,0036	3	0,0108	0	0
0,95	-0,05	0,0025	4	0,0100	1	0,0025
0,96	-0,04	0,0016	7	0,0112	2	0,0032
0,97	-0,03	0,0009	9	0,0081	8	0,0072
0,98	-0,02	0,0004	11	0,0044	14	0,0056
0,99	-0,01	0,0001	11	0,0011	16	0,0016
1,00	0	0	11	0	17	0
1,01	+0,01	0,0001	11	0,0011	16	0,0016
1,02	+0,02	0,0004	10	0,0040	15	0,0060
1,03	+0,03	0,0009	8	0,0072	6	0,0056
1,04	+0,04	0,0016	8	0,0128	4	0,0064
1,05	+0,05	0,0025	4	0,0100	1	0,0025
1,06	+0,06	0,0036	1	0,0036	0	0
1,07	+0,07	0,0049	1	0,0049	0	0
1,08	+0,08	0,0064	0	0	0	0

$$\sigma_1 = \frac{\Sigma (X-A)^2}{n} = \frac{0,0956}{100} = 0,000956$$

$$\sigma_1 = \sqrt{0,000956} = 0,0309$$

$$\sigma_1 = 0,03$$

$$\sigma_2 = \frac{\Sigma (X-A)^2}{n} = \frac{0,0420}{100} = 0,00042$$

$$\sigma_2 = \sqrt{0,00042} = 0,02$$

$$\sigma_2 = 0,02$$

Tabela 3 przedstawia obliczenie średniego odchylenia dla obydwu szeregów omawianego pomiaru polarymetrycznego. Rozkład pierwszego szeregu charakteryzuje zatem skrót  $1,00 \pm 0,03^\circ$ , a drugiego  $1,00^\circ \pm 0,02^\circ$ .

Omawiany przykład miał na celu wyjaśnienie pojęć: średnia arytmetyczna i średnie odchylenie, natomiast nie odpowiada on zadaniu, które stawiamy sobie zazwyczaj przy wykonywaniu pomiaru — przecież prawdziwą wartość znalibyśmy, gdyż roztwór glikozy był w odpowiedni sposób przygotowany, a najczęściej dzieje się inaczej: wartości prawdziwej nie znamy, lecz chcemy ją oznaczyć pomiarem. Dlatego posłużymy się drugim przykładem, w którym do błędów pomiaru dołączy się czynnik zmienności biologicznej. Metodą Kramera i Tisdalla oznaczono (3) zawartość wapnia u 92 dorosłych zdrowych mężczyzn i uzyskano wyniki, które po uporządkowaniu są podane na tabeli 4.

Graficznie przedstawia to ryc. 4. A więc i tutaj nie otrzymaliśmy jednej wartości, lecz stwierdzamy rozrzut spowodowany zarówno zmiennością biologiczną, jak



i nie dającymi się usunąć błędami metody. O tym, że rozrzut ten nie jest spowodowany jakimś błędem systematycznym, lecz tym, co nazywamy przypadkiem, świadczą: a) największa częstość odpowiadająca średniej arytmetycznej wszystkich pomiarów oraz b) symetryczne rozmieszczenie innych wartości z obydwu stron średniej arytmetycznej. O tym, czy krzywa ta odpowiada także i temu, że pole ograniczone wartością średniego odchylenia w jedną i drugą stronę od średniej arytmetycznej obejmuje około  $\frac{2}{3}$  wszystkich oznaczeń, przekonamy się dopiero wtedy, gdy obliczymy średnią arytmetyczną i średnie odchylenie. Normalna zawartość wapnia, a ściślej normalna zmienność wapnia w surowicy krwi dorosłych zdrowych mężczyzn, oznaczona metodą Kramera i Tisdalla, wynosi  $10,1 \pm 0,4$  mg na 100 ml surowicy. Jeżeli krzywa rozrzutu jest „normalna“, tj. spowodowana przypadkiem, na zakres  $A \pm \sigma$ , tj.  $10,1 \pm 0,4$  mg%, a więc między 9,7 a 10,5 mg%, powinno wypadać około  $\frac{2}{3}$  wszystkich przypadków, tj. 61, a wypada 63, natomiast na zakres  $A \pm 2\sigma$ , tj.  $10,1 \pm 0,8$  mg%, a więc między 9,3 a 10,9 — około 95% wszystkich przypadków, tj. 87, a znajdujemy ich 84. Widzimy więc, że mimo stosunkowo małej liczby oznaczeń uzyskane wartości są zbliżone do teoretycznie przewidywanych. Korzyść takiego liczbowego ujmowania wyników jest oczywista: zamiast podawania mało przejrzystego wykazu wszystkich oznaczeń wyrażamy liczbą  $10,1 \pm 0,4$  mg % rozkład odpowiadający normalnej zmienności u ludzi zdrowych. Na tej podstawie możemy przewidywać, że pojedyncza wartość leżąca poza zakresem 9,3 a 10,9 mg% zdarza się stosunkowo rzadko, około jeden raz na dwadzieścia. Wartość taka, choć nie możemy jej uznać za patologiczną, każe nam zwrócić uwagę na nią jako na podejrzaną. Natomiast wartość leżąca poza zakresem  $A \pm 3\sigma$ , tj.  $10,1 \pm 1,2$  mg%, a więc mniejsza niż 8,9 mg% lub większa niż 11,3 mg%, jest bardzo prawdopodobnie zjawiskiem patologicznym. Jaki zakres uznamy za właściwy dla normy, zależy od umowy. Najczęściej wartości leżące poza granicami objętymi podwójnym średnim odchyleniem uważa się za podejrzaną.

Tabela 4  
Zawartość wapnia w surowicy krwi  
92 zdrowych mężczyzn \*

Zawartość wapnia w mg w 100 ml	Liczba poszczególnych wyników
8,8	0
9,0	2
9,2	3
9,4	3
9,6	4
9,8	9
10,0	24
10,2	19
10,4	11
10,6	9
10,8	5
11,0	2
11,2	1
11,4	0

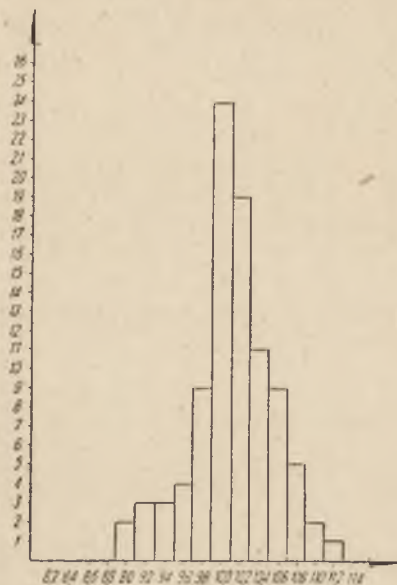
Średnia arytmetyczna  $A = 10,1$  mg%  
Średnie odchylenie  $\sigma = 0,4$  mg%.

Dla wyjaśnienia pojęcia „średnie odchylenie średniej arytmetycznej“ posłużymy się dalszym przykładem. Postawiliśmy sobie następujące zagadnienie: czy pozycja badanego osobnika ma wpływ na zawartość całkowitego azotu w surowicy krwi? Porównano z sobą dwie pozycje: poziomą i skośną (54° od poziomu). Po półgodzinnym pozostawianiu badanego w danej pozycji pobierano krew z żyły łokciowej i w surowicy oznaczano zawartość całkowitego azotu metodą Kjeldahla. Badano osoby zdrowe w wieku od 20 do 30 lat. Wykonano po 20 oznaczeń i uzyskano w wyniku: dla pozycji poziomej  $1,10 \pm 0,06$ , dla pozycji pochyłej  $1,23 \pm 0,05$  gramów azotu na 100 ml.

Aby uzyskać odpowiedź na pytanie, czy zawartość całkowitego azotu w surowicy krwi zależy istotnie od pozycji, w której pobierano krew, można posłużyć się

\* W oparciu o dane piśmiennictwa (3)

obliczeniem średniego odchylenia średniej arytmetycznej. Dla uzmysłowania sobie sensu tego pojęcia można następująco rozumować. Przyjmijmy, że chcemy się dowiedzieć, jaka jest średnia zawartość całkowitego azotu surowicy u wszystkich ludzi między 20 a 30 rokiem życia, zdrowych i nie wykonujących pracy. Przyjmijmy następnie, że poziom azotu nie zależy ani od miejsca przebywania, ani od czasu, a więc będzie taki sam w r. 1953 jak w r. 1900 czy 2000. Całość populacji objęłaby zatem wszystkich ludzi zdrowych w wieku 20 do 30 lat w przeszłości i przyszłości. Taki zbiór osób byłby nieskończenie wielki. Gdyby było możliwe zbadanie całej takiej populacji, otrzymałoby się zapewne normalną krzywą rozrzutu, tj. krzywą Gaussa. Średnia arytmetyczna tego olbrzymiego zbioru byłaby wielkością reprezentującą całą populację. Otóż idzie o zbliżenie się do określenia tej średniej arytmetycznej. W tym celu wybiera się jakąś przypadkową grupę, tj. taką, do której miałby szansę dostania się każdy zdrowy człowiek w wieku 20 do 30 lat, i dla tej grupy oznacza się średnią arytmetyczną. Jest mało prawdopodobne, by uzyskana w ten sposób średnia arytmetyczna była identyczna ze średnią całej populacji. Oznaczenie średniej w innych również przypadkowo wybranych grupach da zapewne wyniki odmienne. Ale możemy się spodziewać, że liczne uzyskane w ten sposób średnie arytmetyczne będą rozmieszczone symetrycznie z obydwu stron tej idealnej średniej arytmetycznej właściwej dla całej populacji; możemy przypuścić, że ich rozmieszczenie będzie odpowiadało normalnej krzywej rozrzutu. Oczywiście nie wiemy, w którym miejscu znajduje się średnia uzyskana dla jednej z grup, ale gdybyśmy mogli oznaczyć średnie odchylenie dla ich rozkładu, to mielibyśmy prawo wnioskować, że jest mało prawdopodobne, by taka średnia leżała w większej odległości niż dwa lub trzy średnie odchylenia od tej charakterystycznej dla całej populacji średniej arytmetycznej. Otóż właśnie to średnie odchylenie takiego zespołu średnich arytmetycznych nazywa się średnim odchyleniem średniej arytmetycznej. Oblicza się je dzieląc średnie odchylenie  $\sigma$  przez pierwiastek z liczby osób badanych danej grupy. Oznaczamy je literą  $S$ .



Ryc. 4. Zawartość wapnia surowicy u 92 dorosłych mężczyzn, oznaczona metodą Kramera-Tisdalla. Odcięte podają zawartość wapnia w miligramach w 100 ml; rzędne — liczby poszczególnych wyników. Według Stutzmanna i Amatuzio (3).

$$S = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$$

Dla pozycji poziomej  $S_1 = \frac{0.06}{\sqrt{20}} = \frac{0.06}{4.47} = 0.013$  gramów azotu w 100 ml surowicy.

Dla pozycji pochylonej  $S_2 = \frac{0.05}{\sqrt{20}} = \frac{0.05}{4.47} = 0.011$  gramów azotu w 100 ml surowicy.

Na pytanie, czy wartości uzyskane w pozycji poziomej i pochyłej należą do jednej populacji, czy też są istotnie różne, możemy odpowiedzieć, że przynależność do tej samej populacji jest mało prawdopodobna, jeżeli suma trzykrotnych średnich błędów średniej arytmetycznej, tj.  $3 S_1 + 3 S_2$  będzie mniejsza niż różnica obydwu średnich arytmetycznych, tj.  $A_2 - A_1$ . Podstawiając uzyskane liczby widzimy, że  $3 S_1 + 3 S_2 = 3 \times 0,013 + 3 \times 0,011 = 0,039 + 0,033 = 0,072$   
 $A_2 - A_1 = 1,23 - 1,10 = 0,13$ .

Obydwie średnie wartości różnią się od siebie więcej niż o sumę trzykrotnych średnich odchyień średniej arytmetycznej obydwu szeregów. A więc jest mało prawdopodobne, by obydwie badane szeregi należały do tej samej populacji. Nasz wniosek, że pozycja istotnie wpływa na zawartość całkowitego azotu w surowicy, jest więc uzasadniony.

Pojęcia: średnia arytmetyczna, średnie odchylenie i średnie odchylenie średniej arytmetycznej są istotne dla wyrażania liczbowych wyników doświadczeń, a w szczególności dla liczbowego wyrażania normalnej zmienności. Podanie dwu pierwszych wartości oraz liczby zbadanych przypadków pozwala obliczyć zarówno średnie odchylenie średniej arytmetycznej, jak i inne pochodne pojęcia. Taki też dezyderat wysuwają redakcje czasopism biochemicznych i w biochemii klinicznej należy ten dezyderat uwzględnić.

## II

Zmienność przypadkowa, wyrażająca się normalną krzywą rozkładu, daje się ściśle charakteryzować przez poprzednio omówione pojęcia. Nie wszystkie jednak składniki biochemiczne wykazują tego rodzaju zmienność; jeżeli istnieje czynnik działający jednokierunkowo, i to z rozmaitym natężeniem, to krzywa rozkładu nie będzie symetryczna i poprzednio omówione pojęcia nie mają ścisłego zastosowania. Dlatego też słuszny jest dezyderat redakcji czasopism biochemicznych, by przy podawaniu wyników z większej liczby doświadczeń określić również rodzaj rozkładu. Wstępem więc do liczbowego ujęcia większej serii liczbowych wyników jest ich uporządkowanie. Posłużmy się jako przykładem normalną zawartością bilirubiny w surowicy. King (4) oznaczył ten składnik u 100 zdrowych osób i otrzymał następujące wyniki:

mg w 100 ml.	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9
Liczba przypadków	26	36	18	10	4	4	0	2

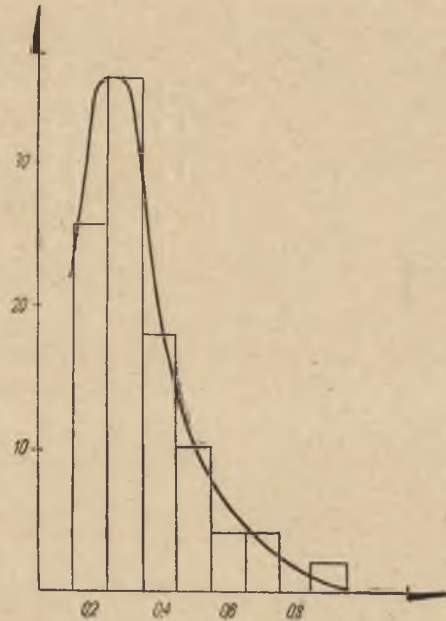
Wyrażenie tego szeregu liczb średnią arytmetyczną oznaczałoby coś zupełnie innego niż w poprzednich przykładach. Gdy dla zawartości wapnia średnia arytmetyczna pokrywa się liczbowo z wartością najczęściej spotykaną (modalną) oraz leżącą pośrodku szeregu liczbowego (medianą), to dla bilirubiny są to trzy różne liczbowo wielkości. Ryc. 5 unaocni to lepiej niż powyższy szereg liczb.

Podobny rozrzut nie jest czymś wyjątkowym. King (4) znajduje go dla licznych składników krwi całkowitej (jak cholesterolu, kreatyniny, mocznika) oraz surowicy (jak bilirubiny, potasu, amylazy, fosfatazy kwaśnej i alkalicznej). Widocznie zmienność wymienionych składników krwi zależy nie tylko od przypadku, lecz od jakiegoś czynnika działającego jednokierunkowo, który zaznacza swój udział raz silniej, drugi raz słabiej. Tym czynnikiem mogą być zmiany stanu fizjologicznego, zmiany patologiczne nie ujawnione w badaniu, wreszcie nienajrzadziej będą nimi jakieś błędy metody, które w różnych oznaczeniach wywierają większy lub mniejszy wpływ. Eliminowanie tego czynnika byłoby zadaniem ważnym, ale nie jest rzeczą łatwą i nie zawsze możliwą. Ponieważ zaś zdanie sobie sprawy ze zmienności

normalnej jest podstawą biochemicznych badań klinicznych, należy ją wyrazić liczbowo, ale już inaczej, mniej ściśle, niż możemy to zrobić dla zmienności podległej jedynie przypadkowi.

King (4) zaproponował następujące postępowanie: dla określenia normalnej zawartości jakiegoś składnika przeprowadza się u 100 zdrowych osób jego oznaczenie, następnie porządkuje się uzyskane wyniki liczbowe i określa wartości, które obejmują 98% oraz 80% wszystkich wyników. Na przykład dla potasu stwierdzono, że wartości 13,5 oraz 21,7 mg w 100 ml obejmują 98% wszystkich oznaczeń, pozostawiając po 1% z każdej strony szeregu; wartości zaś 15,1 oraz 19,6 mg% stanowią dolną i górną granicę 80% wszystkich przypadków, pozostawiając po 10% z obydwu stron szeregu liczbowego. Ten sposób pozwala nam przewidywać, że poziom potasu u ludzi zdrowych będzie z 80-procentowym prawdopodobieństwem mieścił się w granicach 15,1 do 19,6 mg%. Znalezienie większej lub mniejszej wartości nie pozwala nam określić jej jako nienormalnej, ale każe zwrócić na nią uwagę jako na podejrzaną. Natomiast wartości niższe niż 13,5 oraz wyższe niż 21,7 mg% możemy z dużym prawdopodobieństwem uważać za nienormalne.

Tego rodzaju liczbowe ujęcie normalnej zmienności, chociaż mniej ściśle niż omówione w pierwszej części wykładu, może spełnić swoje zadanie i pozwolić na porównanie doświadczalnie uzyskanych wyników z normą.



Ryc. 5. Zawartość bilirubiny surowicy u 100 ludzi zdrowych. Odcięte podają zawartość bilirubiny w miligramach w 100 ml; rzędne — liczby poszczególnych wyników. Według Kinga (4).

### III

Poprzednie rozważania dadzą się zastosować nie tylko do krwi i takich płynów ustrojowych jak płyn mózgowo-rdzeniowy, ale również do poszczególnych tkanek. Nie możemy natomiast wyzyskać poprzednich wywodów dla ścisłego sprecyzowania pojęcia „normalnego“ moczu. Skład płynów ustrojowych i tkanek mimo ciągle zmieniającego się ilościowo i jakościowo pokarmu, mimo rozmaitego nasilenia czynności fizjologicznych utrzymuje się w stosunkowo wąskich granicach: urządzenia regulacyjne dążą do utrzymania składu chemicznego organizmu na możliwie mało zmieniającym się poziomie. Istotną rolę w tej regulacji odgrywa wydalanie przez nerki. Przez zwiększenie wydalania jednych składników, zmniejszenie zaś innych utrzymuje organizm stałość swojego składu. Zdrowa nerka będzie zatem odpowiadała na zmienione warunki wydalaniem moczu o innym składzie. Stały skład moczu bez względu na rodzaj pokarmu i stan fizjologiczny ustroju jest wyrazem chorej nerki. Zmienność składu moczu jest stanem normalnym, stałość zaś patologicznym. Zrozumiałe więc, że podawanie liczbowe składu normalnego moczu bez uwzględnienia diety i warunków fizjologicznych jest bez żadnej wartości. W oparciu o takie rozważanie zaproponowałem (5,6) wyrażanie normalnego składu

moczu rzędem wielkości składników za okres 24 godzin. Taki skład moczu podaje tab. 5.

Tabela 5

Rząd wielkości w gramach	Substancja
1000 g	Woda
10 g	Mocznik, chlorek sodowy
1 g	Kreatynina, kwas moczowy, amoniak, potas, siarczany nieorganiczne, fosforany
0,1 g	Wapń, magnez, aminokwasy, cukier, fenole, estry siarczanowe
0,01 g	Białko, ciała ketonowe, zasady purynowe, urobilinogen, indykan, kwas szczawowy i in.

W moczach patologicznych skład może ulec dużej zmianie. I tak np. w cukrzycy glikoza może występować w ilościach rzędu 10 g, w ketonurii ciała ketonowe w rzędzie 1 g lub 10 g, w białkomoczu białko w rzędzie 1 g lub więcej. Dla większości składników moczu tylko te wielkości mogą być uważane za patologiczne, które różnią się dziesięciokrotnie lub nawet stokrotnie od normalnego składu moczu. Wyczuwa to dobrze klinicysta, który posługuje się przecież metodami wykazującymi nie zmianę kilku czy kilkudziesięcioprocentową, lecz zmianę rzędu wielkości dziesięć czy stokrotną.

Oczywiście rozumowanie to ma zakreślone granice. Wszystkie oznaczenia bi-lansowe przy ściśle określonym składzie pokarmów i określonych warunkach badania wymagają stosowania metod nie ustępujących czułością metodom badania składników krwi. Następnie należy pamiętać, że niektóre składniki wykazują dużą stałość poziomu, np. ilość kreatyniny wydalana na dobę jest u tego samego osobnika wielkością ulegającą nieznacznym stosunkowo wahaniom bez względu na zmianę odżywiania, w związku z czym były nawet propozycje, by ilością kreatyniny zawartej w moczu z 24 godzin kontrolować skrupulatność zbierania moczu.

#### IV

Na przedstawionych przykładach starałem się wykazać i zmienność pojęcia „normalności“, i to, że w dążeniu do ściślego liczbowego wyrażenia wyników analiz chemicznych musimy liczyć się ze stanem naszej metodyki i ze zmiennością fizjologiczną ustroju. Skład chemiczny krwi i płynów organizmu ludzi zdrowych chcemy wyrażać „zmiennością normalną“, wyrażoną przez średnią arytmetyczną i przez średnie odchylenie. Tam, gdzie stwierdzany rozkład nie daje krzywej Gaussa, musimy z tej ściśłości zrezygnować, ale podanie granic 80 i 98-procentowego rozrzutu da nam wartości dające się wyzyskać przy ocenie normalnej czy nienormalnej zawartości poszczególnych składników. W ocenie normalności składu moczu przy nie ustalonych warunkach życia i diecie ściśłość naszego ujęcia spada do posługiwania się rzędem wielkości.

Jeżeli zwrócimy szczególną uwagę na skład krwi, to niestety musimy stwierdzić, że jedną z istotnych trudności stanowi brak ścisłych danych normalnej zmienności, choć są one osiągalne dla metod, którymi dysponujemy. Ten brak jest w dużej mierze przyczyną, że wiele prac nie osiąga celu zamierzonego przez autorów i że nie są dostatecznie przekonujące. Toteż zrozumiałą jest dezzyderat Komitetu Bio-

chemicznego PAN, by obecne sympozjum dało podstawy ustalenia norm tych składników, które mają dla kliniki istotne znaczenie. Aby dezyderat ten został zrealizowany, nie można ograniczyć się do zebrania danych zagranicznych, lecz trzeba je opracować na naszym zespole ludzkim, który przecież i warunkami życia, i wpływem otoczenia może się różnić od zespółów, na których opierają się wyniki obcego piśmiennictwa. O tym, że braki te występują nie tylko u nas, można się łatwo przekonać z takich publikacji jak *Krebsa* (7), prac *Sundermana* i *Boerner*a (8) lub *Tołkaczewskiej* (9). Niech dowodem tego będzie brak ścisłych danych co do normalnej zawartości potasu w surowicy. Granice normy są podawane: 12,1 do 25,4 mg w 100 ml (7) oraz 13,5 do 21,7 mg w 10 ml (4). Normalna zmienność wynosiłaby więc, jeśli chodzi o górną granicę, 50 % w (7) i 38 % w (4), podczas gdy dla wapnia wynosi ona w (4) zaledwie 20 %, a dla sodu 12,5 %. Nie wydaje mi się prawdopodobna taka wielka normalna zmienność i mamy tu do czynienia raczej z niedostateczną ścisłością stosowanej metody, ewentualnie także z istnieniem systematycznego błędu wynikającego stąd, że potas wywędrowuje z krwinek (w których znajduje się w 10 razy większym stężeniu) oraz z tego, że różne okresy czasu, które upływają między pobraniem krwi a oddzielaniem surowicy, powodują większe lub mniejsze przenikanie potasu z krwinek. Dla wyników badań klinicznych ta wielka zmienność normy ma szczególne znaczenie. Są przecież liczne prace, które stosunkiem stężenia potasu do wapnia w surowicy starają się wyrazić stany odmienne od normalnego. Jaką zaś może to mieć wartość, skoro wapń oznacza się ze stosunkowo znaczną dokładnością, a potas wykazuje zmienność nie spotykaną dla innych składników? Można by mnożyć przykłady, które wskazują na słuszność dezyderatu ustalenia norm składników krwi. Zawartość hemoglobiny we krwi była u nas ściśle oznaczana przez kilku badaczy, również dla białek w surowicy mamy normalne wartości uzyskane różnymi niezależnymi od siebie metodami, ale liczne inne składniki czekają na opracowanie.

W jaki sposób powinniśmy przystąpić do wykonania tej pracy? Przede wszystkim należałoby ustalić poszczególne grupy ludzi, zwłaszcza w zależności od wieku i płci. Dzieci wykazują istotne różnice pod względem wielu składników krwi, np. nieorganicznych fosforanów, ale i tutaj nie znamy dokładnych granic normalnych wahań. Wpływ płci przejawia się czasem w ten sposób, że jakiś składnik krwi ma większą dyspersję u kobiet niż u mężczyzn, np. mocznik. Zdaje się tutaj działać cykl menstruacyjny, a więc odpowiednio zestawiając grupy powinniśmy uwzględnić i ten wpływ. Zwrócono również uwagę na to, że pozycja, w której pobiera się krew, ma istotny wpływ na niektóre składniki. Porównując zawartość różnych składników w surowicy krwi pobranej od ludzi w pozycji poziomej i pochylej wykazaliśmy istotne różnice w zawartości białek, cholesterolu i wapnia przy nie dającej się stwierdzić zmianie poziomu mocznika, sodu i chlorków. A przecież znaczenie tej obserwacji dla kliniki jest wielkie. Wszak często porównuje się wartości uzyskane u chorych leżących z wartościami „normalnymi“ u personelu, od którego pobiera się krew ambulatoryjnie. Również wpływ diety może być istotny.

Drugą sprawą jest odpowiedź na pytanie, jak wielka powinna być grupa dla oznaczania normalnej zmienności. Niekiedy możemy sobie pozwolić na sto i więcej. W innych wypadkach warunki zmuszają do ograniczenia tej liczby, niekiedy nawet dość znacznego. Ale nabiera wtedy szczególnej wagi dezyderat, obowiązujący zresztą przy podawaniu wszelkich norm, wyraźnego podania liczby przypadków, która posłużyła do obliczenia średniej arytmetycznej i średniego odchylenia.

Trzecią ważną sprawą jest dokładne podanie metody, którą się posługiwano, oraz wszelkich wprowadzonych modyfikacji; nawet zastąpienie np. wirowania przez sączenie może mieć istotny wpływ, np. w oznaczaniu wapnia. Jak wielki wpływ na wyniki ma rodzaj metody, dobitnie wskazują dane dla cukru w krwi, uzyskane przy użyciu różnych metod, dane dla azotu niebiałkowego przy różnych sposobach odbiał-

czania, dane dla białek osocza wtedy, gdy stosuje się oznaczenie azotu, refrakcję, ciężar właściwy lub próbę biuretową. Z wyborem metody łączy się także konieczność jej kontroli. Nie wolno opierając się na obcych wynikach ograniczyć się jedynie do ścisłego wykonania metody. Przecież i odczynniki pochodzą z różnych fabryk, również istnieją nie dające się ściśle sprecyzować różnice indywidualne poszczególnych pracowników, które mogą wywierać większy lub mniejszy wpływ na uzyskane wyniki. Toteż systematyczna kontrola metody na wzorcach i określenie zmienności wywołanej błędem metody stanowi ważny punkt ustalenia normy, jak i w ogóle użycia metod biochemicznych. Sprawa ta jest tak ważna, że i w publikacji nie należy tego pominąć.

Po czwarte, uzyskane wyniki liczbowe należy uporządkować dzieląc je na grupy. Zakres objęty przez jedną grupę zależy i od dokładności stosowanej metody, i od liczby oznaczeń. Uporządkowanie takie pozwoli nam stwierdzić rodzaj rozrzutu i gdy rozrzut ten jest normalny, tj. odpowiadający krzywej Gaussa, obliczyć średnią arytmetyczną i średnie odchylenie. Te dwie wartości przy podaniu liczby badanych przypadków wystarczą do uzyskania dalszych liczb ważnych dla oceny wyników. Gdy jednak rozrzut nie wyraża się krzywą Gaussa, należy podać skrajne wartości zmienności oraz granice 80- i 98-procentowego rozrzutu, nie zapominając oczywiście o liczbie badanych przypadków.

O tym, że znajomość takiej normalnej zmienności składników ważnych klinicznie jest rzeczą podstawową, nikt nie będzie powątpiewał. Ale należy wyraźnie zaznaczyć, że najściślejsze opracowanie statystyczne wyników nie da żadnego pożytku, jeżeli w samej metodyce i jej wykonaniu tkwią istotne błędy. Przecież i najlepszy rzemieślnik nie uzyska dobrego wyniku, jeśli materiał, którym się posługuje, jest bez wartości. A więc dobre opanowanie metodyki musi stanowić podstawę oznaczeń, które mają na celu ustalenie normalnej zmienności. Ale omówienie tych dezyderatów i właściwa ocena wartości metodyki nie wchodzi w zakres mego wykładu.

#### PIŚMIENICTWO

- 1) Hill A. B.: Principles of medical statistics, Lancet Limited London 1948, IV. wydanie. — 2) Michaelis L.: Einführung in die Mathematik, Springer, Berlin 1922. — 3) Stutzmann F. i Amatuzio D.: Arch. Biochem., 1952, t. 39, s. 271 do 275. — 4) Wootton I.: King E. J. i Smith J. Maclean: Brit. Med. Bulletin, 1951, t. 7, s. 307—311. — 5) Mozolowski W.: Polska Gazeta Lekarska, 1938, t. 17, nr 9. — 6) Mozolowski W.: Lancet, 1948, I, s. 423. — 7) Krebs H. A.: Ann. Rev. Biochem., 1950, t. 19, s. 409—430. — 8) Sunderman F. i Boerner F.: Normal values in clinical medicine, Saunders, Filadelfia 1949. — 9) Tolkaczewska N. F.: Chemiczeskij sostaw krwi, sekretow, ekskretow i židkosteĵ normalnogo czełoweczeskogo organizma, Moskwa 1940.

ZDZISŁAW STOLZMANN

## METODY BIOCHEMII KLINICZNEJ, ICH SWOISTOŚĆ I SPOSÓB INTERPRETACJI

Zarówno w badaniach biochemii klinicznej dążących do rozwiązywania problemów teoretycznych, jak i w pracach prowadzonych dla celów diagnostyki lekarskiej istotnym i niezbędnym warunkiem rzetelności wyników i wysnuwanych na ich podstawie wniosków jest dokładna metodyka chemiczna i jej właściwa interpretacja.

Omawianie warunków, jakie powinien zachować biochemik i analityk w swej pracy dla uzyskania wiarogodnych wyników, nie jest atrakcyjne i może łatwo wywołać wrażenie, że marnotrawstwem czasu byłoby prowadzenie dyskusji nad zagadnieniem tak prostym i błahym oraz samo przez się zrozumiałym, czy poświęcanie mu osobnego wykładu.

Dwie publikacje, które ukazały się w czasopismach zagranicznych — *W. P. Belka* i *F. W. Suñdermana* (1) oraz *I. D. P. Woottona* i *E. J. Kinga* (2), a następnie artykuły dyskusyjne (3) są dowodem, że zagadnienie to nie jest błahie i że jest godne uwagi. Co więcej, powinno ono wzbudzić zainteresowanie tych wszystkich, którzy mają styczność z pracowniami analitycznymi i na ich wynikach opierają swoje wnioski. Wymienione dwa główne artykuły są bowiem obrazem pracy laboratoriów szpitalnych.

Komitet Laboratoriów Towarzystwa Lekarskiego w stanie Pensylwania w zamiarze sprawdzenia stopnia rzetelności i prawdziwości wyników analiz wykonywanych w pracowniach szpitali zorganizował pewnego rodzaju ankietę. Mianowicie po uprzednim porozumieniu się z klinicystami i lekarzami i uzyskaniu ich zgody na poddanie kontroli pracy pracowni analitycznych w szpitalach rozesłane zostały do 59 laboratoriów wodne roztwory takich substancji, które najczęściej, a może nawet stale, oznaczane bywają w każdym laboratorium klinicznym. Były to wodne roztwory glikozy, mocznika, soli wapniowej, chlorku sodowego w takich stężeniach, jakie znajdujemy w krwi człowieka. Nadto rozesłano próbki surowicy ludzkiej dla oznaczenia białka całkowitego i albumin oraz dwie próbki krwi z dodatkiem cytrynianu sodowego dla oznaczenia zawartości hemoglobiny. Zadaniem pracowni było oznaczenie ilościowe składników w rozesłanych próbach i podanie wyników. Zawartości składników wszystkich 12 próbek były dokładnie znane, a po przesłaniu do poszczególnych placówek analitycznych ponownie skontrolowane dla upewnienia się, że transport nie wpłynął na zmianę stężenia.

Całą akcję przeprowadzono w dwu etapach: jedną serię próbek, obejmującą oznaczenie 7 składników w sześciu próbach, rozesłano w jednym miesiącu, a drugą, obejmującą 6 składników — w drugim. Wyniki całej akcji zestawione są w tabeli 1.



Tabela 1

## Analizy wrześniowe

Substancja	Zawartość w 100 ml i dopuszczalny błąd	Liczba prób	Wyniki		
			Dobre	Błędne	Z dużym błędem
Hemoglobina	9,8 g ± 0,3 g	51	17	34	11
Hemoglobina	15,1 g ± 0,5 g	52	21	31	3
Glikoza	60 mg ± 10 mg	52	33	19	5
Glikoza	375 mg ± 30 mg	51	27	24	4
Chlorek sodu	456 mg ± 50 mg	44	30	14	2
Białko całkowite	6,6 g ± 0,4 g	47	18	29	7
Albuminy	4,6 g ± 0,3 g	44	9	35	7

## Analizy październikowe

Wapń	6,6 mg ± 0,5 mg	43	14	29	12
Wapń	12,6 mg ± 0,5 mg	44	14	30	11
Azot mocznika	45 mg ± 5 mg	41	14	27	13
Azot mocznika	9 mg ± 1 mg	42	21	21	14
Chlorek sodu	642 mg ± 50 mg	43	28	15	2
Chlorek sodu	447 mg ± 50 mg	43	28	15	1

Już przy pobieżnym przeglądzie tabeli 1 uderza duża liczba błędnych wyników, zestawionych w kolumnie 5. Jeżeli zsumujemy liczby tej kolumny i porównamy z sumą wyników dobrych, to okaże się, że więcej było wyników złych aniżeli dobrych (323 i 274). Nie uzasadnia takiego wyniku akcji wymagana nadmierna dokładność oznaczeń, która, jak widać z kolumny 2, dopuszcza stosunkowo duży błąd. Nadto trzeba zauważyć, że rozestane próby były w większości roztworami wodnymi, które nie wymagają dodatkowych czynności nieodzownych w pracy ana-

Tabela 2

Składniki i ich stężenie w próbkach wzorcowych mg <sup>0</sup> / <sub>0</sub>	Otrzymane wyniki „z wielkim błędem“											
	mg <sup>0</sup> / <sub>0</sub>											
Wapń	12,6	7	8	8	8,5	9	9,4	14,6	15	19	23,5	26,6
Wapń	6,6	4	4	9,7	10	10	10,6	12	12	12,5	13	17,7
Chlorek sodowy	456	340	350	370	600	600	620	770	780			
Chlorek sodowy	447	250	320	590	620	750						
Glikoza	60	35	95	115	333	363	444	571				
Glikoza	375	95	100	250	500	500	680					
Azot mocznika	45	6 wyników od 5—6 mg <sup>0</sup> / <sub>0</sub>										
Azot mocznika	9	2	3	3,1	3,2	3,3	4,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
		17,0		22,0	30,0	93,7						

	g <sup>0</sup> / <sub>0</sub>	g <sup>0</sup> / <sub>0</sub>										
Białko całkowite	6,6	4,5	4,5	8,4	8,5	8,6	8,5	9,0	11,9	12,0		
Albuminy	4,6	1,5	2,5	6,0	6,4	6,5	7	10				
Hemoglobina	9,8	8,8	8,8	8,4	8,5	12,0	12,1	13	13,1	15,6		
Hemoglobina	15,1	12,5	18,0	18,1	17,0	17,1	17,5					

litycznej na materiale biologicznym powiększających niebezpieczeństwo popełnienia błędu w oznaczeniu ilościowym. W ostatniej kolumnie ujęto liczbowo wyniki odznaczające się dużym błędem. Dla lepszego zilustrowania tej kolumny i dania pojęcia skali błędów, zestawilem w tabeli 2 liczby zebrane z wykresów pracy oryginalnej.

Porównanie liczb zestawionych w tabeli 2 daje nam pojęcie o wielkości błędów wyników, które zaliczono do grupy bardzo błędnych.

W innym zestawieniu, mającym na celu ocenę pracy poszczególnych laboratoriów na podstawie otrzymanych wyników, okazało się, że w akcji wrześniowej na 52 pracownie nie było takiej, która by wykonała wszystkie analizy w dopuszczalnych granicach błędu, w październikowej zaś na 44 pracownie były zaledwie 2, które wykonały wszystkie 6 oznaczeń w dozwolonych granicach błędu.

Podobną próbę kontroli pracy laboratoriów szpitalnych przeprowadził *I. D. P. Wootton* i *E. J. King* (2) w Anglii. Do 21 pracowni rozesłano próbki tej samej krwi z dodatkiem cytrynianu oraz streptomycyny z zaleceniem oznaczenia w przesłanej próbie mocznika, azotu niebiałkowego, kwasu moczowego, kreatyniny, cholesterolu i chlorków, przy czym stężenie składników nie było znane. W drugiej serii rozesłano do 36 pracowni próbki roztworów wodnych o znanym stężeniu następujących składników: mocznika, kreatyniny, kwasu moczowego, glikozy, chlorków, fosforanów, potasu i wapnia.

W pierwszej próbie nieznaną była autorom akcji zawartość składników krwi i otrzymane cyfry wyników zestawiono w ten sposób, że średnią otrzymanych cyfr oznaczono liczbą 100%, a poszczególne wyniki różniące się od średniej dają nam obraz rozrzutu, co ujęte zostało w tabeli 3. Liczby wzięto z wykresów pracy oryginalnej.

Tabela 3

Zestawienie rozrzutu wyników analiz. 100% oznacza średnią otrzymanych cyfr

Mocznik				1	3	1		3	5	1		2	3				2	
Azot																		
pozabiałkowy			1			1	1	1	1	1		1		1	1			
Kwas moczowy			1		2		2	1	2	4	3	1		1			1	
Kreatynina			1		2	1	1	1	1	1								
Cholesterol					1	1	2	6	3	1	4		3					
Chlorki					1	1	2	6	6	6	1	1	1					
	0	20	40	60	80	100	120	140	160	180	200%	1(352%)						

Z tabeli widać, że rozrzut cyfr dla wszystkich oznaczeń jest duży, a szczególnie dla mocznika, dla którego wynosi od 40 do 180% wartości średniej. Podobnie przedstawia się sprawa z kwasem moczowym i azotem niebiałkowym.

Powtórzona kontrola, tym razem już na płynach o znanym stężeniu, dała wyniki zestawione w tabeli 4, w której liczbą 100% oznaczono zawartość rzeczywistą składnika rozesłanych prób.

Jakkolwiek większość wyników skupia się dokoła wartości rzeczywistości 100%, to i w tym zestawieniu widzimy duży rozrzut wyników dotyczących oznaczania mocznika, kwasu moczowego, fosforanów i kreatyniny.

Wyniki obu ankiet mówią za siebie. Trzeba szukać przyczyny tego zjawiska i wskazać drogę tym, którzy w zagadnieniu analiz klinicznych są bezpośrednio zainteresowani. Cytowane artykuły o rozbieżności wyników i nierealności liczb podawanych w analizach są przecież obrazem pracy pracowni szpitalnych.

Wskazanie i znalezienie drogi uniknięcia podobnych błędów, zwrócenie uwagi na ich źródła jest właśnie wytyczną niniejszego referatu. Trzeba poczynić wszelkie starania, by pracownie nie dawały wyników niewiarogodnych i przez to bezwarto-

ściowych niezależnie od tego, czy to będą laboratoria usługowe przy szpitalach, dające wyniki dla celów diagnostycznych, czy pracownie naukowe, których zadaniem jest dostarczenie wyników potrzebnych do rozwiązywania zagadnień naukowych. Należy zastanowić się nad tym, co jest przyczyną, że pracownie analityczne nie

Tabela 4

Zestawienie rozrzutu wyników analiz. 100<sup>o</sup>% oznacza rzeczywistą zawartość składników

Mocznik																		
Kwas moczowy	1																	
Fosforany				1														
Kreatynina					1													
Glikoza					1	3	13	13										
Chlorki					1			12	18	4								
Sód						2	8	17	4									
Potas						3		12	11	4								
Wapń							8	12	12	2	1							
	0	20	40	60	80	100	120	140	160	180	%							

spełniają dobrze swego zadania i wykonują błędne analizy chemiczne. Trzeba odpowiedzieć na pytanie, gdzie jest źródło błędów. Wydaje mi się, że składa się na to wiele czynników, które kolejno omówię.

## 1. BRAK WYSZKOLONEGO PERSONELU

Pierwszym powodem będzie zawsze brak personelu odpowiednio wyszkolonego, który by dobrze znał podstawowe zasady pracy analitycznej, albo personel niedostatecznie liczny, z czym zawsze musimy się liczyć. Jest to sprawa w naszych warunkach szczególnie aktualna, gdyż za szybkim rozwojem naszego szpitalnictwa nie podąży rozwój i organizacja pracowni analitycznych w klinice i szpitalu. Na pracowników zatrudnionych w laboratorium, nawet dobrze wyposażonym w aparaturę i przybory laboratoryjne, spada obowiązek wykonywania masowych analiz, których liczba jest niewspółmierna z wydajnością pracy personelu. Personel nawet najlepiej wyszkolony nie jest w stanie należycie wykonać zadania. Nie tylko nie zdąży on dobrze wykonać zleconych analiz, ale nie ma możliwości sprawdzenia swej pracy na roztworach wzorcowych. A przecież w każdej pracowni powinno się skalibrować co pewien czas naczynia miarowe, sprawdzić ciężarki wag analitycznych, by mieć pewność, że nie popełnia się błędów już w czynności odmierzenia czy odważania. Każda metoda wymaga co pewien czas sprawdzenia na wzorcowym roztworze i następnie na materiale biologicznym pobranym u ludzi zdrowych. Jest to szczególnie ważne, gdy zaczyna się pracować świeżo przyrzadzonymi roztworami. Jestem przekonany, że w tych pracowniach analitycznych, które zasypywane są analizami, tych podstawowych warunków rzetelności wyników analiz nie spełnia się wcale właśnie z braku czasu jako wtórnej przyczyny niedostatecznej liczby pracowników. Wtedy w konsekwencji należy spodziewać się takich wyników pracy, jakie widzieliśmy w zestawieniu wymienionych na wstępie ankiety.

## 2. WŁAŚCIWOŚCI MATERIAŁU BIOLOGICZNEGO I NIESWOISTOŚĆ METOD

Właściwości chemiczne i fizyczne materiału biologicznego są dalszą przyczyną, dla której praca z nim analityka jest trudna i wymaga szczególnej akuracji i doświadczenia. Jest to zwykle mieszanina wielu połączeń chemicznych, które często

w czasie przechowywania ulegają przemianom i przez to zmieniają swe pierwotne cechy. Dalszą trudnością jest to, że szukany składnik znajduje się w badanej próbce w bardzo małym stężeniu, ilość próby jest także niewielka, co razem wzięte podnosi możliwość popełnienia błędów. Nie możemy w takich warunkach stosować metod klasycznej analizy, w której wyodrębniamy szukaną substancję w stanie czystym, a następnie oznaczamy ją ilościowo na podstawie swoistego odczynu.

Większość metod stosowanych w biochemii klinicznej opiera się na próbach empirycznych, przez co sama metoda kryje w sobie źródło błędu. Pominąwszy nieliczne wyjątki, metody oznaczeń ilościowych są oparte na odczynach nieswoistych, to znaczy takich, które nie są charakterystyczne wyłącznie dla szukanej substancji, jaką trzeba oznaczyć ilościowo. Odczyn, na podstawie którego wykonujemy analizę czy to metodą miareczkową, czy kolorymetryczną, jest nieraz wspólny wielu połączeniom chemicznym, nieraz bardzo różnym, które równocześnie znajdują się w badanej próbce. Okoliczność ta sprawia, że metody empiryczne wymagają ścisłego zachowania warunków toku analizy. A często zdarza się, że metoda jest opracowana dla określonego zakresu szukanej substancji. Nie trudno więc zrozumieć, że drobne odchylenie od podanego w oryginalnej metodzie toku pracy musi prowadzić do otrzymania błędnych wyników. Wystarczy mała zmiana stężenia jonów wodorowych przez dodanie nadmiaru kwasu czy zasady lub też innego odczynnika chemicznego, by zmienić warunki środowiska i wpłynąć na tok reakcji, a tym samym na wynik analizy.

Przykładem takim jest proces redukcji żelazicyjanku potasowego w powszechnie znanej metodzie oznaczania cukru wg *Hagedorna i Jensena* (4). Stopień redukcji w oryginalnej metodzie nie jest zupełny w obecności węglanów i ilość cukru nie jest ściśle proporcjonalna do ilości zredukowanego żelazicyjanku. Jeżeli jednak prowadzić będziemy redukcję w środowisku o  $\text{pH} = 10$  przy zastosowaniu buforu fosforanowego (*Fujita i Iwatake* oraz *Fujita i Okamoto* — 5), wartość redukcji jest dokładnie proporcjonalna do zawartego w roztworze cukru.

Metody są zwykle opracowane dla określonego zakresu stężeń substancji, takich stężeń, z jakimi spotykamy się w warunkach fizjologicznych. Dlatego metoda, która jest opracowana dla stężenia 1 n, nie zawsze będzie dokładna dla stężeń 1,5 n, 2 n itd. Metoda *Hagedorna i Jensena* (4) daje wyniki zadowalające dla zakresu stężeń nie przekraczających 120 mg%. Powyżej tej granicy stężeń daje wyniki błędne, dochodzące do 30% (*Folin i Malmros* — 6). Oryginalna metoda *Hagedorna-Jensena* wymagała modyfikacji, która została opracowana przez *Wierzuchowskiego* i współpracowników (7). Pozwala ona na oznaczenie glikozy nawet w stężeniach dochodzących do 1700 mg%.

A oto jeszcze jedno zastrzeżenie. W metodzie *Millera i Van Slyke'a* (8), w której stosuje się do miareczkowania siarczan ceru, otrzymuje się miarodajne wyniki jedynie wtedy, gdy ilość mocznika w krwi nie przekroczy poziomu 80 mg%.

Z powyższych przykładów wynika jasno, że w doborze metody nie może być bezwzględnej dowolności. Trzeba kierować się szeregiem wytycznych i nie posługiwać się pierwszą lepszą metodą, zwłaszcza wtedy, gdy mamy do czynienia z materiałem pochodzącym od ludzi chorych, u których stosunki ilościowe składników są zmienione w porównaniu z normami fizjologicznymi.

Poruszone przed chwilą metody oznaczania cukru mają jeszcze jeden aspekt. Mówimy w pracowni klinicznej o oznaczaniu cukru w krwi, moczu, płynie mózgowo-rdzeniowym. A przecież nie oznaczamy cukru ani glikozy we wspomnianych płynach, bo korzystamy jedynie z jednej właściwości glikozy, mianowicie właściwości redukcyjnych. Mierzmy zawsze w metodzie na „cukier“ stopień redukcji czynnika utleniającego i na tej podstawie obliczamy zawartość glikozy. Powinniśmy jednak pamiętać o tym, że utleniają się przy takim oznaczaniu nie tylko glikoza, ale też obecne obok glikozy inne składniki krwi posiadające również właściwości

redukcyjne. Są nimi: kwas moczowy, kreatynina, glutation, ergotioneina, kwas glikuronowy, kwas adenilowy, ATP. Popełniamy więc pewien błąd mówiąc o oznaczaniu glikozy w krwi, błąd wynikający z samej metody, w której oznaczamy stopień redukcji wywołany wielu związkami o różnym charakterze chemicznym. Oznaczamy zatem nie glikozę, lecz glikozę oraz ciała redukujące poza glikozą, wszystko jedno, czy do utlenienia bierzemy sole miedzi, rtęci, żelazicyjanek potasowy czy kwas pikrynowy. Jest rzeczą oczywistą, że stopień redukcji jest wywołany w głównej mierze obecną we krwi glikozą — tak jest przynajmniej w warunkach fizjologicznych — i błąd wynikający z samej metody może nie być brany pod uwagę, jeżeli chodzi o wyniki dla celów diagnostyki lekarskiej. Trzeba jednak pamiętać, że ta sama zasada może nie odnosić się do materiału patologicznego. Błąd wynikający z samej metody możemy zmniejszyć przez usunięcie dodatkowych ciał redukujących stosując odpowiedni odczynnik, który przy usunięciu białka usuwa jednocześnie redukujące związki poza glikozą. Jeżeli w przesączach wg *Folina* i *Wu* (9), przy których zastosowano do odbiałczenia kwas wolframowy, znajdują się jeszcze takie substancje redukcyjne, jak kwas moczowy, kreatynina, glutation, to mniej jest tych substancji w przesączach wg metody Hagedorna-Jensena, w której wytrącamy białko wodorotlenkiem cynku. Zawierają one co prawda jeszcze substancje z grupami redukcyjnymi — SH oraz kwas moczowy. Dlatego wyniki według tej metody będą zawsze wyższe od faktycznego poziomu glikozy w krwi. Błąd metody zmniejszamy do minimum stosując wodorotlenek kadmowy do odbiałczania wg *Fujita* i *Iwatake* (5). Przy użyciu wodorotlenku kadmu otrzymamy wyniki najbardziej zbliżone do rzeczywistej zawartości glikozy.

Powyższe rozważania nasuwają wniosek, że przy każdorazowym podawaniu wyniku oznaczenia trzeba cytować metodę, według której wykonano badanie. Jest to konieczne z tego powodu (a odnosi się szczególnie do badań naukowych), że pozwala odbiorcy wyniku na krytyczną i właściwą ocenę liczb. Inaczej ocenimy wynik otrzymany metodą Hagedorna-Jensena, a inaczej — metodą *Fujita* i *Iwatake*. Pierwsza daje wyniki wyższe o 30—40 mg % w porównaniu z ostatnią. Jeżeli np. mamy wynik zawartości cukru w krwi 70 mg %, to według metody *Fujita* i *Iwatake* jest on w granicach normy, a według metody Hagedorna-Jensena za niski w porównaniu ze stanem fizjologicznym. Z drugiej strony wynik 110 mg % jest w metodzie Hagedorna-Jensena normalny, a w metodzie *Fujita* i *Iwatake* mówi o hiperglikemii.

Można wyeliminować błąd wynikający z samej metody przez oznaczanie stopnia redukcji dwukrotnie — przed i po fermentacji drożdżowej. Tego rodzaju oznaczania zwykle nie stosuje się w masowych analizach w klinice.

Podobne błędy jak przy oznaczaniu cukru w krwi powtarzają się przy wykrywaniu i oznaczaniu ilościowym cukru w moczu. Obok kwasu moczowego i kreatyniny powiększają błąd glikuroniany, których ilość jest szczególnie duża po podaży takich leków, jak chloral, antypiryna, kamfora, sulfonamidy, hormony estrogenne. Wystarczy nieraz, że mocz jest dostatecznie zagęszczony, o dużym ciężarze właściwym, by z odczynnikiem Fehlinga odczyn redukcyjny wypadł dodatnio w przypadkach, w których cukru nie było.

Z drugiej strony obecność kreatyniny sprawia, że mocz zawierający glikozę nie daje wyraźnego odczynu z odczynnikiem Fehlinga, ponieważ kreatynina tworzy w nim związek kompleksowy barwy zielonkawej i przez to zaciemniający obraz reakcji. Podobnie działają duże ilości soli amonowych w przypadkach kwasicy utrudniając wydzielenie się soli miedziowych. Często stosowany bizmutowy odczynnik na cukier w moczu (*Nylander*) daje pozytywny wynik wtedy, gdy w moczu jest dużo indykanu.

Większe ilości cukru w moczu pozwalają na stosowanie metody polarymetrycz-

nej do oznaczenia ilościowego. Także i w tej metodzie są błędy wynikające stąd, że w moczu są inne ciała mające te same właściwości optyczne co glikoza.

Weźmy inny przykład — tak często oznaczanego azotu niebiałkowego w krwi czy surowicy. Trzeba zdawać sobie sprawę, że cyfry uzyskane w tym oznaczeniu zależą w dużym stopniu od sposobu wytrącania białka i wziętego do strącania odczynnika. Wyniki oznaczeń wykonane na tej samej surowicy różnić się będą w zależności od tego, czy wytrącaliśmy białko wodorotlenkiem cynku (*Somogyi* — 10), czy wodorotlenkiem kadmu (*Fujita* — 5), czy wreszcie kwasem trójchlorooctowym. Po wytrąceniu białka cynkiem czy kadmem nie przechodzą do przesączu takie ciała, jak kwas moczowy, tioneina, glutation, przez co wyniki na azot pozbiałkowy będą niższe i nie obejmą azotu wymienionych związków.

Poziom białek w osoczu czy surowicy krwi zawsze interesuje klinicystę i oznaczenie tych składników krwi jest ważnym zadaniem pracowni chemicznej w klinice. Posługujemy się kilku metodami więcej lub mniej dokładnymi. Najczęściej postępujemy się bardzo prostą w wykonaniu metodą pomiaru współczynnika refrakcji. Obecnie rozpowszechniona jest też metoda *Phillipsa* i *Van Slyke'a* (11), nie wymagająca skomplikowanych przyrządów i aparatury. Do dokładniejszych pomiarów stosuje się metodę opartą na zasadzie odczynu biuretowego (12). Każda z cytowanych metod jest oparta na odmiennej zasadzie. Źródła błędów i różnice wynikają stąd, że białka surowicy są heterogenną mieszaniną wielu połączeń, z których wszystkie należą do klasy białek, ale różnią się między sobą wielkością drobin, zawartością azotu, zawartością w drobinie ciał nie będących białkiem i innymi właściwościami. Metodą preparatywnego frakcjonowania udało się wyizolować aż 33 substancje białkowe z normalnej surowicy krwi człowieka (*Wuhrman*). Nawet metoda *Kjeldahla*, którą jeszcze dziś uznaje się za wzorcową, opiera się na założeniu, że zawartość azotu w oznaczanym białku wynosi dokładnie 16% i dlatego przyjmuje współczynnik 6,25 jako stały mnożnik. Prace *Hillera*, *Van Slyke'a* i in. (14) wykazały co prawda, że współczynnik taki jest słuszny dla surowicy normalnej. Nasuwa się jednak pytanie, czy będzie też słuszny dla surowic patologicznych. Nawet w normalnej surowicy, biorąc pod uwagę zestawienie frakcji białkowych surowicy rozdzielonych według *Cohna* (15) i procentową zawartość azotu w poszczególnych frakcjach, stwierdza się dużą rozpiętość liczb — od 11,9 do

T a b e l a 5

Zawartość azotu we frakcjach białkowych normalnego osocza krwi ludzkiej

	Albumina	Globulina			Fibryno- gen	Osocze jako całość
		Alfa	Beta	Gamma		
Azot w %	15,95	11,9	14,84	16,03	16,9	14,9
Współczynnik białkowy	6,27	8,41	6,73	6,24	5,92	6,72

16,9%. Białka te zawierają również składniki węglowodanowe, cholesterol i lipidy. Jeżeli będziemy je traktowali jako przykłady sympleksów, czyli samodzielne jednostki, to nie wolno nam odnosić do nich współczynnika 6,25, lecz współczynniki zaproponowane przez *Cohna* dla poszczególnych frakcji, jak to wykazuje tabela 5. Chyba że potraktujemy oddzielnie składnik białkowy, a oddzielnie resztę niebiałkową, bo wtedy współczynnik białkowy 6,25 będzie słuszny.

W szerokiej dyskusji wykazano na cytowanych przykładach metod oznaczania cukru, azotu niebiałkowego oraz białka ich niedoskonałość, a tym samym nie-swoistość. Ten empiryczny moment analiz klinicznych, który przesądza istnienie

błędu w samym założeniu metody, zobowiązuje do dokładnego przestrzegania toku analizy. Drobne na pozór zmiany metody wymagają zawsze prób kontrolnych na roztworach wzorcowych i na surowicy normalnej. Kontrola taka daje ponadto obraz dokładności pracy analityka oraz metody. Z otrzymanych kilkunastu prób kontrolnych możemy sobie wyrobić pojęcie rozrzutu wyników w odniesieniu do średniej, co pozwoli nam na krytyczną ocenę samych wyników.

### 3. SPOSÓB PRZECHOWANIA MATERIAŁU I ZMIANY PO POBRANIU

Czynnikiem, który wpływa na wartość wyniku analizy, jest odpowiedni sposób konserwacji pobranego do badań materiału. Jak słuszny jest ten postulat, niech wykażą przykłady. Oznaczenie fosforu nieorganicznego w surowicy krwi da nam inną wartość, jeśli analizę wykonamy na surowicy zaraz po oddzieleniu jej od skrzepu, a inny, jeśli zostawimy surowicę ze skrzepem przez dobę lub dłużej w temperaturze pokojowej. Zestawienie liczb w tabeli 6 najlepiej ilustruje te zmiany.

Tabela 6

Zawartość fosforu nieorganicznego w mg<sup>0</sup>/<sub>o</sub>

	D z i e Ń a n a l i z y						
	1	2	3	4	5	6	7
Surowica ze skrzepem	2,05	3,10	6,20	6,50	7,95	7,50	7,60
Surowica oddzielona od skrzepu	2,05	2,08	2,30	2,30	2,40	2,35	2,40

Poziom fosforu wzrasta w wyniku rozpadu połączeń organicznych pod działaniem fosfataz. Spostrzeżenie to jest szczególnie cenne w przypadkach, w których próbę krwi trzeba przesyłać do odległego laboratorium. Oznaczenie fosforu w surowicy krwi po kilku dniach nie ma żadnej wartości, jeśli surowica stykała się przez ten czas z krwinkami. Surowica oddzielona od skrzepu i przechowywana w chłodni nadaje się do analizy nawet po kilku dniach.

Podobnie ma się sprawa z oznaczaniem cukru w krwi, które wymaga natychmiastowego wykonania analizy zaraz po pobraniu materiału, ponieważ glikoza ulega wtórnym przemianom przechodząc w kwas mlekowy, co oczywiście ma wpływ na ostateczny wynik analizy. Zmianom glikozy można zapobiec przez dodanie do próbki krwi fluorku sodowego lub soli sodowej kwasu jodooctowego, jeżeli wykonanie analizy od razu jest niemożliwe. Taki sam efekt daje dodatek mieszaniny izotonicznej siarczanu miedziowego i siarczanu sodowego, który wstrzymuje glikolizę do 72 godzin (16).

Szczególnie duże znaczenie ma sposób przechowywania krwi przy oznaczeniu potasu w surowicy czy w osoczu. Nierówne rozmieszczenie jonów potasowych między obie fazy krwi sprawia, że trzeba zachować duże ostrożności, by nie dopuścić do przenikania potasu z krwinek do osocza, co ma miejsce przy dłuższym stykaniu się krwinek z surowicą czy osoczem, ponieważ krwinki po krótkim czasie tracą swoją biologiczną zdolność zatrzymywania jonów potasowych. Dlatego należy zaraz po skrzepnięciu krwi oddzielić surowicę, a odrzucić każdą wykazującą najmniejszy ślad hemolizy.

Bardzo dużą ostrożność trzeba zachowywać przy przechowaniu i pobieraniu krwi

na oznaczenie chlorków. Wędrówka chlorków między krwinkami i osoczem, zależna od parcjalnego ciśnienia dwutlenku węgla, nakazuje pobieranie materiału i przechowywanie go pod parafiną.

#### 4. WARUNKI POBIERANIA KRWI, CZAS, STAN USTROJU, POSTAWA

Nie tylko sposób konserwacji krwi, ale też i sposób pobierania, jak i czas pobrania nie są bez wpływu na zawartość poszczególnych składników. Podobne znaczenie ma stan na czczo czy po jedzeniu, rano czy wieczorem, pozycja stojąca czy leżąca osoby badanej. Wartość azotu niebiałkowego dla krwi pobranej na szczycie trawienia ciał białkowych jest dużo wyższa niż w stanie czczości (17). Surowica krwi pobranej rano da inny wynik na zawartość albumin niż pobranej wieczorem. To samo odnosi się do globulin. Wykazano bowiem, że poziom albumin jest najniższy w porze rannej, gdy tymczasem globulin jest najwięcej rano. Zatem współczynnik albuminy/globuliny ulega wahaniom w ciągu dnia (18).

Jak wpływa na zawartość białka w surowicy krwi czas trwania zacisku żyły, wykazuje *Nordmann* (19), według którego staza krwi żyłnej trwająca 6 minut zmieniła zawartość białka całkowitego z 7,3 na 9,5 %.

Nie bez wpływu na zawartość składników krwi jest postawa człowieka w momencie pobierania materiału do badania. Wynika to z pracy *Keysa* i *Butta* (20), *Langego* (21) i *M. Żydowo* (22). W pozycji stojącej zawartość białka jest większa w porównaniu z pozycją leżącą, przy czym różnice wynoszą do 14 % (*Żydowo*). Jest to wynik ultrafiltracji krwi przez ściany naczyń wskutek zwiększonego ciśnienia hydrostatycznego. Podobnie zwiększone ilości cholesterolu, kwasów tłuszczowych, fosforu lipidowego poza białkami stwierdzili w pozycji stojącej *Keys* i *Butt*.

Cytowane przykłady dowodzą, jak ważne jest to, w jakim czasie pobierana jest krew i jaki jest wpływ tej czynności na wyniki analiz.

Wydaje mi się, że w referacie dość wyczerpująco poruszono najważniejsze przyczyny błędnych wyników analiz. Nie trudno bowiem o popełnienie błędu, jeśli nie zna się tych wszystkich zagadnień, na które starałem się zwrócić uwagę.

Należy teraz zastanowić się nad tym, co zrobić, by zapobiec błędom i by nie dopuścić do otrzymywania wyników bezwartościowych i nierzetelnych.

Wnioski, nasuwające się w tej dyskusji, których przestrzeganie miałyby być gwarancją rzetelnych wyników pracy analityka, postaram się ująć w kilka punktów:

1. Każdą metodę powinno się przerobić na roztworach o znanym stężeniu szukanego składnika, a następnie na krwi, osoczu czy surowicy szeregu ludzi zdrowych oraz na tym samym materiale, do którego dodano znane ilości płynu wzorcowego. Na podstawie otrzymanych wyników możemy ocenić dokładność metody, a na podstawie rozrzutu liczb — ścisłość własnej pracy.

2. Tok oryginalnej metody musi być ściśle zachowany. Niedopuszczalne jest wprowadzanie dowolnych zmian. Najmniejsza modyfikacja wymaga ponownej kontroli nie tylko na wzorcach, ale także na materiale biologicznym z dodatkiem wzorcowego płynu.

3. Trzeba stale zdawać sobie sprawę, że w większości metod biochemicznych badaną substancję oznacza się pośrednio, a metoda jest bardzo często oparta na próbach empirycznych. Znajomość istoty metody powinna być wytyczną w jej doborze. Przy wybieraniu metody musimy mieć na uwadze, do jakiego celu służy wynik analizy i jaka jest wymagana dokładność.

4. Należy ustalić warunki pracy od chwili pobrania materiału do ostatecznego wykończenia badań. Na wartość i ocenę wyników ma wpływ szereg czynników, jak czas pobrania materiału, sposób pobrania i konserwacja, stan badanej osoby i jej postawa.



5. Regularna kontrola naczyń miarowych, wagi i innych przyrządów pomiarowych. choć sama przez się zrozumiała, jest czynnością, na którą czas znaleźć się musi i którą należy powtarzać w każdej pracowni analitycznej w pewnych stałych okresach.

6. Wielkim błędem byłoby ograniczenie się do jednorazowej kontroli metody: trzeba ją sprawdzać co pewien czas, zwłaszcza wtedy, gdy zmienia się odczynniki.

Możemy mieć pewność, że praca analityka, w której zostaną wzięte pod uwagę ujęte w powyższych punktach zalecenia, będzie rzetelna, a jej wyniki dobre. Wtedy tylko uzyskane liczby mogą stać się podstawą do wysnuwania wniosków czy to w celach diagnostycznych, czy też w zagadnieniach teoretycznych.

#### PIŚMIENNICTWO

- 1) *Belk W. P.* i *Sunderman F. W.*: *Am. J. Clin. Path.*, 1947, 17, 853. — 2) *Wootton I. D. P.* i *King E. J.*: *Lancet* 1953, I, 470. — 3) Artykuły dyskusyjne: *Lancet* 1953, I, s. 476, 795, 1104. — 4) *Hagedorn H. C.* i *Jensen B. N.*: *Bioch. Z.*: 1923, 135, 46 i 137, 92. — 5) *Fujita A.* i *Iwatake D.*: *Bioch. Z.*, 1931, 242, 43; *Fujita A.* i *Okamoto K.*: *Bioch. Z.*, 1930, 225, 368. — 6) *Folin O.* i *Malmros H.*: *J. Biol. Chem.*, 1929, 83, 121. — 7) *Wierzechowski M.*, *Dzisiow S.*, *Sysa J.* i *Borkowski Z.*: *Z. physiol. Chem.*, 1938, 253, 231. — 8) *Miller B. T.* i *Van Slyke D. D.*: *J. Biol. Chem.*, 1936, 114, 583. — 9) *Folin O.* i *Wu H.*: *J. Biol. Chem.*, 1919, 38, 61. — 10) *Somogyi M.*: *J. Biol. Chem.*, 1930, 86, 655.
- 11) *Phillips R. A.*, *Van Slyke D. D.* i współpracownicy: *J. Biol. Chem.*, 1950, 183, 305. — 12) *Weichselbaum T. E.*: *Am. J. Clin. Path.*, 1946, 10, 49; 1946, 16, 40. — 13) *Wuhrman F.* i *Wunderly C.*: *Die Bluteiweisskörper des Menschen* Schwabe, Basel 1952. — 14) *Van Slyke D. D.*, *Hiller A.*, *Phillips R. A.* i inni: *J. Biol. Chem.*, 1950, 183, 331; *Hiller A.*, *Plazin J.* i *Van Slyke D. D.*: *J. Biol. Chem.*, 1948, 176, 1401. — 15) *Cohn E. J.* i *Strong L. E.*; *Hughes W. L.* i inni: *Am. Soc.*, 1946, 68, 459. — 16) *King E. J.*, *Pillai S. S.* i *Beall D.*: *Lancet*, 1941, I, 310. — 17) *Stolzmann Z.*: *Bull. Acad. Sc. Pol.*, 1939, 263; *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1939, 21, 549. — 18) *Hoppe-Seyler-Thierfelder*: *Untersuchung der Organe, Körperflüssigkeiten und Ausscheidungen*, Springer Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1953, s. 17. — 19) *Nordmann J.*: *La presse Med.*, 1947, 55, 830. — 20) *Keys A.* i *Butt H. R.*: *Arch. Int. Med.*, 1939, 63, 165. — 21) *Lange H. F.*: *Acta Med. Scand. Suppl.*, 1946, 176. — 22) *Żydowo M.*: *Pol. Tyg. Lek.* 1952, 22.

EDWARD KOWALSKI

## O SYTUACJI W BIOCHEMII KLINICZNEJ

Zadaniem sympozjum biochemii klinicznej jest wskazanie tej gałęzi biochemii właściwego miejsca w naukach lekarskich. Najważniejsze zagadnienia, które należy przy tym poruszyć, są moim zdaniem następujące:

- 1) zdefiniowanie biochemii klinicznej jako nauki, określenie jej zadania, wskazanie jej właściwego miejsca w zakresie biochemii i nauk klinicznych;
- 2) ustalenie, kto powinien zajmować się biochemią kliniczną i jakie powinno być wykształcenie biochemików klinicznych;
- 3) ustalenie wytycznych, co do sposobu kształcenia kadry biochemików klinicznych w Polsce.

Biochemia kliniczna jest gałęzią biochemii zajmującą się zmianami chemicznymi w różnych stanach chorobowych. Dąży ona do ustalenia zależności pomiędzy zmianami chemicznymi a objawami chorobowymi. Tak jak w biochemii w ogólności, tak i w biochemii klinicznej można rozróżnić następujące kierunki pracy:

- a) biochemia kliniczna statyczna,
- b) biochemia kliniczna dynamiczna,
- c) biochemia kliniczna funkcjonalna.

Biochemia kliniczna statyczna rejestruje odchylenia od stanu prawidłowego w składzie chemicznym tkanek chorych lub płynów ustrojowych, przede wszystkim osocza krwi. Ten kierunek badań rozważa ustrój jako składający się z milionów cząsteczek; biochemia kliniczna statyczna szuka różnic między składem chorego i zdrowego ustroju, różnic ilościowych i jakościowych. Można ją nazwać patologią molekularną. W zakres tego kierunku wchodzi większa część rutynowanych badań wykonywanych codziennie w pracowniach analitycznych klinik i szpitali, jak np.: oznaczanie poziomu mocznika, cukru, cholesterolu w krwi itp., lub też badania o charakterze bardziej teoretycznym, jak np. ustalenie różnic w składzie chemicznym tkanek nowotworowych i tkanek zdrowych albo ustalenie natury chemicznej zmian wstecznych. Kierunek ten dostarcza klinice przede wszystkim danych diagnostycznych. Do właściwej oceny wyników uzyskanych drogą badań analitycznych niezbędna jest znajomość norm oraz te dane statystyki, o których była mowa w referacie prof. *Mozołowskiego*.

Biochemia kliniczna dynamiczna odzwierciedla dynamiczny aspekt współczesnej biochemii. Biochemia dynamiczna rozpatruje w ruchu cząsteczki, z których składa się ustrój. Każda cząsteczka ma swoją przeszłość i przyszłość, powstaje poprzez zawiąta kolej przemian z pokarmów i tlenu środowiska zewnętrznego, zamienia się w ustroju na inne cząsteczki i jest ostatecznie wydalana. Każda cząsteczka włącza się do toczących się nieustannie w ustroju procesów pośredniej przemiany materii. Biochemia kliniczna dynamiczna bada odchylenia od prawidłowej pośredniej przemiany w stanach chorobowych. Dla niej wszystkie choroby są chorobami przemiany materii i cechują się mniej lub bardziej charakterystycznymi

odchyleniami w powiązanych ze sobą drogach metabolicznych. Biochemia kliniczna dynamiczna umożliwi dokładniejsze i wnikliwsze poznanie istoty zjawisk chorobowych, pozwala nieraz na wyciąganie wniosków patogenetycznych i znalezienie właściwych metod leczniczych. Jako przykłady tego podejścia badawczego można przytoczyć heksokinazową teorię Cori'ch patogenezy cukrzycy, ostatnio ogłoszone przez tych samych autorów badania nad patogenezą choroby Gierkego i wiele innych.

Biochemia kliniczna funkcjonalna bada zależności między zmianami układu chemicznego, zmianami w przemianie materii a zaburzeniem funkcji. Usiłuje ona tłumaczyć objawy chorobowe zmienioną funkcją ustroju i jego narządów, funkcją cząsteczek ilościowo lub jakościowo odmiennych, wpływem zaburzeń przemiany materii na funkcję narządu lub ustroju w całości. Podejście takie odzwierciedla jedno z zasadniczych zagadnień biologii w ogólności, a mianowicie zagadnienie zależności między strukturą i funkcją. Dla przykładu podam zależność między budową chemiczną hemoproteidów i ich stosunkiem do tlenu. W zależności od struktury elektronowej atomu żelaza hemoproteid przyłącza luźno atomy tlenu (hemoglobina) lub jest akceptorem elektronów tlenu (cytochromy), lub wreszcie posiada właściwości peroksydatyczne (katalazy i peroksydazy). Wiadomo, jak wielkie znaczenie dla funkcji ustroju posiadają wymienione właściwości atomu żelaza związanego z pierścieniem porfirynowym i nosicielem białkowym. Biochemię kliniczną funkcjonalną interesują oczywiście odchylenia w budowie hemoproteidów i wynikające z tego zmiany funkcji. Poznano szereg zmian w budowie hemoglobiny, warunkujących zaburzenia jej funkcji, a co za tym idzie i objawy chorobowe, np. związaną z żelazem z tlenkiem węgla lub innymi jadami, zmiany w strukturze globiny, warunkujące według *Paulinga* wadliwą funkcję hemoglobiny i czerwonych krwinek w zespołach hemolitycznych.

Innym przykładem ilustrującym zależność między strukturą i funkcją może być aktomiozyn, białko kurczliwe mięśnia prądkowanego. W przypadku tym wykazano (*Engelhart*) najściślejsze zespolenie struktury i funkcji. Miozyn, białko kurczliwe, element strukturalny, jest równocześnie enzymem rozkładającym ATP (kwas adenozyno-trójfosforowy), który dostarcza energii dla skurczu mięśnia.

Przedmiotem badań biochemii klinicznej funkcjonalnej jest sprawa zależności między metabolizmem a funkcją; bada ona np. zależność między metabolizmem mięśnia prądkowanego i jego czynnością, zależność między metabolizmem czerwonej krwinki i jej funkcją, zależność między metabolizmem komórek błony śluzowej żołądka i wytwarzaniem kwasu solnego, zależność czynności wydalniczej nerek od metabolizmu nabłonka nerkowego itd. Biochemia kliniczna funkcjonalna zajmuje się oczywiście zależnością między zaburzeniami metabolizmu i wynikającym z nich zaburzeniem funkcji w stanach patologicznych.

Dodam kilka uwag uzupełniających do tego podziału kierunków pracy w biochemii klinicznej.

Po pierwsze, podział ten, aczkolwiek historycznie w pewnym stopniu uzasadniony, jest oczywiście sztuczny i może mieć znaczenie tylko pomocnicze, metodologiczne w opisywaniu i interpretacji badań naukowych. W rzeczywistości wszystkie trzy kierunki badawcze zająbiają się o siebie i nie dają się często od siebie oddzielić. Wydaje się, że biochemię przyszłości coraz bardziej będzie cechowało podejście funkcjonalne.

Po drugie, wyżej naszkicowane podejście do biochemii klinicznej odzwierciedla ogólną tendencję rozwojową nauk biologicznych i lekarskich, wyrażającą się w dążeniu do poznania ożywionej materii drogą analityczną, rozłożenie jej na cegiełki, z których jest zbudowana, i wnikanie w ten sposób coraz bardziej w jej głąb. Otwiera to coraz nowe aspekty poznawcze, odsłania tajemnice, których na wyższych szczeblach organizacji materii nie jesteśmy zdolni poznać. Poznano istotę

wielu chorób, wnikając w poziom molekularny (awitaminozy, dyshormonozy, skazy krwotoczne i wiele innych).

Po trzecie, metoda poznawcza analityczna kryje w sobie niebezpieczeństwo olbrzymiego błędu myślowego. Nie wolno mechanicznie przenosić poznania zdobytego na niższym szczeblu organizacji materii na poziom wyższy, stanowiący nową jakość. Oznacza to innymi słowy: nie wolno przenosić biochemicznych danych analitycznych na cały ustrój. Jeżeli rozkładamy zegarek na części, z których on jest zbudowany, na kółka, śrubki, a następnie na atomy żelaza, to jest rzeczą jasną, że znajomość tych atomów żelaza, a nawet śrubek i kółek nie pozwala jeszcze na poznanie zegarka w całości. A o ile bardziej złożoną organizację przedstawia ustrój niż zegarek! Dlatego wysuwają się dwa wnioski zasadnicze: każdy fakt znaleziony na niższym poziomie, powiedzmy na poziomie molekularnym, wymaga syntetycznego ujęcia, wymaga integralnego włączenia w syntetyczną całość, stanowiącą nową, wyższą jakość. I z tego wynika drugi wniosek praktyczny: nie może być biochemii klinicznej w oderwaniu od kliniki. Punktem wyjścia badań z zakresu biochemii klinicznej jest chory człowiek. Zagadnienia, problemy do rozwiązania z zakresu biochemii klinicznej dotyczą patologii klinicznej; chemia dostarcza jedynie metodyki rozwiązywania zagadnień, a wnioski są znowu natury klinicznej. Chory człowiek jest punktem wyjścia i celem badań w zakresie biochemii klinicznej.

Dla ilustracji zakresu pracy biochemii klinicznej i dla wykazania pewnych jej osiągnięć podam niektóre dziedziny patologii klinicznej, w które biochemia wniosła istotne elementy poznawcze i może się poszczycić znakomitymi osiągnięciami leczniczymi. Na samym początku należałoby wymienić dwie ogromne dziedziny patologii klinicznej, które właściwie w całości wchodzą w zakres biochemii klinicznej. Są to patologia awitaminoz i endokrynologia. Ogromny wkład biochemii w te dziedziny patologii jest oczywisty; podawanie jednej ściśle określonej substancji chemicznej — witaminy, której brak powoduje objawy chorobowe, usuwa chorobę. Poznanie natury chemicznej hormonów oraz zaburzeń przemiany materii w schorzeniach gruczołów dokrewnych otworzyło ogromne możliwości lecznicze.

W zakresie nauki o zapaleniach badania *Schadego* i jego szkoły potrafiły objaśnić główne cechy procesu zapalnego zmianami właściwości fizykochemicznych w wyniku miejscowych zaburzeń przemiany materii. *Menkin*, wychodząc z zupełnie innych założeń, usiłuje tłumaczyć istotę wielu zjawisk zapalnych. Znalazł on swoiste białka i peptydy powodujące migrację leukocytów, wysiękanie itp. Zjawiska alergii w procesach zapalnych tłumaczono wyzwalaniem się substancji histaminowych, co doprowadziło do odkrycia znakomych leków antyalergicznych (antystyna itp.).

Biochemia nowotworów jak dotychczas nie ziściła pokładanych w niej nadziei. Pozwoliła ona, co prawda, na wnikliwsze poznanie procesu nowotworowego i nawet na jego doświadczalne odtwarzanie, ale nie wykazała ani w tkance nowotworowej, ani w chorym ustroju obecności lub nieobecności substancji chemicznej lub reakcji metabolicznych, właściwych jedynie procesowi nowotworowemu. Wykazała ona pod względem chemicznym jedynie to, co już było znane patologii komórkowej: jednolitość systemów enzymatycznych, które w warunkach zdrowia są swoiste dla poszczególnych tkanek. Badania ostatnich lat idą w kierunku poznania spaczenia syntezy białka w komórkach nowotworowych, związanego z zaburzeniami przemiany kwasów nukleinowych. Być może, że przyniosą one tak oczekiwaną chemoterapię chorób nowotworowych.

Wielkie triumfy święciła biochemia kliniczna w zakresie chorób krwi. Poznanie przemiany żelaza, zawiłych dróg i mechanizmów jego wchłaniania w warunkach fizjologicznych, magazynowania i zużycowania dla syntezy hemoglobiny pozwoliło nie tylko na lepsze zrozumienie powstawania niedokrwistości niedobarwliwych, ale dało również podstawy właściwego leczenia. Poznano jednostki chorobowe związane

z brakiem żelaza tkankowego. Nie znamy jeszcze mechanizmów włączania żelaza do pierścienia protoporfiryny; poznanie go posunie niewątpliwie o dalszy krok naprzód leczenie niedokrwistości niedobarwliwych. Patogeneza niedokrwistości megalocytarnych stała się o wiele jaśniejsza od czasu wykrycia roli kwasu foliowego, witaminy B<sub>12</sub> i czynnika *citrovorum* w prawidłowej cytogenezie krwinki czerwonej. Wyniki leczenia tymi substancjami są tak znakomite, że niedokrwistości megalocytarne przestały zasługiwać na miano niedokrwistości złośliwej. Niedokrwistości hemolityczne od czasu odkrycia *Paulinga* nieprawidłowości w budowie hemoglobiny są trafnie nazywane „chorobą molekularną“. Tym niemniej to wielkie odkrycie oraz poznanie roli lizolecytyny w patogenezie tych zespołów hemolitycznych nie znalazło dotychczas terapeutycznego oddźwięku. Znajomość skaz krwotocznych posunęła się ogromnie naprzód dzięki odkryciu złożonego mechanizmu wielu składników układu krzepnięcia. Poznano skazy krwotoczne uwarunkowane brakiem jednego białka układu krzepnięcia (czynnika V, VII, globuliny przeciwhemofilowej) lub nadmiarem substancji przeciwkrzepliwych podobnych do heparyny lub wreszcie nadmierną czynnością fibrynolizyny. Poznanie tych faktów i możliwości ścisłego poznawania i utożsamiania biochemicznego poszczególnych skaz krwotocznych otwiera wielkie możliwości lecznicze. To samo można powiedzieć o chorobach zakrzepowych, w których dokładna znajomość mechanizmu krzepnięcia dostarcza broni do ich zwalczania.

W ten sposób można rozpatrywać całą patologię kliniczną „z pozycji molekularnych“. Wystarczy wymienić poznanie mechanizmu stłuszczenia wątroby i zaburzeń biochemicznych czynności wątroby, biochemię zmian wstecznych, biochemię nadciśnienia, zaburzenia wydalania nerkowego, zaburzenia będące wyrazem patologicznej przemiany wapniowo-fosforowej, aby wykazać, że rzeczywiście cała patologia kliniczna może być rozpatrywana z punktu widzenia biochemicznego.

Przytoczę jeszcze jedną dziedzinę patologii klinicznej, w której biochemia nieśmiało stawia pierwsze kroki; jest to biochemia niewydolności mięśnia sercowego. Skurcz mięśnia sercowego podlega podobnym prawom jak skurcz mięśnia prądkowanego w ogólności. Aktomiozyn, równowaga jonowa potasu i wapnia oraz czynność kwasu adenozyntrójfosforowego i adenozyntrójfosfatazy są według stanu naszych obecnych wiadomości tymi czterema czynnikami, które warunkują skurcz mięśnia; patologia skurczu mięśnia sercowego może być wywołana zaburzeniami w zakresie tych czterech czynników. Co do aktomiozynu nie wiele wiadomo; być może, że uszkodzenia mięśnia sercowego spotykane w zaburzeniach przemiany białkowej ustroju w dys- i paraproteinemiach, nazywane przez *Wuhrmanna* miokardozą, tłumaczyć by się dały zmianami w białku kurczliwym mięśnia sercowego. Co do równowagi jonowej potasu i wapnia znany jest wpływ właściwego stężenia jonów potasu na przebieg skurczu włókna mięśniowego — aktomiozynu *in vitro*. Z kliniki, zwłaszcza z elektrokardiografii, wiadomo, jak głębokie zaburzenia wywołuje hipokalenia (przedłużenie *QT*); wydaje się, że łatwo jest wznieść pomost między zjawiskami chemicznymi obserwowanymi *in vitro* a zaburzeniami stwierdzonymi w klinice i rejestrowanymi elektrokardiograficznie. Zaburzenia w zakresie ATP są trudno uchwytnie. Mogą one być uwarunkowane zmniejszoną zawartością ATP w mięśniu sercowym albo zaburzeniami rozpadu ATP na skutek wadliwej czynności ATP-azy. Zmniejszoną zawartość ATP w mięśniu sercowym stwierdza się w stanach anoksji, gdyż synteza ATP odbywa się w warunkach tlenowych. Poza tym można spodziewać się zmniejszonej zawartości ATP w mięśniu serca we wszystkich stanach, w których mamy do czynienia z zaburzeniami pośredniej przemiany materii, gdyż jak wiadomo, ATP jest resyntetyzowany przede wszystkim na skutek oksydacyjnych fosforylacji w cyklu Krebsa. Można uważać zaburzenia te za zaburzenia okresu spoczynkowego lub przemiany spoczynkowej mięśnia sercowego. Mogą one być wywoływane brakiem witamin, kofermen-

tów procesów pośredniej przemiany, zatruciem (hamowanie reakcji fermentacyjnych) tyroksyną, która prawdopodobnie rozprzega procesy fosforylacji i utlenienia. W tych stanach skraca się czas  $QT$ , co można interpretować jako skrócony czas skurczu. W innych przypadkach, w których zawartość ATP w mięśniu sercowym jest prawidłowa, można niewydolność mięśnia sercowego interpretować jako osłabienie czynności ATP-azowej miozynu. Ta postać niewydolności mięśnia serca charakteryzuje się elektrokardiograficznie przedłużeniem czasu  $QT$  (Hegglin).

Jak powiedziałem, powyższe próby interpretacji objawów niedomogi mięśnia sercowego są pierwszymi krokami czynionymi w tym kierunku. W związku z tymi próbami wspomnę o bardzo interesujących wynikach węgierskich badaczy (Horvath, Koraly i Szerb). Stwierdzili oni, że glukozydy naparstnicowe w ilościach mikrogramowych przyspieszają przejście G-aktynu w F-aktyn, ale tylko wówczas, gdy aktyn otrzymano z mięśnia sercowego; na aktyn innych mięśni glukozydy te nie działają.

Po ogólnych uwagach dotyczących zakresu biochemii klinicznej i naszkicowaniu jej tematyki spróbuję przedstawić, jak wyobrażam sobie możliwości stworzenia naukowej biochemii klinicznej w Polsce. Wydaje się, że w rozwiązaniu tego zagadnienia może nam przyjąć z pomocą, jak w wielu innych dziedzinach, przykład Związku Radzieckiego, dlatego opiszę w kilku słowach stosunki, które poznałem w przeszłym roku w Moskwie, zwiedzając niektóre instytuty kliniczne.

W Związku Radzieckim przypisuje się biochemii klinicznej duże znaczenie. We wszystkich instytutach klinicznych istnieją oprócz rutynowanych pracowni analitycznych pracownie biochemiczne badawcze, zajmujące się biochemią kliniczną w wyżej określonym znaczeniu. Kierownicy pracowni biochemicznych są samodzielni pracownikami naukowymi, często profesorami, współpracującymi z działem klinicznym albo patofizjologicznym instytutu; zasadniczo są oni niezależni. Tematyka naukowa mieści się w problematyce naukowej instytutu.

Tak np. w pracowni biochemicznej Instytutu Terapii, zajmującego się chorobą nadcisnieniową, pracuje się nad przemianą adrenaliny w chorobie nadcisnieniowej, szukając zależności między nią a symptomatologią kliniczną. Poza tym bada się przemianę fosforowo-wapniową i jej wpływ na miażdżycę powstającą w przebiegu choroby nadcisnieniowej, skład aminokwasów oraz białek surowicy w przebiegu tej choroby i wiele innych zagadnień biochemicznych związanych z chorobą nadcisnieniową.

Jako przykład powiązania badań biochemicznych z praktyką leczniczą podaję następujący fakt. Stwierdzono podwyższenie poziomu cholinesterazy w surowicy w pewnych okresach choroby nadcisnieniowej, wobec czego zaczęto próby lecznicze fosfakolem, preparatem chemicznym hamującym czynność cholinesterazy.

Kierownicy pracowni biochemicznych przy instytutach klinicznych są na ogół z wykształcenia chemikami lub biochemikami. Wydaje się, że istnieją w Związku Radzieckim pewne trudności w obsadzeniu tych stanowisk wysoko wykwalifikowanymi biochemikami, gdyż biochemicy na ogół nie mają zainteresowań klinicznych i wolą pracować „czysto“ biochemicznie. Przeniesiono ostatnio dwóch wybitnych biochemików z Instytutu Biochemii do dwóch przodujących instytutów klinicznych: do Instytutu Terapii i Instytutu Chirurgii (Krieman i Konikowa).

Pomocniczy personel naukowy pracowni biochemii klinicznej składa się z lekarzy, chemików lub biochemików. Poza tym niektórzy aspiranci oddziałów klinicznych wykonują prace kandydackie w pracowniach biochemicznych. Wszyscy pracownicy pracowni biochemicznej biorą udział w posiedzeniach klinicznych Instytutu i są obeznani z jego problematyką kliniczną.

Zaznaczam, że oprócz opisanych pracowni biochemii klinicznej istnieją w instytutach klinicznych pracownie chemiczne o innej tematyce. W Instytucie Hematologii i Przetaczania Krwi np. istnieje oprócz dwóch pracowni biochemii klinicz-

nej o wyżej zaznaczonym kierunku badań pracownia preparatywnej chemii, pracownia koloido-chemiczna i pracownia chemiczna zajmująca się zmianami biochemicznymi zachodzącymi w krwi konserwowanej.

Z wyżej podanego wrywkowego opisu biochemii klinicznej w ZSRR wydaje mi się niezmiernie godnym i cennym do naśladowania podział na pracownie rutynowe i pracownie biochemiczne badawcze. W pracowni rutynowej wykonuje się „na zamówienie“ kliniczne badania wchodzące w skład normalnej pracy szpitalnej lub klinicznej. Zakres tych badań jest oczywiście zależny od możliwości kadrowych danej pracowni, od wyrobienia kierowników tych pracowni i jest do uzgodnienia między klinicystami i kierownikiem danej pracowni. Trudniejsze badania, jak oznaczenie poziomu żelaza, sodu i potasu w surowicy lub ketosteroidów w moczu, mogą oczywiście wchodzić w zakres pracy pracowni rutynowej, jeżeli posiada ona odpowiedni personel. Te same badania mogą również wchodzić w zakres pracy pracowni badawczej biochemii klinicznej.

Jest rzeczą jasną, że do zakresu pracy pracowni rutynowej wchodzi również prostsze badania z innych dziedzin medycyny klinicznej, jak badanie morfologicznego składu krwi, moczu i innych płynów ustrojowych oraz prostsze badania z zakresu bakteriologii i serologii.

Kierownik pracowni rutynowej nie musi być specjalistą biochemikiem; każdy lekarz po odpowiednim przeszkoleniu może być kierownikiem pracowni analitycznej. Pracownie badawcze biochemii klinicznej nie wykonywające rutynowych badań zleconych przez klinicystów, lecz mające własną problematykę naukową wchodzącą w zakres biochemii klinicznej, znajdują się przy instytutach naukowych i większych klinikach. Kierownik pracowni badawczej jest samodzielnym pracownikiem naukowym współpracującym z klinicystami, z wykształcenia lekarzem z ukończoną specjalizacją w biochemii.

Rozwój współczesnej medycyny wymaga stworzenia pracowni biochemii klinicznej również w Polsce. Największą trudnością w stworzeniu takiej pracowni w obecnej chwili jest brak odpowiednio wykwalifikowanych kierowników tych pracowni. Biochemią kliniczną powinien zająć się lekarz posiadający odpowiedni staż i wykształcenie zarówno kliniczne, jak i biochemiczne. Kształcenie takich specjalistów jest możliwe przy katedrach biochemii akademii medycznych, w Instytucie Doskonalenia i Specjalizacji Kadr Lekarskich, w Instytucie Biochemii oraz w tych instytutach naukowych, które dysponują już obecnie wykwalifikowanymi biochemikami (Instytut Gruźlicy, Instytut Wenerologii i Instytut Hematologii). Przed kształceniem biochemicznym, równoległe z nim lub po jego ukończeniu powinno odbywać się kształcenie kliniczne. Lekarze uznani przez kierowników wyżej wymienionych zakładów lub pracowni biochemicznych za zdolnych do samodzielnej pracy naukowej powinni być przydzieleni do instytutów naukowych lub do większych klinik.

Bazą pracy biochemika klinicznego powinna być pracownia przy instytucie klinicznym lub klinice. Stały kontakt z klinicystami, udział w posiedzeniach klinicznych oraz możliwość bezpośredniego kontaktu z chorymi interesującymi z punktu widzenia biochemii klinicznej są nieodzownymi warunkami pracy biochemika klinicznego. Umożliwia to poznanie zagadnień klinicznych, potrzeb kliniki, zdobycie pewnego klinicznego sposobu myślenia, co jest niezbędne dla nadania właściwego kierunku pracy.

Dla ilustracji wyżej podanych tez oraz jako próbę rozwiązania omawianych zagadnień organizacyjnych i naukowych przedstawię organizację pracy w Instytucie Hematologii. W dziale klinicznym Instytutu Hematologii istnieje podział na pracownie: rutynową analityczną i badawczą biochemii klinicznej (oprócz szeroko rozbudowanego działu biochemii). Pracownia rutynowa wykonuje badania w zakresie tzw. analityki szpitalnej zarówno chemicznej, jak i morfologicznej. Jej kierownik pracuje równocześnie naukowo w pracowni badawczej. Stały kontakt pra-

owników laboratorium rutynowego analitycznego, pracowni badawczej oraz naukowej pracowni hematologicznej, sprzyja podnoszeniu poziomu ich pracy.

W pracowni badawczej są czynni lekarze zajmujący się wyłącznie biochemią i lekarze klinicyści. Wszyscy „biochemicy“ mają staż kliniczny, pełnią dyżury lekarskie i mają stały kontakt z kolegami klinicystami. Znają oni wszystkie interesujące przypadki i biorą udział w naradach i posiedzeniach klinicznych. Lekarze-klinicyści wykonują w pracowni prace naukowe w zakresie biochemii klinicznej.

Tematyka tych prac mieści się w ramach problemów planowych Instytutu: np. w ramach problemu „białka osocza“ *S. Niewiarowski* pracuje nad zagadnieniami krzepnięcia i fibrynolizy. Wykazał on między innymi istnienie 2 fermentów czynnych w procesie fibrynolizy oraz badał szereg powiązań między krzepnięciem i fibrynolizą. Wspólnie z *M. Kopeć* przeprowadzał badania nad fibrynolizą w różnych stanach chorobowych i nad metodyką oznaczania czynności fermentów fibrynolitycznych. Badania nad fibrynolizą doprowadziły do otrzymania przetworu streptokinazy, aktywatora profermentów fibrynolitycznych, mającego duże znaczenie lecznicze (leczenie krwioaków opłucnej i zapobieganie zrostom). Praca *H. Żywickiej* nad zużyciem protrombiny łączy się z problemem krzepnięcia.

W ramach problemu „Patofizjologia chorób krwi“, objętego planem naukowym Instytutu Hematologii, opracowuje się przede wszystkim dwa zagadnienia: przemianę żelaza w ustroju oraz zachowanie się enzymów osocza i krwinek w różnych schorzeniach układu krwiotwórczego.

*J. Zajączkowski* opracował metody oznaczania żelaza surowicy krwi oraz zdolności wiązania żelaza przez białka surowicy krwi. Z zestawionych badań poziomu żelaza, krzywych absorpcji żelaza po doustnym i dożylnym obciążeniu żelazem oraz zdolności wiązania żelaza przez surowicę, wyciąga się zarówno wnioski naukowe o bardziej ogólnym znaczeniu, jak również bezpośrednio wskazania do racjonalnego leczenia niedokrwistości u badanych chorych. Praktycznym wynikiem prac nad przemianą żelazową była synteza przetworu żelaza do wstrzyknięć dożylnych.

Prace nad enzymami krwinek i osocza obejmują badania zachowania się karboanhydrazy węglanowej (*Z. Szott*), katalazy i peroksydazy (*M. Woźniewska*), fosfataz (*M. Kucharska* i *S. Roszkowski*) i cholinesterazy (*M. Kopeć*) w różnych stanach chorobowych, ze szczególnym uwzględnieniem zaburzeń hematopoezy. W związku z pracami nad karboanhydrazą *Szott* opracował metodykę oznaczania cynku w osoczu i w krwinkach czerwonych. Prace te mają na celu ocenę przydatności diagnostycznej oznaczania tych enzymów we krwi oraz poznanie mechanizmów patogenetycznych badanych schorzeń.



JERZY KRAWCZYŃSKI

## CHARAKTERYSTYKA STANU CHEMII KLINICZNEJ W CZECHOSŁOWACJI

Przeprowadzenie dokładnej charakterystyki stanu chemii klinicznej w ČSR przeraża ramy tego referatu, tym bardziej że w chwili obecnej chemia kliniczna w ČSR nie jest jeszcze całkowicie zorganizowana i dopiero po dokładniejszej analizie obecnego stanu można by dostrzec główne zarysy powstającej struktury organizacyjnej. Dlatego też ograniczę się do fragmentarycznego omówienia niektórych jednostek laboratoryjnych, które w przyszłości stanowiąc będą zapewne zasadnicze ogniwa organizacyjne.

Przebudowa całej służby zdrowia i przystosowanie jej do potrzeb państwa socjalistycznego wymagały również przebudowy w zakresie chemicznej diagnostyki lekarskiej w kierunku coraz szerszego jej rozpowszechnienia, przy równoczesnym podnoszeniu fachowego poziomu pracy w tej dziedzinie. Oprócz tych czysto praktycznych względów należało też wziąć pod uwagę dążność do coraz ściślejszego powiązania problematyki naukowej poszczególnych specjalności klinicznych z problematyką biochemiczną.

Konieczność stworzenia jednolitej struktury organizacyjnej wyłoniła się jednak stosunkowo niedawno, dopiero w r. 1951, kiedy było już minimum warunków niezbędnych do realizacji tego zamierzenia.

Stworzenie jednolitej organizacji w zakresie chemii klinicznej uzależnione jest bowiem od następujących czynników:

- 1) odpowiednio przeszkolonych kadr pracowniczych, obejmujących personel kierowniczy, wyższy, średni i pomocniczy;
- 2) odpowiednio przygotowanych zakładów pracy;
- 3) uświadomionego pod względem fachowym zespołu odbiorców, umiejących w racjonalny sposób wykorzystać dostarczony mu materiał.

1. Istnienie personelu kierowniczego i wyższego jest ściśle związane z rozwojem danej gałęzi wiedzy. W ČSR przed r. 1939 chemia kliniczna nie stanowiła odrębnej gałęzi naukowej. Poszczególne zagadnienia wchodzące w jej zakres były opracowywane w ramach zagadnień z chemii lekarskiej lub poszczególnych specjalności klinicznych, a zwłaszcza kliniki chorób wewnętrznych. Trzeba przyznać, że obydwie istniejące przed wojną Kliniki Chorób Wewnętrznych Uniwersytetu Karola w Pradze: klinika prof. Hynka i klinika prof. Pelnařa miały biochemiczne nastawienie w swej pracy naukowej. Dowodzi tego fakt, że prawie wszyscy członkowie obecnej kadry kierowniczej są wychowankami tychże klinik. Niezależnie od tego kliniki te wychowały wielu klinicystów biochemików, których wkład w rozwój chemii klinicznej jest tak duży, że i ich zaliczyć można do kierowniczej kadry w zakresie chemii klinicznej.

Podczas okupacji hitlerowskiej rozwój chemii klinicznej był znacznie zahamo-

wany, chociaż nie w tym stopniu co u nas. Wydziały lekarskie zostały wprowadzone zamknięte przez okupanta, ale możliwości pracy naukowej istniały nadal; również nie uległy likwidacji czasopisma naukowe, jak np. *Časopis Lékařu Českých*, w którym w latach 1939—1945 ukazało się wiele interesujących prac z zakresu chemii klinicznej. W procesie kształcenia wyższego personelu fachowego dużą rolę odegrały istniejące w okresie okupacji 2-letnie wyższe szkoły techniczne, tzw. „Prumyslovki“. W szkołach tych kształciła się także młodzież lekarska, najczęściej na wydziałach chemicznych, zdobywając w ten sposób praktyczne i teoretyczne podstawy wykształcenia chemicznego. Większość obecnych kierowników pracowni chemiczno-klinicznych rekrutuje się właśnie spośród absolwentów tych szkół technicznych.

Natychmiast po wyzwoleniu wprowadzono szereg innowacji zmierzających do polepszenia istniejącej sytuacji. Na wydziale przyrodniczym utworzono sekcję biochemiczną (prowadzi ją doc. *Koštitš*), co spowodowało w następstwie napływ chemików do laboratoriów klinicznych. Przy Zakładzie Chemii Lekarskiej Uniwersytetu Karola zorganizowano samodzielny oddział chemii klinicznej, którego kierownictwo zlecone prof. *Šuli*. Na terenie całej republiki przystąpiono do organizowania czteroletnich średnich szkół dla laborantów medycznych. W programie nauczania chemii lekarskiej położono duży nacisk na praktyczne przeszkolenie z chemii klinicznej, szczególnie w zakresie ćwiczeń, często kosztem właściwych ćwiczeń biochemicznych. Niezależnie od tego, w ramach wykładów z propedeutyki chorób wewnętrznych starano się dać podstawy teoretyczne chemii klinicznej i powiązać wiadomości zdobyte na wykładach z biochemii z medycyną praktyczną. W r. 1952 przeprowadzono kilka dalszych zmian, a mianowicie: czteroletnie szkoły dla laborantów medycznych zmieniono na trzyletnie, zorganizowano dwuletnie wieczorowe kursy dla laborantów przyuczonych, a na Wydziale Lekarskim Uniwersytetu Karola przystąpiono do organizowania Zakładu Chemii Klinicznej wprowadzając na starszych latach medycyny obowiązkowe wykłady i ćwiczenia z tego zakresu. Zakład Chemii Klinicznej powstał przez połączenie Oddziału Chemii Klinicznej i Centralnego Biochemicznego Laboratorium Klinicznego. Kierownikiem Zakładu został mianowany prof. dr *J. Hořejši*. Przy Zakładzie Chemii Klinicznej ustanowiono na razie 2 aspirantury.

Obecna sytuacja na odcinku kadrowym przedstawia się więc następująco: a) istnieje załazek kadry kierowniczej; b) istnieje dość silna ilościowo i jakościowo grupa personelu wyższego z coraz większą przewagą chemików; c) istnieje dość liczebny i przygotowany pod względem fachowym zespół średniego personelu laboratoryjnego.

Uzupełnienie kadry kierowniczej jest procesem w pewnym sensie samoistnym, zależnym jedynie od rozwoju grupy wyższego personelu laboratoryjnego, natomiast dopływ personelu wyższego jest zapewniony przez wprowadzenie wykładów i ćwiczeń z chemii klinicznej na wydziale lekarskim, przez utworzenie sekcji biochemicznej na wydziale przyrodniczym, oraz przez zorganizowanie aspirantur.

O poziomie naukowym kierowniczego i wyższego personelu świadczy wielka ilość publikacji naukowych z dziedziny chemii klinicznej, ukazujących się w czasopismach fachowych krajowych i zagranicznych, a także duża stosunkowo ilość wydawnictw książkowych poświęconych całkowicie lub częściowo chemii klinicznej.

Kadra personelu średniego jest uzupełniana przez absolwentów trzyletnich szkół laboranckich i dwuletnich kursów dla laborantów przyuczonych. Szkoła dla laborantów medycznych jest szkołą średnią, której ukończenie daje prawo wstępu na wyższe studia. Program nauczania obejmuje m. in. 240 godzin chemii ogólnej, nieorganicznej i organicznej, 60 godzin biochemii i 160 godzin chemii klinicznej. Takie same uprawnienia, jak trzyletnia szkoła laborancka, dają kursy dla personelu przyuczonego. Wykłady i zajęcia na tym kursie odbywają się w godzinach popołudniowych i obejmują 12 godzin tygodniowo. Ogólnie można powiedzieć, że po-

ziom fachowy laborantów jest dość wysoki. Wielu z nich opublikowało poważne prace naukowe.

W ramach obecnej reorganizacji chemii klinicznej powstał projekt przeprowadzenia klasyfikacji personelu laboratoryjnego. Projekt ten może w niedługim już czasie zostanie zatwierdzony przez Ministerstwo Zdrowia, jako obowiązujący na terenie całego państwa.

Według tego projektu personel laboratoryjny klasyfikowany jest następująco: pomocniczy pracownik — bez kwalifikacji; laborant — nieco przyuczony; techniczny asystent I stopnia — po 4-miesięcznym kursie; techniczny asystent II stopnia — po 4-miesięcznym kursie i rocznej praktyce; naukowy asystent I stopnia — po trzy- lub czteroletniej szkole laboranckiej lub dwuletnich kursach doształcających; naukowy asystent II stopnia — po trzy- lub czteroletniej szkole laboranckiej i rocznej praktyce; pracownik naukowy I stopnia — po wyższych studiach; pracownik naukowy II stopnia — po wyższych studiach z pewnym naukowym dorobkiem.

Jest jednak widoczne, że liczebność istniejących kadr, aczkolwiek dość duża, nie pozwala na równoczesne zorganizowanie chemii klinicznej we wszystkich ośrodkach. Dotyczy to zwłaszcza personelu kierowniczego wyższego. Liczebność kadry laboranckiej jest proporcjonalnie wyższa, ale i tutaj zapotrzebowanie w skali ogólnokrajowej nie jest jeszcze całkowicie pokryte. Kadra jest więc czynnikiem, który zmusza, aby rozciągnąć całkowitą realizację planu reorganizacyjnego na okres kilku lat. Toteż zarządzenia kompetentnych władz wskazują na to, że reorganizacja chemii klinicznej postępować będzie etapami, zaczynając od ośrodków centralnych.

2. Po wyzwoleniu w r. 1945 otworzono Uniwersytet Karola w Pradze, a zlikwidowano istniejący przez cały czas okupacji uniwersytet niemiecki. Wszystkie zakłady i kliniki uniwersytetu niemieckiego zostały przejęte przez Uniwersytet Karola. Restytuowano istniejące dawniej kliniki i założono nowe, jak np. III i IV Klinikę Chorób Wewnętrznych. Przy klinikach chorób wewnętrznych zorganizowano laboratoria biochemiczne, nastawione na prace naukowo-badawcze danej kliniki. W r. 1949 w oparciu o laboratorium I Kliniki Chorób Wewnętrznych powstało Centralne Biochemiczne Laboratorium Kliniczne, jako jednostka o charakterze mieszanym, użytkowo-naukowym. Laboratorium Kliniczne w ciągu kilku lat odegrało ważną rolę w całym procesie rozwoju chemii klinicznej w ČSR. W latach 1949—1951 zorganizowało swoje filie w Karlovych Varach i w Instytucie Opieki nad Matką i Dzieckiem w Pradze, które z biegiem czasu stały się samodzielnymi jednostkami.

Skład personalny laboratorium wynosi 28 osób: kierownik, jego zastępca, 5 asystentów lekarzy i chemików, 13 laborantów i 8 sił pomocniczych. Laboratorium posiada aparat do elektroforezy Tiseliusa, spektrofotometr „Coleman“, 4 fotokolorymetry, pH-metr, fluorometr, 2 aparaty Warburga, 2 polarografy, 2 fotometry, większą ilość wirówek i wiele innej aparatury. Laboratorium wykonuje przeciętnie 15 tys. analiz chemicznych miesięcznie.

Do zadań Centralnego Laboratorium należy prowadzenie bieżącej pracy analitycznej w ramach Państwowych Szpitali Klinicznych i poliklinik, praca naukowa w dziedzinie chemii klinicznej i prowadzenie prac organizacyjnych związanych z tworzeniem nowej struktury organizacyjnej w zakresie chemii klinicznej.

Prace bieżące wykonują laboranci, którzy co 3 miesiące zmieniają swoje stanowiska. Praca laborantów uregulowana jest normami, określającymi maksymalną ilość analiz, jaką laborant w danych warunkach może wykonać w ciągu 8 godzin pracy. Normy ulegają zmianie w zależności od wprowadzonych uproszczeń metodycznych i udoskonalień organizacyjnych. Kliniki poinformowane są o wysokości norm i stosownie do nich regulują ilość przysyłanego materiału. Normy nie doty-

czą tzw. analiz „pilnych“ (cukier we krwi i moczu, diastaza krwi i moczu, azot resztkowy itp.). Centralne Laboratorium ma zorganizowaną nocną i niedzielną służbę. Do zadań personelu wyższego należy: przystosowanie i wypróbowanie nowych metod analitycznych przed wprowadzeniem ich do pracy bieżącej oraz zaznajomienie z nimi personelu laboranckiego. Personel wyższy prowadzi też systematyczną kontrolę pracy laborantów i sprawuje nadzór techniczny nad całym laboratorium.

Większość publikowanych prac naukowych dotyczy samej metodyki laboratoryjnej, np. *Slavík K.*: Mikrostanovení amino-N v krevním séru ninhydrinem — Čas. Lek. Česk. 1952, 91, 273; *Kořínek J.*: Stanovení kyselých a alkalických fosfatů z krevního séra Čas. Lek. Česk. 1951, 90, 1220; *Michalec Č., Slavík K.*: Nekolik poznámek k stanovení dusíku Nesslerovým činidlem. Chem. Listy, 1951, 45, 231; *Slavík K., Michalec C.*: Nekolik poznámek k stanovení tyrosinu a tyraminu Gerngrossovou reakcí. Čas. Lek. Česk. 1952, 91, 301. Z innych zagadnień związanych z chemią kliniczną opracowano np. w r. 1952: „Wpływ riwanolu na białka surowicy“ i „Badania nad oddychaniem skrawków tkankowych w świetle teoretycznych założeń próby galaktozowej“. W latach 1949—1952 wyszło z Centralnego Laboratorium około 40 publikacji.

Jednym z głównych zadań organizacyjnych Centralnego Laboratorium na lata 1952 i 1953 jest przygotowanie standaryzacji metod chemiczno-klinicznych.

Opracowano już następujące metody: a) chemiczne badanie moczu, b) oznaczanie diastazy we krwi i moczu, c) oznaczanie aminokwasów we krwi i moczu, d) oznaczanie kwasowości soku żołądkowego, e) oznaczanie azotu niebiałkowego we krwi metodą Kjeldahla, f) oznaczanie azotu niebiałkowego we krwi metodą Folina, g) oznaczanie chlorków w moczu metodą Votočka.

Każda metoda opracowana jest według następującego schematu: a) zasada metody, b) potrzebna aparatura i szkło, c) ilość odczynników potrzebnych na 100 analiz, d) sposób przyrządzania odczynników, e) sposób przeprowadzania analizy.

Opracowany w ten sposób projekt metody zostaje przesłany do przejrzenia członkom Komisji Standaryzacyjnej powołanej przez Ministerstwo Zdrowia, a następnie przedyskutowany na posiedzeniu Komisji. Po zatwierdzeniu przez komisję zostaje przesłany do Ministerstwa Zdrowia.

Centralne Laboratorium Kliniczne jest więc obecnie w ČSR jednostką najwyższego typu w schemacie organizacyjnym. Typ ten należy jednak traktować jako tymczasowy. Jest bowiem widoczne, że duża ilość pracy bieżącej, jaką wykonuje laboratorium, jest przeszkodą w realizacji jego najważniejszych zadań, jakimi są: prace organizacyjne, doskonalenie personelu wyższego i praca naukowa. Toteż istnieją już konkretne projekty, aby Centralne Laboratorium przekształcić w zakład o zdecydowanie naukowym charakterze, który obejmie pieczę nad rozwojem chemii klinicznej w skali ogólnopaństwowej.

Inny typ organizacyjny reprezentuje Laboratorium Zakładu Opieki nad Matką i Dzieckiem w Pradze. Typ ten można określić jako laboratorium obsługujące większy zakład leczniczy o dość znacznym różnicowaniu specjalistycznym.

Laboratorium to jest podzielone na 2 oddziały: biochemiczny i hematologiczny. Laboratorium nastawione jest przede wszystkim na pracę bieżącą, usługową. Prowadzone badania naukowe stanowią uboczny tor pracy. Laboratorium posiada: 3 fotokolorymetry „Leitz“, 1 fotometr płomieniowy „Zeiss“, 2 polarografy „Heyrovsky“, 1 fotometr „Pulfrich“ oraz drobniejszą aparaturę naukową (pH-metr, polarymetr, refraktometr).

Skład personalny wynosi 29 osób, w tym 7 pracowników z wyższym wykształceniem i 14 laborantów. Laboratorium obsługuje zakład leczniczy o 450 łózkach. Prace bieżące wykonują laboranci i techniczni asystenci. Personel laborancki i techniczno-asystencki zmienia swe stanowiska co 3 miesiące. Ponieważ zakład posiada

duży oddział dla niemowląt, laboratorium stosuje szereg metod chemicznych zmodyfikowanych na mikrometody. Kontrolę pracy bieżącej przeprowadzają pracownicy naukowcy. Podobnie jak w Centralnym Laboratorium ustalone są normy dla każdego pracownika.

Przedstawicielem laboratorium ściśle związanego z określoną kliniką jest laboratorium biochemiczne III Kliniki Chorób Wewnętrznych w Pradze prof. Charvata. Obsada laboratorium składa się z 2 lekarzy, 1 chemika i 4 laborantów. Obydwaj lekarze pracują także jako klinicyści. Laboratorium jest bardzo dobrze zaopatrzone w aparaturę. Posiada m. in.: spektrofotometr kwarcowy „Beckman“, spektrofotometr „Coleman“, 3 fotokolorymetry, polarograf, aparat Warburga, pH-metr „Beckman“, fotometr płomieniowy. Laboratorium obsługuje III Klinikę Chorób Wewnętrznych. Wykonuje badania moczu i niektórych składników krwi interesujących specjalnie klinikę. Pozostałe badania przeprowadza Centralne Laboratorium Kliniczne. W pracowni naukowej wykonuje się m. in. oznaczanie ketosteroidów w moczu, oznaczanie kwasu bursztynowego. W r. 1952 prowadzono w dalszym ciągu badania nad ACTH oraz nad ciałami dającymi dodatnią reakcję Jaffego, jak również badania mierzące do identyfikacji wydalanych z moczem ketosteroidów.

Ostatnim typem organizacyjnym, który należy omówić, jest typ laboratorium istniejącego przy większym szpitalu prowincjonalnym. Jako przykład posłuży laboratorium przy Szpitalu Miejskim w Morawskiej Ostrawie. Laboratorium to posiada 2 pracownice: biochemiczną i hematologiczno-bakteriologiczną. Obsada laboratorium liczy 3 osoby, w tym 1 dyplomowana laborantka. Najprostsze badania wykonywane są w małych podręcznych pracowniach mieszczących się przy każdym oddziale. Laboratorium posiada 1 fotokolorymetr, 1 fotometr i trochę drobniejszej aparatury. Laboratorium wykonuje wyłącznie pracę bieżącą.

Opisane wyżej typy laboratoriów klinicznych prezentują zasadnicze ogniwa organizacyjne, na których ma się opierać przyszła struktura organizacyjna chemii klinicznej w ČSR. Przechodząc poszczególnie poszczególne organizacyjne należy zwrócić uwagę na zjawisko stopniowego zężania się zakresu działania poszczególnych typów laboratoryjnych, zmierzające do coraz ściślejszego wyspecjalizowania się w jednej dziedzinie analityki lekarskiej. Najniższy organizacyjnie typ laboratorium przeprowadza w ramach jednej pracowni badania chemiczne, hematologiczne i bakteriologiczno-serologiczne. W laboratorium wyższego typu wykonuje się jeszcze i badania chemiczne i hematologiczne. Natomiast laboratoria najwyższego typu nastawione są już wyłącznie na badania biochemiczne.

Jednostek laboratoryjnych, które można zaliczyć do opisanych wyżej typów organizacyjnych, jest w ČSR wiele. Nie wszystkie posiadają wprawdzie odpowiednio liczebny i odpowiednio wyszkolony personel i nie wszystkie są jeszcze należycie zaopatrzone w sprzęt i aparaturę. Ale widoczne jest, że istniejące braki dadzą się w ciągu kilku najbliższych lat usunąć. Z jednej strony szybkie szkolenie kadr pozwoli na usunięcie niedociągnięć kadrowych, a z drugiej strony rozwój przemysłu precyzyjnego, szklanego i chemicznego gwarantuje szybkie pokrycie niedoboru zaopatrzeniowego.

Musimy więc stwierdzić, że istniejąca już obecnie baza materialna, jaką reprezentują poszczególne laboratoria, pozwala na rozpoczęcie przebudowy organizacyjnej w dziedzinie chemii klinicznej w ČSR, choćby w ograniczonym początkowo zakresie.

3. Ostatnim czynnikiem potrzebnym do sprawnego funkcjonowania całego aparatu organizacyjnego chemii klinicznej i nadającym całej pracy tego aparatu praktyczny sens jest istnienie uświadomionego pod względem fachowym zespołu odbiorców, jakimi są lekarze klinicyści. Lekarz praktyk nie przeszkolony w chemii klinicznej nie potrafi wykorzystać w odpowiedni sposób dostarczonego mu przez laboratorium materiału ani wyciągnąć z niego właściwych wniosków. W tych warun-

kach istnieje niebezpieczeństwo, że praca, nawet najbardziej wykwalifikowanych fachowców w dziedzinie chemii klinicznej, dysponujących najlepiej wyposażonymi laboratoriami, może pójść na marne.

W ČSR niebezpieczeństwo to zostało już dawno spostrzeżone. Wystarczy przejrzeć powszechnie używany w ČSR podręcznik chemii lekarskiej prof. *Hamsika*, aby przekonać się, że najmniej połowa materiału zawartego w części praktycznej podręcznika poświęcona jest chemii klinicznej. Student na ćwiczeniach z chemii lekarskiej obowiązany jest przerobić całkowite ilościowe i jakościowe chemiczne badanie krwi, płynu mózgowo-rdzeniowego, płynów przesiękowych i wysiękowych, śliny, treści żołądkowej i dwunastniczej, żółci, kału i moczu. Właściwe ćwiczenia biochemiczne są potraktowane w tym podręczniku w sposób bardzo lakoniczny. Tego rodzaju system nauczania nie rozwiązuje całkowicie sprawy wykszolenia lekarzy w dziedzinie chemii klinicznej, zbliża wprawdzie studenta do zagadnień chemiczno-klinicznych, zwłaszcza od strony praktycznej, ale czyni to na koszt właściwej biochemii i co gorsze nie daje uzupełnienia teoretycznego, które powinno nauczyć studenta umiejętności interpretowania wyników laboratoryjnych. Uzupełnienie tych braków w ramach wykładów z propedeutyki chorób wewnętrznych na III roku studiów nie mogło dać również o wiele lepszych rezultatów, ze względu na niemożność szerszego rozwinięcia tematu, a także z uwagi na niski jeszcze poziom ogólnolekarskiego wykształcenia studenta III roku. Dlatego też jako jedyne racjonalne rozwiązanie tego problemu uznano zorganizowanie zakładów chemii klinicznej i włączenie tego przedmiotu jako obowiązkowego do programu studiów lekarskich. Szczerpłość kadr kierowniczych nie pozwoliła na razie na zorganizowanie tego rodzaju zakładów przy wszystkich wydziałach lekarskich.

Od 1 października 1952 rozpoczęto wykłady z chemii klinicznej na razie tylko na Wydziale Lekarskim Uniwersytetu Karola w Pradze. Według diskutowanych wcześniej projektów chemia kliniczna miała być wykładana na III i IV roku studiów. Wykłady III roku miały obejmować metodykę ogólną i szczegółową oraz tzw. interpretację ogólną. Niezależnie od tego student musiał przejść normalne wykszolenie praktyczne z zakresu analityki chemiczno-klinicznej. Na IV roku miało się wykladać tzw. interpretację szczegółową ze szczególnym podkreśleniem umiejętności interpretowania prób czynnościowych. Ćwiczenia na tym roku miały być również poświęcone przede wszystkim próbom czynnościowym. W ten sposób student medycyny miał otrzymać całokształt wykszolenia chemiczno-klinicznego, który by czynił z niego pełnowartościowego odbiorcę wyników badań laboratoriów klinicznych. O dalszych losach omawianego projektu i jego realizacji zadecydują najbliższe lata.

W chwili obecnej przeciętny lekarz w ČSR orientuje się na ogół w zasadniczych zagadnieniach chemii klinicznej i ma tzw. „biochemiczne podejście do zagadnień klinicznych“. Nie jest jednak jeszcze przygotowany do głębszego analizowania zagadnień klinicznych pod kątem biochemii, a więc stanowi właściwie dopiero materiał na pełnowartościowego odbiorcę prac laboratoriów.

Jak widzimy, wymienione na wstępie trzy warunki konieczne do przeprowadzenia organizacji w zakresie chemii klinicznej nie są całkowicie spełnione w ČSR. Stąd też zrozumiąta jest ostrożność, z jaką przystąpiono do realizacji tego projektu. Realizację projektu rozbito na etapy i przeprowadza się ją na razie tylko tam, gdzie istnieją już obecnie odpowiednie warunki.

Biorąc pod uwagę obecny stan chemii klinicznej w ČSR i planowo rozpoczętą działalność organizacyjną można sądzić, że całkowita realizacja projektu organizacyjnej przebudowy chemicznej diagnostyki lekarskiej może nastąpić w ciągu najbliższych 3—4 lat.

JÓZEF HELLER

## PODSTAWOWE REAKCJE W ODDYCHANIU ROŚLIN I ZWIERZĄT

Przez oddychanie w szerokim tego słowa znaczeniu rozumiemy wszelkie procesy metabolizmu pośredniego, zarówno kataboliczne, czyli dysymilacji, jak anaboliczne, czyli asymilacji. Procesy dysymilacji dostarczają energii chemicznej, procesy asymilacyjne umożliwiają odnowienie substancji żywej przy zużyciu energii. U zwierząt, jako organizmów heterotroficznych, dysymilacja musi dostarczyć energii na pracę mięśniową, pracę osmotyczną i inne przejawy życia, a także musi pokryć całkowity wydatek energetyczny związany z anabolizmem. U roślin oprócz energii uzyskanej z dysymilacji, organizm wykorzystuje energię promienistą słońca przerabiając ją na energię chemiczną.

Budowa chemiczna ciała zwierzęcego i roślinnego wykazuje tak daleko idące podobieństwa, że możemy mówić o jednolitym składzie biochemicznym żywej substancji.

Enzymy katalizujące szereg procesów w żywej substancji posiadają swoistość związaną z naturą chemiczną substratu bez względu na jego zwierzęce czy roślinne pochodzenie.

Już te dwa zasadnicze fakty pozwalają przypuszczać, że główne szlaki metaboliczne są wspólne dla obu światów.

Zasadniczym procesem wyzwalającym energię chemiczną w żywej substancji jest utlenienie. Współczesna chemia określa jako utlenienie wszystkie procesy, w których rozpatrywany substrat oddaje elektron. Zatem zarówno właściwe oksydacje, jak i fermentacje są utlenieniem.

Zasadniczym materiałem utlenianym, czyli donatorem elektronów jest w żywej substancji wodór. Zasadniczym akceptorem elektronów zaś jest tlen. Można więc ująć katabolizm świata żywego w postaci jednego podstawowego równania chemicznego: reakcji utlenienia wodoru na wodę. Utlenienie to przebiega izotermicznie, jak w ogniwie elektrycznym, którego biegunami są wodór i tlen. Praca takiego ogniwa równa się iloczynowi z ilości przeniesionej elektryczności i z napięcia, które w takim ogniwie wynosi 1,23 wolta.

Oddychanie zewnętrzne roślin i zwierząt polega na pobieraniu z atmosfery tlenu i na wydalaniu dwutlenku węgla. Rola tlenu atmosferycznego ogranicza się do tego, że pod wpływem właściwych katalizatorów przyjmuje on na każdy atom dwa elektrony od dwu atomów wodoru, przechodząc w dwuwartościowy ujemny jon. Jon ten w połączeniu z dwoma jonami wodorowymi daje cząsteczkę wody. Tlen wydalanego dwutlenku węgla nie pochodzi bezpośrednio z atmosfery. Częściowo jest to tlen zawarty już pierwotnie w substracie utlenianym, częściowo zaś pochodzi z wody, której cząsteczki przyłączają się w trakcie przemian do substratu, przy czym wodór tej wody ulega utlenieniu na równi z wodorem własnym ciała wyjściowego. Węglowi zatem przypisujemy w cyklu przemian energetycznych rolę

bierną, rolę struktury, z którą związany jest właściwy substrat utleniany — wodór. W miarę zużycia wodoru pozostaje na węglu sam tlen i struktura likwiduje się stopniowo po jednym ogniwie odszczepianym jako  $\text{CO}_2$ .

Przejście elektronu z wodoru na tlen nie odbywa się od razu pod napięciem 1,23 wolta. Proces utlenienia podzielony jest na kilka etapów, z których każdy odbywa się pod napięciem stanowiącym określoną część całości, tj. 1,23 wolta. Energia wyzwolona na każdym etapie jest wprost proporcjonalna do różnicy napięcia, czyli do spadku potencjału oksydo-redukcyjnego na danym etapie. Między poszczególne etapy utlenienia włączone są procesy przebudowujące strukturę chemiczną, najczęściej z przyłączeniem wody. Znaczenie tej przebudowy (poza wzbogaceniem w wodór) polega na tym, że ciało powstałe przez utlenienie, a więc odporne na dalsze utlenienie, a raczej podatne na redukcję, przekształca się w ten sposób dając nową strukturę znów podatną na utlenienie. Na przykład kwas fumarowy powstały przez utlenienie kwasu bursztynowego jest odporny na dalsze działanie czynników utleniających, a nawet, przy doprowadzeniu potrzebnej energii, łatwo się redukuje z powrotem na kwas bursztynowy. Przez przyłączenie wody kwas fumarowy przechodzi w kwas jabłkowy, który jest już odpowiednim substratem do utlenienia.

Energia uwolniona na poszczególnych etapach przeprowadzanych *in vitro* ujawnia się jako ciepło, które rozprasza się w otoczeniu. W substancji żywej energia ta służy do wytworzenia struktur termodynamicznie labilnych, utrwalonych przez związanie z grupą fosforanową. Przy usunięciu grupy fosforanowej związki te przechodzą w formę trwałą, uboższą w energię od formy labilnej, a uwolniona w ten sposób różnica energii może wykonać pracę chemiczną. Tego rodzaju ciała nazywamy związkami wysokoenergetycznymi. Powstają one w każdym etapie utlenienia wyzwalającym dostateczną ilość energii, dzięki czemu procesy utlenienia przebiegają w żywej substancji bez wyzwolenia tych ilości ciepła, które im towarzyszą poza żywą substancją.

Te związki wysokoenergetyczne, przede wszystkim kwas adenozyntroójfosforowy (ATP), stanowią bezpośrednie źródło energii dla wszystkich procesów energochłonnych żywej substancji. Z nich pochodzi energia pracy mięśniowej, energia pracy osmotycznej, stanowiącej poważny, choć dotąd często nie doceniany wydatek energetyczny zarówno u zwierząt, jak i u roślin, energia elektryczna i świetlna. Przede wszystkim zaś energia chemiczna endergonicznych procesów ma w nich swe bezpośrednie źródło. Stanowią one zatem zasadnicze ogniwo łączące katabolizm i anabolizm, procesy dysymilacji z procesami asymilacji, zapewniając krążenie energii. Krążenie to polega na tym, że związki wysokoenergetyczne wchodzi w reakcje endergoniczne jako jedno z ciał reagujących, przechodząc przy tym w formę niskoenergetyczną. Podobnie w reakcjach egzergonicznych biorą udział formy niskoenergetyczne, przechodząc kosztem energii wyzwolonej w reakcji w wysokoenergetyczne.

Współczesne pojęcie stanu dynamicznego ustroju daje nam obraz metabolizmu jako jednej niepodzielnej całości, w której poszczególne ciągi reakcji krzyżują się i wzajemnie uzależniają. Wyróżnianie przemian cukrowców, tłuszczowców czy też innych szlaków metabolicznych jest tylko pomocniczym uproszczeniem, ułatwiającym nam orientację w tym labiryncie. Tak pojęte szlaki metaboliczne są wspólne dla roślin i zwierząt.

Głównym szlakiem przemian cukrowych jest glikoliza, prowadząca przez kwas pirogronowy do kwasu octowego. Przemiana tłuszczowców odbywa się drogą, której zasadniczy przebieg odpowiada teorii beta-oksydacji, wysuniętej przed 40 laty przez *Knoopa*. Produktem beta-oksydacji jest znowu kwas octowy (lub kwas aceto-octowy, co praktycznie na jedno wychodzi). Przemiana pośrednia białek jest pojęciem zbiorowym, obejmującym przemianę poszczególnych kwasów aminowych. Nie



wszystkie koleje poszczególnych aminokwasów są nam dotąd znane, te które znamy, wyprowadzają po dezaminacji na tor przemian bądź cukrowych, bądź tłuszczowych, tak że w rezultacie dochodzi również do kwasu octowego. Kwas octowy jest zatem węzłowym metabolitem. Dalsze przemiany tego kwasu przebiegają w powszechnie znanym cyklu kwasów trójkarboksylowych (cykl Krebsa), którego produktami końcowymi są dwutlenek węgla i woda. Charakterystyczny dla tego cyklu jest udział w jego przemianach kofermentu A, jedyne go ze znanych nam dotąd związków wysokoenergetycznych, który nie zawiera czynnej grupy fosforanowej. Miejsce jej zajmuje w kofermencie A grupa — SH.

Naszkicowany układ dróg metabolicznych łącznie z cyklem trójkarboksylowym panuje ilościowo nad całym obrazem przemian świata zwierzęcego. Wedle przybliżonych obliczeń w przemianach tych powstaje ponad 95 % całej energii i wydalanego dwutlenku węgla oraz zużywa się ponad 95 % całego tlenu pobranego przez zwierzę. Inne szlaki są zupełnie podrzędne pod względem ilościowym, choć nie mniej istotne pod względem jakościowym. Opisany wyżej schemat można by nazwać w całości systemem przemian fragmentów dwuwęglowych ze względu na węzłową w nim rolę kwasu octowego.

Występowanie cyklu trójkarboksylowego u roślin nie ulega dziś wątpliwości. Udowodniono obecność u roślin wszystkich zaczynów cyklu, wykazano hamowanie przez malonian, które prowadzi do nagromadzenia bursztynianu. Dotychczasowe jednak badania nie pozwalają na ocenę ilościowego znaczenia tego cyklu w świecie roślinnym, wiemy tylko, że jego udział jest znacznie mniejszy aniżeli u zwierząt.

Krażenie azotu jest u roślin znacznie bardziej urozmaicone i wychodzi daleko poza szlaki wspólne ze zwierzętami, u których po dezaminacji kwasów aminowych wydala się amoniak albo wprost, albo po przeróbce na mocznik lub kwas moczowy. O przemianie azotowej u roślin nie będę mówił szerzej, ponieważ zagadnienie to, jako główny temat obecnego sympozjum, będzie omawiane dokładnie w następnych referatach.

Obok systemu przemian dwuwęglowych zarysował się w ostatnich latach wyraźnie szlak metaboliczny, który można określić jako strumień przemian jednowęglowych. W przemianach tych, polegających na przenoszeniu reszty jednowęglowej, występuje koenzym powstający z kwasu foliowego lub folinowego (*citrivorum factor*), który ma tu rolę analogiczną do roli koenzymu A w przemianie reszt dwuwęglowych. Również witamina B<sub>12</sub> jest w jakiś sposób związana z przemianami jednowęglowymi.

Przemiany jednowęglowe obejmują np. przekształcenie glicyny w serynę, homocysteiny w metioninę i inne reakcje metylujące oraz syntezę puryn z karboksaminy imidazolowej. Należy tu również przyswajanie dwutlenku węgla, reakcja, którą jeszcze przed kilkunastu laty uważano za cechę właściwą jedynie świata roślinnego, za jedno z głównych kryteriów podziału świata żywego na część zwierzęcą i roślinną. Odbywa się ona również i u zwierząt, jednak ilościowo w stopniu nieznacznym. W związku z asymilacją dwutlenku węgla przemiany jednowęglowe odgrywają u roślin bez porównania większą rolę aniżeli u zwierząt, ograniczając w ten sposób udział procentowy przemian dwuwęglowych. Mały udział przemian jednowęglowych w metabolizmie wyższych zwierząt i człowieka warunkuje małe stosunkowo zapotrzebowanie tych organizmów na witaminy potrzebne do tych przemian.

Utlaniecie substratów na opisanych drogach metabolicznych przebiega w kilku etapach, zanim wodór połączy się z tlenem na wodę. Na każdym etapie energia wyzwolona z utlenienia jednej pary atomów wodoru wystarcza na związanie jednej reszty fosforanowej na związek wysokoenergetyczny. Pierwszy etap polega na przeniesieniu wodoru na kozymazę działaniem specyficznej dla danego substratu dehydrogenazy. Związaną z tym fosforylację ADP nazywa się fosforylacją substratową.

Dalsze fazy utlenienia wodoru zredukowanej kozymazy przebiegają w trzech etapach. Związane z tym fosforylacje, zwane oksydacyjnymi, stanowią główne źródło związków wysokiej energii. Na przykład na 15 fosforylowań, które odpowiadają zupełnemu utlenieniu kwasu pirogronowego w cyklu trójkarboksylowym, występuje tylko jedna fosforylacja substratowa, a 14 oksydacyjnych. W przeciwieństwie do różnorodności donatorów wodoru na pierwszym poziomie utleniań, na drugim występuje wyłącznie zredukowana kozymaza jako donator wodoru.

Najważniejszymi akceptorami wodoru od zredukowanej kozymazy lub fosfokozymazy są enzymy, zawierające rdzeń izoaloksazynowy, a więc chromoproteidy flawinowe, pochodne witaminy B<sub>2</sub>. Ciała te w swojej formie utlenionej są swoistymi akceptorami wodoru od zredukowanej kozymazy lub fosfokozymazy. Noszą one również miano diaforazy lub reduktazy cytochromowej, ponieważ przenoszą elektrony na cytochrom *c*, odszczepiając równocześnie jony wodorowe.

Enzymy flawinowe są bardzo rozpowszechnione w świecie zwierzęcym, znaleziono je także w kielkach roślinnych i ziemniakach. W wyższych roślinach wykazano wielokrotnie istnienie funkcji diaforetycznej, tj. przeniesienie elektronów ze zredukowanej kozymazy na cytochrom *c*, ale dotąd nie stwierdzono w sposób przekonujący flawinowej natury czynnych tu enzymów.

Przeniesienie elektronów z flawiny na cytochrom *c* jest połączone z drugą z kolei fosforylacją oksydacyjną. Trzecia zachodzi w nieustalonej dotąd fazie przejścia elektronów z cytochromu *c* poprzez oksydazę cytochromową na tlen.

U roślin występują te same cytochromy *a*, *b* i *c*, które znamy ze świata zwierzęcego. Ponadto jednak stwierdzono niedawno (1) obecność dalszych cytochromów, których dotąd poza światem roślinnym nie spotkano. Są to cytochromy *b<sub>3</sub>* i *f*. Ciekawy jest zwłaszcza cytochrom *f*, podobny na ogół do cytochromu *c*, lecz różniący się bardziej dodatnim potencjałem oksydo-redukcyjnym. Znamienny jest fakt, że występowanie jego ogranicza się do zielonych części roślin. Wyrażono przypuszczenie, że jest on katalizatorem nie procesu oddychania, lecz fotochemicznej redukcji wody.

Końcowym ogniwem enzymatycznym utlenienia, reagującym wprost z tlenem jest oksydaza cytochromowa, przenosząca na tlen elektrony ze swego żelaza, które z formy dwuwartościowej przechodzi w ten sposób w trójwartościową. Oksydaza cytochromowa jest też ogniwem końcowym przy utlenianiu kwasu bursztynowego, które odbywa się z pominięciem kozymazy. Łącznie ocenia się udział oksydazy cytochromowej w oddychaniu zwierząt na 97%. U roślin oksydaza cytochromowa jest bardzo rozpowszechniona; starsze prace opisują ją pod nazwą oksydazy indofenolowej. Nie ulega jednak wątpliwości, że ilościowy jej udział w oddychaniu jest znacznie mniejszy niż u zwierząt. Stwierdzono np., że w kartoflu najwyżej 20% całego oddychania idzie poprzez ten zaczyn.

Obok oksydazy cytochromowej duże znaczenie w oddychaniu roślin ma oksydaza polifenolowa, którą się uważa dzisiaj za identyczną z tyrozynazą. Enzym ten zawiera miedź, która aktywuje tlen, podobnie jak żelazo w oksydazie cytochromowej. Polifenolaza utlenia fenole na odpowiednie chinony, które działają następnie jako akceptory wodoru. Nie wyjaśniono dotąd, czy chinony reagują bezpośrednio ze zredukowaną kozymazą, czy też za pośrednictwem dalszego ogniwia, np. zaczynów flawinowych. Rozpowszechnienie polifenolazy w świecie roślinnym jest na tyle ograniczone, że nie można o niej mówić jako o powszechnie występującym ogniwie końcowym oddychania. Jeszcze bardziej ograniczone jest występowanie oksydazy askorbinowej, również enzymu miedziowego, dla którego akceptorem wodoru jest utleniona forma kwasu askorbinowego. Przypuszcza się również istnienie w roślinach układów oddechowych, których ogniwem terminalnym są oksydazy nie zawierające metalu, np. samoutlenialne zaczyny flawinowe.

Reasumując możemy powiedzieć, że w świecie roślinnym występuje układ cyto-

chromowy zasadniczo ten sam co w zwierzęcym, lecz jego udział ilościowy w oddychaniu, dokładnie nie znany, jest z pewnością znacznie mniejszy niż w świecie zwierzęcym. Obok tego typu oddychania spotykamy szereg innych układów, których działanie możemy określić jako oddychanie chinonowe.

Ciekawy przykład występowania oddychania chinonowego u zwierząt udało mi się wykazać (2) w miazdze poczwerek w czasie diapauzy zimowej. W okresie tym układ cytochromowy poczwarki ulega zniszczeniu i oddychanie odbywa się poprzez chinonowe pochodne tyrozyny.

Wielkie postępy poczyniła w ostatnich 10 latach nauka o rozmieszczeniu i współdziałaniu enzymów. Okazało się, że zaczyny katalizujące oddychanie (w najszerszym tego słowa znaczeniu) zawarte są w mitochondriach lub homologicznych ziarnistościach. Preparat z mitochondrii nazwano cykloforazą. Mieszczą się tam zaczyny katalizujące wszystkie reakcje cyklu trójkarboksylowego, przemiany kwasów aminowych, glikolizy, a nawet tak złożone ciągi reakcji, jak fosforylacje oksydatywne i utlenianie tłuszczowców. Preparat mitochondriowy otrzymany z określonej masy tkanki wykazuje prawie pełne natężenie metabolizmu macierzystej tkanki, pozostała zaś reszta tkanki nie wykazuje prawie oddychania. Zawiera ona przezważnie zaczyny z grupy hydrolaz, czynne w procesach trawienia.

W świecie roślinnym, o ile mi wiadomo, opisano dotąd tylko jeden preparat, który można by porównać ze zwierzęcymi mitochondriami (3). Z kiełków fasoli otrzymano nierozpuszczalne w wodzie cząstki, wykazujące właściwości bardzo podobne do zwierzęcych mitochondriów. Barwią się one jak mitochondria i mają enzymatyczne właściwości cykloforazy.

Swoistym rysem przemiany energetycznej zielonych roślin jest udział energii promienistej słońca w pracy asymilacyjnej. Chcąc prawidłowo przeprowadzić porównanie między metabolizmem zwierzęcym a roślinnym musimy zdać sobie sprawę, że fotosynteza, jako swoiste zjawisko charakterystyczne dla biochemii roślin, a obce biochemii zwierzęcej, ogranicza się do jednego tylko procesu: rozszczepienia wody z uwolnieniem tlenu i wodoru. Jest to odwrócenie podstawowej reakcji życia, wspólnej tak zwierzętom jak roślinom, do którego zwierzęta nie są zdolne.

Rozszerzenie pojęcia fotosyntezy poza ten fakt podstawowy prowadzi do zaciemnienia obrazu i w końcu do sformułowań wyraźnie już fałszywych. Kiedy *Bonner* (4) w swoim podręczniku powiada, że fotosynteza polega na redukcji dwutlenku węgla kosztem energii słonecznej, to jest to sformułowanie nieściśle, nasuwające interpretację, że uwalniany w fotosyntezie tlen pochodzi z dwutlenku węgla. Kiedy zaś rozszerza jeszcze dalej pojęcie fotosyntezy twierdząc, że „cukrowce w roślinach powstają drogą fotosyntezy“, to dochodzi już do wyraźnie fałszywego obrazu. Z tego bowiem sformułowania wynika, że metabolizm cukrowy stanowi jakąś wyodrębnioną gałąź przemian, której można przyporządkować energię określonego pochodzenia. Jest to sprzeczne z pojęciem dynamicznego stanu ustroju. Trzeba więc ograniczyć pojęcie fotosyntezy do podstawowej reakcji uwalniania wodoru z wody albo trzeba rozszerzyć na cały metabolizm roślinny. W tym drugim wypadku sformułowanie będzie miało charakter przenośni wyrażającej, że każdy proces egzergoniczny pokrywany jest z ogólnego zapasu energii, którego bardzo istotną składową jest dla roślin energia słoneczna.

Jeżeli ograniczymy fotosyntezę do podstawowej reakcji redukcji wody, to całą resztę asymilacji roślinnej możemy zrozumieć i wytłumaczyć nie wychodząc poza pojęcia znane nam z biochemii zwierząt.

#### PIŚMIENNICTWO

- 1) *Keilin D. i Slater E. C.*: Brit. med. Bull. 1953, 9, 89. — 2) *Heller J.*: Acta Biol. Exper. 1947, 14, 229. — 3) *Millard A., Bonner J., Axellrod B., Bandurski R.*: Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. 1951, 37, 855. — 4) *Bonner J.*: Plant Biochemistry, Nowy Jork 1950.

## PRZEMIANA ASPARAGINY, GLUTAMINY I GLUTATIONU

Znaczenie asparaginy i glutaminy ograniczono do niedawna do roli magazynowania i transportu produktów ich enzymatycznego rozkładu, a mianowicie: amoniaku, aminokwasów i ketokwasów. Również rola glutationu miała polegać wyłącznie na jego udziale w biologicznych procesach oksydo-redukcji. Dopiero w ostatnich kilku latach zwrócono uwagę na pewne wspólne cechy tych trzech substancji związane z ich konfiguracyjnym podobieństwem, które polega na tym, że związki te posiadają grupy aminowe podstawione nie w grupie  $\alpha$ -karboksylowej, lecz w grupie  $\beta$ , jak w asparaginie lub w grupie  $\gamma$ -karboksylowej, jak w glutaminie i glutationie. Ostatnie badania nad enzymatyczną katalizą syntezy tych związków wykazały, że wiązania te stanowią podstawę pokrewieństwa niektórych ważnych i wspólnych reakcji enzymatycznych dla wszystkich 3 substancji.

Niedawno wykryte syntezy enzymów katalizujących syntezę tych związków i wymianę rodnika glutamylowego i asparaginyłowego z innymi aminami pozwoliły na opracowanie nowej hipotezy roboczej, która znacznie rozszerza rolę i znaczenie tych związków. Hipoteza ta widzi w asparaginie, glutaminie i glutationie substancje biorące bezpośrednio udział w syntezie białek jako pierwsze ogniwa, które przy udziale wiązań fosforanowych bogatych w energię zapoczątkowują *de novo* syntezę peptydów.

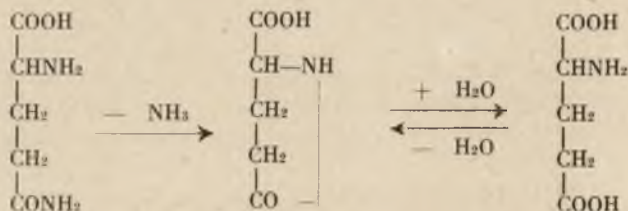
Jak wiadomo, chemiczna reaktywność rodnika glutamylowego jest dużo większa od aktywności rodnika asparaginyłowego. W hydrolizie nieenzymatycznej wydzielanie amidowego amoniaku glutaminy odbywa się już w bardzo łagodnych warunkach. W pH 6,5 i w temperaturze 100° w obecności buforów fosforanowych glutamina ulega ilościowemu rozkładowi już po upływie 30 minut. W tych warunkach asparagina hydrolizuje się w ilościach poniżej 3 %.

W wyniku hydrolizy w pH 6,5 powstaje z glutaminy amoniak i kwas pirolidonkarboksylowy. Reakcja ta, w odróżnieniu od hydrolizy asparaginy, nie jest hydrolizą wiązania amidowego. Jest to raczej reakcja podstawienia amoniaku amidu przez  $\alpha$ -aminową grupę kwasu glutaminowego i mechanizm ten można uważać za reakcję wymiany, jako prototyp reakcji zachodzących przy enzymatycznej katalizie wymiany w przypadku glutaminy i glutationu. W bardziej kwaśnych roztworach (pH 2—3) kwas pirolidonkarboksylowy ulega uwodnieniu, przy czym należy pamiętać, że również kwas glutaminowy w pH 6,5 po dłuższym ogrzewaniu do 100° ulega cyklizacji do zamkniętego pięcioczołowego pierścienia kwasu pirolidonkarboksylowego (ryc. 1).

Niższy homolog kwasu glutaminowego, kwas asparaginyłowy nie tworzy związków cyklicznych, natomiast homolog wyższy, kwas  $\alpha$ -aminoadipinowy jeszcze łatwiej ulega cyklizacji aniżeli kwas glutaminowy, i tak np. krystalizacja tego aminokwasu z gorących roztworów jest niemożliwa, ponieważ nawet krótki okres ogrzewania wystarczy, aby wytworzył się cykliczny bezwodnik kwasu aminoadipinowego.

Kwasowa deamidacja peptydów glutaminy przebiega nieco inaczej i zależy od

wolnych wiązań amidu. Jeżeli glutamina jest podstawiona w grupie  $\alpha$ -karboksylowej, wówczas w wyniku hydrolizy kwasowej powstaje kwas piroolidonkarboksylowy, natomiast jeżeli amid podstawiony jest w grupie  $\alpha$ -aminowej, wówczas reakcja grup aminowych między wiązaniem amidowym i aminowym jest utrudniona. W rezultacie grupa amidowa w peptydzie posiada dużo większą trwałość i odporność na czynniki, które normalnie powodują łatwą i szybką hydrolizę wolnej glutaminy. Zdumiewająco zachowują się peptydy asparaginy, ponieważ niezależnie od tego, czy są podstawione w grupie karboksylowej, czy aminowej, wykazują dużo większą labilność aniżeli wolny amid. Asparagina w  $\text{pH}=12$  w temperaturze pokojowej w czasie 50 minut nie ulega w ogóle rozkładowi, natomiast glicyloasparagina wydziela 20%, a asparaginyloglicyna 100% amoniaku amidowego.



Ryc. 1.

Z enzymów katalizujących hydrolizę amidów aminokwasów, szczególnie dobrze zbadane zostały glutaminazy tkanki ssaków. Ze względu na kofaktory aktywizujące ich działalność dzielimy je na glutaminazę I, aktywowaną przez fosforany i glutaminazę II aktywowaną przez ketokwasy, jak np. kwas pirogronowy. Dzięki pewnym różnicom we właściwościach fizycznych obu enzymów, jak np. odporność na zwiększone stężenia jonów wodorowych i wyższe temperatury, glutaminaza II została oddzielona od glutaminazy I i jej częściowo oczyszczone preparaty zostały szczegółowo zbadane. Mechanizm działania glutaminazy II polega prawdopodobnie na rozkładzie dehydropeptydu, który powstaje przejściowo pod wpływem enzymów z glutaminy i ketokwasu, po czym dehydropeptydaza rozkłada  $\gamma$ -glutamylodehydropeptyd do kwasu glutaminowego, amoniaku i ketokwasu. Doświadczenia ostatnich lat wykazały, że glutaminaza II jest transaminazą, która korzysta bezpośrednio z glutaminy w reakcji transaminacji. Przy użyciu glutaminy zawierającej  $\text{N}^{15}$  w grupie amidowej wykazano, że  $\alpha$ -aminowa grupa glutaminy zostaje przekazana innym ketokwasom i że amid kwasu glutaminowego jest w pewnych wypadkach bardziej aktywny w transaminacji aniżeli wolny kwas glutaminowy. Grupa amidowa nie bierze udziału w transaminacji, ponieważ okazało się, że cały  $\text{N}^{15}$  znajduje się w amoniaku odszczepionym od glutaminy, a w grupie aminowej powstałych aminokwasów nie było śladu izotopu. Jako produkt przejściowy powstaje  $\alpha$ -ketoglutaryl- $\gamma$ -amid. Reakcja ta posiada duże teoretyczne znaczenie, gdyż obok reakcji transferazy pozostaje ona do tej pory jedyną enzymatycznie katalizowaną reakcją, w której glutamina, a może i asparagina biorą bezpośredni udział w procesach syntezy.

Enzymatyczny rozkład glutationu przedstawia bardziej złożony obraz, bowiem kwas glutaminowy pochodzący z hydrolizy trójpeptydu występuje w zależności od  $\text{pH}$  bądź jako wolny aminokwas, bądź jako jego bezwodnik w postaci kwasu piroolidonkarboksylowego. W  $\text{pH}$  7,4 cały wydzielony aminokwas występuje w postaci bezwodnika, mimo że w tych warunkach rozszczepiona glutamina przez glutaminazę daje wyłącznie kwas glutaminowy. Zjawisko to można wytłumaczyć w sposób podobny do deamidacji glutaminy metodą nieenzymatyczną, a mianowicie przez wymianę  $\alpha$ -aminowej grupy cysteinyloglicyny z  $\alpha$ -aminową grupą samego kwasu glu-

laminowego. W ten sposób  $\alpha$ -aminowa grupa reszty kwasu glutaminowego glutationu posiada zdolność reagowania z własną  $\gamma$ -karboksylową grupą.

Przemiana amidów w drobnoustrojach i roślinach wyższych. W badaniach nad przemianą asparaginy i glutaminy w drobnoustrojach wykazano, że amidy spełniają istotne, odrębne i specyficzne funkcje poza dostarczaniem organizmowi aminokwasów, ketokwasów i amoniaku. Tak np. glutamina nie może zastąpić asparaginy w rozwoju wielu szczepów *Streptococcus lactis*. Również w rozwoju *Lactobacillus casei* stymulacja asparaginą jest dziesięciokrotnie wyższa od działania glutaminy. Rola glutaminy jako podstawowego metabolitu w przemianie drobnoustrojów została opracowana w badaniach nad *Lactobacillus arabinosus*, który może rozwijać się na pożywce z kwasem glutaminowym bez dodatku glutaminy. Na tej pożywce organizm wykazuje wyraźne opóźnienie w rozwoju, które obecność glutaminy natychmiastowo likwiduje. Widocznie opóźnienie wynika z braku amoniaku do syntezy glutaminy, a dodatek soli amonowych rzeczywiście przyspiesza rozwój drobnoustroju. Nieco później podstawowa rola glutaminy w przemianie została potwierdzona w doświadczeniach z antymetabolitami. W obecności sulfoksydu metioniny synteza glutaminy z kwasu glutaminowego i amoniaku ulega zahamowaniu, rozwój bakterii zostaje zatrzymany i dopiero dodatek glutaminy umożliwia normalny ich rozwój. Konwersja kwasu glutaminowego jest więc podstawowym torem metabolizmu kwasów dwukarboksylowych i przynajmniej w pewnych wypadkach glutamina nie stanowi rezerw kwasu glutaminowego, lecz wręcz przeciwnie, kwas glutaminowy razem z amoniakiem jest prekursorem niezbędnej glutaminy w przemianie niektórych drobnoustrojów. Z drugiej strony rozwój gronkowca złocistego na pożywce z glutaminą ulega zahamowaniu przy dodatku antymetabolitu  $\gamma$ -alkylamidu. Dodatek kwasu glutaminowego umożliwia dalszy normalny rozwój gronkowca. Bardzo istotną jest również obserwacja hamowania rozwoju *Lactobacillus arabinosus* i bakterii gnilnych *Proteus vulgaris* w obecności hydroksyloaminy. Obecność amidów lub amoniaku przeciwdziała inhibicji hydroksyloaminy. Hydroksyloamina bowiem łączy się z acylem kwasów glutaminowego i asparaginowego tworząc odpowiednie kwasy hydroksamowe, które blokują podstawową przemianę kwasów dwukarboksylowych.

Przemiana amidów w roślinach wyższych była przedmiotem długoletnich badań, przy czym obiektem doświadczalnym były zazwyczaj kielki lub liście odseparowane od reszty rośliny. W roślinach amidy powstają z amoniaku doprowadzonego z zewnątrz i z węglowodanów, które na torze podobnym do cyklu kwasów trójkarboksylowych dostarczają amidom szkieletu węglowego. Poza tym amidy powstają na drodze degradacji białek, jednak utlenianie cukrowców stanowi główne źródło kwasów szczawiowo-octowego i  $\alpha$ -ketoglutarowego do syntezy asparaginy i glutaminy w roślinach wyższych.

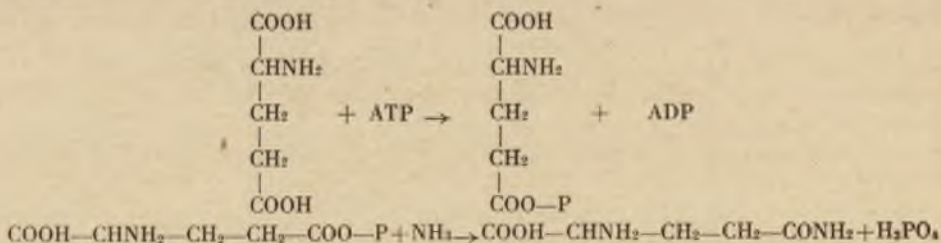
Etiolowane kielki roślin wykazują większą zawartość asparaginy i glutaminy, które na świetle lub po bezpośrednim dokarmianiu węglowodanami wykazują zwiększoną syntezę białka kosztem nagromadzonych amidów. U roślin, podobnie jak u drobnoustrojów, amidy nie zastępują się wzajemnie. W głodujących kielkach i oddzielonych liściach akumulacja glutaminy poprzedza akumulację asparaginy, a podczas rozkładu białka ilość asparaginy rośnie kosztem glutaminy. Starsze poglądy roli amidów jako wyłącznie detoksyfikatorów amoniaku w roślinie są w świetle ostatnich badań przedawnione, bowiem ilość amoniaku w roślinie można znacznie podwyższyć bez wywołania równoległych zmian w stężeniu amidów.

Zrozumienie znaczenia amidów zostało w ostatnich latach znacznie pogłębione i obecnie widzimy w tych związkach podstawowe substancje reakcji transaminacji. W badaniach z izotopowym  $N^{15}$  w amoniaku okazało się, że stężenie izotopu w grupie amidowej kwasów dwukarboksylowych jest znacznie większe aniżeli w azocie białek, co wskazuje na silnie zwiększoną metaboliczną aktywność amidów w porów-

naniu z białkami. Asparagina i glutamina posiadają w grupie amidowej wiązania i zawartość energii podobne do wiązania peptydowego, które mogą służyć jako substrat reakcji enzymatycznych zapoczątkowujących syntezę białka poprzez przekształcanie się w wiązania peptydowe.

Znaczenie glutationu i jego przemiana w materiale roślinnym nie są jeszcze zbadane. Przemiana glutationu w tkance zwierzęcej jest niezmiernie szybka. W doświadczeniach *in vivo* *Waelsch* wykazał, że półokres trwania glutationu w wątrobach szczura i królika wynosi od 2 do 4 godzin, w porównaniu ze 170 godzinami półokresu trwania białka wątroby. Na podstawie doświadczenia, że półokres aminokwasów potrzebnych do syntezy glutationu wynosi również od 2 do 4 godzin, a więc że synteza glutationu odbywa się z tą samą szybkością w wszystkich 3 aminokwasów peptydu i na podstawie doświadczeń z cysteiną zawierającą  $S^{35}$ , która również została wcielona w skład glutationu w okresie 3 godzin, *Waelsch* przyjął, że glutation jest produktem pośrednim między wolnymi aminokwasami i białkami, którym trójpeptyd przekazuje swoje aminokwasy albo spełnia rolę regulatora mechanizmu syntezy. Hipoteza *Waelscha* została w ostatnich latach potwierdzona, bowiem glutation, podobnie jak glutamina, jest przekaźnikiem rodnika glutamylowego na inne aminokwasy.

Synteza asparaginy, glutaminy i glutationu. Pierwszym krokiem w biologicznej syntezie glutaminy były doświadczenia wykonane w r. 1935 przez *Krebsa*, który wykazał, że glutamina powstaje z kwasu glutaminowego i amoniaku w obecności systemu enzymatycznego i odpowiednich kofaktorów tkanki nerek lub mózgu kręgowców. Amoniak i kwas glutaminowy znikają z systemu, a nowo powstały związek po izolacji został zidentyfikowany jako glutamina. W drugim etapie badań ostatnich 5 lat zastąpiono materiał tkankowy przez ekstrakty bezkomórkowe, przy czym w miejsce źródła energii wynikającego z oddychania tkanekowego, doprowadzono z zewnątrz adenozyotrójfosforan. W ten sposób zdołano oddzielić reakcje syntezy od hydrolitycznego działania enzymów tkanki i przeprowadzić doświadczenia w środowisku mniej złożonym o znanych substratach i źródłach energii. W r. 1949 wyjaśniony został mechanizm udziału ATP w syntezie glutaminy z kwasu glutaminowego i amoniaku w obecności bezkomórkowych ekstraktów wątroby gołębia, jonów Mg i ATP,



Jeżeli w miejsce amoniaku system zawiera hydroksyloaminę, wówczas zamiast glutaminy powstaje kwas glutamohydroksamowy i podobnie jak w syntezie amidu proporcjonalnie do nowo powstałego produktu syntezy wydziela się nieorganiczny fosforan.  $\text{COOH-CHNH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COO-P} + \text{NH}_2\text{OH} \rightarrow \text{COOH-CHNH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CONHOH} + \text{H}_3\text{PO}_4$ . Produktem syntezy enzymatycznej jest fosforanowy  $\gamma$ -acyl kwasu glutaminowego, który z amoniakiem, hydroksyloaminą i hydrazyną tworzy odpowiednie wiązanie amidowe.

Kwas asparaginowy nie może zastąpić kwasu glutaminowego w reakcji i w wyżej opisanych warunkach nie powstaje asparagina lub kwas aspartohydroksamowy i ATP nie rozkłada się do ADP i nieorganicznego fosforanu.

W r. 1950 *Elliott* wykrył obecność podobnych systemów enzymatycznych w materiale roślinnym, a mianowicie w łubinie białym i niebieskim. *Denes* w r. 1952

wyizolował z łubinu enzym w stanie częściowo oczyszczonym i wyjaśnił mechanizm jego działania. Obecność enzymów katalizujących syntezę glutaminy wykazano również w bezkomórkowych ekstraktach gronkowca złocistego i w gnilnych bakteriach *Proteus vulgaris*. Wszystkie preparaty enzymatyczne niezależnie od tego, czy pochodzą z organizmów zwierzęcych, roślinnych lub drobnoustrojów, katalizują syntezę glutaminy tylko w obecności jonu Mg i ATP.

Większość uczonych przyjmuje niesłusznie do tej pory, że pierwszy i drugi etap syntezy glutaminy, a więc powstanie  $\gamma$ -glutamyloacyl fosforanu i reakcja wymiany z aminami katalizowane są przez systemy enzymatyczne. *Denes* i *Gazda* w laboratorium *Strauba* w Budapeszcie udowodnili niezbicie, że rozkład acylu w obecności amoniaku lub hydroksyloaminy przebiega spontanicznie w kilku minutach w czystych roztworach wymienionych substancji. *Denes* i *Gazda*, podobnie zresztą jak *Elliott* i *Speck*, nie zdołali wykryć  $\gamma$ -acylu w systemie enzym-substrat, przeprowadzili przeto syntezę acylu kwasu glutaminowego i na syntetycznym produkcie udowodnili jego nieenzymatyczny spontaniczny rozkład.

Mniej więcej w tym samym czasie, bo w r. 1948 *Braunstein* zademonstrował syntezę glutationu z 3 składowych aminokwasów trójpeptydu w obecności oddychającej tkanki wątroby szczura. Nieco później otrzymano bezkomórkowe ekstrakty enzymu z wątroby gołębia i stwierdzono, że ATP i jon Mg, podobnie jak w syntezie glutaminy, są niezbędne w syntezie glutationu.

Mechanizm syntezy glutationu nie jest jeszcze dostatecznie wyjaśniony i nie wiemy, czy kwas glutaminowy, cysteina i glicyna wchodzące w skład peptydu tworzą glutation w toku jednej reakcji, czy też powstają związki przejściowe, korzystające tylko z jednego wiązania fosforanowego bogatego w energię do syntezy dwupeptydu, który za pośrednictwem dalszego  $\sim$  P tworzy trójpeptyd glutationu. Ostatnie badania wykazują, że  $\gamma$ -glutamylocysteina jest pierwszym członem syntezy glutationu, który w dalszej reakcji fosforylacji łączy się z glicyną w obecności dodatkowego ATP.

Synteza glutationu wymaga ATP jako źródła energii. Homogenizaty wątrób gołębi, zawierające systemy enzymów katalizujących syntezę glutationu tracą bardzo szybko swoją aktywność nawet w temperaturze 0°. Po dodaniu gotowanych ekstraktów z wątrób gołębia lub drożdży pierwotna aktywność homogenizatu jest przywrócona. W poszukiwaniu kofaktorów katalizy okazało się, że inaktywacja i reaktywacja enzymów katalizujących syntezę glutationu zależy od produkcji ATP związanego z procesem glikolizy. *Yanari*, *Snoke* i *Bloch* w r. 1953 podają metody otrzymywania preparatów wątroby gołębia, które wykazują 50-krotnie zwiększoną aktywność katalizy syntezy glutationu z  $\gamma$ -glutamylocysteiny i glicyny w porównaniu z wyciągiem wątroby suszonej acetonem. W odróżnieniu od wyciągów nie oczyszczanych, preparaty te nie katalizują syntezy glutationu z wolnych aminokwasów, tj. kwasu glutaminowego, cysteiny i glicyny. Nieoczyszczone wyciągi tracą przeszło 80% swojej aktywności po upływie 6 godzin w temp. 0° lub po upływie 1,5 godziny w temperaturze 37°. Niektóre wyciągi wykazują bardzo niską wyjściową aktywność bezpośrednio po przygotowaniu ekstraktu. Wszystkie te mało aktywne albo nieaktywne preparaty odzyskują zdolność syntezy glutationu po dodaniu gotowanych ekstraktów wątroby gołębia. Wyciągi wątrób ssaków nie katalizują syntezy peptydu i dodanie kofaktorów w postaci czystych preparatów AMP, glutaminy, DPN, TPN, B<sub>12</sub>, trójglutaminianu pteroylu, fosforanu pirydoksalu i koenzymu A nie powoduje syntezy glutationu. Natomiast czyste preparaty glikogenu reaktywują nieczynne systemy enzymów i prawdopodobnie glikogen jest identyczny z kofaktorem wątroby gołębia, ponieważ wyciągi traktowane amylazą tracą właściwości aktywatora katalizy syntezy glutationu. Produkty przejściowe procesu glikolizy, jak heksozodwufosforany, kwas 3-fosfoglicerynowy i kwas pirogronowy zachowują się podobnie jak glikogen. Rola glikolizy nie polega jednak na produkcji dodatkowego ATP



w celu kompensacji jego strat na skutek czynności ATP-azy, która znajduje się w wyciągach wątroby gołębia w bardzo czynnej postaci; wpływ bowiem dużych nadmiarów ATP dostarczonego z zewnątrz jest minimalny w porównaniu z dodatkiem 100-krotnie mniejszej ilości ATP razem z kwasem 3-fosfoglicerynowym. Ponadto preparaty częściowo oczyszczone, które nie zawierają ATP-azy, reagują również wyraźnie na kwas fosfoglicerynowy. AMP w dużych nadmiarach nie hamuje katalizy, natomiast nawet małe ilości ADP hamują reakcję w 75 % w porównaniu z kontrolą bez dodatku ADP.

Podobnie jak przy syntezie glutaminy, syntezie glutationu towarzyszy rozkład ATP do ADP i nieorganicznego fosforanu. Rola kwasu fosfoglicerynowego nie polega więc na resyntezie ATP, ponieważ synteza glutationu jest niezależna od jego nadmiaru, polega ona natomiast na obniżeniu stężenia ADP w reakcji z kwasem fosfopirogronowym, który pod wpływem fosfokinazy przechodzi w enolową formę kwasu pirogronowego, przy czym ADP jest akceptorem reszty kwasu fosforowego. Regeneracja ATP uniemożliwia akumulację adenozyndwufosforanu, który jest inhibitorem syntezy glutationu. Dalsze obserwacje potwierdziły hamujący wpływ ADP na reakcję syntezy, bowiem inaktywacja i reaktywacja enzymatycznego systemu są dużo bardziej wyraźne w wyciągach nie oczyszczanych, a to ze względu na to, że w świeżych wyciągach ADP powstaje nie tylko w wyniku syntezy glutationu, lecz także przede wszystkim w wyniku rozkładu ATP przez ATP-azę. W porównaniu z wyciągami z wątrób gołębich, wyciągi wątrób ssaków są prawie nieczynne, mimo że ich zawartość glikogenu jest równie wysoka. Ekstrakty te mogą być aktywowane do poziomu ekstraktów wątrób gołębich, jeżeli systemowi enzym-substrat dostarczy się kwasu 3-fosfoglicerynowego. Ekstrakty wątrób ssaków suszonych acetonem wiodcznie nie zawierają w stanie czynnym enzymów katalizujących reakcje wcześniejszych etapów glikolizy. Glutation-fosfoferaza jest enzymem specyficznym i tylko glicyna z wszystkich aminokwasów powoduje ekwimolekularny rozkład ATP i wydzielanie nieorganicznego fosforanu. Fosforan powstaje natomiast podobnie jak w przypadku syntezy kwasu glutamohydroksamowego w obecności  $\gamma$ -glutamylcysteiny i hydroksyloaminy, a produktem syntezy jest kwas  $\gamma$ -glutamylcysteinhydroksamowy. Odszczepienie granicznego fosforanu z ATP jest jedynym źródłem energii w syntezie glutationu, ponieważ syntezie peptydu odpowiada równoważnik wydzielonego fosforanu i ponieważ żadne inne źródło energii nie może zastąpić ATP. Opisany enzym nie katalizuje hydrolizy glutationu do wolnych aminokwasów, ani nie katalizuje reakcji wymiany, jak wynika z doświadczeń w systemach zawierających glutation, glicynę z izotopowym C i ATP, ponieważ nie można było stwierdzić izotopowego C w peptydzie.

Enzymatyczna synteza glutaminy i glutationu wykazuje zdumiewające podobieństwo. W jednym i drugim wypadku ATP ulega rozszczepieniu do ADP i ortofosforanu. W jednym i drugim wypadku tylko jeden enzym katalizuje reakcję, przy czym jon Mg jest niezbędny w reakcji syntezy. Żaden z enzymów nie korzysta z kofaktorów, które ulegają odszczepieniu przy dializie. Ponadto obie fosfoferazy nie katalizują reakcji odwracalnej hydrolizy substratów i reakcji wymiany. Funkcje obu enzymów ograniczają się wyłącznie do reakcji syntezy. Jedyna różnica polega na tym, że synteza glutationu związana jest z procesem glikolizy, w którym ADP powstały w wyniku różnorodnych reakcji enzymatycznych ulega regeneracji do ATP, natomiast w syntezie glutaminy ADP nie jest czynnikiem hamującym reakcję.

Synteza glutationu jest do tej pory jedynym doświadczalnie potwierdzonym wzorcem powstawania wiązań peptydowych *de novo* z aminokwasów przy udziale wysokoenergetycznych związków fosforanowych. Mechanizm syntezy glutationu jest jedynym torem syntezy peptydów, bowiem enzymy proteolityczne w odpowiednich warunkach mogą również zastąpić jeden iminowy składnik aminokwasowy przez drugi i w ten sposób tworzyć nowe peptydy. Należy jednak zaznaczyć, że te reakcje

nie powiększają już wyjściowo istniejących ilości wiązań peptydowych, zamieniają one tylko składniki aminokwasowe peptydów albo kosztem jednego peptydu mogą przedłużyć peptydowy łańcuch drugiego.

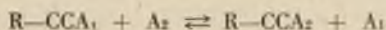
W ostatnich latach wykryto szereg systemów enzymów, które katalizują wymianę rodników asparaginylowych i glutamylowych amidów i glutationu z jednego aminokwasu na drugi bez udziału zewnętrznych źródeł energii. Reakcje te pozwalają przynajmniej hipotetycznie na włączenie amidów dwukarboksylowych aminokwasów i glutationu w mechanizm biosyntezy związków peptydowych. W r. 1949 *Waelsch* wykrył w bakteriach obecność enzymów katalizujących wymianę grupy amidowej asparaginy i glutaminy z hydroksylaminą i innymi aminami.



gdzie: R = rodnik asparaginylowy albo glutamylowy.

Enzymy te wykryte zostały w toku badań nad fosfoferazami bezkomórkowych ekstraktów bakterii *Proteus vulgaris*, które katalizują syntezę glutaminy z kwasu glutaminowego i amoniaku. Jak już wspomniano wyżej, enzymy te w obecności jonów Mg i ATP katalizują syntezę glutaminy lub kwasu glutamohydroksamowego, jeżeli hydroksyloamina zastąpi amoniak w reakcji z kwasem glutaminowym. Kiedy *Waelsch* zastąpił w powyższej reakcji kwas glutaminowy glutaminą, wówczas ilość wytworzonego kwasu hydroksamowego była trzykrotnie większa, przy czym jak *Waelsch* stwierdził później, reakcja ta jest niezależna od obecności ATP i jonów Mg. Identyczna ilość kwasu hydroksamowego powstaje w obecności zewnętrznych źródeł energii i jonów Mg, jak i przy nieobecności tych dwu czynników, które są niezbędne w katalizie syntezy kwasu hydroksamowego z kwasu glutaminowego i hydroksyloaminy. Nieorganiczne fosforany, jony Mg, fluorki i kwas jodooctowy nie hamują reakcji enzymatycznej, co dowodzi, że procesy glikolizy i fosforylacji nie są związane z czynnością transferazy.

W rok później wykryto podobne systemy enzymów w tkance roślinnej i zwierzęcej, a znaczenie tych reakcji przybrało na wadze, kiedy w roku 1950 wykryto enzym w nerkach ssaków, który katalizuje wymianę rodnika glutamylowego glutationu z innymi aminokwasami. W ten sposób ogólna reakcja wymiany transferaz została poważnie rozszerzona:

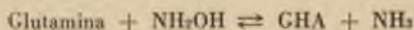


gdzie: R = rodnik asparaginylowy lub glutamylowy; A<sub>1</sub> = amoniak, aminokwas lub peptyd; A<sub>2</sub> = hydroksyloamina, amoniak, hydrazyna, aminokwas lub peptyd.

Jak wynika z równania, reakcja polega na enzymatycznej katalizie wymiany grupy asparaginylowej lub glutamylowej, a enzymy, które katalizują reakcję, nazywamy asparagino- lub glutamotransferazami [ATF, GTF(G) i GTF(glutation)].

Wymiana grupy amidowej asparaginy i glutaminy z hydroksyloaminą posiada olbrzymie teoretyczne znaczenie, a to z tego względu, że jeżeli w miejsce hydroksyloaminy wyobrazimy sobie aminokwasy, wówczas reakcja ta mogłaby dać początek syntezy  $\gamma$ -glutamyl- lub  $\beta$ -asparaginylo-peptydów, które drogą jeszcze niepoznanych reakcji mogą przekształcić się w normalne  $\alpha$ -peptydowe wiązania. Rzeczywiście wszystkie aminokwasy są w dużym stopniu inhibitorami glutamotransferazy i w słabszym stopniu asparagino-transferazy. Niestety próby wykrycia  $\gamma$ -glutamyl peptydów za pomocą rozdzielczej chromatografii bibułowej były negatywne, co jednak syntezy peptydów nie wyklucza, ponieważ obecność peptydaz w systemie może uniemożliwić wykrycie produktów przejściowych albo przemiana kwasu glutaminowego w kwas pirolidonkarboksylowy może być, niezbędnym warunkiem wymiany grupy amidowej z innymi aminokwasami. Amoniak i hydrazyna są również

inhibitorami syntezy kwasu hydroksamowego. Reakcja katalizy transferazami jest reakcją odwracalną, ponieważ kwas hydroksamowy w obecności enzymu ulega z amoniakiem wymianie do glutaminy i hydroksyloaminy, aczkolwiek równowaga reakcji ustala się znacznie na korzyść syntezy kwasu glutamohydroksamowego.



GTF jest enzymem specyficznym, ponieważ acetamid, benzamid, amid kwasu nikotynowego, glicylamid i inne nie tworzą z hydroksyloaminą odpowiednika kwasu hydroksamowego. Podobnie, podstawione związki kwasu glutaminowego w pozycji  $\gamma$ -karboksylowej lub  $\alpha$ -aminowej, jak  $\gamma$ -glutamylglutaminian, glicylglutamina lub glutaminyloglicyna również uniemożliwiają wykorzystanie glutaminy jako substraktu reakcji wymiany.

W odróżnieniu od enzymów pochodzenia mikrobiologicznego transferazy pochodzenia roślinnego są mało aktywne i nawet niedializowane wyciągi z dyni, wodorostów i brodawek roślin motylkowych są czynne dopiero w obecności jonów Mn i fosforanów. Dializowane wyciągi roślinne pozostają nieczynne nawet po dodaniu wymienionych kofaktorów i odzyskują swoją zdolność katalizy dopiero w obecności zewnętrznych źródeł energii jak ADP lub ATP. Ponieważ bardzo małe ilości ATP aktywują transferazy pochodzenia roślinnego, przeto przyjmuje się, że fosforany adenozyliny są raczej kofaktorem aniżeli substratem reakcji. Podobnie transferazy pochodzenia zwierzęcego katalizują tylko w obecności jonu Mn i ATP, który może być zastąpiony przez koenzym A.

W tkance organizmów roślinnych i zwierzęcych nie wykryto asparginotransferazy, mimo że udział asparaginy w przemianie związków azotowych w roślinach jest jednym z najbardziej dominujących czynników. Prof. *Straub* w referacie w PAN w Warszawie w kwietniu r. 1953 wygłosił przypuszczenie oparte na jeszcze nie ogłoszonych wynikach, że amidowa grupa glutaminy może być enzymatycznie przeniesiona na asparaginę i *vice versa*. Fakt ten może wytłumaczyć nie tylko nieobecność ATF, lecz również akumulację asparaginy w materiale roślinnym.

W pracy ogłoszonej w roku 1953, *Elliott* podaje metodę otrzymania oczyszczonych preparatów glutamoferyzy i glutamotransferazy o katalitycznej aktywności około 2000 razy większej od wyjściowego materiału nasion zielonego grochu. Ponieważ stosunek enzymów otrzymanych z grochu mimo oczyszczania pozostawał przez cały okres frakcjonowania prawie niezmienny i ponieważ nie udało się odseparować jednego enzymu od drugiego, *Elliott* wysunął nowe i raczej zdumiewające pytanie, a mianowicie, czy czynność syntezy i wymiany jest funkcją jednego i tego samego enzymu, czy też są to enzymy odrębne o bardzo podobnych właściwościach fizycznych. Wprawdzie fosfoferaza jest maksymalnie aktywowana w obecności jonu Mg, a w mniejszym stopniu jonu Mn, a transferaza na odwrót, wprawdzie istnieją pewne różnice ilościowe w aktywacji cysteiną i w hamowaniu fluorkiem w odniesieniu do katalizy syntezy i wymiany, niemniej jednak *Elliott* pozostawia otwartą kwestię tożsamości lub odrębności.

Badania nad katalizą przez glutamylotransferazę reakcji wymiany rodnika glutamylowego z innymi aminokwasami dały już poważniejsze wyniki. Homogenizaty nerek owiec i świń w obecności jonów Mg, glutationu i innych aminokwasów poddane po odbiłączeniu rozdzielczej chromatografii bibułowej, wykazały plamy, które mogą odpowiadać  $\gamma$ -glutamyl-pochodnym leucyny, waliny i fenyłalaniny. System glutamo-transferazy katalizujący transport rodnika glutamylowego z glutationu na inne aminokwasy jest tylko jedną z funkcji tego układu. Ten sam enzym przenosi rodnik glutamylowy również z  $\gamma$ -glutamylglicyny na inne aminokwasy. Ponadto  $\gamma$ -glutamylglicyna ulega w obecności enzymu podwójnej wymianie do glutamylglutaminy i glicylglicyny, co dowodzi, że rodnik glutamylowy wielu  $\gamma$ -glutamylpeptydów może być wymieniony z różnymi aminokwasami,

Transferazy, które katalizują wymianę rodnika glutamyłowego glutationu są prawdopodobnie identyczne z enzymami, które katalizują rozkład glutationu do kwasu pirolidonkarboksylowego i cysteinyłglicyny i są odpowiednikami glutamo-transferazy glutaminy. Natomiast enzym katalizujący rozkład glutationu do kwasu glutaminowego i dwupeptydu stanowi odrębny system i może być uznany jako odpowiednik glutaminazy. Jak wiadomo, nieenzymatyczna „hydroliza“ glutaminy w pH 6,5—7 prowadzi do amoniaku i kwasu pirolidonkarboksylowego w odróżnieniu od wszystkich do tej pory znanych reakcji hydrolizy enzymatycznej, w której wyniku powstaje zawsze kwas glutaminowy, nigdy zaś jego bezwodnik. Zjawisko to tłumaczy dotychczasowe niepowodzenia wykrycia wymiany rodnika glutamyłowego glutaminy z innymi aminokwasami ze względu na brak pośrednictwa aktywnego kwasu pirolidonkarboksylowego. W związku z tym powstaje pytanie, czy asparagino-transferaza i glutamotransferaza glutaminy biorą w ogóle jakikolwiek czynny udział w biologicznej syntezie peptydów i czy ich obecność rozszerzonej roli nie należałoby ograniczyć do magazynowania i transportu rezerw ketokwasów i amoniaku z dodatkiem hydroksyloaminy w postaci kwasów hydroksamowych. Bardzo interesująca jest obserwacja dużej aktywności tranferaz w brodawkach roślin motylkowych, w których przemiana związków azotu przebiega właśnie przez przejściową syntezę hydroksyloaminy. Z drugiej strony obecność bardzo czynnych transferaz w kiełkach roślin wyższych pozostałaby w tym naświetleniu bez wytłumaczenia.

Zagadnienie amidów w reakcjach wymiany i syntezie związków peptydowych i ich udział w procesach biosyntezy w obecności transferaz zostało wyraźnie postawione dopiero w badaniach ostatnich kilku lat. Pierwsze kroki w wyjaśnieniu mechanizmu reakcji wymiany zostały uwieńczone sukcesem i wykazanie udziału związków fosforanowych bogatych w energię w syntezie glutaminy i glutationu stanowią doniosłą zdobycz postępu nauk biochemicznych. Wykazano, że ATP bierze udział w syntezie amidowych wiązań peptydowych dwukarboksylowych aminokwasów i peptydów w stosunku stechiometrycznym i że produktem przejściowym jest acyl fosforanowy, który drogą nieenzymatyczną ulega rozkładowi i stanowi źródło energii dla nowych wiązań amido-peptydowych przy wydzieleniu odpowiedniej ilości nieorganicznego fosforanu. Nowo powstałe wiązania amido-peptydowe mogą drogą katalizy enzymatycznej wymieniać swoje podstawione grupy aminowe i ta wymiana, np. rodnika glutamyłowego, jest podstawą syntezy  $\gamma$ -glutamylamidów o różnej długości łańcucha peptydowego. W ten sposób przez wykorzystanie energii wiązań amido-peptydowych mogą zachodzić reakcje syntezy drogą enzymatyczną katalizy reakcji wymiany.

Dalsze kroki syntezy peptydów nie zostały doświadczalnie potwierdzone. Powstawanie normalnych wiązań  $\alpha$ -peptydowych z  $\gamma$ -glutamyl peptydów można sobie wyobrazić w sposób następujący.

I:  $\gamma$ -glutamyl-aminokwas A +  $\gamma$ -glutamyl-aminokwas B  $\rightarrow$   $\gamma$ -glutamyl-aminokwas A — aminokwas B + kwas glutaminowy wg tego schematu synteza glutationu mogłaby dokonać się na zasadzie następującej reakcji:  $\gamma$ -glutamylcysteina +  $\gamma$ -glutamylglicyna  $\rightarrow$   $\gamma$ -glutamylcysteinylglicyna + kwas glutaminowy, albo:

II.  $\gamma$ -glutamyl-aminokwas A + aminokwas B  $\rightarrow$  aminokwas B aminokwas A + kwas glutaminowy.

Przez wtórne usunięcie glutamyłowej części trójpeptydu powstaje wg schematu I normalny dwupeptyd aminokwasów AB. Schemat II obrazuje powstawanie dwupeptydów o odwróconej kolejności aminokwasów. W reakcji z dalszą cząsteczką  $\gamma$ -glutamyl-peptydu łańcuch peptydowy może być dowolnie przedłużony podobnie jak w wypadku transglukozydacji syntezy polisacharydów z dwucukrowców.

Kolejność reakcji od syntezy amidów do syntezy peptydów można hipotetycznie ująć w ramach następujących czynności: 1) udział ATP w powstawaniu pierwszego

amido-peptydowego wiązania amidów, 2) wymiana rodników dwukarboksylowych aminokwasów z innymi aminami, 3) przekształcenie  $\gamma$ -glutamylowego peptydu w  $\alpha$ -peptyd i 4) reakcje wymiany, które prowadzą do przedłużenia łańcucha peptydowego. Reakcje 1 i 2 są w dużym stopniu doświadczalnie potwierdzone. Bezpośredni udział ATP w syntezie glutaminy i glutationu jest udowodniony, przy czym mechanizm syntezy asparaginy jest jeszcze nie wyjaśniony. Asparagina i glutamina katalizowane przez transferazy biorą udział w reakcjach syntezy, korzystając z energii wiązań amido-peptydowych, aczkolwiek wymiany grup amidowych z aminokwasami nie zdołano potwierdzić. Szczegółowy mechanizm syntezy glutationu również pozostaje do wyjaśnienia, bowiem nie wiadomo jeszcze, czy jako produkt przejściowy powstaje acyl fosforanowy podobnie jak w syntezie glutaminy, czy też produkty przejściowe nie związane są z udziałem wiązań fosforanowych bogatych w energię. Wiązania peptydowe mogą powstawać drogą wymiany z innymi peptydami i udziałem proteinaz w reakcjach wymiany prowadzących do syntezy peptydów i białek pozostaje nadal podstawowym wzorcem syntezy, w którym pośredni udział wymiany katalizowanej przez transferazy w obecności wysokoenergetycznych fosforanów mógłby rozszerzyć możliwości powstawania specyficznych białek.

Ścisły związek między asparaginą, glutaminą i glutationem a syntezą białek, możliwość roli amidów i glutationu jako substancji zapoczątkowujących syntezę peptydów znacznie rozszerza i pogłębia znaczenie dwukarboksylowych aminokwasów w przemianie związków azotowych. Badania ostatnich lat wskazują drogę, na której hipoteza ta może znaleźć swoje pełne doświadczalne potwierdzenie.

#### PIŚMIENNICTWO

- Archibald R. M.*: J. Biol. Chem., 1944, 154, 643. — *Behrens O. K.* i *Bergmann M.*: J. Biol. Chem., 1939, 129, 587. — *Bergmann M.*: Advances in Enzymology, 1942, t. II 49. — *Bergmann M.* i *Fru-ton J. S.*: Advances in Enzymology, 1941, t. II 63. — *Borsook H.* i *Dub-noff J. W.*: J. Biol. Chem., 1947, 168, 397. — *Braunsztejn A. E.*: Advances in Protein Chem., 1947, t. III 1. — *Braunsztejn A. E.*, *Szamszikowa G. A.* i *Jiffe A. L.*: Biochimia, 1948, 43, 95. — *Chibnall A. C.*: Protein Metabolism in the Plant, 1939 — *Chibnall A. C.* i *Rees M. W.*: Biochem. J., 1951, 48, XLVII. — *Denes G.* i *Gazda Z. S.*: Acta Phys. Acad. Scj. Hung., 1953, t. IV 1. — *Elliott W. H.*: Bioch. J., 1951, 49, 1. — *Elliott W. H.* i *Gale E. F.*: Nature, 1948, 161, 129. — *Greenstein J. P.* i *Carter C. E.*: J. Natl. Cancer Inst., 1946, 7, 57. — *Greenstein J. P.* i *Price V. E.*: J. Biol. Chem., 1949, 178, 695. — *Grossowicz* i inni: J. Biol. Chem., 1950, 187, 1. — *Hac L. R.* i *Snell E. E.*: J. Biol. Chem., 1945, 159, 291. — *Hac L. R.*, *Snell E. E.* i *Williams R. J.*: J. Biol. Chem., 1945, 159, 273. — *Hamilton P. B.*: J. Biol. Chem., 1945, 158, 397. — *Hanes C. S.*, *Hird F. R. J.* i *Isherwood F. A.*: Nature, 1950, 166, 288. — *Hanes C. S.*: Brit. Med. Bull., 1953, t. 9, nr 2, 131.
- Krebs H. A.*: Bioch. J., 1935, 29, 1951. — *Krebs A. H.*: Bioch. J., 1948, 43, 51. — *Krebs H. A.*: Bioch. J., 1950, 47, 605. — *Lipmann F.*: J. Biol. Chem., 1945, 160, 173. — *Lipmann F.*: Advances in Enzymology, 1946, t. VI, 231. — *Lipmann F.* i *Tuttle L. C.*: J. Biol. Chem., 1945, 159, 21. — *Lyman C. M.*, *Kuiken H. A.*, *Blotter* i *Hale F.*: J. Biol. Chem., 1945, 157, 395. — *Meister A.* i *Tice S. V.*: J. Biol. Chem., 1950, 187, 173. — *Miller H. K.* i *Waelsch H.*: Nature, 1952, 168, 30. — *Mothes K.*: Planta, 1940, 30, 726. — *Snoke J. E.*, *Yanari S.* i *Bloch K.*: J. Biol. Chem., 1953, 201, 573. — *Speck J. F.*: J. Biol. Chem., 1949, 179, 1405. — *Speck J. F.*: J. Biol. Chem., 1949, 179, 1387. — *Steward F. C.*: Ann. Rev. Biochem., 1947, 16, 161. — *Street H. E.*: Advances in Enzymology, 1949, t. IX, 391. — *Vickery H. B.*, *Pucher G. W.*, *Clark H. E.*, *Chibnall A. C.* i *Westall R. G.*: Biochem. J., 1935, 29, 2710. — *Waelsch H.*: Lancet, 1949, July 2. — *Waelsch H.*: Advances in Protein Chem., 1951, t. VI, 299. — *Waelsch H.* i *Rittenberg D.*: J. Biol. Chem., 1941, 139, 761. — *Waelsch H.* i *Rittenberg D.*: J. Biol. Chem., 1942, 144, 1. — *Waelsch H.*: Advances in Enzymology, 1952, t. XIII, 237. — *Wright L. D.* i *Skeggs H. R.*: J. Bact., 1944, 48, 117. — *Yanari S.*, *Snoke J. E.* i *Bloch K.*: J. Biol. Chem., 1953, 201, 561.

JERZY MEDUSKI

## REAKCJE TRANSAMINACJI W ROŚLINACH

Wstęp. Kiedy przeglądamy dorobek biochemii w zakresie biogenezy aminokwasów, gromadzony w ciągu trzydziestu paru lat poprzedzających odkrycie reakcji określanych dzisiaj jako przeaminowanie, transaminacja, nie trudno nam dostrzec, że odkrycie to było pięknym ukoronowaniem systematycznie zbieranych faktów i formułowanych uogólnień. W przypadku badań nad zwierzętami szereg kierunków eksperymentalnych potwierdził tworzenie prawie wszystkich — z wyjątkiem lizyny — aminokwasów z odpowiednich ketokwasów. Należy wspomnieć tutaj: 1) wyniki poddawania w diecie zamiast niezbędnych dla wzrostu badanego ustroju zwierzęcego aminokwasów, odpowiadających im budową ketokwasów, 2) otrzymywanie w moczu badanych zwierząt aminokwasów nie występujących w przyrodzie, wtedy gdy zwierzętom tym podawano odpowiednie ketokwasy, 3) otrzymywanie podczas perfundowania wątroby albo w czasie inkubowania skrawków wątrobowych *in vitro* z mieszaniny amoniaku i ketokwasu — odpowiedniego aminokwasu.

Odpowiednich doświadczeń nad ustrojami roślinnymi było — o ile wiem — mniej. Za tło odkrycia transaminacji w ustrojach roślinnych można by dziś uważać stare doświadczenia *Bartholda Hansteena* (1899). Badacz ten hodował rośliny na pożywkach płynnych zawierających cukier i rozmaite związki azotowe. Otrzymywał on w niektórych przypadkach takich zestawień wzmoczenie syntezy białek badanej rośliny. Przede wszystkim należy tu jednak wymienić wnikliwie przedyskutowane przez *Chibnalla* w klasycznej książce „Metabolizm białek w roślinie“ (1939, polskie wydanie, 1952) wyniki badań *Pfeffera*, *Schulzego* i *Borodina* nad rolą asparaginy i glutaminy w przemianie białkowej roślin.

Przegląd dotychczasowego dorobku biochemii ujawnił lukę w pojęciach dotyczących przemiany pośredniej aminokwasów. Na niejasności istniejące tutaj zwróciła np. uwagę *Dorothy M. Needham* (1930) stwierdzając — po dodaniu do preparatu mięśnia piersiowego gołębia kwasów glutaminowego i asparaginowego — znikanie tych metabolitów, czemu nie towarzyszyło znikanie azotu aminowego. Badaczka ta zwróciła z kolei uwagę na azot mocznikowy i amoniak i nie stwierdziła ich wzrostu. Zaobserwowała natomiast wzrost kwasu bursztynowego. Obserwacje swe *Needham* ujęła w takie sformułowanie: „Prawdopodobnie zachodzi tu połączenie grupy aminowej z jakimś czynnym rodnikiem węglowodanowym; gdy zachodzi następnie rozpad i utlenienie, grupa aminowa jest zatrzymywana w postaci nowego aminokwasu“. Jaki układ reakcji stoi u podstawy zaobserwowanych faktów, na to *Needham* odpowiedzieć nie umiała. W latach 1936 i 1937 *Szent-Györgyi* opublikował szereg faktów wskazujących na to, iż miał do czynienia w badanym przez siebie materiale z transaminacjami, których wówczas nie uważał za nieznaną dotąd typ bioreakcji. Badacz ten stwierdzał zwiększenie szybkości rozpadu kwasu

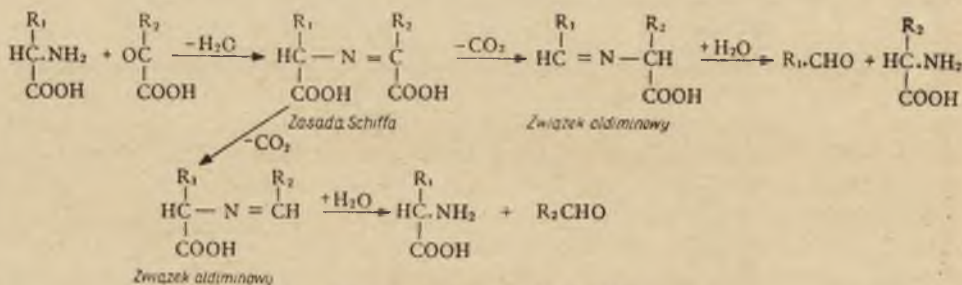
szczawiowo-octowego w mięśniu piersiowym gołębia i preparatach enzymatycznych tego mięśnia pod wpływem dodawania do układu kwasu glutaminowego.

Odkrycie transaminacji enzymatycznej. Zasługa odkrycia transaminacji przypada badaczom radzieckim *Braunsteinowi* i *Kritzmann*, którzy w r. 1937 wykazali na takim samym obiekcie doświadczalnym, jakiego używał *Szent-Györgyi*, tj. w mięśniu piersiowym gołębia, istnienie reakcji nazwanej *Umaminierung* — „przeaminowanie“. Badali oni układ: 1 (+) — kwas glutaminowy + kwas pirogronowy = kwas alfa-ketoglutazarowy + 1 (+) — alanina.

Dokonywane w trzy lata później badania *Vickery* i współpracowników (1940) oraz *Hevesy* i towarzyszy (1940) wskazały wyraźnie na konieczność przyjęcia w tkankach roślinnych mechanizmu szybkiej wymiany grup aminowych, przy współdziałaniu w tym procesie — jako związków o podstawowym znaczeniu — aminokwasów dwukarboksylowych. Pierwsi z tych badaczy dodawali do pożywki tytoniowi izotopowy chlorek amonu i analizując hydrolizaty białek tkanki badanej rośliny wykazywali, że kwasy glutaminowy i asparaginowy zawierają znamienne więcej N<sup>15</sup> niż inne aminokwasy. Drudzy ze wspomnianych badaczy, badacze duńscy, wykonując doświadczenia nad słonecznikiem otrzymali takie same wyniki.

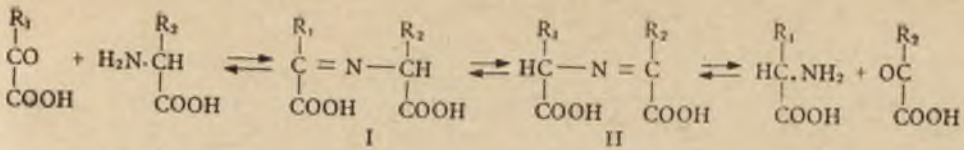
Oba zespoły jednak nie sformułowały wyraźnie, jakie czynności biochemiczne kryją się za zaobserwowanymi faktami. Gdy przyszło do pierwszego przedstawienia przebiegu transaminacji enzymatycznej, biochemia zwróciła się do chemii organicznej o przykłady reakcji polegającej na wymianie grup aminowych. Potrzebnej modelowej reakcji jednak wtedy nie znaleziono. Chemia organiczna знаła od dawna dezaminację aminokwasów przez związki zawierające grupę karbonylową. Przykłady takich reakcji organicznych zestawia *Herbst* (1944) w swym opracowaniu monograficznym reakcji transaminacji i *Braunstein* w przeglądowym referacie poświęconym transaminacji (1947). Przykładami takimi są: reakcja aminokwasów z allokсанem, o-chinonami, izatyną, ninhydryną, metyloglioksalenem itp. We wszystkich tych reakcjach z wyjątkiem ninhydryny azot alfa-aminowy uwalniany jest jako amoniak. W przypadku ninhydryny tworzony pierwotnie amoniak ulega dalszej reakcji z odczynnikami.

W reakcjach tych zazwyczaj dochodzi do powiązania dezaminacji z dekarboksylacją aminokwasu. Jako stadia pośrednie przyjmuje się tutaj utworzenie zasady Schiffa i przekształcenie tautomeryczne tej zasady. Modelu odpowiedniego dla wytłumaczenia transaminacji biologicznych ówczesna chemia organiczna nie знаła. Dopiero w r. 1934 *Herbst* i *Engel* odkryli następującą niebiologiczną transaminację: fenyloglicyna + kwas pirogronowy → alanina + benzaldehyd + CO<sub>2</sub>. Reakcja ta przedstawiona jest na schemacie 1.



Schemat 1. Wg *Herbsta*, 1944.

W przedstawieniu odkrytej przez siebie transaminacji *Braunstein* i *Kritzmann* wzorowali się na modelu *Herbsta* (schemat 2).



Schemat 2. Wg *Braunsteina i Kritzmanna, 1937*. Stadium katalizowanym enzymatycznie jest odwracalna zmiana prototropowa („wewnątrzcząsteczkowa oksydo-redukcja“) w układzie metylen-azometyna (wzajemne przekształcenie zasad Schiffa I i II).

Zgodnie z przedstawieniem w tym schemacie uważano, iż stadium katalizowanym enzymatycznie jest odwracalna zmiana prototropowa w moście metylen — azometyna, W ślad za odkryciem pierwszej transaminacji enzymatycznej odkryto dwie następujące:

Kwas glutaminowy + kwas szczawiowo-octowy  $\rightleftharpoons$  kwas asparaginowy + kwas alfa-ketoglutazarowy.

Kwas asparaginowy + kwas pirogronowy  $\rightleftharpoons$  alanina + kwas szczawiowo-octowy.

Ówczesna biochemia określała transaminację enzymatyczną jako reakcję między alfa-aminokwasem i alfa-ketokwasem, w wyniku której dochodzi do przeniesienia grupy aminowej z pierwszego kwasu na drugi. Produktami końcowymi transaminacji enzymatycznej jest alfa-aminokwas i alfa-ketokwas, z których pierwszy odpowiada w budowie pierwotnemu alfa-ketokwasowi, a drugi budowie pierwotnego alfa-aminokwasu.

**Terminologia transaminacji.** Wiele nieporozumień między różnymi szkołami biochemicznymi, zajmującymi się zagadnieniem transaminacji, spowodowały różnice terminologiczne. Ustalenie jednoznacznej terminologii jest tutaj sprawą szczególnej wagi. Badacze radzieccy nazwali enzymy zawiadujące reakcjami transaminacji „aminoferazami“. Amerykańska szkoła biochemiczna, tłumacząc niemiecką nazwę z pierwszej zachodniej publikacji radzieckich badaczy *Umaminierung* — na „transamination“, użyła dla katalizującego tę reakcję enzymu pochodnej nazwy „transaminaza“, zgodnej z ogólnym określeniem „transreakcje“ (transmetylacje, transfosforylacje, transimiacje, transulfuracje itp.). W referacie tym posługiwali się będą zgodnie z *Marchlewskim i Skarżyńskim* (Chemia Fizjologiczna, t. II, s. 251) określeniami: transaminaza, czynność transaminatyczna, reakcja transaminacji. Dla bliższego określenia transaminaz badacze amerykańscy używają dwóch przymiotników, z których pierwszy określa wyjściowy aminokwas, a drugi wyjściowy ketokwas. Dla bliższego określenia transaminaz posługiwali się będą określeniami badaczy radzieckich — dwoma przymiotnikami, z których pierwszy odnosi się do aminokwasu wyjściowego, a drugi do aminokwasu tworzony w czasie bioreakcji. Zgodnie z tym nazwy najdawniej znanych transaminaz będą brzmiały: transaminaza glutaminowo-asparaginowa, transaminaza asparaginowo-alaninowa oraz transaminaza glutaminowo-alaninowa. Ograniczenie dokładniejszej nazwy transaminazy do jednego przymiotnika określającego wyjściowy aminokwas nie wydaje mi się (zgodnie z *Terroinem, 1952, s. 125*) właściwe.

Przy zestawieniu piśmiennictwa biochemicznego dotyczącego transaminaz, należy zwrócić uwagę na oboczności w określeniu szybkości przebiegu reakcji transaminacji.

Iloraz transaminacji, którym wyrażamy szybkość tej bioreakcji, określa się rozmaicie:

$$1) Q_{\text{transaminacji}} = \frac{\text{mikrolitry substratu transaminowanego}}{(\text{mg suchej masy tkanki}) \times (\text{godziny})}$$



$$2) Q_{TN} = \frac{\text{mikrolitry substratu transaminowanego}}{\text{mg N} \times \text{godziny}}$$

$$3) Q_T(N) = \frac{\text{mikromole substratu transaminowanego}}{\text{mg N} \times \text{godziny}}$$

Zwracam tu uwagę na częste stosowanie dla niegazowych substratów jednostki miary „mikrolitr“. Powstała ona z wyrażenia: jeden mikromol = 22,4 mikrolitry.

Transaminacje niebiologiczne a enzymatyczne. Obecnie, w kilkanaście lat po odkryciu transaminacji enzymatycznych, znamy już dość dokładnie różnice między nimi a transaminacjami niebiologicznymi oraz potrafimy na podstawie dotychczasowych wyników badań, prowadzonych głównie przez radziecką szkołę *Braunsteina* i jego współpracowników, sformułować dość dokładnie pogląd na mechanizm transaminacji i rolę transaminacji biologicznych w przemianie pośredniej aminokwasów w ustrojach żywych, a wśród nich, choć w skromniejszej mierze, w ustrojach roślinnych.

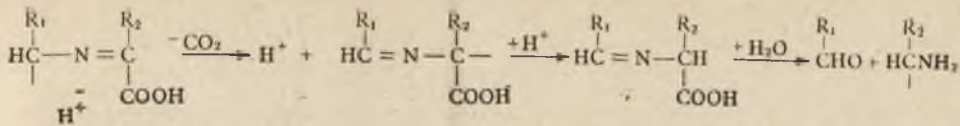
Poniżej przytoczę zestawienie *Braunsteina* właściwości transaminacji niebiologicznych i właściwości transaminacji enzymatycznych. Zestawienie w tej postaci zostało przedstawione przez *Braunsteina* w r. 1947 w monografii pod tytułem: „Transamination and the integrative functions of the dicarboxylic acids in nitrogen metabolism“. Różni się ono nieco od zestawienia tegoż autora na s. 70 i 71 książki „Biochimija aminokisłotnego obmienu“ wyd. 1949.

#### Transaminacje niebiologiczne

1. Odbywają się w temp. wrzenia jako reakcja niekatalizowana.
2. Przebiegają najszybciej w roztworze kwaśnym. Zahamowane całkowicie w odczynie obojętnym lub zasadowym.
3. Są nieodwracalne na skutek dekarboksylacji aminokwasu.
4. Zmiana elektromeryczna zachodzi ze stratą elektronu ze zjonizowanej grupy karboksylowej aminokwasu. Nie naładowana grupa COO jest oddzielona jako CO<sub>2</sub>. Wodór alfa pierwotnego aminokwasu zatrzymany jest w powstałym aldehydzie. Na pozycję alfa nowoutworzonego aminokwasu wchodzi jon wodorowy wodnego środowiska (p. schemat 3).
5. Reakcja nie jest swoista, jeśli chodzi o konfigurację wchodzącego w reakcję aminokwasu, nawet gdy wyjściowym aminokwasem jest optycznie czynny związek; w wyniku reakcji otrzymuje się racemiczny nowoutworzony aminokwas.
6. Kwasy monokarboksylowe reagują łatwiej niż dwukarboksylowe. Cystyna i aromatyczne aminokwasy są transaminowane najłatwiej.
7. Azot aminowy może być przeniesiony na kwasy alfa-ketoacyloaminowe z utworzeniem peptydów.

#### Transaminacje enzymatyczne

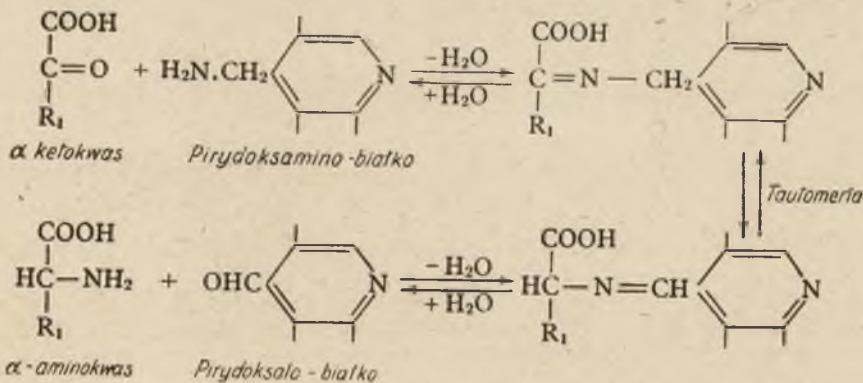
1. Są reakcjami katalizowanymi enzymatycznie. Odbywają się szybko, w niskiej temperaturze.
2. Optymalne pH: 7,4. Całkowite zahamowanie poniżej pH 3,5 i powyżej pH 9,5.
3. Całkowicie odwracalne. Dekarboksylacja się nie odbywa.
4. Zmiana elektromeryczna zachodzi ze stratą elektronu z alfa-atomu węgla aminokwasu po oddysocjowaniu uchwiejonego wodoru alfa jako jonu wodorowego. Na pozycję alfa nowoutworzonego aminokwasu wchodzi jon wodorowy wodnego środowiska.
5. Reakcja jest stereochemicznie asymetryczna. Wyjściowy aminokwas musi należeć do serii 1. Utworzony aminokwas ma tę samą konfigurację.
6. Jednym z początkowych substratów musi być kwas dwuzasadowy. Reakcja osiąga największą szybkość z substratami dwukarboksylowymi. Aminokwasy aromatyczne, kwasy dwuaminowe, cystyna i kwasy hydroksyaminowe nie reagują.
7. Na podstawie posiadanych wiadomości przypuszcza się, że peptydy i kwasy alfa-ketoacyloaminowe nie są czynne w transaminacji enzymatycznej.



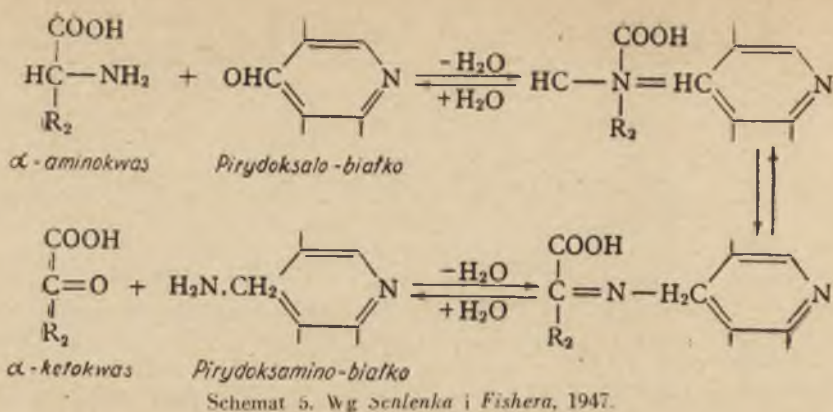
Schemat 3. Przebieg zmiany elektromerycznej w transaminacji niebiologicznej (wg Braunsteina, 1947).

Koenzym transaminaz. Już badania *Kritzmann* z r. 1940 wykazały, że oczyszczanie transaminaz przez adsorpcję, wysalanie czy dializę prowadzi do zaniku czynności enzymatycznej. Odtworzenie czynności enzymatycznej następowało po dodaniu gotowanego wyciągu mięśnia sercowego świni. Wnioskiem: czynność transaminatyczna zachodzi przy obecności ciepłostalego, posiadającego niewielki ciężar cząsteczkowy koenzymu. W r. 1943 *Braunstein* i *Kritzmann* sporządzali koncentraty kotransaminazy asparaginowo-alaninowej z gotowanego wyciągu mięśnia sercowego. Badacze ci usuwali substancje nieaktywne octanem ołowiu, octanem rtęciowym i azotanem srebra w odczynie słabokwaśnym. Następnie strącaniem solami srebra w środowisku zasadowym wyosabniali frakcję czynną, którą po dodaniu siarkowodoru stężali w próżni. 0,001 ml tak przygotowanego koncentratu miało czynność mniej więcej 1 ml wyjściowego gotowanego wyciągu mięśnia sercowego.

Dalszy postęp w badaniach nad koenzymem transaminacji zawdzięczamy badaczom amerykańskim *Schlenkowi* i *Snellowi* (1945), którzy stwierdzili po raz pierwszy, że tkanki ubogie w pirydoksynę okazują niską czynność transaminatyczną. W przypadku *Streptococcus faecalis* okazało się (*Lichtstein, Gunsalus i Umbreit*, 1945), że koenzymem transaminazy jest fosforan pirydoksalu. Wyniki innych badań potwierdzały również rolę pirydoksalu jako koenzymu transaminaz. *Schlenk* i *Fisher* np. donieśli, że oczyszczone preparaty transaminazy zawierają witaminę B<sub>6</sub> (1945). Ponadto opierając się na ciekawej obserwacji *Snella*, że ogrzewanie pirydoksalu z kwasem glutaminowym prowadzi do tworzenia pirydoksaminy i kwasu alfa-ketoglutazarowego, co jest reakcją odwracalną (*Snell*, 1945), ci sami badacze zaproponowali schemat reakcji transaminatycznej (1947), zgodnie z którym pośrednim dawcą grup aminowych jest pirydoksamina (p. schemat 4 i 5). W schemacie tym idąc od alfa-ketokwasu (schemat 4) za pomocą pirydoksaminy związanej z białkiem (transaminazy) dochodzimy do odpowiedniego aminokwasu, przy czym pirydoksamina przekształca się w pirydoksal. Jeśli natomiast związkciem wyjściowym jest alfa-aminokwas (schemat 5), to w wyniku reakcji za pomocą piry-

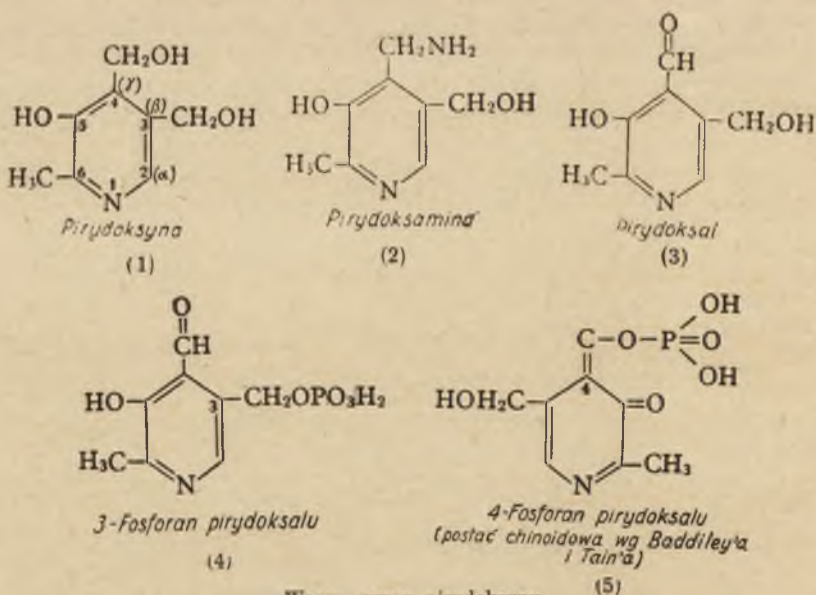


Schemat 4. Wg Schlenka i Fishera, 1947.



doksalu przekształcającego się w pirydoksaminy dochodzimy do odpowiedniego alfa-ketokwasu.

Dane doświadczalne uzyskiwane po opublikowaniu schematu *Schlenka i Fishera* zdawały się początkowo bez zastrzeżeń potwierdzać ten schemat. Nieco później spostrzeżono fakty, które nasuwały pewne wątpliwości. Za sprawę ustaloną jednak uważano występowanie fosforanu pirydoksaminy w przyrodzie oraz to, że fosforan ten posiada określoną czynność biologiczną. Brano tutaj pod uwagę możliwość, że fosforan pirydoksaminy osiąga swe właściwości biologiczne dopiero po przekształceniu go przez dany ustroj w fosforan pirydoksalu (*Gunsalus*, 1950). Właśnie w fosforanie pirydoksalu zaczęto coraz powszechniej dopatrywać się postaci, w której pirydoksal czynny jest jako kotransaminaza. Po wynikach badań przeprowadzonych przez *O'Kane i Gunsalusa* (1947) brano pod uwagę możliwość, że pirydoksal pełni w ustroju nie jedną czynność koenzymatyczną, lecz kilka takich czynności, będąc np. kodekarboksylazą aminokwasową.



Wzory grupy pirydoksyny

Poddano dokładnym badaniom strukturę fosforanu pirydoksalu dla ustalenia pozycji, którą zajmuje w związku grupa fosforanowa. Istniały tu już od r. 1947 rozbieżne zdania. *Karrer* i *Viscontini* twierdzili, że grupa fosforanowa fosforanu pirydoksalu znajduje się w pozycji 3. *Gunsalus* i *Umbreit* natomiast podali w wątpliwość wyniki badań *Karrera* i *Viscontini*. Porównali bowiem 3-fosforan pirydoksalu otrzymany od badaczy szwajcarskich z preparatem własnym, o którym wiadano, że grupa fosforanowa na pewno nie znajduje się w pozycji 3; w wyniku stwierdzili, iż czynność koenzymatyczna ich preparatu jest do 3000 razy większa od czynności koenzymatycznej 3-fosforanu pirydoksalu. Po opublikowaniu tych sprzecznych danych w wielu laboratoriach podjęto badania nad wyjaśnieniem położenia grupy fosforanowej w fosforanie pirydoksalu. Jedną z takich prac jest publikacja *J. Baddileya* i *E. M. Taina* (1951), którzy stwierdzili, że wymyte zawiesiny pałeczki kwasu mlekowego zabarwiały się w czasie syntezy fosforanu pirydoksalu o nieoznaczonej strukturze (=kodekarboksylazy) na kolor żółty, bardziej żółty niż równocząsteczkowe roztwory pirydoksalu. Badacze angielscy w świetle tych danych przyjmowali dla fosforanu pirydoksalu strukturę chinoidową (wzór 5), która tłumaczy fakt występowania ciemnożółtego zabarwienia, brak reakcji na fenole i obecność reakcji na ketony w badanym przez nich preparacie fosforanu pirydoksalu. Nie należy sądzić, że prace *Baddileya* i *Taina* są ostatnim słowem w tej sprawie. Ogólnie biorąc jednak, na podstawie ostatnich badań przeprowadzonych w latach 1952 i 1953 przez *Braunsteina*, *Szemiakina* i współpracowników przyjmujemy dzisiaj udział pirydoksalobiałek w przebiegu reakcji transaminacji. Badacze radzieccy stwierdzili ostatnio udział pirydoksalobiałek w szeregu innych bioreakcji, o czym jeszcze dalej będzie dokładnie powiedziane.

Jak wiadomo, dla przebiegu wielu czynności enzymatycznych niezbędna jest obecność pewnych kationów. Czy dzieje się tak również w przypadku czynności transaminacyjnych — nie wiemy. Otrzymywane dotychczas preparaty transaminaz nie są zbyt czyste, aby można było rozstrzygnąć udział kationów w tej bioreakcji. Na prawdopodobieństwo takiego udziału wskazują modelowe doświadczenia *Baddileya* (1952) oraz fakt stwierdzony przez *Snella* i *Metzlera* (1952), że nieenzymatyczna reakcja między pirydoksalem i aminokwasami, w wyniku której powstaje pirydoksamina i ketokwas, katalizowana jest przez ślady miedzi, żelaza i glinu.

Uwagi o metodyce badania transaminaz. Na przykładzie poznawania czynności transaminacyjnych widać wyraźnie, jaki wpływ na postawienie sprawy ma wybór metod analitycznych, sposób przygotowania preparatu enzymatycznego i warunki wykonywania pomiaru czynności enzymatycznej.

We wczesnych swych pracach szkoła *Braunsteina* dla oznaczenia „dwuzasadowych aminokwasów“ używała określania zmiany azotu aminowego w częściowo oczyszczonej, nierozpuszczalnej w alkoholu frakcji Foremana kwasów dwukarboksylowych (*Foreman*, 1914).

*Cohen* chcąc poprawić metodykę i mieć argumenty na zacieśnienie zakresu reakcji transaminacyjnych oznaczał kwas glutaminowy (1939) utleniając go chloremianą T do kwasu beta-cyjanopropionowego, hydrolizował ten ostatni do kwasu bursztynowego, a kwas bursztynowy oznaczał manometrycznie używając oksydazy bursztynowej. Mierzył zużycie tlenu potrzebnego dla utlenienia enzymatycznego kwasu bursztynowego do kwasu fumarowego.

Dalszy postęp w metodyce oznaczało wprowadzenie określania ilości kwasu glutaminowego za pomocą swoistej dekarboksylazy *Clostridium Welchii* S. R. 12 (*Krebs*, 1948 i 1950). Metoda ta wolna jest od przeszkód ze strony obecnej w układzie glutaminy lub glutationu, a po dodatku 2% bromku cetylotrójmetyloamonoowego staje się jeszcze bardziej swoista, gdyż nie ma przeszkód ze strony kwasu asparaginowego, pirogrogenowego i alfa-alaniny.

Równocześnie coraz dokładniej opracowywano metody oznaczania kwasu l-aspa-

raginowego, opierając je na różnych zasadach: bądź na użyciu *Leuconostoc mesenteroides* P—60 (Hac i Snell, 1945), bądź na oznaczeniu polarymetrycznym kwasu jabłkowego utworzonego działaniem na kwas asparaginowy kwasem azotowym (Roberts, 1947), bądź na sposobie Braunsteina, Niemczynskiej i Wilenkinej (1947), działając nań siarczanem metylowym i alkaliami, redukując utworzone kwasy fumarowy i maleinowy do kwasu bursztynowego i oznaczając ten kwas manometrycznie. Mardaszew i Gładkowa (1948) dekarboksylowali kwas asparaginowy bakterijną dekarboksylazą drobnoustroju nazwanego *Pseudomycobacterium* i oznaczali manometrycznie utworzony CO<sub>2</sub>. Wreszcie Krebs (1950) opracował manometryczną metodę oznaczania kwasu l-asparaginowego.

Ostatnio opublikowano szereg metod kolorymetrycznych, enzymatycznych, a zwłaszcza chromatograficznych, oznaczania kwasów organicznych; metody te mogą mieć i mają znaczenie w studiowaniu transaminacji u roślin. Zestawia je w swym przeglądzie Burrisa (1953). Wspomnę tu jedynie o nie przytoczonych przez Burrisa a ciekawych studiach metodycznych nad analizą aminokwasów przy użyciu chromatografii na krążkach bibuły. Są to prace badaczy indyjskich (Giri i Rao, 1952; Giri, Krishnamurthy i Venkitasubramanyan, 1952; Giri, Radhakrishnan, Vaidyanathan, 1952). Prace te zasługują na przytoczenie przede wszystkim dlatego, że opracowane metody zostały przez nich z powodzeniem zastosowane właśnie do studiów nad transaminazami roślinnymi (Giri, Radhakrishnan i Vaidyanathan, 1952 ab).

Z osiągnięć metodycznych, które wpłynęły na poszerzenie zakresu badań nad reakcjami transaminacji należy wspomnieć o metodyce przygotowania ketokwasów odpowiadających takim np. aminokwasom, jak walina, tyrozyna, fenyloalanina, metionina, cytrulina i etionina (Meister, 1952).

Dla zorientowania czytelnika w sposobie przygotowania preparatu enzymatycznego i warunkach wykonywania pomiaru czynności enzymatycznej podam kilka szczegółów metodycznych badań transaminaz roślinnych według opisu Leonarda i Burrisa (1947).

Badacze ci przygotowywali preparaty enzymatyczne homogenizując lub rozcieńczając z piaskiem tkankę. Badaną próbkę chłodzono natychmiast po zmiżdżeniu lub przed zmiżdżeniem do temperatury lodu, doprowadzono do pH 8, przecedzono przez płótno i odwirowywano. Do badań używano płynu nad osadu. Przygotowywanie zarodków do badań polegało na wyjąłowaniu nasion roztworem HgCl<sub>2</sub> 1:1000. Wyjąłowane nasiona moczoно w wyjąłowanej wodzie destylowanej na bibule w płytkach Petriego, a potem poddawano kiełkowaniu, inkubując w wilgotnej komorze w ciemności, w 30°. Zarodki wycinano z nasion i homogenizowano w ochłodzonym do temp. 0° 0,1 M buforze fosforanowym (pH = 8). Rośliny 2, 4 i 6-tygodniowe, używane w doświadczeniach, rosły na piasku z syntetycznymi, płynnymi pożywkami. W określaniu próbek na tablicach Leonarda i Burrisa (1947, p. niżej) „liście“ oznaczają jedynie tkankę liścia bez szypułki, a „łodygi“ oznaczają i łodygi i szypułki. Przebieg reakcji od kwasu glutaminowego + kwas szczawiowo-octowy w kierunku kwasu alfa-ketoglutarowego + kwas l-asparaginowy studiowano w probówkach o wymiarze 18 × 150 mm trzęsionych mechanicznie w łaźni wodnej o temp. 30°. 5 ml preparatu transaminazy inkubowano z 2 ml 0,06 M kwasu szczawiowo-octowego w ciągu 10 minut. Następnie dodawano 2 ml 0,06 M kwasu glutaminowego i kontynuowano inkubację w ciągu różnych okresów czasu. Reakcję hamowano przez dodanie 1 ml 10% kwasu siarkowego. Następnie doprowadzono pH układu do 2,0 i próbki zanurzano na 1 godzinę do wrzącej wody, by rozłożyć pozostały kwas szczawiowo-octowy. W zawartości po ostudzeniu oznaczano manometrycznie kwas glutaminowy używając dekarboksylazy bakteryjnej (Umbreit i Gunsalus, 1945). Przebieg reakcji odwrotnej badano inkubując w naczyniu Warburga preparat enzymatyczny z 0,5 ml 0,03 M kwasu asparaginowego

w temp. 30°. Po wyrównaniu temperatury wprowadzono z ramienia bocznego do układu 0,5 ml M kwasu alfa-ketoglutarrowego. Reakcja postępowała przez określony czas. Reakcję hamowano dodając z drugiego ramienia bocznego 0,5 ml cytrynianu aniliny. Pozwalało to jednocześnie na oznaczanie powstałego w czasie reakcji kwasu szczawiowo-octowego. Badane reakcje odbywały się w pH 8. To samo pH miały wszystkie dodawane substraty. W badaniach z ostatnich lat nastąpiła zmiana preparatyki enzymatycznej transaminaz przez użycie liofilizacji wyciągów tkankowych, co wraz z dodawaniem do układu reagującego fosforanu pirydoksalu umożliwiło w znacznie szerszym zakresie poszukiwania przemian transaminatycznych w metabolizmie ustrojów żywych.

Dane o występowaniu czynności transaminatycznych w roślinach. Równoległe z odkryciem transaminacji enzymatycznej i wyrabianiu sobie ogólnego poglądu na ich mechanizm, postępowały studia jakościowe i ilościowe nad rozmieszczeniem czynności transaminatycznych w rozmaitych ustrojach żywych oraz studia nad swoistością i warunkami przebiegu transaminacji. Dziś wiemy już, że czynności transaminatyczne spotyka się zarówno w ustrojach zwierzęcych, roślinnych, jak i w drobnoustrojach. Najbardziej dokładnie zbadano transaminazy zwierzęce. Znacznie mniej danych mamy o transaminazach innych ustrojów żywych. Według zdania *Cohana* (1951, l. c. s. 1058) najaktywniejszym ze zbadanych układów jest transaminaza glutaminowo-asparaginowa. Zgodnie z tematem niniejszego przeglądu, omawiając występowanie czynności transaminatycznych ustrojów żywych, ograniczę się do roślin.

Już w pierwszych pracach nad transaminazami stwierdzono zrazu tylko jakościowo obecność ich w roślinach. Dane takie mamy w publikacjach badaczy radzieckich, np. u *Kritzmanna* (1938). *Euler* i współpracownicy twierdzili w r. 1938, nie publikując jednak dokładnych danych doświadczalnych, że spostrzegli u roślin wyższych czynności transaminatyczne. *Virtanen* i *Laine* (1933) wykazali w miazdze grochu obecność transaminazy asparaginowo-alaninowej. *Kritzmann* w r. 1939 wykazała czynności transaminatyczne w wyciągach przygotowanych z kiełków grochu, łubinu i dyni. *Cedrangolo* i *Carandante* w r. 1940 badali reakcje transaminatyczne w roślinach trawiastych i strączkowych. Otrzymywali oni wyniki świadczące, iż preparaty dehydrogenazy kwasu mrówkowego badanych obiektów mają właściwości transaminaz asparaginowo-alaninowej, asparaginowo-glutaminowej i alaninowo-glutaminowej. Wyniki te mają jedynie charakter jakościowy, badacze ci bowiem porównywali jedynie szybkość transaminacji odpowiednich preparatów w obu rodzajach obiektów.

*Wys* (1940) spostrzegł tworzenie dość znacznych ilości kwasu asparaginowego po dodaniu do miazgi brodawek grochu kwasu szczawiowo-octowego. W przypadku tym nie wiadomo jednak, czy autor miał do czynienia z reakcją transaminacji.

*Albaum* i *Cohen* (1943) badali czynności transaminatyczne w kiełkach owsa i wykazali, że czynność transaminazy glutaminowo-asparaginowej wzrasta z rozwojem zarodków owsa (p. tab. 1).

*Rautanen* (1943) wykazał obecność transaminazy glutaminowo-asparaginowej w kiełkujących nasionach, częściach zielonych i korzeniach *Pisum sativum*. Transaminazy glutaminowo-alaninowa i asparaginowo-alaninowa były w preparatach

Tabela 1

Zmiany czynności transaminazy glutaminowo-asparaginowej w rozwijających się zarodkach owsa (wg *Albauma* i *Cohana* l. c.)

Wiek zarodka w godz.	Q <sub>TN</sub>
2	1675
24	1840
48	4900
72	5030
96	5650

*Rautanena* mniej czynne. Nieznaczną czynność enzymatyczną miał układ: kwas alfa-ketowalerianowy + walina.

*Leonard i Burris* (1947) opublikowali najpełniejszy dotychczas przegląd czynności transaminacyjnych u roślin. Badali oni transaminazę glutaminowo-asparaginową w częściach 22 gatunków roślin w różnym wieku.

Jeśli za autorami kierunek badanej reakcji od kwasu l-glutaminowego oznaczymy jako *a*, kierunek zaś od kwasu l-asparaginowego jako *b*, to wyniki *Leonarda* i *Burrisa* będziemy mogli zestawić w niżej podanych tabelach (tab. 2 i tab. 3, str. 69 i 70).

Przeoglądając przytoczone dane zauważymy, że w soi, pomidorze i buraku czynność transaminacyjna z wiekiem nieco zmniejsza się, gdy tymczasem kartofel w wieku 6 tygodni wykazuje nieco większą czynność transaminacyjną niż 4 tygodnie wcześniej. Na ogół korzenie mają zawsze największą czynność transaminacyjną, a szczególnie wysokie  $Q_T(N)$  mają korzenie marchwi. Prace publikowane w ostatnich latach wskazują na szeroki zakres czynności transaminacyjnych w roślinach. *Stumpf* wykazał, że alanina, kwas asparaginowy, kwas alfa-aminoglutazarowy, leucyna, izoleucyna, walina i norwalina oddają swą grupę aminową kwasowi alfa-ketoglutazarowemu w następujących roślinach: kiełki pszenicy, łubin, dyni i grochu. To samo ma miejsce w liściach dyni (1951). Dalszym przykładem takich prac mogą być cytowane przez *Burrisa* (1953) badania *Wilsona* i *Kinga*, gdzie wykazano, że w preparatach kiełków białego łubinu udało się stwierdzić 13 czynności transaminacyjnych.

Nicią przewodnią dla badacza zamierzającego studiować czynności transaminacyjne w roślinach są klasyczne dane takich prac o biochemii roślin, jak podręcznik *Czapka*, przedstawiające rozmieszczenie w roślinach substratów, o których wiemy dzisiaj, że są substratami transaminaz. Oznaczenia takie szeroko podjęto w ostatnich latach ze względu na nowe możliwości analityczne.

Szereg studiów poświęcono zwłaszcza chromatograficznej identyfikacji wolnych aminokwasów tkanek roślinnych, tzn. takich aminokwasów, które nie wchodziły w skład cząsteczek białkowych. Otrzymane wyniki zachęcają do badań czynności transaminacyjnych, gdyż wolnymi aminokwasami okazują się bardzo często właśnie częste substraty transaminaz: kwas glutaminowy, asparaginowy, alanina, seryna czy kwas alfa-aminomasłowy (por. *Wood*, 1953).

Ilość transaminaz. Ich swoistość. W pracach nad rolą transaminaz w przemianie pośredniej aminokwasów zajęto się zagadnieniem swoistości tych enzymów. Otrzymane wyniki, jeśli chodzi o materiał roślinny są bardzo niekompletne. Zasługują jednak, by o nich wspomnieć. Zanim będziemy mogli postawić sprawę swoistości transaminaz, należałoby zdać sobie sprawę z ilości niewątpliwie znanych enzymów transaminacji. Według wczesnych poglądów *Braunsteina* i *Kritzmanna* w ustrojach żywych istnieje kilkanaście różnych transaminaz. Poglądowi temu sprzeciwiał się *Cohen*, który w r. 1939 ilość transaminaz sprowadzał do trzech: transaminazy glutaminowo-alaninowej, asparaginowo-alaninowej i glutaminowo-asparaginowej. Pierwsza i trzecia z nich, według *O'Kane* i *Gunsalusa* (1947), imituje w tkankach badanych obecność drugiej z wymienionych tutaj transaminaz. *O'Kane* i *Gunsalus* twierdzą mianowicie, że transaminaza asparaginowo-alaninowa jest artefaktem. Mieszanina bowiem dwóch pozostałych enzymów działać może jako oddzielna transaminaza, gdy w układzie obecny jest kwas glutaminowy. Powiązanie owych 2 systemów w obecności kwasu glutaminowego wyglądałoby jak następuje: kwas pirogronowy + kwas glutaminowy = alanina + kwas alfa-ketoglutazarowy oraz: kwas alfa-ketoglutazarowy + kwas asparaginowy = kwas glutaminowy + kwas szczawiowo-octowy. Sumaryczny efekt tych 2 reakcji dawałby: kwas pirogronowy + kwas asparaginowy = alanina + kwas szczawiowo-octowy.

Tabela 2

Transaminacja w tkance roślinnej. Badano reakcję b (wg *Leonarda i Burrisa* l. c.)

Roślina	Wiek w tygodniach	Tkanka	Okres transaminacji minut	Utworzony kwas szczawiowo-octowy mikro M	Q <sub>T</sub> (N)
Soja	2	liść	10	3,70	8,6
		łodyga	10	2,64	13,8
		korzeń	10	2,40	47,7
	6	liść	10	1,91	5,9
		łodyga	10	2,22	8,1
		korzeń	10	2,15	40,3
Kartofel	2	liść	10	1,98	5,3
		łodyga	10	0,88	11,1
		korzeń	10	0,96	14,4
	6	liść	10	3,30	6,1
		łodyga	10	0,96	13,2
		korzeń	10	1,58	25,7
Pomidor	2	liść	10	2,62	16,1
		łodyga	10	2,53	36,0
		korzeń	10	1,54	82,0
	6	liść	10	1,78	8,1
		łodyga	10	0,73	7,3
		korzeń	10	2,00	19,4
Burak	2	liść	10	1,71	8,4
		łodyga	10	0,78	38,8
		korzeń	10	0,41	17,6
	10	liść +	10	2,54	8,0
		łodyga	10		
		korzeń	10	2,60	8,5
Sałata	2	liść +	10	1,73	23,1
		łodyga			
		korzeń	10	0,82	24,6
Kapusta	2	liść	10	2,24	15,6
		łodyga	10	1,21	48,3
		korzeń	10	0,57	10,0
		liść +	1	2,00	9,0
Jęczmień „Mandżuria“	2	łodyga			
Jęczmień „Korsbyg“	2	”	10	2,22	9,1
Marchew	10	korzeń	10	0,93	18,6
		liść	10	0,59	3,8
		korzeń	10	2,79	52,2
Dyń	10	owoc	10	2,13	7,6
		”	10	0,35	0
		”	10	0,00	0,0
Zielone pomidory		”	10	0,00	0,0
Zielone jabłka	12	liść	10	1,53	3,2
		łodyga	10	2,41	3,5
		strąk	5	2,42	16,3
		”	10	3,57	12,1
Kalarepa	12	liść	10	1,07	3,9
		łodyga	10	2,29	16,6
Zielona fasolka	9	liść	10	1,84	6,4
		łodyga	10	3,07	9,7
		korzeń	10	1,86	22,2
		brodawki	10	2,33	19,7
Klon Sosna		liść	10	0,40	6,0
		igły	10	0,00	0,0



Tabela 3

Badano transaminację w tkance roślinnej. Kierunek reakcji *b*. Czas reakcji 10 minut (wg Leonarda i Burrisa l. c.)

Roślina	Wiek w tygodniach	Tkanka	Mikro M kwasu glutaminowego transaminowane	Q <sub>T</sub> (N)
Kartofel	2	korzeń	7,85	146,3
		łodyga	6,51	102,2
		liść	8,70	29,0
Pomidor	6	liść	6,25	35,2
		korzeń	9,24	111,0
		strąk	10,00	33,7
Groszek pachnący	12			
Dynia	10	liść	13,47	45,5
Jęczmień „Korsbyg“	2	liść	7,90	44,2

Przeciw poglądom uważającym transaminazę asparaginowo-alaninową za artefakt przemawiają jednak prace Moulder'a, Venneslanda i Evans'a (1945) oraz późniejsze badania Kritzmanna i Samarinej (1949), które w dalszych swych pracach potwierdziły istnienie swoistej transaminazy asparaginowo-alaninowej. Obecnie Cohen i Cammarata (1950) a także Stumpf (1951) oraz Burris (1953) przyznają jednak rację badaczom radzieckim i dochodzą do wniosku, że zakres transaminacji jest nawet większy, niż to początkowo przyjmowali badacze radzieccy, i rozciąga się na, co najmniej, 26 rozmaitych aminokwasów.

Powracając do sprawy swoistości transaminacji enzymatycznej musimy stwierdzić, że homologi kwasów szczawiowo-octowego i alfa-ketoglutazarowego mogą występować w transaminacjach jako akceptory grup aminowych, natomiast dwuzasadowe sulfokwasy analogiczne do kwasu glutaminowego lub asparaginowego mogą występować jako donatory grup aminowych. Stwierdzono to w następujących reakcjach:

l-alanina + kwas alfa-ketoadipinowy = kwas aminoadipinowy + kwas pirogronowy (*a*),

l-alanina + kwas mezoksalowy = kwas aminomalonowy + kwas pirogronowy (*b*),

kwas l-glutaminowy + kwas mezoksalowy = kwas aminomalonowy + kwas alfa-ketoglutazarowy (*c*),

kwas l-cysteinowy + kwas pirogronowy = l-alanina + kwas sulfopirogronowy (*d*),

kwas l-cysteinowy + kwas szczawiowo-octowy = kwas l-asparaginowy + kwas sulfopirogronowy (*e*),

kwas l-cysteinowy + kwas alfa-ketoglutazarowy = kwas l-glutaminowy + kwas sulfopirogronowy (*f*),

kwas l-homocysteinowy + kwas pirogronowy = l-alanina + kwas sulfo-alfa-ketomasłowy (*g*).

Ponadto, na razie w tkankach zwierzęcych, stwierdzono obecność następujących transaminaz:

glutaminowo-aminomasłowej (*h*), glutaminowo-walinowej (*i*), glutaminowo-leucynowej (*j*) oraz glutaminowo-izo-leucynowej (*k*).

Badania nad swoistością transaminaz nie wniosły dotychczas zbyt wiele dla zrozumienia istoty biologicznej tych procesów. Podobnie studia nad hamowaniem tych bioreakcji nie dały również wiele nowego.

Inhibitory transaminaz. Studia nad inhibitorami transaminaz znajdują się w stadium, które dowcipnie określa *Cohen* w swej monografii o transaminazach (s. 1053) jako odczuwanie naglącej potrzeby odkrycia swobodnego inhibitora czynności transaminacyjnych.

Znaczenie swobodnych inhibitorów dla studiów metabolicznych nie wymaga specjalnego uzasadnienia.

Dotychczasowe badania pozwoliły wprowadzić na zestawienie szeregu związków posiadających 100 % efekt hamujący czynność transaminacyjną, ale efekt stwierdzony w żadnym wypadku nie był swoisty. W 100 % hamują transaminazy związki srebra, rtęci, cynku, p-benzochinon w stężeniu 0,001 M, pochodne p-fenyleneodwuminy i sam ten związek w stężeniu  $3,5 \times 10^{-2}$  M (*Cohen* i współpracownicy, 1942). Znane jest jednak działanie strącające metali ciężkich na białka, znany reakcję p-benzochinonu z aminami, szczególnie aminami aromatycznymi, znany wpływ p-fenyleneodwuminy na reakcję enzymatyczną. *Braunstein* zestawia wpływ czynników chemicznych na czynność transaminazy glutaminowo-alaninowej (tab. 4).

Tabela 4

Wpływ czynników chemicznych na czynność transaminazy glutaminowo-alaninowej (wg *Braunsteina*, 1949, rozdz. V s. 74)

Czynnik chemiczny	Stężenie molarne	Procent hamowania reakcji
Żelazicyjanek	$2 \times 10^{-5}$ — $1 \times 10^{-2}$	10 — 15
Malonian	0,1	10
Malonian	0,01	6
Cyjanek	0,05	79
Cyjanek	0,01	50 — 56
Cyjanek	0,001	3 — 30
Cyjanek	0,0001	0 — 12
p-Benzochinon	0,001	100
p-Benzochinon	0,0002	28
Chinhydron	0,001	71
Hydrochinon	0,001	44
CaCl <sub>2</sub>	0,1	85
CaCl <sub>2</sub>	0,04	50
CaCl <sub>2</sub>	0,02	25
BaCl <sub>2</sub>	0,02	25
BaCl <sub>2</sub>	0,2	83
SrCl <sub>2</sub>	0,4	62
ZnSO <sub>4</sub>	0,001	36
CuSO <sub>4</sub>	0,001	85
Hg(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub>	0,001	89
Hg(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub>	0,0001	10
HgNO <sub>3</sub>	0,01	100
HgNO <sub>3</sub>	0,001	70
HgNO <sub>3</sub>	0,0001	16
AgNO <sub>3</sub>	0,01	100
AgNO <sub>3</sub>	0,001	70
AgNO <sub>3</sub>	0,0001	17

Tabela 4 nie daje nam wielu informacji o grupach czynnych swobodnych dla badanego układu enzymatycznego.

Szereg związków zupełnie nie wpływa na czynności enzymatyczne. Zacytować tu można za *Braunsteinem* i *Kritzmann* (1937), *Wyszepanem* (1940) i *Braunsteinem* (1947) brak hamowania przez: 1) narkotyki i inhibitory dehydrogenaz: chloroform, toluen, alkohol kaprylowy, etanol w stężeniach od 10 do 15 %, aceton, uretan



Na poziomie pierwszym, gdzie chodziłoby o utworzenie kwasów asparaginowego i glutaminowego, występowałyby transaminazy typu np. transaminazy alaninowo-glutaminowej czy innych wykazanych przez *Stumpfa* (1951).

Na poziomie drugim chodziłoby o utworzenie całego wachlarza alfa-aminokwasów. Najprawdopodobniej występowały tu rozmaite transaminazy glutaminowo- albo asparaginowo-alfa-aminokwasowe, gdyż wydaje się już bardzo prawdopodobne, że większość aminokwasów w roślinach tworzona jest drogą transaminacji. Wniosek ten wysuwany przez *Burrisa* (1953) potwierdza, według tego autora, fakt, że dotychczas nie udało się wykazać obecności wielu innych współistniejących dróg tworzenia alfa-aminokwasów.

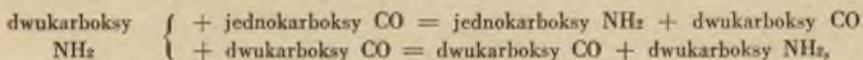
Poziom trzeci, przedstawiający najogólniej reakcje tworzenia cząsteczek białkowych, związany jest najprawdopodobniej również z czynnościami transaminacji. Obecnie mamy trzy teorie tworzenia białek w roślinie i dwie z nich uwzględniają rolę transaminacji w tym procesie. Pomińmy tu starą, polipeptydową teorię (*Fischer*, 1902, *Hofmeister*, 1902), według której synteza białek postępuje przez stopniową kondensację aminokwasów tworzonych oddzielnie, a która niewątpliwie w pewnych przypadkach obowiązuje. Obie pozostałe teorie, reprezentowane jedna przez *Stewarda* ze współpracownikami (1947, 1950 ab) oraz przez *Streeta* (1949), a druga — przez *Linderstræma-Langa* (1939), twierdzą, że synteza białek idzie drogą inną, niż ich hydroliza.

Zgodnie z pierwszą z tych teorii układy transaminacyjne dołączają grupy aminowe do łańcuchów węglowych tworzących szkielet cząsteczki białkowej. Zgodnie z drugą — ketopeptydy utworzone na skutek kondensacji ketoaldehydów lub keto-kwasów z aminokwasami przekształcają się drogą transaminacji w białka.

Za oboma tymi teoriami przemawia fakt stwierdzania zależności między syntezą białek, przemianą węglowodanów a transaminacjami. Przytoczyć tu należy zwłaszcza prace *Synge* (1951), który oznaczał w rajgrasie wolne i związane aminokwasy. Te ostatnie są związane najprawdopodobniej z cukrowcami.

Rola transaminacji w przemianie roślin nie ogranicza się do udziału w syntezie aminokwasów i białek. Prace *Gunsalus*a i *Tonzeticha* (1952) wskazują na jeszcze jedną możliwą rolę transaminacji w metabolizmie roślinnym. Autorzy ci wykazali w przypadku *Escherichia coli* tworzenie kwasu glutaminowego z alfa-ketoglutarowego w obecności adeniny, guaniny i cytozyny. Obecność amoniaku, natomiast, takiego tworzenia nie powodowała. Autorzy wysnuwają wniosek, że tworzenie i przekształcanie wzajemne puryn i pirymidyn odbywa się również drogą transaminacji.

Na podstawie wyników otrzymanych w przypadku tkanek zwierzęcych należałoby brać ponadto pod uwagę jeszcze inne możliwe role transaminacji w przemianie roślin, jak np. ich udział w dezaminacji z utlenieniem pewnych l-aminokwasów. Nasze dzisiejsze wiadomości pozwalają nam przypisywać transaminacjom, tzn. w najogólniejszym skrócie reakcjom takim, jak



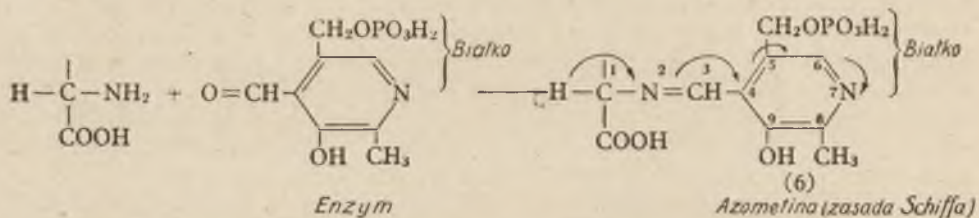
kluczową rolę wśród bioreakcji pośredniej przemiany azotowej roślin.

Transaminacje a inne bioreakcje katalizowane przez pirydoksalobiałka. W badaniach transaminaz daleko za sobą mamy sytuację, w której dla wytłumaczenia nieznannej bioreakcji trzeba było posługiwać się niebiologicznymi modelami. Doszliśmy do etapu, w którym coraz to dokładniejsze poznawanie istoty transaminacji enzymatycznej zbliżyło nas nie tylko do poznania metabolicznego znaczenia tych reakcji, lecz pozwoliło nam rozpatrywać transaminacje jako przykład pewnego ogólniejszego typu bioreakcji.

Obecnie, opierając się na ostatnich badaniach *Braunsteina* i jego szkoły, dostrzegamy pokrewieństwa, jakie zachodzą między katalizowanymi przez pirydoksa-

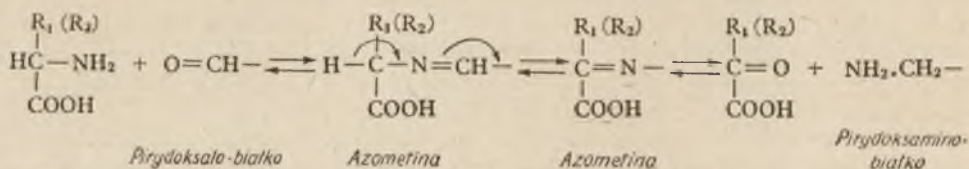
lobiałka reakcjami transaminacji a innymi reakcjami katalizowanymi przez inne holoenzymy, opartymi jednak na współdziale tego samego koenzymu i na tym samym mechanizmie zasadniczej reakcji.

Podstawową reakcją fosfopirydoksalu w przemianach aminokwasowych jest tworzenie z aminokwasami zasad Schiffa (azometyn) ogólnego typu wzoru 6. W związkach tych (p. schemat 7), jak to stwierdzają *Braunstein* i *Szemiakina* (1952), na skutek ich właściwości strukturalnych, a także na skutek wpływu środowiska zewnętrznego, możliwe są przemieszczenia układu elektronowego zmieniające właściwości atomu węgla w pozycji pierwszej i umożliwiające powstanie azometyn o charakterystycznych cechach chemicznych. Podstawowy typ reakcji enzymatycznych katalizowanych przez enzymy pirydoksalowe spotykamy:



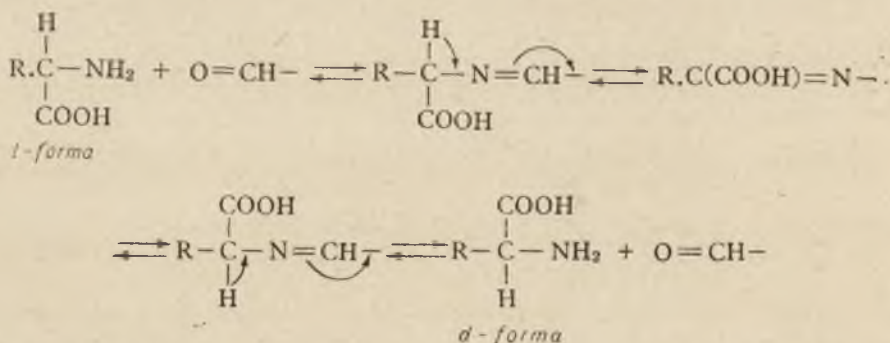
Schemat 7. Podstawowa reakcja fosfopirydoksalu w przemianie aminokwasów (wg *Braunsteina* i *Szemiakina*, 1952).

1. W omawianych dotychczas transaminacjach (p. schemat 8).



Schemat 8. Ogólny szkielet transaminacji enzymatycznej (wg *Braunsteina* i *Szemiakina*, 1953).

2. Tworzenie azometyn (wzór 6) jest tłem racemizacji l- i d-alanin przez bakteryjną racemazę. Mechanizm tej reakcji według *Braunsteina* i *Szemiakina* przedstawia schemat 9.



Schemat 9. Enzymatyczna racemizacja alaniny (wg *Braunsteina* i *Szemiakina*, 1953).

3. Zbliżony do poprzednich jest przebieg reakcji alfa-dekarboksylowania l-aminokwasów, zachodzący również przy współdziale pirydoksalobiałek.

4. To samo tyczy się enzymatycznej beta-dekarboksylacji kwasu asparaginowego dokonywanej w niektórych drobnoustrojach przez pirydoksalobiałka.

5. Rozkład alfa-amino-gamma-ketokwasów kinureny i 3-oksikinureny zachodzący pod wpływem enzymu kinureninazy przebiega również poprzez utworzenie azometynu typu przedstawionego we wzorze 6.

6. Z udziałem pirydoksalobiałek dochodzi do rozpadu enzymatycznego niektórych beta-pochodnych aminokwasów.

7. Podobnie beta-podstawne alfa-aminokwasów mogą ulegać enzymatycznej kondensacji ze związkami typu pochodnych beta-indolu, co odbywa się również przy udziale pirydoksalobiałek.

8. Stwierdzono rolę pirydoksalobiałek w reakcjach enzymatycznego rozpadu gamma-pochodnych alfa-aminokwasów.

9. To samo da się powiedzieć o kondensacjach enzymatycznych gamma-pochodnych alfa-aminokwasów, co jest przemianą zbliżoną do przemian zachodzących w przypadku beta-pochodnych alfa-aminokwasów (punkt 7).

Przedstawione wyżej zestawienia bioreakcji katalizowanych przez pirydoksalobiałka, dokonane przez *Braunsteina* i *Szemiakina* (1953), pozwalają dojrzeć w mechanizmie transaminacji biologicznej centralny punkt biochemicznej integracji przemiany azotowej. Na tle tego przeglądu inaczej — szerzej — widzimy rolę transaminaz. „Rola transaminacji — zacytuję słowa odkrywcy czynności transaminatycznej prof. *Braunsteina* (1947, s. 47) — nie ogranicza się do udziału jej w syntezie, rozkładzie i przenoszeniu grup aminowych, ani nie ogranicza się do regulacji oddychania tkankowego przez tworzenie i usuwanie metabolitów pośrednich oddychania. Dostarczając narzędzia szybkiego przekształcenia się wzajemnie sześciu głównych składowych układu kwasów dwukarboksylowych, tj. kwasów glutaminowego, asparaginowego, alaniny, kwasu alfa-ketoglutarowego, kwasu szczawio-octowego oraz kwasu pirogronowego, transaminazy grają na równi z dehydrogenazami kwasów amino-dwukarboksylowych, amidazami i enzymami cyklu Krebsa czołową rolę w chemicznej integracji przemiany azotowej“.

## PIŚMIENNICTWO

*Abderhalden E.*: Naturwissenschaften, 1924, 12, 716. — *Adler E. i Sreenivasaya M.*: Z. Physiol. Chem., 1937, 249, 24. — *Albaum H. G. i Cohen P. P.*: J. Biol. Chem., 1943, 149, 19. — *Baddiley J. i Tain E. M.*: Nature, 1951, 167, 557. — *Baddiley J.*: Nature, 1952, 170, 711. — *Braunstein A. E., Kritzmann M. G.*: Biul. Eksp. Biol. Med., 1937, 3, 229. — *Braunstein A. E. i Kritzmann M. G.*: Nature, 1937, 140, 503. — *Braunstein A. E. i Kritzmann M. G.*: Enzymologia, 1937, 2, 129. — *Braunstein A. E. i Kritzmann M. G.*: Biochimia, 1943, 8, 1. — *Braunstein A. E.*: Adv. Protein. Chem., 1947, 3, 4. — *Braunstein A. E.*: Biochimia aminokisłotnego ohmiena. Izd. AMN. SSSR, Moskwa 1949, s. 426. — *Braunstein A. E. i Szemiakin M. M.*: DAN SSSR, 1952, 85, 1115. — *Braunstein A. E. i Szemiakin M. M.*: Biochimia, 1953, 18, 393. — *Burriss R. H.*: Annual Rev. of Plant Physiol., 1953, 4, 91. — *Cedrangolo F. i Carandante G.*: Boll. soc. ital. biol. spen., 1941, 15, 482. — *Chibnall A. C.*: Metabolizm białek w roślinie. PWRiL, Warszawa 1952, s. 232 + 2 nlb. — *Christiansen G. C. i Thimann K. V.*: Am. J. Botany, 1949, 36, 821. — *Christiansen G. C. i Thimann K. V.*: Arch. Biochem., 1950, 28, 117. — *Cohen P. P.*: Biochem. J., 1939, 33, 551. — *Cohen P. P.*: Biochem. J., 1939, 33, 1478. — *Cohen P. P.*: Rozdz. pt.: „Transamination“ w Symposium on Respiratory Enzymes, wyd. The Univ. of Wisconsin Press, Madison, 1942. — *Cohen P. P. i Cammarata P. S.*: J. Biol. Chem., 1950, 187, 439. — *Cohen P. P.*: Rozdz. 32 w The Enzymes, t. 1, cz. 2, wyd. Acad. Press, 1951. — *Euler H. v. Adler E., Guenther G. i Das N. B.*: Z. Physiol. Chem., 1938, 254, 61. — *Fischer E.*: Ber., 1902, 35, 1095, cyt. wg *H. E. Streeta*, 1949, s. 421. — *Foreman F. W.*: Biochem. J., 1914, 8, 463.

*Giri K. V., Kristnamurthy K. i Venkitasubramanyan T. A.*: Journal of the Indian Institute of Science, 1952, 34, 209. — *Giri K. V., Radhakrishnan A. N. i Vaidyanathan C. S.*: Journ. of the Ind. Institute of Science, 1952, 34, 305. — *Giri K. V., Radhakrishnan A. N. i Vaidyanathan C. S.*: Nature, 1952, 170, nr 4337, 1025. — *Giri K. V. i Rao N. A. N.*: Journ. Ind. Institute of Science, 1952, 34, 95. — *Green D. E., Leloir L. F. i Nocito V.*: J. Biol. Chem.,

1945, 161, 559. — *Gunsalus I. C. i Umbreit W. W.*: J. Biol. Chem., 1947, 170, 1. — *Gunsalus I. C.*: Feder. Proc., 1950, 9, 556. — *Gunsalus C. F. i Tonzetich J.*: Nature, 1952, 170, 162. — *Hansteen B.*: Jahrbuecher f. wiss. Botanik, 1899, 33, 417—486. — *Herbst R. M. i Engel L. L.*: J Biol. Chem., 1934, 107, 505. — *Herbst R. M. i Shemin D.*: J. Biol. Chem., 1943, 147, 541. — *Herbst R. M.*: Adv. Enzym., 1944, 4, 75. — *Hevesy G., Linderstrøm-Lang K., Keston A. S. i Carsten Olsen*: Compt rendus des travaux du Lab. Carlsberg, ser. chim., 1940, 23, 15, 213—218. — *Hofmeister F.*: Ergeb. Physiol., 1902, 1, 759, cyt. wg *H. E. Streeta*, 1949, 421. — *Karrer P. i Viscontini M.*: Helv. Chim. Acta, 1947, 30, 52, 524. — *Krebs H. A.*: Biochem. J., 1948, 43, 51. — *Krebs H. A.*: Biochem. J., 1950, 47, 605. — *Kritzmann M. G.*: Biochimia 1938, 3, 28. — *Kritzmann M. G.*: Biochimia, 1940, 4, 667, 39, cyt. wg Chem. Abstr., 34, 5865. — *Kritzmann M. G. i Samarina*: Cyt. wg Chem. Abstr., 1949, 43, 2252. — *Leonard M. J. K. i Borris R. H.*: J. Biol. Chem., 1947, 170, 701. — *Lichtstein H. C., Gunsalus I. C., Umbreit W. W.*: J. Biol. Chem., 1945, 161, 311. — *Linderstrøm-Lang K.*: Ann. Rev. Biochem., 1939, 8, 37.

*Meister A.*: J. Biol. Chem., 1952, 197, 309—317. — *Moulder, Vennesland i Evans*: J. Biol. Chem., 1945, 160, 305. — *O'Kane i Gunsalus I. C.*: J. Biol. Chem., 1947, 170, 425. — *Needham. Dorothy M.*: Biochem. J., 1930, 24, 208. — *Rautanen N.*: Ann. Acad. Sci. Fennicae. Ser. A, II, Chem., 1948, nr 33. — *Schlenk F. i Fisher A.*: Arch. Biochem. 1945, 8, 337. — *Schlenk F. i Snell E. E.*: J. Biol. Chem., 1945, 157, 425. — *Schlenk F. i Fisher A.*: Arch. Biochem., 1947, 12, 69. — *Snell E. E.*: J. Am. Chem. Soc., 1945, 67, 194. — *Snell J. i Metzler*: J. Am. Chem. Soc., 1952, 74, 979. — *Steward F. C. i Street H. E.*: Ann. Rev. Biochem., 1947, 16, 471. — *Steward H. C., Thompson J. F., Dent C. E.*: Science, 1949, 110, 439. — *Steward F. C. i Thompson J. F.*: Nature, 1950, 166, 593. — *Steward F. C. i Thompson J. F.*: Ann. Rev. Plant Physiol., 1950, 1, 233. — *Steward F. C., Thompson J. F., Millar F. K., Thomas M. D. i Hendricks R. H.*: Plant. Physiol., 1951, 26, 123. — *Street H. E.*: Adv. in Enzymol., 1949, 9, 391. — *Stumpf P. K.*: Federation Proc., 1951, 10, 256. — *Synge R. L. M.*: Biochem. J., 1951, 49, 642. — *Szent-Gyeorgyi A. i wsp.*: Z. Psychiol. Chem., 1936, 244, 105. — *Szent-Gyeorgyi A. i Banga I.*: Z. Psychiol. Chem., 1937, 245, 118. — *Terroine Emile F.*: La synthese proteique. CNRS. Paryż 1952. — *Umbreit W. W. i Gunsalus I. C.*: J. Biol. Chem., 1945, 159, 333. — *Virtanen A. i Laine T.*: Nature, 1938, 141, 748. — *Virtanen A. i Laine T.*: Biochem. J., 1939, 33, 412. — *Vickery H. B., Pucher G. W., Schoenheimer R. i Rittenberg D.*: J. Biol. Chem., 1940, 135, 531. *Wood J. G.*: Nitrogen metabolism of higher plants, Ann. Rev. of Plant Physiol., 1953, 4, 1. — *Wyss O.* cyt. wg *Wilsona P. W.*: The biochemistry of symbiotic nitrogen fixation, Univ. of Wisconsin Press, Madison, 1940, s. 175.

ANNA NOWOTNY-MIECZYŃSKA

## O MECHANIZMIE WIĄZANIA WOLNEGO AZOTU

Problem mechanizmu wiązania wolnego azotu jest przedmiotem sporu badaczy bodaj od czasu odkrycia istoty tego zjawiska przez *Hellriegla*, *Prażmowskiego*, *Beijerincka* i in. Problem ten najwidoczniej przedstawiał i nadal przedstawia ogromne trudności, jeżeli nawet dziś przy nowoczesnych środkach i metodach badawczych wciąż jeszcze dalecy jesteśmy od całkowitego wyjaśnienia tej sprawy. *Winogradski* (1949) w ostatnim zbiorowym wydaniu swoich prac przyznaje, że 40 lat temu zagadnienie mechanizmu wiązania wolnego azotu wydawało się mu dużo łatwiejsze do rozwiązania niż w momencie pisania tych słów. Trudność polega przede wszystkim na tym, że mechanizm ten jest ściśle zespolony z życiem komórki organizmu i że na zewnątrz tej komórki odtworzyć go nie można. W przypadku symbiotycznego wiązania wolnego azotu badanie problemu mechanizmu jest jeszcze trudniejsze, ponieważ zjawisko to jest wynikiem ściślej współpracy dwóch organizmów: rośliny i bakterii.

W związku z problemem mechanizmu wiązania cząsteczkowego azotu wyłania się przede wszystkim zasadnicze pytanie: czy mechanizm ten jest wspólny dla wszystkich organizmów uzdolnionych do korzystania z atmosferycznego azotu, czy też odrębny dla wolno żyjących mikroorganizmów, jak azotobakter, *Clostridium* i inne, i odrębny dla bakterii żyjących w symbiozie z rośliną motylkową? Zdania były i są podzielone, jednak większość badaczy z *Fiedorowem* (1952) na czele przychyła się raczej do opinii, że mechanizm ten jest uniwersalny, a to na tej podstawie, że czynniki, które hamują wiązanie wolnego azotu u wolno żyjących bakterii, wywierają to samo działanie w systemie rośliny motylkowej — bakterie. Jednakże w ostatnim dziesięcioleciu stwierdzono zasadniczą różnicę między wolno żyjącymi bakteriami a organizmami, które wiążą azot tylko przy współzyciu z rośliną motylkową; różnicę tę stanowi czerwony barwnik brodawek korzeniowych, którym natura obdarza rośliny motylkowe tylko wtedy, gdy aktywny szczep *Rhizobium* zakazi właściwą sobie roślinę i tylko tak długo, jak długo trwa proces wiązania azotu atmosferycznego. Barwnik ten jest jedynym tego rodzaju spotykanym w świecie roślinnym wskaźnikiem biologicznym, oczywiście obok zielonego barwnika, który nam sygnalizuje fotosyntezę. Do barwnika tego powrócę jeszcze, obecnie pragnę omówić najważniejsze teorie mechanizmu wiązania molekularnego azotu, będące przedmiotem rozważań od szeregu lat.

Mamy dwie teorie: teorię redukcji i teorię utlenienia molekularnego azotu. Z teoriami tymi łączą się dwa zagadnienia: 1) jak wygląda kluczowy produkt wiązania wolnego azotu, tj. ten ostatni związek, który „wprowadza“ azot molekularny w skład aminokwasów, 2) jaki system enzymatyczny katalizuje procesy wiązania wolnego azotu?

Teoria redukcji ma za sobą ogromną większość zwolenników i stworzona



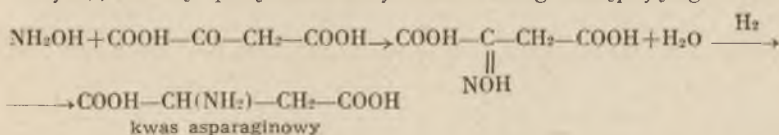
była przez *Kostyczewa* (1926) i *Winogradskiego* (1936). Pierwszy z nich badał mechanizm wiązania wolnego azotu przez azotobakter i stwierdził, że około 25 % produktów tego wiązania znajduje się w postaci związków amoniakalnych (resztę stanowiły różne aminokwasy), natomiast *Winogradski* badał brodawki świeżo odcięte od macierzystego korzenia w okresie najenergiczniejszego wiązania wolnego azotu przez rośliny motylkowe i stwierdził wydzielanie się z nich amoniaku, przy czym środki antyseptyczne nie hamowały tego wydzielania. Badania te potwierdzili *Demolon* i *Dunez* (1938) znajdując ścisłą współzależność między procesami oddechowymi brodawek a wydzielaniem się z nich amoniaku. *Winogradski* i *Kostyczew* wyciągnęli z wyników swoich badań logiczny wniosek, że pierwszym, a zarazem kluczowym produktem wiązania wolnego azotu przez symbiotyczne i wolno żyjące organizmy jest amoniak, który łącząc się z ketokwasami daje odpowiednie aminokwasy. Pogląd ich poparł również i *Prianisznikow* (1945), który wprawdzie bezpośrednio tymi sprawami sam nie zajmował się, jednak zawsze głosił tezę, że alfa i omegą przemian azotowych wszystkich organizmów, bez względu na ich charakter fizjologiczny i źródło azotu, jest amoniak.

Te dwa podstawowe dowody reducyjnego wiązania wolnego azotu wywołały ożywioną dyskusję i jeszcze bardziej ożywioną działalność badawczą, która jednakże przez wiele lat nie dostarczyła ważniejszego materiału dowodowego do teorii *Kostyczewa* i *Winogradskiego*. Dopiero w ostatnich latach, gdy zyskaliśmy nowe narzędzie do badania dróg wiązania cząstkowego azotu w postaci nacechowanego azotu  $N_2^{15}$ , śledzenie mechanizmu zrobiło ogromne postępy. Wśród szeregu badań z tego zakresu na uwagę zasługują badania szkoły *Wilsona* (1952). *Wilson* ze swymi współpracownikami prowadził badania na azotobakterze, *Clostridium*, *Nostoc muscorum* i in. w ten sposób, że azot zwykły zastępował azotem nacechowanym w różnych związkach azotowych, jak amoniak, mocznik, azotany, azotyny i in. i stwierdził, że tylko azot amoniakalny pobierały te organizmy natychmiast i w całości oraz odkładały go potem w kwasie glutaminowym, mniej w kwasie asparaginowym i alaninie, które to związki mogły zresztą powstać z kwasu glutaminowego dzięki działalności transaminazy glutaminowo-asparaginowej. Badając wpływ różnych związków azotowych na energię wiązania wolnego azotu przez azotobaktera *Wilson* stwierdził, że tylko amoniak hamuje to wiązanie w 100 %, natomiast inne połączenia, jak azotany czy azotyny, potrzebują dopiero pewnego krótszego czy dłuższego czasu do wywołania takiego hamującego działania. Zjawisko to tłumaczone jest w ten sposób, że azotobakter mając do wyboru azot molekularny i azot amoniakalny natychmiast korzysta z azotu amoniakalnego.

*Burris*, *Orcutt* i *Umbreit* (1952; — również ze szkoły *Wilsona*) badali sprawę wiązania wolnego azotu na brodawkach korzeniowych roślin motylkowych, ale obrali inną drogę badawczą; mianowicie usiłowali oni ustalić w brodawkach skład aminokwasów, charakterystyczny dla symbiotycznego wiązania wolnego azotu. Rozwój chromatografii ułatwił im to zadanie i badacze stwierdzili, że podobnie jak w azotobakterze, pobrany przez zakażone rośliny motylkowe nacechowany azot  $N_2^{15}$  zostaje odłożony przede wszystkim we frakcji kwasu glutaminowego, mniej we frakcji kwasu asparaginowego. Dużą porcję nacechowanego azotu znaleziono też we frakcji amoniakalnej, do której zaliczamy obok amoniaku również i związki amidowe. Te zbieżne wyniki badań prowadzone na wolno żyjących bakteriach i na brodawkach korzeniowych doprowadziły badaczy do zgodnego wniosku, że najbardziej prawdopodobnym kluczowym produktem wiązania wolnego azotu jest tylko amoniak. Badania te jednak nie mogą być uważane za kompletne, pozostaje bowiem pytanie, jak wyglądają związki pośrednie między azotem molekularnym a amoniakiem? Zapełnienie tej luki jest, jak dotychczas, przedmiotem domysłów i różnych spekulacji badawczych.

Teoria utlenienia molekularnego azotu, która dotychczas miała bardzo

nielicznych zwolenników i była najsilniej zwalczana przez *Prianisznikowa*, została obecnie znowu wysunięta przez *Virtanena* (1952). Na podstawie swoich prac i na zasadzie rozumowania badacz ten dochodzi do wniosku, że drogi chemizmu wiązania wolnego azotu są odmienne dla bakterii tlenowych (azotobakter, *Rhizobium* wespół z rośliną motylkową), a odrębne dla bakterii anaerobowych, jak *Clostridium* i in. Według fińskiego badacza pierwszym produktem wiązania wolnego azotu przez aeroby byłyby produkt utlenienia cząsteczkowego azotu, najprawdopodobniej  $N_2O$ , natomiast dla anaerobów produkt redukcji tegoż azotu. Pogląd ten uzasadnia *Virtanen* w następujący sposób: kluczowym związkiem pobierania wolnego azotu przez system rośliny — *Rhizobium* nie jest amoniak, lecz hydroksylamina, a to dlatego, że w związkach wydzielanych z brodawek korzeniowych roślin motylkowych do podłoża \* znaleziono wprawdzie nieduże, ale stale występujące ilości kwasu oksiminobursztynowego. Związek ten mógł, według niego, powstać tylko z syntezy hydroksylaminy z kwasem szczawio-octowym, którego znaczne ilości znalazł *Virtanen* w soku roślin motylkowych. Kwas ten niezwykle szybko reaguje z hydroksylaminą (dużo szybciej niż amoniak z kwasem ketoglutarynym), tworząc połączenia oksymowe według następującego wzoru:



Równocześnie *Blom* (1931) odkrył w produktach wiązania wolnego azotu u azotobaktera znacznie większe ilości hydroksylaminy, a *Enders* (1935) to potwierdził, natomiast u *Clostridium butyricum* nie udało się nikomu wykryć śladów hydroksylaminy ani też związków, które by przez hydrolizę dawały hydroksylaminę; stwierdzono jednak obecność dużych ilości połączeń amoniakalnych. Powyższe wyniki badań, swoich i cudzych, naprowadziły *Virtanena* na myśl, że mechanizmy wiązania wolnego azotu u aerobowych i anaerobowych organizmów muszą być odrębne i sprawę tę rozważa dalej w następujący sposób: *Virtanen* wychodzi z założenia, że jeśli nie znajdujemy różnic w składzie białka w zależności od tego czy organizm (azotobakter, *Rhizobium* + roślina) syntetyzuje je z azotanów, czy też z azotu atmosfery, to najwidoczniej te dwa metabolizmy wywodzące się z dwu odmiennych źródeł azotu muszą się w jakimś punkcie spotykać; *Virtanen* rozumuje dalej: jeśli procesy pobierania azotu z azotanów tłumaczymy sobie stopniową redukcją reszty azotanowej, według następującego schematu:

$$NO_3 \rightarrow NO_2 \rightarrow N_2O \xrightarrow{H_2O} (NOH)_2 \rightarrow NH_2OH \rightarrow NH_3$$

to najbardziej prawdopodobnym zbieżnym dla obu metabolizmów produktem pobierania azotu mogłyby być dla aerobowych organizmów związek  $N_2O$  względnie jego uwodnione połączenie  $(NOH)_2$  \*\*, jako najbliższy sąsiad hydroksylaminy.

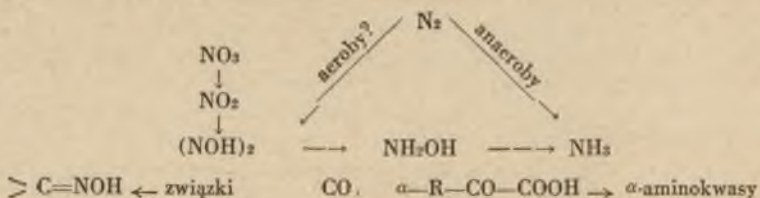
Dla silniejszego poparcia swoich wywodów *Virtanen* przytacza jeszcze jeden argument: jest rzeczą od dawna wiadomą, że molekularny wodór hamuje wiązanie wolnego azotu, ale tylko u bakterii tlenowych, jak: azotobakter, *Nostoc*, *Rhizobium* i in. natomiast bakterie beztlenowe, jak *Clostridium*, *Chromatium* i in., w swej działalności pobierania wolnego azotu przez wodór nie są hamowane. To hamujące działanie wodoru u aerobów tłumaczy *Virtanen* (1952) zjawiskiem hamowania przez współzawodnictwo (*inhibitory competition*), a mianowicie współzawodnictwem wodoru z azotem o tlen. Tak więc za koncepcją *Virtanena* przemawiałyby następujące przesłanki: 1) w produktach wiązania wolnego azotu przez tlenowce znaleziono hydroksylaminę, a u beztlenowców amoniak z wykluczeniem

\* Środowisko odżywcze rośliny.

\*\*  $OH-N=N-OH$ .

hydroksylaminy, 2) wodór hamuje wiązanie wolnego azotu tylko u aerobowych organizmów, natomiast u anaerobów tego zjawiska nie stwierdzono.

Na podstawie powyższych danych *Virtanen* kreśli następujący schemat wiązania cząsteczkowego azotu przez bakterie tlenowe i beztlenowe:



Według tego schematu pierwszym produktem wiązania wolnego azotu u tlenowców byłby produkt utlenienia  $\text{N}_2$ , natomiast u anaerobów produkt redukcji  $\text{N}_2$ . Kluczowym związkiem byłaby nie tylko hydroksylamina, ale także i amoniak powstały przez redukcję hydroksylaminy. O powstawaniu aminokwasów: asparaginowego z hydroksylaminy, a kwasu glutaminowego z amoniaku decydowałaby obecność ketokwasu; w pierwszym przypadku kwasu szczawio-octowego, w drugim ketoglutazarowego, zależnie od tego, jakim w danym momencie dysponuje organizm (s. 78).

Gdyby teoria *Virtanena* okazała się słuszną, to luka między  $\text{N}_2$  a  $\text{NH}_3$  (na którą zwróciłam uwagę omawiając badania *Wilsona*) byłaby w myśl tej teorii zapełniona.

Całkiem odmiennie zapatruje się na sprawę mechanizmu wiązania wolnego azotu *Prianisznikow*; według niego nie jest rzeczą ważną, czy kluczowym produktem wiązania cząsteczkowego azotu jest amoniak czy hydroksylamina, ale rzeczą pierwszorzędnej wagi byłoby podpatrzenie przyrody, w jaki sposób pod względem katalitycznym odbywa się to wiązanie. Byłaby to wspaniała wskazówka dla przemysłu, który jak dotąd nie zna metody wiązania molekularnego azotu w takich warunkach jak rośliny motylkowe czy inne organizmy uzdolnione do tych funkcji, tj. w normalnej temperaturze i pod normalnym ciśnieniem.

Jak więc wygląda aparat enzymatyczny, który katalizuje procesy wiązania wolnego azotu? System ten, objęty ogólną nazwą „nitrogenazy“, jest według *Fiedorowa* (1946) wspólny całej rodzinie bakterii korzystających z atmosferycznego azotu, a to na tej podstawie, że czynniki takie jak tlenek węgla, hamują wiązanie tego azotu u wszystkich tego typu organizmów zarówno tlenowych, jak i beztlenowych, symbiotycznych i wolno żyjących. Według *Fiedorowa* w skład tego systemu wchodzi grupa karboksylowa, aminowa i karbonilowa, i właśnie ta ostatnia grupa bierze, według niego, bezpośredni udział w pobieraniu wolnego azotu dając w rezultacie amoniak i aminokwas.

Według badań z ostatnich lat ściśle z nitrogenazą jest związany jeszcze inny enzym — hydrogenaza, która specyficznie aktywuje molekularny wodór. Jej obecność stwierdzono w azotobakterze i innych niedawno odkrytych bakteriach zarówno tlenowych, jak i beztlenowych, uzdolnionych do pobierania azotu atmosferycznego, i na tej podstawie wysunięto przypuszczenie, że wszystkie organizmy zawierające hydrogenazę są potencjalnymi nosicielami sił, które je uzdolniają do korzystania z cząsteczkowego azotu. Jednakże, jak dotychczas, nie udało się wykryć hydrogenazy ani w brodawkach korzeniowych roślin motylkowych, ani w ich bakteriach symbiotycznych. Mimo to *Wilson* (1952) jest zdania, że brak hydrogenazy w brodawkach czy ich bakteriach bynajmniej nie dowodzi jej absolutnej nieobecności w systemie rośliny-bakterie. Według niego hydrogenaza jest tak ściśle zespolona z samym procesem wiązania wolnego azotu, że znika natychmiast, gdy

tylko czynne brodawki korzeniowe odetniemy od ich macierzystego korzenia lub choćby tylko uszkodzimy. Dowodem takiej łączności byłby zaobserwowany fakt, że azot saletry hamuje wszystkie reakcje, które katalizuje hydrogenaza, a azot molekularny tego działania nie wywiera.

Jeżeli jednak nie mamy pewności co do obecności hydrogenazy w brodawkach, to mamy niezbitą pewność, że istnieje tam inny system, którego roli w procesach wiązania wolnego azotu jeszcze nie rozumiemy. Rolę tego systemu spełnia czerwony barwnik, który według *Keilina* (1945) jest hemoglobina identyczną z hemoglobina krwi zwierząt kręgowych, a według *Virtanena* (1952) substancją tylko do hemoglobiny ogromnie zbliżoną, a to z powodu odmiennego składu aminokwasów komponenty białkowej. Gdy tylko na nowo odkryto barwnik czerwony w brodawkach (na nowo — bo przecież już *Prazmowski* pisał o „różowo mięsnym“ zabarwieniu brodawek grochu w okresie jego działalności symbiotycznej), *Virtanen* natychmiast wysunął koncepcję, że rola tego barwnika polega na tym, że jest on nosicielem i przenośnikiem tlenu dla bakterii uwieczonych w brodawkach. Jednak koncepcję tę obalił *Smith* (1948) na podstawie swoich badań, w których wykazał, że stopień pobierania tlenu przez czynne i nieczynne brodawki (to jest niezdolne do wiązania wolnego azotu i nie produkujące czerwonego barwnika) jest jednakowy i że przeprowadzenie znajdującego się w brodawkach barwnika w tlenkowęglową hemoglobinę (przez co traci zdolność katalizowania wiązania wolnego azotu) nie ma wpływu na pobieranie tlenu przez brodawki korzeniowe.

Obecnie *Virtanen* (1952) wysuwa inne przypuszczenie; być może rola czerwonego barwnika polega na tym, że drobina azotu atmosferycznego łączy się z jodem żelaza hemoglobiny:  $Hb-Fe-N_2$ , przez co międzycząsteczkowe wiązanie azotu zostaje rozluźnione, a cała drobina zyskuje w ten sposób na aktywności, albo: że barwnik ten bierze udział w utlenieniu molekularnego azotu przy równoczesnej zmianie ładunku elektrycznego swego żelaza. Tej koncepcji przeczą jednak badania *Keilina*, który w brodawkach znalazł tylko hemo- i oksyhemoglobinę, natomiast w żadnym razie nie stwierdził methemoglobiny. *Fiodorow* reprezentuje pogląd nielicznych badaczy, którzy negują udział czerwonego barwnika brodawek w funkcjach wiązania wolnego azotu, a to na tej podstawie, że: 1) akacja i olcha (*Alnus glutinosa*) również korzystają z azotu atmosfery za pośrednictwem brodawek, a jednak nie produkują hemoglobiny, że 2) azotobakter i inne wolno żyjące bakterie obchodzą się bez hemoglobiny w swych czynnościach pobierania wolnego azotu. Akacja i olcha istotnie wiążą azot bez udziału hemoglobiny, ale metabolizm azotowy np. olchy jest odmienny od azotowej gospodarki roślin motylkowych i brodawki korzeniowe roślin motylkowych są bogate w kwas glutaminowy i asparaginowy, gdy tymczasem w brodawkach olchy brak jest tych aminokwasów, natomiast produkują one duże ilości l-cytruliny, której z kolei w brodawkach roślin motylkowych nie znajdujemy. W brodawkach olchy nie ma hemoglobiny, ale za to produkują one około 15 razy więcej różnych połączeń hematynowych niż korzenie innych roślin; być może połączenia te spełniają w brodawkach olchy tę samą rolę co i hemoglobina brodawek roślin motylkowych. Jakkolwiek olchę zakażają odmienne od *Rhizobium* organizmy symbiotyczne, to jednak mimo to przypuszcza się, że mechanizmy tych roślin są bardzo do siebie zbliżone.

Jeżeli wciąż jeszcze brak nam dostatecznych dowodów na udział czerwonego barwnika w procesach wiązania wolnego azotu, to jednak nie mogą nas nie intrygować fakty, że: 1) w wielkiej rodzinie roślin tylko motylkowe produkują hemoglobinę, 2) że jest ona niezawodnym wskaźnikiem na przebiegające procesy wiązania wolnego azotu, ponieważ tylko aktywne szczepy *Rhizobium* wespół z rośliną syntetyzują ten barwnik, 3) że barwnik ten zamienia się w zielony, z chwilą gdy procesy te ustają (co jest połączone z pęknięciem pierścienia porfiryнового hemoglobiny), 4) że tlenkowęglowa hemoglobina brodawek hamuje wiązanie wolnego

azotu podobnie jak tlenkowęgłowa hemoglobina krwi blokuje rozprawdanie tlenu po organizmie zwierząt, że wreszcie 5) nieodzownym warunkiem syntezy czerwonego barwnika w brodawkach jest nie tylko obecność w pożywce żelaza, ale także i miedzi, znów jak w świecie zwierzęcym. Na powyższe pytania i wiele innych, dotyczących mechanizmu wiązania wolnego azotu, nie znajdujemy jeszcze odpowiedzi, nie umiemy przecież jeszcze rozstrzygnąć kwestii poruszonej na początku tego referatu — czy mechanizm ten jest uniwersalny dla wszystkich tego typu organizmów? Dlatego problem mechanizmu wiązania wolnego azotu wymaga dalszych wnikliwych i cierpliwych badań zarówno biochemików, jak i mikrobiologów i fizjologów. Dopiero takie zespolone badanie problemu może przynieść definitywne jego rozwiązanie.

#### PIŚMIENNICTWO

*Blom I.*: Zentralbl. f. Bakt., 1931, II Abt., 84. — *Burris R. H., Orcutt F. S., Umbreit W. W.*: Według *Advances in Enzymology*, 1952, V. XIII. N. J. — *Demolon i Dunez A.*: *Ann. Agronom.*, 1938, 8. — *Enders G.*: *Annal.*, 1935, 518, 109. — *Fiodorow M. W.*: *Mikrobiologia* 1946, t. XV, 6. — *Fiodorow M. W.*: *Biologiczeskaja fiksacja azota atmosfery*, 1952 Moskwa. — *Keilin D. i Wang Y. A.*: *Nature*, 1945, 155, 3930. — *Kostyczew S.*: *Biochemische Untersuchungen über Azotobacter*, 1926. — *Prianisznikow A. A.*: *Azot w życiu roślin*, P. I. W. R., 1945. — *Smith J. D.*: *Biochemical Journal*, 1948, 44. 5. — *Virtanen A. I.*: *Chemica* 43; *Some Aspects of Biological Nitrogen fixation*, 1952. — *Wilson P. W.*: *Advances in Enzymology*, V. XIII. N. J., *The comparative biochemistry of Nitrogen fixation*, 1952. — *Winogradski S.*: *Ann. Inst. Pasteur*, 1936, 56.

M. KAŃSKI, O. SAKŁAWSKA-SZYMONOWA, M. SZYMONA

TRANSAMINACJA ASPARAGINOWO-ALFA-KETOGLUTAROWA  
(ASPARAGINOWO-GLUTAMINOWA) U *MYCOBACTERIUM PHLEI*

W porównaniu z obszernym piśmiennictwem dotyczącym zagadnienia transaminacji w tkankach zwierzęcych istnieje raczej niewielka liczba prac doświadczalnych poświęconych sprawie transaminacji u drobnoustrojów.

Od czasu pierwszej publikacji *Lichsteina* i *Cohana* z 1945 r. (1) dopiero ostatnie lata przyniosły kilka prac z tej dziedziny (2, 3, 4 i 5).

W dostępnym piśmiennictwie nie spotkał się wzmianek na temat transaminacji u prątków kwasoodpornych poza przypuszczeniem wysuniętym przez *Edsona* (6), że zużywanie kwasu glutaminowego przez zawiesiny *Mycobacterium* może być związane z procesem transaminacji.

Celem naszej pracy było wykrycie transaminazy asparaginowo-alfa-ketoglutarowej (asparaginowo-glutaminowej wg nomenklatury anglosaskiej), katalizującej przeniesienie grupy aminowej z kwasu asparaginowego na kwas alfa-ketoglutarowy, w dezintegratach acetonowych i zawiesinach komórkowych *Mycobacterium phlei*.

Do badań nad zawiesinami hodowaliśmy prątki na płynnym podłożu syntetycznym wg *Syma* (7), natomiast do dezintegracji używaliśmy hodowli rosnących na pożywce stałej *Lowensteina*. Do naczynek inkubacyjnych dodawano zawiesinę prątków lub zawiesinę proszku acetonowego, odpowiednie ilości kwasu asparaginowego i kwasu alfa-ketoglutarowego rozpuszczone w buforze fosforanowym o pH 8,3. Inkubację prowadzono w warunkach aerobowych w temp. 37° do 3 godzin (dezintegraty acetonowe) i do 72 godzin (zawiesiny komórkowe), po czym inkubację przerywano przez dodanie do mieszaniny 20% kwasu trójchlorooctowego. Przesączone próbki poddawano analizie chromatograficznej bibułowej wstępującej jednokierunkowej.

Stwierdzono zwiększenie się wielkości i natężenia plamy kwasu glutaminowego na chromatogramach w miarę czasu trwania inkubacji w porównaniu z próbkami kontrolnymi, co dowodzi obecności aktywnej transaminazy asparaginowo-alfa-ketoglutarowej. Wydaje się, że proces transaminacji zachodzi szybciej w dezintegratach acetonowych niż w zawiesinach komórkowych *Mycobacterium phlei*.

W dalszych doświadczeniach prowadzonych w warunkach aerobowych oraz w atmosferze azotu nie potwierdzono w odniesieniu do *Mycobacterium phlei* dawniejszego spostrzeżenia *Lichsteina* i *Cohana* o hamującym wpływie tlenu na aktywność transaminazy asparaginowo-alfa-ketoglutarowej.

Dodawanie przegotowanego wyciągu z mięśnia sercowego jako źródła koenzymu (8) do układu dezintegrat — substraty nie wzmagało aktywności badanej transaminazy, co zgadza się z doświadczeniami *Cammaraty* i *Cohana* (9), którzy wykazywali, że wyciągi z mięśni działają „aktywująco“ na różnorodne transami-

nazy jedynie ze względu na zawartość dość znacznych ilości kwasu glutaminowego, a nie z powodu obecności w nich fosforanu pirydoksalu.

#### PIŚMIENICTWO

- 1) Lichstein H. C. i Cohen P. P.: J. Biol. Chem., 1945, 157, 85. — 2) Gunsalus C. F. i Tonzetich J.: Nature, Londyn 1952, 170, 162. — 3) Rudman D. i Meister A.: J. Biol. Chem., 1953, 200, 591. — 4) Wiame J. M. i Storck R.: Biochim. et Biophys. Acta 1953, 10, 268. — 5) Altenbern R. A. i Housewright R. D.: J. Biol. Chem., 1953, 204, 159. — 6) Edson N. L.: Bacteriol. Rev., 1951, 15, 147. — 7) Sym E.: Medycyna Doświadczalna i Społeczna, 1946, nr 1/2. — 8) Kritzman M. G. i Samarina O. P.: Dokł. Ak. Nauk SSSR, 1948, 63, 171. — 9) Cammarata P. S. i Cohen P. R.: Biochim. et Biophys. Acta 1953, 10, 117.

MARIA BIELIŃSKA

## ZMIANY CHEMICZNE TOWARZYSZĄCE PRZEMIENNEMU OWOCOWANIU JABŁONI

(Doniesienie tymczasowe)

Od trzech lat prowadzone są w Instytucie Sadownictwa badania nad zmianami chemicznymi towarzyszącymi przemienemu owocowaniu jabłoni. Większość naszych odmian jabłoni owocuje co drugi rok. Walka z tym zjawiskiem jest jednym z kluczowych problemów w sadownictwie, którego rozwiązaniu poświęcono dużo uwagi w pracach badawczych Instytutu Sadownictwa i Zakładu Sadownictwa SGGW.

Nad zmianami chemicznymi występującymi przy przemienym owocowaniu prowadzono badania głównie w Związku Radzieckim i Stanach Zjednoczonych. Wnioski wyprowadzone na podstawie tych badań były jednak różnorodne i często sprzeczne. Na ogół wszyscy badacze przyjmują, że chodzi tu o wyczerpanie zasobów pokarmowych. Specjalną uwagę poświęcono związkom azotowym i węglowodanom. My również postanowiliśmy przede wszystkim prześledzić dynamikę azotu i węglowodanów (cukrów i skrobi) w liściach i pędach jabłoni owocujących i nie owocujących. Do doświadczenia wchodziły początkowo dwie, potem cztery odmiany: Grochówka, Wealthy, Antonówka, Fameuse, ogółem 21 drzew. Próbkę liści początkowo pobierano trzykrotnie, w okresie różnicowania się pąków kwiatowych, tj. od początku lipca do początku sierpnia, w następnych latach 4—5 razy w ciągu wegetacji: 1 — przed różnicowaniem się pąków kwiatowych, 2 i 3 — w okresie różnicowania się, 4 — przed opadnięciem liści.

Stwierdzono co następuje: w badanych przypadkach ogólna ilość związków azotowych w liściach z drzew owocujących była wyższa niż z nie owocujących. Różnica ta występowała nawet w obrębie jednego drzewa, wówczas gdy oberwano kwiaty z jednej jego połowy, skutkiem czego połowa drzewa owocowała, połowa nie. Wyraźny był również spadek zawartości azotu w ciągu wegetacji.

Tabela 1

Procentowa zawartość azotu ogólnego w suchej masie liści jabłoni odm. Grochówka 1951 r.

Numer porządkowy drzewa	D a t a			
	26. VII	22. VIII	18. IX	19. X
Drzewo 4 owocujące	2,60	2,57	2,39	1,92
Drzewo 5 owocujące	2,59	2,50	2,40	1,99
Drzewo 1 nie owocujące	2,33	2,26	1,91	1,82
Drzewo 2 nie owocujące	2,40	2,35	2,22	1,94
Drzewo 3 nie owocujące	2,45	2,35	2,12	1,75



Tabela 2

Procentowa zawartość azotu ogólnego w suchej masie liści jabłoni odm. Wealthy 1951 r.

Numer porządkowy	D a t a			
	27. VII	23. VIII	20. IX	20. X
Drzewo 1, część północna owocująca	2,44	2,32	2,21	brak danych
część południowa nie owocująca	2,37	2,28	1,93	1,70
Drzewo 2, część południowa owocująca	2,73	2,52	2,21	1,84
część północna nie owocująca	2,49	2,13	2,09	1,63

Owocowanie wpływało ponadto na przedłużenie okresu wegetacji, zmniejszenie powierzchni liści, a zwiększenie ilości aparatów szparkowych. Otrzymane wyniki z oznaczeń cukrów nie pozwalają, jak dotąd, na uchwycenie charakterystycznej regularności w ich ilościowym rozmieszczeniu.

W ostatnim roku badań przystąpiono do oznaczania azotu całkowitego i nierozpuszczalnego, opierając się na twierdzeniu *Ursulenki*, że na owocowanie zasadniczy wpływ ma zawartość substancji białkowych w stosunku do ogólnej ilości związków azotowych. Ponadto rozpoczęto badania nad zawartością składników popiołu.

SPRAWOZDANIE Z PRAC ZAKŁADU BIOCHEMII INSTYTUTU  
MATKI I DZIECKA W ZAKRESIE BIOCHEMII ROŚLIN

Zakład Biochemii Instytutu Matki i Dziecka w Warszawie zajmował się między innymi zagadnieniem ilościowego występowania kwasu askorbinowego w liściach niektórych roślin krajowych. Praca ta ma nie tylko znaczenie teoretyczne, lecz również ma na celu ewentualne znalezienie wśród surowców krajowych takiego naturalnego źródła witaminy C, które dałoby się wykorzystać przy zapobieganiu stanom hipowitaminozy, występującym dość często, zwłaszcza wśród dzieci.

Ogółem przebadano na zawartość kwasu askorbinowego około 50 gatunków roślin. Stosowano metodę miareczkowania za pomocą 2,6-dwuchlorofenoloindofenolu. Badania rozpoczęto wczesną wiosną. Trwały one do połowy sierpnia. Wybór roślin przeznaczonych do badania był początkowo przypadkowy, z tym że nie brano pod uwagę drzew iglastych, co do których wiadomo, że zawierają dużo kwasu askorbinowego. Już po pierwszych badaniach zauważono, że liście drzew liściastych zawierają na ogół więcej kwasu askorbinowego niż liście innych roślin zielonych, chociaż i tu zdarzały się wyjątki.

Zawartość kwasu askorbinowego we wczesnym okresie wegetacji (kwiecień-maj) była z reguły wyższa niż w okresie późniejszym.

Średnią zawartość poniżej 50 mg % w świeżej masie znaleziono w następujących roślinach: 1) Skrzyp polny (*Equisetum arvense*), 2) Przetacznik leśny (*Veronica officinalis*), 3) Podróżnik pospolity (*Cichorium intybus*), 4) Babka pospolita (*Plantago major*), 5) Ostrożeń polny (*Cirsium arvense*), 6) Mniszek pospolity (*Taraxacum officinale*).

Najliczniejszą grupę stanowiły rośliny o zawartości od 50—100 mg % kwasu askorbinowego: 1) Wrotycz pospolity (*Tanacetum vulgare*), 2) Podbiał pospolity (*Tussilago Farfara*), 3) Krwawnik pospolity (*Achillea millefolium*), 4) Bylica pospolita (*Artemisia vulgaris*), 5) Muchotrzew (*Spergularia*), 6) Trzykrotka paskowana (*Tradescantia zervina*), 7) Mak ogrodowy (*Papaver somniferum*), 8) Powój polny (*Convolvulus arvensis*), 9) Rozchodnik ostry (*Sedum acre*), 10) Ziemniak (*Solanum tuberosum*), 11) Komosa strzałkowata (*Chenopodium bonus Henricus*), 12) Rdest ptasi (*Poligonum aviculare*), 13) Pokrzywa zwyczajna (*Urtica dioica*), 14) Rumianek pospolity (*Matricaria chamomilla*), 15) Bławatek (*Centaurea cyanus*).

Kwas askorbinowy w ilościach 100—200 mg % zawierały: 1) Poziomka pospolita (*Fragaria vesca*), 2) Ognicha (*Sinapis arvensis*), 3) Mięta polna (*Mentha arvensis*), 4) Groch zwyczajny (*Pisum sativum*), 5) Fasola zwykła (*Phaseolus vulgaris*).

Kwas askorbinowy w ilościach 200—250 mg % występował wśród roślin bada-

nych jedynie w liściach roślin z rodziny motylkowatych (*Papilionaceae*): 1) Lucerna siewna (*Medicago sativa*), 2) Wyka płotowa (*Vicia saepium*), 3) Różne odmiany koniczyny (*Trifolium*).

Najbogatszymi w kwas askorbinowy okazały się liście chrzanu (*Cochlearia armoracia*), w których znaleziono 500—700 mg %, co znacznie odbiega od zawartości w innych roślinach.

Spośród krzewów przebadano liście czarnego bzu (*Sambucus nigra*), maliny (*Rubus idaeus*), jeżyny (*R. fruticosus*) oraz dzikiej róży (*Rosa canina*). Zawartość kwasu askorbinowego wynosiła w nich 99—250 mg %.

W liściach badanych drzew ilość kwasu askorbinowego była znaczna, gdyż przekraczała w miesiącach wiosennych 150 mg %, dochodząc nawet do 300 mg % (topola, osina).

Samo stwierdzenie dość dużych ilości kwasu askorbinowego w liściach badanych roślin nie było wystarczające dla celów praktycznych, gdyż liście nie nadają się do konsumpcji, poza tym brak jest ich w zimie i wczesną wiosną, kiedy najsilniej dają się odczuwać niedobory kwasu askorbinowego. Wobec tego poczyniono próby konserwacji liści jako możliwego źródła witaminy C również w miesiącach zimowych.

Badania rozpoczęto od suszenia jako najłatwiejszej metody konserwującej, nie wymagającej skomplikowanych urządzeń oraz pozwalającej liście proszkować lub pastylkować i używać jako preparat leczniczo-odżywczy. Można również sporządzać napary z wysuszonych liści w postaci herbatek lub używać je jako surowca do technicznego sporządzania koncentratów.

Zwykle suszenie niestety nie dawało pozytywnych rezultatów, gdyż zawartość kwasu askorbinowego w suszu była znikoma. Wobec tego postanowiliśmy przed suszeniem wprowadzić tak zwane blanszowanie lub siarkowanie. Czwarta metoda polegała na suszeniu w promieniach podczerwonych. Najlepsze rezultaty w zachowaniu kwasu askorbinowego otrzymaliśmy przy siarkowaniu. W liściach suszonych promieniami podczerwonymi i w liściach blanszowanych zawartość kwasu askorbinowego była także wyższa niż w liściach suszonych zwyczajnie. Dane te odnoszą się do przeliczenia na suchą masę.

Inną pracą o charakterze praktycznym, dotyczącą również witaminy C, było określanie jej zawartości w sokach jarzynowych i owocowych podawanych dzieciom w pierwszym roku życia. Chodziło o stwierdzenie, jaką realną wartość C-witaminową posiada sok zależnie od sposobu jego sporządzania i czasu przechowywania. Stwierdzono, że największe straty kwasu askorbinowego powstawały w okresie sporządzania soku, zwłaszcza jeżeli używano sprzętu metalowego (sita, tarki). Natomiast zawartość witaminy C w soku już sporządzonym spadała nieznacznie w czasie przechowywania w ciągu 1—3 godzin. Nie zauważono także znacznych różnic pomiędzy sokiem przechowywanym w temperaturze pokojowej i w lodówce. Z przebadanych 5 soków, które sporządzano z kalarepy, jabłek, marchwi, agrestu i porzeczek, najlepszym źródłem witaminy C okazały się soki z agrestu, kalarepy i porzeczek. Natomiast soki najczęściej praktycznie używane, tzn. marchwiowy i jabłkowy, miały mniejszą zawartość kwasu askorbinowego. Mieszanek sporządzanych z powyższych soków wykazywały niższą zawartość kwasu askorbinowego, niż wynikało to z obliczeń.

Trzecią pracą wykonywaną w zakładzie jest badanie składu chemicznego i wartości odżywczych niektórych grzybów krajowych. Do tego czasu opracowano pieczarki i piestrzenice. Oznaczono zawartość poszczególnych składników pokarmowych oraz wartość kaloryczną. Grzybami zainteresowano się nie tylko jako produktem żywnościowym, ale i ze względu na wysoką zawartość w nich pektyny, oraz na możliwość jednoczesnego wykorzystania białka i innych składników pokarmowych

grzybów wraz z pektyną, używaną w biegunkach dziecięcych. Interesujące było stwierdzenie w grzybach między innymi stosunkowo dużych ilości miedzi i cynku, które, jak wiadomo, wchodzi w skład niektórych enzymów (tyrozynaza, fenolaza, oksydaza kwasu askorbinowego). Wobec tego powstało zagadnienie, czy metale te znajdują się tylko w postaci składników enzymów, czy też w innej postaci. Dla rozwiązania tego problemu mamy zamiar wykonać równoległe oznaczenie aktywności enzymów i zawartości odpowiednich metali.

KRYSTYNA MICHALSKA

PRACE Z ZAKRESU BIOCHEMII GRZYBÓW I MYKOBAKTERII  
W ZAKŁADZIE BIOCHEMII INSTYTUTU GRUŻLICY W WARSZAWIE

Zagadnienia opracowywane przez Zakład Biochemii Instytutu Gruźlicy nie pozostają w ścisłym związku z tematyką obecnego sympozjum poświęconego biochemii roślin. Jednakże prace prowadzone ostatnio w zakładzie na temat biochemii grzybów i niektórych drobnoustrojów zajął się o problemy biochemii roślin, szczególnie w zakresie roślin niższych. Dlatego przedstawiam w skrócie sprawozdanie z tych prac i plan naszych prac na przyszłość, wychodząc z założenia, że drogą porozumienia się z innymi placówkami fizjologii i biochemii roślin możemy znaleźć pomoc w rozwiązaniu interesujących nas problemów.

Chodzi tu o kontynuowanie kierunku, nakreślonego w swoim czasie dla zakładów teoretycznych Instytutu Gruźlicy przez prof. E. Syma i rozpoczętego przez niego osobiście, mianowicie o bliższe zbadanie dobrze znanego i daleko sięgającego podobieństwa w metabolizmie grzybów i promieniowców z jednej strony, a mykobakterii z drugiej, istnienie którego w świetle nowszych prac wydaje się nie ulegać wątpliwości. Wymaga ono jednak szerszego opracowywania z zastosowaniem do tych obiektów ostatnich zdobyczy biochemii, w szczególności osiągnięć biochemii roślin.

Wspólne cechy grzybów i mykobakterii nie ograniczają się do podobieństwa morfologicznego, cech barwliwości (kwasooporności), pokrewieństwa filogenetycznego czy położenia systematycznego, lecz sięgają w głąb procesów fizjologicznych, przede wszystkim metabolicznych, u obu grup organizmów. Przy bliższym rozpatrzeniu okazuje się, że można znaleźć wiele wspólnych cech w biochemicznej charakterystyce i procesach przemiany u niższych grzybów, zwłaszcza u *Actinomycetes* i *Proactinomycetes* z jednej strony, a mykobakterii i mykokoków z drugiej.

Zagadnienie różnic i podobieństw biochemicznych tych dwóch grup taksonomicznych jest tak rozległe, że nie sposób zająć się nim w całości. Dlatego przede wszystkim wybraliśmy tylko jedną część tego zagadnienia, mianowicie problem zużytkowania substratów organicznych w płynnych hodowlach tlenowych. W przyszłości przy bezpośredniej współpracy pracowni mykologicznej i mikrobiologicznej Instytutu mamy zamiar zająć się również problemem zapotrzebowań odżywczych i czynników wzrostowych, wytwarzania pośrednich metabolitów, wpływu anaerobiozy i substancji chemoterapeutycznych i grzybobójczych na przemianę grzybów i mykobakterii.

Zagadnienie ilościowego zużytkowania substratów organicznych w badanych przez nas płynnych hodowlach grzybów i mykobakterii wymagało przede wszystkim wybrania metodyki odpowiadającej pracy porównawczej. Chodziło o metodę sumaryczną, ale nadającą się do porównywania metabolizmu ogólnego nawet przy różnych substratach dla poszczególnych gatunków. Metoda Syma (1), w której określa się wszystkie pierwiastki chemiczne, odpowiada tym wymaganiom w całości, ale

nie może być zastosowana do badań masowych ze względu na jej trudność techniczną. Metoda kalorymetryczna, stosowana przez *Tausona* (2), dotyczy przede wszystkim przemiany energetycznej, której badaniu oddaje niemałe usługi, ale nie zawsze może być stosowana do wyliczania wydajności materiałowej.

Wybraliśmy wobec tego tak zwaną metodę „deficytu tlenowego“, opracowaną w naszym zakładzie (3, 4). Metoda ta ze względu na swą szybkość, prostotę i niezależność od jakiegokolwiek aparatury może być z powodzeniem stosowana na szerszą skalę w doświadczeniach ilościowych nad przemianą grzybów, drobnoustrojów, pierwotniaków, jak przekonaliśmy się w wielu doświadczeniach, i możliwe, że znajdzie ona zastosowanie również w biochemii wyższych roślin.

Pod pojęciem deficytu tlenowego rozumiemy całkowitą ilość tlenu potrzebną do utlenienia danej substancji lub mieszaniny substancji organicznych do końcowych produktów utlenienia biochemicznego, tzn. węgla do  $\text{CO}_2$ , wodoru do  $\text{H}_2\text{O}$ , siarki do  $\text{SO}_3$  itd., przy czym tlen i azot odpowiednio się redukują do wody i amoniaku. Deficyt tlenowy poszczególnych związków, ich mieszanin oraz mieszanin naturalnych o znanym składzie pierwiastkowym może być wyliczony według prostych wzorów. Dla środowiska o nie znanym składzie została opracowana metoda chemiczna polegająca na utlenieniu kwasem jodowym, sprawdzona na wielu różnych związkach.

W powyższy sposób możemy oznaczać deficyt tlenowy podłoża przed szczepieniem lub po dowolnym czasie hodowli czy fermentacji oraz deficyt tlenowy powstającej biomasy. Wszystkie te wielkości wyrażane są w tych samych jednostkach — miligramach tlenu — co daje możliwość nie tylko porównywania ich między sobą, ale również ustalania ogólniejszych zależności.

Tak na przykład wyliczony dla wielu grzybów współczynnik ekonomiczny, tzn. masa powstałej grzybni w procentach od ilości użytego substratu wyraża się zwykle w jednostkach wagowych, co nie jest słuszne z tego względu, że ciało grzyba składa się przeważnie z substancji wielkocząsteczkowych, podczas gdy jako substraty mogą służyć substancje drobnocząsteczkowe. Po drugie, stawiając w mianowniku spadek substratu, czyli jego zużycie w jednostkach wagowych, nie uwzględniamy powstających metabolitów pośrednich, nie mówiąc już o tym, że korzystając tylko z metody oznaczeń wagowych musimy za każdym razem wprowadzać poprawkę na popiół zarówno grzybni, jak i podłoża.

Metoda deficytu tlenowego pozwala na wyeliminowanie tych trudności. Powstająca biomasa i zużyte substraty są wyrażane w tych samych jednostkach, ewentualnie powstające metabolity uwzględnia się przy oznaczaniu DT pożywki wzrostowej i to w tym większym stopniu, im mniej one uległy utlenieniu, wreszcie nie ma potrzeby określania popiołu, ponieważ obecność składników mineralnych do pewnych granic nie przeszkadza przy określaniu deficytu tlenowego.

W pracy, którą wykonuję obecnie (3), przeprowadziłam porównawcze oznaczenia współczynnika ekonomicznego następujących drobnoustrojów: *Streptomyces griseus*, szczepy 3475 i 134/6, hodowanych na pożywce Thornberry i Anderson oraz pożywce peptonem i wyciągiem mięsnym, *Aspergillus niger*, szczepy 23 i 27 na pożywce Doelger-Prescotte'a, *Penicillium chrysogenum* Q 176 na pożywce syntetycznej z laktozą, kwasem octowym, azotanem amonu i sodu, fosforanami i solami magnezu, żelaza, cynku, miedzi, oraz na *Mycobacterium phlei* szczep 3 i *Mycobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv na pożywce Sautona. Kultury prowadzono w warunkach hodowli powierzchniowej. W pierwszych doświadczeniach używano do oznaczeń współczynnika ekonomicznego metody wagowej i metody specyficznej dla danego substratu, ażeby porównać wyniki ilościowe otrzymane przy ich użyciu z wynikami otrzymanymi metodą deficytu tlenowego. Doświadczenia pozwoliły stwierdzić, że współczynnik ekonomiczny wyliczony metodą deficytu tlenowego osiąga wartości przeważnie niższe niż wyliczony innymi metodami, chociaż nie na wszystkich obiektach. Ponieważ jednak wyniki uzyskane metodą deficytu tlenowego są

powtarzalne w danych warunkach doświadczalnych i nie wykazują tak znacznych odchyień między równoległymi hodowlami, jak to ma miejsce przy użyciu innych metod, w doświadczeniach późniejszych wybrałam metodę deficytu tlenowego, tym bardziej że odznacza się ona prostotą manipulacji i stałością warunków, w których przeprowadza się analizę. Okazało się przy tym, że mykobakterie stanowią bardzo dobry obiekt doświadczalny dla oznaczania współczynnika ekonomicznego opisaną metodą.

W pracy *Odrzywolskiej* (4), będącej również w toku, metoda deficytu tlenowego znalazła zastosowanie przy wyliczeniu szybkości reakcji zużywania substratu przez grzyby i mykobakterie. Jest przy tym możliwe wyliczenie stałej szybkości reakcji w różnych okresach czasu dlatego, że zarówno zmniejszenie ilości substratu, jak i przyrost biomasy wyraża się w tych samych jednostkach.

Drugim kierunkiem prac z zakresu biochemii grzybów wykonywanych w naszym zakładzie są badania nad działaniem antybiotyków i substancji chemoterapeutycznych na przemianę pośrednią.

W opublikowanej już pracy „Wpływ streptomycyny na wytwarzanie kwasu cytrynowego przez *Aspergillus niger*“ (5) badałam wytwarzanie kwasu cytrynowego w obecności różnych stężeń streptomycyny, wychodząc z założenia, że teoria *Umbreita*, tłumacząca działanie streptomycyny hamowaniem syntezy kwasu cytrynowego, nie ma ogólnego zastosowania.

Na czterech szczepach *A. niger* hodowanych na pożywce *Doelger-Prescotte'a* ustaliłam, że wydajność kwasu cytrynowego nawet w obecności 5000 mcg/ml streptomycyny jest tego samego rzędu, jak w kontroli bez streptomycyny. Fakt możliwości wytwarzania kwasu cytrynowego w obecności streptomycyny stwierdził również *Blakeley* na *Mycobacterium phlei*, wskutek czego *Umbreit* zmodyfikował ostatnio w sposób zasadniczy swoją hipotezę.

Dla uzupełnienia podam, że Zakład Mikrobiologii Instytutu Gruźlicy i pracownia mykologiczna przeprowadzają badania w kierunku zbliżonym do biochemii grzybów, zwłaszcza w zakresie antybiotyków. Ostatnio *Kostrzeński* (6) opublikował swoje spostrzeżenia nad szczepem *A. niger*, działającym antagonistycznie wobec prątka gruźlicy, a *Krakówka* (7) — nad zaobserwowanym przez niego zjawiskiem, polegającym na odwrotnym, tzn. nie hamującym, a pobudzającym działaniu przesączów hodowli grzyba *Candida albicans* na prątki kwasooporne, którego istota nie jest jeszcze znana. Możliwe, że odgrywa tu rolę powstawanie pewnych katabolitów, stanowiących czynnik pobudzający wzrost prątków kwasoopornych.

Z Zakładu Biochemii wyszła również praca *Tysarowskiego* (8) nad otrzymywaniem asparaginy z kiełkujących w ciemności nasion białego łubinu, co ma znaczenie praktyczne dla uruchomienia krajowej produkcji asparaginy, będącej składnikiem wielu pożywek używanych między innymi do wytwarzania tuberkuliny i szczepionek przeciwgruźliczych.

## PIŚMIENNICTWO

- 1) *Sym E.*: Med. Doświadcz. i Społ. 1947, 25, 295. — 2) *Tauson W.*: Osnownyje po'łożenia rastitielnoj bioenergetiki, 1950. — 3) *Michalska K.*: Oznaczanie współczynnika ekonomicznego drobnoustrojów metodą deficytu tlenowego, 1954 (w druku). — 4) *Odrzywolska A.*: Zastosowanie metody deficytu tlenowego do oznaczania szybkości zużycia substratów, 1954 (w druku). — 5) *Michalska K.*: Med. Doświadcz. i Mikrobiol. 1953, 5, 113. — 6) *Kostrzeński W.*: Gruźlica, 1953, 21, 441. — 7) *Krakówka P.*: Gruźlica 1953, 21, 435. — 8) *Tysarowski W.*: Gruźlica, 1951, 19, 330.

F. B. STRAUB

## O ENZYMATYCZNEJ SYNTEZIE GLUTAMINY

(odczyt wygłoszony w PAN dn. 3. IV. 1953 r.)

Chciałbym tu omówić dwa kierunki naszych prac w Zakładzie Chemii Uniwersytetu Medycznego w Budapeszcie. Oba kierunki mają za cel zbadanie biochemicznej syntezy glutaminy z kwasu glutaminowego i amoniaku. Dawno już poznano dużą szybkość syntezy amidów w roślinach i podkreślano znaczenie amidów kwasów dwukarboksylowych jako rezerwy związanego azotu. Później odkryto syntezę amidów w ustroju zwierzęcym i wykazano ich znaczenie w reakcjach detoksykacji.

W świecie roślinnym w warunkach, gdy roślina może gromadzić materiał zapasowy, jak np. w kielkujących nasionach *Lupinus albus*, stwierdza się często nagromadzenie asparaginy. Kiedy rozpoczyna się dalszy rozwój, ten materiał zapasowy zostaje zużyty. Przyjęto więc, że za pomocą tego łatwo syntetyzowanego aminokwasu powstają tylko rezerwy grup aminowych.

Stwierdzono, że w organizmie zwierzęcym asparagina nie odgrywa takiej roli, natomiast glutamina stanowi szczególnie dużą część aminokwasowego azotu resztkowego krwi. W tkankach, jak i w moczu występuje również kwas glutaminowy, głównie w postaci glutaminy. Po usunięciu wątroby lub po silnym drażnieniu zwiększa się zawartość  $\text{NH}_3$  w mózgu, a w związku z tym również zawartość glutaminy. Doświadczenia *in vitro* wykazują, że amoniak ma bardzo silne działanie trujące na tkankę mózgową i że działanie to można usunąć przez dodanie kwasu glutaminowego. Osiągnięto też poważne kliniczne wyniki, okazało się bowiem, że kwas glutaminowy znacznie hamuje częstość drgawek o typie epileptycznym w *petit mal*. Działanie to łatwo wytłumaczyć powstawaniem glutaminy i usunięciem w ten sposób amoniaku.

Na wstępie chciałbym jeszcze wspomnieć, że *Krebs* wykazał charakterystyczne działanie kwasu glutaminowego, a mianowicie jego udział w utrzymywaniu stężenia potasu w skrawkach mózgowych badanych *in vitro*.

Badania nad syntezą glutaminy podjęliśmy nie tylko dlatego, że uważaliśmy wyżej wymienione fakty za interesujące i warte bliższego zbadania, ale również dlatego, iż naszym zdaniem synteza glutaminy jest punktem wyjściowym do syntezy białka. Znane są już doświadczenia, w których *in vitro* otrzymuje się syntezę związków o typie peptydów.

Wśród tych reakcji synteza glutaminy jest jedyną reakcją, która wchodzi w skład normalnego metabolizmu. Nie chcę teraz zaczynać dyskusji na temat możliwości udziału tej reakcji w syntezie białka. Wspominam tu jedynie te luźne rozważania, ponieważ na ich właśnie tle powstało nasze zainteresowanie dla syntezy glutaminy.



## I. SYNTEZA GLUTAMINY W NASIONACH *LUPINUS ALBUS*

Prace mojego współpracownika *G. Dënese* (1) na oczyszczonych systemach z wątroby i *Lupinus albus* posunęły sprawę wyjaśnienia mechanizmu syntezy glutaminy.

*Speck* (2) i równocześnie *Leuthardt* i *Buyard* (3) stwierdzili, że wyciągi sporządzone z proszku acetonowego z wątroby tworzą w obecności ATP glutaminę z kwasu glutaminowego i amoniaku. Syntezę tę można łatwo śledzić w ten sposób, że do wyciągów dodaje się kwasu glutaminowego i hydroksyloaminy. W obecności ATP powstaje kwas glutamylhydroksamowy, który łatwo da się oznaczyć kolorymetrycznie. Sporządzaliśmy enzym z nasion *Lupinus albus*, które kiełkowały 5 do 6 dni przy zwyczajnym laboratoryjnym oświetleniu. Po roztarciu materiału wyciska się płyn, którego aktywność enzymatyczną można zwiększyć 20-krotnie przez strącanie w pH 5,2 i 4,2.

Syntezę glutaminy za pomocą tego enzymu mierzono po inkubacji 1 lub 2-godzinnnej przy pH 6,5 w temp. 30°. Powstały kwas glutamylhydroksamowy oznaczano kolorymetrycznie w przesączach trójchlorooctowych. Znaleźliśmy oczekiwany stosunek stechiometryczny: przy powstaniu 1 mola kwasu glutamylhydroksamowego uwalnia się 1 mol fosforanu nieorganicznego.

Że chodzi tu rzeczywiście o ferment syntetyzujący glutaminę, stwierdziliśmy w ten sposób, iż w analogicznych warunkach inkubowaliśmy zwiększoną ilość fermentu z ATP, kwasem glutaminowym i amoniakiem. Z mieszaniny inkubowanej wyosobniliśmy glutaminę, którą zidentyfikowaliśmy chromatografią bibułową i analizą chemiczną. Enzym jest specyficzny dla naturalnego kwasu glutaminowego, nie działa na kwas D-glutaminowy, jak również jest nieczynny względem kwasu pteroiłoglutaminowego, kwasu N-acetylo-glutaminowego i N-karbobenzoksyglutaminowego. Te ostatnie wyniki dowodzą, że enzym wymaga wolnej grupy aminowej w kwasie glutaminowym.

Bardzo ważny jest fakt, że enzym ten katalizuje reakcję kwasu glutaminowego nie tylko z amoniakiem, ale również z innymi aminami, jak hydroksyloaminą i hydrazyną. Widać to z wyników podanych w tab. 1, gdzie działanie enzymu można było mierzyć ilością odszczepionego fosforanu, ponieważ enzym ten nie posiada aktywności ATP-azy.

Tabela 1

	Powstały fosforan nieorganiczny w $\mu$ M
Kwas glutaminowy bez dodatku aminy	0,2
Kwas glutaminowy z chlorkiem amonowym	6,0
Kwas glutaminowy z hydroksylaminą	4,6
Kwas glutaminowy z hydrazyną	4,6

Enzym jest nieaktywny w nieobecności jonów dwuwartościowych. Najlepiej aktywują jony  $\text{Co}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$  i  $\text{Mn}^{++}$ . Jony kobaltu najsilniej aktywują w stężeniu 0.005 M, podczas gdy dla maksymalnej aktywacji przez jony Mg potrzeba dwa razy silniejszego stężenia (ryc. 1).

Badaliśmy dokładnie mechanizm tej syntetyzującej reakcji. Wcześniejsze prace nad enzymem występującym w wątrobie wskazywały na możliwość, że najpierw w reakcji kwasu glutaminowego z ATP powstaje  $\gamma$ -acylofosforan kwasu glutaminowego, który dopiero następnie reaguje z amoniakiem. Nie udało się jednak wykazać w mieszaninach inkubowanych acylofosforanu. Badania nasze w tym kierunku nie dały również wyników — nie wykazaliśmy acylofosforanu podczas syntezy pod wpływem oczyszczonego enzymu z łubinu. Sporządziliśmy syntetyczny  $\gamma$ -acylo-

fosforan kwasu glutaminowego i za pomocą jego stwierdziliśmy, że syntetyczny  $\gamma$ -acylofosforan kwasu glutaminowego w ciągu paru minut reaguje nie enzymatycznie z amoniakiem lub hydroksoaminią, dając glutaminę lub kwas glutamylhydroksamowy. Można więc właściwie przyjąć, że enzym nie katalizuje syntezy amidu, tylko syntezę glutamyl- $\gamma$ -acylofosforanu, który jednakże w mieszaninie reagującej nie nagromadza się w ilościach dających się oznaczyć.

Jeżeli to przypuszczenie jest słuszne, to wydaje się możliwe, że enzym, który określamy jako syntetyzujący glutaminę, bierze również udział w innych procesach syntetycznych. I tak np. Bloch (4) otrzymał z proszku wątrobowego preparat enzymatyczny, który przeprowadzał syntezę glutationu w obecności ATP, kwasu glutaminowego i cysteinylglicyny. Badaliśmy ten preparat enzymatyczny i stwierdziliśmy, że w obecności hydroksoaminy wytwarza on kwas glutamyl- $\gamma$ -hydroksamowy. Dlatego wydaje się nam prawdopodobne, że synteza  $\gamma$ -peptydów, potrzebna do syntezy glutationu, katalizowana jest przez ten sam enzym. Tu również powstaje najpierw glutamyl- $\gamma$ -acylofosforan, który następnie przy udziale innego enzymu reaguje z dwupeptydem  $\gamma$ -cysteinylglicyną, dając glutation.

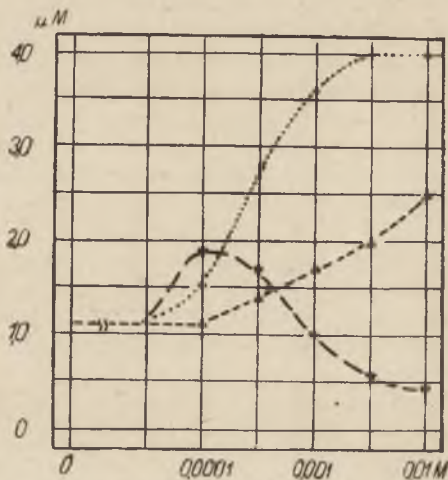
Wiadomo, że nasiona *Lupinus albus* dzięki dużej zawartości asparaginy służą do przemysłowego otrzymywania asparaginy. Glutamina zaś występuje w tych nasionach tylko w małych ilościach. Dlatego przypuszczano, że w *Lupinus albus* synteza asparaginy jest dużo silniejsza niż synteza glutaminy.

Nasze doświadczenia wykazały, że nasiona *Lupinus albus* przeprowadzają syntezę asparaginy nie wprost, lecz drogą pośrednią. Wyciągi z tych nasion syntetyzują glutaminę, ale nie syntetyzują asparaginy. Wyciągi te zawierają przy tym drugi enzym, który katalizuje transamidację z glutaminy na kwas asparaginowy. Stan równowagi tej reakcji enzymatycznej jest przesunięty na korzyść asparaginy i to jest przyczyną występowania w nasionach łubinu tak znacznej ilości asparaginy. W świetle powyższego należy uważać asparaginę za rezerwę grup amidowych leżącą nie w głównym szlaku przemian, lecz na torze bocznym. Sytuacja jest tu podobna jak w mięśniach i w innych tkankach pomiędzy ATP a fosfokreatyną. Fosfokreatyna powstaje przez transfosforylację z ATP i jest rezerwą makroergicznymi związków fosforanowych, jednak nie powstaje ani nie rozkłada się przez bezpośrednią reakcję swych składników.

## II. SYNTEZA GLUTAMINY W METABOLIZMIE SZAREJ SUBSTANCJI \*

H. A. Krebs (6) zauważył, że skrawki z szarej substancji mózgu szczurów i morskich świnek *in vitro* w obecności tlenu i glikozy, w temp. 37° oddają potas do płynu, w którym są zawieszane. Utratę potasu można zahamować tylko przez doda-

\* Badania te przeprowadzili w naszym zakładzie dwaj aspiranci — G. Acs i R. Balázs (5).

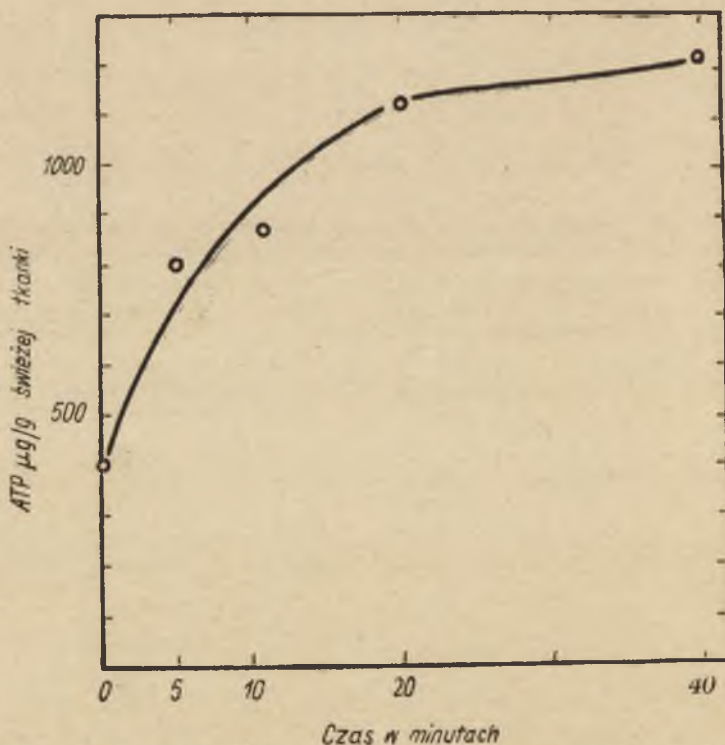


Ryc. 1. Wpływ jonów  $Co^{++}$ ,  $Mg^{++}$  i  $Mn^{++}$  na syntezę amidu.  
 Synteza kwasu hydroksamowego w obecności jonów kobaltu .....  
 Synteza kwasu hydroksamowego w obecności jonów magnezu .....  
 Synteza kwasu hydroksamowego w obecności jonów manganu .....  
 Na osi rzędnych — powstały kwas hydroksamowy w mikromolach. Na osi odciętych — stężenie jonów w M.

nie kwasu glutaminowego. Badaliśmy i całkowicie potwierdziliśmy ten fakt. Ponieważ w naszych pracach nad zawartością potasu w ludzkich krwinkach znaleźliśmy zależność pomiędzy ATP a poziomem potasu w komórkach, chcieliśmy na tym materiale doświadczalnym zbadać wpływ kwasu glutaminowego na zawartość ATP w komórkach. Posługując się naszą opracowaną przed paru laty metodą oznaczania ATP (7) łatwo było zrobić seryjne oznaczanie ATP, ponieważ do tej metody wystarczają używane zwykle małe skrawki tkanki.

Moim zdaniem zawartość ATP w komórkach jest miarą ich biologicznej wydolności. Jest już przecież rzeczą dobrze wiadomą, że wszystkie poznane procesy przemian dostarczające energii — w końcu wytwarzają ATP, i że wszystkie czynności zużywające energię, jak chemiczne syntezy, praca mięśniowa lub praca osmotyczna, zużywają ATP. Gdy spada zawartość ATP w komórce, traci ona zdolność wykonywania swych funkcji. Pogląd ten zgadza się bardzo dobrze ze znanym faktem, że komórki szarej substancji mózgowej po krótkim okresie anaerobiozy nie mogą podjąć swych funkcji i równolegle z tym stwierdza się, że po krótkiej anaerobiozie skrawki mózgowe zawierają już bardzo mało ATP. Z wielu doświadczeń wiadomo, że prawdziwą fizjologiczną zawartość ATP w szarej substancji mózgu można oznaczyć tylko wtedy, jeżeli głowę zwierzęcia natychmiast po dekapitacji wkłada się do ciepłego powietrza. Jeżeli najpierw otworzy się czaszkę i jak najszybciej wyjmie mózg, a dopiero wtedy odbiła lub wrzuci do ciepłego powietrza — to już znajduje się dużo mniejsze ilości ATP. Dla spreparowania skrawków tkankowych potrzeba co najmniej 5 minut. Już w ciągu tego czasu zawartość ATP spada na pewien ułamek zawartości pierwotnej.

Ta strata ATP jest odwracalna, ale tylko w tym przypadku, gdy się skrawki



Ryc. 2. Resynteza ATP w skrawkach z mózgu morskiej świnki, w obecności 100 mg<sup>o</sup>/<sub>o</sub> glikozy i 100% O<sub>2</sub>, temperatura 38°.

tkankowe wytrząsa w obecności czystego tlenu w temp. 37<sup>o</sup>, w roztworze Krebsa-Henseleita-Ringera z dodatkiem glikozy. W tym przypadku stopniowo wzrasta zawartość ATP, aż osiągnie poziom wyjściowy. Jeżeli skrawki tkankowe w tym środowisku oddychają, mogą ten wyjściowy maksymalny poziom ATP utrzymać (ryc. 2).

Jeżeli przeprowadza się doświadczenie w powietrzu zamiast w atmosferze tlenu, to stwierdza się zwolnioną i niezupełną resyntezę ATP. W warunkach beztlenowych nie stwierdza się w ogóle resyntezy. Jeszcze bardziej interesujący jest fakt, że żaden inny substrat poza glikozą nie może zapewnić maksymalnej zawartości ATP w szarej substancji. Widać to jasno z doświadczenia podanego w tab. 2, w którym zamiast glikozy dodawano do skrawków inne związki znane jako dobre substraty. Substraty te są wprawdzie przez skrawki silnie zużywane i praktycznie powodują takie samo zwiększenie zużycia tlenu co glikoza.

Doświadczenie to pozwala wyciągnąć dwa ważne wnioski. Po pierwsze, że zużycie tlenu nie jest dobrą miarą wytwarzania energii, zawartość ATP jest dużo lepszą miarą. Po drugie, doświadczenie to wykonane metodami biochemicznymi daje — o ile mi wiadomo po raz pierwszy — dowód na od dawna znane doświadczenie fizjologiczne, że glikoza jest *par excellence* substratem dla tkanki mózgowej.

Następnie badaliśmy, jak zachowuje się poziom ATP, gdy utrata potasu zostaje zahamowana przez kwas glutaminowy. Wystarcza już stężenie 0,01 M kwasu glutaminowego dla utrzymania tego efektu. Zauważyliśmy, że w obecności glikozy, gdy zawartość ATP jest maksymalna, dochodzi do utraty potasu. W obecności glikozy i kwasu glutaminowego, gdy utrata potasu jest zahamowana, zawartość ATP jest niższa (tab. 3). Z tego doświadczenia musieliśmy najpierw wyciągnąć wniosek, że sprawa utrzymania różnych stężeń potasu pomiędzy komórkami a płynem pozakomórkowym nie jest taka prosta, że mechanizm nagromadzenia potasu nie jest po prostu funkcją stężenia ATP.

Okazało się, że kwas glutaminowy ma specyficzne działanie na obniżenie poziomu ATP, inne znane związki pośrednie metabolizmu mają podobne działanie, ale dopiero w wyższych stężeniach, w których można przyjąć, że przechodzą w kwas glutaminowy, jak np. kwas asparaginowy. Glutamina ani kwas  $\alpha$ -ketoglutaryny nie mają takiego działania. Substraty te, jak i kwas mlekowy, kwas pirogronowy i kwas bursztynowy, dodane razem z glikozą nie mają żadnego wpływu na działanie glikozy — poziom ATP wzrasta do maksymalnej wartości.

Tabela 2

Wpływ różnych substratów na zużycie tlenu i na zawartość ATP w skrawkach z mózgu morskiej świnki. Wszystkie wartości przeliczone na gram świeżej tkanki

Substrat	ATP w mg	QO <sub>2</sub>
Glikoza	1,0	2,3
Kwas jabłkowy	0,4	2,4
Kwas mlekowy	0,3	2,2
Kwas pirogronowy	0,4	2,1
Kwas bursztynowy	0,4	2,0

Tabela 3

Wpływ różnych dodatków na zużycie tlenu i na zawartość ATP w inkubowanych w obecności glikozy skrawkach z mózgu świnki morskiej. Wszystkie wartości podane po przeliczeniu na 1 g świeżej tkanki

	ATP w mg	QO <sub>2</sub>
Glikoza	1,2	2,1
Glikoza + kwas glutaminowy 0,01 M	0,5	2,3
Glikoza + kwas asparaginowy	0,8	2,5
Glikoza + glutamina	1,2	2,3
Glikoza + alanina	1,1	2,0
Glikoza + kwas ketoglutaryny	1,2	2,4

Stwierdziliśmy następnie, że działanie kwasu glutaminowego jest odwracalne. Jeżeli wstrząsa się skrawki tkankowe w obecności kwasu glutaminowego, to zmniejsza się w nich zawartość ATP. Jeżeli następnie przeniesie się te skrawki do środowiska zawierającego glikozę bez kwasu glutaminowego, to wzrasta zawartość ATP znowu do maksymalnej wartości. Działanie jest proporcjonalne do stężenia kwasu glutaminowego.

Ponieważ w warunkach beztlenowych zawartość ATP w komórkach szybko spada, a w warunkach tlenowych szybko wzrasta, to staje się jasne, dlaczego za pomocą fosforanu radioaktywnego stwierdza się szybką wymianę fosforanu w ATP. Wysoki maksymalny poziom ATP w obecności glikozy oznacza zatem, że synteza ATP szybsza jest niż jego rozpad. Stosownie do tego wpływ kwasu glutaminowego można tłumaczyć bądź w ten sposób, że związek ten hamuje syntezę ATP, bądź też, że zwiększa jego zużycie.

Stwierdziliśmy, że kwas glutaminowy w ogóle nie ma wpływu na zużycie cukru. Następnie zauważyliśmy, że w stosowanych przez nas stężeniach nie zachodzi glikoliza tlenowa, prawdopodobnie więc kwas glutaminowy nie wpływa na syntezę ATP uwarunkowaną przez utlenienie glikozy.

Natomiast stwierdziliśmy, że skrawki tkankowe nie tylko pobierały ze środowiska dodany kwas glutaminowy, ale nawet go magazynowały. Analiza skrawków tkankowych wykazała, że wtedy, gdy w płynie zewnętrznym znajdowała się glikoza razem z kwasem glutaminowym, to w skrawkach tkankowych zwiększała się nie tylko zawartość kwasu glutaminowego, ale także i glutaminy. Ponieważ w komórkach kwas glutaminowy i glutamina stale są rozkładane — nie można było ustalić bilansu i nie można dokładnie powiedzieć, ile glutaminy powstało z dodanego kwasu glutaminowego. Jednak z doświadczeń, których wyniki przedstawia tab. 4, można wyliczyć, że synteza glutaminy musiała być intensywna. Jeżeli przeliczymy, ile ta synteza może zużyć ATP, to wynika, że na wytworzenie 1 mg glutaminy na 1 g tkanki w ciągu 15 minut potrzeba co najmniej 0,2 mg/g ATP na minutę. Jak widać z tabeli, poziom glutaminy ustala się na 1,2 mg/g. Jest to jednak równowaga dynamiczna między syntezą a rozpadem, w całym zaś systemie suma glutaminy i kwasu glutaminowego stale się zmniejsza.

Tabela 4

Kwas glutaminowy i glutamina w skrawkach z mózgu świniki morskiej inkubowanych w obecności 100 mg% glikozy i 0,01 M kwasu glutaminowego. Wszystkie wartości przeliczone na gram świeżej tkanki

Czas inkubacji w minutach	Kwas glutaminowy w mg	Glutamina w mg
0	0,6	0,5
15	4,1	1,2
30	5,5	1,3

Obliczone zużycie ATP jest z pewnością wartością minimalną. Można więc twierdzić, że kwas glutaminowy już w małym stężeniu obniża zawartość ATP w szarej substancji, zużywając go przy syntezie glutaminy. Synteza glutaminy dając bardzo duże zużycie ATP silnie obciąża zapasy energii komórki.

Przyróżczenie to poparliśmy następującym doświadczeniem: badaliśmy działanie kwasu glutaminowego po dodaniu amoniaku. W powyżej omawianych doświadczeniach nie dodawaliśmy amoniaku, synteza glutaminy odbywała się kosztem amoniaku powstałego w komórkach. Amoniak sam wywołuje również duży spadek zawartości ATP.

W innych tkankach zauważyliśmy również podobne działanie kwasu glutaminowego. W skrawkach z wątroby, w obecności glikozy lub innego związku ulegającego spaleniu, znajduje się 0,5 mg ATP na gram świeżej tkanki. Jeżeli obok glikozy doda się również kwasu glutaminowego, to zawartość ATP spada do około 0,2 mg/g. Podobne działanie stwierdzono i na siatkówce wołu.

Resumując można powiedzieć, że synteza glutaminy w przeżywających skrawkach tkankowych jest reakcją nadzwyczaj intensywną. Już przy małych stężeniach kwasu glutaminowego, stężeniach, które nie bardzo odbiegają od fizjologicznego, synteza jest tak intensywna, że częściowo wyczerpuje zapasy energii komórki. Fakt ten umocnił nas jeszcze bardziej w naszej hipotezie, że reakcja ta jest związana z syntezą peptydów lub białka.

#### PIŚMIENNICTWO

- 1) *Dénes G. i Gazda Z.*: Acta Physiol. Hung., 1953, 4. 1. — 2) *Speck J. F.*: J. Biol. Chem., 1947, 168, 403. — 3) *Leuthardt F. i Buyard E.*: Helv. Med. Acta, 1947, 14, 247. — 4) *Johnston R. B. i Bloch K.*: J. Biol. Chem., 1951, 188, 221. — 5) *Acs G., Balázs R. i Straub F. B.*: Ukrain. Bioch. Żurnał, 1953, 25, 17. — 6) *Krebs H. A. i Eggleston L. V.*: Biochem. J., 1949, 44, VII. — 7) *Kramer M., Pettkó E. i Straub F. B.*, Kisérletes Orvostudomány, 1949, 1, 114. — Postępy Biochemii, 1953. I. 122.

F. B. STRAUB

## O METABOLIZMIE CZERWONYCH CIAŁEK KRWI

(Odczyt wygłoszony w PAN dn. 27. III. 1953 r.)

Wiadomo, że bezjądrzaste czerwone ciała krwi ssaków pokrywają swoje zapotrzebowanie energetyczne glikolizą oraz że w dojrzałych komórkach nie przebiegają żadne ważne przemiany tlenowe. Glikolizę badano wielokrotnie albo za pomocą klasycznej manometrycznej metody Warburga, albo też przez oznaczenie powstałego kwasu mlekowego. Badania te wykazały, że mechanizm glikolizy w erytrocytach jest w zasadzie identyczny z mechanizmem glikolizy w mięśniach i drożdżach.

Zajęliśmy się metabolizmem erytrocytów w tym celu, aby zbadać związek pomiędzy przemianą materii, strukturą i funkcją. Obok wyżej wymienionych klasycznych metod, uzupełniliśmy przeważnie nasze badania nową metodą, a mianowicie oznaczaniem zawartości kwasu adenozyntroójfosforowego (ATP). Nasza nowa metoda oznaczania ATP (1) pozwala na oznaczenie ATP w 0,025 do 0,05 ml krwi. W ten sposób mogliśmy śledzić zmiany poziomu ATP w czasie. Przyjęliśmy, że oznaczenie zawartości ATP daje lepszy pogląd na wydolność czynnościową danej tkanki niż oznaczenie natężenia procesów fermentacyjnych lub oksydacyjnych, procesów, które dostarczają energii. Kwas adenozyntroójfosforowy jest tym związkiem, który jest syntetyzowany w procesach dostarczających energii i wciąż zużywany w procesach pochłaniających energię. Zatem poziom ATP w danej chwili jest miarą biochemicznej wydolności czynnościowej komórki.

Najczęściej badaną czynnością erytrocytów zużywającą energię jest utrzymanie nierównomiernego rozdziału jonów potasu między komórkami a osoczem. Nasze badania skierowane były na wyjaśnienie mechanizmu tej funkcji. W trakcie badań w tym kierunku zrobiliśmy parę obserwacji nad mechanizmem hemolizy osmotycznej, jak też nad rozmieszczeniem enzymów fermentacji w związku ze składnikami strukturalnymi komórki.

Należy najpierw krótko wspomnieć o doświadczeniach, w których badaliśmy mechanizm zwiększenia stężenia jonów potasu. W r. 1940 *Wilbrandt* (2) zauważył, że po zatruciu erytrocytów fluorkiem albo kwasem monojodooctowym następuje szybkie wypłynięcie potasu. Po usunięciu zahamowania wypływ ustaje.

Z drugiej strony wiadomo z badań *Harrisa* (3), że podczas przechowywania krwi przez parę dni w niskiej temperaturze erytrocyty oddają potas do osocza. Podczas inkubacji takiej krwi w temp. 37° komórki znowu pobierają potas z osocza. W tym przypadku okazało się więc wyraźnie, że komórki mogą nagromadzać potas także z roztworu o mniejszym stężeniu. Akumulacja ta zostaje zahamowana jadami glikolizy, odbywać się może tylko wtedy, gdy równocześnie przebiega glikoliza.

W opisanych przypadkach stwierdza się zwykle, że wędrówce jonów potasu towarzyszy idąca w przeciwnym kierunku wędrówka jonów sodu. W piśmiennictwie znajduje się różne poglądy co do tego, który z tych procesów jest pierwotny. Ła-

two bowiem przedstawić sobie, że komórki przy użyciu energii z przemian akumuluja potas, a wędrówka sodu jest biernym ruchem wyrównującym. Można też przyjąć na odwrót, że sód jest aktywnie wydzielany z komórki, a pobranie potasu jest wywołanym przez to wtórnym biernym zjawiskiem. Istnieje nawet pogląd, według którego oba procesy, tzn. akumulacja potasu i oddanie sodu są niezależne od siebie, uwarunkowane procesami przemiany. Nie podejmujemy się na razie rozstrzygnąć, która z tych możliwości jest prawdziwa. Badaliśmy jedynie zależność między metabolizmem a wędrówką potasu, nie zajmując się bliżej wędrówką sodu.

Na podstawie wyżej wymienionych i dobrze znanych w piśmiennictwie danych przyjęto, że akumulacja potasu związana jest z procesami metabolizmu, a w przypadku erytrocytów związana jest z glikolizą. O mechanizmie tej reakcji w ogóle nic nie wiadomo. Trudność dotychczas nie pokonana polega na tym, że reakcję tę można badać tylko przy niezniszczonej strukturze komórki. W takim jednak doświadczeniu nie można nic bliższego dowiedzieć się o mechanizmie reakcji. Wyśiłki naszej pracowni szły w tym kierunku, aby stworzyć warunki doświadczalnego badania akumulacji. W tym celu badaliśmy: strukturę komórki, metabolizm komórki, związek pomiędzy metabolizmem a strukturą i mechanizm hemolizy. Udało nam się w końcu osiągnąć zamierzony cel i otrzymać taki układ testowy, za pomocą którego badanie akumulacji potasu stało się łatwo dostępne. Opiszę najpierw ten układ testowy i wyniki osiągnięte za jego pomocą, następnie krótko wspomnę o niektórych naszych spostrzeżeniach.

Postępowaliśmy w następujący sposób: erytrocyty ludzkie zawieszano w około trzykrotnej objętości płynu izotonicznego, zawiesinę hemolizowano przez dodanie 1,4 objętości wody. Przy tym stężeniu jonów spada z wartości izotonicznej na 0,065 N. Po przechowaniu w temp. 0° przez 15 minut dodaje się tyle 9% NaCl, aby z powrotem doprowadzić do izotonii. Następuje wtedy znane zjawisko — odwrócenie hemolizy, „rewersja“. Komórki odwirowuje się i przemywa roztworem NaCl. W ten sposób otrzymujemy komórki, które straciły większą część swojej hemoglobiny, z których została usunięta większa część potasu i które zamiast potasu zawierają sód. Przy tym odwróceniu hemolizy otoczka komórki staje się znowu nieprzepuszczalna dla kationów. Jeżeli takie komórki zawierające sód zawiesić w izotonicznym roztworze KCl, to stwierdza się jedynie nieznaczna wymianę kationów. Takie komórki, które zawierają około 0,14 M Na i 0,01 M K, inkubuje się w temp. 37° w obecności glikozy z roztworem izotonicznym, który zawiera tyle samo Na i K (0,14 M i 0,01 M). W takich doświadczeniach nie stwierdza się wyraźnego przesunięcia w stężeniu potasu, ale i glikoliza komórek jest prawie zerowa.

Jeżeli jednak przeprowadza się doświadczenie w ten sposób, że podczas hemolizy dodaje się jonów magnezu 0,001 M i kozymazy 0,1 mg/ml, to po zawieszeniu tych komórek, jak wyżej podano, w temp. 37° stwierdza się silną glikolizę, a równocześnie potas w płynie stale spada, a zwiększa w komórkach. To samo stwierdza się również wtedy, gdy komórki już na początku inkubacji zawierają więcej potasu niż płyn zewnętrzny. W ten sposób można otrzymać komórki wykazujące zjawisko akumulacji.

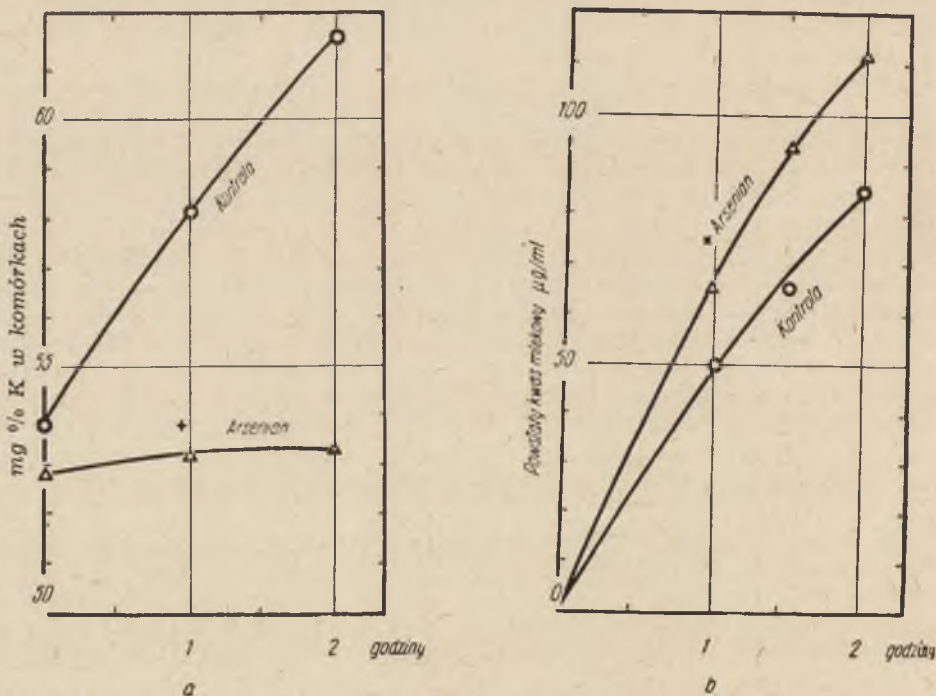
Działanie jonów magnezu i kozymazy polega na tym, że dodanie ich wyrównuje utratę tych związków. Podczas hemolizy bowiem otoczka komórki staje się dla tych ciał przepuszczalna, przechodzą one do płynu zewnętrznego i ich stężenie tak dalece się zmniejsza, że glikoliza nie może już przebiegać. Dodanie tych związków w trakcie hemolizy zmniejsza ich ubytek.

Zwiększona przepuszczalność otoczki komórkowej nie tylko ułatwia wyjście tych ważnych związków z komórki, ale również pozwala na wprowadzenie takich substancji, które zazwyczaj nie mogą wejść do komórki. Tak jest np. z arsenianem. Arsenian, tak jak i fosforan, przenika bardzo powoli do erytrocytów. Mała prze-



puszczalność jest spowodowana wielowartościowym ładunkiem przy fizjologicznych wartościach pH. Dlatego też dotychczas nie można było badać wpływu arsenianu. Wykazaliśmy, że arseniany już w stężeniu 0,0025 M dodane do komórek w czasie wyżej opisanej hemolizy — a więc gdy błona komórkowa jest rozluźniona — natychmiast docierają do komórek powodując zjawisko arsenolizy i w ten sposób mogą przyspieszać glikolizę. Wiadomo, że w obecności arsenianu zwiększa się glikoliza, ale równocześnie wyłączona jest synteza kwasu adenozynotrójfosforowego. Wiadomo również, że glikoliza w erytrocytach jest ściśle związana z obecnością ATP, ponieważ ufosforylowanie glikozy jest punktem wyjścia glikolizy. Dlatego też efekt arsenianowy można wyraźnie obserwować tylko przy użyciu fruktozo-dwu-fosforanu zamiast glikozy. W normalnych warunkach fruktozo-dwu-fosforan nie może przeniknąć do erytrocytów. Podczas trwania hemolizy błona komórkowa staje się jednak przepuszczalna i dla fruktozo-dwu-fosforanu.

Wykonaliśmy zatem następujące doświadczenie. Erytrocyty hemolizowaliśmy w obecności arsenianu w ten sposób, że stężenie jonów z izotonicznego spadało na 0,065 N. Po 15 minutach zawiesinę komórek przeprowadzaliśmy do izotonii za pomocą 9% NaCl. Po przemyciu zawieszaliśmy w temp. 37° w płynie izotonicznym. Wynik takiego doświadczenia jest podany na ryc. 1.



Ryc. 1. Akumulacja potasu (a) i glikoliza (b) w rewertowanych komórkach zawierających Na i fruktozo-dwu-fosforan. Wartości dla powstałego kwasu mlekowego odnoszą się do 1 ml zawiesiny, której hematokrytywa wartość wynosiła 45. Arsenian: 0,0025 M.

Widać, że kosztem dodanego fruktozo-dwu-fosforanu zachodzi w komórkach żywa glikoliza i że arsenian przyspiesza powstanie kwasu mlekowego. Równocześnie okazuje się jednak, że komórki, które kosztem powstawania kwasu mlekowego akumulują potas, w obecności arsenianu nie wykazują już akumulacji. Doświadczenie to jest dowodem tego, co przypuszczano, ale czego dotąd nie umiano dowieść, że do akumulacji potrzebne są procesy glikolityczne nie jako takie, ale wytwarzany

w tych procesach kwas adenozynotrójfosforowy. W doświadczeniu z arsenianem przebiegają wszystkie reakcje glikolizy, są nawet przyspieszone, nie powstaje jednak ATP i dlatego nie ma akumulacji.

Pogląd ten ugruntowaliśmy na kilku drogach. Ostatnio udało nam się nawet (*G. Gárdos*) w czasie hemolizy wprowadzić większe ilości ATP do komórki. ATP ma duży ładunek, tak że nawet podczas wyżej opisanej częściowej hemolizy nie przenika przez błonę komórki. Jeżeli jednak do zhemolizowanych komórek dodać stężonego kwaśnego roztworu ATP (pH 2,3) — w takim kwaśnym roztworze dysocjacja ATP jest silnie cofnięta — to stwierdza się, że komórki pobrały ATP. W ten sposób można otrzymać erythrocyty, które zamiast potasu mają sód i zawierają 10 razy więcej ATP od normalnych. Jeżeli takie komórki inkubuje się w temp. 37° z równoczesnym zahamowaniem glikolizy, np. kwasem monoiodoocetowym, to stwierdza się mimo braku glikolizy bardzo silną akumulację jonów potasowych. Oczywiście dzieje się to kosztem dodanego adenozynotrójfosforanu.

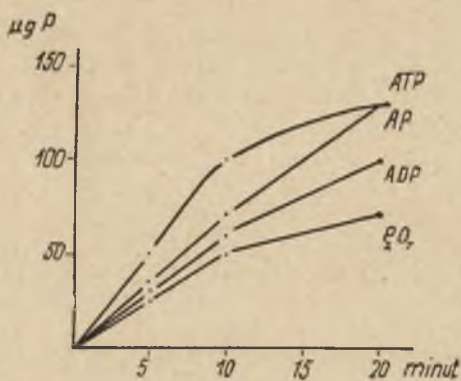
Następne istotne pytanie dotyczy tego, w jaki sposób komórki zużywają ATP na akumulację potasu. Dotychczas stwierdziliśmy tylko, że proces ten można zahamować fluorkiem. Przeprowadziliśmy następujące doświadczenie: sporządziliśmy komórki zawierające sód, które fermentowały fruktozo-dwu-fosforan. Dodanie 0,008 M fluorku, jak wiadomo, wyraźnie hamuje glikolizę erythrocytów i przez to hamuje również akumulację. Jeżeli jednak do takiego systemu dodamy kwasu pirogronowego, to znosi się zahamowanie fluorkiem. Kwas pirogronowy bowiem utlenia zredukowaną kozymazę, która nagromadza się w obecności fluorków. Że w naszym doświadczeniu kwas pirogronowy uruchamia z powrotem glikolizę, sprawdzaliśmy przez oznaczenie ATP i kwasu mlekowego. W obecności fluorków i kwasu pirogronowego stwierdza się ATP w ilości wystarczającej do akumulacji, mimo to akumulacji nie ma. Wskazuje to na wrażliwość na małe stężenia fluorku w procesach lub jednym z procesów zachodzących pomiędzy ATP a akumulacją potasu. Jest bardzo prawdopodobne, że zachodzi tu reakcja transfosforylacji. Następnym naszym zadaniem jest wykazanie akceptora.

W związku z powyższymi faktami uważaliśmy za konieczne zbadanie enzymatycznego rozkładu ATP. Badania te przeprowadzili moi współpracownicy *T. Garzó* i *A. Ullmann* (4).

Jeżeli do odwirowanych i zawieszonych w płynie izotonicznym krwinek dodać ATP, to nie można stwierdzić jego rozkładu. Natomiast zhemolizowane krwinki wykazują aktywność ATP-azy. Z hemolizatów krwi różnych zwierząt oraz człowieka wyosobniliśmy ten enzym metodami używanymi zwykle w chemii enzymów (strącanie siarczanem amonowym i zmianami w pH). W ten sposób otrzymaliśmy zagęszczenie enzymu 30 — 40-krotne. Dalsze oczyszczanie nie udało się, chociaż aktywność katalityczna oczyszczonego fermentu ciągle jeszcze była raczej niska. Krótko mówiąc okazało się, że izolowaliśmy otoczkę krwinek. ATP-aza jest związana z otoczką, od której nie daje się wyplukać, a denaturacja fermentu postępuje równocześnie z denaturacją otoczki. Stwierdzono to pomiarami aktywności katalitycznej z równoczesnym badaniem zmian w strukturze za pomocą mikroskopu elektronowego.

Chciałbym krótko wspomnieć o paru charakterystycznych właściwościach tego fermentu. Enzym ten do swojej czynności wymaga Mg, nie aktywuje się jodem Ca, jest nadzwyczaj odporny na odczynniki dla grupy —SH, a równocześnie jest hamowany przez fluorek dużo silniej od innych ATP-az. Enzym ten odszczepia wszystkie trzy reszty kwasu fosforowego jako fosforan nieorganiczny, odpowiednio do tego odszczepia 2 mole fosforanu z adenozyno-dwu-fosforanu, a jeden mol fosforanu z kwasu adenozyno-5-fosforowego. Działa również na pirofosforan, ale nie działa na fenylofosforan ani na glicerofosforan (ryc. 2).

Zdjęcia mikroskopem elektronowym wykazały, że preparat enzymu zawiera prawie wyłącznie tylko otoczkę erytrocytów. Jasne jest jednak, że ferment nie występuje na zewnętrznej powierzchni otoczki, ponieważ, jak już wspomniano, nie naruszone krwinki w ogóle nie rozkładają dodanego ATP. Z drugiej strony nie można przyjąć, że ferment jest umiejscowiony na wewnętrznej powierzchni otoczki. Jest to szczególnie jasne w przypadku komórek krwi świni: glikoliza w tych



Ryc. 2. Początkowa szybkość odszczepiania nieorganicznego fosforanu z różnych substratów. 1,5 ml enzymu, 0,025 M  $MgCl_2$ . Substrat zawsze zawierał 170  $\mu g$  P całkowitego. Objętość końcowa 4 ml. Temperatura 37°.

komórkach wytwarza mniej niż 1 mM ATP na litr krwinek na godzinę, podczas gdy aktywność ATP-azy wobec ATP w stężeniu takim jak w krwinkach odpowiada rozkładowi ponad 10 mM ATP na godzinę na litr komórek. Podobne obliczenia wskazują, że także w ludzkich krwinkach synteza ATP nie idzie tak szybko jak rozkład przez ATP-azę. Mimo to krwinki zawierają stosunkowo duże ilości ATP. Wynika z tego, że ATP-aza nie występuje ani na wewnętrznej, ani na zewnętrznej powierzchni komórki. Później powrócę jeszcze do tego zagadnienia.

W następnym etapie naszych doświadczeń badaliśmy wpływ uszkodzenia struktury komórki na metabolizm. W poglądach na strukturę erytrocytów wciąż jeszcze panuje niezdecydowanie. Nadal pojawiają się zupełnie różne poglądy na

mechanizm hemolizy. Jedni przyjmują, że ciała krwi mają błonę nieprzepuszczalną dla hemoglobiny, a wewnątrz komórek jest struktura włókienkowa, z którą wiążą się cząsteczki hemoglobiny. Według drugiego poglądu komórki, chociaż zawierają otoczkę, nie mają wewnątrz żadnej struktury. Jedna z ostatnich teorii przyjmuje nawet, że forma i struktura erytrocytów jest nadana przez *quasi* krystaliczny stan hemoglobiny, że otoczka już w warunkach normalnych jest przepuszczalna dla hemoglobiny, a hemoliza powstaje w ten sposób, że przez obniżenie stężenia soli agregaty hemoglobiny rozkładają się. Nie chcę wdawać się w dyskusję nad tymi różnymi teoriami, opiszę tylko nasze doświadczenia nad hemolizą odwracalną, które zmuszają nas do przyjęcia określonego stanowiska.

Znane jest od dawna, że przy hemolizie spowodowanej nie za dużą objętością destylowanej wody ciała krwi niezupełnie niszczej. Hemolizat staje się przejrzysty i lakowy. Składniki upostaciowane znikają w obrazie mikroskopowym. Jeżeli do tego hemolizatu dodamy taką ilość stężonego roztworu soli, która doprowadza ponownie do izotonii, to roztwór mętnieje, a w mikroskopie pojawiają się z powrotem składniki upostaciowane. Fenomen ten opisano jako hemolizę odwracalną i przyjęto, że pod wpływem utworzonej znowu izotonii hemoglobina wchodzi z powrotem do komórek. Nie udało się jednak tego stwierdzić. Godny uwagi jest fakt, że procent hemoglobiny uwalniającej się podczas hemolizy jest prawie niezależny od objętości wody, którą się hemolizę powoduje.

W doświadczeniach przeprowadzonych w naszej pracowni (*S. Mányai* i *M. Székely* — 5) badaliśmy rozmieszczenie podczas hemolizy trzech ważnych składników komórkowych, a mianowicie: potasu, ATP i nieorganicznego fosforanu. Następnie badaliśmy rozmieszczenie żelazicyjanku, o którym od czasu prac *Keilina* (6) wiadomo, że w ogóle nie wnika do normalnej komórki. Oznaczenie rozmieszczenia tych dodanych komórkom z zewnątrz ciał dało wyniki, które podaje poniżej.

O metodzie powiem tyle: odwłóknioną krew ludzką odwirowuje się i hemolizuje komórki dwoma objętościami wody w temp. 0° przez 15 minut. Dla uniknięcia rozłożenia dwu-fosfo-piridynowego nukleotydu (DPN) w hemolizacie i zachowania w ten sposób normalnego metabolizmu, dodawano zawsze 1/20 objętości 4% roztworu amidu kwasu nikotynowego. Po 15 minutach doprowadza się do izotonii przez dodanie odpowiedniej ilości 9% roztworu NaCl lub odpowiednio procentowego KCl. Pojawiające się elementy upostaciowane można dobrze oddzielić na zwykłej wirówce. Oddzielnie analizuje się płyn z nad komórek i komórki na zawartość dodanych substancji.

Jeżeli dla otrzymania izotonii doda się NaCl, to otrzymuje się komórki, które wewnątrz zawierają dużo NaCl. Po zawieszeniu takich komórek w izotonicznym roztworze KCl łatwo stwierdzić, że w komórkach jest zawsze mniej potasu niż w płynie zewnętrznym. Jeżeli dla otrzymania izotonii używa się roztworu KCl, to poddane odwracalnej hemolizie komórki (rewertowane) zawierają taką samą ilość potasu jak normalne. Po zawieszeniu takich rewertowanych, zawierających potas komórek w izotonicznym roztworze soli kuchennej stwierdza się w nich — po następujących po sobie przemyciach — 330, 322, 286 mg % K.

Stan komórek przed doprowadzeniem do izotonii określamy jako stan hipotoniczny, po doprowadzeniu do izotonii jako stan izotoniczny. Z rozmieszczenia potasu i sodu wynika, że komórki w stanie hipotonicznym są przepuszczalne dla K i Na natomiast w stanie izotonicznym są prawie nieprzepuszczalne.

Zachowanie się nieorganicznych jonów fosforanowych badaliśmy w ten sposób, że w stanie hipotonicznym lub też po nastawieniu izotonii dodawaliśmy komórkom moderator fosforanowy w takiej ilości, by ostateczne stężenie fosforanu było 0,0065 M. Po doprowadzeniu do izotonii przemywano komórki czterokrotnie w celu usunięcia zaadsorbowanych fosforanów. Jeżeli fosforan był dodany do komórek znajdujących się w stanie hipotonicznym, stwierdzaliśmy następujące rozmieszczenie fosforu, podane w tab. 1.

Fosforan znajdujący się w płynie użytym do przemycia pochodzi z komórek, które podczas przemywania rozpadają się. Komórki rewertowane bowiem są o wiele bardziej wrażliwe niż komórki nienaruszone. Widać jednak, że w stanie hipotonicznym komórki fosforan łatwo dostaje się do wnętrza. Przez przywrócenie izotonii zostaje w komórce uwięziony i nie może już przejść otoczkę. Fosforan dodany po doprowadzeniu do izotonii nie potrafi już wejść do komórki.

W doświadczeniach z żelazycjankiem i ATP stwierdziliśmy, że te duże jony, o wielokrotnym ujemnym ładunku, nie przenikają przez otoczkę ani w stanie hipotonicznym, ani w izotonicznym komórki.

Wyniki te przedstawia tab. 2.

Nie wchodząc w dyskusję nad tymi wynikami chciałbym tylko podkreślić, że żelazycjankiem oraz ATP również w stanie hipotonicznym komórki nie przenikają przez otoczkę. Jest to uderzające dlatego, że w stanie hipotonicznym, tzn. podczas hemolizy, dużo od nich większe cząsteczki, jak hemoglobina i enzymy wewnątrzkomórkowe, przechodzą przez otoczkę na zewnątrz.

Wszystkie te zjawiska można łatwo wytłumaczyć, jeżeli się przyjmie, że otoczka komórkowa podczas hemolizy nie przerywa się. Przebadałoby wiele preparatów za

T a b e l a 1

	P w µg na mililitr	
	komórek	płynu nad komórek
Stan początkowy	150	155
Po 1 przemyciu	96	23
Po 2 przemyciu	97	14
Po 3 przemyciu	99	10

Tabela 2

Przepuszczalność	K o m ó r k i		
	nienaruszone	w stanie hipotonicznym	w stanie izotonicznym
dla potasu	0	+	0
dla fosforanu	0	+	0
dla żelazicyjanku	0	0	0
dla ATP	0	0	0

pomocą mikroskopu elektronowego. Widzi się czasem nieliczne otoczki ze szczelinami lub też z tzw. kraterami hemolitycznymi, ale to są wyjątki. Większość pustych otoczek jest nienaruszona. Musimy więc przyjąć, że po dodaniu wody, w stanie hipotonicznym, rozluźnia się struktura otoczki, ciśnienie osmotyczne wpędza wodę do komórki, powstałe nadciśnienie wyciska na zewnątrz zawartość komórki przez małe otworki rozluźnionej otoczki. Wyrównuje się nadciśnienie i rozciągnięte otworki zaciągają się. Wskutek niskiego stężenia soli struktura otoczki pozostaje wciąż jeszcze rozluźniona i otworki w otoczce przepuszczają mniejsze jony, jak potas i fosforan. Po dodaniu soli aż do uzyskania izotonii struktura otoczki powraca do poprzedniej formy, gęstnieje i znowu jony potasu i fosforanu nie mogą już tak szybko przenikać.

Zdawałoby się, że jest sprzeczność między tym, że duże cząsteczki hemoglobiny przechodzą na zewnątrz, a dużo mniejsze od niej cząsteczki żelazicyjanku i ATP nie mogą wniknąć do wnętrza. Nie ma tu jednak sprzeczności, ponieważ hemoglobina zostaje siłą wyciśnięta i wypływa mocnym strumieniem, który stawia opór cząsteczkom posuwającym się od zewnątrz do wnętrza komórki. A gdy ten prąd ustaje, wtedy otwory ponownie się zaciągają.

W piśmiennictwie znajdujemy pewne dane, które pozornie nie zgadzają się z podanymi wyżej wnioskami i ze wszystkimi naszymi doświadczeniami. Tak np. stwierdzono, że tak zwane cienie (*ghosts*), tzn. zhemolizowane otoczki, są w zupełności przepuszczalne dla potasu. Mogliśmy udowodnić, że ta wyraźna sprzeczność polega w tych przypadkach na nieuwzględnianiu objętości. Jeżeli zhemolizuje się komórki dwiema objętościami wody, to stwierdza się opisane przez nas zjawiska. Jeżeli natomiast hemolizuje się 20 objętościami wody i bada naszą metodą przepuszczalność otoczki w stanie hipotonicznym i izotonicznym, to można ocenić ilość nie rozerwanych otoczek. Fosforan dodany w stanie hipotonicznym komórek, po doprowadzeniu do izotonii zostaje w 40% zatrzymany. To znaczy, że po hemolizie 20 objętościami wody 60% otoczek jest zupełnie przerwanych, a 40% jest wciąż jeszcze względnie nienaruszonych.

W nowszym piśmiennictwie jest już przyjęte, że cienie są dla Na i K prawie tak nieprzepuszczalne, jak komórki pierwotne, naturalnie o ile hemolizę przeprowadza się ostrożnie.

Wyżej podane wyniki pomogły nam bardzo przy badaniu zmian w metabolizmie, spowodowanych uszkodzeniem struktury komórki. Zmiany te badali w naszym Zakładzie Székely i Mányai (7). Śledzili oni przede wszystkim zawartość ATP metodami wyżej wspomnianymi.

Odwłókniona krew, jeżeli jest zaopatrzona w glikozę, może przez parę godzin w temp. 37° utrzymać prawie niezmienny poziom ATP. Równocześnie przebiega glikoliza, którą można zmierzyć. Po zhemolizowaniu dwiema objętościami wody, po około 30 minutach zawartość ATP w roztworze spada do połowy zawartości początkowej. Dodanie do takiego osmotycznego hemolizatu niedużych ilości amidu

kwasu nikotynowego prawie zupełnie zatrzymuje ubytek ATP. Wiadomo, że zewnętrzna powierzchnia krwinek zawiera aktywną dwu-fosfo-pirydyno-nukleotydazę. Rozkład dwu-fosfo-pirydynowego nukleotydu (DPN) aktywowany przez ten enzym można zahamować amidem kwasu nikotynowego. Ponieważ w osmotycznym hemolizacie z dodanym amidem kwasu nikotynowego zawartość ATP nawet po parogodzinnej inkubacji pozostaje bez zmiany, jasne jest, że odbywające się tam procesy syntezy i rozpadu są tak zrównoważone jak w nienaruszonych komórkach. To stwierdzenie zgadza się w zupełności z wyżej wymienionymi wynikami, że hemoliza małą ilością wody, chociaż powoduje wypłynięcie zawartości komórek, nie oznacza jednak zniszczenia najważniejszych struktur. Stwierdzono również klasycznymi metodami manometrycznymi i oznaczaniem kwasu mlekowego, że w osmotycznych hemolizatach po dodaniu amidu kwasu nikotynowego utrzymuje się poziom ATP dzięki temu, że jego synteza i zużycie przebiegają normalnie.

Należy podkreślić, że wyniki te dotyczą krwi ludzkiej. Na materiale tym najlepiej obserwuje się zjawisko odwracalnej hemolizy. Krew królika, psa i kota nie nadaje się do tych doświadczeń, ponieważ odwracalność hemolizy zachodzi w niedużym tylko stopniu. W związku z tym amid kwasu nikotynowego może w zupełności zapobiec ubytkowi ATP tylko w hemolizatach krwi ludzkiej, w krwinkach wymienionych zwierząt pomimo obecności amidu kwasu nikotynowego stopniowo ustaje metabolizm.

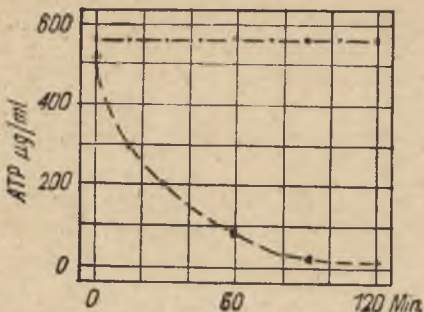
Ludzkie krwinki można również zhemolizować przez zamrożenie z następowym odtajaniem. Taki mrożony hemolizat zachowuje się zupełnie inaczej. Przy inkubacji w temp. 37° połowa ATP w ciągu 5 do 10 minut rozkłada się. Rozkład nie daje się zahamować amidem kwasu nikotynowego, chociaż i tu należy się liczyć z działaniem DPN-azy. Przyczyna rozkładu ATP musi zatem być nieco inna. W każdym razie można powiedzieć, że procesy rozkładu w stosunku do procesów syntezy mają przewagę.

Efekt ten analizowaliśmy w sposób następujący. Okazało się, że w mrożonych hemolizatach nie zachodzi glikoliza w obecności amidu kwasu nikotynowego. Ale jeżeli zastąpi się glikozę przez fruktozo-1:6-dwu-fosforan (FDP) lub też jeżeli do hemolizatu obok glikozy doda się ATP, to otrzymuje się silną glikolizę — powstaje kwas mlekowy, i to z większą szybkością niż w normalnej glikolizie. Gdy jednak FDP lub ATP zużyją się — przemiana natychmiast ustaje. Doświadczenia te przekonały nas o tym, że w naszych mrożonych hemolizatach przyczyną zahamowania przemiany jest brak reakcji heksokinazowej, brak reakcji fosforylującej. Obserwacje nasze stwierdzające, że glikoliza zachodzi nie tylko po dodaniu FDP, ale również i po dodaniu ATP, wskazują na to, że enzym heksokinaza nie jest uszkodzony. Można to było również potwierdzić specyficznym oznaczaniem heksokinazy.

Wynika z tego, że przyczyną zaburzenia metabolizmu w mrożonym hemolizacie jest ustanie fosforylacji z powodu braku ATP, że podczas zniszczenia struktury jakaś reakcja zużywająca ATP została zaktywowana. Poza heksokinazą i fosfoheksokinazą należy pomyśleć jeszcze o ATP-azie. Te trzy enzymy są najważniejsze z enzymów zużywających ATP. Nie chcę teraz zbyt szczegółowo analizować różnych doświadczeń, wspomnę tylko krótko, że w mrożonych hemolizatach znaleźliśmy zupełnie normalną zawartość heksokinazy. Skierowaliśmy więc naszą uwagę na ATP-azę. Już dawniej zauważyłem, że np. z krwi świni, a także ludzkiej, otoczki po chemicznym wyosobnieniu wykazują tak wielką aktywność ATP-azy, że glikoliza nie może jej dotrzymać kroku. Dlatego przypuszczaliśmy, że ATP-aza nie działa w komórce jako ferment rozszczepiający ATP i że jej aktywność hydrolityczna ujawnia się dopiero po zniszczeniu struktury. Przypuszczenie to poparliśmy doświadczeniem. Izolowaliśmy otoczkę z krwi ludzkiej w ten sposób, że do komórek dodaliśmy 50 objętości wody i dobrze chłodząc natychmiast odwirowaliśmy. Okazało się, że tak

otrzymane otoczki nie mają działania ATP-azy. Otoczki te po zamrożeniu i następnym odtajaniu wykazują dużą aktywność ATP-azy (ryc. 3).

Ogólnie znane jest zapatrywanie, że przez zniszczenie struktury komórki metabolizm komórek w ten sposób zawsze zostaje zaburzony, że natężenie procesów syntezy zostaje w tyle w stosunku do hydrolitycznych procesów rozkładu. Przeważnie jednak przyjmuje się po cichu, że stan ten powstaje przez uszkodzenie procesów syntetycznych jako bardziej skomplikowanych i delikatniejszych. Doświadczenia nasze wykazują, że w przypadku glikolizy w ludzkich erytrocytach sytuacja jest właśnie odwrotna. Metabolizm ustaje dlatego, że przez uszkodzenie struktury jeden z rozkładających fermentów (ATP-aza) zostaje zaktywowany.



Ryc. 3. Wpływ zamrożenia na aktywność ATP-azy otoczki krwinek. 2,5 ml nieuszkodzonych lub zamrożonych otoczek. 2,5 ml 0,02 M ATP, 0,25 ml 0,1 M  $MgCl_2$ .

nieuszkodzone otoczki — · — · — · —  
zamrożone otoczki — — — — —

Poruszam tu jeden z najbardziej interesujących problemów nowoczesnej biochemii — jak wpływa struktura komórki na aktywność enzymów wewnątrzkomórkowych. Badania biochemików radzieckich w tej dziedzinie są pionierskie. Szkoła *Oparina* i w ostatnich czasach głównie *Sisakjan* (8) udowodnili, że aktywność enzymów w komórce jest regulowana przez mniej lub bardziej silną adsorpcję, tzn. przez adsorpcję i desorpcję. Ma to swój wpływ na cały metabolizm.

Do zagadnienia tego bardzo trudno jest podejść metodycznie. Przeprowadziliśmy parę doświadczeń, które mogą służyć za punkt wyjścia do dalszych badań. W doświadczeniach, w których badaliśmy akumulację potasu stosując wyżej opisaną odwracalną hemolizę, otrzymywaliśmy komórki zawierające Na i badaliśmy akumulację potasu w obecności glikozy w temp. 37°. Stwierdziliśmy, że w obecności glikozy w niektórych przypadkach następuje akumulacja potasu, w innych natomiast trwa ono tylko przez krótki czas, potem ustaje i zaczyna się wypływ potasu. Równoległe przeprowadzone oznaczenia kwasu mlekowego wykazały, że wtedy, gdy

Tabela 3

Akumulacja K i powstawanie kwasu mlekowego w komórkach rewertowanych zawierających Na\*

Dodatek	100 mg <sup>o</sup> / <sub>o</sub> glikozy			100 mg <sup>o</sup> / <sub>o</sub> fruktozo-dwu-fosforanu		
	0	60	120	0	60	120
Czas inkubacji w minutach:						
Znaleziono mg <sup>o</sup> / <sub>o</sub> K w płynie zewnętrznym	47,3	48,1	47,1	50,8	48,7	39,3
Obliczono mg <sup>o</sup> / <sub>o</sub> K w komórkach	74	—	71,6	65,6	—	75,1
Przyrost K w mg na 100 ml komórek	—	—	(-2,4)	—	—	+9,5
Znaleziony kwas mlekowy w mg na ml zawiesiny	0,030	0,078	0,078	0,048	0,102	0,180

\* W hematokrycie oznacza się prawdopodobnie równocześnie również uszkodzone komórki, które łatwo przepuszczają K i Na. Zatem wartości dla potasu w komórkach, obliczone na podstawie wartości hematokrytu, są stale mniejsze niż faktyczne. Objętość komórek w hematokrycie oznaczano na początku i na końcu inkubacji.

zachodzi dobra akumulacja, powstaje kwas mlekowy. Wtedy zaś, gdy ustaje akumulacja ustaje również powstawanie kwasu mlekowego (tab. 3). Równolegle przeprowadzone oznaczenia ATP wykazały, że przy dobrej akumulacji potasu poziom ATP pozostaje bez zmiany, podczas gdy w innych przypadkach zawartość ATP spada do zera. Trzeba jeszcze dodać, że w tych warunkach doświadczenia w obecności fruktozo-dwu-fosforanu nigdy nie zawodzi akumulacja potasu. Możemy stąd wyciągnąć wniosek, że brak lub ustanie akumulacji wywołane są przez to, że śródkomórkowo następuje aktywacja ATP-azy. Już wyżej wspomniałem, że komórki, w przypadku gdy ich ATP-aza jest zaktywowana, nie mogą mimo biegnącej glikolizy zachować poziomu ATP. Wydaje mi się, że uzyskaliśmy w ten sposób układ testowy, za pomocą którego można badać różne czynniki wpływające na wewnątrzkomórkową aktywację lub inaktywację tego enzymu.

#### PIŚMIENICTWO

- 1) *Kramer M., Pettko E. i Straub F. B.*: Kisertetes Orvostudomány, 1949, 1, 114; Postępy Biochemii, 1953, I 122. — 2) *Wilbrandt*; Pflügers A., 1940, 243, 519. — 3) *Harris J. E.*: J. Biol. Chem., 1941, 141, 579. Cytowane według *Höber*: Phys. Chem. of Cells and Tissues, J. a. A. Churchill Ltd, Londyn 1947. — 4) *Garzó T., Ullmann A. i Straub F. B.*: Acta Physiol. Hung., 1952, 3, 513. — 5) *Székely M., Mányai S. i Straub F. B.*: Acta Physiol. Hung., 1952, 3, 571. — 6) *Keilin D. i Hartree E. F.*: Nature, 1946, 157, 210 — 7) *Székely M., Mányai S. i Straub F. B.*: Acta Physiol. Hung., 1953, 4, 31. — 8) *Sisakjan N.*: Die Fermentaktivität der Protoplastenstrukturen, Akademische Verlagsgesellschaft, Budapest 1953.





W Y D A W N I C T W A P Z W Ł

*Zbigniew Kozar*

TOKSOPLAZMOZA

1954 r., str. 188, ryc. 27, zł 20,80

\*

Zagadnienie toksoplazmozy (odzwierzęcej choroby zakaźnej wywołanej przez pierwotniak) powinno niewątpliwie budzić znacznie większe, niż to się dzieje dotychczas, zainteresowanie ogółu specjalistów: parazytologów, biologów, lekarzy weterynaryjnych, przede wszystkim lekarzy medycyny. Autor, jeden ze znawców i badaczy toksoplazmozy w Polsce, postawił sobie zadanie zapoznać z tą „nową” jednostką chorobową ogół lekarzy i pobudzić do pracy badawczej nad toksoplazmozą. Jest to szczególnie ważne, ponieważ liczne problemy dotyczące toksoplazmozy, a między innymi klinika tej choroby, wymaga jeszcze dalszego wyjaśnienia i pogłębienia. Do napisania tej pracy autor wyzyskał olbrzymie piśmiennictwo światowe (wydrukowane w książce tylko częściowo) i krajowe, a także oparł się na własnym bogatym doświadczeniu. Toksoplazmoza wywołuje tyle różnorodnych objawów chorobowych i w tak licznych narządach, że musi być przedmiotem badań ze strony wielu gałęzi medycyny: pediatrii, okulistyki, psychiatrii, ginekologii itd.

Książka dzieli się na dwie części. W pierwszej najwięcej miejsca zajmują zagadnienia etiologii i epidemiologii. Inne zagadnienia, jak klinika, rokowanie i leczenie zostały potraktowane dość pobieżnie, co jest najsłabszą stroną pracy. Część druga natomiast, poświęcona laboratoryjnemu rozpoznaniu toksoplazmozy, została opracowana szczegółowo. Takie ujęcie układu książki przez autora tłumaczy częściowo fakt, że właśnie diagnostyka toksoplazmozy jest bardzo utrudniona, co jest przyczyną bardzo licznych błędów rozpoznawczych nawet u doświadczonych lekarzy. Toteż w części drugiej zostały podane wszystkie metody utrzymywania szczepów toksoplazm oraz wszystkie zużyczone dotychczas diagnostyczne próby immunobiologiczne.

Praca dra *Kozara* jest pierwszą w Polsce próbą obszerniejszego ujęcia całości zagadnienia toksoplazmozy.

\*

*E. N. Pawłowski*

## PARAZYTOLOGIA CZŁOWIEKA

tłum. z rosyjskiego

1954 r., str. 337, ryc. 229, tabl. wielob. II, opr. pł. zł 28,—

\*

W obliczu zadań, jakie stoją przed służbą zdrowia w zakresie zwalczania i profilaktyki chorób inwazyjnych, jak i wobec konieczności kształcenia młodych kadr tej służby, specjalnie dotkliwy był brak w języku polskim dobrego podręcznika parazytologii człowieka. W takiej sytuacji niezbędne stało się przyswojenie naszej literaturze naukowo-dydaktycznej właściwego podręcznika. Musiał to być podręcznik obejmujący swym zakresem pasożyty naszych terenów, a z drugiej strony, co bodaj najważniejsze, oparty na właściwym światopoglądzie, przesycony właściwym rozumieniem roli tej nauki i operujący pojęciami odpowiadającymi naszemu okresowi rozwoju społecznego. Podręcznik *E. N. Pawłowskiego* spełnia zadania takiemu dziełu stawiane. Nie jest to formalne zestawienie i opis pasożytów, nie jest to rejestr parazytoz. Jest to pełny kurs parazytologii lekarskiej jako nauki o całości tego swoistego stosunku, jaki zachodzi między pasożytami i żywicielami. Zagadnienie chorób inwazyjnych ujmuje on w pełni, z uwzględnieniem zarówno czynników ekologicznych, jak i społecznych. Pionierskie są ujęcia dróg rozwoju chorób transmisyjnych, krążenia pasożytów w biocenozie, modyfikacji przystosowawczych wśród pasożytów (np. *Entamoeba*); niezwykle cenne są dane z biologii kleszczy, komarów itd. Pozostawienie i wyjaśnienie zagadnienia epidemii czy endemii chorób inwazyjnych w warunkach środowiska naturalnego i kulturowego, wskazanie na źródła i ogniwa chorób tkwiące w najprzeróżniejszych środowiskach, wykrywanie prawidowości rozwoju chorób transmisyjnych — to elementy niezbędne dla naukowego i owocnego traktowania zagadnień higieny społecznej. Przystrojony polskiej literaturze naukowej podręcznik akademika *E. N. Pawłowskiego* „Parazytologia człowieka“ może i powinien stać się cenną i nieodzowną pomocą dla lekarzy nie tylko tych, którzy interesują się specjalnie „pasożytnictwem“, jak mówi przedślowie do wydawnictwa, ale sądzić należy — dla ogółu lekarzy, szczególnie terenowych, którym zagadnienia chorób inwazyjnych i walki z nimi nie mogą być obce.

\*



Cena zł 21,-

