

P 1434  
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

ACTA  
BIOCHIMICA POLONICA

KWARTALNIK

T O M   I V



WARSZAWA 1957  
PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE

KOMITET REDAKCYJNY

Tadeusz Korzybski, Irena Mochnacka, Włodzimierz Mozołowski

RADA REDAKCYJNA

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

ADRES REDAKCJI: Warszawa, Sniadeckich 8



## S P I S T R E Ś C I

(Tom IV. 1957 r.)

### Z e s z y t 1

S. G r o s s i T. W r o ń s k a, Odczytywanie pasków z elektroforezy bibułowej . . . . .	3
P. M a s t a l e r z, Synteza kwasu $\gamma$ -fosfonoglutaminowego . . . . .	19
M. C h o r ą ż y, Wpływ operacyjnego usunięcia nowotworu na bilans azotowy u szczura . . . . .	23
J. H e l l e r, P. S z a f r a ń s k i, L. S z a r k o w s k a i J. W. S z a r k o w s k i, Bilans energetyczny wzrostu hodowli <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv . . . . .	33
W. D r a b i k o w s k i, Modyfikacja dwuacetylowej metody oznaczania kreatyny i fosfokreatyny . . . . .	41
T. K o r z y b s k i, Synoptyczny sposób przedstawiania wiadomości strukturalnych biochemii . . . . .	49

### Z e s z y t 2

A. D m o c h o w s k i i L. K ł y s z ę j k o, Frakcje fosforowe łusek łuszczyca ( <i>Psoriasis vulgaris</i> ) . . . . .	73
G. K u p r y s z e w s k i i T. S o k o ł o w s k a, Nowe metody estryfikacji aminokwasów . . . . .	85
A. M a n i t i u s, Zawartość potasu w surowicy krwi ludzi zdrowych. II. Wpływ zastoju żylnego krwi, posiłku i wysiłku. Stałość osobnicza poziomu potasu . . . . .	93
J. D ź u ł y ń s k a, Kwas neuraminowy we frakcjach białkowych surowicy otrzymywanych metodami: wysalania i wytrącania metanolem . . . . .	103
K. S p e t t, Fotometryczna metoda oznaczania stopnia utlenowania hemoglobiny w krwi . . . . .	117
J. W. S z a r k o w s k i, Aktywowanie tyrozynazy z ziaren żyta . . . . .	129

### Z e s z y t 3

R. R y ś, L. G ó r s k i i H. S t y c z y ń s k i, Badania nad powstawaniem amoniaku w zwaczu owiec karmionych różnymi dietami . . . . .	147
I. R e i f e r i S. N i z i o ł e k, Kolorymetryczna mikrometoda oznaczania alkaloidów w nasionach łubinu . . . . .	165

E. G ą s i o r, Zastosowanie amin alifatycznych do elucji aminokwasów z kationitów o grupach funkcyjnych sulfonowej i fenolowej . . . . .	181
J. K r z e m i c k a, 17-ketosterydy i 17-hydroksysterydy w moczu ludzi, królików i szczurów . . . . .	187
J. P a w e ł k i e w i c z i K. Z o d r o w, Badania nad biosyntezą związków kobalaminowych. 2. Mechanizm powstawania kobalamin u <i>Corynebacterium diphtheriae</i> . . . . .	203

Z e s z y t 4

W a n d a M e j b a u m - K a t z e n e l l e n b o g e n, S t a n i s ł a w K a r p i a k, B a r b a r a K o w a l i E l ż b i e t a R o m a n o w s k a, Wpływ śródskórnego podania hormonu adrenokortykotropowego na metabolizm ludzi zdrowych . . . . .	217
E. B o r o w s k i, Ulepszona metoda otrzymywania antybiotyku tetainy. II. Otrzymywanie czystego antybiotyku . . . . .	231
E. B o r o w s k i i J. K o n o p a, Badania nad budową chemiczną tetainy. I. Studia elektroforetyczne . . . . .	241
W. O s t r o w s k i i A. K r a w c z y k, Biochemia samożywnych bakterii siarkowych. IV. Badania nad przemianą siarki w <i>Thiobacillus thioparus</i> przy zastosowaniu <sup>35</sup> S . . . . .	249
A. M a n i t i u s, O tak zwanej homolizie odwracalnej. I. Zmiany stężeń jonów nieorganicznych. Istota rewersji . . . . .	267
S. H i l l e r i A. M a n i t i u s, O tak zwanej hemolizie odwracalnej. II. Badania morfologiczne . . . . .	277

## I N D E K S A U T O R Ó W

### B

- Borowski E.**, Ulepszona metoda otrzymywania antybiotyku tetainy. II. Otrzymanie czystego antybiotyku . . . . . 231
- Borowski E., Konopa J.**, Badania nad budową chemiczną tetainy. I. Studia elektroforetyczne . . . . . 241

### C

- Choraży M.**, Wpływ operacyjnego usunięcia nowotworu na bilans azotowy u szczura . . . . . 23

### D

- Dmochowski A., Kłyszewko L.**, Frakcje fosforowe łusek łuszczycy (*Psoriasis vulgaris*) . . . . . 73
- Drabikowski W.**, Modyfikacja dwuacetylowej metody oznaczania kreatyny i fosfokreatyny . . . . . 41
- Dżużyńska J.**, Kwas neuraminowy we frakcjach białkowych surowicy otrzymanych metodami: wysalania i wytrącania metanolem . . . . . 103

### G

- Gąsior E.**, Zastosowanie amin alifatycznych do elucji aminokwasów z kationitów o grupach funkcyjnych sulfonowej i fenolowej . . . . . 181
- Górski L.**, patrz Ryś R. i Styczyński H. . . . . 147
- Gross S., Wrońska T.**, Odczytywanie pasków z elektroforezy bibułowej . . . . . 3

### H

- Heller J., Szafrąński P., Szarkowska L. i Szarkowski J. W.**, Bilans energetyczny wzrostu hodowli *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv . . . . . 33
- Hiller S., Manitius A.**, O tak zwanej hemolizie odwracalnej. II. Badania morfologiczne . . . . . 277

### K

- Karpiak S.**, patrz Mejbaum-Katzenellenbogen W., Kowal B. i Romanowska E. 217
- Kleczkowska D.**, patrz Reifer I. . . . . 135
- Kłyszewko L.**, patrz Dmochowski A. . . . . 73
- Konopa J.**, patrz Borowski E. . . . . 241

### V

<b>Korzybski T.</b> , Synoptyczny sposób przedstawiania wiadomości strukturalnych biochemii . . . . .	49
<b>Kowal B.</b> , patrz <b>Mejbaum-Katzenellenbogen W.</b> , <b>Karpiak S.</b> i <b>Romanowska E.</b>	217
<b>Krawczyk A.</b> , patrz <b>Ostrowski W.</b> . . . . .	249
<b>Krzemicka J.</b> , 17-ketosterydy i 17-hydroksysterydy w moczu ludzi, królików i szczurów . . . . .	187
<b>Kupryszewski G.</b> , <b>Sokołowska T.</b> , Nowe metody estryfikacji aminokwasów . . . . .	85

### M

<b>Maniñius A.</b> , Zawartość potasu w surowicy krwi ludzi zdrowych. II. Wpływ zastojów żylnych krwi, posiłku i wysiłku. Stałość osobnicza poziomu potasu . . . . .	93
<b>Maniñius A.</b> , O tak zwanej hemolizie odwracalnej. I. Zmiany stężeń jonów nieorganicznych. Istota rewersji . . . . .	267
<b>Maniñius A.</b> , patrz <b>Hiller S.</b> . . . . .	277
<b>Mastalerz P.</b> , Synteza kwasu $\gamma$ -fosfonoglutaminowego . . . . .	19
<b>Mejbaum-Katzenellenbogen W.</b> , <b>Karpiak S.</b> , <b>Kowal B.</b> i <b>Romanowska E.</b> , Wpływ śródskórnego podania hormonu adrenokortykotropowego na metabolizm ludzi zdrowych . . . . .	217

### N

<b>Niziołek S.</b> , patrz <b>Reifer I.</b> . . . . .	165
-------------------------------------------------------	-----

### O

<b>Ostrowski W.</b> , <b>Krawczyk A.</b> , Biochemia samożywnych bakterii siarkowych. IV. Badania nad przemianą siarki w <i>Thiobacillus thioparus</i> przy zastosowaniu $^{35}\text{S}$ . . . . .	249
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

### P

<b>Pawełkiewicz J.</b> , <b>Zodrow K.</b> , Badania nad biosyntezą związków kobalaminy. 2. Mechanizm powstawania kobalaminy u <i>Corynebacterium diphtheriae</i> . . . . .	203
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

### R

<b>Reifer I.</b> , <b>Kleczkowska D.</b> , Badania nad biosyntezą alkaloidów w łubinie wąskolistnym ( <i>Lupinus angustifolius</i> ) . . . . .	135
<b>Reifer I.</b> , <b>Niziołek S.</b> , Kolorymetryczna mikrometoda oznaczania alkaloidów w nasionach łubinu . . . . .	165
<b>Romanowska E.</b> , patrz <b>Mejbaum-Katzenellenbogen W.</b> , <b>Karpiak S.</b> , <b>Kowal B.</b>	217
<b>Ryś R.</b> , <b>Górski L.</b> i <b>Styczyński H.</b> , Badania nad powstawaniem amoniaku w żwaczu owiec karmionych różnymi dietami . . . . .	147

### S

<b>Sokołowska T.</b> , patrz <b>Kupryszewski G.</b> . . . . .	85
<b>Spett K.</b> , Fotometryczna metoda oznaczania stopnia utleniania hemoglobiny w krwi . . . . .	117

### VI

<b>Styczyński H.</b> , patrz. Ryś R., Górski L. . . . .	147
<b>Szafrński P.</b> , patrz Heller J., Szarkowska L., Szarkowski J. W. . . . .	33
<b>Szarkowska L.</b> , patrz Heller J., Szafrński P., Szarkowski J.W. . . . .	33
<b>Szarkowski J. W.</b> , patrz Heller J., Szafrński P., Szarkowska L. . . . .	33
<b>Szarkowski J. W.</b> , Aktywowanie tyrozynazy z ziaren żyta . . . . .	120

**W**

<b>Wrońska T.</b> , patrz Gross S. . . . .	3
--------------------------------------------	---

**Z**

<b>Zodrow K.</b> , patrz Pawełkiewicz J. . . . .	203
--------------------------------------------------	-----

## INDEKS RZECZOWY

### A

<b>Adrenokortykotropowy hormon:</b> wpływ śródskórnego podania na metabolizm ludzi zdrowych, W. Mejbaum-Katzenellenbogen, St. Karpiak, B. Kowal, E. Romanowska . . . . .	217
<b>Alkaloidy:</b> Badania nad biosyntezą w łubinie wąskolistnym, I. Reifer i D. Kleczkowska . . . . .	135
<b>Alkaloidy:</b> kolorymetryczna mikrometoda oznaczania, I. Reiter i S. Niziołek . . . . .	165
<b>Aminokwasy:</b> elucja z kationitów aminami alifatycznymi, E. Gąsior . . . . .	181
<b>Aminokwasy:</b> estryfikacja, nowe metody, G. Kupryszewski i T. Sokołowska . . . . .	85
<b>Amoniak:</b> powstawanie w żwaczu owiec karmionych różnymi dietami, R. Ryś, L. Górski i H. Styczyński . . . . .	147

### B

<b>Bilans azotowy:</b> u szczura, wpływ operacyjnego usunięcia nowotworu, M. Choraży . . . . .	23
<b>Bilans energetyczny:</b> wzrostu hodowli <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv. J. Heller, P. Szafranski, L. Szarkowska, i J. W. Szarkowski . . . . .	33
<b>Biochemia:</b> synoptyczny sposób przedstawiania wiadomości strukturalnych, T. Korzybski . . . . .	49

### C

<b>Corynebacterium diphtheriae:</b> mechanizm powstawania kobalamin, J. Pawelkiewicz i K. Zodrow . . . . .	203
------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

### E

<b>Elektroforeza bibułowa:</b> odczytywanie pasków, S. Gross i T. Wrońska . . . . .	3
<b>Elucja:</b> aminokwasów z kationitów aminami alifatycznymi, E. Gąsior . . . . .	181

### F

<b>Fosforowe frakcje:</b> łusek łuszczycy ( <i>Psoriasis vulgaris</i> ), A. Dmochowski i L. Klyszejko . . . . .	73
<b>Fosfokreatyna i kreatyna:</b> modyfikacja dwuacetylowej metody oznaczania, W. Drabikowski . . . . .	41
<b><math>\gamma</math>-Fosfonoglutaminowy kwas:</b> synteza, P. Mastalerz . . . . .	19



**H**

<b>Hemoglobina:</b> fotometryczna metoda oznaczania stopnia utlenowania w krwi, K. Spett . . . . .	117
<b>Hemoliza odwracalna:</b> badania morfologiczne, S. Hiller i A. Manitius . . . . .	277
<b>Hemoliza odwracalna:</b> zmiany stężeń jonów nieorganicznych, A. Manitius . . . . .	267

**K**

<b>Kationity:</b> elucja aminokwasów aminami alifatycznymi, E. Gąsior . . . . .	181
<b>17-ketosterydy i 17-hydroksysterydy:</b> w moczu ludzi, królików i szczurów, J. Krzemicka . . . . .	187
<b>Kobalaminy:</b> mechanizm powstawania u <i>Corynebacterium diphtheriae</i> , J. Pawelkiewicz i K. Zodrow . . . . .	203
<b>Kreatyna i fosfokreatyna:</b> modyfikacja dwuacetylowej metody oznaczania, W. Drabikowski . . . . .	41
<b>Krew:</b> fotometryczna metoda oznaczania stopnia utlenowania hemoglobiny, K. Spett . . . . .	117

**Ł**

<b>Łubin:</b> kolorymetryczna mikrometoda oznaczania alkaloidów, I. Reifer i S. Niziołek . . . . .	165
<b>Łubin wąskolistny:</b> ( <i>Lupinus angustifolius</i> ) badania nad biosyntezą, I. Reifer i D. Kleczkowska . . . . .	135

**M**

<b>Metabolizm:</b> ludzi zdrowych, wpływ śródskórnego podania hormonu adrenokortykotropowego, W. Mejbaum-Katzenellenbogen, St. Karpiak, B. Kowal, E. Romanowska . . . . .	217
<b>Mikrometoda:</b> kolorymetryczna oznaczania alkaloidów w nasionach łubinu. I. Reifer i S. Niziołek . . . . .	165
<b>Mocz:</b> ludzi, królików i szczurów, zawartość 17-ketosterydów i 17-hydroksysterydów, J. Krzemicka . . . . .	187
<b>Mycobacterium tuberculosis H 37 Rv:</b> bilans energetyczny wzrostu hodowli, J. Heller, P. Szafrński, L. Szarkowska i J. W. Szarkowski . . . . .	33

**N**

<b>Neuraminowy kwas:</b> we frakcjach białkowych surowicy, J. Dżużyńska . . . . .	103
-----------------------------------------------------------------------------------	-----

**P**

<b>Potas:</b> w surowicy krwi ludzi zdrowych, stałość osobnicza, wpływ zastoju żylnego, wysiłku i posiłku, A. Manitius . . . . .	93
<b>Psoriasis vulgaris:</b> fosforowe frakcje, A. Dmochowski i L. Kłyszejko . . . . .	73

**S**

<b>Siarka:</b> przemiana w <i>Thiobacillus thioparus</i> , badania z <sup>35</sup> S, W. Ostrowski i A. Krawczyk . . . . .	249
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

**IX**

<b>Surowica krwi:</b> kwas neuraminowy we frakcjach białkowych, J. Dżułyńska	103
<b>Surowica krwi:</b> zawartość potasu u ludzi zdrowych, stałość osobnicza, wpływ zastoju żylnego, wysiłku i posiłku, A. Manitius	93
<b>Synoptyczny:</b> sposób przedstawiania wiadomości strukturalnych w biochemii, T. Korzybski	49

### T

<b>Thiobacillus thioparus:</b> przemiana siarki badana przy zastosowaniu <sup>35</sup> S, W. Ostrowski i A. Krawczyk	249
<b>Tetaina:</b> badania elektroforetyczne, E. Borowski i J. Konopa	241
<b>Tetaina:</b> ulepszona metoda otrzymywania czystego antybiotyku, E. Borowski	231
<b>Tyrozynaza:</b> z ziaren żyta, aktywowanie, J. W. Szarkowski	129

### Z

<b>Żwacz:</b> powstawanie amoniaku u owiec karmionych różnymi dietami, R. Ryś, L. Górski i H. Styczyński	147
----------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

WAŻNE DLA AUTORÓW

KĄDZY AUTOR WINIEN DOKŁADNIE ZAPOZNAĆ SIĘ Z TREŚCIĄ „WYTYCZNYCH DLA AUTORÓW” JESZCZE PRZED PRZYSTĄPIENIEM DO PISANIA SWEJ PRACY I SKRUPULATNIE STOSOWAĆ SIĘ DO NICH. PRACE NIE ODPOWIADAJĄCE POD WZGLĘDEM FORMY POSTAWIONYM WYMOGOM NIE BĘDĄ MOĞLY BYĆ BRANE POD UWAGĘ I ZOSTANĄ ZWRÓCONE AUTORIZACJĄ. FAKT PRZESŁANIA PRACY DO REDAKCJI UWĄŻANY JEST JAKO RÓWNOZNACZNY ZE ZGODĄ AUTORA NA TREŚĆ „WYTYCZNYCH”.

WYTYCZNE DLA AUTORÓW

1. Acta Biochimica Polonica publikują prace biochemiczne i z dziedzin pokrewnych biochemii, zawierające nie ogłoszone dotychczas wyniki badań doświadczalnych. Ogłaszane prace winny zawierać element nowości naukowej. Językiem prac zgłaszanych do publikacji w Acta Biochimica Polonica jest język polski, lub jeden z języków kongresowych.

2. Prace powinny być pisane możliwie zwięzłe, ale zwięzłość nie powinna powodować niejasności przedstawienia. Artykuły są przeznaczone przede wszystkim dla czytelnika wyspecjalizowanego w danym temacie, mimo to artykuły powinny być zrozumiałe dla ogółu czytelników. Opis doświadczeń powinien być taki, by mógł je powtórzyć każdy, kto dysponuje odpowiednim materiałem, wyposażeniem i techniczną sprawnością. Należy unikać technicznych neologizmów. Używane skróty należy wyjaśnić w tekście.

3. Układ artykułów. Prace należy przysyłać do redakcji w postaci gotowej do druku, w trzech egzemplarzach pisanych na maszynie jednostronnie, z marginesem szerokości około 4 cm po lewej stronie i około 1 cm po prawej stronie, z podwójną interlinią oraz z numeracją stron. Pierwszy egzemplarz należy pisać na papierze piśmiennym (białym). W tekście maszynopisu nie należy robić żadnych poprawek, przekreśleń lub podkreśleń na maszynie ani atramentem. Dopuszczalna najwyższa ilość poprawek wynosi trzy na jednej stronie. Autor może proponować oznaczenia typograficzne przez odpowiednie określenie (tekst rozspacjowany, złożony kursywą, ccionką grubą itp.), ale wyłącznie ołówkiem. Nie należy stawiać kropek po tytułach i podtytułach, ani po skrótach takich jak: ml, cm, g, kg. Dla wyrażenia mikrogramu służy skrót „μ”, a nie „γ”. Na osobnych kartkach poza tekstem pracy należy umieścić: a) streszczenie polskie, b) cytowaną literaturę, c) tablice, d) rysunki lub fotografie wraz z objaśnieniami (patrz, pkt. 8 i 9), e) pełne imię i nazwisko autora (-ów), adres dla przesłania korekty i honorarium, oraz skróconą wersję tytułu nie przekraczającą 60 miejsc literowych, przeznaczoną dla umieszczenia jej nad stronami tekstu pracy. Należy podać nazwisko i adres osoby upoważnionej do przeprowadzenia korekty w przypadku nieobecności autora. W tekście należy zaznaczyć

ołówkiem na marginesie w przybliżeniu miejsca, w których powinny być umieszczone tablice i rysunki. *Prace nie odpowiadające wymaganiom zawartym w punkcie 3 zostaną przepisane na koszt autora, a odpowiednia kwota zostanie potrącona z honorarium autorskiego.*

4. Na pierwszej stronie pracy należy podać: imię i nazwisko autora (-ów), tytuł możliwie zwięzły, ale jasno charakteryzujący treść pracy, zakład naukowy, w którym wykonano pracę i nazwisko kierownika zakładu, odpowiedzialnego za jego działalność. W interesie autora leży, aby *tytuł pracy* zawierał w najkrótszej formie podstawowy wynik pracy, a nie tylko zagadnienie. Należy unikać tytułów w rodzaju: „Badania nad...”. Wskazane jest podawanie już w tytule głównego wniosku wynikającego z pracy, nawet w przypadku, gdy jest on negatywny. Tytuł może wtedy przybrać postać: „Niemożność...” lub podobnie.

5. Tekst pracy powinien składać się z następujących części: a) zwięzły wstęp wyjaśniający cel i założenie pracy, b) opis metod doświadczalnych, charakterystyka, pochodzenie lub sposób preparatywnego uzyskania używanych chemikaliów oraz opis szczegółów, które są potrzebne dla powtórzenia opisanych doświadczeń i sprawdzenia przeprowadzonych obliczeń, c) opis wyników ujęty możliwie zwięźle, najlepiej w postaci tablic lub wykresów, d) dyskusja o uzyskanych wynikach, e) streszczenie lub wnioski — objętości nie przekraczającej 3% rozmiarów pracy. Streszczenie lub wnioski winny być tak sformułowane, aby zawierały, w postaci możliwie najbardziej zwięzłej, wyniki pracy wraz z głównymi danymi liczbowymi. Wnioski winny wynikać bezpośrednio z doświadczeń. Wnioski pośrednie mogą być zamieszczone w tym punkcie wyłącznie pod warunkiem wyraźnego określenia, że mają one charakter dyskusyjny lub podobny.

6. Metody doświadczalne powinny być przedstawione bardzo starannie. Jeżeli autor posługiwał się znaną metodą publikowaną, wystarczy powołanie się na odnośną pracę, ewentualnie omówienie istoty danej metody. Należy wymienić wszelkie, nawet pozornie niewielkie odchylenia od pierwotnej metody; stwierdzenie, że posługiwano się odnośną metodą „z niewielkimi modyfikacjami” nie jest dopuszczalne.

7. Stężenie roztworów pospolitych kwasów i zasad wyraża się pojęciem normalności (N), natomiast dla roztworów soli należy posłużyć się pojęciem mowości (M): 0,25 N HCl, 0,15 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Stężenie ułamkowe należy wyrazić systemem dziesiętnym, np. 0,25 N HCl, a nie N/4 HCl. Pojęcia „procent”, „‰” używa się w ścisłym znaczeniu, tj. w gramach na 100 gramów roztworu. Procenty objętościowe należy wyrażać symbolem „% obj./obj.”, a procenty wagowo-objętościowe „% wag.obj.”.

8. Poszczególne tablice powinny mieć nagłówek opisujący ich treść. Sens tablic powinien być zrozumiały bez odnośnienia się do tekstu pracy. Nie jest konieczne ogłaszanie wszystkich liczbowych wyników podobnych doświadczeń, jeżeli poda się wartość średnią wraz z jego „średnim odchyleniem”, ew. liczbę indywidualnych rezultatów.

9. Rysunki i fotografie należy wykonywać w postaci nadającej się do reprodukcji, lub przerysowania. Każdy rysunek, lub fotografia winna być przygotowana na oddzielnej kartce. Na odwrocie każdego rysunku lub fotografii należy podać ołówkiem: nazwisko autora, pierwsze słowa tytułu pracy, kolejny numer rysunku oraz pierwsze słowa legendy, która ma być umieszczona pod nim. Do rysunków i fotografii należy dołączyć wykaz (na maszynie) zawierający kolejne numery wraz z tytułami i legendą. Należy unikać podawania na rysunkach objaśnień tekstowych. Na fotografiach nie należy dopisywać żadnych oznaczeń. Jeśli fotografie t-

kich oznaczeń wymagają, należy umieścić je na przypiętej do fotografii kalce technicznej. Nadmierna ilość rysunków może być wykonana wyłącznie na *koszt autora*. Krzywe wyrażające zależności zbadane eksperymentalnie winny mieć wyraźnie zaznaczone punkty, których wartości uzyskano doświadczalnie.

10. Cytowaną *literaturę* należy wypisać na oddzielnej karcie, wymieniając pozycje w alfabetycznej kolejności autorów. W wykazie podawać kolejno: numer pozycji, nazwisko autora, pierwsze litery imion, skrócony tytuł czasopisma, tom (rocznik), początkową stronę artykułu i rok wydania. Np. [8] Parnas J. K., *Acta Biol. Exp.* **11**, 292, 1937. Jeżeli cytowany artykuł ma kilku autorów, należy w wykazie literatury podać nazwiska i początkowe litery imion wszystkich autorów. Dla cytowanych książek (nie czasopism) należy podać także tytuł książki, wydawcę, miejsce oraz rok wydania. Np. [12] Sniadecki J., *O fizycznym wychowaniu dzieci*, Turowski, Sanok, 1855. Wykaz używanych skrótów czasopism podają Roczniki Chemii **26**, 497, 1952. Prace kilkakrotnie cytowane należy podawać jeden raz, a wszystkie odsyłacze do tej pracy powinny mieć ten sam numer. Powołanie się w tekście na odnośną pozycję cytowanej literatury następuje przez wymienienie numeru pozycji wykazu w nawiasie, np. [13].

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

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

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



S. GROSS i T. WRÓŃSKA

## ODCZYTYWANIE PASKÓW Z ELEKTROFOREZY BIBUŁOWEJ

*Z Instytutu Medycyny Pracy w Łodzi*

*Dyrektor: doc. dr J. Nofer*

### Wstęp

Od chwili wprowadzenia w 1950 r. [6] elektroforezy bibułowej do badań analitycznych pojawił się w literaturze cały szereg artykułów opisujących różne sposoby odczytywania wyniku analizy. W analizie białek surowicy krwi paski, często nazywane proteinogramami, poddaje się barwieniu odpowiednim barwnikiem, po czym wysuszony pasek odczytuje się:

- 1) na drodze elucji i następnego pomiaru eluatu w spektrofotometrze,
- 2) na drodze bezpośredniego spektrofotometrycznego lub absorpcyjometrycznego odczytywania pochłaniania poszczególnych frakcji na bibule. Odczytywanie to można prowadzić przy użyciu aparatury:
  - a) nierejestrującej lub
  - b) samorejestrującej.

Każdy z tych sposobów dostarcza wyniku, który zależy od konkretnych warunków prowadzenia pomiaru, a przede wszystkim od rodzaju użytej aparatury, przy czym otrzymane wyniki są nieporównywalne.

W ostatnich latach daje się zaobserwować dążność do coraz większego automatyzowania czynności związanych z odczytywaniem proteinogramów i do konstruowania coraz bardziej skomplikowanych i uniwersalnych aparatów przeznaczonych do tych celów. Także i u nas w kraju obserwuje się dążność do konstrukcji uproszczonych samopiszących aparatów z użyciem prymitywnych części aparatury dostępnych u nas w handlu. Celem tego artykułu jest omówienie kilku najważniejszych sposobów odczytywania proteinogramów, zestawienie wyników otrzymanych przy użyciu różnych aparatów dostępnych na naszym terenie oraz zwrócenie uwagi na trudności konstrukcji aparatu, który dostarczyłby możliwie

obiektywnych wartości rozkładu frakcji białkowych w proteinogramie. Za obiektywne można uważać wyniki tego rzędu wielkości, co wyniki elektroforezy w roztworze lub wyniki uzyskane metodami frakcjonowanego wytrącania, chociaż obydwie te metody oparte są na wykorzystaniu innych własności białek i uzyskanie identycznych wyników we wszystkich tych metodach jest niemożliwe.

#### 1. METODA ELUCJI

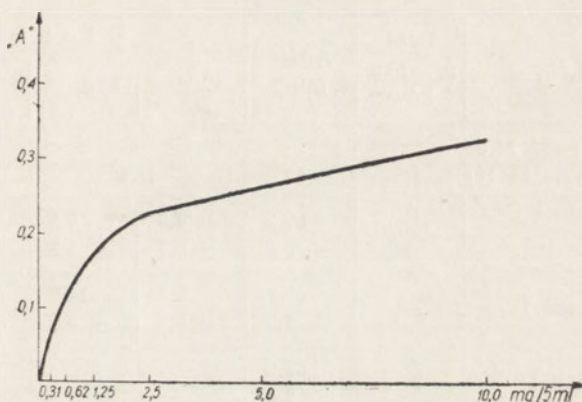
Ta najprostsza i wprowadzona do elektroforezy przez Grassmana [6] metoda polega na pocięciu paska bibuły prostopadle do jego długości na odcinki szerokości ok. 0,5 cm i wyekstrahowaniu barwnika z każdego paska. Paski ekstrahuje się w osobnych próbkach jednakowymi porcjami odpowiedniego rozpuszczalnika, przy czym ekstrakcję powinno się prowadzić w określonym czasie i pomiar absorpcji powinien odbywać się zawsze po upływie tego samego czasu od chwili rozpoczęcia ekstrakcji (absorpcja ekstraktu jednostajnie spada z biegiem czasu).

W przypadku elektroforezy białek surowicy znajdują najczęściej zastosowanie dwa barwniki: czerń amidowa 10B lub też błękit bromofenolowy, z których ten ostatni stosowany jest chętniej ze względu na to, że powinowactwo jego do albumin jest bardzo podobne do powinowactwa do globulin [16, 17]. Nie wymaga dzięki temu stosowania współczynników przeliczeniowych. Ponadto barwnik ten posiada większą wartość współczynnika absorpcji. W przypadku stosowania błękitu bromofenolowego elucję można prowadzić w 5 ml 0,1 n NaOH w ciągu 1 godz., po czym pomiar spektrofotometryczny prowadzi się w długości fali  $\lambda = 595 \text{ m}\mu$ . Otrzymane wartości absorpcji odkłada się na wykresie, w którym rzędne oznaczają wartości absorpcji, a odcięte odległość od początku paska. W ten sposób otrzymuje się krzywą rozkładu frakcji w proteinogramie.

Pole zawarte pod krzywą jest planimetrowane i stosunek pól zawartych pod poszczególnymi maksimumami do sumarycznej powierzchni jest miarą ilości poszczególnych frakcji białka. Opisany sposób wymaga, aby roztwory barwnika zachowywały się zgodnie z prawem Beera, mówiącym o prostej proporcjonalności absorpcji i stężenia. Zgodność ta jest spełniona tylko dla bardzo niskich wartości absorpcji, o czym należy pamiętać przy interpretacji wyników. Sposób ten posiada także inne wady związane z pomiarem zbyt dużej ilości próbek eluatu i z badaniem zbyt małych wartości absorpcji leżących poniżej zakresu optymalnych stężeń. W większości pracowni pomiar absorpcji wykonuje się przy użyciu absorpcjometrów łatwiej dostępnych niż spektrofotometry. W związku z tym do pomiarów zostają wprowadzone dodatkowe czynniki zniekształ-



cające prostą proporcjonalność absorpcji ( $A$ ) od stężenia ( $c$ ). Jest to wynikiem złej, filtrowej monochromatyzacji światła, co ma miejsce w absorpcjometrach [7]. Filtry przepuszczają zbyt szeroką wiązkę widmową, co powoduje pojawienie się pozornych odstępstw od prawa Beera. W przypadku amerykańskiego absorpcjometru Klett'a, zaopatrzonego w filtr pomarańczowy, wykres zależności  $A$  (absorpcji) od  $c$  (stężenie błękitu bromofenolowego w roztworze) posiada wygląd widoczny na rys. 1.



Rys. 1. Zależność absorpcji od stężenia błękitu bromofenolowego w eluacie

Z wykresu tego widać, że w miarę wzrostu stężenia barwnika wskazania aparatu (absorpcja) są coraz mniej wrażliwe na zmiany stężenia i wskazania te nie mogą być prostą miarą stężenia barwnika.

Wykres posiada bardzo krótki odcinek prostej zależności absorpcji od stężenia, z tego powodu zmiana grubości naczynek lub też rozcieńczenie badanego roztworu tylko w ograniczonym zakresie mogą być wykorzystane dla wyeliminowania niezgodności z prawem Beera.

W związku z tym konieczne się staje graficzne przeliczenie wskazań absorpcjometru na stężenia barwnika i obliczanie procentowego udziału poszczególnych frakcji na drodze dzielenia każdej z nich przez sumę stężenia barwnika we wszystkich frakcjach. Dla ułatwienia tnie się wtedy pasek na tyle części, ile frakcji białka zostało rozdzielonych. Z powodu znacznych różnic wielkości frakcji albumin w porównaniu do pozostałych należy dla zwiększenia dokładności wyników rozcieńczać albuminy w 3—5-krotnie większej ilości roztworu i następnie odczytane z wykresu stężenia mnożyć przez wielkość zastosowanego rozcieńczenia (w stosunku do pozostałych frakcji).

Na tej drodze można wyeliminować wpływ ewentualnych niezgodności z prawem Beera.

Wyniki uzyskane dla normalnej krwi przy zastosowaniu tej metody są zbliżone do spotykanych w literaturze, jak to widać z tablicy 1, częściowo zaczerpniętej z artykułu Orłowskiego i Kleczkowskiego [13] i częściowo z książki Antweilera [1].

Tablica 1  
Przytoczone z literatury normy zawartości frakcji białkowych krwi  
oraz wyniki własne

A u t o r	Ilość przypadków	Albu- miny	G l o b u l i n y			
			$\alpha_1$	$\alpha_2$	$\beta$	$\gamma$
Ojwin J.A., Basok M.J. i Ojwin W.J. [za 13]	10	58,0	13,9		13,3	16,5
Dole [za 1]	—	63,2 $\pm 2,8$	4,9 $\pm 0,7$	7,5 $\pm 1,3$	12,7 $\pm 1,9$	11,6 $\pm 2,5$
Armstrong [za 1]	—	55,2 $\pm 1,3$	5,3 $\pm 0,5$	14,0 $\pm 0,8$	13,4 $\pm 1,6$	11,0 $\pm 0,7$
Antweiler [za 1]	20	63,2 $\pm 2,49$	9,0 $\pm 1,75$		13,7 $\pm 0,29$	14,1 $\pm 1,92$
Kemula W. i Bartosiewicz W. [9]	1	54,2	4,0	9,1	9,7	23,0
Reiner i współautorzy [za 13]	80	56,8	15,9		12,8	14,4
Wyniki własne [8]	10	64,0 $\pm 2,2$	3,9 $\pm 0,24$	7,0 $\pm 1,03$	9,4 $\pm 1,02$	15,7 $\pm 1,29$

## 2. METODA BEZPOŚREDNIEGO FOTOMETROWANIA

a) przy użyciu aparatury nierejestrującej:

Zasada oznaczania polega na przesuwaniu zabarwionego paska bibuły pomiędzy odpowiednio dobranym źródłem światła i fotoogniwem. Stosunek natężeń prądów wysyłanych przez fotoogniwo w przypadku prześwietlania czystej i zabarwionej bibuły jest miarą wielkości absorpcji, jaką wykazuje badany punkt proteinogramu. Wartości absorpcji odczytuje się dla dużej ilości punktów bezpośrednio ze skali aparatu, po czym nanosi się je na analogiczny wykres zależności absorpcji od długości paska, jak o tym była mowa w metodzie elucji.

Pole zawarte pod wykresem jest planimetrowane, a poszczególne powierzchnie zawarte pod odpowiednimi maksimami są miarą wielkości poszczególnych frakcji białek. Sposób ten może znaleźć zastosowanie tyl-

ko przy użyciu spektrofotometru i to tylko w przypadkach pomiaru małych wartości absorpcji, dla których nie obserwuje się odstępstw od prawa Beera. W przypadkach absorpcjometru wyniki odbiegają od uzyskiwanych innymi metodami z powodu złej monochromatyzacji światła, prowadzącej do niezgodności z prawem Beera, jak o tym była już częściowo mowa. W tych przypadkach przy ścisłej standaryzacji warunków pracy można uzyskać dobre wyniki korzystając z odpowiednich krzywych kalibracji.

Spośród wielu absorpcjometrów tego typu można tu wspomnieć o ostatnio wprowadzonym przez firmę Zeiss—Jena modelu fotometru Pulfricha, dostosowanym do odczytywania pasków z elektroforezy.

b) przy użyciu aparatury samorejestrującej:

Zasada postępowania jest analogiczna jak w poprzednim przypadku. Zabarwiony proteinogram przesuwają się pomiędzy źródłem światła monochromatycznego i fotoogniwem. Prąd wysyłany przez fotoogniwo porusza lusterko galwanometru, rzucające wiązkę światła na przesuwaną się papier fotograficzny. Ruch papieru fotograficznego jest sprzężony z ruchem proteinogramu. Szybkość tego ruchu zależy od przekładni sprzężenia i ma wpływ na wielkość otrzymywanego pola. Zasadnicza różnica wykresów otrzymywanych w aparaturze samorejestrującej i nierejestrującej polega na tym, że w pierwszym przypadku otrzymany wykres jest wykresem transmisji (przepuszczalności), a nie wykresem absorpcji, jak to ma miejsce w drugim przypadku. Absorpcja związana jest z przepuszczalnością, określoną jako procent transmisji ( $T^0/\%$ ) zależnością:

$$A = \lg \frac{I_0}{I} = ac l = \lg \frac{100}{T^0/\%} = 2 - \lg T^0/\%,$$

gdzie  $a$  — współczynnik absorpcji,  $c$  — stężenie,  $l$  — grubość warstwy,  $I_0$  — natężenie promieniowania przechodzącego przez bibułę,  $I$  — natężenie promieniowania przechodzącego przez zabarwioną bibułę.

Na skutek tego wychylenia galwanometru, a więc i pola zawarte pod krzywą, pozostają w logarytmicznej zależności od stężenia barwnika, a więc wielkość pola nie może być miarą zawartości poszczególnych frakcji białkowych.

Aby tę wadę usunąć, należałoby otrzymany wykres transmisji punkt po punkcie przeliczać na absorpcję i planimetrować pole dopiero pod wykresem absorpcji. Można także skonstruować aparaty w ten sposób, aby wynikiem pomiaru był bezpośrednio wykres absorpcji. Można to uzyskać stosując odpowiednie przekładnie kształtu logarytmicznego, zmieniające w logarytmiczny sposób szybkość poruszania się lusterka w zależności od wielkości mierzonej absorpcji. Można także stosować wzmacnianie prądu przy pomocy lampy wzmacniającej pracując na początkowym lo-

garytmicznym odcinku jej charakterystyki. Pierwszy z tych sposobów jest żmudny, pozostałe jeszcze w technice niedostatecznie opracowane na naszym terenie. W samopiszących absorpcjometrach do ostatnio omówionej wady samopiszących spektrofotometrów (podawanie wykresów w jednostkach transmisji lub też w jednostkach  $100 - T^0/0$ ) dochodzi jeszcze wpływ złej monochromatyzacji światła.

Absorpcjometry, w których stosuje się nawet dobre selektywne filtry, dają wyniki pomiarów pozostające w dużej niezgodności z prawem Beera. Fakt ten wpływa na znaczne liczbowe rozbieżności wyników od wartości uznanych za właściwe, między innymi znaczne obniżenie wartości cyfry podającej zawartość albumin. Stosowanie światła monochromatycznego, np. żółtej linii lampy sodowej, lub też filtru dostarczającego promieniowanie monochromatyczne, np. filtru interferencyjnego, może zmniejszyć te różnice, wymaga jednak użycia bardzo silnych źródeł światła. Na skutek tego wpływu monochromatyzacji światła — wyników otrzymanych w absorpcjometrach samopiszących nie można przeliczać na absorpcję, ponieważ odczytywana na skali absorpcjometru wielkość nie ma nic wspólnego z właściwym pojęciem transmisji. Ostatnio w USA pojawiły się samopiszące aparaty do odczytywania proteinogramów, zbudowane w ten sposób, że wszystkie wymienione przez nas dotychczas wady zostały usunięte na drodze mechanicznych ulepszeń. Przykładem może być aparat Analytol [11] produkowany w ostatnich dwóch latach przez firmę Beckman w Kalifornii. Jest to aparat samopiszący przeprowadzający w czasie pomiaru przeliczenia wskazań transmisji na absorpcję, jednocześnie eliminujący wpływ niezgodności z prawem Beera. Przeliczenie odbywa się przy użyciu odpowiedniej przekładni o działaniu zależnym od:

- 1) stosunku absorpcji do transmisji,
- 2) niezgodności wskazań aparatu z prawem Beera,
- 3) rodzaju użytego barwnika,
- 4) innych szczegółów metody, jak rodzaj bibuły, szybkość poruszania się proteinogramu i inne.

Zakłady Zeissa w Jenie produkują także podobny aparat przystosowany zarówno do światła przechodzącego, jak i do odbitego. Na naszym terenie samopiszące urządzenia absorpcjometryczne do odczytywania proteinogramów opisali Ostrowski i Mikucki [14, 15], Kemula i Bartosiewicz [9] i Ruszkowski [20]. W dalszym ciągu przyrządy tego typu są ze względów aparaturowych szczególnie chętnie konstruowane w wielu laboratoriach na naszym terenie. W większości z nich wykorzystuje się do rejestracji samopiszące części wchodzące w skład polarografu Heyrowskiego lub też w skład elektrokardiografów. Detektorem jest jak zwykle fotoogniwo selenowe. W związku z tym na-

leży tu zwrócić uwagę na znaczenie szczegółów technicznych poszczególnych części użytych do konstrukcji aparatury absorpcyjometrycznej. I tak np. wielkość wytwarzanego w fotoogniwie fotoprądu jest zależna od wielkości natężenia światła padającego na nie, jednak zależność ta nie jest wprost proporcjonalna [7]. Przy dużych wartościach natężenia światła następują tym większe odchylenia od proporcjonalności, im opór galwanometru jest większy. Zbyt duże natężenia światła powodują tak zwane zmęczenie fotoogniwa, zaś zbyt małe powodują tak nieznaczne wychylenia galwanometru, że odczytanie ich jest utrudnione. Fotoogniwa wykazują pewne opóźnienie w reagowaniu na zmiany oświetlenia, podobnie jak i galwanometry o zbyt małym oporze wewnętrznym. Z tych to względów przesuwanie paska przed szczeliną fotoogniwa nie może być zbyt prędkie. Szybkość przesuwania paska wpływa poza tym nie jednakowo na wielkość powierzchni znajdujących się pod poszczególnymi maksimumami krzywej. Cechy te wskazują na konieczność wszechstronnego uwzględnienia własności poszczególnych części montowanego zestawu.

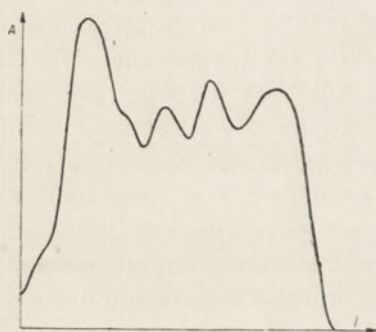
Oprócz wymienionych czynników pochodzących z rodzaju użytego zestawu elektrooptycznego na wyniki pomiaru wpływa jakość bibuły proteinogramu. Bibuła silnie rozprasza światło, znacznie obniżając natężenie promieniowania padającego na fotoogniwo. Wielkość rozproszenia zależy od gatunku bibuły. Stosunek ilości promieniowania przechodzącego do rozpraszanego jest zależny od wielkości absorpcji zabarwionych części bibuły. Wszystkie wymienione czynniki powodują konieczność standaryzacji stosowanych warunków odczytu, ponieważ wyniki uzyskane przy zmianie niektórych czynników są zupełnie różne i ze sobą nieporównywalne. Nie dają się one także wzajemnie przeliczyć.

Jakość uzyskiwanych krzywych rozkładu frakcji białkowych zbliża się do rozkładu znanego z elektroforezy Tiseliusa w przypadkach stosowania odpowiednich filtrów oraz nasycenia bibuły mieszaniną o podobnym do celulozy współczynniku załamania światła. Filtry dobierane są w ten sam sposób, jak w metodach absorpcyjometrycznego oznaczania stężeń, a więc także w metodach elucji. Bibułę nasycy się najczęściej mieszaniną alfa-bromonaftalenu z parafiną, salicylanem metylu, lakierami saponowymi lub innymi [10]. Nasycanie ma na celu zmniejszenie wpływu rozpraszania światła.

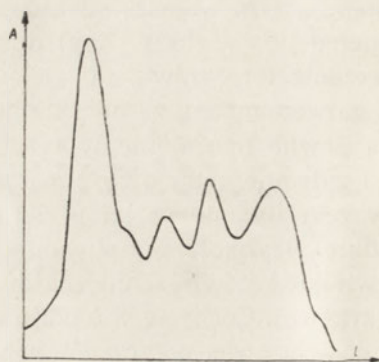
Wpływ monochromatyzacji światła oraz nasycania bibuły jest widoczny na załączonych wykresach otrzymanych dla tego samego paska (rys. 2—5). Wykresy zrobiono przy użyciu uproszczonego absorpcjometru samopiszącego [9] życzliwie udostępnionego nam przez mgr Bartosiewicza.

Wyniki liczbowe przytoczone w tablicy 2 dla każdego rysunku wskazują na zupełną nieporównywalność otrzymanych danych. Widać, że je-

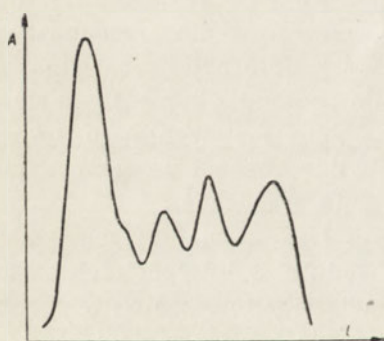
dynie wykresy otrzymane z zastosowaniem filtrów i z nasyceniem bibuły mieszaniną zmniejszającą rozpraszanie mogą być ilościową miarą zawartości poszczególnych frakcji. W tych przypadkach wyniki otrzymane przez planimetrowanie powierzchni zawartych pod poszczególnymi maksimumami krzywej rozkładu frakcji (po ewentualnym uwzględnieniu róż-



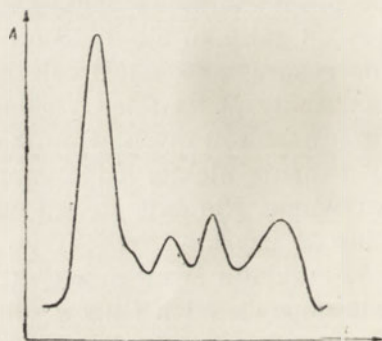
Rys. 2. Wykres dla proteinogramu bez użycia filtru i bez  $\alpha$ -bromonaftalenu



Rys. 3. Wykres dla proteinogramu z zastosowaniem czerwonego filtru



Rys. 4. Wykres dla proteinogramu nasyczonego mieszaniną  $\alpha$ -bromonaftalenu, lecz bez użycia filtru



Rys. 5. Wykres dla proteinogramu nasyczonego mieszaniną  $\alpha$ -bromonaftalenu z parafiną oraz z zastosowaniem czerwonego filtru

nic wiązania barwników przez albuminy i globuliny na drodze stosowania odpowiednich współczynników przeliczeniowych) mogą być przy dobraniu optymalnych warunków pomiaru ilościową miarą zawartości białka w poszczególnych frakcjach. Przy braku któregośkolwiek z wymienionych czynników wykres może być tylko jakościową umowną miarą wielkości poszczególnych frakcji, mającą tylko znaczenie porównawcze, bardzo zresztą cenne w klinicznej ocenie schorzeń charakteryzujących

Tablica 2  
Dane liczbowe w % dla przytoczonych rysunków 2—5

	Albu- miny	G l o b u l i n y			
		$\alpha_1$	$\alpha_2$	$\beta$	$\gamma$
Odczyt bez filtru i bez $\alpha$ -bromo- naftalenu (rys. 2)	29,9	8,2	15,0	18,9	28,0
Odczyt z filtrem czerwonym bez $\alpha$ -bromonaftalenu (rys. 3)	38,2	6,3	13,1	16,2	26,2
Odczyt bez filtru z użyciem $\alpha$ -bromonaftalenu (rys. 4)	46,0	6,3	15,0	16,3	22,4
Odczyt z użyciem filtru i $\alpha$ -bro- monaftalenu (rys. 5)	47,0	5,0	10,2	15,4	22,4
Odczyt na spektrofotometrze Beck- mana z użyciem $\alpha$ -bromonaf- talenu	56,8	4,0	7,1	13,1	19,0

się wielkimi zmianami wielkości frakcji, ale bezwartościowe dla oceny rzeczywistego stosunku frakcji oraz dla uchwycenia małych zmian ich wielkości.

### 3. WYNIKI OZNACZEŃ I DYSKUSJA

Dla przykładu podajemy porównanie cyfr (tabl. 3) oraz typu wykresów (rys. 6) przedstawiających wielkości frakcji białkowych tej samej surowicy otrzymane trzema metodami:

1) metodą elucji,

2) metodą użycia nierejestrującego spektrofotometru (typu Beckmana). Spektrofotometr Beckmana został tutaj zużyty w ten sposób, że proteinogram przesuwano w aparacie w miejscu przeznaczonym do wstawienia naczynek. Pomiar odbywał się w odstępach co 0,5 cm, a wyniki liczbowe otrzymano przez planimetryczną ocenę pola pod wykresami zależności absorpcji od długości paska,

3) metodą użycia trzech samopiszących absorpcjometrów, opisanych przez różnych autorów [14, 15, 20, 9].

Celem porównania rezultatów pomiarów wykonanych opisanymi sposobami jest zwrócenie uwagi na możliwość istnienia znacznych rozbieżności wyników dla tej samej krwi, podawanych przez autorów stosujących różne metody odczytywania proteinogramów. Rozbieżności te mają swe źródło w stosowanej metodzie odczytywania, a nie zależą od rodzaju

Tablica 3

Porównanie wartości procentowych poszczególnych frakcji białek w proteinogramie, otrzymanych różnymi sposobami odczytywania

	Albuminy					Globuliny														
						$\alpha$					$\beta$					$\gamma$				
	E	B	$A_B$	$A_O$	$A_R$	E	B	$A_B$	$A_O$	$A_R$	E	B	$A_B$	$A_O$	$A_R$	E	B	$A_B$	$A_O$	$A_R$
	61,0	61,9	48,2	52,7	36,2	11,0	11,8	14,3	12,3	22,8	11,0	11,8	14,3	10,2	20,4	17,0	14,5	23,2	24,8	20,6
	61,2	57,8	47,5	46,6	34,1	10,8	10,5	15,1	7,0	16,3	11,3	12,8	15,1	18,7	15,6	16,7	18,9	22,3	27,6	34,0
	61,4	58,0	43,0	42,4	47,3	11,1	9,5	13,2	15,6	11,8	11,6	14,1	21,9	21,0	22,3	15,9	18,4	21,9	21,0	18,6
	61,2	62,6	47,0	—	41,0	10,8	7,0	13,5	—	15,0	10,8	13,0	15,5	—	17,8	17,2	17,4	24,0	—	26,2
	61,0	58,7	47,2	49,0	33,4	10,9	10,9	15,3	14,5	20,8	11,1	12,6	14,6	13,6	19,6	17,0	17,8	22,9	22,9	26,5
Srednio	61,1	59,8	46,5	47,6	38,4	10,9	9,9	14,3	12,7	17,3	11,2	12,9	16,3	15,8	19,1	16,8	17,4	22,9	24,0	25,2

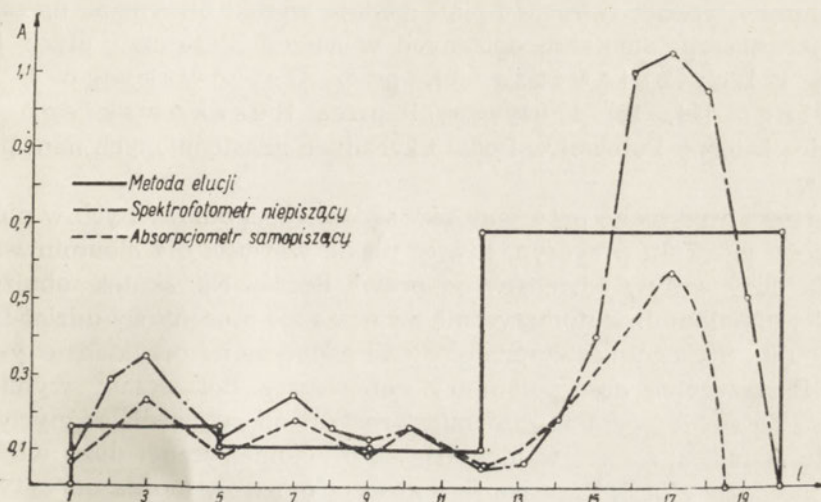
E — elucja

B — spektrofotometr nierejestrujący Beckmana

 $A_B$  — absorpcjometr — Kemula, Bartosiewicz $A_O$  — absorpcjometr — Ostrowski, Mikucki $A_R$  — „ — Ruszkowski



badanego materiału doświadczalnego. Fakt ten zmusza do bardzo krytycznego ustosunkowania się do publikowanych norm zawartości poszczególnych białek we krwi, o ile jednocześnie nie są podane szczegóły stosowanej metody odczytywania proteinogramów.



Rys. 6. Przebieg krzywych służących do obliczenia procentowego rozkładu frakcji w metodzie elucji, spektrofotometru niepiszącego i absorpcjometru samopiszącego. Uwaga: jednostki A odkładane na osi rzędnych posiadają dla każdego z trzech wykresów inne znaczenie zależnie od użytego aparatu

Porównanie to jest szczególnie ciekawe w obecnej chwili, kiedy większość autorów u nas w kraju stara się zautomatyzować proces odczytywania proteinogramów z użyciem prymitywnych części aparatury dostępnych u nas w handlu. Metodą dającą najlepszą zgodność wyników z wynikami elektroforezy w roztworze oraz z różnymi metodami wysalania białek surowicy krwi jest metoda elucji, którą z tego też względu szerzej opisano na początku artykułu.

$\alpha_1$  i  $\alpha_2$ -globuliny zostały w tabeli podane w jednej wspólnej kolumnie jako  $\alpha$ -globuliny dla ułatwienia porównania z wynikami innych autorów, którzy oznaczają  $\alpha$ -globuliny bez ich różnicowania. W tabelicy 3 w kolumnie oznaczonej literą E podane są wyniki otrzymane na drodze elucji.

Wyniki otrzymane metodą elucji są bardzo zbliżone do wyników elektroforezy swobodnej oraz metod wysalania. Jest to szczególnie wyraźnie widoczne w przypadku dużych wartości albumin oraz niskich  $\gamma$ -globulin. Do wyników elucji bardzo podobne są wyniki otrzymane na drodze pomiaru absorpcji proteinogramu w spektrofotometrze Beckmana. Wyniki te podano w tabeli w kolumnie oznaczonej literą B. Wyniki te są

nieco mniejsze niż otrzymane w metodzie elucji, ponieważ ze względów technicznych stosowana szczelina spektrofotometru posiadała szerokość 1 mm, co odpowiada wiązce  $30\text{ m}\mu$ , co z kolei powoduje pojawienie się nieznacznych, pozornych odstępstw od prawa Beera [7].

Kolumny trzecia, czwarta i piąta podają wyniki otrzymane na samopiszących absorpcjometrach opisanych w naszej literaturze przez Kemulę i Bartosiewicza [9], przez Ostrowskiego i Mikuckiego [14, 15] i używanym przez Ruszkowskiego [20] w klinice Interny Polowej w Łodzi i życzliwie udostępnionych nam przez autorów.

Wartości otrzymane przez autorów są ilustracją omówionych w pierwszej części artykułu przyczyn, a więc niskie wartości dla albumin wskazują na duży wpływ odstępstw od prawa Beera. Na skutek obniżenia wartości dla albumin automatycznie zwiększa się procentowy udział frakcji globulin. Szczególnie wyraźnie jest to widoczne na przykładzie  $\gamma$ -globulin. Poszczególne absorpcjometry samopiszące dostarczają wyników, które są do siebie podobne, natomiast rozrzut odczytów dla różnych paszków tej samej krwi jest w metodzie absorpcjometrycznej dużo większy niż w metodzie elucji. Przy pomocy absorpcjometrów można odczytywać tylko proteinogramy o bardzo dobrze rozdzielonych frakcjach, by uniknąć przypadkowych błędów zwiększających różnice. Na rys. 6 przedstawiono schematycznie trzy sposoby graficznego przedstawienia wielkości frakcji. W opisanej poprzednio metodzie elucji, gdzie całą frakcję oznaczano sumarycznie, poszczególne frakcje można zobrazować tylko przy pomocy prostokątów, których wysokość jest miarą wielkości frakcji.

W metodach samopiszących kształt krzywej jest bezpośrednio wynikiem pomiaru, jak to przedstawia schematyczna linia przerywana rys. 6 oraz wykresy rys. 2—5, zaś pomiar przy użyciu spektrofotometru Beckmana dostarcza wyników, które mogą być naniesione na wykres zależności absorpcji od stężenia. Krzywa otrzymana w tym ostatnim przypadku wykazuje dużo wyższe maksima niż krzywa absorpcjometryczna. Miarą zawartości poszczególnych frakcji jest wielkość pola zawarta pod poszczególnymi maksimami. Wartości absorpcji odkładanej na osi rzędnych posiadają zupełnie inne znaczenie dla każdej krzywej. Są one zależne od elementów konstrukcji poszczególnych aparatów i są ze sobą nieporównywalne.

### Wnioski

Przedstawione wyniki wskazują, że uproszczone aparaty samopiszące służące do odczytywania proteinogramów są bardzo wygodne w praktyce klinicznej, gdzie pozwalają na szybkie otrzymywanie wykresów służą-

cych do półilościowej oceny rozkładu frakcji białkowych surowicy, co ma duże znaczenie diagnostyczne. Przy użyciu tych aparatów nie można jednak otrzymywać dokładnych wyników ilościowych porównywalnych z wynikami elektroforezy swobodnej. Normy zawartości frakcji białkowych otrzymane przy użyciu tych uproszczonych absorpcjometrów nie są porównywalne z normami otrzymanymi na innych aparatach i co najgorsze — odpowiednie przeliczenie wyników jest zupełnie niemożliwe. Używanie aparatów samopiszących, szczególnie prostych absorpcjometrów, jest zupełnie niedopuszczalne w przypadkach, gdy celem pomiarów ma być stwierdzenie małych odchyień od normy. W tych przypadkach opisane w artykule własności aparatów samopiszących powodują właśnie zacieranie się małych różnic pomiędzy poszczególnymi badanymi próbkami.

Wydaje się nam, że ilościowe prace dotyczące ilościowego składu frakcji białkowych surowicy krwi winny być zawsze wykonywane z użyciem metod elucji lub też bezpośredniego odczytywania proteinogramu przy pomocy spektrofotometrów. Użycie samopiszących spektrofotometrów jest dopuszczalne tylko po wprowadzeniu jednego ze wspomnianych sposobów logarytmowania wskazań aparatu, co ma miejsce tylko w najnowszych typach aparatów znajdujących się w handlu za granicą. Uproszczone samopiszące absorpcjometry mogą oddawać cenne usługi tylko w klinicznej diagnostyce lekarskiej. W dalszej konstrukcji tych uproszczonych absorpcjometrów należy jednak dążyć do użycia elementów składowych posiadających odpowiednie własności. Najważniejszymi z tych elementów składowych są filtry oraz urządzenia przeliczające wartości transmisji na absorpcję.

W zakończeniu pracy miło jest nam serdecznie podziękować drowi W. Ostrowskiemu, mgrowi W. Bartosiewiczowi oraz drowi M. Ruszkowskiemu za wielką życzliwość w udostępnieniu nam ich aparatury oraz w przedyskutowaniu szeregu, nie zawsze jednako przez nas interpretowanych zagadnień, dotyczących elektroforezy bibułowej.

### Streszczenie

Praca ma na celu porównanie różnych metod odczytywania proteinogramów oraz oceny pospolicie stosowanych w naszym kraju absorpcjometrów samopiszących. Autorzy uważają za najpraktyczniejszą w naszych warunkach metodę elucji barwnika z proteinogramu oraz absorpcyjometryczne oznaczanie stężenia wypłukanego barwnika, co w dalszym ciągu pozwala na ustalenie wielkości frakcji białkowych.

Samopiszzące absorpcjometry, stosowane dotychczas u nas w kraju, dostarczają wyników nieporównywalnych z elektroforezą swobodną i powinny znajdować zastosowanie tylko w laboratoriach klinicznych. Aparaty te wymagają jeszcze dalszych ulepszeń, zanim zostaną wprowadzone do laboratoriów naukowych. Podano także zasady, jakimi należy się kierować przy wprowadzaniu dalszych ulepszeń w konstrukcji tych aparatów.

#### LITERATURA

- [1] Antweiler H. J., *Die Quantitative Elektrophorese in der Medizin*, Springer Berlin 1952.
- [2] Braithwaite F. i in., *Biochem. J.* **51**, X, 1952.
- [3] Cremer H. D., Tiselius A., *Biochem. Z.* **320**, 273, 1950.
- [4] Crock E. M. i in., *Biochem. J.* **51**, XXVI, 1952.
- [5] Esser H. i in., *Münch. Med. Wochschr.* **93**, 986, 1951.
- [6] Grassman W., Hemmig K., *Z. physiol. Chem.* **290**, 1, 1952.
- [7] Gross St. i in., skrypt — *Optyczne Metody Analityczne*, PZWL, Warszawa 1955.
- [8] Gross St., *Medycyna Pracy* **7**, 261, 1956.
- [9] Kemula W. i Bartosiewicz W., *Roczniki Chemii* **28**, 100, 1954.
- [10] Latner A. L., *Biochem. J.* **53**, XXXI, 1952.
- [11] Mackey I. R., *J. Lab. Clin. Med.* **47**, 164, 1956.
- [12] Mies H. J., *Kli. Wo.* **31**, 159, 1953.
- [13] Orłowski T. i Kleczkowski B., *Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej* **14**, 63, 1954.
- [14] Ostrowski W. i Mikucki A., *Pol. Tyg. Lek.* **7**, 657, 1952.
- [15] Ostrowski W. i Mikucki A., *Acta Physiol. Polon.* **3**, 277, 1952.
- [16] Pezold F. A. i Peiser U., *Kli. Wo.* **31**, 982, 1953.
- [17] Pezold F. A. i Kofes A., *Kli. Wo.* **32**, 504, 1954.
- [18] Röttger H., *Kli. Wo.* **31**, 85, 1953.
- [19] Röttger H., *Experientia* **9**, 150, 1953.
- [20] Ruszkowski M., ustne informacje.
- [21] Wenzel M. i in., *Z. Physiol. Chem.* **292**, 137, 1953.

#### ОТСЧЕТ ПОЛОСОК БУМАЖНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА

#### Резюме

Целью настоящей работы является сравнение различных методов отсчета протеинограмм, а также оценка обыкновенно применяемых в нашей стране самопишущих абсорбциометров. Наиболее практическим в наших условиях авторы считают метод элюции красителя из протеинограммы и абсорбциометрическое определение концентрации выполосканного красителя, что в дальнейшем позволяет установить размеры белковых фракций.

Применяемые до настоящего времени в нашей стране самопишущие абсорбциометры дают результаты несравнимые с электрофорезом в растворе и должны находить применение только в клинических лабораториях. Эти аппараты требуют еще дальнейшего усовершенствования до введения их в научных лабораториях. Приведены также принципы, которыми следует руководствоваться при дальнейшем усовершенствовании конструкции этих аппаратов.

#### INTERPRETATION OF PAPER-ELECTROPHORESIS CHROMATOGRAMS

##### Summary

The authors compare various methods of analysing proteinograms, and evaluate the self-recording absorptiometers currently used in this country. Under existing conditions, the authors favour on practical grounds elution of the dye from the proteinogram and absorptiometric determination of the eluted dye, which permits subsequent quantitative determination of protein fractions. The self-recording absorptiometers hitherto used in this country afford results that cannot be compared with those of electrophoresis in solution and should not be used in other than clinical laboratories. These instruments call for further improvements before being introduced into scientific laboratories. The paper also indicates the principles which should be taken into account in devising further improvements in the construction of these instruments.

Otrzymano 28.3.1956 r.



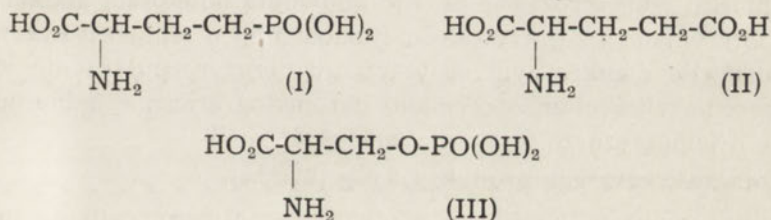


P. MASTALERZ

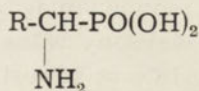
## SYNTEZA KWASU $\gamma$ -FOSFONOGLUTAMINOWEGO

Z Instytutu Immunologii i Terapii Dośw. PAN we Wrocławiu  
 dyrektor: prof. dr S. Slopek  
 Dział Biochemii, kierownik: prof. dr T. Baranowski

W toku poszukiwań inhibitorów glutaminazy, zbliżonych strukturalnie do kwasu glutaminowego, otrzymano syntetycznie nie opisany dotąd kwas  $\gamma$ -fosfonoglutaminowy (1-amino-3-fosfono-propano-karboksyłowy-1). Analogia strukturalna tego związku (I) do kwasu glutaminowego (II) polega na tym, że grupa fosfonowa  $-\text{PO}(\text{OH})_2$  zastępuje grupę karboksylową kwasu glutaminowego w pozycji  $\gamma$ . Istnieje również daleko idące podobieństwo do fosforanu seryny (III). W tym wypadku grupę  $\text{CH}_2$  zastępuje atom tlenu.



Kwas fosfonoglutaminowy jest przedstawicielem grupy związków zawierających atom fosforu związany bezpośrednio z atomem węgla. Tego rodzaju organiczne związki fosforu nie występują w organizmach żywych i nie były dotychczas badane w izolowanych układach enzymatycznych. W piśmiennictwie znalazłem zaledwie kilka pozycji dotyczących własności biochemicznych tych związków. M. N. Kabacznik i wsp. [2] badali niedawno dość wyczerpująco działanie biologiczne kwasów  $\alpha$ -aminofosfonowych o wzorze ogólnym



P. Preis, T. C. Myers i E. V. Jensen [1] podali syntezę fosfonowych analogów kwasu glicerynowego i zapowiedzieli badanie ich zachowania się w reakcjach enzymatycznych. Zapowiedzieli również syntezę dalszych związków fosfonowych, analogicznych do naturalnych metabolitów.

Badania enzymatyczne z zastosowaniem opisanego w tej pracy kwasu fosfonoglutaminowego są w toku.

### Część doświadczalna

1,3 g (0,056 mola) sodu rozpuszczono w 60 ml absolutnego etanolu, dodano 10,2 g (0,047 mola) dwuetylowego estru kwasu acetaminomalonowego i do powstałego roztworu wkroplono w ciągu 10 min. 11,5 g (0,047 mola) dwuetylowego estru kwasu  $\beta$ -bromoetylofosfonowego. Mieszaninę ogrzewano na wrzącej łaźni wodnej przez 6 godzin. Po odsączeniu wydzielonego bromku sodu odparowano rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem a pozostały olej ogrzewano do wrzenia z 20% kwasem solnym przez 8 godzin. Roztwór po hydrolizie odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem do sucha. Pozostałą szklistą masę rozpuszczono w 50 ml absolutnego etanolu, odsączono nierozpuszczalny osad nieorganiczny (chlorek sodu). Odparowano alkohol, pozostałość rozpuszczono w 50 ml wody i dodawano małymi porcjami tlenek srebra aż do ilościowego wytrącenia jonu chlorkowego, unikając nadmiaru tlenu srebra. Po odsączeniu powstałego chlorku srebra roztwór zadano podwójną objętością alkoholu etylowego. Otrzymano 4,2 g krystalicznej substancji o temperaturze topnienia 190—193°. Po dwukrotnym oczyszczeniu przez rozpuszczenie w wodzie i wytrącenie alkoholem otrzymano chromatograficznie jednorodną substancję o temperaturze topnienia 206—208°.

Wydajność czystego produktu 3,6 g (37,2%).

Wyniki analiz potwierdzają przewidywanie, że otrzymana substancja jest kwasem  $\gamma$ -fosfonoglutaminowym.

Znaleziono 7,84% N, 17,20% P.

Wyliczono dla  $C_4H_{10}O_5NP$  7,65% N, 16,92% P.

Kwas  $\gamma$ -fosfonoglutaminowy jest kwasem trójzasadowym. Równoważnik kwasowy wyznaczony przez miareczkowanie formolowe wobec fenolftaleiny wynosi 62, wyliczony 61. Miareczkowanie potencjometryczne wykazuje trzy stopnie dysocjacji kwasowej.  $pK$  wyznaczone w przybliżeniu z krzywej miareczkowania wynoszą I = 2,5; II = 6,9; III = 10,3.

Wykonano chromatogram jednowymiarowy na bibule Whatman nr 1. Rozpuszczalnikiem był fenol nasycony wodą. Rozwijanie chromatogramu trwało 8 godzin w temp. ok. 18°, w atmosferze zawierającej amoniak.



Chromatogram wywoływano w zwykły sposób 0,1% alkoholowym roztworem ninhydryny.

### Streszczenie

Otrzymano syntetycznie kwas  $\gamma$ -fosfonoglutaminowy. Materiałami wyjściowymi do syntezy były dwuetylowy ester kwasu acetaminomalonowego oraz dwuetylowy ester kwasu  $\beta$ -bromoetylofosfonowego. Wydajność metody 37,2%.

### LITERATURA

- [1] Preis S., Meyers T. C., Jensen E. V., *J. Am. Chem. Soc.* **77**, 6225, 1955.
- [2] Ryżkow W. Ł., Kabaczniak M. N., Tarasewicz Ł. M., Medwed T. J., Zejtlenok N. A., Marczenko N. K., Wagżanowa B. A., Ułanowa E. F., Czewurkina I. W., *Doklady A. N. ZSRR* **98**, 849, 1955.

### СИНТЕЗ $\gamma$ -ФОСФОНИНГЛУТАМИНОВОЙ КИСЛОТЫ

#### Резюме

Получена синтетически  $\gamma$ -фосфонинглютаминовая кислота. Исходным материалом для синтеза были: диэтиловый эфир ацетаминмалоновой кислоты и диэтиловый эфир  $\gamma$ -бромэтилфосфониновой кислоты.

Производительность метода 37,2%.

### SYNTHESIS OF $\gamma$ -PHOSPHONOGLUTAMIC ACID

#### Summary

The synthesis of  $\gamma$ -phosphonoglutamic acid, a substance structurally related to glutamic acid is announced.  $\gamma$ -phosphonoglutamic acid has been synthesised by the usual method of synthesis of amino acids, using diethylacetaminomalonate and diethyl- $\beta$ -bromoethylphosphonate as starting materials. Yield 37.2%.

Otrzymano 2.7.1956 r.



M. CHORAŻY

## WPLYW OPERACYJNEGO USUNIĘCIA NOWOTWORU NA BILANS AZOTOWY U SZCZURA

*Z Instytutu Onkologii — Oddział w Gliwicach*

*Dyrektor: dr med. J. Świecki*

*Zakład Biologii Nowotworów*

*Kierownik: prof. dr K. Dux*

W poprzedniej pracy [2] stwierdziliśmy, że retencja azotu w organizmie szczura wzrasta w miarę wzrostu guza nowotworowego. Celem niniejszej pracy było zbadanie, czy po operacyjnym usunięciu nowotworu bilans azotowy powraca do normy nagle, czy też nieprawidłowo wielka retencja azotu utrzymuje się przez pewien czas po operacji. W ostatnim wypadku moglibyśmy oczekiwać szybszego przyrostu wagi ciała zwierzęcia.

Wyniki doświadczenia skłoniły nas do wykonania kilku badań kontrolnych, które miały na celu próbę wyjaśnienia mechanizmu zmian w bilansie azotowym zachodzących po usunięciu nowotworu.

### Material i metoda

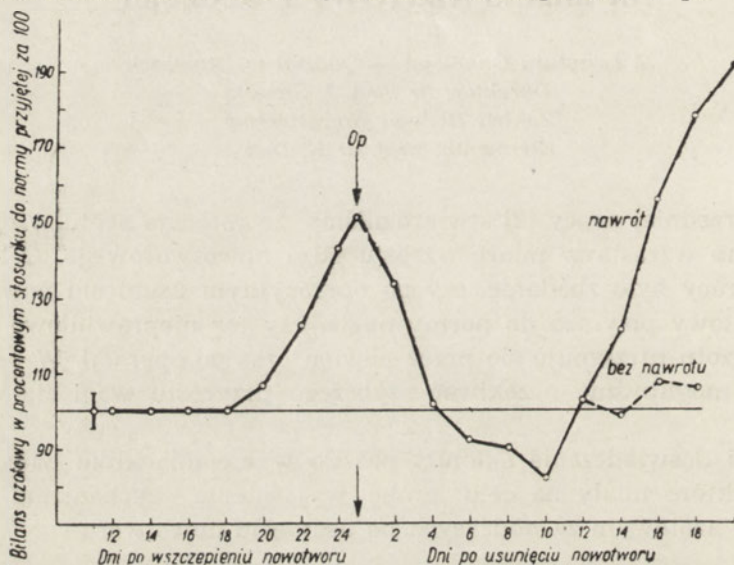
Doświadczenia wykonano na samcach szczura białego o wadze początkowej 120—130 g. Sposób wszczepiania i charakterystykę mięsaka, sposób karmienia zwierząt, zbierania wydaliny i oznaczania bilansu azotowego podano w poprzedniej pracy [2]. Zwierzęta karmiono „dieta I”, której skład podano uprzednio. U zwierząt obciążonych nowotworem oznaczenie bilansu azotowego rozpoczynano około 12 dnia po wszczepieniu nowotworu. Zmiany w bilansie azotowym wyrażono w odsetkach w stosunku do normalnego bilansu, który określano jako 100%. Za normalny przyjęto bilans azotowy szczurów zdrowych lub obciążonych nowotworem w okresie utajonego wzrostu guza.

Z wyjątkiem wszczepienia nowotworu wszelkie zabiegi operacyjne przeprowadzono w narkozie eterowej. Szczury w ciągu pierwszej doby po zabiegu otrzymywały do picia zamiast wody destylowanej fizjologicz-

ny roztwór NaCl. Zwierzętom po usunięciu nadnerczy podawano w ciągu pierwszej doby dietę w mniejszych porcjach, a za to częściej niż zwykle, tak że dobową ilość pożywienia podana tym zwierzętom była taka sama, jak w innych grupach doświadczalnych.

### Wyniki badań

Począwszy od 18 dnia po wszczępieniu nowotworu bilans azotowy przyjmował stopniowo coraz to wyższe wartości. W 24 dniu retencja azotu osiągnęła wartość o ok. 50% wyższą od normy. Po operacyjnym usunięciu nowotworu bilans azotowy obniżał się stopniowo i po 4 dniach



Rys. 1. Bilans azotowy w trakcie wzrostu i po operacyjnym usunięciu nowotworu. Moment operacji oznaczono strzałką i symbolem „Op”. Drugie wzniesienie krzywej przedstawia bilans 5 szczurów w czasie rozwoju nawrotu. Linia przerywana — bilans u szczura bez nawrotu. Krótka pionowa linia na początku wykresu zakończona poziomymi kreskami ilustruje maksymalne odchylenie (w %) średniej dobowej bilansu grupy szczurów od normy

przybierał wartości zbliżone do normy, a następnie spadał nieco poniżej normy, osiągając 10 dnia po operacji najniższą wartość (Rys. 1). Przyrost wagi zwierząt po usunięciu guzów miał tempo zbliżone do przyrostu wagi w okresie utajonego wzrostu nowotworu (Rys. 4).

Spośród 6 szczurów (którym usunięto guz) u 5 zwierząt nastąpił miejscowy nawrót nowotworu. Kliniczne objawy nawrotu pojawiały się między 5 a 9 dniem po operacji. Od 10 dnia po usunięciu guzów bilans azotowy przybierał ponownie coraz to wyższe wartości. U jednego szczura, u którego nawrót nie nastąpił, retencja azotu po okresie spadku wahała

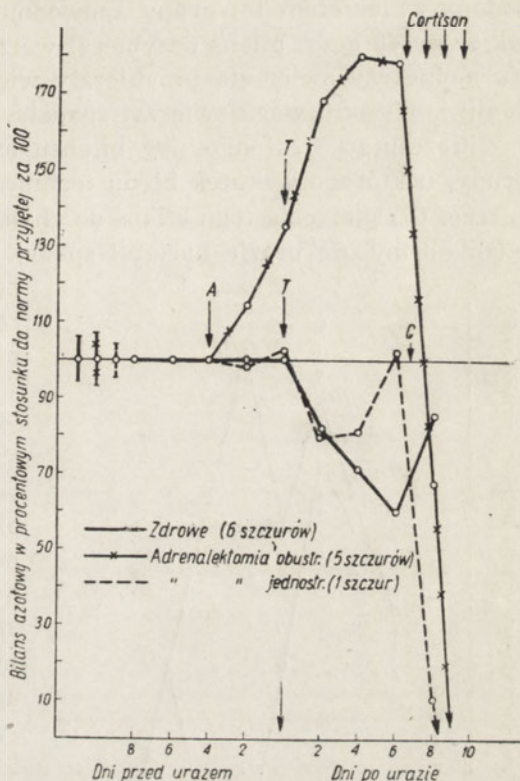
się w pobliżu normalnych wartości (Rys. 1). Przyrost wagi tego zwierzęcia był wyraźnie mniejszy niż zwierząt z wtórnie rozwijającym się guzem (Rys. 4). Przez okres całego doświadczenia absorpcja azotu z przewodu pokarmowego utrzymywała się na jednakowym poziomie.

Przebieg bilansu azotowego po operacyjnym usunięciu nowotworu nasunął konieczność zbadania wpływu urazu na bilans azotowy w warunkach naszego doświadczenia.

Zdrowe szczury po zadaniu urazu (zmiażdżenie mięśni biodrowych) wydalaly z moczem znaczne ilości ciał azotowych, przez co bilans azotowy obniżał się, utrzymywał się jednak w obrębie wartości dodatnich (Rys. 2). Retencja azotu osiągała najniższą wartość w 6 dniu po urazie, po czym następował wzrost ilości azotu zatrzymywanego w ustroju. Zstępujący odcinek krzywej bilansu po urazie podobny jest do krzywej bilansu po usunięciu nowotworu w poprzedniej grupie szczurów. Absorpcja azotu z przewodu pokarmowego w omawianej grupie zwierząt utrzymywała się na jednakowym poziomie w ciągu 14 dni.

Próbowano następnie sprawdzić, czy uraz wpływa na bilans azotowy za pośrednictwem nadnerczy, gdyż w piśmiennictwie

wielokrotnie podnoszono znaczenie nadnerczy w przystosowaniu przemiany materii do bodźców działających na szkodę ustroju (S e l y e-stress). W tym celu zadawano uraz szczurom, którym uprzednio usunięto nadnercza. W takich doświadczeniach uraz nie wywoływał spadku bilansu azotowego, przeciwnie, już po samej adrenalectomii bilans przybierał



Rys. 2. Przebieg bilansu azotowego po urazie u szczurów zdrowych oraz po urazie i kortyzonie u szczurów pozbawionych nadnerczy. Nadnercza usunięto w momencie („A”), uraz zadano w momencie („T”). Linia przerywana przedstawia bilans u szczura, któremu usunięto tylko jedno nadnercze („A”), następnie zadano uraz („T”) oraz podano kortyzon („C”). W trzecim dniu po podaniu kortyzonu bilans azotowy przyjął wartości ujemne (nie objęte wykresem)

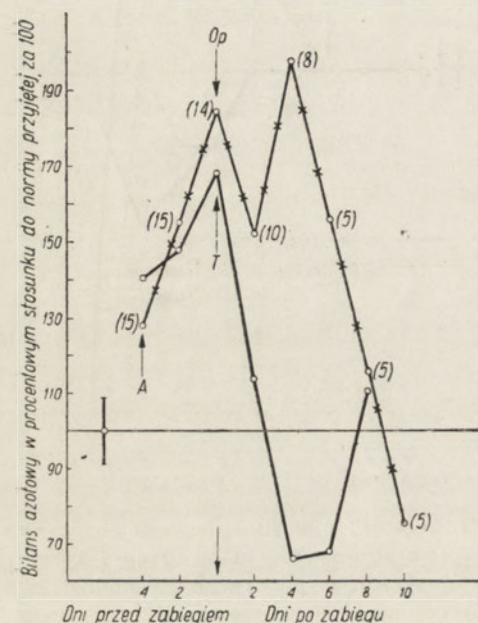
wartości wyższe od normy i taki wzrost bilansu utrzymywał się nadal mimo zadaniu urazu. W 8 dniu po adrenalektomii bilans osiągał wartość wyższą o 80% od wartości przed usunięciem nadnerczy (Rys. 2). Kortyzon podany zwierzętom tej grupy spowodował gwałtowny spadek bilansu, tak że po 48 godz. bilans przybierał wartości ujemne (Rys. 2). Po usunięciu nadnerczy zwierzęta przybierały więcej na wadze, natomiast po podaniu kortyzonu waga zwierząt spadała.

Interesujący jest przebieg bilansu azotowego u jednego szczura tej grupy, u którego wskutek błędu technicznego usunięto tylko jedno nadnercze. U zwierzęcia tego bilans do chwili zadania urazu wahał się w pobliżu normy, po urazie nastąpił spadek bilansu, a następnie powrót do

normy (Rys. 2). Na podanie kortyzonu zwierzę zareagowało podobnie jak pozostałe.

U szczurów obciążonych nowotworem uraz (nacięcie skóry u podstawy guza, częściowe odłuszczenie skóry od guza i częściowe zmiążdżenie mięśni biodrowych po jednej stronie) wywoływał gwałtowny spadek bilansu azotowego (Rys. 3). Przebieg krzywej bilansu był bardziej stromy niż krzywej po usunięciu guza w pierwszej grupie zwierząt (Rys. 1).

Opierając się na dotychczas przedstawionych wynikach staraliśmy się w następnej serii doświadczeń wyłączyć wpływ urazu na bilans azotowy przez wycięcie nadnerczy u nosicieli nowotworu przed operacyjnym usunięciem guza. Większość szczurów obciążonych nowotworem źle znosiła adrenalektomię. Zwierzęta po zabiegu były osłabione, apatyczne, spostrzegano objawy atonii jelit oraz zmniejszone oddawanie moczu i kału. Następowe usunięcie guza



Rys. 3. Przebieg bilansu azotowego po urazie („T”) u szczurów obciążonych nowotworem (—x—). Średnie uzyskano z 6 szczurów. Przebieg bilansu po operacyjnym usunięciu guza („Op”) u szczurów-nosicieli nowotworu (—o—) uprzednio poddanych adrenalektomii („A”). W nawiasach podano ilość szczurów, z której obliczono średnią

nowotworowego powodowało pogarszanie się stanu ogólnego zwierząt. Znaczna część szczurów padła wśród objawów ogólnego osłabienia oraz niedrożności jelit lub biegunki. Jeden szczur padł z objawami porażenia

ruchowego czterech kończyn i drgawek. Spośród 15 szczurów użytych do tego doświadczenia zaledwie 5 przeżyło okres dostatecznie długi do oznaczenia bilansu. U czterech szczurów po adenalektomii spostrzegano wyraźną regresję nowotworu.

Bilans azotowy po usunięciu nowotworu u szczurów, którym cztery dni wcześniej usunięto nadnercza, spada do normy i poniżej, utrzymuje się jednak w obrębie wartości dodatnich (Rys. 3). Spadek bilansu występował z wyraźnym opóźnieniem w porównaniu ze spadkiem po usunięciu guzów u zwierząt posiadających nadnercza, przy czym krzywa bilansu miała przebieg dwufazowy. Wspomniane wyżej zmiany chorobowe spostrzegane u nosicieli nowotworu po adenalektomii wikłają jednak obraz przebiegu bilansu azotowego.

### Omówienie wyników

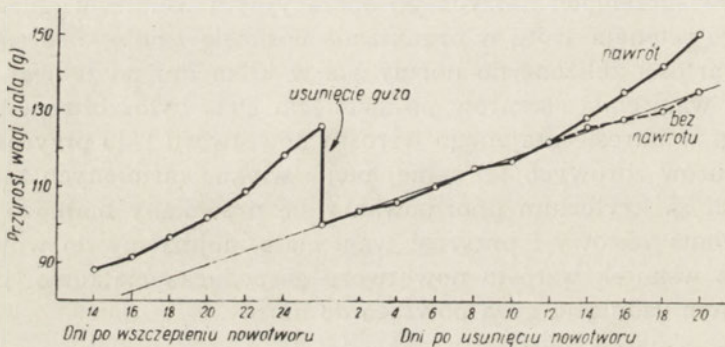
W doświadczeniach naszych po operacyjnym usunięciu guza nowotworowego retencja azotu w organizmie nosiciela zmniejszała się i przybierała wartości zbliżone do normy już w kilka dni po zabiegu. Tempo przyrostu wagi ciała szczurów po usunięciu guza było zbliżone do szybkości wagi w okresie utajonego wzrostu nowotworu i do przyrostu wagi ciała szczurów zdrowych tej samej płci i wieku, karmionych taką samą dietą. Jeśli za kryterium unormowania się przemiany białkowej przyjmujemy bilans azotowy i przyrost wagi ciała, dojdziemy do wniosku, że zachwiana wskutek wzrostu nowotworu gospodarka białkowa [1], [2] po operacyjnym usunięciu guza powraca do normy.

Z piśmiennictwa wynika, że również inne objawy zaburzenia metabolizmu ustrojowego po usunięciu nowotworu powracają do normy: obniżona w czasie wzrostu nowotworu aktywność katalazy wątroby podwyższa się [8], wysokość fali polarograficznej surowicy krwi spada do wartości normalnych [11], normuje się obraz białek krwi [16], [17].

U zwierząt doświadczalnych w warunkach dowolnego odżywiania się spostrzegano po operacyjnym usunięciu nowotworu szybszy przyrost wagi [6]. Zjawisko to można objaśnić zwiększonym pobieraniem pokarmu po okresowej utracie łaknienia w okresie wzrostu nowotworu.

Godne uwagi jest obserwowane w pierwszym doświadczeniu zjawisko szybkiego rozwoju nawrotu nowotworu. Okres utajonego wzrostu nawracającego guza wynosił 5—9 dni, czyli był o połowę krótszy od okresu utajenia guza pierwotnego. Wzrost ilości zatrzymywanego w ustroju azotu wskutek rozwoju guza pierwotnego rozpoczynał się około 18 dnia po wszczęciu nowotworu, natomiast rozwijający się nawrót wywoływał wzrost retencji azotu już w 10 dni po usunięciu guza pierwotnego.

W tym okresie przyrost masy tkanki nowotworowej nie wywoływał jeszcze widocznego przyrostu wagi zwierząt (Rys. 4). Zjawisko szybkiego rozwoju nawrotu można by tłumaczyć lepszymi warunkami odżywienia komórek nowotworowych pozostawionych w obrębie pola operacyjnego w porównaniu z warunkami troficznymi pierwotnego wszczepu. Sposstrzegany jednak w doświadczeniach na zwierzętach i u ludzi szybszy wzrost przerzutów odległych od ogniska pierwotnego, po jego operacyjnym usunięciu, skłania do przypuszczenia, że pewną rolę odgrywają tu też warunki ogólnoustrojowe. Gwałtowne usunięcie z ustroju pierwotnego guza nowotworowego może stwarzać bardziej korzystne warunki metaboliczne dla rozwoju nowotworu wtórnie odrastającego po niedoszczętej operacji. W odniesieniu do gospodarki azotowej ponowny rozwój guza nowotworowego powoduje szybszy wzrost retencji azotu w porównaniu ze wzrostem retencji azotu towarzyszącym rozwojowi guza pierwotnego.



Rys. 4. Przyrost wagi ciała szczurów obciążonych nowotworem (—o—). Wagę zwierząt bezpośrednio po usunięciu nowotworu przyjęto za 100. Linia prosta ilustruje średni przyrost wagi szczurów tej samej płci i wieku, pozostających w takich samych warunkach

W kilku seriach doświadczeń próbowaliśmy wyjaśnić, czy spadek retencji azotu spostrzegany u nosiciela nowotworu po usunięciu guza nie jest wywołany urazem operacyjnym. Spadek ilości azotu zatrzymywanego w ustroju na skutek różnorodnych urazów jest zjawiskiem znanym [5], [13], [21], spostrzegany również w warunkach naszego doświadczenia (Rys. 2). Denoix i wsp. [4] wspominają, że po usunięciu żołądka u chorych na raka tego narządu spostrzegano wzmożony katabolizm białkowy.

Według panujących współcześnie poglądów utrata azotu przez organizm na skutek urazu zachodzi w wyniku uruchomienia odruchu neuro-



humoralnego, którego końcowe ogniwo stanowi kora nadnerczy pobudzona do wzmożonego wydzielania dokrewnego przez ACTH [12]. Przerwanie powyższego łańcucha odruchowego, np. przez usunięcie nadnerczy, przysadki lub niektórych ośrodków podkorza na ogół znosi metaboliczne efekty urazu. Również w naszym doświadczeniu uraz zadany szczurom po uprzednim usunięciu nadnerczy nie wywołał, jak u zwierząt zdrowych, spadku bilansu azotowego. Jedynie u jednego szczura z pozostawionym jednym nadnerczem pourazowy efekt w bilansie azotowym był podobny do efektu pourazowego u zwierząt zdrowych. Jednak spadek bilansu u tego zwierzęcia był mniejszy niż u szczurów zdrowych.

Kortykoidy podane w nadmiarze wywołują efekty metaboliczne podobne do efektów obserwowanych po urazie (Rys. 2).

Związek hormonów kory nadnerczy z powstawaniem pourazowych efektów w przemianie białkowej jest więc niewątpliwy [14]. Duży materiał dowodowy zebrany jest w pracach przeglądowych [3], [7], [10], [15], [20]. Wyszukiwano jednak zastrzeżenia, że hormony kory nadnerczy nie są bezpośrednio odpowiedzialne za zwiększone wydalanie azotu po urazie [13] i nie określają wielkości odczynu na uraz [9]. Wg R o b e r t s a hormony kory nadnerczy ułatwiają mobilizację białka tkankowego.

Wyłuszczenie guza nowotworowego szczurom, którym na kilka dni wcześniej usunięto nadnercza, powodowało spadek bilansu azotowego. Odczyn ten występował jednak z 4 dobowym opóźnieniem, tak że dopiero około 8 dnia po usunięciu nowotworu bilans przybierał wartości zbliżone do normy (Rys. 3). Po usunięciu guza bilans azotowy spadał mimo wyeliminowania wpływu urazu operacyjnego. Z powyższego doświadczenia wynika też, że obecność nadnerczy nie jest konieczna dla ustabilizowania się retencji azotu na nowym, niższym poziomie po usunięciu z ustroju tkanki nowotworowej. Zjawiska te przemawiałyby za tym, że chociaż ustrój zwierzęcia również w nieobecności nadnerczy dostosowuje swój metabolizm do aktualnych potrzeb jego tkanek, to jednak w obecności hormonów nadnerczy proces ten przebiega sprawniej i szybciej.

Interesującym jest, że bilans azotowy od wysokich wartości, wywołanych obecnością nowotworu, po usunięciu guza lub urazie spadał poniżej normy, a dopiero potem podwyższał się. Homeostaza przebiegała jak gdyby w dwóch okresach; w pierwszym mechanizm obniżający bilans wywoływał spadek retencji azotu poniżej normy, co z kolei w drugim okresie wyzwalało mechanizm przeciwny podwyższający retencję. Przebieg tego odczynu przypomina kolejność zmian w stężeniu glikogenu w wątrobie, jakie spostrzegał D r e w s u myszy poddanych działaniu urazu [5].

### Streszczenie

1. Bilans azotowy u szczurów po operacyjnym usunięciu przeszczepianego mięsaka powracał do normy. Odrastanie niedoszczętnie usuniętego nowotworu spowodowało ponowny wzrost wartości bilansu azotowego.

2. W warunkach kontrolowanego odżywiania tempo przyrostu wagi ciała szczurów po operacyjnym usunięciu nowotworu nie zwiększało się i było zbliżone do tempa przyrostu wagi ciała szczurów zdrowych.

3. Powrót bilansu azotowego do normy po usunięciu guza nowotworowego zachodził również u zwierząt pozbawionych nadnerczy. U zwierząt posiadających nadnercza proces ten zaczynał się jednak wcześniej, bezpośrednio po operacji i przebiegał szybciej.

4. Rozwój odrastającego nowotworu po jego niedoszczętnym usunięciu postępował szybciej niż rozwój tkanki mięsaka wszczepionego pierwotnie.

5. Szczury obciążone mięsakiem źle znosiły usunięcie nadnerczy. Następowe usunięcie guza pogarszało stan ogólny, a w przeważającej części naszych zwierząt doświadczalnych spowodowało zgon.

Panu prof. K. Duxowi za udzielenie cennych uwag oraz pani inż. M. Grabowskiej i żonie mojej Kazimierze — asyst. techn. za wydatną pomoc techniczną składam serdeczne podziękowanie.

### LITERATURA

- [1] Begg R. W., Dickinson T. E., *Cancer Res.* **11**, 409, 1951.
- [2] Choraży M., *Acta Biochim. Pol.* **3**, 131, 1956; skrót tejsze pracy: *Bull. Acad. Pol. Sci.*, Cl. II, **4**, 7, 1956.
- [3] Cuthbertson D. P., *Brit. Med. Bull.* **10**, 33, 1954.
- [4] Denoix P. F., Pequignot G., Bernard Ph., Trémolière S., *Mém. Acad. Chirurgie* **77**, 863, 1951.
- [5] Drews R., *Chir. Narz. Ruchu* **14**, 160, 1949.
- [6] Dux K., informacja ustna.
- [7] Dux K., „Czynność gruczołów dokrewnych we wstrząsie” w „Patogeneza wstrząsu”, Państw. Zakł. Wyd. Lek., Warszawa 1955.
- [8] Greenstein J. P., Jenrette W. V., White J., *J. Nat. Cancer Inst.* **2**, 283, 1941.
- [9] Engel F. L., *Recent Progr. Hormone Res.* **7**, 277, 1951.
- [10] Engel F. L., *J. Clin. Endocrin. Metabolism* **13**, 1555, 1953.
- [11] Godlewski H., Chmielowski J., *Českosl. Onkologia* **3**, 1, 1956.
- [12] Hume D. M., *Ann. Surg.* **138**, 548, 1953.
- [13] Ingle D. J., Ward E. O., Kuizenga M. H., *Am. J. Physiol.* **149**, 510, 1947.

- [14] Long C. N. H., *Endocrinology* **30**, 870, 1942.  
[15] March R. S., Muller A., Mach E., *Schweiz. Med. Wochenschr.* **83**, 1223, 1953.  
[16] Patermann M. L., Hogness K. R., *Cancer* **1**, 100, 1948.  
[17] Patermann M. L., Hogness K. R., *Cancer* **1**, 104, 1948.  
[18] Roberts S., *J. Biol. Chem.* **200**, 77, 1953.  
[19] Roberts S., *Cancer Res.* **14**, 582, 1954.  
[20] Sayers G., *Physiol. Rev.* **30**, 241, 1950.  
[21] White J., Burr B. E., Cool H. T., David P. W., Ally M. S., *J. Nat. Cancer Inst.* **15**, 1145, 1955.

## ВЛИЯНИЕ ОПЕРАЦИОННОГО УДАЛЕНИЯ НОВООБРАЗОВАНИЯ НА АЗОТНЫЙ БАЛАНС У КРЫСЫ

### Резюме

1. Азотный баланс у крыс после операционного удаления прививочной саркомы возвращался к норме. Развитие недостаточно удаленной опухоли вызвало вторичное увеличение азотного баланса.

2. В условиях контролируемого питания скорость прироста веса тела крыс, после операционного удаления опухоли, не увеличивалась и была приблизительно такая же, как у здоровых крыс.

3. Возвращение азотного баланса к норме после удаления опухоли появлялось также у животных, у которых ранее были удалены надпочечники. Однако, у животных с надпочечниками этот процесс начинался раньше (непосредственно после удаления опухоли) и протекал быстрее.

4. Развитие рецидивирующей опухоли после неполного ее удаления наступало быстрее, чем развитие первоначально привитой саркомы.

5. Удаление надпочечников у крыс, пораженных саркомой, вызывало тяжелые осложнения. Удаление опухоли после адреналектомии вызывало ухудшение общего состояния крыс, большинство которых погибало.

## THE EFFECT OF REMOVAL OF A TUMOUR ON THE NITROGEN BALANCE IN THE RAT

### Summary

1. The nitrogen balance of rats after the extirpation of transplantable sarcoma was immediately restored to normal values. The recurrence after the incomplete removal of the tumour was followed by a rapid increase of retained nitrogen.

2. The gain in weight of tube-fed animals after removal of tumour was about the same as in normal rats.

3. The nitrogen balance after tumour removal fell to normal level also in the adrenalectomised rats. However, in the non-adrenalectomised animals this process began sooner, and the normal values were reached more rapidly.

4. The growth of locally recurring sarcoma was more rapid than the growth of the primary tumour.

5. In tumour-bearing rats adrenalectomy was followed by numerous complications. The majority of adrenalectomised rats died after excision of tumour.

Otrzymano 6.9.1956 r.

J. HELLER, P. SZAFRAŃSKI, L. SZARKOWSKA i J. W. SZARKOWSKI

## BILANS ENERGETYCZNY WZROSTU HODOWLI *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* H37Rv

Z Zakładu Chemii Fizjologicznej Akademii Medycznej w Warszawie  
Kierownik: prof. dr J. Heller

W r. 1946 i 1947 ogłosił Ernest Sym wyniki swoich badań z lat wojny nad metabolizmem prątka gruźlicy [6, 7]. Pierwsza publikacja zawierała rozważania teoretyczne nad bilansowym ujęciem metabolizmu drobnoustrojów i obszerny program badań, w którym badania nad metabolizmem prątka gruźlicy miały stanowić pierwszą fazę.

Metoda stosowana przez Syma polega na prowadzeniu hodowli w naczyniu zamkniętym i na wyliczeniu całego bilansu węgla, wodoru, azotu i tlenu. Oznacza się zużycie tlenu, wydalanie CO<sub>2</sub>, ubytek substratów z pożywki, zawartość węgla i azotu w pożywce powzrostowej i skład elementarny oraz wagę wyhodowanych prątków. Sym i współpracownicy ogłosili ogółem 8 pełnych bilansów dla prątka zjadliwego [2, 4, 7, 9] stosując 4 różne pożywki. Planowane były również pomiary kalorymetryczne, lecz przedwczesna śmierć badacza w sierpniu 1950 r. uniemożliwiła ich wykonanie. W obecnej pracy podjęliśmy to zagadnienie, oznaczając bilans kaloryczny zjadliwego prątka gruźlicy hodowanego na pożywce Syma DGK, lecz w układzie otwartym. Otrzymane wyniki porównaliśmy z wynikami bilansowych doświadczeń Syma na tej samej pożywce, przeliczonymi na kalorie wedle ciepła spalania substratów. Celem tego porównania jest zbadanie na odmiennej drodze doświadczalnej słuszności wniosków, które Sym wyciągnął ze swoich bilansów materiałowych.

### Część doświadczalna

W badaniach używano zjadliwego szczepu *Mycobacterium* H37Rv ze zbioru Instytutu Gruźlicy. Hodowlę prowadzono na 200 ml syntetycznej pożywki glikozowej DGK Syma [8]. Po czterech tygodniach od mo-

mentu rozpoczęcia hodowli, kożuch bakteryjny oddzielono sącząc pożywkę przez filtr Seitza z dodatkowym sączkiem z bibuły. Bakterie na sączku przemywano wodą destylowaną do zaniku reakcji na glikozę. Glikozę oznaczano metodą Hooglанда i Mendela [3]. Przemyte drobno-ustroje autoklawowano i suszono w 105<sup>o</sup> do stałej wagi. Popłuczyny wraz z pożywką pobakteryjną odparowywano na łaźni wodnej do uzyskania gęstego syropu, po czym resztę wody usuwano pod zmniejszonym ciśnieniem w temp. 50<sup>o</sup>. Podobnie traktowano pożywkę wyjściową. Suszenie w próżni trwało 3—4 dni, po wysuszeniu ważono, szybko rozcierano i przygotowywano ok. 1,5 g naważki do oznaczeń kalorymetrycznych. Naważki zawijano w ilościowe sączki o znanej wadze i tabletkowano. W podobny sposób przygotowywano prątki do spalań, biorąc w każdym doświadczeniu ilości ponad 0,5 g. Tak więc do spalań przygotowano trzy pożywki wyjściowe, trzy pożywki pobakteryjne oraz trzy porcje prątków. Tabletkę wkładano do woreczka celofanowego i spalano w bombie kalorymetrycznej pod ciśnieniem 20 atm. tlenu [1]. Uprzednio oznaczono wartość cieplną celofanu i bibuły użytej do tabletkowania pożywek i prątków. Na podstawie uzyskanych danych zestawiono bilans kaloryczny, obejmujący energię zawartą w pożywce wyjściowej, w wyhodowanej masie bakteryjnej, w pożywce powzrostowej oraz (z wyliczenia) energię rozproszoną podczas wzrostu bakterii. Wyniki podano w tablicy 1.

Rubryka 2a tablicy 1 przedstawia ciepło spalania pożywki wyliczone z tablic<sup>1</sup> na podstawie jej składu. W 3 oznaczeniach bezpośrednich otrzymaliśmy następujące wartości dla pożywki wyjściowej: 36 111, 37 376 i 35 370 kal. Przyjmując jako czwartą wartość teoretyczną, tj. 36 310, otrzymujemy jako średnią 36 293 i tę wartość wprowadzamy do rubryki 2b jako średnią wyjściową. W rubryce 3 podajemy wartość kaloryczną pożywki powzrostowej. Na wartość tę składają się niezużyte substraty oraz produkty niepełnego utlenienia rozłożonych substratów. Przez odjęcie znalezionej wartości od 36 293 kal. pożywki wyjściowej otrzymujemy całkowity ubytek wartości kalorycznej pożywki w czasie wzrostu (rubryka 4).

W rubryce 5 podajemy wyniki otrzymane przez spalanie w bombie bakterii z każdego doświadczenia osobno, po przeliczeniu na cały zbiór z 200 ml pożywki. Odejmując te wyniki od całkowitego ubytku wartości kalorycznej pożywki, otrzymujemy właściwy wydatek energetyczny podczas wzrostu. Masa wyrosłych prątków była różna w każdym z 3 doświadczeń. Chcąc uzyskać podstawę do porównania wyników poszczególnych doświadczeń, przeliczyliśmy wartości z rubryk 4, 5 i 6, biorąc jako pod-

<sup>1</sup> *Chemiker Kalender* 2, 247, 1925.

Tablica 1  
Bilans kaloryczny wzrostu *Mycobacterium* H 37 Rv

Doświadczenie nr	1	2	3
1 Sucha masa wyhodowanych prątków w g	0,822	0,802	0,663
Ilość energii na 200 ml pożywki (w kaloriach)			
2 Pożywka wyjściowa			
a) teoretyczna	36310	36310	36310
b) oznaczona (średnio)	36293	36293	36293
3 Pożywka pobakteryjna	21261	22588	22999
4 Ubytek wartości kalorycznej pożywki w czasie wzrostu	15032	13705	13294
5 Bakterie	5370	5037	4203
6 Utrata energii podczas wzrostu	9662	8668	9091
Ilość energii na 1 g suchej masy bakteryjnej (w kaloriach)			
7 Ubytek wartości kalorycznej pożywki w czasie wzrostu	18300	17088	20051
8 Bakterie	6533	6280	6339
9 Utrata energii podczas wzrostu	11767	10808	13712
10 Energia zawarta w bakteriach w procentach ubytku wartości kalorycznej pożywki	35,7	36,8	31,6

stawę 1 g suchej masy wyhodowanych prątków. Wyniki tych przeliczeń znajdujemy w rubrykach 7, 8 i 9.

W rubryce 10 wyliczyliśmy, jaką część całkowitej utraty energii pożywki w czasie wzrostu zamagazynowały bakterie w swym ciełe.

Tablica 2

Bilans energetyczny *Mycobacterium tbc.* H 37 Rv w procentach pożywki wyjściowej (wartości zaokrąglone)

Pożywka wyjściowa	100
pozostało w pożywce powzrostowej	61
ubytek	
masa bakteryjna	13
energia rozproszona	26
	39

W tablicy 2 zestawiliśmy bilans energetyczny naszych doświadczeń pod kątem widzenia wykorzystania pożywki. Na każde 100 kalorii wartości cieplnej pożywki zużyło się podczas wzrostu licząc okrągło 39 kal., z czego 13 odnajdujemy jako wartość energetyczną wyhodowanej masy bakteryjnej, pozostałe 26 zostało zużyte w czasie wzrostu i ostatecznie rozproszone w postaci ciepła.

Przechodzimy obecnie do przeliczeń kalorycznych wyników doświadczeń S y m a. W tablicy 3 przeprowadziliśmy wyliczenia kaloryczne zużycia substratów podczas wzrostu *Mycobacterium tbc.* w odniesieniu do 1 g suchej masy prętka. W tym celu wybraliśmy spośród bilansów S y m a i współpracowników 3 doświadczenia, w których prętki hodowano na tej samej pożywce DGK, co w naszych doświadczeniach [2]. Pierwsze dwa bilanse przeprowadzone były na szczepie H 37 Rv, trzeci zaś na szczepie L, wyosobnionym z chorego. Jako ubytek substratu podaje S y m wartości uzyskane przez odjęcie ilości każdego z trzech substratów znalezionych w pożywce powzrostowej od ilości substratów zawartych w pożywce wyjściowej. Ilości te przeliczyliśmy na 1 g suchej masy zebranych prętów. Otrzymane tak liczby podano w kolumnie 3. Wartości te wymnożyliśmy przez ciepło spalania jednego grama danego substratu, posługując się tablicami z *Chemiker Kalender*. W ten sposób otrzymaliśmy ilości kalorii podane w 4 kolumnie. Ostatnia kolumna podaje sumę kalorycznego ubytku substratów w każdym doświadczeniu. Średnia wartość z 3 doświadczeń wynosi 18 555 kalorii.

Liczbę tę, która przedstawia całkowitą wartość cieplną ubytku substratów, możemy porównać z wartością otrzymaną przez nas na drodze kalorymetrii bezpośredniej. Wyniki naszych doświadczeń przeliczone na



Tablica 3

Przeliczenie kaloryczne bilansu materiałowego S y m a [2]. Wartości podane w przeliczeniu na 1 g suchej masy wyhodowanych *Mycobacterium tbc.*

Nr dośw.	Substrat	zużycie w mg	zużycie w kaloriach	suma w kal
1	glikoza	3418	12794	16742
	kwas glutaminowy	1033	3813	
	kwas cytrynowy	54	135	
2	glikoza	3925	14696	19026
	kwas glutaminowy	1109	4094	
	kwas cytrynowy	95	236	
3	glikoza	4232	15839	19897
	kwas glutaminowy	1038	3831	
	kwas cytrynowy	91	227	
Średnia				18555

gram suchej masy prętka podano w tabl. 1 (rubryka 7). Średnia z podanych tam 3 wartości wynosi 18 480 kalorii. Porównując te dwie liczby trzeba pamiętać, że kalorymetria bezpośrednia daje nam wartość cieplną substratów, pomniejszoną o wartość cieplną ewentualnie obecnych produktów niepełnego utlenienia. Zatem wartość otrzymana przez spalanie bezpośrednie powinna być niższa od wartości wyliczonej z bilansu substratów o wartość cieplną pośrednich produktów przemiany. W naszym przypadku różnica obu wartości wynosi zaledwie 108 kalorii, co jest w granicach dokładności metod użytych. Potwierdza to wniosek S y m a, że prętki gruzlicy są doskonałymi utleniaczami, nie fermentującymi, lecz spalającymi rozłożone substraty aż do końca, tj. do dwutlenku węgla i wody. Zupełna prawie zgodność wyników jest tu naturalnie przypadkowa, wystarczy choćby zwrócić uwagę z jak różnych wartości indywidualnych powstały nasze przeciętne. W każdym razie możemy wykluczyć fermentacyjny charakter metabolizmu *Mycobacterium H37Rv*. Gdyby bowiem tylko 30% ubytej ilości glikozy zachowało się w postaci np. kwasu mlekowego, to nadwyżka wartości obliczonej z bilansu S y m a nad naszą wartością bezpośrednio oznaczoną musiałaby być rzędu 4 tys. kal.

We wszystkich doświadczeniach oznaczyliśmy również wartość energetyczną wyhodowanych bakterii. Podaje je w przeliczeniu na 1 g rubryka 8 w tabelicy 1. Odejmując tę wartość od całkowitego ubytku war-

tości kalorycznej pożywki, otrzymujemy ilość energii wydatkowaną i rozproszoną w postaci ciepła. Ilość ta wynosi w poszczególnych doświadczeniach 11 747, 10 808 i 13 712 kal., średnio 12 089 kalorii. Dzieląc wartość energetyczną bakterii przez całkowite zużycie energii w czasie wzrostu (rubr. 7 tabl. 1) i mnożąc przez 100 otrzymujemy wydajność energetyczną wzrostu. Wynosi ona średnio 34,7%, co świadczy o dużej ekonomii wzrostu. Dla porównania przytaczamy, że w doświadczeniach Rubnera [5] wydajność ta tylko w hodowli *Escherichia coli* osiągnęła podobną wartość, mianowicie 30,8% dla *B. pyocyaneus* 27,7%, zaś dla *V. cholerae* 17,0%, dla *C. dysphtheriae* 12,1% a dla *S. typhi* tylko 11,6%. Przytaczamy te wartości tylko dla wstępnej orientacji nie przypisując im głębszego znaczenia. Ekonomia wzrostu drobnoustroju jak każdej żywej substancji zależy prawdopodobnie od wielu czynników, jak fizjologiczny wiek hodowli, zastosowane substraty i temperatura hodowania. W dalszych pracach zamierzamy zbadać wpływ tych czynników dla stwierdzenia, czy przy ich uwzględnieniu różnice międzygatunkowe w ekonomii wzrostu okażą się nadal istotne.

### Streszczenie

Metodą spalania w bombie kalorymetrycznej zestawiono energetyczny bilans wzrostu hodowli *Mycobacterium tbc.* H37Rv. Oznaczono energię zawartą w pożywce wyjściowej, pozostałą w pożywce powzrostowej oraz zawartą w wyhodowanej masie bakteryjnej. Przeliczono na kalorie bilans materiałowy Syma i stwierdzono zgodność obu wyników.

Energia zamagazynowana w ciele bakteryjnym waha się od 31,6 do 36,8% energii pobranej z podłoża.

### LITERATURA

- [1] Centnerszwer M. i Świętosławski W., *Podręcznik do ćwiczeń z Chemii Fizycznej, Termochemii i Elektrochemii*, 1921, M. Arct, Warszawa.
- [2] Głębiński T., Jałowicka K., Sym E. A., *Gruźlica* 18, 413, 1950.
- [3] Hoogland P. L., Mendel B., *Lancet* 259, 16, 1950.
- [4] Pałewicz F., *Przegl. Epidemiol.* 3, 232, 1949.
- [5] Rubner M., *Archiv f. Hygiene* 57, 193, 1906.
- [6] Sym E. A., *Med. Dośw. Społ.* 25, 3, 1946.
- [7] Sym E. A., *Med. Dośw. Społ.* 25, 395, 1947.
- [8] Sym E. A., *Przegl. Epidemiol.* 3, 205, 1949.
- [9] Westfal I., *Przegl. Epidemiol.* 3, 257, 1949.

ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ БАЛАНС РОСТА КУЛЬТУРЫ  
*MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS H37 Rv.*

Резюме

Методом сжигания в калориметрической бомбе был составлен энергетический баланс роста культуры *Mycobacterium tuberculosis H 37 Rv*. Определили энергию, содержащуюся в исходной питательной среде, энергию оставшуюся в питательной среде после роста, а также содержащуюся в выращенной бактериальной массе. Выразили в калориях материальный баланс *S y m a*, а также констатировали согласованность обоих результатов.

Накопленная в бактериальном теле энергия колеблется между 31,6% и 36,8% энергии, почерпнутой из питательной среды.

HEAT BALANCE OF THE GROWTH OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS H37Rv*

S u m m a r y

Combustion in an oxygen-bomb calorimeter was used to determine the heat balance of growth of a culture of *Mycobacterium tbc. H 37 Rv*. Energy determinations concerned the initial nutrient medium, the post culture medium, and the bacteria grown on the medium. The material balance published by *S y m* was calculated in terms of calories and the experimental results were found to agree with it.

The energy stored in bacteria varies from 31.6 to 36.8 per cent of the energy taken up from the nutrient medium.

Otrzymano 5.11.1956 r.



W. DRABIKOWSKI

**MODYFIKACJA DWUACETYLOWEJ METODY OZNACZANIA  
KREATYNY I FOSFOKREATYNY**

*Z Zakładu Biochemii Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego  
Kierownik: prof. dr Wł. Niemierko*

Barwną reakcję kreatyny z dwuacetylem wykrył jeszcze w roku 1911 Valpole [9]. Dodatek  $\alpha$ -naftolu wydatnie zwiększa czułość tej reakcji (Barrit [1]). Eggleton i wsp. [3], Ennor i Stocken [4] i Raablauf i wsp. [6] opracowali warunki tej reakcji umożliwiając kolorymetryczne oznaczenie kreatyny w ilościach 10—40  $\mu\text{g}$  w próbce. W reakcję z dwuacetylem wchodzi jedynie kreatyna wolna. Ennor i Rosenberg [5] zastosowali tę metodę również i do oznaczania fosfokreatyny. Celem określenia wg tych autorów ilości fosfokreatyny oznacza się w jednej próbce kreatynę wolną, a w równoległej próbce, po uprzedniej hydrolizie, kreatynę całkowitą. Z różnicy oblicza się ilość kreatyny związanej z fosforem. Metoda ta oddała duże usługi szczególnie tam, gdzie ze względu na niskie stężenie fosfokreatyny nie można jej było dotychczas dokładnie oznaczyć [5, 2].

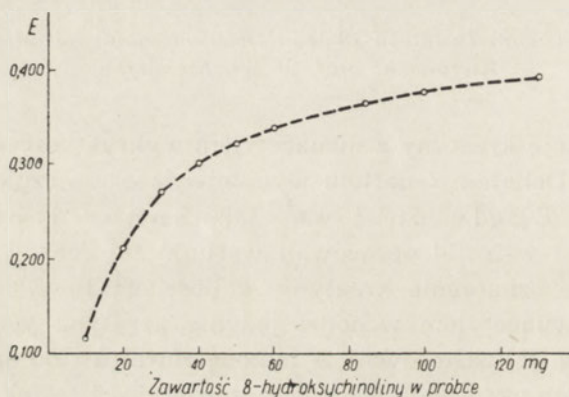
W metodzie dwuacetylowej dodatek  $\alpha$ -naftolu wpływa, jak powiedziano wyżej, na znaczne podwyższenie czułości reakcji. Użycie  $\alpha$ -naftolu pociąga jednak za sobą pewne niedogodności. Jedną z nich jest uboczna barwna reakcja  $\alpha$ -naftolu z kwasem trójchlorooctowym, używanym zazwyczaj do odbiałczania. Reakcja ta jest katalizowana przez światło, szczególnie ultrafioletowe [3] i dlatego należy ją wywoływać w ciemności lub przy świetle czerwonym. Drugą niedogodnością jest konieczność oczyszczania handlowych preparatów  $\alpha$ -naftolu oraz konieczność każdorazowego przygotowania świeżych jego roztworów.

W pracy niniejszej w poszukiwaniu innych związków mogących zastąpić  $\alpha$ -naftol w reakcji kreatyny z dwuacetylem zatrzymano się na 8-hy-

droksychinolinie, która wykazuje podobieństwo strukturalne do  $\alpha$ -naftolu i którą ostatnio zastosował Sakaguchi<sup>1</sup> zamiast  $\alpha$ -naftolu do oznaczania argininy.

### Sposób postępowania i uzyskane wyniki

W doświadczeniach wstępnych wykonanych na roztworze standardowym kreatyny wypróbowano przede wszystkim różne sposoby przyrządzania roztworu 8-hydroksychinoliny: 1) roztwór alkoholowy, 2) roztwór alkaliczny (NaOH) i 3) roztwór kwaśny (kwas octowy). Przy zastosowaniu pierwszych dwóch roztworów uzyskiwano przy oznaczeniach zbyt niską gęstość optyczną, ponadto zaś same roztwory szybko ulegały ściemnieniu. Zadowalające wyniki uzyskano jedynie przy zastosowaniu roz-



Rys. 1. Zależność między stężeniem 8-hydroksychinoliny (w mg w próbce) a gęstością optyczną E

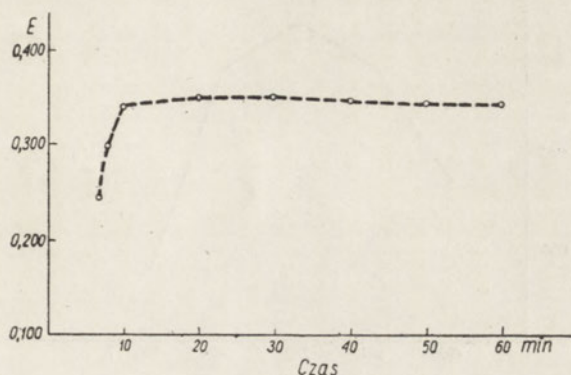
tworu 8-hydroksychinoliny w kwasie octowym, wobec czego do wszystkich dalszych prób używano jedynie tych ostatnich. Reakcję przeprowadzano w ten sposób, że do roztworu kreatyny dodawano dwuacetyl w ilości podanej w metodzie Eggletona i wsp. [3, 4, 6], a następnie roztwór 8-hydroksychinoliny oraz taką ilość NaOH, by stężenie końcowe ługu zgodnie z metodą Eggletona wynosiło 0,3 N. (NaOH dodawano, jak i w poprzedniej pracy [2] zgodnie z Raablaufem [6] bez węglanu sodu).

W doświadczeniach dalszych, również wykonanych na standardowym roztworze kreatyny, sprawdzono wpływ stężenia 8-hydroksychinoliny i wpływ czasu trwania reakcji na intensywność otrzymanego zabarwienia,

<sup>1</sup> Prace Sakaguchi [7, 8] są nam, niestety, znane jedynie ze streszczenia w *Chem. Abstr.*

zbadano zależność między uzyskaną gęstością optyczną a stężeniem kreatyny i dobrano odpowiedni filtr do pomiarów fotometrycznych.

Wpływ stężenia 8-hydroksychinoliny na intensywność barwy. Do próbek brano po 40  $\mu\text{g}$  kreatyny, dodawano dwuacetyl, następnie różne ilości roztworu 8-hydroksychinoliny w kwasie



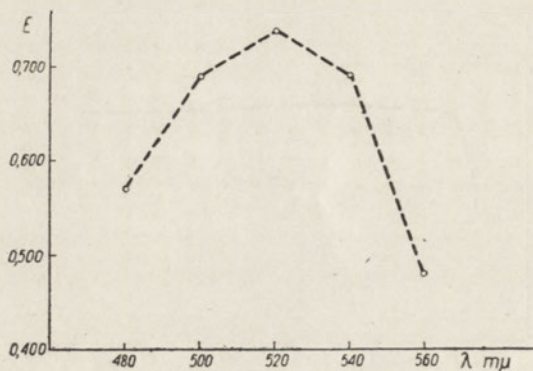
Rys. 2. Zależność między czasem wywoływania barwy a gęstością optyczną E

octowym i w końcu roztwór NaOH. Całość uzupełniano wodą do 10 ml. Oznaczenia wykonywano po 20 min. stosując kuetę o długości 1 cm i filtr Spekkera OG I. Rys. 1 przedstawia zależność między stężeniem 8-hydroksychinoliny a otrzymaną gęstość optyczną. Jak widać, w miarę wzrostu jej stężenia gęstość optyczna wzrasta. Przy stężeniu 100 mg 8-hydroksychinoliny na 10 ml ostatecznej objętości roztworu uzyskiwano dla 40  $\mu\text{g}$  kreatyny gęstość optyczną 0,365—0,375. Jak wynika z krzywej na rys. 1, dalsze zwiększenie stężenia 8-hydroksychinoliny w małym już stopniu wpływa na wzrost gęstości optycznej. W związku z tym zdecydowano się pozostać przy tym jej stężeniu i dodawać do badanych próbek w czasie wykonywania analiz po 2 ml 5% roztworu 8-hydroksychinoliny w 3 N kwasie octowym.

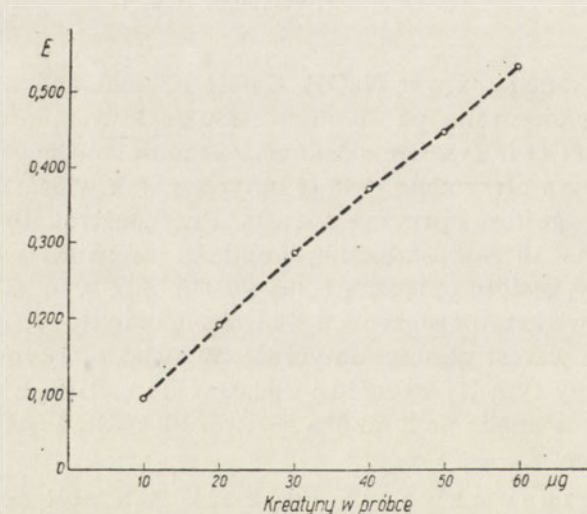
Wpływ czasu trwania reakcji. Zależność między gęstością optyczną a czasem wywoływania barwy podaje rys. 2. Jak wynika z niego, po 20 minutach osiąga się maksymalne zabarwienie, które jest trwale przynajmniej przez dalsze 15 min., po czym bardzo powoli się obniża.

Zależność pomiędzy długością fali a ekstynkcją. Rysunek 3 podaje wartości gęstości optycznej w zależności od długości fali. Oznaczenia przeprowadzono na spektrofotometrze Colemana. Maksimum uzyskano przy około 250  $m\mu$  i dlatego wszystkie oznaczenia wykonywano przy użyciu odpowiadającego tej długości fali filtru zielonego.

Zależność pomiędzy stężeniem kreatyny a ekstynkcją. Zależność tę ilustruje rys. 4. Z rysunku wynika, że w granicach stężeń od 10 do 40  $\mu\text{g}$  kreatyny w próbce proporcjonalność jest zupełnie dobrze zachowana. Przy wyższych stężeniach kreatyny otrzymuje się nieco niższe wartości gęstości optycznej.



Rys. 3. Zależność między ekstynkcją a długością fali



Rys. 4. Zależność między stężeniem kreatyny (w  $\mu\text{g}$  w próbce) a gęstością optyczną  $E$

Szereg oznaczeń kreatyny wykonano używając zamiast roztworu 8-hydroksychinoliny w kwasie octowym roztwór wodny chinosu. (Chinosol jest siarczanem 8-hydroksychinoliny i z powodu zastosowania w farmacji jest w handlu łatwiej dostępny od wolnej zasady). Do próbek dodawano po 2 ml 10% roztworu chinosu. (Odpowiada to około 103 mg wolnej



zasady, a więc nieco więcej niż zawiera 2 ml 5% jej roztworu). Dla 40  $\mu\text{g}$  kreatyny otrzymywano w tym przypadku gęstość optyczną równą 0,370—0,380, a więc uzyskane wyniki były zgodne z wynikami otrzymanymi przy użyciu roztworów 8-hydroksychinoliny w kwasie octowym.

Roztwory 8-hydroksychinoliny w kwasie octowym jak i roztwory chinosolu w wodzie mogą być używane nawet po upływie dłuższego okresu czasu (pół roku). Mimo że roztwory te stają się stopniowo nieco ciemniejsze, nie wpływa to jednak na uzyskaną przy oznaczaniu kreatyny ekstynkcję.

Przed wypróbowaniem opisanej metody na materiale biologicznym sprawdzono, czy 8-hydroksychinolina nie daje, analogicznie jak  $\alpha$ -naftol, ubocznej reakcji z kwasem trójchlorooctowym. W tym celu do próbek roztworu kreatyny dodawano po 1 ml 10% kwasu trójchlorooctowego, zobojętniano go, a następnie wywoływano barwę podanym wyżej sposobem.

#### Gęstość optyczna dla 40 $\mu\text{g}$ kreatyny

- |                                        |                     |
|----------------------------------------|---------------------|
| a) próbki trzymane na świetle          | 0,365; 0,370; 0,366 |
| b) próbki trzymane w ciemności         | 0,367; 0,369; 0,370 |
| c) próbki bez kwasu trójchlorooctowego | 0,368; 0,370; 0,372 |

Jak widać z przytoczonych liczb, nie ma różnic w wielkości gęstości optycznej między próbkami zawierającymi kwas trójchlorooctowy (zarówno trzymanymi na świetle jak i przechowywanymi w ciemności) a próbkami kontrolnymi.

Całkowity przebieg analizy kreatyny i fosfokreatyny wygląda następująco:

#### Odczynniki:

1. 0,05% roztwór dwuacetylu <sup>1</sup>
2. 0,05 M roztw. soli sodowej kwasu *p*-chlorortęciobenzoesowego <sup>1</sup>
3. 5% roztwór 8-hydroksychinoliny w 3 N kw. octowym lub 10% roztwór chinosolu w wodzie <sup>2</sup>
4. 12% (około 3 N) NaOH
5. Standardowy roztwór kreatyny <sup>1</sup>.

Materiał biologiczny homogenizuje się z 10% kwasem trójchlorooctowym, a następnie sączy. Przesącz zobojętnia się wobec *p*-nitrofenolu i rozcieńcza do określonej objętości.

Do próbek przesącza (bezpośrednio — celem oznaczenia kreatyny wolnej lub po uprzednim zhydrolizowaniu wg Ennora i Rosenberga

<sup>1</sup> Dwuacetyl i kwas *p*-chlorortęciobenzoesowy oraz standard kreatyny otrzymywano, jak w poprzedniej pracy [2].

<sup>2</sup> Używano 8-hydroksychinoliny produkcji czeskiej („Lachema”), a chinosolu produkcji polskiej („Centrofarm”).

[5] — przy oznaczaniu sumy kreatyny i fosfokreatyny) dodaje się 1 ml roztworu soli sodowej kwasu chlorortęciobenzoesowego, 1 ml roztworu dwuacetylu, 2 ml roztworu 8-hydroksychinoliny (lub roztworu chinosu) oraz roztwór NaOH (3 ml w przypadku użycia 8-hydroksychinoliny i 1 ml przy użyciu chinosu).

T a b l i c a 1

Porównanie oznaczenia kreatyny wolnej i związanej z fosforem przy zastosowaniu  $\alpha$ -naftolu i 8-hydroksychinoliny. Oznaczenia przeprowadzono na tych samych wyciągach kwasem trójchlorooctowym z mięśni łydkowych żab *Rana esculenta*. Wyniki podano w mg%. Każda liczba jest średnią z dwu równoległych oznaczeń różniących się od siebie 0—3%

Żaba Nr	$\alpha$ -naftol			8-hydroksychinolina		
	kreatyna w mg%			kreatyna w mg%		
	wolna	całkowita	związana z fosforem	wolna	całkowita	związana z fosforem
151	137,5	314,0	176,5	140,6	314,5	173,9
152	339,5	400,0	60,5	343,7	398,7	55,0
153	134,5	335,0	201,5	132,1	338,0	205,9
163	210,8	368,0	157,2	211,4	363,4	152,0
164	239,3	358,9	119,6	239,8	357,4	117,6
165	130,6	354,0	223,4	133,5	358,5	225,0
166	207,0	324,0	117,0	209,2	320,0	110,8

Całość dopełnia się do 10 ml wodą i szybko miesza. Powstające zabarwienie oznacza się na absorpcjometrze Spekkera po 20 min., stosując filtr zielony OG 1, posiadający maksimum przy około 525 m $\mu$ . W każdej serii oznaczeń badano wielkość ekstynkcji dla standardu kreatyny i wartość tę przyjmowano jako podstawę do obliczeń. Ślepą próbę stanowiła mieszanina wszystkich odczynników nie zawierająca jedynie materiału badanego względnie standardu kreatyny.

Opisaną powyżej modyfikację dwuacetylowej metody określania kreatyny wypróbowano na materiale biologicznym oznaczając ilość kreatyny i fosfokreatyny w wyciągach kwasem trójchlorooctowym z mięśni łydkowych żab *Rana esculenta*. Szereg uzyskanych wyników jest podany w tabelicy 1. Widzimy, że wyniki otrzymane przy zastosowaniu  $\alpha$ -naftolu i 8-hydroksychinoliny są ze sobą zgodne.

Opisana modyfikacja dwuacetylowej metody oznaczania kreatyny przy pomocy 8-hydroksychinoliny ma, jak się wydaje, szereg zalet w stosunku do metody, w której stosuje się  $\alpha$ -naftol. Dwie niedogodności związane z użyciem  $\alpha$ -naftolu — konieczność przeprowadzenia reakcji w ciemności oraz nietrwałość  $\alpha$ -naftolu zarówno *in substantia*, jak i w roztworze, zo-

stały w opisanej modyfikacji usunięte. 8-hydroksychinolina nie daje żadnej barwnej reakcji z kwasem trójchlorooctowym. Preparaty jej *in substantia* nie ulegają rozkładowi, a roztwory mogą być przechowywane przez długi okres czasu.

### Streszczenie

Opisano modyfikację dwuacetylowej metody oznaczania kreatyny i fosfokreatyny stosując zamiast  $\alpha$ -naftolu 8-hydroksychinoliny. Odczynnik ten dodaje się w postaci roztworu w kwasie octowym lub w postaci wodnego roztworu siarczanu (chinosolu).

Ze względu na trwałość 8-hydroksychinoliny oraz brak ubocznej reakcji z kwasem trójchlorooctowym, używanym do odbiałczania, opisana modyfikacja posiada szereg zalet w stosunku do metody stosującej  $\alpha$ -naftol.

Metoda pozwala na oznaczenie kreatyny w ilości 10—40  $\mu$ g w próbce.

### LITERATURA

- [1] Barrit M., *J. Path. Bact.* **42**, 441, 1936.
- [2] Drabikowski W., *Acta Biochim. Polon.* **3**, 119, 1956.
- [3] Eggleton P., Elsdon S. R., Gough N., *Biochem. J.* **37**, 526, 1943.
- [4] Ennor A. H., Stocken L. A., *Biochem. J.* **42**, 557, 1948.
- [5] Ennor A. H., Rosenberg H., *Biochem. J.* **51**, 606, 1952.
- [6] Raablauf J., Abelin L., *Biochem. Z.* **321**, 158, 1950.
- [7] Sakaguchi S., *J. Biochem. (Japan)* **37**, 231, 1950. cyt. wg *Chem. Abstr.* **44**, 3017, 1951.
- [8] Sakaguchi S., *J. Biochem. (Japan)* **38**, 91, 1951, cyt. wg *Chem. Abstr.* **44**, 7178, 1951.
- [9] Valpole G. S., *J. of Physiol.* **42**, 301, 1911.

### МОДИФИКАЦИЯ ДВУАЦЕТИЛОВОГО МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ КРЕАТИНА И ФОСФОКРЕАТИНА

#### Резюме

Разработанная модификация двуацетилового метода определения креатина и фосфокреатина основана на применении 8-оксихинолина вместо  $\alpha$ -нафтола. Этот реактив прибавляется в виде раствора в уксусной кислоте или в виде водного раствора сульфата (хинозола).

Ввиду стойкости 8-оксихинолина и отсутствия побочной реакции с трихлоруксусной кислотой, употребляемой для удаления белков, описанная модификация обладает рядом достоинств в сравнении с методом, применяющим  $\alpha$ -нафтол.

Предлагаемый метод дает возможность определить креатинин в количестве 10—40  $\mu$ г.

## A MODIFICATION OF THE DIACETYL METHOD OF CREATINE ESTIMATION

## Summary

A modification of the diacetyl method of creatine (and phosphocreatine) estimation is presented consisting in the use of 8-hydroxyquinoline instead of  $\alpha$ -naphthol. The reagent is added as a solution in acetic acid or as an aqueous solution of the sulfate (chinosol).

The present modification possesses several advantages over that using  $\alpha$ -naphthol, among them the stability of 8-hydroxyquinoline and the lack of a side-reaction with trichloroacetic acid.

The method enables the determination of creatine in quantities ranging from 10 to 40 micrograms in the sample.

Otrzymano 30.11.1956 r.

T. KORZYBSKI

**SYNOPTYCZNY SPOSÓB PRZEDSTAWIANIA WIADOMOŚCI  
STRUKTURALNYCH BIOCHEMII***Z Zakładu Biochemii Polskiej Akademii Nauk w Warszawie***Postawienie zagadnienia**

Stopień złożoności materiału biochemii (zarówno statycznego jak i kinetycznego) wzrasta w ciągu ostatnich lat coraz bardziej. Równoległe do tego rosną także trudności w graficznym przedstawianiu tego materiału. Staje się on coraz trudniejszy do opanowania nie tylko dla początkujących, ale i dla zaawansowanych w przedmiocie. Jedną z przyczyn tego jest między innymi brak dostatecznie synoptycznego sposobu przedstawiania. Sądzymy, że obecny (często tylko pozornie skomplikowany) materiał przez zastosowanie odpowiedniego sposobu stanie się znacznie prostszy. Ułatwi to także porozumienie się między pracownikami wyspecjalizowanymi w wąskich dziedzinach biochemii. Przy obecnych sposobach przedstawiania także i zależności strukturalne nie są dostatecznie przejrzyste. Zastosowanie nowego, łatwego, naocznego sposobu przedstawiania strukturalnych wiadomości biochemii wydaje się więc rzeczą pożądaną.

Stosowane do odzwierciedlania budowy związków chemicznych symbole chemii organicznej, a już tym bardziej chemii nieorganicznej zupełnie nie odpowiadają tym istotnym cechom budowy związków organicznych, które są istotne dla komórki żywej. Symbole używane dotąd w biochemii, np. w podręczniku *Westa i Todda* z 1956 roku [4] są symbolami bezpośrednio zapożyczonymi, prawie bez zmiany, z chemii organicznej. Treść chemii organicznej jest wynikiem metod analitycznych i metod syntezy organicznej stosowanych przez ten dział chemii. Komórka żywa ma inny arsenał metod zarówno przy biosyntezie jak i przy analizie. Podpatrywanie tego arsenału syntetycznych i analitycznych metod stosowanych przez żywą komórkę jest celem biochemii. Celowi temu winny odpowiadać także i graficzne sposoby przedstawiania materiału struk-

turalnego biochemii. Wydaje się, że wynalezienie takich sposobów przedstawiania rzeczywistości biochemicznej, które by jak najbardziej zbliżały nas do prawdy biochemicznej, a jednocześnie były bardziej naoczne i proste, nie tylko znacznie ułatwiłyby porozumiewanie się między sobą biochemików różnych specjalności, ale przede wszystkim ochroniłyby biochemię od przeobrażenia się w naukę hermetyczną, co groziłoby jej przy dalszym wzroście tych tendencji, które obserwuje się w dotychczasowym jej rozwoju.

Fakt istnienia tak bardzo skomplikowanych narzędzi chemicznych, jakimi są na przykład niektóre koenzymy, narzuca konieczność poszukiwania sposobów znacznego uproszczenia klasycznych sposobów przedstawiania rzeczywistości chemicznej stosowanych przez chemię organiczną. Wyrazem tego jest istniejąca w biochemii tendencja do oznaczania złożonych cząsteczek za pomocą liter będących skrótami nazwy części składowych. Sposób ten stanowi jednak wyłącznie stenograficzne uproszczenie samej nazwy, ale nie odtwarza samej istoty cząsteczki czy jej części składowych. Ponadto skróty literowe nie zostały niestety dotychczas ujednostajnione i skodyfikowane (w pewnej mierze z powodu różnic językowych), wymagają więc każdorazowego podawania ich znaczenia.

Idealnym niemal sposobem przedstawienia strukturalnej treści statycznych i kinetycznych zagadnień biochemii są modele przestrzenne cząsteczek. Szerokie jednak stosowanie tego sposobu musi być ograniczone z powodu trudności w budowaniu modeli cząsteczkowych, ich kosztu i często niedostatecznych danych odnośnie geometrii przestrzennej. Ponadto modele atomowe cząsteczek o znacznym stopniu złożoności unaoczniają w niedostateczny sposób ich wewnętrzny schemat czy strukturę.

Przy próbach zestawienia materiału strukturalnego poszczególnych rozdziałów czy zagadnień biochemii zastosowaliśmy w jednej z prac (Korzybski, Parnas [2]) przed kilkunastu laty nowy i jak się obecnie wydaje, dość uniwersalny sposób, który może mieć szerokie zastosowanie. Sposób ten w ciągu ostatnich lat był przez nas coraz szerzej stosowany, tak że obecnie z powodzeniem udało się go wprowadzić do znacznej części materiału biochemii, zarówno statyki, jak kinetyki.

### Statyka

Przy opisie związków chemicznych, z którymi mamy do czynienia w biochemii (statyka), stwierdza się podstawowy fakt występowania grup związków chemicznych o zbliżonej budowie. Są to rodziny związków, których poszczególni przedstawiciele mają w znacznym stopniu identyczną budowę częściową. Stosowany dotychczas w podręcznikach sposób przedstawiania materiału biochemii w postaci wzorów chemicznych nie od-

zwierciedla tego, jak się wydaje, mającego podstawowe znaczenie faktu biochemicznego. Dotychczasowy sposób polega najczęściej na przedstawianiu pełnych wzorów strukturalnych zupełnie tak, jak to czyni chemia organiczna. Wzory takie nie uwypuklają dostatecznie ani podobieństw i różnic w grupie związków do siebie podobnych, ani części składowych w przypadku złożonej cząsteczki. Proponowany przez nas sposób usuwa te niedogodności.

Na rys. 1 przedstawiono budowę związków sterydowych w sposób synoptyczny. Na rysunku tym linie poziome i pionowe przydzielają poszczególnym zakresom struktury odpowiednie nazwy związków czy grup związków. Na rysunku pokazano w sposób ścisły budowę i podano nazwy kilkunastu związków bez powtarzania wspólnej struktury. Poza wyżej przedyskutowanymi cechami rysunek ten ma również i tę zaletę, że na małej przestrzeni zawiera obfitą treść.

Dla naocznego pokazania struktury, w przypadku złożonej cząsteczki, jej wzór strukturalny zaopatrujemy w linie rozdzielające go na takie części składowe, które powstają po hydrolizie. Składowym tym odpowiadają ich nazwy obejmujące zakresy poszczególnych składowych. Zakresy te często pokrywają się częściowo. Poszczególne struktury wynikają synoptycznie, naocznie i jednoznacznie z jednego wzrostu strukturalnego stanowiącego główną treść schematu. W taki sposób opracowano budowę streptomycyn w monografii: Korzybski T., Kuryłowicz W.: *Antybiotyki* [3], na stronie 139.

Dalsze uproszczenie strukturalnego materiału w biochemii można często osiągnąć przez usunięcie liter jako symboli pierwiastków chemicznych. Jeżeli w schemacie zastąpi się symbole C, O, N przez odpowiednie znaki, np. C punktem czarnym, N — zielonym, a O karbonylowy kółkiem czerwonym, to najczęściej nie będzie konieczne umieszczanie specjalnych znaków dla H, obecność ich bowiem wynika z układu atomów węgla, ich wiązań, azotu i tlenu. Takie postępowanie daje schematy bardziej podobne do obrazu cząsteczek.

Na rys. 2 przedstawiono w sposób synoptyczny przykładowo zależności strukturalne między purynami, pirymidynami, pterynami, ugrupowaniem izoalloksazynowym związków flawinowych i zasadą nukleinową witaminu B<sub>12</sub>. Z rysunku wynika bezpośrednio częściowa wspólna struktura poszczególnych grup związków.

### Kinetyka

Odnosnie procesów biochemicznych trudności występujące w przedstawianiu materiału wzrastają. Dużym postępowaniem było zastosowanie przez Baldwiną [1] dwóch splecionych półkolistych strzałek dla

zobrazowania i graficznego opisu dwu sprzężonych reakcji. Nie zaspokaja to jednak konieczności uczynienia sposobów przedstawiania biochemicznych przemian jeszcze bardziej synoptycznymi i bardziej przejrzystymi.

Fakt istnienia tzw. cykli metabolicznych znalazł dotychczas swój odpowiednik w cyklicznym ułożeniu na obwodzie koła poszczególnych etapów procesu za pomocą powtarzania (mało różniących się między sobą) chemicznych wzorów cząsteczek. Wydaje się, że kołowy sposób przedstawiania tych procesów może u początkujących kojarzyć się niepotrzebnie z wyobrażeniem cykliczności, czyli obrotowości przestrzennej. Pojęcie cyklu, czyli koła, ma swój odpowiednik tylko w czasie, nie ma go jednak w przestrzeni, jak to sugeruje cykliczna forma graficzna. Dlatego wydaje się, że cykle metaboliczne korzystniej jest przedstawiać nowym sposobem, który jest podobny do zastosowanego przez nas do opisu strukturalnych wiadomości statycznej części biochemii (por. rys. 1 Sterydy).

Sposób ten naocznie pokazuje stopniowe odrywanie lub przyłączanie poszczególnych atomów czy ich grup, ogólnie mówiąc, pokazuje kolejne zmiany, którym podlega cząsteczka, bez potrzeby powtarzania wzorów zarówno w ich części zmiennej, jak nieziennej. Przy tym cząsteczka pozostaje niejako w miejscu, a więc proces nie kojarzy się z jej ruchem kołowym (rys. 3, 4 i 5).

Sposób ten daje ponadto jeszcze inną, może najważniejszą korzyść. Indywidualizuje mianowicie poszczególne atomy. Jest to dezyderat, który winien znajdować coraz częściej swój odpowiednik we wzorach czy schematach. Do przedstawienia indywidualności poszczególnych atomów czy ich grup stosuje się sposób (dotychczas jedyny) polegający na zaopatrywaniu ich w odpowiedni znaczek (np. w postaci gwiazdki). Gdy zachodzi konieczność jednoczesnego znakowania kilku atomów w cząsteczce, obraz staje się mało przejrzysty. Nasz sposób przedstawiania może tu oddać znaczne usługi, naocznie bowiem pokazuje historię poszczególnych atomów związku metabolizowanego. Na jednym bowiem wzorze (jak gdyby na modelu) dokonują się kolejne przemiany (np. rys. 3, barwa czerwona). Przemianom tym odpowiadają podane obok nazwy związków. Czytelnik może odtworzyć sobie wszystkie szczegóły każdego kroku przemian, odczytać nazwy związków wyjściowych i wszystkich produktów pośrednich; w niektórych innych schematach może odczytać także i nazwy enzymów rządzących poszczególnymi reakcjami. Wszystko to przedstawione jest na jednym wzorze, bez konieczności uciekania się do niepotrzebnego, zapożyczonego z równań chemicznej stechiometrii powtarzania części lub całości wzorów. Dla pokazania indywidualnej historii poszczególnych autorów w cyklu Krebsa Baldwin ("*Dynamic Aspects of Biochemistry*" II wyd., 1952, strona 444) potrzebował aż 12 wzorów. W naszym sposobie przedstawienia tego cyklu historia poszczególnych atomów węgla



wynika bezpośrednio ze schematu (rys. 3). Na schemacie tym widać bezpośrednio, że przy „pierwszym obrocie” tego cyklu te obydwa atomy węgla, które weszły do cyklu jako reszta acetylowa acetylokoenzymu *A*, nie ulegają spalaniu na  $\text{CO}_2$ . Przeciwnie, obydwa atomy węgla powstałych dwóch cząsteczek  $\text{CO}_2$  pochodzą z obydwu grup karboksylowych kwasu szczawiowoocetowego. Dopiero przy następnym „obrocie” cyklu jeden z węgli, mianowicie dawny węgiel karbonylowy grupy acetylowej, wchodzący obecnie w skład nowej cząsteczki kwasu szczawiowoocetowego ulega spalaniu na  $\text{CO}_2$ .

Na rys. 4 przedstawiono jednocześnie cykl ornitynowy i biosyntezę pirymidyn, stosując metodę synoptyczną. W tym przypadku przedstawiono także omawiane przemiany na jednym, wspólnym wzorze. Kolejność odczytywania przemian cyklu ornitynowego (1, 2, 3, 4, 5) i biosyntezy pirymidyn (1, 2, 3, 4', 5') wskazują cyfry.

Na rys. 5 przedstawiono w podobny sposób biosyntezę kreatyny.

Sposób nasz jest, jak się wydaje, nie tylko łatwiejszy, ale lepiej odzwierciedla procesy zachodzące w przyrodzie, jest poza tym uniwersalny. Dotychczasowy sposób przedstawiania przemian w postaci równań (w których znak równości został zastąpiony dwiema strzałkami) niepotrzebnie podkreśla ilościowy charakter przemian, podczas gdy nacisk powinien być położony na zmiany jakościowe zachodzące na przestrzeni ciągu metabolicznego. Dla ciągu takiego nie jest odpowiednia forma równań, jako zapożyczona ze stechiometrii, tutaj nie odgrywającej zasadniczej roli. Stechiometryczny sposób przedstawiania jest natomiast konieczny i istotny w bilansie danego cyklu (rys. 3 — na dole) — jedynie wtedy konieczne jest zastosowanie równania, będącego ilościową formą zmian w strukturze. Same zmiany natomiast najprościej można przedstawić za pomocą podanego w niniejszej pracy sposobu.

Proponowany sposób również dobrze nadaje się do przedstawiania biogenezy poszczególnych związków. Udało się przygotować odpowiednie schematy obrazujące biologiczną syntezę, między innymi, układu purynowego lub rdzenia porfinowego.

Przy próbach jednostajnego zestawiania materiału opisowego biochemii napotkać można niekiedy zagadnienia, które prowadzą do postawienia pewnych hipotez o charakterze hipotez roboczych. Przy zestawieniu podobieństw między strukturami pirymidyn, puryn, ugrupowania izoalloksazynowego cząsteczki flawin, następnie pteryn, a także zasadowej części nukleotydu wchodzącego w skład witaminu  $\text{B}_{12}$  (dwumetylobenzimidazolu) powstaje szereg pytań odnośnie ewentualnej wspólnej drogi biosyntezy pewnej części tych ugrupowań. Powstaje na przykład zagadnienie, czy istnieje, czy też nie istnieje wspólna historia atomu węgla grupy metylenowej kwasu pteroilowego (łączącej ugrupowanie pterydynowe z resztą

kwasu p-aminobenzoowego) i węgla zajmującego pozycję 5 w ugrupowaniu izoalloksazynowym flawin. Taka forma zagadnienia wydaje się być złożona. Stanie się ona prosta po zastosowaniu omawianego w niniejszej pracy sposobu.

Różne drogi biosyntetyczne rdzenia pirymidynowego, inne w przypadku, gdy nie jest on skondensowany z pierścieniem imidazolowym i inne wtedy, gdy tak jak w purynach, jest on w ten sposób skondensowany, są tego przykładem. Zagadnienia te jednak powstają dopiero wtedy wyraźnie, gdy sposób przedstawienia materiału jest tak uproszczony, jak w podanych przez nas schematach.

Jedyną, jak się wydaje, wadą proponowanego sposobu jest występująca niekiedy, choć nie często, trudność w znalezieniu graficznego rozwiązania w przedstawianiu danego procesu na jednej płaszczyźnie. Sprawa ta jednak znajduje różnorodne rozwiązania techniczne praktycznie biorąc dla wszystkich przypadków.

### Streszczenie

1. Przedyskutowano konieczność stosowania nowego, uproszczonego, bardziej odpowiadającego rzeczywistości, synoptycznego sposobu przedstawiania strukturalnego materiału biochemii zarówno w dziedzinie statyki, jak i kinetyki biochemicznej.

Sposób taki przedstawiono podając istotne cechy.

2. Przedstawiono kilka przykładów proponowanego sposobu spośród (opracowanego już przez nas) większego materiału schematów.

### LITERATURA

- [1] Baldwin E., *Dynamic Aspects of Biochemistry*, 2nd edition, 1952.
- [2] Korzybski T., Parnas J. K., „Über den Umsatz der Adenosintri-phosphorsäure im lebenden Tier”, *Acta Biologiae Experimentalis*. 13, 157, 1939.
- [3] Korzybski T., Kuryłowicz W., *Antybiotyki. Pochodzenie, rodzaje, właściwości*, Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich, Warszawa 1955.
- [4] West E. S., Todd W. R., *Textbook of Biochemistry*, The Macmillan Co. New York 1956.

### СИНОПТИЧЕСКИЙ МЕТОД ПРЕДСТАВЛЕНИЯ СТРУКТУРНЫХ СВЕДЕНИИ ПО БИОХИМИИ

#### Резюме

1. Рассмотрена необходимость применения нового, упрощенного, более соответствующего действительности, синоптического метода представления структурного материала по биохимии, как в области

биохимической статики, так и в области биохимической кинетики автором представлен такой метод и его существенные характерные черты.

2. Приведено несколько примеров использования предлагаемого метода из значительного числа схем (уже разработанных автором).

#### A SYNOPTIC MEANS OF PRESENTING THE STRUCTURAL NEWS OF BIOCHEMISTRY

#### S u m m a r y

1. A discussion of the need of applying a new, more simplified (conforming more to reality) and synoptic means of presenting the structural (static and dynamic) content of biochemistry. Such a procedure has been proposed, and its essential features presented.

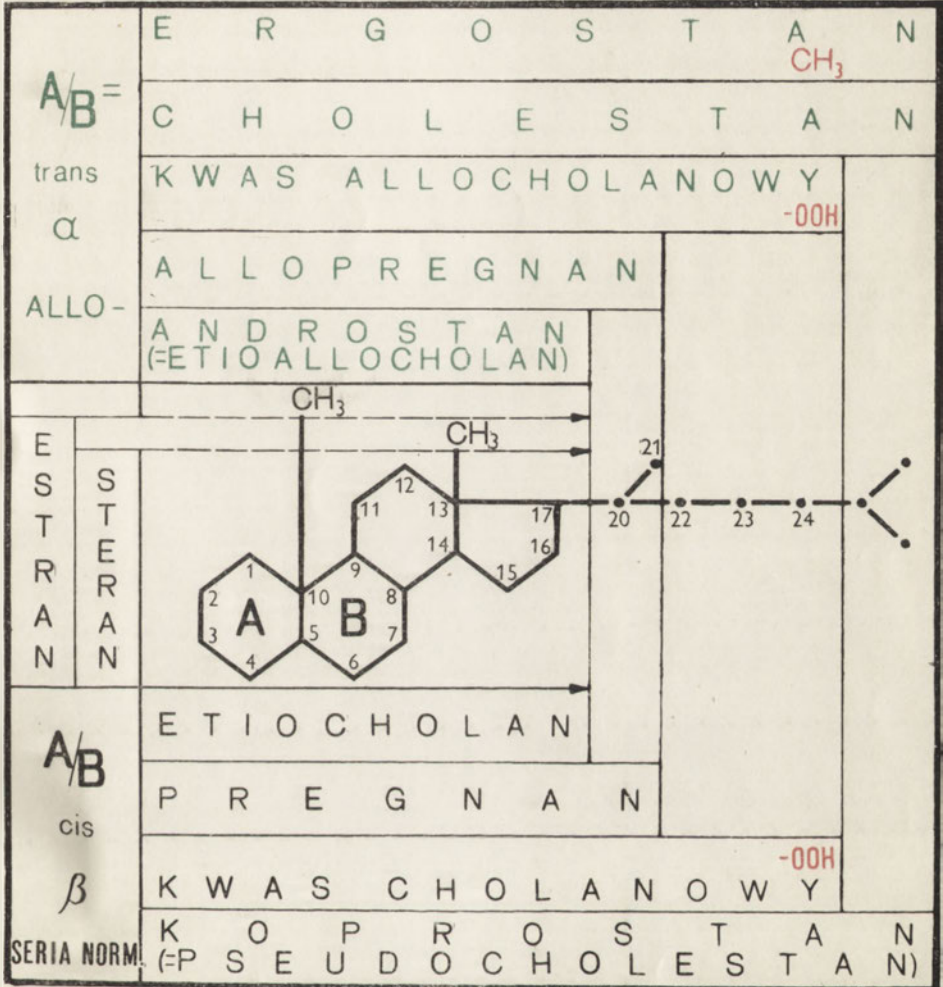
2. There are presented several examples of the proposed method (which have been selected from a larger number of diagrams worked out).

Otrzymano 17.12.1956 r.



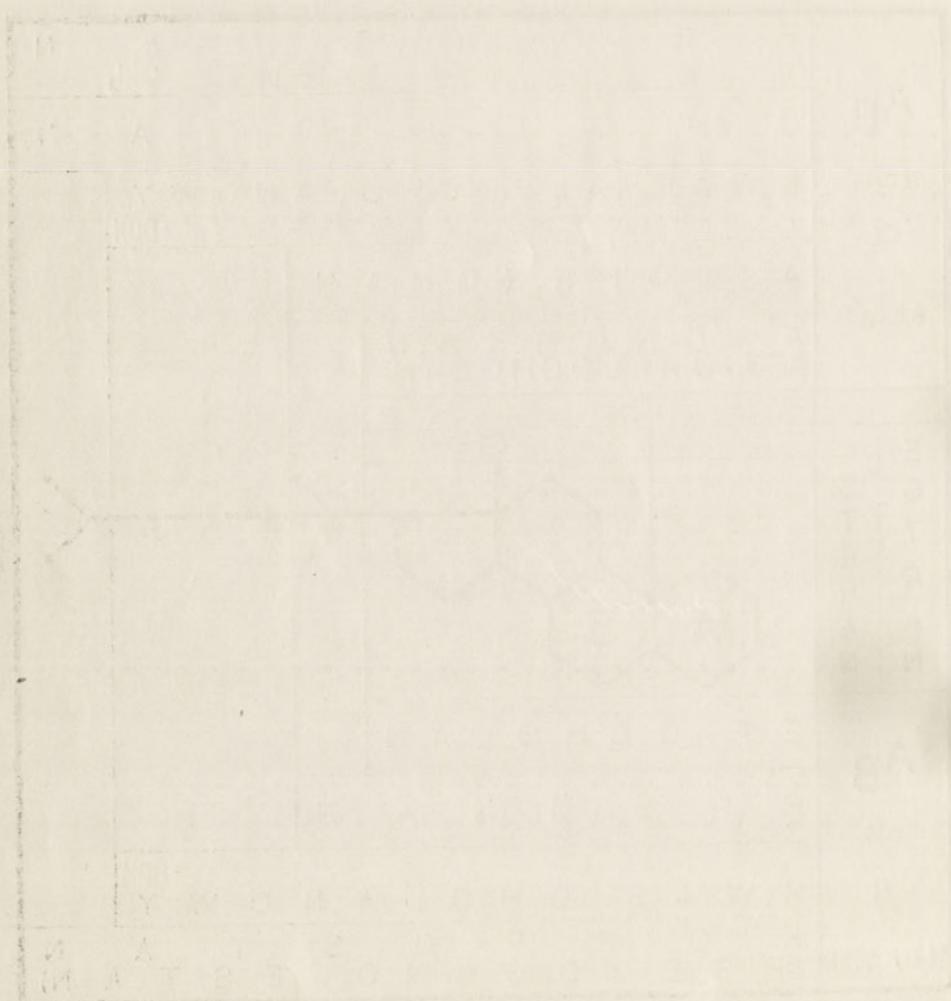
# STERYDY

(UGRUPOWANIA MACIERZYSTE)



Prawa reprodukcji rysunków zastrzeżone

Rys. 1



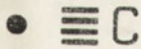
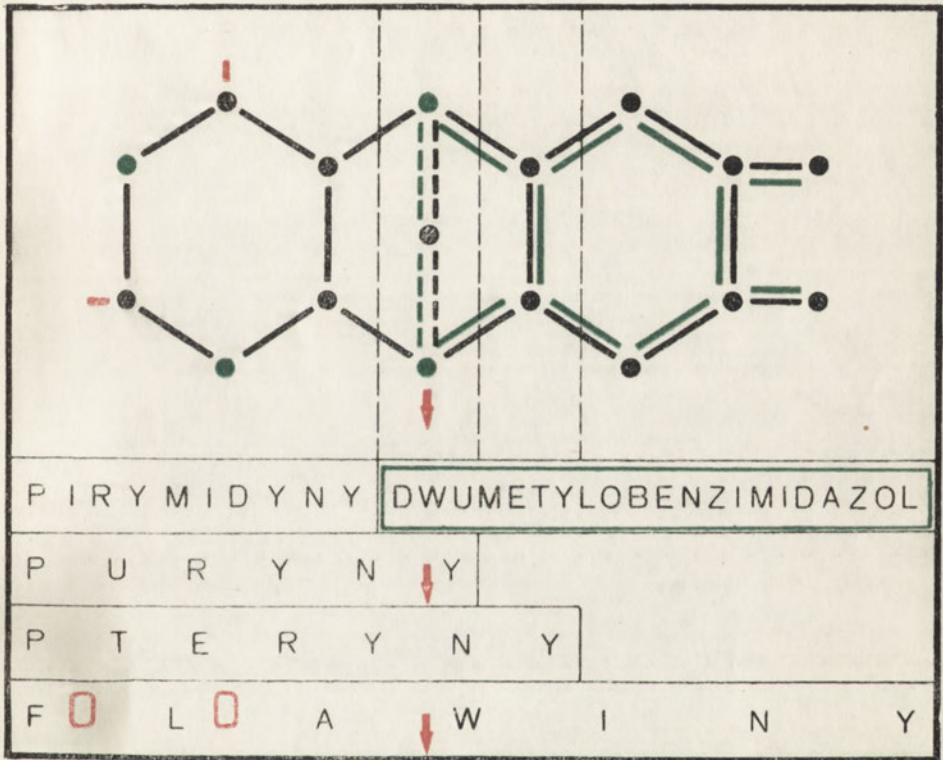
STRUKTURALNE ZALEŻNOŚCI

MIĘDZY BUDOWĄ:

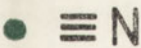
PIRYMIDYN, PURYN, PTERYN, FLAWIN

I ZASADY NUKLEINOWEJ WITAMINU B<sub>12</sub>

(DWUMETYLOBENZIMIDAZOLU)

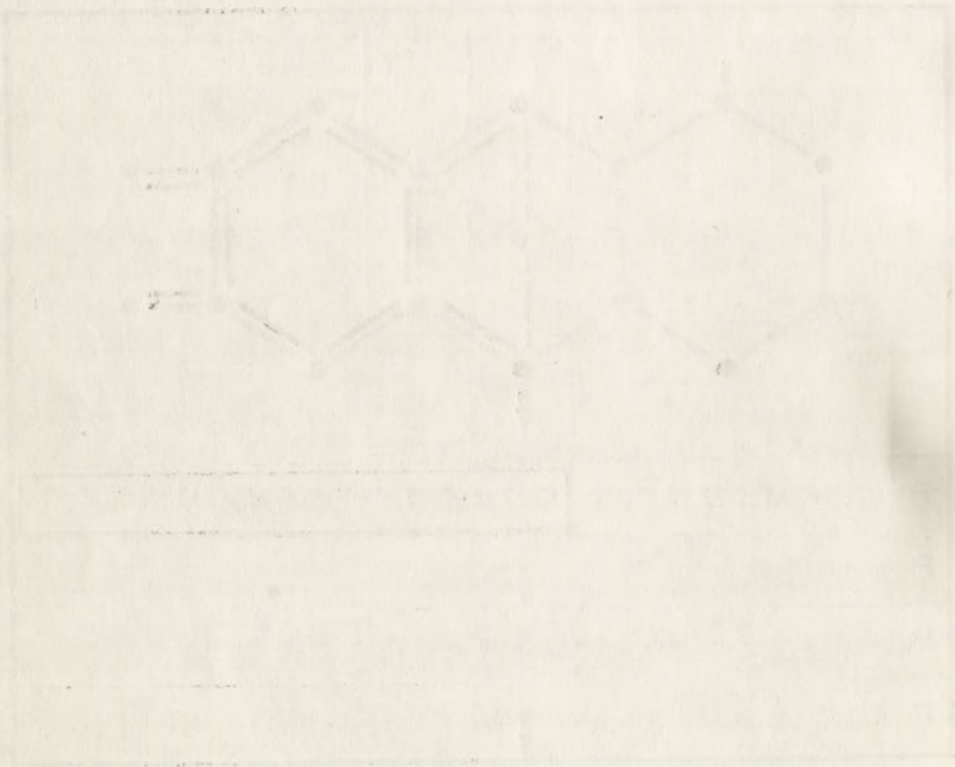


⊗ węgiel części imidazolowej puryn i dwumetylobenzimidazolu



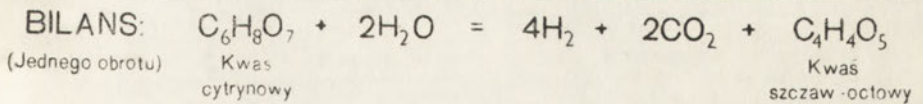
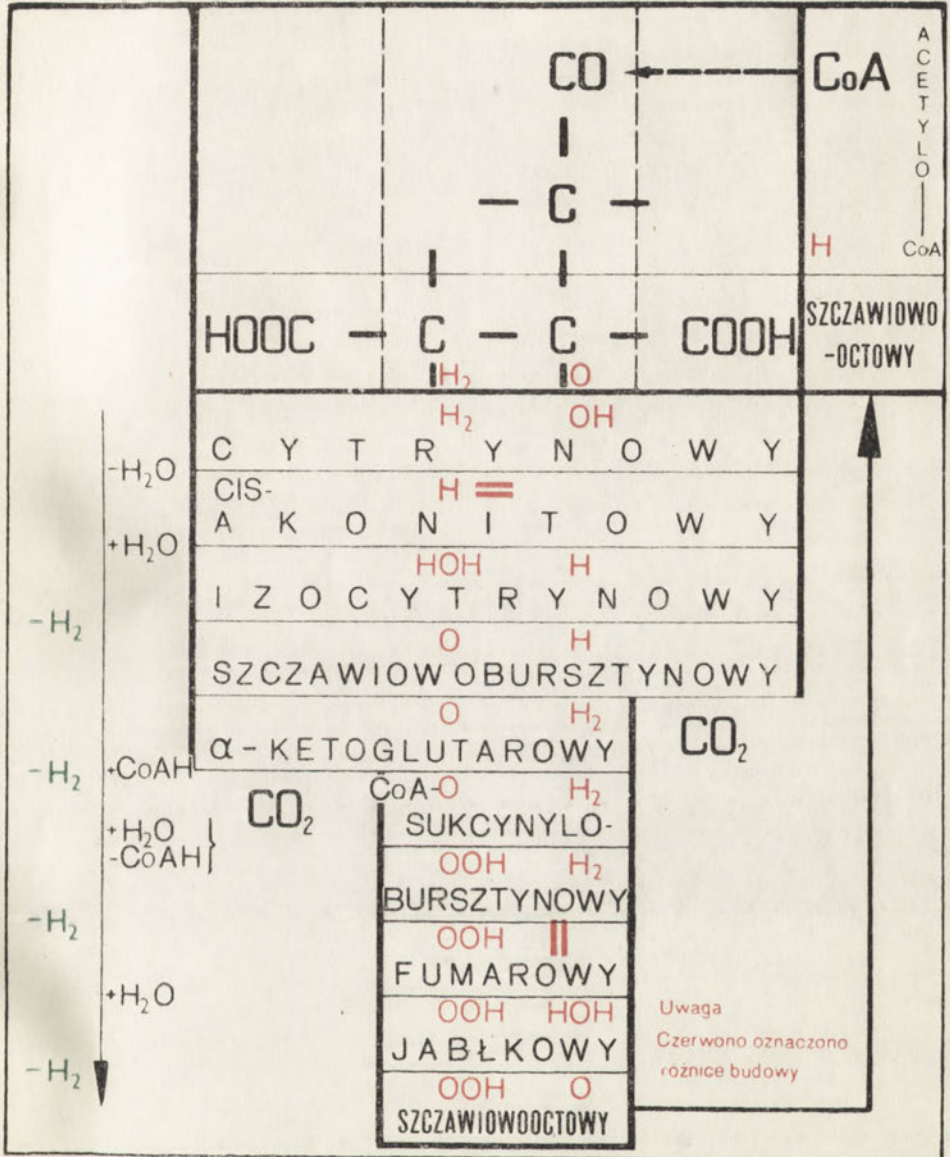
↓ miejsce przyłączenia C<sub>1</sub> { rybozy w nukleozydach  
rybitolu w ryboflawinie

Rys. 2





CYKL KWASÓW TRÓJKARBOKSYLOWYCH



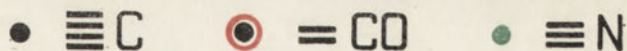
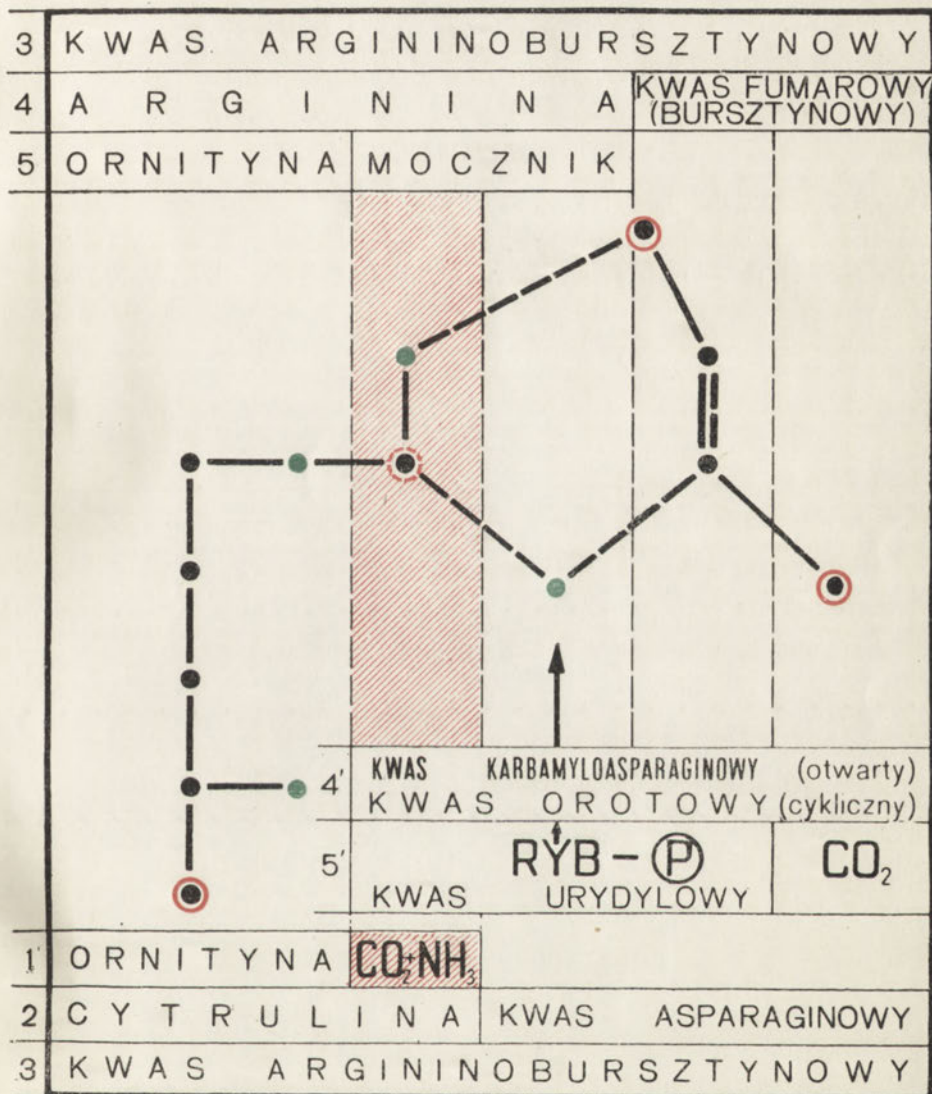
Rys. 3

<p>1</p>	<p>1</p>	<p>1</p>	<p>1</p>	<p>1</p>
<p>2</p>	<p>2</p>	<p>2</p>	<p>2</p>	<p>2</p>
<p>3</p>	<p>3</p>	<p>3</p>	<p>3</p>	<p>3</p>
<p>4</p>	<p>4</p>	<p>4</p>	<p>4</p>	<p>4</p>

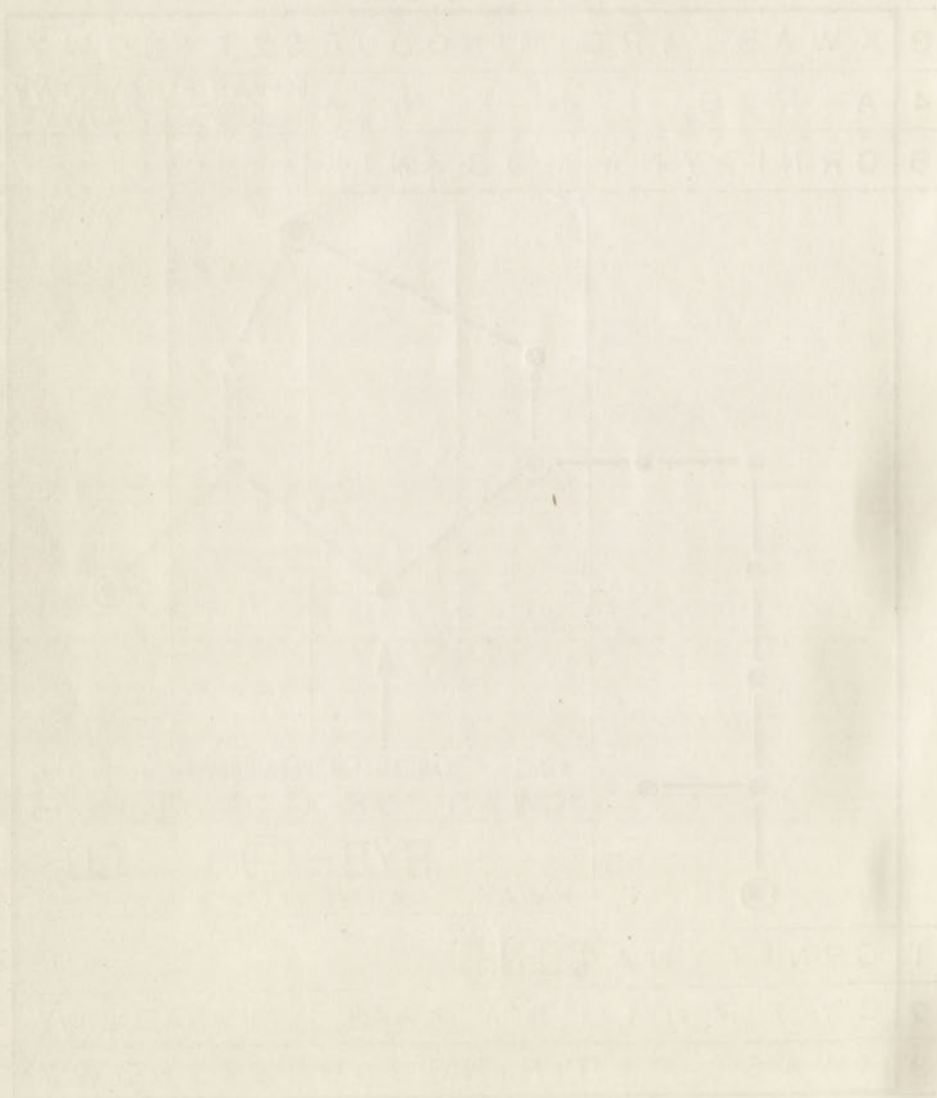
CYKL ORNITYNOWY, UREOGENEZA (1,2,3,4,5.)

I. BIOSYNTeza PIRYMIDYN (1,2,3,4',5')

(POWIĄZANIE)

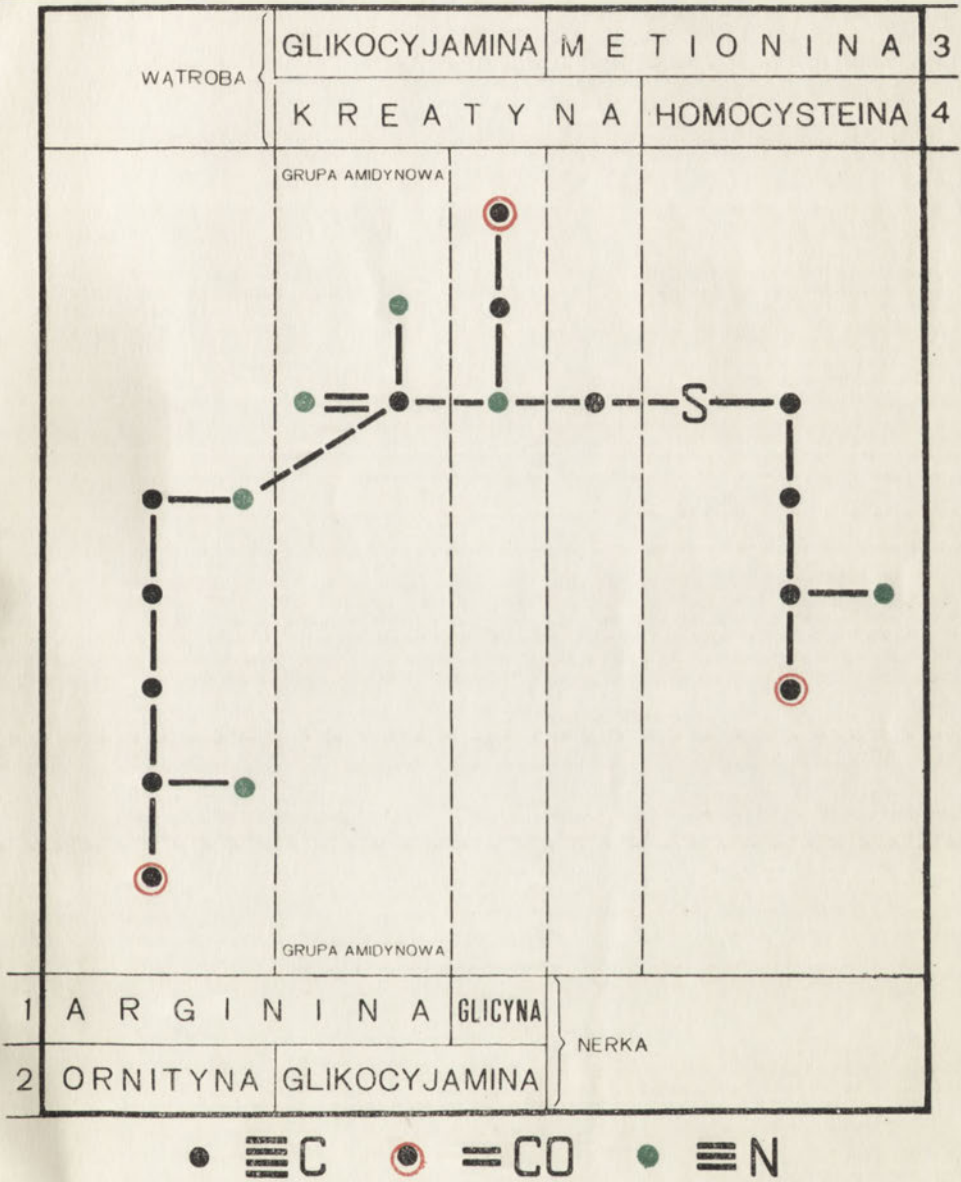


Rys. 4



# BIOSYNTETA KREATYNY

(1, 2, 3, 4)



Rys. 5

