

BIOLOGJA LEKARSKA

Wydawana pod kierunkiem Dr. S. OTOLSKIEGO

Rok XII. — Nr. 7

Listopad 1933

WEWNĄTRZKOMÓRKOWA PRZEMIANA CIAŁ AZOTOWYCH

podał

L. GENEVOIS

Profesor Chemji Biologicznej na Wydziale Przyrodniczym Uniwersytetu
w Bordeaux.

Treść:

- I. Wstęp.
- II. Teorja tworzenia się mocznika według Krebsa i Henseleita.
- III. Technika fizjologii komórki w związku z badaniem przemiany azotowej.
- IV. Udowodnienie doświadczalne, przy pomocy metod mikro-manometrycznych, teorji Krebsa i Henseleita.
 - 1° Swoistość tworzenia mocznika przez komórki wątrobowe.
 - 2° Własności i repartycja arginazy.
 - 3° Swoistość amoniaku, jako ciała tworzącego mocznik.
 - 4° Działanie katalityczne ornityny.
 - 5° Działanie cytruliny.
 - 6° Warunki fizjologiczne tworzenia się mocznika.
 - 7° Warunki fizykochemiczne tworzenia się mocznika.
- V. Dezaminacja kwasów aminowych w nerce, pod wpływem rozpuszczalnego zaczynu.

VI. Wnioski.

VII. Piśmiennictwo.

I. Wstęp.

W pracy niniejszej zapoznamy czytelnika z badaniami ostatnich czasów nad wewnątrzkomórkową przemianą azotową u kręgowców, zwłaszcza z mechanizmem tworzenia się mocznika w wątrobie oraz z dezaminacją kwasów aminowych w wątrobie i nerkach. W badaniach tych, dokonanych pod kierunkiem H. A. K r e b s a i jego uczniów, posługiwano się metodami i techniką stosowaną w fizjologii komórkowej.

Dotychczas nie posiadamy wyczerpujących danych o przemianie azotowej; Prof. D e l a u n a y z Bordeaux streścił dotychczasowe wiadomości, w artykule zamieszczonym w *Biological Reviews* w roku 1930, pod skromnym tytułem „L'azotique”. W pracy tej czytelnik znajdzie ogólny przegląd zagadnienia. Niżej podane badania były opublikowane po raz pierwszy w czerwcu i wrześniu 1932 roku.

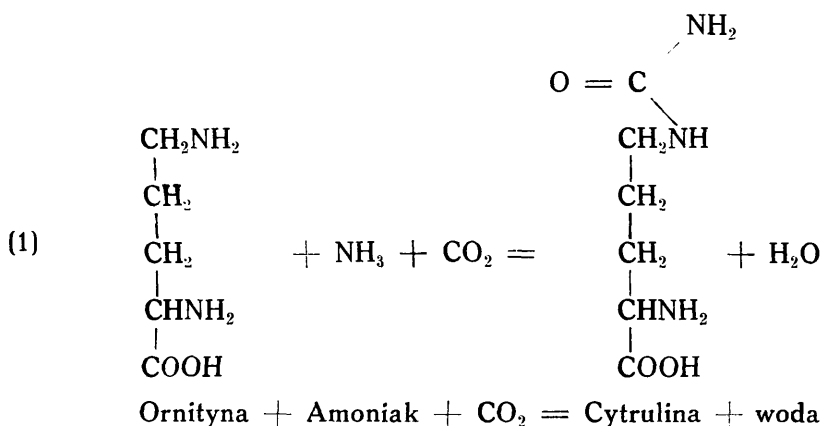
II. Tworzenie się mocznika w ustroju według teorii Krebsa i Henseleita.

Zdawna wiadomo, że głównym organem, w którym tworzy się mocznik jest wątroba. Tem niemniej niewiele doświadczeń stwierdza, że mocznik nigdzie po za wątrobą nie tworzy się, gdyż usunięcie tego organu jest zabiegiem niezmiernie złożonym, zazwyczaj kończącym się śmiercią. Nawet mechanizm tworzenia się mocznika jest hypotetyczny i podlega zastrzeżeniom. Zagadnienie to zostało wznowione przez H. A. K r e b s a i K. H e n s e l e i t a, z Uniwersytetu fryburskiego, przy pomocy techniki manometrycznej oraz badań zawieszonych części organów. H. A. K r e b s, długoletni współpracownik Prof. W a r b u r g a z Berlina, wykazał, że metody fizjologii komórkowej mogą służyć do rozwiązania zagadnienia przemiany azotowej oraz zagadnień przemiany glucydów.

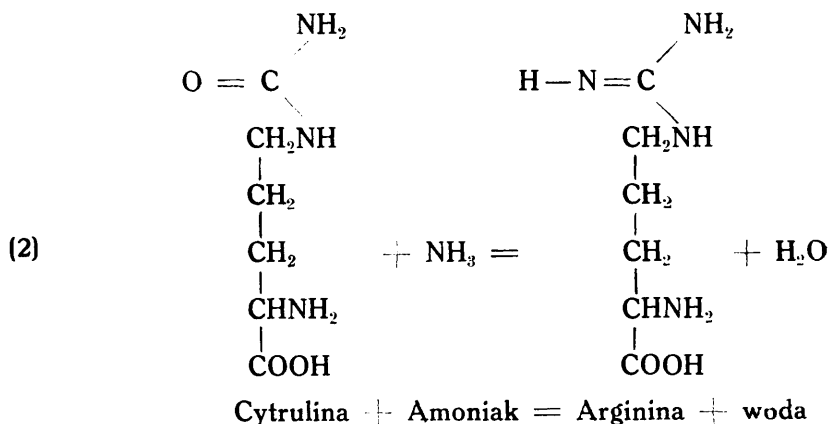
W. v. K n i e r i m (1874) i E. S a l k o w s k i (1877) wy-

kazali, że sole amonowe, wprowadzone do ustroju ulegają przy pomocy CO_2 , zawartego w surowicy krwi, przemianie na mocznik. Poczynając od tego czasu zagadnienie mechanizmu tworzenia się mocznika w ustroju nie postąpiło naprzód. Salkowski (1877) przypuszczał, zgodnie z syntezą Wöhlera, przejście procesu przez cjanek amonowy. Drechsel (1880), opierając się na doświadczeniach *in vitro*, wygłosił hipotezę przejścia procesu przez karbaminian amonowy. Ani jedna ani druga z tych hipotez nie została udowodniona. Metody fizjologii komórkowej, którymi posługiwali się Krebs i Henseleit szybko wyjaśniły powyższe zagadnienie. Poniżej podajemy teorię tworzenia się mocznika, proponowaną przez powyższych autorów. Udowodnienie tej teorii podamy w dalszym ciągu niniejszej pracy.

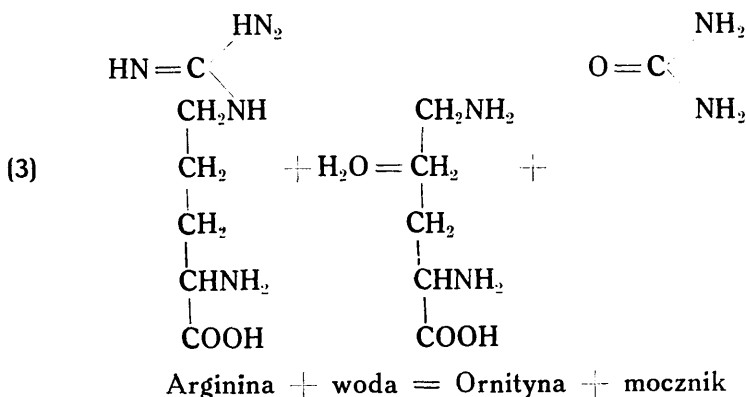
Synteza mocznika polega na połączeniu się jednej drobinu amoniaku z jedną drobiną CO_2 w grupie aminowej ornityny; jednocześnie następuje wydzielenie jednej drobinu wody i tworzenie się kwasu aminowego δ ureidowego, cytruliny:



Po tej pierwszej reakcji, idzie następna, która jest równie reakcją syntezy i dehydratacji. Jedna drobina cytruliny działa na nową drobinę amoniaku i tworzy jedną drobinę argininy i jedną drobinę wody.



Trzecia reakcja jest klasycznym odczynem hydrolizy argininy, przemieniającej się na ornitynę i mocznik przy udziale arginazy (Kosseli i Dakin, 1904), odgrywającej niezmiernie ważną rolę w przemianie komórkowej wątroby u ssaków.



Dwa pierwsze odczyny są nowymi. Sprawdzianem doświadczalnym powyższych schematów są następujące dowodzenia:

1°. Tylko tkanka wątrobowa może stworzyć mocznik z amoniaku i z CO_2 (doświadczenia ze szczurem, kotem i królikiem).

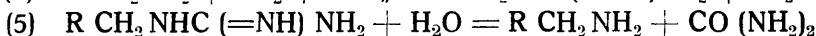
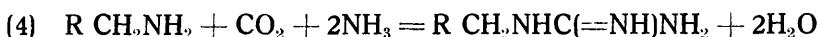
2°. Tylko wątroba ssaków zawiera dużą ilość arginazy (Edlbacher, 1927—1930). Inne tkanki zawierają jej 100

do 1000 razy mniej. Jedynie z argininy może powstać mocznik, i to w małych ilościach.

3°. Szybkość tworzenia się mocznika w skrawkach wątroby, w obecności karbaminianu amonu, lub różnych kwasów aminowych, przebiega daleko słabiej niż w obecności amoniaku. Cyjanek amonu tworzy mocznik jedynie kosztem grupy amonowej.

4°. Ornityna posiada specjalne działanie: przy nadmiarze amoniaku, zwiększa katalitycznie ilości utworzonego mocznika i to w stosunku 200 do 400 %. W obecności ornityny można uzyskać większe ilości mocznika od tworzonych normalnie, przewyższające niekiedy 30-krotną ilość mocznika odpowiadającą odnośnej ilości ornityny. Ornityna działa więc jako czynnik pośredni, stale powracający. Komórka wątrobowa jest niezmiernie wrażliwa na działanie ornityny. Stężenie 10 mg na litr zawiesiny wystarczy aby wywołać powyższy efekt katalityczny.

Dzięki ornitynie można sprawdzić, że z dwóch drobin amoniaku i jednej drobin CO_2 tworzy się jedna drobina mocznika, jak to potwierdzają reakcje 1, 2 i 3.



W pierwszej swojej notatce *Krebs i Hensleit* przypuszczali, że reakcja przebiega według wzorów 4 i 5, to jest bezpośrednia przemiana ornityny w argininę i hydroliza argininy. Dodanie do tkanki wątrobowej argininy daje taki sam efekt jak dodanie ornityny.

5°. Cytrulina przyspiesza bardziej niż ornityna tworzenie się mocznika w obecności amoniaku. Działanie cytruliny jest różne od działania ornityny: ciało to bierze udział w reakcji; doświadczalny bilans wskazuje, zgodnie ze wzorem (2), że dla utworzenia jednej drobin mocznika została zapożyczona jedna drobina amoniaku z roztworu i jedna drobina z cytruliny.

Tego rodzaju odczyny nieznane były dotychczas w żywej komórce. Tem nie mniej *Knoop* przypuszcza tworzenie się amino kwasów z keto kwasów przy pomocy kwasów imidowych, zbliżonych do cytruliny.

6°. *Krebs* wykazał, że dezaminowanie aminokwasów

następuje nietylko w wątrobie, jak dotychczas przypuszczano, lecz również i w nerce; dezaminowanie następuje przy jednoczesnem tworzeniu odnośnego kwasu α ketonowego. Deza-minowanie w nerce jest źródłem tworzenia się amoniaku moczu.

Oto całokształt niezmiernie ciekawych wyników; należy teraz wskazać, jakimi drogami doświadczalnymi twierdzenia te zostały uzyskane i przedyskutować teorię, posługując się danymi cyfrowymi.

III. Technika badań.

Technika podana przez K r e b s a jest znacznie łatwiejsza od techniki opisanej przez W a r b u r g a (*Métabolisme cellulaire et métabolisme des tumeurs*); metodę tę opiszemy dokładnie. Dla zapoznania się z zasadami pomiarów, czytelnika odsyłamy do wyżej podanej pracy W a r b u r g a. Poniżej czytelnik znajdzie przykłady metod stosowanych w fizjologii komórkowej, służących do uzyskania szybkich i precyzyjnych wyników.

TABLICA 1.

Skład rozczynu fizjologicznego K r e b s a.

Ciało	Średnie stężenie w surowicy ssaków	Nowy fizjologiczny rozczynek K r e b s a
Na +	320 mg %	327 mg %
K +	22	23
Ca ++	10	10
Mg ++	2,5	2,9
CC —	370	454
PO ₄ —	10	11
SO ₄ —	11	11,4
HCO ₃ —	54 obj. %	54 obj. %
CO ₂ (38°)	2,5 obj. %	2,5 obj. %
pH	7,4	7,4

K r e b s i H e n s e l e i t stale używali do swych doświadczeń skrawków tkanek, dokonanych przy pomocy brzytwy, grubości 0,3 do 0,4 mm. Grubszych skrawków należy unikać, gdyż część środkowa skrawka znajduje się w warunkach anaerobiotycznych, komórki części środkowej nie są w stanie rów-

nowągi dyfuzji, dostatecznie szybkiej ze środowiskiem bocz-
nem. Zagadnienie to było rozpatrywane i ustalone przez
O. Warburga (1928, A. V. Hilla (1930), O. Meyerhofa (1932). Należy również unikać skrawków cieńszych, gdyż
rozpadają się one pod wpływem koniecznego poruszania
naczynia. Uprzednie doświadczenia wykazały, że skraw-
ki zachowują się jak tkanka normalna; natomiast tkanka zmie-
lona zachowuje się inaczej i traci swe podstawowe własności.
Skrawki, pobrane z organów jeszcze ciepłych świeżo zabitego
zwierzęcia, przemywa się w roztworze fizjologicznym, przez
trójkrotne kolejne mieszanie w 20 cm³ roztworu fizjologicznego,
przy temperaturze pokojowej; zabieg trwa około 3 minut i ba-
dane tkanki nie mają czasu, aby ulec zmianom, natomiast mocz-
nik, który mógłby się znaleźć w tych tkankach, jest wydalony.
Tkanki przenosi się do roztworu fizjologicznego, gdzie
są następnie badane, w stosunku 3 do 8 mm. suchej tkanki
(15—40 mg świeżej tkanki) na 3 cm³ roztworu. Mamy więc
duży nadmiar roztworu tak, że można utrzymać podczas badań
względnie stałe stężenie drobin odżywczych (glikoza i amoniak)
i słabe stężenie drobin odpadowych (mocznik).

Krebs poświęcił dużo uwagi zestawieniu roztworu fizjo-
logicznego; podaje on nowy wzór, który odtwarza możliwie
najlepiej stężenie jonowe przeciętnej surowicy ssaków, zamiesz-
czone w tablicy 1.

TABLICA 2.

Sposób przygotowania roztworu fizjologicznego według Krebsa.

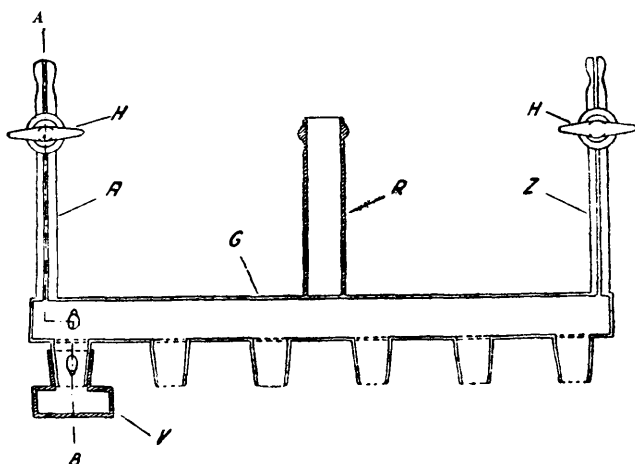
Stężenie drobinowe	S ó l	Używane stężenie	Objętości mieszaneek
0,154	NaCl	0,9 %	100
0,154	KCl	1,15 %	4
0,11	CaCl ₂	5 cm ³ = 11 cm ³ AgNO ₃ ^N ₁₀	3
0,154	PO ₄ KH ₂ (według Sörensen)		1
0,154	MgSO ₄ · 7H ₂ O	3,82 %	1
0,154	NaHCO ₃ nasyc. CO ₂	1,3 %	21
			130

Dla przygotowania roztworu fizjologicznego Krebs miesza izotoniczne roztwory różnych soli. Tablica 2 podaje skład tych roztworów izotonicznych. Po przygotowaniu roztworu należy go nasycić mieszaniną gazową w ilości 5% CO_2 . Roztwór przechowywany we flakonach zamkniętych może być konserwowany niezmiennie długo; pozostawiony otwarty, traci CO_2 , staje się bardziej zasadowy, mętny, strąca fosforan wapnia i fosforan magnezu. Strąt znika po przepuszczeniu przez mieszaninę 5% CO_2 . Wskazane jest przygotowanie codziennie świeżej mieszaniny.

W większości doświadczeń niezbędne jest dodanie glikozy: do roztworu dodaje się 4 cm^3 6%-wego roztworu glikozy, co stanowi około 2‰ glikozy i odpowiada stężeniu glukozy w surowicy krwi; można również rozpuścić 260 mg glikozy w 130 cm^3 pierwotnego roztworu.

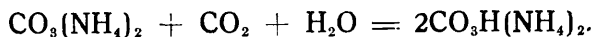
Cząsteczki różnych tkanek umieszcza się w zbiorniku, pojemności około 12 cm^3 , o płaskim kwadratowym dnie (Ryc. 2). Wobec tego, że przy tworzeniu się mocznika zbędne są pomiary, naczyńka w ilości 6-ciu naraz, są przyczepione do jednej i tej samej armatury ze szkła (Ryc. 1). Na początku doświadczenia przez aparat przepuszcza się przez przeciąg 10 minut prąd powietrza z dodaniem 5% CO_2 . Przez ten okres czasu zbiorniki są wstrząsane w termostacie przy 37° (Ryc. 3). Po tym czasie wstrzymuje się przepływ gazu i wstrząsa wszystkie zbiorniki w ciągu jednej lub dwóch godzin. Po upływie ustalonego czasu, aparat rozkłada się, skrawki tkanek szybko usuwa, przemyla wodą destylowaną, suszy i waży. Płyn w którym skrawki były wstrząsane, służy do określenia ilości mocznika i amoniaku.

Określenie ilościowe mocznika skutecznia się przy pomocy metody manometrycznej przez działanie ureazy na mocznik. Ilościowe określenie może być przeprowadzone dwoma różnymi sposobami, zależnie od tego czy mamy do czynienia z dwuwęglanami, np. $\text{pH} = 7,4$ lub też ze środowiskiem kwaśnym, nie zawierającym dwuwęglanów, np. $\text{pH} = 5$.



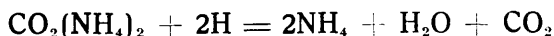
Ryc. 1. Przyrząd do seryjnego badania tkanki z punktu widzenia tworzenia mocznika. Skrawki tkanek są umieszczone w roztynie fizjologicznym w naczyniach, z których jedno figuruje na rysunku i jest oznaczone literą V; pozostałe 5 naczyń może być umieszczone i połączone z tym samym aparatem. G-rurka ze szkła (o przekroju 13 mm.) łącząca, przy obecności wszystkich naczyń, z dwiema rurkami włoskowatymi A i Z, zamkniętymi kranikami H. Przed rozpoczęciem badań przez aparat jest przepuszczany, w ciągu 5 minut, prąd powietrza z 5% CO₂, biegnącego od A do Z. Sześć naczyń swobodnie łączy się z główną rurą G. R — oznacza część potrzebną do przytrzymania aparatu.

W pierwszym przypadku mamy do czynienia z absorpcją CO₂ i utworzony węglan amonu przemienia się w dwuwęglan:

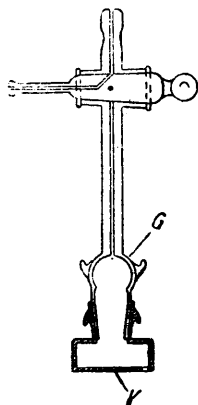


Równanie to ma miejsce o ile w środowisku nie ma innego kwasu, który mógłby się połączyć z węglanem amonowym, zwłaszcza fosforanu. Metoda ta nie może mieć zastosowania ani do surowicy, ani do krwi.

W drugim przypadku następuje wydzielanie się CO₂.



Drugi ten odczyn daje należyte wyniki, niezależnie od tego jaki kwas znajduje się w roztworze, pod warunkiem jednak, że stężenie jonów H jest dostateczne, aby dwuwęglany nie utworzyły się w roztworze. Dotyczy to przypadku, gdzie $\text{pH} = 5$, z tamponem kwasu acetylo octowego. Krebs tworzy ten tampon przez rozpuszczenie 27,2 g. octanu sodu ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) i 6 cm^3 kwasu octowego lodowatego w 100 cm^3 wody. Stężenie całkowite w jonach octanów jest około 3N, pH.



Ryc. 2.—Przyrząd z ryc. 1, pokazany pod kątem prostym. Rurka G łączy się ze zbiornikiem V, zawierającym skrawki badanych tkanek. Płyn, znajdujący się w miejscu V, jest w stanie równowagi gazowej z przestrzenią G, połączoną rurką włoskowatą, widoczną nad zbiornikiem G. G i V są połączone standaryzowanym stożkiem. Wielkość naturalna jest prawie trzykrotnie większa od rysunku. Zestawienie przyrządu nie pozwala na dokonywanie pomiarów podczas przebiegu reakcji. Pomiaru dokonane są po skończonej reakcji. (Obliczenie mocznika, amoniaku i aminokwasów).

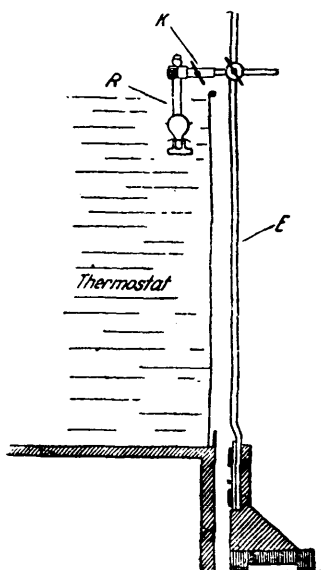
Przygotowanie ureazy nie natrafia na duże trudności; pomijając preparaty znajdujące się w handlu, które zawsze są czynne, ureazę można przygotować tanim sposobem z wyciągu ziarenek soi. Wyciąg uskutecznia się przez nalanie na 12 godzin czterokrotnie większej wagowo ilości wody na zmielone ziarenka, mieszaninę tę odwirowuje się i do roztworu dodaje 1/10 objętości powyższego odczynu octowego; tworzy się białawy strąt protein, który odwirowuje się w ciągu godziny. Uzyskany mętnawy płyn nadaje się do określenia mocznika. Przechowywany w lodówce nie traci wartości w ciągu ośmiu dni.

Miareczkowanie polega na zadziałaniu roztworu ureazy 0,3 N z tamponem octanowym, z roztworem badanym i zakwaszonym również 1/10 objętości tamponu octanowego. Mieszanina dwóch roztworów posiadających jednakowe pH wykazuje bardzo małe wahania parcia, o ile roztwór badany nie zawiera ureazy. Badanie uskutecznia się w specjalnych

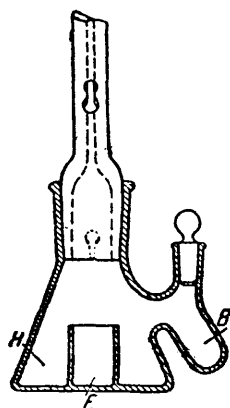
małych naczyńkach, stożkowatych, zawierających z boku małą ampułkę oraz naczynko pośrodku (Ryc. 4). Naczynko środkowe narazie nas nie interesuje (służy ono do umieszczenia produktu

absorbującego gazy, jak np. NaOH dla pochłonięcia CO_2 , jeżeli chcemy stwierdzić ilość zużytego tlenu).

Do owalnego głównego zbiornika wlewa się 3 cm^3 badanej cieczy i $0,3 \text{ cm}^3$ tamponu kwasu acetylo - octowego; do bocznej ampułki wlewa się $0,3 \text{ cm}^3$ ureazy. Naczynko stożkowate jest dopasowane do manometru płynnego (płyn Brodiego, zawierający 46 g NaCl w litrze wody oraz 5 g soli żółciowych, nasyconych tymolem *).



Ryc. 3.— Zestawienia przyrządu; ryc. 1 i 2 znajdują się wewnątrz termostatu. R, przyrząd, widoczny na ryc. 1, z widocznym niżej zbiornikiem V; E - podstawa, którą można wstrząsać w płaszczyźnie prostopadłej do rysunku. Manometr, widoczny na ryc. 5, jest w podobny sposób umieszczony w termostacie.

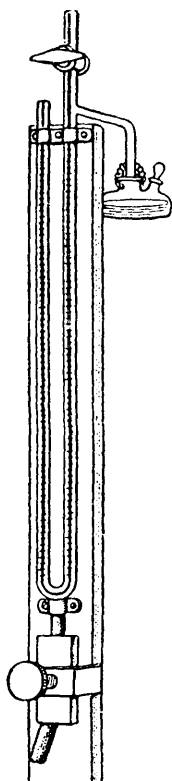


Ryc. 4.— Zbiornik walcowato-stożkowaty, służący do badań przemiany gazowej i mierzenia mocznika. W ostatnim przypadku ureazę (w ilości $0,3 \text{ cm}^3$) wlewa się do bocznej naczynka B, a badany roztwór (3 cm^3) do środkowej części naczynia H. W tych razach środkowego zagłębienia E nie używa się. Po uzyskaniu równowagi temperatury i ciśnienia w przyrządzie, zawartość naczynka B wlewa się do naczynia H. Przyrząd łączy się z manometrem, wyobrażonym na ryc. 5. Połowa wielkości rzeczywistej.

Całość układu, to jest zbiornik stożkowaty (ampułka boczna jest zamknięta szklanym przytartym korkiem) i manometr (którego kranik jest zamknięty tworzy przestrzeń zupełnie za-

*) Manometry stożkowate najczęściej stosowane wyrabia na zamówienie f-ma Rhône-Poulenc w Paryżu.

mkniętą (Ryc. 5). Zbiornik stożkowaty zanurza się do termostatu tak, aby manometr pozostał na zewnątrz (Ryc. 3). Za-



Ryc. 5.—Zbiornik do badań przemiany gazowej, połączony z manometrem umieszczony na deseczce. Zbiornik jest zanurzony do termostatu, przyczem manometr znajduje się nazewnątrz termostatu. (Porównaj ryc. 3). Śruba w dolnej części manometru służy do regulowania poziomu płynu w manometrze (określenia są dokonywane przy stałej objętości i zmiennem ciśnieniu. Wysokość manometru wynosi 300 mm.

wyczaj wystarczy pół godziny dla doprowadzenia ciśnienia w manometrze do stanu równowagi. Po ustaleniu parcia wylewa się ureazę z bocznej ampulki do przestrzeni okrągłej. Z tą chwilą rozwija się reakcja, którą po pół godzinie należy uważać za skończoną. Odczytuje się wówczas różnicę wysokości parcia. Różnica parcia pomnożona przez objętość gazu w zbiorniku (objętość gazowa więcej objętość płynu, pomnożona przez rozpuszczalność gazu w płynie), z uwzględnieniem poprawki ciepłoty, dają objętość w mm^3 sprowadzoną do 0° i 760 mm parcia wydzielonego gazu. W jednej serii badań, ciepłota i objętość płynu w zbiorniku są danymi ustalonymi i pozwalają na obliczenie tak zwanej „stałej zbiornika”, która pomnożona przez różnicę w parciu wykazuje objętość wytworzonego gazu. Wobec tego, że w przeciągu 30 minut zarówno ciepłota w termostacie jak i parcie barometryczne mogą ulegać pewnym zmianom, dla porównania sporządza się drugi aparat, którego zbiornik nie zawiera mocznika, znajduje się obok pierwszego i służy jako termobarometr. Dla przykładu podajemy, za K r e b s e m protokół doświadczenia, umieszczony w tabelicy 3-ciej.

Wahania objętości mierzy się ze ścisłością do 2 mm^3 , co przy całkowitej objętości, wynoszącej 200 mm^3 stanowi ścisłość z różnicą do 1%. Bardzo niewiele metod biologicznych, dających szyb-

kie wyniki jest bardziej ścisłych. Jeżeli określić mocznik przy pomocy metody xanthydrolowej, to należy zebrać, wysuszyć i zważyć ze ścisłością do 1% przesącz ogólnej wagi 3,5 mg, co wprawdzie nie nasuwa trudności, lecz jest zabiegiem bardzo delikatnym i wymaga posilkowania się mikrowagą specjalnie czułą na 1/100-ną mg. Z punktu widzenia manometrycznego ścisłość ta jest w przybliżeniu 10% w odniesieniu do ilości mocznika około 50 γ , nie dającą się określić na drodze wagowej. Posiadamy więc metodę dostatecznie ścisłą dla celów biologicznych, gdzie inne metody nie dają wyników. Wrażliwość metody można zwiększać niemal czterokrotnie, posługując się naczyniami bardzo małymi, których liczba stała wynosi nie więcej jak 0,3. Można wówczas określać ilości mocznika, wynoszące około 10 γ i stwierdzać nawet 1 γ mocznika. Wynika stąd, że metody manometryczne są 10—100 razy czulsze od metod wagowych, nawet przy użyciu najbardziej czułych wag mikrometrycznych. Metody te są również łatwiejsze od mikrometod wagowych.

Określenie amoniaku zostało uskutecznione według P a r n a s a (1924, 1926), przy pomocy przedestylowania i schwywania amoniaku w roztworze kwaśnym. Małe ilości amoniaku (1 do 10 γ) łatwo można określić na drodze kolorymetrycznej, przy pomocy odczynnika Nesslera; większe ilości można określić miareczkowo. Wynika stąd, że jedynie metody kolorymetryczne mogą rywalizować pod względem czułości z metodami manometrycznymi.

Amoniak został wprowadzony do środowiska pod postacią 1%-wego roztworu, czyli 1,2 cm³ — 1,8 roztworu w 100 cm³ płynu fizjologicznego; końcowe stężenie wynosiło więc 120, względnie 180 miligramów amoniaku w litrze.

W wielu wypadkach ciekawe jest określenie nie tylko tworzenia się mocznika, lecz i nasilenia oddechu, t. j. ilości pochłoniętego tlenu i wydzielonego CO₂. Pomiaru te były uskutecznione według metod W a r b u r g a. Należy podkreślić, że jeżeli natężenie tworzenia się mocznika jest znaczne, to, aby uzyskać liczbę CO₂ faktycznie utworzoną podczas wydechu, należy od całkowitej liczby CO₂ odjąć liczbę CO₂, odpowiadającą rozkładowi dwuwęglanów:



Tak utworzone CO_2 może być w ilości nieco większej od CO_2 wydechowego. Błąd może być duży, jeżeli brać pod uwagę, że cała ilość CO_2 wydzielonego jest pochodzenia wydechowego.

TABLICA 3.

Działanie ureazy na wiadomy roztwór mocznika.

Szczegółowy protokół przebiegu doświadczenia (Krebs i Henseleit 1932).

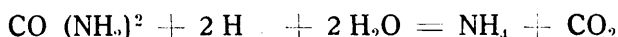
Ciepłota $37,5^\circ$. Środowisko gazowe: powietrze. Zbiornik walcowo - stożkowy.

	Naczynie 1 Termobarometr	Naczynie 2 Doświadczenie
Główna, owalna } przestrzeń } Boczna ampulka }	3 cm ³ H ₂ O 0,3 octanu pH = 5,0 0,3 ureazy pH = 5,0	3cm ³ H ₂ O+0,489mgmocznika 0,3 octanu, pH = 5,0 0,3 ureazy, pH = 5,0
Objętości roztworów . . . atmosfery . . . Stała naczynia dla CO ₂	3,6	3,6 12,47 1,289
Różnice ciśnienia po 10 min. mieszaniu 20 " " 50 " "	— 0,5 — 2,5 — 8,0	Brutto po poprawce termo-baromet. + 104 + 104,5 + 144 + 136,5 + 132 + 140
CO ₂ mocznika w mm ³ Mocznik w mg . .		$1,289 \times 140 = 180,5$ $180,5 \times 2,69 \cdot 10^{-3} = 0,487$

Lepiej jest wyrazić wyniki otrzymane przy określaniu przemiany wewnątrzkomórkowej, przy pomocy prawideł podanych przez Warburga i wielu innych autorów (patrz „Meta-

bolisme et fonctions des cellules"), w objętościach gazowych (sprowadzonych do 0° C. i 760 mm), podzielonych przez wagę suchej tkanki oraz czas, wyrażony w godzinach; utrzymuje się tym sposobem godzinne natężenie przemiany materji w mm³ na mg suchej substancji (lub cm³ na gramy, lub litry na kg suchej substancji).

Przemiannę mocznika wyraża się w ilości CO₂, wydzielonego w stosunku 1 drobiny CO₂ na 1 drobinę mocznika:



Racjonalniej jest określić natężenie tworzenia się mocznika przy pomocy następującego wzoru:

$$I_u = \frac{\text{CO}_2 \text{ mocznika w mm}^3}{\text{sucha substancja w mg} \times \text{godziny}}$$

Liczby te są proporcjonalne do liczby zniszczonych drobin i bezpośrednio mogą być porównane do natężenia oddychania I_{O_2} lub też do fermentacji F_{CO_2} lub F_L ; liczby równe oznaczają jednakową ilość drobin tlenu, alkoholu, kwasu mlekowego lub mocznika. Wiadomo, że jedna drobina gazu odpowiada 22.412.000 mm³, posługując się regułą trzech, można określić masę ciał stałych, biorących udział w reakcji.

W przypadku z mocznikiem:

$$1 \text{ mg mocznika} = \frac{2,24}{6,0} \frac{10^7}{10^4} = 373 \text{ mm}^3$$

$$1 \text{ mm}^3 \text{ CO}_2 = \frac{1}{373} = 2,67 \cdot 10^{-3} \text{ mg mocznika.}$$

Szybkość znikania amoniaku można wyrazić następującym wzorem:

$$I_{\text{NH}_3} = \frac{\text{mm}^3 \text{ NH}_3 (0^\circ, 760)}{\text{sucha substancja w mg} \times \text{godziny,}}$$

biorąc pod uwagę, że $2I^{NH_3}$ odpowiadają jednemu I_U , w przypadku gdy mocznik jest całkowicie utworzony kosztem amoniaku, zawartego w roztworze. Stosunek NH_3 do I_U raz jest niższy, raz wyższy od 2.

IV. Udowodnienie doświadczalne teorii Krebsa i Henseleita przy pomocy mikrometod manometrycznych.

1) Swoistość tworzenia się mocznika w wątrobie.

Jeżeli wstrząsać w ciągu dwóch godzin skrawki wątroby w wyżej opisanym roztworze fizjologicznym, do którego dodano 120 mg NH_3 na litr, pod postacią NH_4Cl , to amoniak z roztworu znika i powstaje mocznik.

Natężenie tworzenia się mocznika jest zależne od przypadku; I_U może wynosić od 1,2 do 6; średnia z 20 określeń wynosiła 3,04. Przy powtarzaniu określeń z różnymi częściami tej samej wątroby, liczby są bardzo różne, zazwyczaj wyższe od przypuszczalnych błędów doświadczalnych. Oznacza to, że wątroba nie jest organem jednolitym, że różne części jej są mniej lub więcej czynne. Zależnie od osobników, spotyka się wątrobę mniej lub więcej bogatą w zaczyny, zawierającą większe lub mniejsze ilości rezerw. Tłumaczy to wahania uzyskane przy badaniu wątroby różnych osobników. Natężenie spada bardzo wyraźnie, jeżeli zwierzę uprzednio było głodzone w ciągu 24—48 godzin. W tablicy 4 podane są wyniki doświadczeń K r e b s a, dokonanych w warunkach bardzo podobnych. Przy średnim natężeniu, wynoszącym dla zwierząt normalnych 3,04, liczba ta spada do 1,58 dla zwierząt (szczury) uprzednio głodzonych w przeciągu 24 godzin. Nie należy zapominać, że dla tych zwierząt okres 24 godzin odpowiada okresowi 8 do 15 dni dla człowieka. Przy I_U równym 3, ilość mocznika na 1 mg suchej substancji i na godzinę wynosi 8γ. Wynika stąd że wątroba szczura tworzy na godzinę około 1% mocznika w stosunku do swej wagi, a w ciągu doby $\frac{1}{4}$ mocznika w stosunku do swej wagi. Przemiana ta posiada te same cechy co fermentacja mlekowa, określana anaerobiozą (F_L od 2 do 5) i nieco słabsza od natężenia oddechowego (I_{O_2} od 7 do 15).

TABLICA 4.

Wpływ stanu odkarmiana jednostki na tworzenie się mocznika. Skrawki tkanek są umieszczone w roztworze fizjologicznym K r e b s a, zawierającym amoniak w stężeniu 120 mg/litr.

Pomiary K r e b s a i H e n s e l e i t a, 1932.

Zwierzęta karmione				Głodzone 24 g.		Głodzone 48 g.	
Nr.	I _U	Nr.	I _U	Nr.	I _U	Nr.	I _U
1	1,19	10	2,91	1	1,13	9	0,96
2	1,31	12	3,49	3	1,27	10	1,50
3	1,80	14	3,76	4	1,39	11	1,54
4	1,95	16	4,11	5	1,57	12	1,55
6	2,16	17	4,21	7	1,90	13	2,18
8	2,55	19	5,98	8	2,23	14	2,62
Średnio: 3,04				Średnio: 1,58			

Trzecia część, a nawet czwarta, CO₂ utworzonego w czasie wydechu, może być przemieniona na mocznik; dalej zobaczymy, że można zwiększyć natężenie tworzenia się mocznika do takiego stopnia, że większa część CO₂ wydechowego może być przemieniona, w miarę tworzenia się, na mocznik i wówczas I₀ i I_U wynoszą od 10 do 22 (patrz tablicę 16).

Jednocześnie określenia ilości ginącego amoniaku i powstającego mocznika wskazują wyraźnie na katalityczny charakter tworzenia się mocznika, przyczem współczynnik:

$$\frac{\text{Ginące drobiny NH}_3}{\text{Tworzące się drobiny mocznika}} = \frac{I_{\text{NH}_3}}{I_U}$$

jest zazwyczaj większy od 2, co oznacza, że wątroba asymiluje amoniak przy pomocy innych jeszcze odczynów.

Tablica 5 wskazuje, że po 48 godzinnem głodzeniu tworzenie się mocznika zmniejsza się, podczas gdy asymilacja amoniaku jest stała oraz, że stosunek

$$I_{\text{NH}_3} \text{ do } I_U \left(\frac{I_{\text{NH}_3}}{I_U} \right) \text{ zwiększa się do 11.}$$

Odwrotny przypadek, gdzie stosunek jest mniejszy od 2, jest łatwiejszy do wyjaśnienia: wątroba zużywa część amoniaku do dezaminacji swej własnej substancji.

TABLICA 5.

Tworzenie przez skrawki tkanek mocznika z amoniaku.

Pomiary Krebsa i Henseleita, 1932.

Nr.	Subst. sucha w mg.	Stan osobnika	I_U	I_{NH^3}	$\frac{I_U}{I_{NH^3}}$
1	11,56	Karmiony	4,84	—11,4	—2,38
2	7,20	—	5,84	— 9,5	—1,63
3	15,07	Głodzony 24 g.	2,23	— 5,24	—2,18
4	8,30	Głodzony 48 g.	0,98	— 9,40	—9,59

Duża ilość ciał azotowych nie wpływa na szybkość tworzenia się mocznika; dotyczy to większości kwasów organicznych: kwasu mrówkowego, masłowego, walerjanowego, bursztynowego, malonowego i cytrynowego, wielowartościowych alkoholów, jak gliceryna, cukrów niepodlegających fermentacji, jak sorboza.

Cukry podlegające fermentacji, jak glikoza i lewuloza oraz ich pierwsze produkty fermentacji: laktat, pyrogronian, zwiększają siłę tworzenia się mocznika z 25 do 75%; zwiększenie występuje zawsze przy stosowaniu komórek zwierząt zabitych po 24 lub 48 godzinnem głodzeniu, posiadających zapasy glikogenu; może ono nie występować w komórkach zwierząt odżywianych normalnie. Jest to powszechna „inanicja komórkowa”, nie będąca cechą swoistą ani komórki wątrobowej, ani tworzenia się mocznika. Przemiana komórkowa zależy wogóle od stężenia drobin odżywczych w danym środowisku oraz od odżywczych zapasów swoistych dla każdej komórki. Lewuloza i pyrogronian naogół zwiększają bardziej I_U niż glikoza i mleczan, aczkolwiek fakt powyższy nie jest stały i zupełnie pewny.

Najważniejsze doświadczenia były dokonane z tkankami szczura; doświadczenia te były powtórzone z tkankami królika i kota, a uzyskane wyniki były zbieżne.

Do badania poszczególnych tkanek bardzo nadają się metody manometryczne: nerka, śledziona, mięsień, mózg, jądra, białe ciała krwi, czerwone ciała krwi, szpik kostny, płuca, gruczoły podszczękowe, trzustka, śluzówka jelit, grasica, siatkówka, łożysko, kosmówka, nie tworzą mocznika w ilości wymiernej. Wyżej stwierdziliśmy, że wątroba wytwarza około 10% mocznika z 1 mg suchej substancji na godzinę; przy użyciu 10 mg tkanki i obserwacji dwugodzinnej, tworzy się 200% mocznika. Przy pomocy metod manometrycznych można wykryć i stwierdzić 2% mocznika. Można więc powiedzieć, że wyżej wyliczone tkanki w jednakowych warunkach tworzą co najmniej 100 razy mniej mocznika niż wątroba.

Tworzenie się mocznika zależy w zupełności od nienaruszalności i całości komórek wątrobowych; miazga z tkanki wątrobowej nie posiada własności tworzenia mocznika. Z tej też racji maszyny do miażdżenia, typu *L a t a p i e* nie są wskazane i nie należy ich używać przy badaniu przemiany wewnątrz komórkowej. Skrawek tkanki i miazga tkankowa są dwiema rzeczami zupełnie odmiennymi.

Tworzenie mocznika jest własnością swoistą komórek wątrobowych ssaków, związaną z budową komórki.

2) Własności i repartycja arginazy.

Arginazę wykryli w roku 1904 *K o s s e l* i *D a k i n* w wątrobie ssaków. Ferment ten nie jest związany z budową komórkową. Miazga komórek wątrobowych przemienia argininę w ornitynę na równi ze skrawkami.

Według *E d l b a c h e r a*, który dużo na ten temat pracował, arginazę przygotowuje się w następujący sposób: cielecą wątrobę rozciera się i miesza z krzemionką w ilości dostatecznej dla utworzenia miękkiego ciasta i masę tę poddaje się działaniu prasy *B u c h n e r a*, przy ucisku dochodzącym do 300 atmosfer. Wyciekający jasny płyn chwyta się do 10-krotnie większej objętościowo ilości acetonu, przy ciągłym poruszaniu. Tworzący się osad przemywa się szybko trzy razy acetonem, poczem suszy w próżni nad kwasem siarkowym. W ten sposób otrzymuje się proszek, który można przechowywać w ciągu wielu miesięcy. Dla utrzymania roztworu arginazy, miesza się 1 g powyższego proszku ze 100 cm³ wody, pozostawia na 12 godzin pod warstwą toluenu

w termostacie przy 38° C., dla przetrawienia, poczem zlewa się i przesącza. W ten sposób otrzymany zaczyn komórkowy, którego przygotowanie nie natrafia na duże trudności, może być przechowywany. Zaznaczmy jednak, że glicerynowe wyciągi wątroby są również czynne *).

W ślad za podstawowymi pracami Kossela i Dakina, prace z arginazą zostały powtórzone przez Huntera i Dauphinee w Anglii, Clementi we Włoszech i Edlbachera i jego uczniów, w Niemczech. Ten ostatni autor wraz ze swymi uczniami określił ilość arginazy w różnych organach zwierząt ssących i ptaków. Tablica 6 zawiera powyższe dane, przeliczone przez Krebsa na I_U , tak że można je porównać z innymi danymi, zamieszczonymi w tej pracy. Z tablicy powyższej wynika, że jedynie wątroba ssaków zawiera dużą ilość arginazy; wątroba ptaków, prawie że jej nie zawiera; z innych organów, zaledwie nerka i jądra zawierają małe jej ilości. Większość gruczołów, tkanek mięśniowych nie zawiera arginazy.

TABLICA 6.

Natężenie tworzenia się mocznika z argininy (działanie arginazy) w różnych tkankach.

Pomiary Edlbachera i współpracowników, przeliczone przez Krebsa i Henseleita, 1932.

Narząd	Rodzaj zwierzęcia	I_U	Narząd	Rodzaj zwierzęcia	I_U
Wątroba	Kot	2600	Sledziona	Szczur	0
	Świnka morska	4000	Jajnik	"	0
	Mysz	4400	Tarczycza	"	0
	Szczur	2000	Trzustka	"	0
Nerka	Kogut	3	Serce	"	0
	Szczur	67	Krew	"	0
	Kogut	36	Mięsień	Świnka morska	0
	Świnka morska	34	Tkanka rako-	Mysz	0
Jądro	Szczur	6	wata		
	Kogut	13			

*) Odnosne wyciągi glicerynowe z wątroby oraz innych organów dla celów doświadczalnych i opoterapeutycznych przygotowują w Polsce Przem. Handl. Zakł. Chem. Ludwik Spiess i Syn. (Przyp. red.).

Wydzielanie mocznika jest własnością swoistą, wyłącznie zwierząt ziemnych: *sauropsidea*, będące poczęści ptakami, poczęści zaś stworzeniami wodnymi, wydzielają mocznik, o ile nie wydzielają soli amonowych, jak aligator. Bezkęgowce wodne zarówno morskie jak i słodkowodne wydzielają bardzo mało lub nawet nie wydzielają mocznika; u bezkręgowców wodnych, na wyższym szczeblu organizacji, przeważa wydzielanie amoniakalne, spostrzega się to zwłaszcza u głowonogów, skorupiaków i pijawek (D e l a u n a y, 1927). Natomiast u mięczaków ziemnych i u ślimaków, a zwłaszcza u ślimaków nagich, spotyka się silnie zaznaczone wydzielanie mocznika; ślimak nagi 70% swego azotu wydziela pod postacią mocznika, tak jak to spotyka się u ssaków (D e l a u n a y, 1925). Niezmiernie ciekawe jest zestawienie spostrzeżeń dotyczących mocznika, z faktami dotyczącymi arginazy. C l e m e n t i, H u n t n e r i D a u p h i n e e, nie znaleźli arginazy u bezkręgowych morskich (kraby i rozgwiazdy), natomiast C l e m e n t i stwierdził obecność arginazy u ślimaka. Powyższe dane fragmentaryczne nie przeczą pojęciu ureogenezy, związanej z obecnością arginazy. Drobną cząstka mocznika, jaką stwierdza się zawsze u bezkręgowych morskich może pochodzić z innego źródła. Od czasu prac L o h m a n n a i M e y e r h o f a (1927) wiadomo, że arginina jest bardzo rozpowszechniona u bezkręgowych, gdzie znajduje się pod postacią kwasu argininowo-fosforowego (patrz w tej sprawie u M e y e r h o f a, 1932), i pod tą postacią odgrywa ona poważną rolę w skurczu mięśniowym.

W roślinach mocznik spotyka się w wielu odmianach. W pierwszym rzędzie znajduje się on w grzybach, gdzie może dochodzić, jak np. w grupie *licoperdaceae*, do 10% wagi suchej substancji (B a m b e r g e r i L a n d s i e d l, 1903, 1906, G a z e, 1903, G o r i s, M a s c r é, 1908, 1911). F o s s e stwierdził obecność mocznika w wielu nasionach (1912, 1913). I w a n o w podał ostatnio szereg odnośnych spostrzeżeń (1923), potwierdzonych przez G o r i s a i C o s t y (1922).

Arginaza znajduje się również w wielu roślinach. S h i g a odkrył ją w roku 1904, K i e s e l (1911, 1922) opublikował monografię, poświęconą argininie i arginazie w roślinach. Możliwe więc, że podany przez K r e b s a mechanizm tworzenia się mocznika u ssaków jest taki sam i u roślin; zagadnieniem fizjologii ko-

mórkowej jest wykazanie zbieżności i wspólnoty mechanizmów u różnych istot żywych.

3°. *Swoistość amoniaku, ciała moczniko-twórczego.*

R. F o s s e stwierdził, że raptowne utlenienie na zimno, a nawet i na gorąco, przy pomocy nadmanganianu potasu w proszku, rozpuszczającego dużą ilość zwykłych drobin organicznych, jak: glikozę, glicerynę, alkohol metylowy, alkohol etylowy, fenol, aldehyd mrówkowy, w obecności soli amoniakalnej ma własność tworzenia mocznika w ilościach zależnych od danego ciała, lecz zazwyczaj w dużych ilościach. Z powyższego F o s s e wyprowadza wniosek, że „zjawisko oksydacji jest tworzywem syntezy”. Należy podkreślić łatwość z jaką można uzyskać mocznik *in vitro* przez utlenienie różnych ciał, z pośród których najbardziej czynnym jest aldehyd mrówkowy. Nie trzeba jednak zapominać, że u istot żywych, mechanizm syntezy jest bardziej określony i bardziej szczegółowy niż raptowne utlenienie.

Za zwiastunów tworzenia się mocznika w ustroju uważano dwa ciała: cyjanian amonowy $\text{NH}_4 \cdot \text{OCN}$ i karbaminian amonu. $\text{O}=\text{C} < \text{O.NH}_2.\text{NH}_4$ Hipoteza cyjanianu amonowego była przedstawiona w sposób wyłącznie spekulatywny przez D u m a s a i C a h o u r s a w r. 1832; S a l k o w s k i w r. 1877 i H o p p e S e y l e r w 1881 r. wznowili powyższą hipotezę. H o f m e i s t e r (1896) daremnie szukał kwasu cyjanowego w miazdze wątrobowej. Kwas cyjanowy doświadczalnie dodany do wątroby, był znaleziony nienaruszony przy końcu doświadczenia, z czego wynika, że wątroba nie posiada własności przemieniania i tworzenia cyjanu. N i c l o u x i W e l t e r szukali w roku 1922 kwasu cyjanowego we krwi, przy pomocy metod niezmiernie czułych i nie stwierdzili jego obecności. Obecnie biochemicy, prawie jednoznacznie stwierdzają, że cyjanian amonowy nie gra roli w tworzeniu mocznika lub innych ciał azotowych ustroju. Hipoteza kwasu karbaminowego $\text{CO}_2.\text{HNH}_2$, została podana przez D r e c h s e l a (1880) i potwierdzona przez licznych autorów, bez dostatecznego jej udowodnienia.

K r e b s i H e n s e l e i t wznowili, posługując się swą ele-

gancką i szybką metodą, zagadnienie pochodzenia mocznika i stwierdzili, że z cyjanków nie można wyprowadzić mocznika. Przy próbie badania komórek wątroby zanurzonych w roztworze fizjologicznym mleczanu, ornityny i soli amoniakalnych, w środowisku fosforowem, wytwarzanie się mocznika jest niezmiernie słabe, w związku z niewielką ilością dwuwęglanu sodu, zawartego w danym środowisku. Dodanie cyjanku amonu nie zwiększa ilości wytwarzającego się mocznika; natomiast po dodaniu dwuwęglanu sodu ilość mocznika zwiększa się trzykrotnie. Wynika stąd, że wątroba wytwarza mocznik kosztem dwuwęglanu amonu, a nie kosztem cyjanku amonu. Jako źródło azotu był używany karbamid amonu: zachowuje się on jak dwuwęglan amonu, gdyż pod wpływem ciepłoty, pH i odnośnego ciśnienia CO_2 występującego podczas doświadczenia, karbamid amonu przemienia się na dwuwęglan amonu.

Wypróbowano również szereg innych ciał, w środowisku pozbawionem soli amoniakalnych, z myślą zużycia ich jako źródła azotu dla mocznika; metylamina CH_3NH_2 , cyjanamid $\text{CN}\cdot\text{NH}_2$, dwucyjanamid $(\text{CN}\cdot\text{NH}_2)_2$, dwucyjandwuamidyna $(\text{CN}\cdot\text{NH}_2\text{OH})_2$. Wszystkie te ciała nie są w stanie wytworzyć mocznika, a raczej mocznik tworzy się wolno, co najmniej sto razy wolniej niż przy użyciu dwuwęglanu amonu.

Kwasy amonowe wytwarzają mocznik daleko wolniej niż dwuwęglan amonu. Przy jednoczesnym użyciu ich z dwuwęglanem amonu nie wykazują żadnego działania, za wyjątkiem ornityny, argininy, cytruliny, o których wyżej wspominaliśmy. Dotychczas badano następujące kwasy aminowe i aminy: glicyna, alanina, walina, leucyna, dwucysteina, asparagina, kwas asparaginowy, kwas glutaminowy, fenyloalanina, tyrozyna, putrescyna, kadaweryna, lizyna, kreatyna, guanidyna, cholina, tryptofan, histydyna. W spisie tym uderza homologiczny związek ornityny; lizyna, która różni się tylko od poprzedniego związku, że drobina jej zawiera o jedną grupę CH_2 więcej. Kreatyna jest prawie homologicznym związkiem do argininy. Z powyższego wynika, swoistość soli amoniakalnych jako źródła azotu oraz swoistość katalityczna układu ornityny, cytruliny i argininy. Poniżej przytoczymy kilka szczegółów doświadczalnych, dotyczących tego zagadnienia.

TABLICA 7.

Tworzenie się mocznika przy pomocy skrawków wątrobowych, bez obecności amoniaku, z dodaniem oraz bez ornityny. (Krebs i Henseleit, 1932).

Nr.	Bez ornityny	1 g/litr ornityny
1	0,12	0,45
3	0,20	0,60
4	0,26	0,34

4) Katalityczne działanie ornityny.

Zasługę odkrycia działania katalitycznego ornityny, będącego podstawą teorii, należy przypisać Krebsowi i Henseleitowi. Wyżej widzieliśmy, że duża ilość ciał, zarówno azotowych jak i nieazotowych, posiadających jakoby własność wpływania na tworzenie się mocznika, własności tych w rzeczywistości nie posiada. Heksozy fermentacyjne oraz produkty ich kwaśnego zdwojenia posiadają wpływ bardzo słaby. Natomiast działanie ornityny jest wyraźne. Działanie to można podzielić na 6 punktów:

a) dodanie ornityny, bez amoniaku, zwiększa nieznacznie tworzenie się mocznika;

b) dodanie ornityny do środowiska posiadającego amoniak, bez innej drobin organicznej, zwiększa prawie dwukrotnie ilość wytworzonego mocznika;

c) dodanie ornityny do środowiska, zawierającego glikozę, lewulozę, potraja ilość wytworzonego mocznika;

d) największa ilość mocznika występuje w obecności mleczanu, niezależnie od poprzedniego stanu odżywiania się osobnika;

e) największa ilość mocznika jest niezależna, w ogólnych zarysach, od ilości dodanej ornityny, przyczem ilość drobin mocznika, wytworzonego z czasem wzrasta w stosunku do ilości drobin ornityny, zawartej w środowisku.

TABLICA 8.

Tworzenie mocznika przez skrawki wątroby, w obecności 120 lub 180 mg NH_3 na litr, z ornityną lub bez niej (Krebs i Henseleit, 1932).

Nr.	Stan osobnika	I_U		
		Stężenie ornityny		
		0	1 g./litr	2 g./litr
2	Karmiony	2,16	6,18	
4	"	2,91	7,49	
7	"	5,98		6,89
8	Głodzony 24 godz.	1,27	3,31	
10	" " "	1,64		7,37
12	" 48 "	0,96		5,48
14	" " "	2,62	5,17	

f) bilans azotu doświadczalnego wykazuje, że prawie całkowita ilość azotu mocznika jest pobrana z amoniaku zawartego w roztworze; ornityna natomiast znajduje się, przy końcu doświadczenia, w ilości niezmienionej, ze ścisłością prawie do 2%.

Wynika stąd, że ściśle rozumowania zostały potwierdzone na drodze doświadczalnej. Kilka cyfr stwierdza powyższe rozumowanie:

a) tablica 7 wykazuje, że bez dodania amoniaku tworzenie się mocznika, w wartościach absolutnych, jest bardzo słabe; po dodaniu 1 g ornityny na litr, ilość mocznika wybitnie zwiększa się, chociaż jest mniejsza od ilości absolutnej;

b) tablica 8 wykazuje natomiast, że dodanie ornityny w ilości 1—2 g na litr, w obecności amoniaku, zwiększa I_U , którego wartość dochodzi do 5—7, niezależnie od tego w jakim stanie znajduje się osobnik, to jest czy jest karmiony, czy głodzony;

c) tablica 9 wykazuje różne wartości I_U w obecności ornityny, amoniaku i jednego z czterech następujących ciał: mleczanu, glikozy, lewulozy i pyrogronianu. Z tablicy wynika, że największe działanie występuje w obecności mleczanu;

d) tablica 10 wskazuje na stałą I_U w obecności mleczanu, amoniaku i ornityny, w różnych stężeniach i dla zwierząt głodzo-

nych lub karmionych. Ciekawe jest zestawienie liczb stałych tej tablicy z odnośniami liczbami tablicy. Różnice są wynikiem nietylę błędów technicznych, ile różnorodności materiału fizjologicznego. Jeżeli komórka otrzymuje nadmiar pożywki i katalizatora, jak to wykazuje tablica 9-ta, to liczby odchylają się i różnica wynosi przeciętnie około 12%.

TABLICA 9.

Tworzenie się mocznika w obecności amoniaku, ornityny i jednego z czterech ciał: mleczanu, glikozy, fruktozy i pyrogronianu, (190 mg/l. amoniaku, 100 mg/l. ornityny) (Krebs i Henseleit, 1932).

	Bez dodania trzeciego ciała	Mleczan 2 g./l.	Glikoza 2 g./l.	Fruktoza 2 g./l.	Pyrogronian 2 g./l.
I _u	4,82	14,76	5,58	9,24	
	2,86	11,23			9,04

TABLICA 10.

Tworzenie się mocznika w obecności amoniaku, ornityny i mleczanu (2 g/l. mleczanu, 0,12 lub 0,18 g/l. amoniaku).

Tkanki osobników normalnych lub głodzonych.

Osobniki głodzone			Osobniki normalne		
Nr.	Ilość ornityny g./l.	I _U	Nr.	Ilość ornityny g./l.	I _U
1	0,1	8,53	1	0,1	11,23
2	0,1	14,76	2	0,1	11,36
3	0,1	9,55	3	2,0	8,25
4	0,1	9,78	4	2,0	9,82
5	0,1	11,83	5	2,0	11,65
	średnia	10,84		średnia	10,37

e) tablica 11 wskazuje, że ornityna działa dopiero w stężeniu 5 mg/litr. Największe jej działanie jest przy stężeniu 20 mg/litr. Wynosi to 60 g ornityny na 10 mg suchej tkanki, czyli 1/500 część wagową masy komórek „katalizowanych”.

Z tablicy 12-ej można wyrobić sobie pojęcie o „efekcie katalitycznym” ornityny w małych dawkach, w obecności mleczanu. Ilość mocznika tworzonego w nadmiarze, w odniesieniu do zwykłej ilości ornityny, zwiększa się nieskończenie z biegiem czasu.

f) Bilans azotowy podczas odczynu wykazuje lepiej rolę katalityczną ornityny niż pomiary kinetyczne.

Tablica 13 wykazuje wyniki w wartościach absolutnych, dwóch pomiarów, gdzie są wykazane:

1) Ilość amoniaku, która zginęła, obliczona w mm^3 substancji gazowej;

2) ilość utworzonego mocznika, obliczona w mm^3 wytworzonego CO_2 .

1 mm^3 CO_2 mocznika, odpowiada 2 mm^3 NH_3 roztworu.

TABLICA 11.

Działanie ornityny na tworzeniu się mocznika, w obecności mleczanu. Różne stężenia ornityny przy 2 g/litr mleczanu (Krebs i Henseleit, 1932).

Ilość ornityny mg./l.	I_U
0	3,98
5	5,17
20	8,11
80	8,05
320	10,70

TABLICA 12.

Katalityczne działanie małych ilości ornityny (Krebs i Henseleit, 1932).

Nr.	Wątroba mg.	Ornityna mg./l.	Objętość pływu	Czas w minutach	Całkowita ilość utworzonego mocznika	Nadmiar mocznika	Mocznik ornityna
1	4,79	0	3,0	120	11,2		
	4,79	10	3,0	120	50,0	38,8	7,6
2	3,89	0	1,0	240	41,1		
	3,89	10	1,0	240	82,8	41,7	24,5
3	3,22	0	1,0	300	61,2		
	3,22	10	1,0	300	112,8	51,6	30,4

3) Określenie ilościowe azotu pochodzenia aminowego zawartego w roztworze, to jest określenie ornityny w roztworze. Ornityna była określana ilościowo przy pomocy reakcji z kwasem azotowym, przy wydzielaniu azotu. 90% azotu reagowało w tych warunkach. Równanie odczynu nie odgrywa w tych razach roli, gdyż chodzi jedynie o porównanie różnic między liczbami bardzo zbliżonymi. Różnice te są poniżej 2%.

Z całokształtu danych liczbowych wynika, że ornityna odgrywa główną rolę katalityczną w tworzeniu się mocznika. Arginaza może jedynie zastąpić ornitynę w tej czynności. Arginina w zetknięciu z komórkami wątrobowymi tworzy natychmiast ornitynę. Twierdzeniom powyższym można zarzucić, że *in vivo* komórki zachowują się odmiennie niż *in vitro*. Być może, że zmieniają się one całkowicie, tak że nawet zmieniają swe czynności z chwilą, kiedy są zdala od ustroju. Dopóki wyniki doświadczalne bardziej dokładne nie potwierdzą tych zarzutów, należy uważać, że jednakowo zachowuje się komórka w ustroju żywym i komórka w naczyniu manometrycznym, gdzie zdradza tajemnice swego mechanizmu.

TABLICA 13.

Bilans azotu podczas tworzenia się mocznika w obecności dużego nadmiaru ornityny.

Wielkości są wyrażone w mm³. W założeniu grupa aminowa amino - kwasów wynosi 22,4 na drobinę (Krebs i Henseleit. 1932).

Nr.	Wątroba mg.	Bilans amoniaku			Bilans mocznika			Bilans aminowy		
		w roztworze			w roztworze			w roztworze		
		przed	po	mniej	przed	po	więcej	przed	po	mniej
1	9,32	365	78,3	287	0	143,2	143,2	1879	1849	30
2	8,86	365	79,9	285	0	138,6	138,6	1879	1842	37

5) Działanie cytruliny.

Cytrulina została wynaleziona w roku 1914 przez japończyków Y. Kogę i S. Odakę w cytrynie (*Citrullus vulgaris*).

Skład cytruliny został ostatecznie ustalony przy pomocy syntezy M. Wada w r. 1930. Jest to kwas α amino α moczowo-walerjanowy



Ciało to zajmuje miejsce pośrednie między ornityną, która jest kwasem α - amino - δ - amino-walerjanowym i arginina, która jest kwasem α - amino - δ - guanidyno-walerjanowym. Ciało to powstaje w sposób naturalny podczas gnicia argininy, na czym A c k e r m a n n oparł jej przygotowanie. Posługując się próbka cytruliny, przygotowanej biochemicznie przez A c k e r m a n n a, K r e b s i H e n s e l e i t udowodnili pośrednią rolę tego związku w tworzeniu się mocznika w wątrobie.

Dla odegrania przez cytrulinę pośredniej roli w tworzeniu się mocznika niezbędne są dwa następujące warunki:

a) aby cytrulina, w obecności NH_3 i mleczanu szybciej przetwarzaa mocznik niż ornityna;

b) aby mocznik, utworzony przy pomocy cytruliny, utworzył się w połowie z amoniaku rozczywnu i w połowie z samej cytruliny w myśl wzoru (3).

TABLICA 14.

Tworzenie się mocznika w obecności ornityny lub cytruliny.

W obydwóch przypadkach środowisko zawiera 2 gramy/litr mleczanu i 120 mg/litr amoniaku K r e b s i H e n s e l e i t 1932).

ŚRODOWISKO	I _u	
	I Dośw.	II Dośw.
Bez dodatku	1,94	4,45
2 g/l ornityny	9,82	8,85
2 g/l cytruliny.	12,78	10,90
2 g l cytruliny bez amoniaku	0	

Rozpatrzmy warunki, w jakich obydwie doświadczenia przebiegały:

a) tablica 14 wykazuje dwa doświadczenia, w których jest podane I_u skrawków wątrobowych bez katalizatora, w obecności ornityny, w obecności cytruliny bez amoniaku lub z amoniakiem.

Środowisko zawiera 2 g/litr mleczanu i 120 mg/litr amoniaku. W warunkach *optimum* cytrulina tworzy o 25 do 30% więcej mocznika niż ornityna w tych samych warunkach;

b) przy tworzeniu bilansu mocznika i amoniaku, odnośne cyfry wykazuje tablica 15. Przy braku katalizatora, pod wpływem wątroby ubywa daleko więcej amoniaku od ilości potrzebnej dla utworzenia mocznika. W obecności ornityny ilość utworzonego mocznika jest większa i tworzy się częściej (10%) kosztem substancji wątroby. Współczynnik $\frac{\text{amoniak}}{\text{mocznik}}$ jest nieco niższy od 2.

W obecności cytruliny współczynnik ten zbliża się do 1 : 1,38. W miarę oddziaływania cytruliny i oddawania amoniaku przemienia się ona w ornitynę, tak że w ostateczności posiadamy dwie kategorie odczynów:

a) odczyny (2) i (3) kosztem dodanej cytruliny, które występują daleko szybciej i

b) sumę odczynów (1), (2) i (3) kosztem ornityny, utworzonej i ornityny, która powstaje w miarę przeistaczania się w cytrulinę.

Z trzech następujących po sobie odczynów teoretycznych, pierwszy występuje najwolniej i reguluje szybkość zjawiska; drugi odczyn przebiega szybciej, natomiast trzeci odczyn przebiega z szybkością 10-krotnie większą od poprzednich. Dwa pierwsze odczyny są związane z budową komórki, a nawet, jak to dalej zobaczymy, z jej oddechaniem. Trzeci odczyn jest zależny od rozpuszczalnego fermentu, daleko silniejszego od innych.

TABLICA 15.

Bilans azotowy tworzenia się mocznika w obecności ornityny i cytruliny.

(Krebs i Henseleit, 1932).

Wątroba mg.	1 cm ³ środowiska z 2 mg. mleczanu oraz	Czas trwania w mi- nutach	Nadmiar mocznika w mm ³	Mniej NH ³ w mm ³	NH ³ Mocznik
5,68	0,12 mg NH ³	90	35,0	114,7	3,26
6,21	2 mg ornityny + 0,12 mg NH ³ . .	90	79,4	144,0	1,81
5,96	2 mg cytruliny + 0,12 mg NH ³ . .	90	97,4	134,3	1,38
2,78	2 mg cytruliny	90	0		

6) Fizjologiczne warunki tworzenia się mocznika.

Teoria K r e b s a i H e n s e l e i t a, potwierdzona dużą ilością ważnych spostrzeżeń doświadczalnych, jest teorią wyłącznie empiryczną, nie biorącą pod uwagę zagadnień termodynamicznych. Synteza mocznika jest zasadniczo endotermiczną. Z pośród trzech proponowanych odczynów, pierwszy, a być może i drugi, przebiega łącznie z pochłanianiem energii. Trzeci odczyn jest egzotermiczny i spontaniczny. Opierając się na rozumowaniu termodynamicznym, należy przyjąć pewnego rodzaju „połączenie” między pierwszym odczynem, a być może i odczynem drugim, i jednym lub wieloma odczynami egzotermicznymi. Autorzy nie zajmowali się zagadnieniem rodzaju tego połączenia. Stwierdzili oni, że synteza mocznika łączyła się z natężeniem oddechu, lecz że stan odwrotny nie był rzeczywisty. Wynika stąd, że łącznie to musi być bardzo luźne. Przypomina to zwykłe „palenie”, oddech odgrywa rolę konieczną jednostki energetycznej, tak jak spalanie gazu świetlnego wywołuje wewnątrz szklanego balonu odczyny endotermiczne; szybkość spalania gazu jest niezależna od szybkości odczynów, które przebiegają wewnątrz balonu; odwrotny stosunek jest niemożliwy; zwolnienie przepływu jednostek cieplnych zwalnia odczyny endotermiczne, które mają miejsce wewnątrz balonu. Coś podobnego odbywa się i w ustroju. Przez oddychanie następuje ogrzanie komórki i tym sposobem stwarza się środowisko podatne do powstania syntez endotermicznych. W innej pracy wykazałem tę niezmierną energję, jaka zostaje wyzwolona dzięki oddechowi komórkowemu. Przerachujmy jeszcze raz, posługując się danymi K r e b s a. Według tego autora dane cyfrowe dla komórek wątrobowych, w obecności mleczanów, wynoszą $I_{O_2} = 22,4$; wynika stąd, że na kg suchej substancji w ciągu godziny, komórki zużywają 22 litry tlenu, czyli 1 drobinę, która spala trzecią część drobinę kwasu mlekowego, czyli 30 g.



licząc na 1 g 3,6 duże kalorie (M e y e r h o f 1932, str. 243) wynika: $30 \times 3,6 = 108$ kaloryj na godzinę.

Mały palnik B u n s e n a zużywa 100 litrów gazu na godzi-

nę. Przy średniej 4 kaloryj na litr, wynika, że palnik wytwarza 400 kaloryj na godz., czyli nie więcej niż 4 kg suchej wątroby lub 20 kg świeżej wątroby. Są to cyfry znaczne, które odnoszą się do średniej wydajności cieplnej; w rzeczywistości zjawisko oddechu nie przebiega w całej komórce, gdyż zawiera ona tylko pewne specjalne punkty, ściśle określone, punkty, znajdujące się na powierzchni komórki, jak to wykazał O. Warburg w swych badaniach nad zaczynem oddechowym. Uważając masę komórki, biorącej udział w oddychaniu, za równą dziesiątej części masy suchej, czynimy zapewne duży błąd. Przyjmując za podstawę 100 g masy katalitycznej dla 30 g kwasu mlekowego na godzinę, warunki liczbowe przeolbrzymiamy, gdyż nie ulega wątpliwości, że drobiny kwasu mlekowego szybko zastępują się na płaszczyznach katalizujących. Należy brać pod uwagę również bezpośrednie otoczenie, które pozwala innym drobinom, jak np. mocznikowi, na tworzenie się endotermiczne. Według tych przypuszczeń 108 kaloryj odpowiada 100 g mocznika. Porównajmy z kawałkiem antracytu, palącego się w ciągu 8 godzin i wydzielającego 8640 kaloryj na 1 kg, to jest palącego się przy słabym dopływie powietrza, jak to ma miejsce pod kotłami ogrzewania centralnego. W paleniskach tych węgiel nie pali się płomieniem, lecz nagrzewa się do barwy ciemno-czerwonej. 100 g antracytu, w ten sposób spalającego się, wytwarza ściśle 108 kaloryj na godzinę, przyczem spala się w ciągu godziny 12,5 g antracytu.

TABLICA 16.

Oddech komórkowy nie zwiększa się z chwilą, gdy zwiększa się tworzenie mocznika (Krebs i Henseleit, 1932).

Ś R O D O W I S K O	IO ₂	IU
O,18 g/l NH ₃ , 2 g/l mleczanu	— 22,2	+ 3,19
idem idem + 0,1 g/l ornityny	— 20,8	+ 11,83

Innemi słowy „stężenie energii”, występujące w komórce w związku z jej oddychaniem, nawet nie ograniczając jej „płaszczyzn oddechowych”, nawet biorąc pod uwagę otaczające płasz-

czynny katalizujące, jest zbliżone do zjawisk, występujących w kawałku spalającego się węgla. Syntezy endotermiczne mogą występować w komórce żywej przez zwykłe „nagrzanie”, przy czym wyzwolona energia, np. przy pomocy oddechu, znajduje się w silnym stężeniu w specjalnych uprzywilejowanych miejscach komórki.

Poniżej podajemy dane doświadczalne, potwierdzające powyższą hipotezę.

1) Synteza mocznika, zarówno jak i oddychanie jest związana z niepodzielnością budowy komórkowej.

2) Obojętne narkotyki, jak np. alkohol oktylowy, porażają zarówno oddech jak i tworzenie się mocznika.

3) Anaerobiosa wstrzymuje oddychanie i tworzenie mocznika. Spostrzeżenie powyższe zawdzięczamy odkryciom L ö f f l e r a (1917, 1920).

4) Mleczan pobudza oddychanie komórki wątrobowej i jednocześnie pobudza tworzenie się mocznika (tablica 9).

5) Dodanie ornityny do komórek oddychających w obecności mleczanu, pobudzającego tworzenie się mocznika, nie wpływa na zmiany oddechowe. Innymi słowy mówiąc, z chwilą zwiększenia „palenia” komórkowego przez dodanie mleczanu (albo glikozy, lewulozy, pyrogronianu) zwiększa się syntezę mocznika, jeżeli natomiast tworzenie się mocznika zależy od ornityny jako katalizatora, to „spalanie” jest stałe i natężenie oddechowe nie zmienia się.

K r e b s ściśle sprawdził powyższe fakty. Tablica 16 zawiera liczby wykazujące, że dodanie ornityny nie wpływa na natężenie oddechowe.

7) Warunki fizyko-chemiczne tworzenia się mocznika.

K r e b s dokładnie zbadał wpływ stężeń ciał biorących udział w równaniach (1) i (2) : CO_2 , NH_3 i H^+ , który działa pośrednio na dwa poprzednie ciała.

Równanie (1):



wyraża reakcję, której szybkość zależy od samego zjawiska

(w obecności nadmiaru ornityny); można przewidzieć, że szybkość tworzenia się mocznika będzie:

- 1) funkcją zwiększającą stężenie wolnego NH_3 ;
- 2) funkcją zwiększającą stężenie wolnego CO_2 . Koncentracja drobin obojętnych NH_3 jest funkcją zwiększającą pH; poniżej $\text{pH } x = 6$, praktycznie mówiąc, niema drobin NH_3 ; zjawiają się one dopiero przy pH równym lub wyższym od 7.

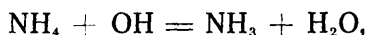
Stężenie wolnego CO_2 zwiększa się w miarę jak pH zmniejsza się. Zjawisko to musi posiadać pewne *optimum* w środowisku fizjologicznym.

Przypuszczenia powyższe zostały sprawdzone przez K r e b s a.

1) Przy $\text{pH} = 7,4$ i stężeniu amoniaku od 32 mg/ litr do 254 mg/litr (czyli od $2 \cdot 10^{-3}$ do $15 \cdot 10^{-3}$ N) I_U zwiększa się z 4 do 15,7. Od tej chwili I_U nie zwiększa się, pomimo zwiększenia stężenia NH_3 . Wynika stąd, że reakcja jest wrażliwa na stężenie NH_3 , przy stężeniach $\frac{N}{100}$ i poniżej, to jest przy rozcieńczeniach, które nie są zbyt duże. Przy milinormalnem roztworze amoniaku, I_U spada poniżej 1/10 wartości optymalnej.

2) Wpływ CO_2 przy pH stałym, jest mniejszy, gdyż komórka, wskutek oddychania, tworzy dostateczną ilość CO_2 dla zabezpieczenia syntezy mocznika (tablica 16). Jeżeli jednak ciśnienie CO_2 przechodzi od jednego (tampon fosforanowy w atmosferze CO_2) do 40 (tampon dwuwęglanowy w obecności CO_2), to I_U zwiększa się z 2,3 do 7,8, to jest w przybliżeniu 1 do 3,4. Wynika stąd, że działanie CO_2 jest bardzo znaczne.

3) Rola pH jest bardziej złożona, jak to zresztą można było przewidzieć. Tablica 17 zawiera dane liczbowe, otrzymane przez K r e b s a i H e n s e l e i t a. Z tablicy tej wynika, że przy pH powyżej 7, I_U zmniejsza się bardzo szybko. *Maximum* I_U występuje przy $\text{pH} = 7,46$; powyżej tej liczby wahania są mało znaczne. Inaczej mówiąc, z danych tych można wyprowadzić wniosek, że komórka „broni się” przeciwko zasadowości, szybko przemieniając zasadę amoniakalną, w miarę jak zwiększa się pH. W zasadzie najważniejszą rolę odgrywa odczyn:



w którym NH^3 może powstać dopiero wtedy, jeżeli stężenie jonów OH jest tego samego wymiaru lub większe od jonów H . Tym sposobem łatwo można sobie wytłumaczyć raptowny spadek Iu przy pH w pobliżu liczby 7. W podobny sposób należy wytłumaczyć stężenie stosunkowo większe N/50 NH_3 , niezbędne dla wystąpienia optimum odczynu; jony NH^4 są nieczynne, należy liczyć się jedynie z drobinami NH^3 , które biorą udział w odczynie (1).

TABLICA 17.

Wahania tworzenia się mocznika, w zależności od funkcji pH . (Krebs i Henseleit, 1932).

pH	6,57	6,87	7,17	7,46	7,78
Iu	2,79	4,78	7,75	9,41	9,98

Na zakończenie musimy zaznaczyć, że w danym przypadku nie można zastosować równania liczbowego, prawa działania mas, gdyż ani ornityna, ani cytrulina, które biorą udział w odczynie nie znajdują się w roztczynach. Odczyn nie przebiega w jakimś środowisku, lecz ma miejsce w określonych punktach struktury komórkowej.

W tych warunkach ciałami, które oddziałują są absorbowane NH_3 i CO_2 ; stężenie winno wpływać i działać jak zjawisko adsorpcji, to jest w myśl zasad logarytmicznych. To właśnie udowodnia badanie doświadczalne Krebsa.

V. Wpływ rozpuszczalnych zaczynów na dezaminowanie aminokwasów w nerce.

Ustrój zwierząt ssących odkarmia się nie solami amoniakalnemi, lecz złożonymi protydami (białkanami), które pod wpływem trawienia zamieniają się na kwasy aminowe. Te ostatnie przedostają się do krwi i wraz z nią stykają się z komórkami. Według teorii klasycznej miejscem dezaminowania jest wątroba. Krebs (1932) wznowił zagadnienie, badając je ilościowo. Z badań tych wynika, że wątroba pochłania małą

ilość kwasów aminowych; szereg innych tkanek pochłania ich daleko więcej niż wątroba, aczkolwiek tkanki te nie dezaminują kwasów; tkanką, która posiada największą siłę dezaminowania jest nerka. Siła destrukcyjna kwasów aminowych w nerce jest niezmiernie duża. Nerka rozkłada prawie taką samą ilość drobin kwasów aminowych, jaką pochłania drobin tlenu do oddychania. Wiadomo również, że nerka posiada największe natężenie oddechowe ze wszystkich innych tkanek.

TABLICA 18.

Dezaminowanie i natężenie (bez lub z alaniną) różnych tkanek szczura. Średnie cyfry (Krebs 1932).

NARZĄDY	I _A	I _{NH₃}			I _{O₂}	
		bez alaniny	z alaniną	z nadmiarem alaniny	bez alaniny	z alaniną
1. Nerka . .	— 15,3	+ 1,72	+ 11	+ 8,28	18,7	43,2
2. Wątroba . .	— 2,0	+ 1,07	+ 2,34	+ 1,27	11,1	13,1
3. Trzustka . .	— 0,8	+ 0,45	+ 0,34		5,9	5,2
4. Jądro . .	— 0,0	+ 0,12	+ 0,44		5,9	5,2
5. Mięsień krezka . .	— 2,9	+ 0,17	+ 0,19		3,8	3,3
6. Mózg. . .	— 3,0	+ 0,64	+ 0,73		13,0	12,6
7. Śluzówka jelita . .	— 2,3	+ 0,61	+ 0,75		8,4	7,9
8. Tkanka ra- kowa. . .	— 3,6	+ 0,13	+ 0,26		4,3	5,1
9. Łożysko. .	— 0,0	+ 0,96	+ 0,93		4,4	3,9

Powyższa tablica jest wyjęta z ostatniej pracy K r e b s a. Liczby wyrażają frakcje drobin i mogą być porównywane między sobą. Działanie różnych tkanek było badane, wraz lub bez alaniny, w kierunku stwierdzenia własności pochłaniania kwasów aminowych I_A (wyrażone w mm³ na mg substancji suchej i na godzinę, przyczem gramodrobina kwasu aminowego stanowi *a priori* 22,4 litry), określenia ilości utworzonego I_{NH₃}, amoniaku, wyrażonych w mm³ na 1 mg substancji suchej i na godzinę oraz natężenia oddechowego I_{O₂}, również wyrażonego w mm³ na mg suchej substancji na godzinę.

Z pobieżnego rzutu na powyższą tablicę wynika, że tkanka nerkowa przoduje pod wszystkimi względami. Z przemiana-

ny NH_3 wynika, że jedynie tkanka wątrobowa i nerkowa zdolne są do dezaminowania, przyczem nerka posiada aktywność sześciokrotnie większą od wątroby. Pod wpływem działania alaniny, natężenie oddechowe w komórkach nerkowych zwiększa się o 140%; podczas gdy odnośne zwiększenie dla komórek wątrobowych wynosi zaledwie 18%, a inne komórki prawie nie wykazują tych własności.

Powyższe doświadczenie było dokonane z tkankami psa, kota i człowieka; wyniki są stałe: tworzenie się amoniaku jest aktywniejsze przy użyciu tkanki nerkowej, niż przy użyciu tkanki wątrobowej u zwierząt zarówno mięsożernych jak i wszystkożernych.

Doświadczenia te były powtarzane porównawczo z całą serją amino kwasów, jednocześnie z tkanką wątrobową i z tkanką nerkową. Wyniki liczbowe Krebsa są zbyt obszerne, aby je tutaj podawać. Streścimy je w kilku słowach. W tkance wątrobowej jedynie alanina w sposób wyraźny przyczynia się do amonogenezy oraz natężenia oddechowego; na tkankę nerkową natomiast działa cała serja amino kwasów; na tem samym poziomie co alanina znajdują się: ornityna, kwas asparaginowy i kwas glutaminowy. Pozatem następujące związki posiadają wyraźne działanie, aczkolwiek znacznie słabsze: walina, leucyna, lizyna, seryna, fenylo-alanina (to ostatnie ciało zwiększa amonogenezę i bardzo niewiele oddech). Słabe działanie posiadają: glikokol, izoleucyna i histydyna.

Nash i Benedict wykazali w roku 1921, że większa część amoniaku, wytwarzanego w nerce pochodzi z samej nerki. W rzeczywistości krew opuszczająca nerkę zawiera daleko więcej amoniaku, niż krew wchodząca do nerki. Nash i Benedict, a następnie Bollmann i Mann wygłosili przypuszczenie, że mocznik pochodzi z amoniaku moczu. Łatwo można udowodnić *in vitro*, że tkanka nerkowa nie jest w stanie wytworzyć amoniaku z mocznika. Wynika stąd, że poprzednie przypuszczenie, oparte głównie na doświadczeniach, związanych z usunięciem wątroby, przy pomocy których niema obiegu nie tylko mocznika, ale nawet kwasów aminowych, nie są uzasadnione.

Z drugiej strony należy udowodnić, że całkowita ilość

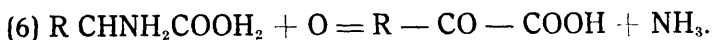
amoniaku, zawartego w moczu, pochodzi z nerki nawet w przypadkach chorobowych. Według Krebsa INH_3 w nerce ludzkiej wynosi 5, czyli 3,8 γ amoniaku na godzinę i na mg suchej substancji, czyli 3,8 mg amoniaku na godzinę i na 1 g suchej substancji. Jeżeli przyjąć, że przeciętna waga nerki wynosi 60 g N, to wtedy wyniki otrzymamy niemal nieprawdopodobne; wypadnie około 230 mg amoniaku na godzinę. Osobnik normalny wydziela 10 do 40 mg amoniaku na godzinę, w kwaszycie cukrzycowej ilość wydzielanego amoniaku dochodzi do 200 mg na godzinę. Wynika stąd, że pomiary manometryczne dają liczby w granicach możliwości czynności nerkowych.

Na tej drodze można zrozumieć znaczenie amonogenezy nerkowej i wydzielania amoniaku w przypadku kwasoty: nerka stale wytwarza duży nadmiar amoniaku, a zwłaszcza przy pokarmie mięsnym. Nadmiar kwasów w ustroju, przechodząc przez nerkę ulega automatycznemu zobojętnieniu przez NH_3 . Krebs objaśnia to zasadą ekonomiki: ustrój zatrzymuje jony Na, trudne do zastąpienia, a natomiast wypuszcza jony NH_4^+ , których ma nadmiar. Zdaniem mojem, należy znaleźć mniej krańcowe wyjaśnienie: jon NH_4^+ jest bardziej rozprzestrzeniony w ustroju od jonu Na; jon Na jest „hydrazowany”, to jest posiada jak gdyby otoczkę z drobin wody i jest jak gdyby poza tkanką zdrową, która zawiera jedynie jony K. Sole NH_4^+ przenikają daleko łatwiej ściany nerki od soli Na. W najbliższej naszej pracy zajmiemy się zagadnieniem przepuszczalności jonów.

Ostre zapalenie nerek, niewydolność nerek powodują, jak wiadomo, znaczne zmniejszenie się amoniaku w moczu. Przyczyny tego należy szukać w zaburzeniach w tkance nerkowej; komórki nerki tracą w tych razach większą część swych własności dezaminowania. Nie posiadamy dotychczas potwierdzeń doświadczalnych powyższego przypuszczenia; byłoby łatwe potwierdzenie takie uzyskać przez wywołanie zapalenia nerek u zwierząt, albo też przez badanie chorych tkanek u osobników zmarłych na skutek zapalenia nerek lub podczas zbiegu.

Hipoteza, która nasuwa się każdemu interesującemu się

zagadnieniem biochemji, dotyczy zagadnienia przemiany kwasu aminowego w kwas α -ketonowy:



Dla sprawdzenia powyższego hipotetycznego mechanizmu K r e b s dokonał serii doświadczeń niezmiernie prostych.

1) W obecności kwasu cyjanowodorowego N/500 lub, co lepiej, kwasu arsinowego N/1000, oddychanie komórki nerkowej w zetknięciu z glikozą jest prawie całkowicie zahamowane, natomiast dezaminowanie przebiega normalnie. Wynika stąd równowaga i wyrównanie między atomami pochłoniętego tlenu i drobinami zwolnionego NH_3 . Kwas ketonowy wytworzony, zbiera się w roztworze, gdzie łatwo go określić ilościowo. Określenie czterech ciał biorących udział w odczynie (6) zostało dokonane przez K r e b s a zgodnie z przewidywaniami, wynikającymi z równania. W tablicy 19, zapożyczonej z ostatniej pracy K r e b s a, znajdujemy wyjaśnienie powyższych faktów.

2. Oddech komórki nerkowej, znajdującej się w warunkach fizjologicznych wzmagą się pod wpływem niektórych aminokwasów: np. pod wpływem działania alaniny lub kwasu glutaminowego oddychanie się zwiększa dwukrotnie. Zjawisko to występuje niezależnie od dezaminacji; jest ono swoiste dla niektórych ketokwasów. Kwas pyrogronowy, kwas α -ketoglutazarowy posiadają także samo działanie, jak odpowiednie kwasy aminowe. Fenyloalanina i kwas fenylopyrogronowy nie zwiększa natężenia oddechowego.

TABLICA 19.

Tworzenie kwasu pyrogronowego z alaniny w tkance nerkowej I p wyraża ilość kwasu pyrogronowego, utworzonego przez 1 mg suchej substancji w ciągu godziny, określanej w mm^3 przy 0° i 760 mm (K r e b s, 1932).

Ś R O D O W I S K O	IO_2	INH_3	IA	IP
0.2 g/l glikozy	— 18,7	+ 2,67		0
idem + $\text{As}_2\text{O}_3\text{N}/1000$	— 3,2	+ 1,65		6
Idem. + Alanina N/1000	— 43,2	+ 11,0	— 15,3	6
idem + idem + $\text{As}_2\text{O}_3\text{N}/1000$	— 8,6	+ 10,1	— 11,7	+ 11,1

3. Dezaminowanie w komórce nerkowej jest niezależne od samej budowy komórki; jest ono wynikiem pewnego fermentu rozpuszczalnego w wodzie. Aby uzyskać ferment dezaminujący i utleniający, należy rozetrzeć w mózdzierzu tkankę nerkową z piaskiem, wyługować przy pomocy tamponu fosforowego N/100 przy pH 7,4, odwirować, a wówczas w roztworze znajdzie się poszukiwany ferment. Po dodaniu do roztworu alanyiny i skłóceniu w obecności tlenu, występuje odnośny odczyn (6). Jeden atom tlenu zostaje pochłonięty przez jedną drobinę alanyiny, która jednocześnie znika, a na jej miejsce powstaje jedna drobina NH_4^+ i jedna drobina pyrogronian. W powyższych warunkach doświadczalnych pyrogronian nie zmienia się; natomiast w zetknięciu z żywą normalną komórką, związek ten bardzo szybko znika.

Dezaminowanie ustroju jest więc własnością rozpuszczalnego fermentu, zawartego głównie w komórkach nerkowych. Krebs proponował nazwać ten ferment „dezamino-oksydazą”. Wprowadzone do ustroju protydy, pod wpływem szeregu znanych obecnie fermentów, zawartych w przewodzie pokarmowym: pepsyny, trypsyny i erepsyny, zamieniają się na aminokwasy. W dalszym ciągu aminokwasy pod wpływem działania dezamino-oksydazy Krebsa podlegają dezaminacji w wątrobie i w nerkach. Utworzony amoniak podlega syntezie przy pomocy komórki wątrobowej i zamienia się na cytrulinę, a następnie argininę; jest to jedyny moment, w którym komórka bezpośrednio bierze udział w przemianie azotowej, posługując się odczynami prostymi, dokładnie już znanymi. Następnie arginina podlega rozkładowi przez działanie arginazy wątroby, zamieniając się na mocznik i ornitynę. Ornityna następnie posłuży komórce wątrobowej do utworzenia cytruliny i argininy, a mocznik zostanie wydzielony przy pomocy nerek. W ten sposób przedstawia się obecnie cykl przemiany azotowej protydy w ustroju normalnym. Należy zwrócić uwagę, że fermenty odgrywają tutaj ważną rolę, co zresztą było przewidziane podczas badań nad fermentami rozpuszczalnymi, znajdującymi się w ustroju.

Całokształt wyników doświadczalnych, uzyskanych przez

Krebsa jest pierwszorzędnej wagi. Tem nie mniej, z punktu widzenia ważności zagadnień fizjologicznych, należałoby postawić dwa zastrzeżenia:

1. Wątroba jest 5 do 10 razy większa od nerek. Nawet jeżeli natężenie dezaminacji, w odniesieniu do jednostki masy tkankowej, jest 5 do 6 słabsze w wątrobie niż w nerkach, to tem nie mniej całkowita ilość dezaminowanych kwasów jest jednakowa w wątrobie i w nerce; jest ona nieco większa w wątrobie. Należy jednak przyjąć, że siła natężenia pracy fizjologicznej jest jednakowa *in vitro* i *in vivo*. Nie ulega wątpliwości, że zachodzą tu różnice, o znaczeniu których nie mamy dostatecznych wiadomości.

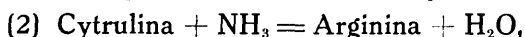
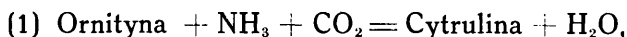
2. Opisane doświadczenia zostały dokonane ze zwierzętami mięsożernymi lub wszystkożernymi. Trawożerne, jak np. królik, inaczej zachowują się. Zwierzęta te wydzielają daleko mniej amoniaku i wydzielina ta nie stoi w związku z wahaniami w równowadze kwasowo - zasadowej. Panna Pipat w pracy swej, dokonanej pod kierunkiem prof. Delaunaya w roku 1929 dochodzi do następującego wniosku: „Trudno jest zgodzić się na to, że nerka królicza wydziela amoniak tak samo jak nerka zwierząt mięsożernych i człowieka, gdyż ilość amoniaku nie zgadza się z wahaniami odczynów pokarmowych oraz z pH moczu”.

VI. Wnioski.

Krebs dochodzi do następujących wniosków:

Dezaminowanie aminokwasów skutecznia się szybko w nerce oraz w wątrobie, w tej ostatniej daleko wolniej, aczkolwiek w podobny sposób. Działanie to zależne jest od rozpuszczalnego fermentu, dającego się wydzielić z komórki nerkowej, noszącego nazwę „dezamino-oksydazy”. Pierwszym produktem dezaminowania jest kwas α -ketonowy i amoniak. Kwas α -ketonowy albo przechodzi do moczu (przypadek kwasów aminowych obcych dla ustroju), albo natychmiast ulega przemianie, pod wpływem działania komórki nerkowej i pod wpływem oddechu. Amoniak pochodzi w części z amoniaku moczu, a w części, zazwyczaj większej, ulega przemianie w wątrobie.

Mocznik tworzy się w wątrobie, jedynym organie posiadającym własność wytwarzania mocznika. Tworzenie się mocznika przebiega według następujących kolejnych reakcyj:



Odczyn (3), jest odczynem arginazy K o s s e l a i D a k i n a, jest niezależny od budowy komórki i przebiega znacznie szybciej niż odczyny (1) i (2). Odczyn (1) reguluje szybkość tworzenia się mocznika, przyczem doświadczenie wykazuje, że tworzenie się mocznika można przyspieszyć, zwiększając, w pewnych granicach, stężenie ornityny albo stężenie NH_3 , albo wreszcie stężenie CO_2 .

Odczyny (1) i (2) są prawdopodobnie związane z budową komórki i stoją w związku z oddychaniem komórkowym, gdyż występują energiczniej wraz ze zwiększeniem się oddychania. Nie mamy podstaw do przypuszczenia, iż zachodzi tu zjawisko kuplowania. Można przypuszczać tworzenie się w komórce żywej eudotermicznej syntezy mocznika, jedynie dzięki sąsiedztwu energii, wytworzonej przez oddychanie komórkowe.

Takie są wnioski K r e b s a. Wszelkie komentarze, starające się rozszerzyć zagadnienie, zarówno z punktu widzenia biochemicznego i klinicznego jak i fizjologicznego, są zbędne. Wnioski te można jedynie wówczas zbijać, kiedy wniesie się nowe dane doświadczalne, równorzędne do wyników otrzymanych.

Na zakończenie pozwolę sobie wyrazić głębokie podziękowanie Prof. H. D e l a u n a y, jednemu z najlepszych znawców przemiany azotowej, za przejrzenie niniejszej pracy przed jej opublikowaniem i opatrzenie cennymi wskazówkami i uwagami, zwłaszcza dotyczącymi zachowania się nerki u zwierząt trawożer-nych.

PIŚMIENNICTWO.

- Ackermann D.** — *Hoppe-Seyler Z.*, 203, 66 (1931).
- Bamberger et Landsiedl.** — *Monatshefte für Chemie*, 24, 218 (1903) et 26, 1109 (1905).
- Bergmann.** — *Klin. Wochenschrift* (1932), 1569.
- Bergmann et Ennslin.** — *Hoppe-Seyler Z.*, 174, 76 (1928).
- Bollman, Mann.** — *Amer. J. Physiol.*, 92, 92 (1930).
- Bollmann, Mann et Magath.** — *Amer. J. Physiol.*, 78, 256 (1926).
- Clementi.** — *R. Acc. Lincei*, 23, 517, 612 (1914). — *Archivio Fisiologia*, 23 (1914). — *Arch. internationales de Physiologie*, 19 (1922).
- Delaunay.** — Les acides aminés. *Biologie médicale*, 8, 45 (1911). — *Arch. internat. Physiol.*, 13, 126 (1913). — *C. R. Soc. Biol.*, 73, 492 (1912). — *C. R. Soc. Biol.*, 74, 151, 154, 639, 767, 769 (1913). — *C. R. Soc. Biol.*, 87, 1091 (1922). — *C. R. Soc. Biol.*, 93, 128, 626 (1925). — *C. R. Soc. Biol.*, 94, 1289 (1926), 95, 1357 (1926). — Recherches biochimiques sur l'excrétion azotée des Invertébrés marins. *Thèse Sciences* 1927, *Bulletin Stat. Arcachon*, 24, 95 (1927). — L'ammoniaque. *Biologie médicale*, 18, 408 (1928). — L'excrétion azotée des Invertébrés, *Biological Reviews*, Cambridge 1930.
- Drechsel.** — *Journal für praktische Chemie*, 22, 481 (1880).
- Edlbacher.** — *Hoppe-Seyler Z.*, 95, 81 (1915); 100, 111 (1917) — *Hoppe-Seyler Z.*, 185, 1 (1929).
- Edlbacher et Bonem.** — *Hoppe-Seyler Z.*, 145, 65 (1925).
- Edlbacher et Röthler.** — *Hoppe-Seyler Z.*, 148, 264, 273 (1925).
- Fosse.** — *C. R. Ac. Sc.*, 154, 1187, 1448 (1912); 155, 851 (1912); 156, 263, 567 (1913). — L'urée. *Presses Universitaires*, Paris (1926).
- Gaze R.** — *Archives de Pharmacologie*, 243, 78 (1905).
- Genevois.** — Métabolisme et fonctions des cellules (Masson. 1930). — Introduction à la physiologie cellulaire. *Biologie médicale*, 22, № 8, 1932.
- Goris et Costy.** — *C. R. Ac. Sc.*, 175, 539 (1922).
- Goris et Mascré.** — *C. R. Ac. Sc.*, 147, 1488 (1908); 153, 1082 (1911).
- Hofmeister.** — *Arch. f. exp. Pathol. u Pharm.*, 37, 442 (1896).
- Hunter et Dauphinee.** — *Proc. R. Soc. B.*, 97, 227 (1925).
- Iwanov.** — *Biochem. Z.*, 136, 9 (1923); 135, 1 (1923).
- Kiesel.** — *Hoppe-Seyler Z.*, 60, 460 (1909); 75, 169 (1911); 118, 267 (1922) — L'arginine et ses transformations chez les Végétaux (1916) (en russe).
- Knierim** — *Z. Biol.*, 10, 263 (1874).
- Koga et Odake** — *J. Tokyo Chem. Soc.*, 35, 519 (1914).
- Kossel et Dakin.** — *Hoppe-Seyler Z.*, 41, 321, 42, 181 (1903).
- Krebs.** — *Biochem. Z.* 238, 174 (1931). — *XIV Congresso Internazionale de Fisiologia*, Rome 1932, str. 143. — *Klinische Wochenschrift*, 11, 1744 (1932).

- Krebs et Henseleit.** — *Klinische Wochenschrift*, 11, 757, 1137 (1932). — *Hoppe Seyler Z.*, 210, 33 (1932).
- Löffler.** — *Biochem Z.*, 85, 230 (1917); 112, 164 (1920).
- Meyerhof.** — Chimie de la contraction musculaire. Delmas et Hermann, Bordeaux et Paris, 1932.
- Meyerhof, Lohmann, Takane.** — *Biochem Z.*, 171, 380 (1926).
- Nash et Benedict.** — *J. Biol. Chem.*, 48, 463 (1921); 51, 514 (1921). — *Ibidem* 69, 381 (1926). — *Ibidem* 82, 673 (1930).
- Nicloux et Welter.** — *C. R. Ac. Sc.* 174, 1735 (1922).
- Pipat.** — L'ammoniurie chez le Lapin. *These, Faculté de Pharmacie de Bordeaux*, 1929.
- Salkowski.** — *Hoppe Seyler Z.*, 7, 1 (1877).
- Shiga.** — *Hoppe Seyler Z.*, 12, 505 (1904).
- Wada M.** — *Biochem Z.*, 224, 420 (1930).
- Warburg.** — Métabolisme cellulaire et métabolisme des tumeurs, Paris Alcan, 1928.
-

REDAKTOR Dr. S. OTOLSKI

Wydawca: Przemysłowo-Handlowe Zakłady Chemiczne Ludwik Spiess i Syn, Sp. Akc. — Warszawa

Zakł. Druk. F. Wyszynski i S-ka, Warszawa.