

# BIOLOGJA LEKARSKA

Wydawana pod kierunkiem Dr. S. OTOLSKIEGO

Rok XIV. — Nr. 8

Październik 1935

## PRZEMIANA KOMÓRKOWA CIAŁ GLUCYDOWYCH

podał

M. L. GENEVOIS.

Profesor chemji biologicznej na Wydziale Nauk Przyrodniczych  
Uniwersytetu w Bordeaux.

ROZDZIAŁ I.

### WEWNĄTRZKOMÓRKOWA PRZEMIANA CIAŁ GLUCYDOWYCH.

W s t ę p.

Rok 1933 zaznaczył się serją niemal sensacyjnych odkryć biochemicznych, co zostało potwierdzone prawie jednogłośnie, na międzynarodowym Kongresie Chemicznym, który odbył się w Madrycie w czasie ferji wielkanocnych roku 1934. Odkrycia te zostały dokonane jednocześnie w różnych krajach, przez uczonych z różnych szkół. Wyniki jednak były zbieżne, a dotyczyły wyjaśnienia przy pomocy biochemji i termodynamiki zjawisk przemiany glcydów, wchodzących w skład dużej ilości komórek zwierzęcych i roślinnych. Podobne określenie niemożliwe było jeszcze w roku 1930, kiedy została wydana praca: „*Métabolisme et fonctions des cellules*”<sup>1)</sup>).

Przemiana glcydowa może być sprowadzona do trzech podstawowych zjawisk:

*Oddychanie.* — Spalanie zupełne ciał bardzo różnorodnych, glcydów lub drobin pochodnych.

<sup>1)</sup> L. Genevois. — *Métabolisme et fonctions des cellules*. Paris, 1930.

*Fermentacja.* — Rozdwojenie drobin glcydowej na różnorodne produkty, z których najważniejszym jest u zwierząt kwas mlekowy, a u roślin dwutlenek węgla i alkohol.

*Reakcja Pasteura-Meyrhoła.* — Reakcja syntezy zdwojonej oddychania, pozwalająca na odtworzenie w komórce glcydów kosztem produktów fermentacji.

Mechanizm trzech tych reakcji, rola koniecznych katalizatorów, stosunek katalizatora do witamin do roku 1930 były niedostatecznie znane. Nieznana była również potencja i teoria potencji oksydoredukcyjnych. Do tej pory nieznane było wytłomaczenie obiektywne lub doświadczalne, które mogłoby wyjaśnić choć jedną z faz metabolizmu.

Od roku 1933 pojęcia zmieniły się zasadniczo.

1°. — W roku 1933 R. W u r m s e r ogłosił pracę o równowadze odwracalnej, zachodzącej między kwasem mlekowym, kwasem pyrogronowym i wodorem w obecności komórki żywej, spełniającej rolę katalizatora. Znajomość równowagi rH pozwoliła na obiektywne sklasyfikowanie, potwierdzone na drodze doświadczalnej różnych odmian fermentacji.

2°. — O. W a r b u r g i jego współpracownicy odkryli w komórkach drożdży i innych tworów komórkowych, żółty barwnik oddechowy, który łączy się nie z tlenem, na wzór typowego fermentu oddechowego, lecz z wodorem, w sposób odwracalny. W a r b u r g nazwał barwnik ten „komórkowym błękitem metylowym“.

3°. — Barwnik ten posiada potencjał oksydoredukcyjny swoisty, stwierdzony przez licznych badaczy (S t e r n, B i e r i c h). Potencjał ten jest bardzo zbliżony do potencjału równowagi, zachodzącej między kwasem mlekowym i kwasem pyrogronowym. Wynika stąd ścisła współzależność między odkryciem W u r m s e r a i W a r b u r g a. W a r b u r g wniósł do teorii tej najbardziej przekonywujący argument odkrywając żółty pigment oddechowy, który znajduje się prawie we wszystkich komórkach.

4°. — R. K u h n i jego współpracownicy określili budowę chemiczną tego pigmentu żółtego, który otrzymał nazwę flawiny. Podobne pigmenty zostały wydzielone z drożdży, z serwatki i z białka (laktoflawina i owoflawina), z wątroby (hepatoflawina).

Pigmenty powyższe tworzą nową rodzinę połączeń organicznych. R. Kuhn i Karrer dokonali syntezy tych pigmentów, a Ellinger i Kosch ara, posługując się widmem fluoryzującym, wykazali, w roku 1932—1933, obecność tych pigmentów w żywych komórkach zwierzęcych, i nazwali je lyochromami.

5°. — Kuhn ze swymi współpracownikami zidentyfikowali flawiny z witaminą B<sup>2</sup>, służącą do przyswajania glcydów przez komórkę. W ten sposób zostały połączone biochemja komórkowa, oparta na termodynamice, z chemją odżywczą, opartą na empiryzmie. Eijkman w roku 1897 ogłosił szereg ważnych prac, dotyczących beriberi, zaburzenia wynikającego z braku różnych czynników B, będących punktem wyjścia dla obecnych naszych wiadomości o witaminach. Należy zaznaczyć, że czynnik B<sup>2</sup>, poczynając od roku 1933, jest źródłem nowych rewolucyjnych pojęć w biologji.

6°. — Wurmser i jego współpracownicy, jak również i inni autorzy wykazali w latach 1932—1933, że kwas heksuronowy, lub kwas askorbinowy Szent-György'ego, będący pochodną glukozy furanowej, jest ciałem o dosyć wysokich potencjach oksydoredukcyjnych.

Potencje oksydoredukcyjne w większości komórek zwierzęcych i roślinnych, znajdują się między potencją witaminy C, lub kwasem askorbinowym i potencją witaminy B<sup>2</sup>, lub flawiną.

7°. — W grupie witamin B, u zwierząt kręgowych występuje inny czynnik przyswajalności komórkowej glcydów. Barnes, O'Brien i Reader, Tschesche wydzielili czynnik ten, jako czynnik B<sup>4</sup>, identyczny z adeniną. Adenina jest podstawowym składnikiem współfermentu fermentacji mlekowej i kwasu adenylopyrofosforowego, niezbędnego w czynności mięśnia. Wynika stąd jeszcze jedno połączenie i związek między chemją odżywczą i przemianą komórkową.

8°. — Mechanizm fermentacji glcydowej — fermentacji alkoholowej lub mlekowej został wyjaśniony. Według teorii C. Nebra z roku 1913, drobina glcydu przemienia się w kwas heksozofosforowy. Heksozofosforan zamienia się w kwas fosforowy i dwie drobiny metyloglyoksalu — CH<sub>3</sub>CO CHO. Tworzenie się metyloglyoksalu było trudne do zrozumienia z punktu widzenia termodynamiki, gdyż ciało to ulega szybkiej redukcji i szybko

przemienia się w komórkach w kwas mlekowy. Nowsze prace E m b d e n a (1933) i M e y e r h o f a (1933) wykazały, że w stanie normalnym nie występuje metyloglyoksal, lecz triozofosforany. Pod wpływem redukcji triozofosforany przechodzą w stan glicerofosforanów, a przez utlenianie w kwas fosfoglicerynowy. Pod wpływem hydrolizy ciała te dają glicerynę, kwas mlekowy lub pyrowinowy, spostrzegane podczas fermentacji. M e y e r h o f wykazał obecność równowagi odwracalnej, a nawet szybko odwracalnej (w ciągu minuty przy 20°), między kwasem heksozodwufosforowym i kwasem triozofosforowym, niezależnie od tego czy mamy do czynienia z produktami naturalnymi czy syntetycznymi. W obu tych razach niezbędna jest konieczność zacyzynów komórkowych. Środowisko komórkowe jest miejscem reakcji odwracalnych, w każdym bądź razie, bardziej odwracalnych od reakcji chemicznych, przebiegających „*in vitro*”.

9°. — Poprzednie pojęcia przyczyniły się do wyjaśnienia szeregu odosobnionych faktów, a nawet faktów nieznanych dotychczas, jak np.: stałej różnicy potencjału oksydoredukcyjnego, między fermentacją bakteryjno-mlekową i fermentacją alkoholowodrożdżową, potencjałów określonych przez zawieszenie drożdży w aerobiozie, semiaerobiozie, lub anaerobiozie (K l u y v e r. 1934), obecność glicerofosforanów w winie, ograniczone potencjały w Bac. Xylinum (M. C o z i c 1933), obecność kwasu askorbinowego we wszystkich owocach, zawierających kwas cytrynowy, brak kwasu askorbinowego w owocach zawierających kwas jabłkowy, tworzenie się tego kwasu w warunkach niby anaerobiozy i rozpad tegoż kwasu w środowisku aerobiozy, a nawet podczas fermentacji alkoholowej, bardzo słaba produkcja kwasu mlekowego w prawdziwej aerobiozie zarówno przez bakterje fermentacji mlekowej jak i przez mięśnie.

Barwniki zasadowe o potencji oksydoredukcyjnej wyższej od flawiny stymulują oddychanie komórek, zawierających małą ilość flawin (algii, zwierzęta bezkręgowce). Barwniki te nie wywierają wpływu na komórki, zawierające duże ilości flawin (drożdże, niektóre bakterje mlekowe).

Teoria potencji oksydoredukcyjnych stanowi obecnie podstawę mikrobiologii chemicznej, fizjologii komórki roślinnej i pojęć o witaminach rozpuszczalnych w wodzie. Teoria ta jest podstawą

naszych wiadomości o przemianie glucydowej. Niewiele jest teorii, któreby wyjaśniły w sposób równie syntetyczny dużą ilość faktów, o których wyżej mowa. Trzeba jednak przyznać, że szereg podstawowych faktów, potwierdzających teorię, uzyskano na drodze empirycznej.

Najbardziej zaciekawiającym było zestawienie faktów, które doprowadziły do wykrycia natury flawin. Zdążając do zidentyfikowania pewnego komórkowego połączenia fluoryzującego, do ustalenia pewnego barwnika żółtego, znajdującego się w częściach organicznych, zdążając do stwierdzenia natury witaminy rozpuszczalnej w wodzie, badanej od przeszło 20 lat, starając się zidentyfikować ciało tworzące bufor oksydoredukcyjny, pięć różnych szkół odkryło jedno i to samo. Każda z tych szkół badając odmienne własności tego ciała określała inną jego płaszczyznę.

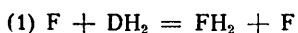
Nieprzeciętny sposób otrzymania jednego wyniku pozwala na obdarzenie biochemji pewnym zaufaniem, zwłaszcza biochemji opartej na termodynamice.

## ROZDZIAŁ II.

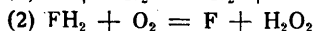
### WITAMINY B<sup>2</sup> I FLAWINY.

#### *Żółty pigment oddechowy Warburga.*

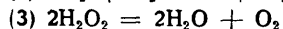
Pierwszego września 1932 r. Ottó Warburg (Instytut Królewski fizjologii komórkowej w Berlinie — Dalhem) ogłosił, iż odkrył nowy żółty ferment oddechowy z drożdży piwnych. Ferment ten posiada własności chwytania wodoru z heksozofosforanów, a zwłaszcza z heksozy jednofosforowej Robisona. W obecności tlenu lub powietrza ferment ten redukuje wodór, tworząc wodę utlenioną. Jeżeli drobinę barwnika żółtego oznaczyć literą F, a drobinę mogącą dać wodór przez  $DH_2$ , to odnośne reakcje, symbolizujące zjawisko to, można przedstawić w następujący sposób:



(Reakcja wolna)



(Reakcja szybka)



(Reakcja dosyć wolna)

Jeżeli na miejsce tlenu wprowadzić do tego środowiska błękit metylenowy, to reakcja będzie przebiegała w następujący sposób.



Tablica pierwsza odtwarza protokół doświadczenia wykonanego przez *W a r b u r g a*. Z protokołu tego wynika, że szybkość pochłaniania tlenu (Reakcja (2) ) czyli szybkość redukcji błękitu metylenowego (4) są równe sobie i niezależne od stężenia  $\text{O}_2$  lub Mb. Szybkość zjawiska jest regulowana odczynem (1). Co zaś do rozkładu wody utlenionej, to jest on niezupełny w obecności tlenu i nie występuje przy braku tlenu.

Mamy więc do czynienia z typowym fermentem oksydoredukcyjnym. Ferment ten nie działa sam, lecz wspólnie z fermentem wydobytym z drożdży i z kofermentem wydobytym z czerwonych ciałek krwi ssaków. Działanie żółtego fermentu na ten układ jest niezmiernie wyraźne.

### Tablica I

*Kataliza oksydacji heksozomonofosforanu pod wpływem działania żółtego fermentu oddechowego, kosztem  $\text{O}_2$  w postaci gazu i kosztem błękitu metylenowego.*

Każde naczynie (od 1 do 5) zawiera:

2 cm<sup>3</sup> kofermentu (wydobytego z krwi bawolej),

0,1 cm<sup>3</sup> fermentu pośredniego (wydobytego z drożdży),

0,9 cm<sup>3</sup> wody,

0,2 cm<sup>3</sup> heksozomonofosforanu potasu.

Zawartość żółtego fermentu oddechowego (flawiny) jest podana w  $\frac{1}{1000}$  mg fotopochodnej.

Tlen wchłaniany jest podany w dwóch postaciach:

1<sup>o</sup> w wartościach doświadczalnych, określanych manometrycznie;

2<sup>o</sup> w tych samych wartościach, z korekcją  $\text{H}_2\text{O}_2$ , rozłożonego przy pomocy katalazy.

|                       | Oksydacja O <sub>2</sub> |           |                     | Oksydoredukcja                               |  |
|-----------------------|--------------------------|-----------|---------------------|--|--|
|                       | 1                        | 2         | 3                   | 4  | 5  |
| Ferment żółty         | 0                        | 7γ        | 7γ                  | 7γ   | 0  |
| Błękit metylenowy     | 0                        | 0         | 0                   | 2 mg =<br>110 mm <sup>3</sup> O <sub>2</sub> | 2 mg =<br>110 mm <sup>3</sup> O <sub>2</sub> |
| Atmosfera             | Powietrze                | Powietrze | O <sub>2</sub>      | Argon  | Argon  |
| O <sub>2</sub> zużyty |                          |           | doś. odp. doś. odr. |  |  |
| 10'.....              | 0                        | 32        | 39                  | 31   | 38   |
| 20'.....              | 1                        | 70        | 85                  | 66   | 82   |
| 25'.....              | 2                        | 89        | 108                 | 85   | 106  |
| 40'.....              | 3                        | 130       | 156                 | 126  | 153  |
| 130'.....             | 4                        | 202       | 245                 | 198  | 241  |

} Odbarwienie } Brak odbarwienia  
 = 110 mm<sup>3</sup>O<sub>2</sub> } w ciągu  
 4 godzin

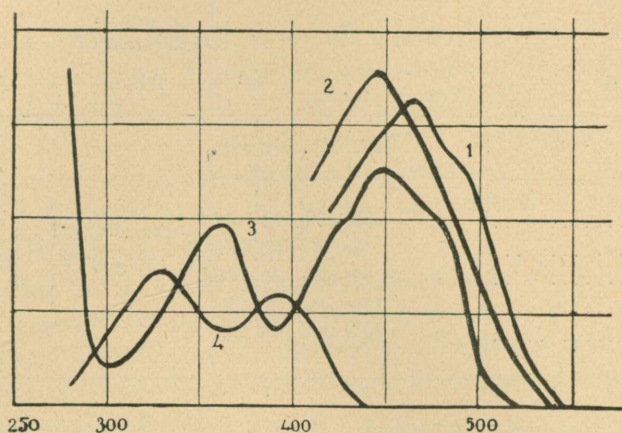
Kilka miesięcy przedtem Banga i Szent - György stwierdzili w buljonie drożdżowym i mięśniach żółty barwnik, który pod wpływem hyposulfitu ulega redukcji. Barwnik ten autorzy nazwali cytoflawem. Jednak barwnik ten nie posiada ani funkcji fizjologicznej, ani wzoru chemicznego.

Barwnik żółty Warburga przygotowuje się przez macerację drożdży lub też z buljonu drożdżowego, lub wreszcie przez zadziaływanie świeżych drożdży metylalem. Ten ostatni sposób pozwala na szybkie otrzymanie rozczynów fermentu.

Barwnik ten pod działaniem wody utlenionej, gąbki platynowej lub hydrosulfitu ulega redukcji i zamienia się na związek bezbarwny, pochodny mleczanów. Barwnik zredukowany odbarwia natychmiast błękit metylenowy, sam natomiast ulega reoksydacji. Barwnik ten pochłania pasmo fioletowe i indygo widma, przyczem najwyraźniej w pobliżu 475  $\mu\mu$ . stąd też i barwa jego żółta. (Ryc. 1 i 2).

Barwnik otrzymany przy pomocy macerowania drożdży jest związany z podłożem koloidalnem. Wystarczy zadziaływanie metanolem rozczyntu barwnego, aby strącić ciało białkowe, zawierające barwnik. Rozczyn alkoholowy posiada piękną barwę żółto-

cytrynową z bardzo ładną florescencją zieloną. Mała różnica widma, zależna od podłoża koloidalnego jest widoczna na ryc. 1. Efekt podłoża koloidalnego spostrzega się we wszystkich barwnikach biologicznych (chlorofil, hemina).

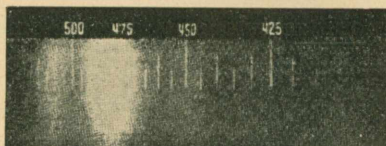


Ryc. 1.

Krzywe absorpcji laktoflawiny i jej pochodnych:

1. żółty ferment (laktoflawina na koloidzie),
2. laktoflawina krystaliczna,
3. fotopochodna albo lumiflawina,
4. kwas oksokarbonowy.

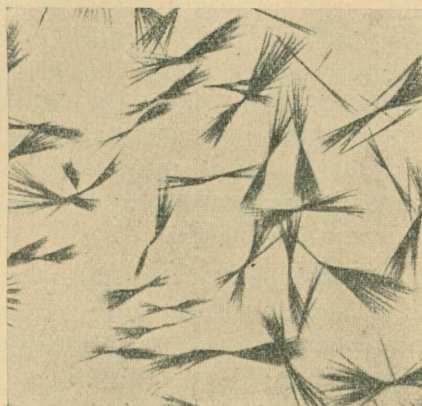
Jeżeli w środowisku alkalicznym (0,1n roztwór ługu sodowego) naświetlać barwnik przy pomocy silnej lampy rtęciowej lub na słońcu, to zamienia się on w ciągu kilku kwadransów. Powstaje pochodna prawie tej samej barwy lecz rozpuszczalna w chloro-



Ryc. 2.

Fotografia pasma absorpcyjnego żółtego fermentu. Odcinek między 450 i 475  $\mu\mu$  (Według Otto Warburga, 1932).

formie. Barwnik ten można wydobyć również przy pomocy chloroformu z roztworu zakwaszonego. Krystalizuje on łatwo; od września 1932 r. Warburg i Christian opublikowali szereg fotografii kryształów tych fotopochodnych. (Ryc. 3). W ten sposób po raz pierwszy uzyskano pochodną krystaliczną ważnego fermentu, odgrywającego dużą rolę w przemianie komórkowej. Trzynastego stycznia 1933 r. Warburg i Christian ogłosili



Ryc. 3.

Kryształy fotopochodnych (Lumiflawina).  
(Fotografia ogłoszona przez Warburga we wrześniu 1932 r.).

wzór chemiczny fotopochodnej:  $C_{13}H_{13}N_4O_2$  oraz punkt topności, wynoszący  $321^{\circ}$ . Szóstego lutego autorzy ci potwierdzili swe wyniki przy pomocy badań ilościowych leukopochodnej. Przy gotowaniu z wodorotlenkiem baru barwnik ten ulega hydrolizie i traci jedną drobinę mocznika. Szesnastego czerwca ciż autorzy ogłosili wzór ciała, uzyskanego przez hydrolizę barytową:  $C_{12}H_{12}N_2O_3$ ; jest to kwas oksokarbonowy bezbarwny. (Ryc. 1).

## WITAMINA B<sup>2</sup>.

Cechą najbardziej charakterystyczną związku Warburga jest jego chwiejność w środowisku zasadowym. Od roku 1926,

dzięki pracom R a n d o i n i S i m o n n e t wiemy, że kompleks zwany witaminą B<sub>1</sub>, zawiera conajmniej trzy ciała, różniące się swymi własnościami chemicznymi i fizjologicznymi.

a) Czynniki przeciwneurotyczne, działający leczniczo w przypadkach wielorakiego zapalenia nerwów u ptaków czyli witamina B<sup>1</sup>. Ciało to ulega zniszczeniu przez długotrwałe gotowanie lub nagrzewanie w autoklawie. Od tej pory ciało to było badane przez wielu autorów. W i n d a u s i R u h k o p f ustalili dla ciała tego, w roku 1932, następujący wzór: C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>N<sub>4</sub>OS. Ciało to posiada dwie funkcje zasadowe, jedną funkcję amidową i jedną grupę CS. Ciało to redukuje na gorąco płyn Fehlinga. Zawiera ono najprawdopodobniej jądro pyrimidynowe. W i n d a u s i jego uczniowie uzyskali z ciała tego liczne sole krystaliczne. Zarówno zasada jak i sole w dawkach 2 γ na dzień działają przeciwneurotycznie u szczurów i gołębi.

b) Czynniki zużytkowania glucydów. R a n d o i n i S i m o n n e t stwierdzili, że ciało to zostaje zniszczone przez gotowanie w środowisku zasadowym. W roku 1932 nieznanne jeszcze były wiadomości o budowie chemicznej czynnika B<sub>2</sub>. Wyciągi przygotowane przez C h i c k a, C o p p i n g a i R o s c o e wykazały aktywność na myszach w dawkach od 40 do 60 mg na dzień. D r u m m o n d i W h i t e ogłosili w roku 1932, nie podając przebiegu doświadczeń, że uzyskali preparaty aktywne już w dawkach 0,5 mg na dobę.

c) Czynniki komórkowy zużytkowania glucydów, wyraźnie różniący się od poprzedniego. R a n d o i n i S i m o n n e t wykazali, że czynnik ten jest odporny na gotowanie w środowisku zasadowym. Czynniki ten lub też może jeden ze składników tego czynnika, będącego kompleksem, jest adeniną (B<sup>4</sup> Anglików).

Ryszard K u h n, G y ö r g y i W a g n e r J a u r e g g (Laboratorium Chemii Instytutu Cesarza Wilhelma dla badań lekarskich w Heidelbergu) zidentyfikowali dnia 14 stycznia 1933 roku czynnik B<sup>2</sup>, zużytkowania glucydów, zmienny w środowisku zasadowym, z barwnikiem żółtym, który wydzielili początkowo według metody W a r b u r g a z drożdży, a następnie z rozmaitych środowisk, jak: z serwatki, z białka jaja kurzego, z żółtka jaja kurzego, ze szpinaku, z wątroby, z serca i nerek. Aktywność wi-

taminowa była określana przy pomocy metody Shermana i Bourquina. Kuhnowi i jego współpracownikom w krótkim czasie udało się przygotować krystaliczne formy pochodnych żółtego barwnika, pomijając hydrolizę alkaliczną. W ten sposób otrzymany związek, nazwali oni laktoflawiną. Związek ten posiada aktywny wpływ na rozrost białego szczura w dawkach bardzo małych. Zwierzątka te przybierają na wadze około 40 g w ciągu miesiąca, jeżeli do racji pokarmowej dodawać zaledwie 0,005 mg barwnika na dzień. Wynika stąd, że aktywność laktoflawiny jest tego samego rodzaju co i karotenu, oksematolu, krystalicznej witaminy B<sup>1</sup> Windausa. W następnych pracach Kuhn i jego współpracownicy potwierdzili pierwsze wyniki swych prac z 14 stycznia 1933 r. Karrer, Euler, Adler i MalMBERG dnia 18 sierpnia 1934 roku potwierdzili wyniki Kuhna i Wagner Jaurega.

Ci ostatni autorzy stosowali następujący skład racji pokarmowej:

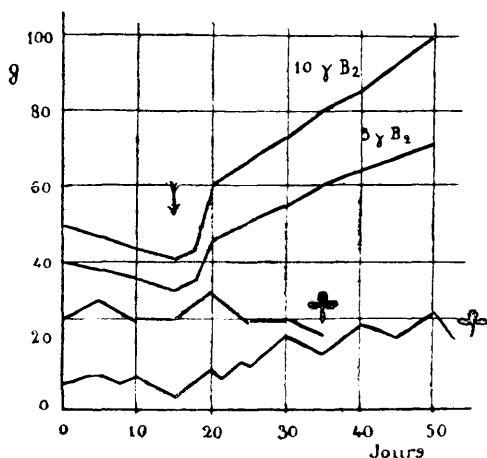
|                        |                    |
|------------------------|--------------------|
| Kazeiny                | 100 g              |
| Krochmalu ryżowego     | 300 g              |
| Orzeszków arachidowych | 65 g               |
| Mieszanki soli         | 25 g               |
| Tranu                  | 10 cm <sup>3</sup> |
| Soku cytrynowego       | 10 cm <sup>3</sup> |

Racja powyższa była uzupełniana czynnikami B<sup>4</sup> i Y — Chicka i Coppinga, przez dodanie buljonu z drożdży, w którym witamina B<sup>2</sup> była usunięta przy pomocy frankonitu. Sprawdzianem usunięcia czynnika B<sup>2</sup> jest zmiana barwy i fluorescencji roztworu. Przy takim pokarmie młode szczury padały w ciągu 30 do 40 dni. Aby uzyskać normalny wzrost, wynoszący 1 g na dzień, wystarczy dodać 0,005 mg różnych flawin.

Następujące flawiny były poddane badaniu:

|   |         |
|---|---------|
| Ovoflawina białka jaja kurzego w ilości | 0,005 „ |
| Ovoflawina żółtka jaja kurzego w ilości | 0,005 „ |
| Laktoflawina serwatki w ilości          | 0,005 „ |
| Hepaflawina z wątroby bawołu w ilości   | 0,005 „ |
| Flawina roślinna w ilości               | 0,005 „ |
| Flawina ze słodu w ilości               | 0,006 „ |

Flawiny różnego pochodzenia, podlegające różnym przeróbkom, wykazują jednakowe działanie fizjologiczne. W serwatce flawina występuje w części pod postacią dializującą, jako laktoflawina, w części zaś utrwała się ona na proteinie koloidalnej i nie dializuje. Przy jednakowej zawartości barwnika witamina jest równie aktywna pod postacią dyfuzyjną jak i pod postacią koloidalną.



Ryc. 4.

Wpływ laktoflawiny krystalicznej na wzrost szczura.  
(Doświadczenie Karrera sierpień 1934 r.).

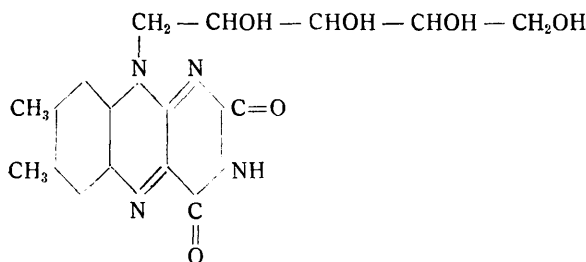
Dwie krzywe dolne odnoszą się do diety próbnej.

Dwie krzywe wyższe odpowiadają 5  $\gamma$  lub 10  $\gamma$  laktoflawiny krystalicznej.

## FLAWINY.

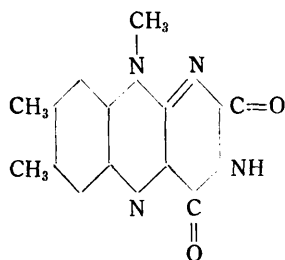
Kuhn i jego współpracownicy byli zajęci w roku 1933 i 1934 ustaleniem chemicznego składu różnych flawin przez nich wydzielonych. Autorzy nie znaleźli różnic między flawinami różnego pochodzenia. Narazie będziemy nazywali, łącznie z autorami, laktoflawinami te flawiny, które były wydzielone początkowo z mleka, a które są prawdopodobnie identyczne lub bardzo zbliżone do flawin wydobytych z drożdży. Z 5400 litrów serwatki otrzymano 1 g laktoflawiny krystalicznej, o wzorze  $C_{17}H_{20}N_4O_6$ , z punktem topienia  $274^\circ$ . Pod wpływem hydrolizy alkalicznej,

przy świetle, związek ten wydziela ciało o zawartości  $C_{14}$ , bardzo zbliżone do cukru. Pozostaje fotopochodna  $C_{13}H_{12}N_4O_2$ , którą *Kuhn* nazwał lumiflawiną. Wzór ogłoszony przez *Warburga* 13 stycznia 1933 r. różnił się tylko o 1 wodór. W roku 1934 *Kuhn* i jego współpracownicy dokonali syntezy tego barwnika. Praca odnośna była ogłoszona w dwóch częściach, pierwsza 25 lipca 1934 r. i druga, bardziej szczegółowa, 23 października 1934 roku. Zaledwie dwa lata upłynęły od czasu pierwszej publikacji *Warburga* o nowym składniku podstawowym komórki do chwili syntetycznego otrzymania tegoż ciała. *Kuhn*, *Reinemund* i *Weygand* 25 lipca 1934 r. ogłosili następujący wzór dla laktoflawiny:



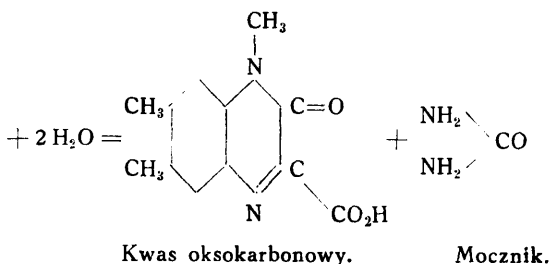
Ciało to składa się zasadniczo z jednego jądra z  $C_{12}$  i z 4 atomów azotu, tworząc aloksazynę. Do jednego z atomów azotu jest przyczepiona drobina pentozy. W jądrze z  $C_{12}$  znajduje się jądro benzenowe, zawierające dwie grupy metylowe w pozycji orto.

Przez hydrolizę zasadową, przy świetle, pierścień cukrowy ulega przerwaniu między grupami  $\text{CH}_2$  i grupą  $\text{CHOH}$  i pozostaje lumiflawina czyli fotopochodna *Warburga*, którą *Kuhn* identyfikował z trójmetyloflawiną. 6. 7. 9.  $C_{13}H_{12}N_4O_2$ . o wzorze:

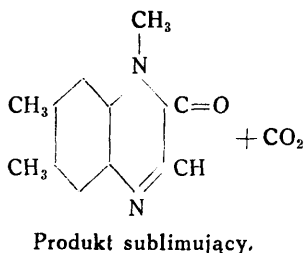


Lumiflawina.

Przez działanie barytem na gorąco tworzy się kwas oksokarbonowy z zatrzymaniem dwóch drobin wody i zwolnieniem jednej drobinicy mocznika. Ta charakterystyczna reakcja została zaobserwowana przez **W a r b u r g a** i opisana dnia 6 lutego 1933 r.



Kwas oksokarbonowy nagrzewany powyżej swego punktu topienia ulega dekarboksylacji i daje charakterystyczny produkt sublimacji.

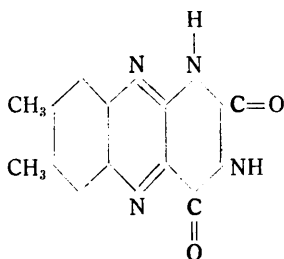


**K u h n** i jego współpracownicy ogłosili w lipcu 1934 roku syntezę lumiflawiny, kwasu oksokarbonowego i produktu jego sublimacji. Poniżej podajemy punkty topliwości produktów naturalnych i produktów syntetycznych oraz punkty topienia mieszanin obu tych produktów. Identyeczność wszystkich trzech punktów topnienia, zarówno dla produktu jak i dla dwóch charakterystycznych pochodnych, wskazuje na identyeczność produktu naturalnego z produktem syntetycznym.

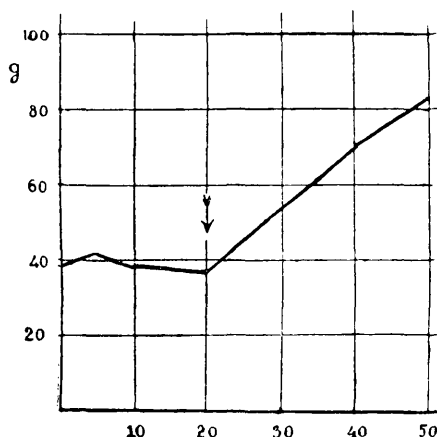
|                              | P R O D U K T Y |             |                |
|------------------------------|-----------------|-------------|----------------|
|                              | naturalny       | sentetyczny | mieszanina obu |
| Lumiflawina . . . . .        | 320—321°        | 321—322°    | 320—321°       |
| Kwas oksokarbonowy . . . . . | 204°            | 205°        | 204—205°       |
| Produkt sublimacji . . . . . | 167—168°        | 169—170°    | 168—169°       |

Kuhn i Reinemund otrzymali bez trudu 19 g lumiflawiny według reakcji, wykazujących wydajność 92 do 96%, to jest wyjątkowo dużo. Tak więc mamy do czynienia z nowym ciałem o dużym znaczeniu biologicznym, którego synteza nie przedstawia dla dobrego organika zasadniczych trudności.

Karrer, Salomon, Schopp, Schlitter i Fritsche opisali 12 lipca 1934 r. produkt rozpadu laktoflawiny, otrzymany przez naświetlania tego ciała w środowisku kwaśnym. Produkt ten został nazwany lumichromem, o następującym wzorze.



We wzorze tym widoczne jest przerwanie łańcucha cukrowego laktoflawiny na wysokości atomu azotu, w wyniku czego pozo-

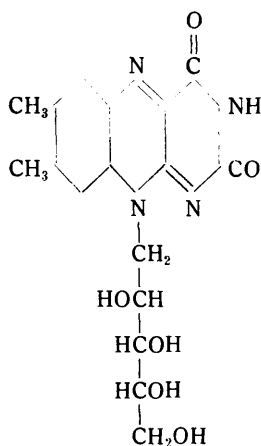


Ryc 5.

Wpływ syntetycznej witaminy B<sub>2</sub> na rozrost szczurów. Ciało to zostało dodane w chwili oznaczonej strzałką. (Rycina zaczerpnięta z pracy Kuhna dn. 15.XI.1934).

staje 6.7 dwumetyloaloksazyna —  $C_{12}H_{10}O_2N_4$  czyli lumichrom. Kuhn i Rudy 23 października 1934 r. potwierdzili powyższy wzór, zastrzegając sobie pierwszeństwo ogłoszenia rozpadu flawiny w środowisku kwaśnym, przy świetle, z jednoczesnym tworzeniem się pochodnej bezbarwnej w środowisku kwaśnym.

16 listopada 1934 roku Kuhn i Weygand ogłosili syntezę witaminy B<sub>2</sub>. Przygotowali oni ciało o takim samym wzorze centezymalnym jak i laktoflawina, w którym grupa cukrowa była podstawiona przez arabinozę. Ciało to posiadało następujący wzór rozwinięty:



Nota. Według notatki ogłoszonej przez Karrera, Schöppa i Benza (15.II.1935) cukier zawarty w witaminie jest ribozą.

Synteza „ryboflawiny“ została dokonana i jej czynność witaminowa została sprawdzona przez Eulera.

Ciało acetylowe posiada własności, w odniesieniu do szczurów, witaminy B<sub>2</sub> w dawce 15  $\gamma$  na dzień. Ze stosunku między układem chemicznym i własnościami witaminowymi wynikają następujące wnioski:

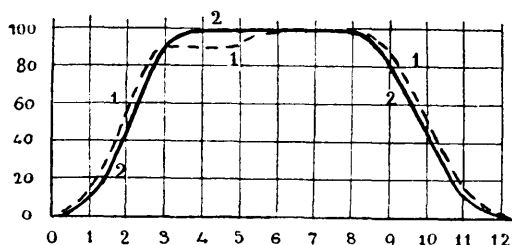
1<sup>o</sup> Pochodne niecukrowe, jak lumichrom, lumiflawina, nie posiadają działania witaminowego.

2<sup>o</sup> Pochodne niemetylowe jądra benzenowego lecz cukrowe, jak  $C_{15}H_{16}N_4O_6$ , również nie posiadają działania witaminowego (w ilości conajmniej 50  $\gamma$  na dzień).

3<sup>o</sup> Grupy hydroksylowe cukru nie potrzebują być wolne, gdyż pochodna czteroacetylowa jest aktywna.

Własności witaminowe są więc związane z jądrem o  $C_{12}$  w połączeniu z grupami metylowymi pod warunkiem, że jądro to posiada łańcuch boczny, dający pochodne rozpuszczalne w wodzie. K u h n przygotował serję ciał zbliżonych do laktoflawiny, w której grupa cukrowa jest reprezentowana przez ksylozę lub inne cukry, lub przez rodnik amyłowy i t. p. Jednak autor ten nie ogłosił jeszcze ciał tych jako czynników witaminowych.

„Zagadnienie witamin” będące na początku zagadnieniem medycyny doświadczalnej, stało się obecnie zagadnieniem chemii doświadczalnej.



Ryc. 6.

Wahania fluorescencji flawin w odniesieniu do funkcji pH.

Krzywa pierwsza: laktoflawina.

Krzywa druga: lumiflawina.

Flawiny charakterystyczne posiadają własności fizyczne.

Laktoflawina, wskutek obecności grupy cukrowej, rozpuszcza się szybko w wodzie i nie rozpuszcza w tych rozpuszczalnikach, które nie zawierają oksyhydrilu. Ciało to strąca się z trudnością z powyższych rozczyń. Nie ulega również adsorbcji za wyjątkiem frankonitu, ziemi foluszowej w środowisku kwaśnym. Obraz spektralny laktoflawiny jest podany na ryc. 1, przyczem ciało to w stanie zupełnego wydzielenia absorbuje mniej promieni długofalowych niż toż samo ciało w stanie koloidalnym. Laktoflawina posiada piękną fluorescencję żółtą w świetle W o o d a. Przy pH poniżej 3 i powyżej 10 fluroscencja ta znika (Ryc. 6)

Ginie ona również przy redukcji. Dzięki tym własnościom łatwo jest określić flawinę w złożonych mieszaninach biologicznych. Natomiast fluorescencja nie ulega zmianom po dodaniu formolu lub kwasu bromooctowego, w ilości wystarczającej dla zablokowania funkcji zasadowych lub też jodu w ilości wystarczającej do utlenienia funkcji SH w danym środowisku. Wynika stąd, że ciało to jest dosyć trwałe. Flawinę wolną łatwo jest oddzielić od flawiny koloidalnej przy pomocy dializy. Lumiflawina i lumichrom rozpuszczają się w rozpuszczalnikach chlorowcowych jak chloroform i trójchloretylen. Łatwo więc jest wydostać je ze środowisk biologicznych, przez zakwaszenie kwasem octowym. Jeżeli środowisko jest bardzo zabarwione, to naświetla się środowisko alkalizowane, a następnie wydobywa się lumiflawinę przy pomocy chloroformu w środowisku octowym, tak jak to czynili w dużej ilości przypadków K u h n, W a g n e r, J a u r e g g i K a l t s c h m i t t. Tablica II wykazuje ilość laktoflawiny, określonej powyższym sposobem w zasadniczych środowiskach biologicznych.

Lumichrom różni się od lumiflawiny fluorescencją. Podczas gdy lumiflawina posiada fluorescencję barwy żółtej, to fluorescencja lumichromu jest niebieska. Z drugiej strony lumichrom jest prawie bezbarwny w środowisku kwaśnym przy pH poniżej 5; pełnego zabarwienia nabiera dopiero przy pH powyżej 8.

Dzięki wiadomościom powyższym udało się K u h n o w i i j e g o współpracownikom zestawić pewien bilans witaminy B<sup>2</sup> i flawiny znajdujących się w naturze.

a) Tworzenie się flawin u zwierząt zależy od pokarmów roślinnych. Krowa zjada dziennie około 7 kg siana, zawierającego około 50 mg flawiny. Produkuje ona 7 do 15 litrów mleka, zawierającego 10 do 15 mg flawiny. Wynika stąd, że ustrój zwierzęcia zachowuje lub niszczy 80% flawiny.

b) Wątroba np. nie posiada innej witaminy B<sup>2</sup> jak tylko flawinę. 0,2 do 0,4 g na dzień wątroby wystarczy dla szczura dla utrzymania w równowadze ilości witaminy B<sup>2</sup>. 0,2 do 0,4 g wątroby zawiera 0,003 do 0,006 flawiny, przeliczonej na laktoflawinę krystaliczną. Nie zgadza się to z dawką krystalicznej flawiny, niezbędnej dla szczura. Stąd wniosek, że laktoflawina nie jest prowitaminą, lecz właściwą witaminą.

## TABLICA II.

*Zawartość laktoflawiny w ważniejszych środowiskach biologicznych.*

Ilość podana w tysiącach mg laktoflawiny krystalicznej w 1 kg świeżego produktu.

|                          |                                   |       |
|--------------------------|-----------------------------------|-------|
| Tkanki roślinne . . . .  | Świeży szpinak . . . . .          | 570   |
|                          | Suszona lucerna . . . . .         | 7166  |
|                          | Otręby żytnie . . . . .           | 330   |
|                          | Wyciąg słodowy . . . . .          | 2100  |
| Organy zapasowe . . . .  | Kartofle . . . . .                | 75    |
|                          | Marchew . . . . .                 | 200   |
| Owoce . . . . .          | Banan obrany . . . . .            | 75    |
|                          | Morela . . . . .                  | 570   |
|                          | Sok pomarańczowy . . . . .        | 90    |
|                          | Sok winogronowy . . . . .         | 60    |
|                          | Sok pomidorowy . . . . .          | 710   |
| Napoje fermentowane      | Piwo . . . . .                    | 290   |
|                          | Białe wino (Pfalz 1933) . . . . . | 81    |
|                          | " " " " . . . . .                 | 125   |
| Drożdże . . . . .        | Drożdże suszone . . . . .         | 18000 |
|                          | Vitox . . . . .                   | 33000 |
|                          | Cenovis . . . . .                 | 43000 |
| Tkanki zwierzęce . . . . | Wątroba świeża wołowa . . . . .   | 16000 |
|                          | Wątroba świeża szczurza . . . . . | 15000 |
|                          | Mleko pełne . . . . .             | 1000  |
|                          | Serwatka . . . . .                | 450   |
|                          | Mocz ludzki . . . . .             | 75    |

## LYOCHROMY.

11 stycznia 1933 r., na trzy dni przed pierwszą publikacją Kuhna, György'ego i Wagnera - Jauregga, Filip Ellinger i Koschara (z laboratorium farmakologicznego Wydziału Lekarskiego Uniw. w Düsseldorfie) opisali pod nazwą lyochromu, żółty barwnik, który wydobyli w ilości 8 mg, w stanie krystalicznym, z 10 litrów serwatki. Barwnik ten w świetle Wo-

da fluoryzował z odcieniem żółto-zielonym. Autorzy zidentyfikowali barwnik ten z pigmentem oddechowym żółtym, opisanym przez Warburga 1 września 1932 r. Ogłoszona przez tych autorów krzywa absorbcyjna jest zbliżona do krzywej Warburga. Autorzy ci pierwsi wykazali przy pomocy mikroskopu do płynów fluoryzujących obecność pigmentu w żywych komórkach, przed zadziałaniem chemicznym. Pigment ten został przez autorów powyższych stwierdzony w komórkach wątroby i nerek: żaby, szczura, myszy, człowieka i psa. Odnośna publikacja o jakości związku pochodzi z roku 1929. Pożywienie zawierające duże ilości protyd zwiększa zawartość lyochromu, pożywienie zawierające małe ilości protyd zmniejsza zawartość lyochromu w tkankach. W wątrobie fluorescencja występuje w stanie rozlanym, natomiast jest utrwalona na drobinach komórek nabłonkowych kanalików moczowych. Wątroba zawiera więcej lyochromu niż nerka. Zbyt mało wagi przypisywano badaniom cytologicznym, które poprzedziły odkrycie witaminy B<sup>2</sup> i flawin. Jest to wyjątkowy fakt, że uczonemu udało się wykryć w tkance żywej flawiny dzięki ich fluorescencji i wysledzić ich rolę fizjologiczną.

Zasługą autorów z Düsseldorfu jest wykrycie w roku 1932 preparatu chemicznego barwnika fluoryzującego zanim cośkolwiek wiadomo było o własnościach fizycznych witaminy B<sup>2</sup> i zanim został stworzony nowy termin naukowy o flawinach. Autorzy ci odkryli również adsorbcję barwnika przez ziemię foluszową w środowisku kwaśnym i jej następczy rozkład przez pirydynę. Autorzy ci ogłosili również skład barwnika. Nie podejrzewali oni zależności między przez nich wynalezionym lyochromem i witaminą B<sup>2</sup>, którą w trzy dni później ogłosił Kuhna. Dnia 27 kwietnia 1933 r. Ellinger i Koscharr stwierdzili identyczność ich ciała z preparatami opisanymi przez Kuhna pod ogólną nazwą flawin. W następstwie wspólnego porozumienia postanowiono nazywać w dalszym ciągu lyochromami żółte barwniki komórkowe, rozpuszczalne w wodzie. Określenie to jest symetryczne do lipochromów, które grupuje barwniki karotenoidalne lipidów. Pod nazwą flawin są zgrupowane wydzielone barwniki, będące w stanie krystalicznym. Nazwy te są podawane łącznie z nazwą ciała ich pochodzenia: laktoflawina — z mleka, urofla-

wina — z moczu, owoflawina — z jajka, maltoflawina — ze sło-  
du i t. p.

Ellinger i Kosch ara ogłosili 27 kwietnia 1933 r. szereg fotografii kryształów laktoflawiny. Byli oni pierwszymi, którzy otrzymali krystaliczną witaminę B<sup>2</sup>. Autorzy ci podali nawet 3 odmiany kryształów, których skład centezymalny różni się w dużej mierze, od laktoflawiny Kuhna (C<sub>19</sub>H<sub>18</sub>O<sub>12</sub>N<sub>14</sub> zamiast C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>O<sub>4</sub>N<sub>4</sub>). W tym okresie swych prac autorzy posiadali preparaty, które zawierały laktoflawinę w połączeniu z proteinami. Kuhn sprawdził, że produkty otrzymane w grudniu 1932 r. przez badaczy z Düsseldorfu posiadają również, wprawdzie w dawce dosyć dużej, bo wynoszącej 0,1 mg na dzień, własności witaminy B<sup>2</sup>.

28 sierpnia 1933 r. Ellinger i Kosch ara opisali laktoflawinę prawie identyczną z flawiną Kuhna, o podobnym punkcie topnienia, 274°, o składzie zbliżonym do C<sub>16</sub>H<sub>20</sub>O<sub>8</sub>N<sub>4</sub>. Punkt topnienia był dokładniejszy od punktu topnienia tymczasowego, ogłoszonego przez Kuhna 20 czerwca tegoż roku (267°).

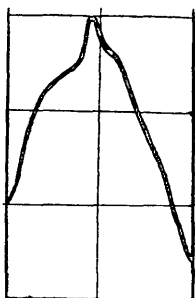
24 marca 1934 r. Kosch ara opisał szczegółowo uroflawinę. Autor ten otrzymał przy pomocy adsorbcji specjalną ziemią (florydyna), następnego strącenia pirydyną i ostatecznego oczyszczenia, z 1700 litrów moczu ludzkiego 50 mg ciała krystalicznego, o punkcie topliwości 272°. Własności optyczne, barwa i fluoryzacja są identyczne z laktoflawiną Kuhna. Zarówno jeden jak i drugi autor używali, posługując się światłem Wooda, metodę chromatograficzną adsorbcji na florydynie, zdążając do zupełnego oddzielenia barwnika fluoryzującego.

Prace z Düsseldorfu, wcześniejsze lub równoległe z pracami z Heidelberga wzajemnie zgadzają się. Flawiny są składnikami powszechnymi komórek, widocznymi w komórkach żyjących w stanie częściowego utlenienia (pigment zredukowany nie fluoryzuje). Obecność stała flawin w mleku, moczu i we krwi wskazuje, że komórki nasze są jakgdyby stale zanurzone w roztworze flawin.

## ODDYCHANIE BAKTERJI BEZTLENOWYCH.

Flawina tworzy pigment oksydoredukcyjny, który odgrywa rolę w komórkach zwierzęcych i roślinnych. Rolę tę można określić

przy pomocy potencjału oksydoredukcyjnego. Zagadnienie to będziemy jeszcze rozważali w rozdziale o potencjałach oksydoredukcji. W grupie bakterji beztlenowych żółty pigment spełnia rolę pigmentu oddechowego. Odnośne badania zostały ogłoszone przez Warburga w roku 1933 i 1934. Stwierdzono, że w bakterji mlecznej, *B. Delbrückii* niema czerwonego pigmentu oddechowego o podstawie heminowej. Spostrzeżenie to może być

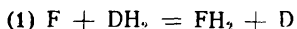


Ryc. 7

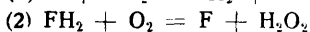
Widmo flawiny z *Clostridium butyricum*. Widmo dotyczy gęstej zawiesiny bakterji w anaerobiozie.

potwierdzone albo na drodze spektroskopowej przez brak charakterystycznych pasm heminy w widmie absorbcyjnym gęstej zawiesiny bakteryjnej, lub też na drodze biochemicznej, przez wykazanie, że oddechanie bakteryjne nie jest wstrzymane ani przez KCN, ani przez tlenek węgla. Jeżeli gęstą zawiesinę bakterji oglądać pod światło, to stwierdza się zabarwienie żółte, trwające dotąd, dopóki bakterje są w zetknięciu z powietrzem. Zabarwienie to znika z chwilą wstrzymania dopływu tlenu. Widmo absorbcyjne żółtego pigmentu zbiega się z widmem flawiny, jak to wykazuje ryc. 7.

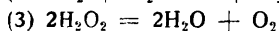
Tak więc w aerobiozie flawina jest w części pod postacią utlenioną. W anaerobiozie jest ona zredukowana. W anaerobiozie odnosi się wrażenie, że ma się do czynienia z utlenieniem zredukowanej flawiny przez tlen atmosferyczny. Utlenienie to przebiega z jednoczesnym tworzeniem się wody utlenionej, która wtórnie i niezupełnie zostaje rozszczepiona na wodę i tlen. W tym miejscu mają zastosowanie, w odniesieniu do istot żywych, równania umieszczone na początku tego rozdziału i odnoszące się do układu stworzonego przez fermenty. Jeżeli pożywienie dające wodór oznaczyć przez  $DH_2$ , gdzie D jest postacią oksydowaną, flawinę przez F i leukopochodną przez  $FH_2$ , to otrzyma się następujące trzy reakcje:



(Reakcja wolna).

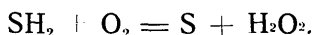


(Reakcja szybka)



(Reakcja dosyć wolna)

Tworzenie się wody utlenionej podczas oddychania bakterji zostało stwierdzone po raz pierwszy przez Bertho i Glücka w roku 1932. Autorzy ci wykazali jednocześnie brak hemochromogenu i inhibicji przez KCN i CO. Fakty powyższe przemawiają na korzyść teorii oddychania Wielanda, zwłaszcza gdy Warburg i Christian wykazali w roku 1933 obecność żółtego fermentu i jego rolę w oddychaniu. Wieland uznaje aktywację bezpośrednią substratu, oznaczonego SH<sub>2</sub> i jego utlenienie według równania:



Wieland odrzuca w swem równaniu i w swych spostrzeżeniach konieczność katalizatora, któryby znajdował się między dawcą i tlenem atmosferycznym. A właśnie ten katalizator jest niezbędny w tem zjawisku. Brak katalizatora w odżywianiu zarówno bakterji jak i u kręgowców, prowadzi do śmierci. Faktu tego nie można uważać za szczegół obojętny.

### TABLICA III

#### *Zawartość żółtego pigmentu (flawiny) w różnych ustrojach.*

Wyciąg metanolowy. Zawartość w mg fotopochodnej.  
(Lumiflawina C<sub>13</sub> H<sub>12</sub> N<sub>4</sub> O<sub>2</sub>) w odniesieniu do 1 kg suchych komórek.

|   |     |
|---|-----|
| Fermenty octowe ( <i>Bacterium Pasteurianum</i> ) | 10  |
| Drożdże piekarskie                                | 24  |
| Drożdże piwne ( <i>Schultheiss-Patzenhofer</i> )  | 20  |
| Fermenty mlekowe ( <i>Bacterium Delbruckii</i> )  | 77  |
| Fermenty masłowe ( <i>Clostridium butyricum</i> ) | 91. |
| Według Warburga i Christiana 1933.                |     |

Warburg i Christian zgruba określali w roku 1933 ilość żółtego fermentu w różnych drobnoustrojach. (Tabl. III). Najmniejszą ilość tego fermentu zawierają bakterje octowe, które nie rozkładają cukrów i które nie wywołują fermentacji. Większą ilość fermentu zawierają drożdże piwne, drożdże piekarskie, które stoją nieco wyżej od poprzednich co do ilości fermentów. Beztlenowe bakterje mlekowe zawierają jeszcze większą

ilość żółtego fermentu, a przodują wszystkim fermenty masłowe. Warburg i Christian otrzymali ferment z bakterji masłowych i podali krzywą absorbcji, która praktycznie zbiegła się z krzywymi innych próbek żółtego barwnika.

Należy podkreślić, że bakterje mlekowe i masłowe należą do gatunku bakterji beztlenowych nie rozwijających się w zetknięciu z tlenem. Zjawisko oddychania tych bakterji jest zjawiskiem niezmiernie ciekawem z punktu widzenia biochemicznego. Zjawisko to nie jest normalne pod względem fizjologicznym, gdyż oddychanie przy pomocy flawiny stoi na przeszkodzie do rozwoju bakterji.

### ROZDZIAŁ III.

#### CYTOCHROM I FERMENT ODDECHOWY.

##### 1. — *Cytochrom Keilina.*

W roku 1925 Keilin opisał pod nazwą cytochromu różowy barwnik zbliżony do heminy, widoczny w żywej tkance w warstwach dostatecznie grubych (kilku mm). Drożdże piekarskie, mięśnie skrzydłowe niektórych insektów nadają się najbardziej do obserwacji. Przy przepuszczaniu silnego światła przez warstwę 3 mm grubości drożdży piekarskich otrzymuje się światło o pięknym kolorze różowym, z odcieniem zbliżonym do normalnego zabarwienia różowego skóry, oświetlonego tejże siły światłem. Proste to doświadczenie, mogące być demonstrowane przed audytorjum, wykazuje obecność pochodnych heminy w komórkach drożdży.

Cytochrom Keilina jest to pigment opisany już w roku 1886 przez Mac Munną pod nazwą histo-hematyny i myo-hematyny. Autor ten spostrzegł u kręgowców i bezkręgowców nie posiadających w swej krwi hemoglobiny, czerwony pigment, którego widmo jest zbliżone do widma heminy krwi. Pigment ten po redukcji posiada cztery pasma absorbcji bardzo wyraźne. W roku 1887 Mac Munn opisał metodę przygotowania „myo-hematyny“, a właściwie pochodnej bezpośredniej myo-hematyny, z mięśni piersiowych gołębia wykrwionego. Z pochodnej tej przy-

gotował on kwaśną hematynę i hematoporfirynę różną od pochodnych hemoglobiny. Mac Munn doszedł do wniosku, że jest to oddechowy pigment komórkowy, różniący się od hemoglobiny, będący prekursorem filogenezy i ontogenezy hemoglobiny. Wnioski Mac Munn'a zostały ostro skrytykowane w roku 1889 przez Hoppe Seylera i jego ucznia Levy'ego. Mac Munn został oskarżony, według klasycznej tradycji, o wzięcie pod rozważanie mieszaniny licznych pochodnych hemoglobiny. W ciągu 40 lat, według silnego wyrażenia Warburga, „nauka nie wierzyła w egzystencję myohematyny”.

Keilin potwierdził więc prace swego poprzednika, przytaczając je zresztą. Zasługą tego autora jest również wykazanie, że cytochrom znaduje się nie tylko u zwierząt, lecz i u roślin, u bakterii tlenowych (*B. subtilis*), u wyższych roślin (korzenie, bulwy, cebulki), u drożdży i wreszcie i wszystkich grzybów. Keilin wykazał, że spotyka się dwie postacie: postać utlenioną i postać zredukowaną oraz że barwnik ten należy uważać jako powszechny pigment oddechowy. Keilin rozszerzył znacznie wartość i znaczenie odkrycia Mac Munn'a i zaproponował nadać tej kategorii pigmentów nazwę cytochromów. Nazwa ta od razu została przyjęta. Myohematyna Mac Munn'a są to odmiany cytochromów tak jak laktoflawina i owoflawina są poszczególnymi przykładami lyochromów, karotenu, likopenu i ksantofil przykładami lipochromów.

Keilin uzupełnił pracę Mac Munn'a niezależnie od rozpowszechnienia na wszystkie komórki tlenowcowe.

1° Wykazał on, że w większości komórek znajduje się nie tylko jeden, lecz trzy cytochromy, bardzo zbliżone do siebie, których jednak pasma absorbcyjne są różne.

2° Hematyna cytochromu jest ściśle związana ze specjalnymi ciałami azotowymi.

3° Każdy z trzech cytochromów różni się od innych równocześnie przez swą hematynę zabarwioną i przez swój podkład azotowy koloidalny.

Widmo zredukowanego cytochromu składa się z trzech pasm zasadniczych w żółtej i zielonej części widma, wyraźnie odróżniającej się, określonej przez Keilina literami a, b i c oraz

z trzech mniejszych pasm, mniej wyraźnych, umiejscowionych w niebieskiej części widma, oznaczonych przez Keilina wspólną literą d. Trzy pasma a, b c należą do trzech różnych składników, natomiast każde z trzech drobnych pasm oznaczonych literą d należą do jednego ze składników. Wynika stąd, że mamy do czynienia z trzema cytochromami a, b i c.

Powyższe przypuszczenia znajdują potwierdzenie w następujących faktach:

1° Przy porównaniu równych komórek położenie pasma a, b i c jest prawie jednakowe. Małe różnice mogą być zależne od różnic w stanach koloidalnych, natomiast natężenie trzech pasm jest zmienne i różne w zależności od komórki. Raz b jest silniejsze od c, innym znów razem jest słabsze. Pasma a ulega zmianom niezależnie od pasm b i c.

2° Podczas utleniania różne pasma giną jedno niezależnie od drugiego. Można więc otrzymać kombinacje a, c, d lub c, d.

|                       | 500   | 550 | 600   | 650 $\lambda$ |
|-----------------------|-------|-----|-------|---------------|
|                       | d     | c   | b     | a             |
| <i>Bac. subtilis</i>  | 521   |     | 566   | 603,2         |
| Drożdże               | 519   | 549 | 564   | 603,5         |
| Cebula                | 519   |     | 564   | 603,5         |
| Mięsień pszczoły      | 521   |     | 566,5 | 604,6         |
| Serce żaby            | 520,5 |     | 566   | 604           |
| Serce świnki morskiej | 520,5 |     | 566   | 604,5         |

Ryc. 8

Pasma absorbcyjne zredukowanego cytochromu różnych komórek.

(Wedł. Keilina 1932)

3° Przy skłócaniu komórek z uratanem i w zetknięciu z powietrzem, pasma a i c znikają, pasmo b pozostaje lub występuje mocniej.

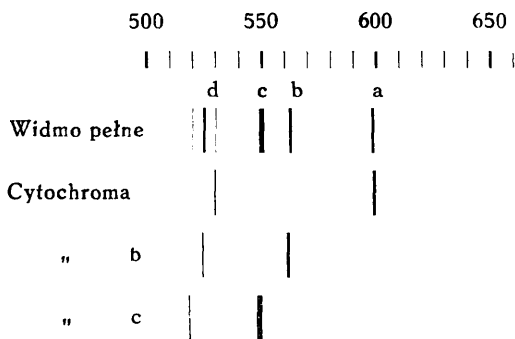
4<sup>o</sup> Jeden ze składników, cytochrom c może być wydzielony i oddzielnie badany w roztworze. Wykazuje on tylko pasma c i d.

Rycina 8 wykazuje układ pasm absorbcyjnych zredukowanego cytochromu w różnych komórkach roślinnych i zwierzęcych. Ryc. 9 wykazuje rozkład pasm wśród trzech cytochromów w mięśniach skrzydłowych pszczoły, wreszcie ryc. 10 wykazuje krzywą absorbcji zupełnej cytochromu c. Na rycinie tej widać grube pasmo absorbcyjne w miejscu błękitu; przy badaniu subiektywnym pasmo to jest mało wyraźne, natomiast przy pomiarach spektrofotometrycznych daje się określić zupełnie wyraźnie. Keilin, któremu zawdzięczamy wszystkie te dane, starał się określić rolę fizjologiczną cytochromu. Autorowi temu udało się stwierdzić, że:

1<sup>o</sup> Cytochrom zredukowany nie ulega autooksydacji. Utlenia się on niezmiernie wolno przy energicznym skłócaniu roztworu w zetknięciu z powietrzem. Nie reaguje z tlenem drobinowym. Sole żelazowe i pochodne hematyny autooksydującej się nie utleniają cytochromu.

2<sup>o</sup> Cytochrom nie łączy się z tlenkiem węgla, a zwłaszcza w środowisku kwaśnym, obojętnym lub słabo zasadowym.

3<sup>o</sup> Cytochrom występuje jako przypuszczalny zbiornik wodoru wewnątrz komórki. Cytochrom, tak jak i flawiny posiada potencję oksydoredukcyjną swoistą, o której będziemy mówili dalej. Cytochrom jest tylko dodatkiem w oddychaniu komórkowym.



Ryc. 9.

Różnica między cytochromami a, b i c w mięśniach skrzydełkowych pszczoły.  
(Według Keilina).

Keilin przypuszcza, że układ oddechowy komórkowy składa się conajmniej z trzech charakterystycznych elementów:

1° Z „oksydazy”, reagującej z tlenem drobinowym. W rzeczywistości ta „oksydaza” lub „oksygeneza” jest czerwonym pigmentem oddechowym, Warburga.

2° Cytochromu, który ulegając redukcji, może magazynować wodór. Cytochrom nie może sam przez się i bezpośrednio ulec utlenieniu tak samo, jak i ulec bezpośredniej redukcji.

3° Z „deshydrogenazy”, odrywającej wodór z substratu. Jako typ tego rodzaju deshydrogenazy może być wskazana witamina B<sup>2</sup> lub żółty ferment Warburga, o czym mówiono w poprzednich rozdziałach.

Keilin otrzymał z mięśnia sercowego posiekanego, przez dłuższy czas przemywanego, mielonego z piaskiem i jeszcze raz przemytego, preparat nierozpuszczalny, który nazwał „oksydazą”. Preparat ten posiada własność katalizowania oksydacji parafenylendwuaminy. Przez dodanie cytochromu C „oksydaza” Keilina utlenia bardzo szybko cysteinę. Utlenianie to ulega zahamowaniu pod działaniem KCN N/1000, Na<sub>2</sub>S N/100, wreszcie CO z chwilą kiedy stosunek CO : O<sub>2</sub> = 8. Doświadczenia te ogłoszone w roku 1929 i 1930 odtwarzają *in vitro*, wraz z fermentem mało określonej „oksydazy”, doświadczenia opisane przez Warburga w 1926, dotyczące żywej komórki nieuszkodzonej. Fakt, że „oksydaza” Keilina utlenia tylko parafenylendwuaminę, a nie pochodne orto i meta, że nie utlenia polifenolów, że ulega zniszczeniu przy nagrzewaniu do 60° lub przy zamrażaniu, nie zwiększa zakresu wiadomości o niej. Harrison w roku 1931 wydestał z wątroby różnych zwierząt deshydrogenazę. Deshydrogenaza wspólnie z cytochromem i oksydazą Keilina utlenia glukozę kosztem tlenu powietrza. Doświadczenie to może być punktem wyjścia do badań „*in vitro*”, główniejszych zjawisk oddechania komórkowego. Badania nad utlenianiem parafenylendwuaminy, polifenolu, tyrozyny nie wyjaśniły zagadnienia oddechania komórkowego. Prace szkoły Batelli i Stern, Chodat ogłoszone w latach 1910 — 1920 ustępują dzisiaj pracom ostatnio ogłoszonym o komórkach i ich oddechaniu.

(Dokończenie nastąpi).

# SPRAWOZDANIE Z DRUGIEJ KONFERENCJI DLA STANDARYZA- CJI WITAMIN

odbytej w Londynie w dn. 12—14 czerwca 1934 r. \*)).

## WSTĘP.

*Konferencja międzynarodowa dla standaryzacji witamin, w której udział wzięła większość autorów niniejszego raportu, odbyła się w Londynie w czerwcu 1931 roku pod protektoratem stałej Komisji standaryzacji biologicznej przy wydziale Higjeny Ligi Narodów. Według sprawozdania, ogłoszonego w roku 1931<sup>1)</sup>, pierwsza konferencja przyjęła prowizorycznie, na przeciąg 2-ch lat jednostki i wzorce międzynarodowe witaminy A, B<sub>1</sub>, C i D. Ponieważ niektóre z tych wzorców zostały dostarczone zainteresowanym dopiero w roku 1932, przeto postanowiono zwołać drugą konferencję dopiero w roku 1934. Konferencja ta miała zrewidować wyniki pierwszej, opierając się na dwuletniej praktyce stosowania wzorców tymczasowych.*

*Dziedzina standaryzacji witamin została ostatnio wzbogacona licznymi danymi doświadczalnymi, które posłużyły obecnej konferencji do ustalenia swych w tej dziedzinie poglądów.*

<sup>1)</sup> „Rapport de la Conference internationale pour la standardisation des vitamines”, Série de Publications de la Société des Nations, document C. H. 1055 (1), Genewa, 1931.

\*) Wobec dużego zainteresowania w świecie lekarskim zagadnieniami o witaminach, redakcja uważa za celowe podanie wyników ostatniej Konferencji dla standaryzacji witamin, zaczerpniętych z „Bulletin Trimestriel de l'Organisation d'Hygiène” — 1934, vol. III, Nr. 3, str. 450, w przekonaniu, że przyczyni się do zaznajomienia czytelnika ze sposobami doboru, przygotowania wzorców i określania aktywności niektórych ważniejszych witamin.

*Zalecane wzorce i jednostki nie mogą nadal być nazywane prowizorycznymi. Zapewne, dzięki postępowi wiedzy, zajdzie potrzeba zmodyfikowania ich w przyszłości. Narazie zbyteczne jest wyznaczanie okresu próbnego, jak to miało miejsce uprzednio.*

*Nadejście niezadługo chwila, gdy złożona metoda określania aktywności witamin w preparacie, polegająca na porównywaniu jego aktywności z aktywnością wzorca, będzie uważana za przestarzałą. W przyszłości aktywność ta będzie mogła być wyrażona ilością czystej witaminy, zawartej w preparacie. Konferencja jednak uznała za stosowne ustalić w dalszym ciągu aktywność czterech witamin, o których mowa w niniejszym raporcie, metodami biologicznymi, polegającymi na porównaniu z wzorcem o znanej aktywności, i to nawet w tych przypadkach, w których substancje o wysokiej aktywności otrzymane są w stanie czystym, pozwalającym na ściśle ich mianowanie sposobami chemicznymi i fizycznymi.*

*Sprawozdanie niniejsze, podobnie jak poprzednie z roku 1931, dotyczy wzorców i jednostek jedynie witamin A, B<sub>1</sub>, C i D. Wysuwano możliwość analogicznej standaryzacji witamin B<sub>2</sub> i E. Jednak ze względu na słabe wiadomości o nich i o zjawiskach patologicznych spowodowanych ich brakiem, żadnych decyzji w tym względzie nie powzięto.*

*Wzorce witamin A i C zostały zmienione, gdyż wybrane w roku 1931 posiadały poważne braki, utrudniające ich zastosowanie. Postęp stanowi tu przyjęcie jako wzorców ciał chemicznych lepiej określonych i łatwiejszych do otrzymania.*

*Wzorzec witaminy B<sub>1</sub> okazał się w praktyce zupełnie zadowalającym. „National Institute for Medical Research” w Londynie posiada, jako główna składnica tego wzorca zapas, wystarczający na szereg lat. Z tego względu nie wydawało się pożądanym zamienić dotychczasowy wzorzec na czystsze produkty witaminy B<sub>1</sub>.*

*Wzorzec witaminy D pozostaje również bez zmian. Zastrzeżono jednak, że w razie gdyby dotychczasowy zapas został wyczerpany, lub gdyby przestał być zadowalający, to zostanie zastąpiony przez odpowiedni roztwór krystaliczny witaminy D. Zauważono niedawno pewną nieprawidłowość w działaniu antirachitycznym preparatów u pewnych gatunków zwierząt, zawie-*

*rających jednakową ilość jednostek międzynarodowych witaminy D. Te nieprawidłowości, krótko wzmiankowane w sprawozdaniu, będą prawdopodobnie powodem ponownej dyskusji w celu określenia czy obecny wzorzec witaminy D jest wystarczający wobec zdobytych ostatnio doświadczeń.*

*We wszystkich przypadkach jednostki pozostają te same. O ile zachodzi zmiana substancji wzorcowej, to zostaje do niej przystosowane określenie dawnych jednostek. Utrzymanie jednostek ustalonych przez Konferencję z roku 1931 było tembardziej wskazane i konieczne, że niektóre z nich zostały przyswojone przez farmakopeję niektórych krajów.*

*W ciągu ostatnich lat, większość członków Konferencji przeprowadziła badania w dziedzinie standaryzacji witamin. Obok nich liczni badacze różnych krajów przyczynili się swemi badaniami, zgodnie z zaleceniami Konferencji z roku 1931 i dostarczyli obecnej Konferencji obfitego materiału. Bez ich cennej współpracy obecna Konferencja nie byłaby w stanie przeprowadzić swego zadania z tak korzystnym wynikiem.*

## RAPORT KONFERENCJI.

### *Lista uczestników.*

*Przewodniczący:* Dr. E. Mellanby, sekretarz „Medical Research Council of Great Britain”. Londyn.

Prof. J. C. Drummond, Prof. biochemji w „University College” w Londynie.

Prof. H. von Euler, Prof. biochemji Uniwersytetu w Sztokholmie.

Prof. L. S. Fridericia, dyrektor Instytutu Higjenu przy Uniwersytecie w Kopenhadze.

Prof. B. C. P. Jansen, Prof. chemji fizjologicznej na Uniwersytecie w Amsterdamie.

Prof. P. de Mattei, dyrektor Instytutu Farmakologii na Uniwersytecie w Pawji.

Dr. E. Nelson z „Bureau of Chemistry and Soils”, z Departamentu Rolnictwa Stanów Zjedn. w Waszyngtonie.

Prof. E. P o u l l s o n, dyrektor Instytutu Państwowego witaminowego w Oslo.

Pani G. L. R a n d o i n, dyrektorka Pracowni Fizjologii i Odżywiania przy Szkole Wyższych Studjów i przy Ministerstwie Rolnictwa w Paryżu.

Prof. H. S t e e n b o c k, Prof. chemji rolniczej na Uniwersytecie w Wisconsin.

Prof. A. S z e n t - G y ö r g y i, dyrektor Instytutu Chemji Lekarskiej przy Uniwersytecie w Szeged (Węgry).

Dr. H. C h i c k z „Lister Institute of Preventive Medicine“ w Londynie.

Dr. W. R. A y k r o y d, członek Sekcji Higjeny  
Sekretarjatu Ligi Narodów.

} Sekretarze  
} Techniczni

Brali udział w zebraniach:

Dr. M. H. B r o w n z „Connaught Laboratories“ z Toronto.

Dr. K. H. C o w a r d, z Laboratorjum T-wa Farmaceutycznego Wielkiej Brytanji, Londyn.

H. H. D a l e, dyrektor „National Institute vor Medical Research“, Londyn.

Dr. P. H a r t l e y, z „National Institute vor Medical Research“, Londyn.

Miss E. M. H u m e, z „Lister Institute of Preventive Medicine“, Londyn.

Dr. A. J u n g, z Instytutu Chemji Fizjologicznej przy Uniwersytecie w Bazyleji.

Dr. R. M e n d e z, z Instytutu Technicznego Farmakobiologii w Madrycie.

Dr. R. A. M o r t o n, z Instytutu Chemji przy uniwersytecie w Liwerculu.

Prof. R. A. P e t e r s, prof. Biochemji na Uniwersytecie w Oksfordzie.

Dr. O. R o s e n h e i m, z „National Institute vor Medical Research. Londyn.

Dr. M. T s u r u m i, członek Komitetu Higjeny Ligi Narodów (Japonja).

M. T. A. W e b s t e r, z „National Institute vor Medical Research“. Londyn.

Dr. S. S. Z i l v a, z „Lister Institute of Preventive Medicine“. Londyn.

Konferencję zagał Sir George Buchanan, witając uczestników w imieniu Komitetu Higjeny, następnie Sir Henry H. Dale, podał w krótkich zarysach postępy uzyskane na terenie międzynarodowym, w dziedzinie standaryzacji witamin.

## I. — WITAMINA A.

### a) Wzorzec międzynarodowy.

Konferencja zaleca przyjęcie karotenu  $\beta$ , jako wzorca międzynarodowego witaminy A. Substancja wzorcowa powinna

odpowiadać własnościom fizycznym i chemicznym, podanym w nocie 1.

b) *Definicja jednostki.*

Konferencja zaleca utrzymać nadal w mocy wartość jednostki witaminy A, ustaloną prowizorycznie przez Konferencję z roku 1931. Jednostka ta jest zawarta w 0,6 mikrograma (0,6  $\gamma$ ) czystego karotenu  $\beta$ .

Proponuje się więc przyjąć za jednostkę międzynarodową witaminy A wartość, odpowiadającą 0,6 mg (0,6  $\gamma$ ) międzynarodowego preparatu wzorcowego.

Stwierdzono, że dzienne dawki od 2 do 4 jednostek międzynarodowych witaminy A, podawane młodym szczurom, będącym na odpowiedniej djece ubogiej w witaminę A, są dostateczne do przywrócenia wzrostu. Do wyleczenia kseroftalmji potrzebne są dawki nieco wyższe.

c) *Sposób przygotowania.*

Poleca się, aby Organizacja Higjeny Ligi Narodów zaopatrzyła się w próbę karotenu  $\beta$ , określoną przez konferencję (nota 1) i aby „Institute for Medical Research“ w Londynie, działający jako Centralne Laboratorium Komitetu Higjeny Ligi Narodów, podjął się przechowywania i wydawania otrzymanego w ten sposób wzorca międzynarodowego witaminy A.

d) *Wydawanie wzorca.*

Konferencja zaleca, aby międzynarodowy preparat wzorcowy był wydawany pod postacią roztworu olejowego, o takim stężeniu, aby 1 g zawierał 500 jednostek międzynarodowych, albo 300 mikrogramów ( $\gamma$ ) karotenu  $\beta$  (patrz notę 2).

e) *Ustalenie wzorca pomocniczego.*

Konferencja zaleca, aby próba tranu o działaniu ściśle określonym, w porównaniu z preparatem międzynarodowym wzorcowym karotenu  $\beta$ , była wydawana jako wzorzec zastępczy.

Wzorzec tranu, według Farmakopei Stanów Zjedn., który

został mianowany zgodnie z wzorcem międzynarodowym prowizorycznym, przyjętym w roku 1931, jest już od pewnego czasu używany w Stanach Zjednoczonych. Konferencja zaleca, aby poczynić odpowiednie kroki w Komisji Farmakopei Stanów Zjednoczonych dla uzyskania pewnej ilości wzorcowego tranu do dyspozycji Organizacji Higieny Ligi Narodów, dla użytku międzynarodowego tego tranu jako wzorca zastępczego dla witaminy A.

Gdyby tran wzorcowy Farmakopei Stanów Zjednoczonych nie mógł być dostarczony dla celów międzynarodowych, konferencja zaleca wybór innej próby tranu i ściśle określenie aktywności w stosunku do międzynarodowego preparatu wzorcowego karotenu  $\beta$  przy pomocy metody biologicznej i pomiarów spektrofotometrycznych i przyjęcie tej próby jako zastępczy, międzynarodowy wzorec witaminy A.

f) *Próby spektrofotometryczne dla mianowania witaminy A w tranie i płynach skoncentrowanych o dużej aktywności.*

Stwierdzono, że w pewnych warunkach, metoda dosyć pewna określenia ilości witaminy A, zawartej w tranach i roztworach stężonych tejże witaminy może być oparta na współczynniku absorpcji (E) przy długości fali  $\lambda = 328 \text{ m}\mu$ . Dla przeliczenia otrzymanych wartości dla  $E \frac{1\%}{1 \text{ cm}} 328 \text{ m}\mu$  na liczbę jednostek międzynarodowych witaminy A, zawartych w 1 g badanej substancji, należy przyjąć jako współczynnik liczbę 1600 (nota 3).

#### Nota 1.

*Własności czystego karotenu* ( $\text{C}^{40}\text{H}^{56}$ ).

- a) Temperatura topnienia, 184—184,5°.
- b) Optycznie nieczynny.
- c) Widmo absorbcyjne wykazuje pasma:
  - w siarczku węgla przy 519, 485,5 m  $\mu$  ;
  - w chloroformie przy 495, 465 m  $\mu$  ;
  - w cykloheksanie przy 486, 465 m  $\mu$  ;

#### Nota 2.

*Własności oliwy, używanej do roztworu:*

Oliwa używana do przygotowywania roztworu wzorcowego karotenu  $\beta$  do rozcieńczenia wzorca i do mianowania biologicznego witaminy A, winna być

oliwą roślinną bezbarwną, niezawierającą witaminy A, pozwalającą na łatwe wchłanianie przez przewód pokarmowy karotenu podawanego w roztworze zwierzętom doświadczalnym. Dla zapewnienia stałości oliwy, należy dodać do niej 0,01 na 100 hydrohinonu, działającego jako środek przeciwutleniający.

Dla stwierdzenia, czy oliwa przeznaczona jako rozpuszczalnik jest zdalna do powyższego użytku, należy ją poddać następującej próbie: przygotowuje się roztwór 0,003% karotenu  $\beta$  w oliwie i roztwór ten porównuje się barwą z roztworem 0,5% dwuchromianu potasu; 6 mg roztworu karotenu w oliwie umieszcza się w próbówce z płaskim dnem (5 cm  $\times$  2 cm), zatkaanej korkiem w ten sposób, aby pozostała wolna przestrzeń powietrzna pojemności około 6 cm<sup>3</sup>. Próbkówka jest przechowywana przy temp. 37° C, w ciemności w ciągu 7 dni. Następnie zabarwienie roztworu jest porównane z zabarwieniem roztworu wzorcowego dwuchromianu potasu. Jeżeli utrata barwy nie przekracza 10%, to oliwa taka może być uważana za odpowiednią do powyższych celów. Stwierdzono, że niektóre próbki oliwy otrzymanej z orzecha kokosowego odpowiadają powyższym warunkom.

### Nota 3.

#### *Próby spektrofotometryczne.*

a) Określenie winno być dokonane na części niezmydlającej się pod warunkiem że aktywność substancji nie przewyższa 10.000 jednostek międzynarodowych na gram.

*Metoda zmydlania.* — Ponieważ różnice pomiędzy wynikami otrzymanymi przy różnych sposobach zmydlania mogą być duże, wskazane jest posługiwanie się następującą metodą, dającą przekonujące wyniki.

1 g oliwy zmydla się 10 cm<sup>3</sup> roztworu alkoholowego półnormalnego KOH, świeżo przygotowanego i doprowadzonego do wrzenia aż do otrzymania roztworu przezroczystego (niezbędny czas wynosi około 5 min.). Po dodaniu 20 cm<sup>3</sup> wody płyn przelewa się do małej zlewki. Płyn ten poddaje się ekstrakcji przez dwukrotne dodawanie 25 cm<sup>3</sup> eteru (nie zawierającego nadtlenu). Rozczyny eterowe są przemywane naprzód wodą (10—20 cm<sup>3</sup>) poczem 10—20 cm<sup>3</sup> KOH półnormalnem, poczem jeszcze raz wodą. Do celów powyższych mieszaninę wprowadza się w ruch umiarkowany rotacyjny, nie wstrząsając zlewką. Następnie roztwór eterowy energicznie wstrząsa się dwukrotnie z 10 cm<sup>3</sup> wody i przesącza do kolbki. Po oddestylowaniu eteru reszta jest rozpuszczona w pewnej ilości alkoholu etylowego lub cykloheksanu w ilości niezbędnej do otrzymania stężenia zależnie od pojemności naczynia. Wstępna próba oliwy pierwotnej wskazuje na ilość oliwy potrzebnej do rozpuszczenia.

b) Jako rozpuszczalnika należy używać czystego alkoholu etylowego, lub cykloheksanu diaktynowanego. Dla celów analizy spektroskopowej cykloheksan winien posiadać następujące własności:  $d_{40}^{20} = 0,7784$ . Temperatury

ra wrzenia: 81,4°. Temperatura topnienia: 6,5°. Winien być prawie przezroczysty w pobliżu 328 m $\mu$  i nie wykazywać śladów absorpcji przerywanej.

c) Zdolność absorpcji przy 328 m $\mu$  może być określona ze ścisłością około 2,5%, przez jakąkolwiek uznaną metodę spektrofotometryczną.

d) Czynniki 1600 jest średnią cyfrą otrzymaną z serii porównań niezależnych, dotyczących części niezmydlającej się tranu i płynów o dużej aktywności witaminy A. Jeżeli cyfra, wskazująca aktywność biologiczną preparatu została określona przy pomocy powyższego obrachunku, to fakt ten należy zaznaczyć.

## II. — WITAMINA B<sub>1</sub>.

### a) Wzorzec międzynarodowy.

*Konferencja potwierdza jako wzorzec międzynarodowy, produkt absorpcji witaminy B<sub>1</sub>, sporządzony w laboratorium medycznym w Batawji (na Jawie), metodą Seidella, opisaną przez Jansena i Donatha.*

### b) Terminologia.

Międzynarodowy preparat wzorcowy nosi nazwę „Wzorcowy produkt, absorbujący witaminę B<sub>1</sub>”.

### c) Sposób przygotowania.

Wzorzec międzynarodowy został przygotowany z otrąb ryżowych, które zalano wodą, zakwaszoną kwasem siarkowym do pH: 4,5. Do roztworu dodano 0,2% kwasu salicylowego z toluenem w celu usunięcia działania bakterji. Po dwóch dniach macerowania, mieszaninę odsączono. Na każde użyte początkowo 100 kg otrąb ryżowych dodano 3 kg ziemi foluszowej (specjalnie wybranej spowodu jej zdolności absorpcyjnych) i mieszaninę wstrząsano przez 24 godziny. Po przefiltrowaniu, ziemię foluszową przemyto wodą, alkoholem i wysuszono. 3 kg ziemi foluszowej adsorbowało tyle witaminy B<sub>1</sub>, ile jej znajduje się w 100 kg otrąb ryżowych.

d) *Określenie jednostki.*

Jednostka międzynarodowa, zalecana przez Konferencję, odpowiada aktywności biologicznej witaminy B<sub>1</sub>, zawartej w 10 mg adsorbentu wzorcowego.

Dzienna dawka 10 do 20 mg tego preparatu jest potrzebna dla zachowania normalnego wzrostu młodego szczura, poddanego dżecie pozbawionej witaminy B<sub>1</sub>, lecz pełnej pod innymi względami. Dzienna dawka lecznicza dla gołębia (wagi 300 g) ze skróconą główką w następstwie dżety, składającej się z polerowanego ryżu, wynosi około 10 do 30 mg (metoda Kinnersley'a i Petersa). Wzorzec zawiera witaminę B<sub>1</sub> i małe ilości witaminy B<sub>2</sub>.

e) *Miejsce wydawania.*

Adsorbat wzorcowy witaminy B<sub>1</sub> jest przechowywany przez „National Institute for Medical Research” w Londynie, działający w tym wypadku jako Centralne Laboratorium Komitetu Higjeny Ligi Narodów.

Preparat ten przechowuje się bez specjalnych ostrożności w miejscu suchym. W wilgoci produkt ulega zepsuciu pod wpływem bakteryj.

f) *Zalecenia w związku z nowymi badaniami.*

Działanie adsorbentu wzorcowego powinno być określone w odniesieniu do działania preparatów krystalicznych witaminy B<sub>1</sub> obecnie rozporządzalnych, aby w przyszłości można było użyć czystą krystaliczną witaminę B<sub>1</sub> jako wzorzec międzynarodowy.

Niżej wyszczególnionym badaczom, którzy wyosobnili podobne preparaty krystaliczne, poleca się przeprowadzenie tego porównania zapomocą metod biologicznych, zazwyczaj przez nich używanych:

Prof. B. C. P. J a n s e n, Amsterdam;

Prof. R. A. P e t e r s, Oksford;

Dr. A. S e i d e l l, Waszyngton;

Prof. U. S u s u k i, Tokio;

Dr. R. R. W i l l i a m s, Nowy Jork;

Prof. A. W i n d a u s, Getynga.

W dalszych poszukiwaniach należałoby zbadać porównawczy efekt stosowania parenteralnego i doustnego.

Co do adsorbatu, to należałoby zbadać przygotowanie odpowiednich wyciągów.

### III. — WITAMINA C.

#### a) *Wzorzec międzynarodowy.*

*Konferencja zaleca przyjęcie kwasu askorbinowego lewoskrętnego jako wzorzec międzynarodowy.* Jeśli chodzi o właściwości chemiczne i fizyczne, substancja wzorcowa winna odpowiadać wymaganiom podanym w nocie 4.

#### b) *Określenie jednostki.*

Konferencja proponuje przyjąć jako jednostkę witaminy C wartość, odpowiadającą aktywności witaminy C, w 0,05 mg kwasu askorbinowego lewoskrętnego.

Jednostka ta przedstawia około 1/10 dziennej dawki zapobiegającej wystąpieniu poważnych zmian gnilcowych, spostrzeganych makroskopowo u młodego szczura, poddanego dziecie gnilcotwórczej.

#### c) *Sposób przygotowania.*

Za pośrednictwem Prof. Szent-Györgyi postanowiono polecić Instytutowi Chemji Lekarskiej w Szeged dostarczenie 500 g preparatu wzorcowego i uzyskać współpracę Prof. W. W. Haworth'a z Uniwersytetu w Birmingham, dla sprawdzenia stopnia czystości substancji wzorcowej.

#### d) *Miejsce wydawania.*

Konferencja postanowiła polecić „National Institute for Medical Research” w Londynie, występującemu w charakterze Centralnego Laboratorium Komitetu Higieny Ligi Narodów, zajęcie się przechowaniem i wydawaniem wzorca witaminy C.

e) *Sposób użycia.*

Wzorzec może być przechowywany w temperaturze pokojowej w zatopionej rurce lub w desykatorku bez dostępu powietrza. Bezpośrednio przed codziennym podaniem doświadczalnemu zwierzęciu, potrzebna ilość substancji wzorcowej winna być rozpuszczona w wodzie przedestylowanej w aparacie szklanym, świeżo przygotowanej i ochłodzonej.

## Nota 4.

*Własności wzorca witaminy C.*

Preparat wzorcowy kwasu askorbinowego lewoskrętnego powinien posiadać następujące własności:

a) Temp. topnienia  $192^{\circ}$  (bez poprawki, określona w otwartej rurce kapilarnej) bez znacznieszego ściemnienia przed stopnieniem.

b) Skręcalność:  $\left[ \alpha \right]_{\text{D}}^{20^{\circ}} = + 20^{\circ} 0$  w wodzie (Koncentr. = 14,0 g na 100)

$\left[ \alpha \right]_{\text{D}}^{20^{\circ}} = + 22^{\circ} 4$  w wodzie (Koncentr. = 2,2 g na 100).

c) Widmo absorbcyjne roztworu wodnego lekko zakwaszonego charakteryzuje się jednolitem, wyraźnym pasmem z maximum przy  $\lambda = 245 \text{ m } \mu$ . Współczynnik przeistoczenia cząsteczkowego dla roztworu 20 mg na litr wynosi 10.000. (Kwas askorbinowy powinien być rozpuszczany w wodzie destylowanej, która się gotowała, z dodatkiem 0,1 cm<sup>3</sup> kwasu siarkowego normalnego na 100 cm<sup>3</sup> wody).

d) 10 mg kwasu askorbinowego lewoskrętnego powinno zużyć 11,4 cm<sup>3</sup> roztworu wodnego jodu  $\frac{\text{N}}{100}$  przy użyciu skrobi jako wskaźnika.

e) Substancja powinna być wolna od popiołu i rozbiór elementarny powinien odpowiadać wzorowi: C<sup>6</sup>H<sup>8</sup>O<sup>6</sup>. Substancja ta krystalizuje normalnie w formie płytek prostokątnych przy nieprzerwanym procesie przeistoczenia i wysokiej podwójnej refrakcji.

$n_a 1,47 \pm 0,005$  } dla linii D sodowej.  
 $n_b 1,68 \pm 0,005$  }

## IV. — WITAMINA D.

a) *Wzorzec międzynarodowy.*

*Konferencja zaleca, aby roztwór wzorcowy ergosterolu naświetlanego, przygotowany i wydawany przez „National Insti-*

*tute for Medical Research*“ w Londynie, został utrzymany jako wzorzec międzynarodowy witaminy D.

Gdyby obecny roztwór wzorca międzynarodowego został wyczerpany, lub gdyby, dla jakichkolwiek przyczyn, przestał być odpowiedni, Konferencja postanawia, że zostanie zastąpiony roztworem czystej krystalicznej witaminy D (calciferol). Roztwór ten zostanie przygotowany na oliwie oliwkowej w takiej koncentracji, aby 1 mg zawierał 0,025 mikrograma ( $\gamma$ ) krystalicznej witaminy D (określenie krystalicznej witaminy D w noście 5).

#### b) *Określenie jednostki.*

Jednostka witaminy D, zalecona do przyjęcia przez Konferencję z 1931 r., winna być utrzymana bez zmiany. Zostaje więc ona określona jako wartość, posiadająca działanie witaminy D, odpowiadające jednemu miligramowi międzynarodowego roztworu wzorcowego ergosterolu naświetlanego. Roztwór ten odpowiada 0,025 mikrograma ( $\gamma$ ) krystalicznej witaminy D.

Dla określenia zawartości witaminy D w preparacie i wyrażenia jego aktywności w jednostkach międzynarodowych, należy przeprowadzić oznaczenia porównawcze na szczurach. Jeśli oznaczenie to przeprowadza się na innych zwierzętach, nie można wtedy otrzymanych wartości wyrażać w jednostkach międzynarodowych. (patrz punkt d).

#### c) *Sposób wydawania.*

„National Institute for Medical Research“, działający jako *Centralne Laboratorium Komitetu Ligi Narodów*, winien być proszony o zajęcie się, jak i uprzednio, przechowywaniem i wydawaniem wzorca międzynarodowego witaminy D. Sposób wydawania ustalony przez Konferencję z 1931 r. pozostanie utrzymany bez zmiany zarówno gdy chodzi o wydawanie posiadanego roztworu wzorcowego, lub też roztworu krystalicznej witaminy D, który będzie mógł w przyszłości zastąpić roztwór wzorcowy.

d) *Zalecenia w związku z nowymi badaniami.* — *Tran jako wzorzec pomocniczy witaminy D.*

Konferencja przyjmuje, że określone ilości tranu i ergosterolu naświetlanego, zawierające jednakową ilość jednostek witaminy D, określonych na szczurach, mogą posiadać niejednakowe działanie przeciwkrzywiczne, o ile je określa się na innych gatunkach zwierzęcych, np. na kurach. Stosowanie tranu jako drugorzędnego wzorca jest powszechne i w wielu krajach tran używany jest jako wzorzec. Jednak, wobec tego, że stosowanie tranu jako wzorca międzynarodowego witaminy D, wymagałoby przechowywania go w bardzo dużych ilościach, Konferencja nie poleca przyjęcia wzoru tranu jako zastępczego wzorca międzynarodowego witaminy D.

Konferencja zaleca natomiast, aby odpowiednie ośrodki państwowe przygotowały wzory tranu o znanej aktywności witaminy D, przeznaczone do wydawania badaczom danych krajów jako wzorce zastępcze. W celu utrzymania jednakowej wartości jednostki międzynarodowej, działanie witaminy D w tych tranach winno być porównane z działaniem wzorca międzynarodowego, na podstawie oznaczeń na szczurach; wartość tych próbek winna być określona w jednostkach międzynarodowych. Poleca się, aby dzięki zdobytemu doświadczeniu przy używaniu tranu, jako wzorca zastępczego, postarano się wyświetlić nienormalności w działaniu witaminy D różnego pochodzenia u pewnych gatunków zwierząt. Poleca się również, aby członkowie Konferencji współpracowali w tym względzie w swoich krajach.

#### e) *Metody biologiczne dla oznaczenia witaminy D.*

Poleca się przy zastosowaniu międzynarodowego roztworu wzorcowego do oznaczania działania przeciwkrzywicznego preparatów nieznanymi, użycie co najmniej dwudziestu szczurów w jednym wieku i jednakowej wagi, a nawet większą ilość szczurów, podając jednej połowie szczurów preparat wzorcowy, a drugiej połowie — preparat nieznanymi. Przy zachowaniu tej ostrożności można zastosować bądź metodę ochronną, bądź też metodę leczenia.

## Nota 5.

a) *Własności krystalicznej witaminy D* (calciferol albo witamina D<sup>2</sup>),  
 $C_{28}H_{48}OH$ :

Kryształy iglaste bezbarwne i bez zapachu. Temp. topnienia: 114,5—117°C (rurka kapilarna otwarta).

b) *Skręcalność:*

W alkoholu  $[\alpha]_D^{20} = + 101$  do  $+ 102,5^{\circ}$ ;  $[\alpha]_{5461}^{20} = + 119$  do  $+ 122^{\circ}$

W chloroformie  $[\alpha]_D^{20} = + 52^{\circ}$ ;  $[\alpha]_{5461}^{20} = + 62^{\circ}$ .

c) *Widmo absorbcyjne:* widmo absorbcyjne w alkoholu (albo w innych używanych rozpuszczalnikach nie absorbujących) przedstawia krzywą regularną z maximum przy  $E \frac{1 \text{ cm}}{1\%}$  265 m  $\mu$  470 do 485.

# DMELCOS

**SWOISTA SZCZEPIONKA DO LECZENIA  
 WRZODU MIĘKKIEGO  
 (ULCUS MOLLE)**

**oraz środek dopełniający leczenie rzeżączki.**

Dożylnie co 2 — 3 dni — 1 amp., poczynając od  $\frac{1}{4}$  cm.<sup>3</sup> wżwyż.

Pudełka po 6 ampułek od 1 cm.<sup>3</sup> do 3 cm.<sup>3</sup> lub

Flakony po 10 cm.<sup>3</sup> z hermetyczną gumową nasadką (do indywidualnego dawkowania).

P.-H. Z. CH. LUDWIK SPIESS I SYN S. A. WARSZAWA

## KOMUNIKAT

Z MIĘDZYNARODOWEGO ZWIĄZKU PRZECIWGRUŻLI-  
CZEGO.

W dniu 10 i 11 lipca r. b. odbyły się w Paryżu posiedzenia władz Międzynarodowego Związku Przeciwgruźliczego: dn. 10.VII o godz. 15-ej posiedzenie Komitetu Wykonawczego (Comité Exécutif de l'Union Internationale contre la Tuberculose), dn. 11.VII — dwa zebrania Rady Zarządzającej (Conseil de Direction) — o godz. 10-ej rano były rozpatrywane sprawy administracyjne, o godz. 15-ej odbyła się sesja naukowa Rady.

Należy podkreślić, że tak licznych i ożywionych posiedzeń Władz Związku oddawna nie notowano. Niewątpliwie należy to przypisać nowemu kierownictwu, nadawanemu Związkowi przez jego obecnego Prezesa p. Dra Piestrzyńskiego.

Komitet Wykonawczy zebrał się w komplecie: prezes — dr. E. Piestrzyński, prof. Lopo de Carvalho (Portugalia), dr. Kendall Emerson (St. Zjedn. A. P.), Dr. Frey (Niemcy), prof. Frölich (Norwegja), prof. Nolen (Holandja), prof. Bocchetti (Włochy) — zamiast prof. Paolucci), prof. Lile Cummins (Anglja — zamiast Sir Roberta Philip'a, który od kilku lat nie opuszcza Anglii), prof. Bezancon — Sekretarz Generalny (Francja), Dr. Skokowska-Rudolf — zast. Sekretarza Generalnego, p. Mirabaud — skarbnik (Francja), ponadto w posiedzeniu Komitetu wzięła udział redaktorka „Bulletin de l'Union Internationale contre la Tuberculose” — dr. Alice Churchill.

Na posiedzenie Rady przybyli ponadto: dr. Derscheid z Belgji, prezes Oeuvre Nationale Belge c. l. Tuberculose, prof. Morelli z Włoch, dr. Bachmann, prezes Szwajcarskiego Związku Przeciwgruźliczego, prof. Madsen z Danji, dr. Saenz z Urugwaju, dr. Guinard — dyrektor sanatorium w Bligny i szereg innych. W sesji naukowej wzięli pozatem udział liczni klinicyści francuscy: dr. Poix, dr. Rist, dr. Debré, dr. Boquet i wielu innych, przybył również dr. Hornung z Polski, który w drodze powrotnej ze studjów w Rzymie znalazł się w Paryżu.

Na porządku dziennym posiedzenia Komitetu były następujące sprawy: sprawozdanie Sekretarza Generalnego i Skarbnika,

wstępny wybór tematów i referentów na Zjazd w r. 1936 w Lizbonie, wybór kandydatów na stypendystów Instytutu im. Carlo Forlanini w Rzymie na rok 1935/36, sprawy różne.

Ze sprawozdania Sekretarza Generalnego wynika, że do Międzynarodowego Związku Przeciwgruźliczego należy obecnie 45 państw (ostatnio ustąpiły Chiny, które zresztą od kilku lat należały nominalnie, a przystąpiła republika Chili). Związek liczy 108 członków radnych (conseillers) i 637 tytułarnych (titulaires); wśród członków, którzy ubyli figuruje nazwisko zmarłego Theobalda Smidt'a. Naogół Związek wzrósł liczbowo, przyjęto 8-miu nowych członków tytułarnych. Dochody i wydatki równoważą się w granicach 120.000 fr. fr.

Osobny dział sprawozdania stanowi fundacja im. Léon Bernard, której powołanie zostało uchwalone na wniosek włoski w Warszawie. Prezesami honorowymi fundacji są: Sir Robert Philip i senator André Honnorat, na prezesa został wybrany, na wniosek dra Piestrzyńskiego, prof. Paolucci, członkami są: dr. Rist (Francja), dr. Melita (Indje Brytyjskie), prof. van der Plaats (Indje Holenderskie), prof. Boccetti (Włochy), p. Dumont (Luksemburg), prof. Frölich (Norwegja), prof. Jacobaeus (Szwecja), prof. Hunek (Czechosłowacja), dr. Saenz (Urugwaj). Ogólna suma składek wynosi obecnie 25.975 fr. fr. od 14-tu krajów.

Wybór tematów na Zjazd w r. 1936 odbywał się inaczej niż zwykle: zamiast zwracania się do członków Związku o przedstawienie tematów, Komitet Wykonawczy przyjął w styczniu wniosek rozesłania gotowych propozycji, co nie wykluczało nadsyłania projektów innych. Jako temat I zaproponowano: „Budowa wnęki płucnej” (wniosek Portugalji), temat II kliniczny: „Pierwotne zakażenie gruźlicą u młodzieży i dorosłych” i III społeczny „Szpitale dla chorych na gruźlicę”. Wszystkie te tematy były poparte przez znaczną liczbę głosów, prócz tego nadesłano jeszcze 23 inne tematy. Po dyskusji przyjęto ostatecznie następującą redakcję tytułów referatów: „Obrazy radiologiczne wnęki płucnej”, ref. porf. Lopo de Carvalho. Z pośród proponowanych koreferentów należy wymienić doc. W. Zawadowskiego (Polska).

Tytuł tematu klinicznego pozostaje bez zmian, referent dr. Olaf Scheel (Norwegja).

Temat społeczny: „Zapobieganie gruźlicy w domu“, referent Sir Henry Gauvain.

Jako kandydatów na stypendystów do Instytutu im. Carlo Forlanini zgłoszono 30 lekarzy z 17 państw. Wobec tego, że kilkanaście państw korzystało już ze stypendjów a niektóre państwa były szczególnie uprzywilejowane, jak Austria, która miała 3-ch stypendystów, Polska i Indie Bryt. po 2, wybrano 6 kandydatów wyłącznie z tych państw, które dotąd swoich delegatów na studjach nie miały. Otrzymali zatem stypendja: dr. Rocheta (Portugalia), dr. Prosek (Czechosłowacja), dr. Cecilioni (Kanada), pani dr. Schambye (Danja), dr. de Arellano y Garcia (Hiszpanja), dr. Sedriks (Łotwa).

W ostatnim punkcie porządku dziennego były omawiane nast. sprawy: dr. Skokowska-Rudolf przedstawiła projekt jednolitej dla wszystkich państw — członków Unji, rejestracji przypadków śmierci z gruźlicy. Projekt ten został zasadniczo przyjęty, żadnych poprawek nie zgłoszono. Przyjęcie projektu powinno mieć wpływ na ujednostajnienie statystyki umieralności z gruźlicy na całym świecie i umożliwi porównywanie stanu rozpowszechnienia gruźlicy w różnych państwach.

Drugim był wniosek dr. Bachmanna, który zaproponował, aby na przyszłych Zjazdach Międzynarodowych omawiano aktualne zagadnienia społeczne. Wobec jednak obszernego zwykle programu zjazdów, wypowiedziano się za wprowadzeniem dodatkowego tematu (czy tematów) dla grupy uczestników, która się zgłosi, bez naruszenia całości programu zjazdu.

Rada (Conseil de Direction) zatwierdziła uchwały Komitetu. Należy zaznaczyć, że prof. Bezançon w swoim sprawozdaniu na Radzie wspomniał serdecznie Zjazd w Warszawie i dziękował za miły pobyt i przyjęcie.

Na sesji popołudniowej prof. Madsen wygłosił referat o standaryzacji próby tuberkulinowej. Przewodniczył na wniosek Prezesa Związku prof. Lyle Cummins.

Wobec tego, że dla wykonania próby tuberkulinowej używane są różne roztwory tuberkuliny, że sama technika przeprowadzenia próby jest różnorodna i, że interpretacja wyników jest oparta na ocenie subiektywnej, porównanie wyników jest trudne a nawet niemożliwe.

Prof. Madsen proponuje przyjęcie tuberkuliny - standartu, zaproponowanego przez St. Zjedn. A. P., wykonywanie dla celów porównawczych jedynie metodą Mantoux (śródkórna) i określanie wyników według szematu amerykańskiego, w zależności od rozmiarów i wyglądu reakcji.

Otrzymanie stałego roztworu starej tuberkuliny jest niemożliwe; różne jej roztwory są roztworami, zawierającymi czynną substancję w koncentracji nieznannej. Amerykanie izolowali tę substancję czynną, jest to składnik proteinowy stały, wydobywany z roztworu tuberkuliny, przygotowanej na podłożu syntetycznym. Po oczyszczeniu substancję tę przygotowuje się w postaci suchych tabletek, które po rozpuszczeniu dają roztwór określonej siły, nie ulegający wahaniom.

Wrażliwość na ten preparat jest bardzo duża, natomiast nie ma on właściwości uczulających i wywołujących powstawanie przeciwciał.

Referat wywołał ożywioną dyskusję. Wyraźnie odrębne stanowisko zajęli klinicyści francuscy, którzy stwierdzili, że wystarcza im odczyn klasyczny Pirquet'a i stara tuberkulina. Projekt prof. Madsena wydaje się być b. zajmujący przez wprowadzenie ścisłych określeń i liczb zamiast oceny subiektywnej.

Po zakończonych obradach odbył się obiad, wydany przez Francuski Komitet Przeciwgruźliczy, w którym wzięli udział członkowie Komitetu i Rady, członkowie Zarządu Komitetu Francuskiego i panie — żony delegatów, które przybyły zdaleka, jak pani Lopo de Carvalho i inne. Nastrój był b. miły, bardzo ciepło i serdecznie wspomniano Zjazd w Warszawie i wygłoszono szereg przemówień, niezmiernie dla Polski i Polaków życzliwych.

---

---

REDAKTOR Dr. S. OTOLSKI

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

---

---

Zakł. Druk. F. Wyszyński i S-ka, Warszawa, Warecka 15