

ZBIGNIEW SZOT, TERESA MALINOWSKA, EDWARD KOWALSKI

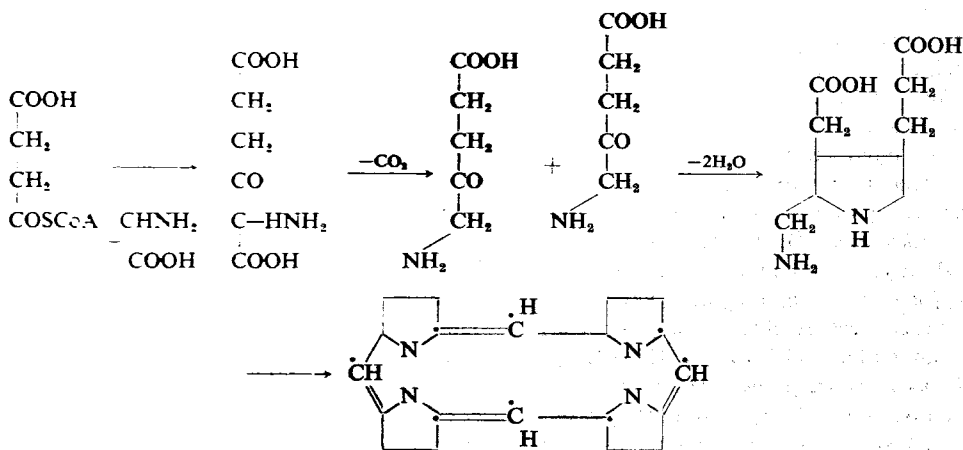
WPLYW PROMIENI X
NA SYNTEZĘ HEMU *IN VITRO* I *IN VIVO*
WE KRWI OBWODOWEJ KUR

Z Zakładu Ochrony Zdrowia Instytutu Badań Jądrowych PAN w Warszawie
Kierownik: prof. dr E. Kowalski

Zastosowanie w badaniach nad biosyntezą hemu radioizotopów N^{15} i C^{14} pozwoliło na szybsze i dokładniejsze poznanie poszczególnych stadiów tego procesu [14, 30]. Szczególnie użycie glicyny znakowanej węglem C^{14} udoskonaliło i uprościło metodykę tych badań [23, 24].

Jak wykazali *Shemin* i *Rittenberg* glicyna jako prekursor hemu dostarcza 8 atomów węgla metylenowych na każde 4 atomy azotu wbudowywane w pierścień porfirynewy [1, 15, 16, 17].

Cztery z tych węgli znajdują się w mostkach metinowych łączących pierścienie pirolowe, a pozostałe 4 wchodzi w pozycję alfa pierścieni pirolowych. Stwierdzono ponadto, że pozostałe 26 węgli pierścienia porfirynewego pochodzi z octanu [14, 16, 17, 21].



Eksperymenty z glicyną znakowaną C^{14} na węglu metylenowym i karbonylowym wykazały, że węgiel metylenowy glicyny jest intensywnie

inkorporowany do heminy, w przeciwieństwie do węgla karboksylowego, który nie wchodzi do pierścienia [7, 8, 16, 17]. W 1952 r. *Shemin* wykazał, że z jednej cząsteczki glicyny i dwóch cząsteczek „aktywnego” bursztynianu może powstać karboksylowany układ pirolowy.

Udział glicyny i octanu w syntezie porfiryny został wykazany nie tylko *in vivo*, ale także *in vitro* w eksperymentach z retikulocytami ssaków, erytrocytami krwi obwodowej kaczki lub z hemolizatami tych komórek [21, 22]. Erytrocyty jądrzaste krwi obwodowej ptaków posiadają zdolność syntetyzowania hemoglobiny i zachowują ją nawet przez pewien okres czasu *in vitro*.

Tę właściwość krwi obwodowej ptaków wykorzystuje się bardzo często do badań nad syntezą hemu ze względu na łatwość w uzyskaniu materiałów do badań, jak również na zalety ważne przy dalszym opracowywaniu badanego materiału (duży stopień inkorporacji glicyny, łatwa preparatyka heminy).

Celem naszej pracy było zbadanie wpływu promieniowania na syntezę hemu we krwi obwodowej kur *in vitro* i *in vivo* w różnych okresach czasu od momentu napromieniowania zwierzęcia.

Stosowano dawkę 750 r i 1000 r, przy tym dawka 750 r okazała się dogodniejsza, gdyż aczkolwiek przy tej dawce u napromieniowanych kur rozwijała się ciężka choroba popromienna, odsetek zwierząt przeżywających był większy niż przy zastosowaniu dawki LD 50 (1000 r) [27].

METODYKA

Badania in vitro. Kury wagi około 2 kg pochodzące z tej samej hodowli napromieniowywano jednorazową dawką promieni X, 750 r lub 1000 r na całe ciało. Posługiwano się aparatem Stabilipan, stosując napięcie 160 KV, 15 mA, filtr 0,5 mm Cu. Moc dawki 28 r/min. Krew kur otrzymywano przez przecięcie tętnicy szyjnej po poprzednim wstrzyknięciu 0,2 ml heparyny jako antykoagulantu.

Po odwirowaniu osocza przy 3 tys. obrotów przez 10 minut i usunięciu leukocytów, erytrocyty przemywano trzykrotnie płynem Krebsa-Henseleita. W przygotowanych w ten sposób erytrocytach oznaczano hemoglobinę [4, 5].

Inkubacja. Do wysterylizowanej 50 ml erlenmayerki zawierającej kilka perełek szklanych odmierzano 5 ml masy erytrocytów, a następnie dodawano płynu inkubacyjnego o następującym składzie: 5 ml mieszaniny 15 podstawowych aminokwasów w roztworze Krebsa-H. w ilościach odpowiadających końcowemu stężeniu dla każdego z nich 0,2 mM [2, 11]: (DL alanina, walina, L leucyna, kwas L glutaminowy, kwas l-asparaginowy, DL treonina, L cysteina, DL metionina, L arginina, L lizyna, L histydyna, L tryptofan, DL prolina, L fenyloalanina, izoleucyna), 30 mg glikozy in subst., 50 tys. jedn. penicyliny krystalicznej w 1 ml płynu Krebsa-H., 1 ml wodnego roztworu glicyny 2-C 14 (10 μ C).

Stosowano glicynę produkcji angielskiej Amersham o akt. wł. 1 mC (1 mM, oraz Stosowano glicynę produkcji angielskiej Amersham o akt. wł. 1 mC/1 mM, oraz radzieckiej 1 mC/6,5 mM.

Mieszanie inkubacyjną uzupełniano płynem Krebsa-H. do stałej objętości 16 ml i inkubowano w aparacie Warburga przy dostępie powietrza w temp. 37°C przez 4 godziny.

Równolegle z krwią zwierząt napromieniowanych inkubowano krew kur zdrowych. Zwykle inkubowano równolegle 5—6 prób badanych i 2—3 kontrolne.

Badania in vivo. Do badań *in vivo* kury napromieniowano dawką 750 r w warunkach podanych poprzednio. Po odpowiednim upływie czasu podawano dożylnie glicynę w izotonicznym roztworze chlorku sodu w ilości 0,15 μ C/g wagi. Okres czasu od chwili podania glicyny do momentu wykrwawienia był stały we wszystkich eksperymentach i wynosił jedną dobę. Po trzykrotnym przemywaniu erytrocytów krwi obwodowej płynem Krebsa-H. i po usunięciu leukocytów preparowano heminę w sposób podany dla postępowania *in vitro* po zakończeniu inkubacji.

Preparatyka heminy [9]. Heminę oznaczano zmodyfikowaną metodą Kassenaar A., Morell H. i London I. M. Po zakończeniu inkubacji oddzielano erytrocyty od płynu inkubacyjnego, a następnie przemywano je stokrotną objętością fizjologicznego roztworu NaCl. Do przepłukanych erytrocytów dodawano wody destylowanej w stosunku objętościowym 2 : 1, następnie 5 ml toluenu, wytrząsano w wytrząsarce przez 30 minut i oddzielano strumą przez odwirowanie przy 4000 obrotów/min. (2500 g) przez 20 min. Przesączony przez sączek hemolizat zadawano kroplami 10-krotną objętością kwasnego acetonu (1,2 ml HCl stęż. na 100 ml acetonu), energicznie mieszając.

Wytrąconą globinę oddzielano od heminy przez odwirowanie przy czterech tys. obr. min. przez 10 minut. Z otrzymanego roztworu heminy pobierano próbkę do ilościowego oznaczania. Heminę wytrącano z roztworu wodą destylowaną dodaną w stosunku 1 : 1 i ogrzewano napromiennikiem podczerwieni. Wytrąconą heminę odwirowywano przy 4000 obr./min. (2500 g) przez 15 minut i przemywano kolejno:

- 5 ml 50% kwasu octowego
- 20 „ wody destylowanej dwukrotnie
- 2 „ etanolu
- 20 „ eteru etylowego.

Każdorazowo po przemyciu wirowano 15 min. przy 4000 obr./min. Preparat suszono na powietrzu przez 24 godziny. Sprawdzone, że hemina otrzymana tą metodą nie różni się w niczym od heminy rekrytalizowanej z gorącej pirydyny i kw. octowego [6].

Pomiar radioaktywności i przedstawienie wyników [3, 18]. Aktywność heminy określano metodą cienkiej warstwy. W tym celu 5 mg heminy umieszczano w miseczce z folii aluminiowej o średnicy 2,4 cm, powierzchni 4,5 cm² i rozpuszczano w jak najmniejszej objętości pirydyny. Po odparowaniu rozpuszczalnika próbkę liczone licznikiem czołowym z okienkiem 1,6 mg na cm². Wydajność liczenia — 3,5%.

Błąd w podwójnych i potrójnych oznaczeniach aktywności heminy otrzymanej z tej samej krwi i tej samej inkubacji nie przekraczał 12,3%.

Wyniki przedstawiano w impulsach na jednostkę wagi badanego materiału lub jako ilość moli zsyntetyzowanej heminy w inkubacji (N_p) bądź też jako zdolność układu do syntezy heminy (W_H).

Obliczenie ilości zsyntetyzowanej heminy [18]. W środowisku inkubacyjnym znajduje się glicyna nieaktywna (G) oraz glicyna aktywna dodana do inkubatu (G^*). Aby obliczyć całkowitą ilość zsyntetyzowanych cząsteczek heminy (N_p) trzeba znać całkowitą ilość glicyny inkorporowanej do heminy (N_g). W tym celu należy uwzględnić poprawkę na inkorporowaną glicynę nieaktywną ze znajomości stosunku całkowitej ilości glicyny do ilości glicyny promieniotwórczej.

Dysponując tymi danymi, w oparciu o wzory podane w pracy *Richmonda* i *Aitmana* wyprowadzono ogólne wzory, którymi posługiwano się w przedstawieniu wyników opisywanej pracy.

Ilość moli pierścieni porfirynowych zsyntetyzowanych w całym inkubacie podaje następująca zależność:

$$N_p = \frac{A \cdot 2,2 \cdot 10^{-12} \cdot \text{imp.} \cdot G}{5}$$

imp = aktywność 1 g heminy w imp/min.

A — ilość heminy w mg w całej inkubowanej próbce.

Zdolność układu do syntetyzowania heminy (W_h) jest wielkością, która może służyć do porównywania wyników różnych inkubacji i wyraża się wzorem:

$$W_h = \frac{A \cdot 2,2 \cdot 10^{-12} \cdot \text{imp.} \cdot G}{240 \times 5 \times \text{ilość białka w inkubacie w g.}} \text{ moli/min.g białka}$$

240 = czas inkubacji w min.

Całkowitą ilość glicyny zawartą w inkubacie obliczano, przyjmując następujące dane: globina stanowi 96,37% ogólnej masy hemoglobiny, a Hb zawiera 5,5% glicyny.

W 1 ml masy erytrocytów znajduje się przeciętnie 0,25 g Hb. Białko erytrocytów stanowiące 6% masy erytrocytów zawiera 4% glicyny.

(1 ml roztworu wodnego glicyny angielskiej (10 μ C) zawierał 0,8 mg glicyny, a 1 ml glicyny radzieckiej (10 μ C) — zawierał 5 mg glicyny).

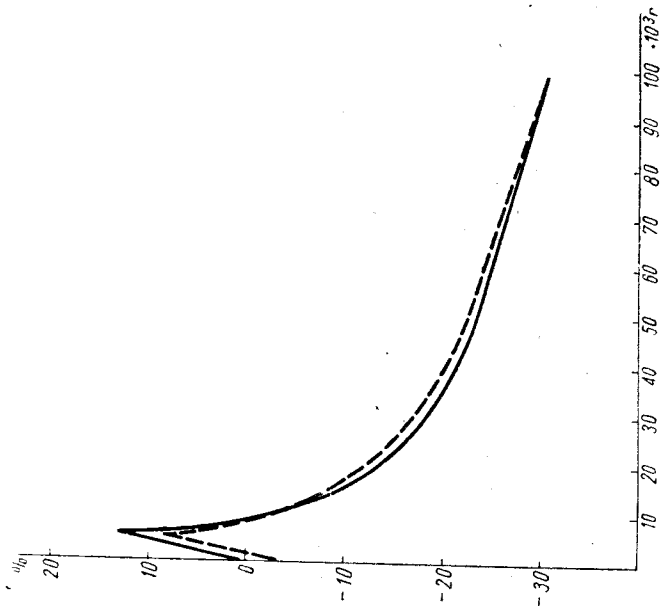
Stężenie heminy w badanych roztworze określano każdorazowo metodą spektrofotometryczną z krzywej standardowej (0–0,06 mM, tj. 0–38 μ g/ml), uwzględniając rozcieńczenie badanej próbki.

Pomiarów dokonywano w kuwetach o grub. 1 cm, przy dł. fali 495 $m\mu$ [9]. Hemoglobinę oznaczano jako cjanmethemoglobinę spektrofotometrycznie przy dł. fali 540 $m\mu$ [4, 5].

Krzywą standardową sporządzono z wzorca cjanmethemoglobiny pochodzącego z Walter Reed Army Institute of Research, Washington.

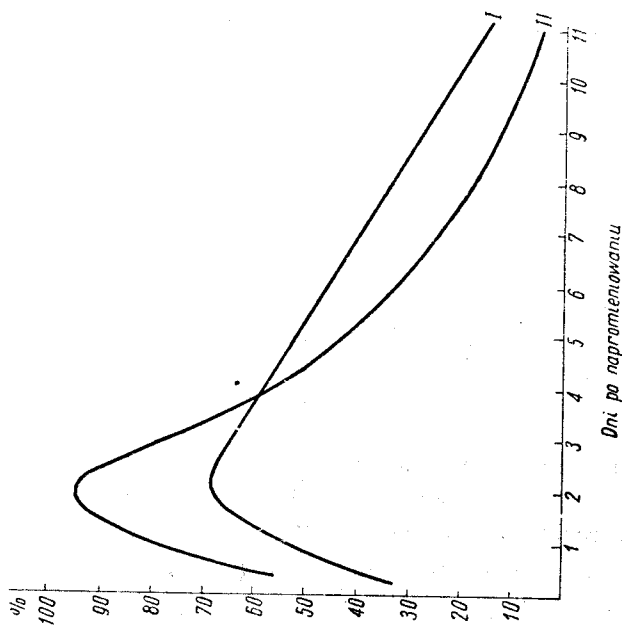
WYNIKI

Ryc. 1 podaje wyniki syntezy hemu *in vitro* w krwinkach kur napromienionych dawką 750 r i badanych w różnych okresach czasu od chwili napromieniowania (od 6 godzin do 11 dni). Dla umożliwienia porównania wyników przedstawiono je w wartościach N_p i W_h oraz w odsetkach wartości próby kontrolnej. Okazało się, że zdolność inkorporacji jest różna w zależności od środowiska, w którym ona jest przeprowadzana. Największą inkorporację uzyskano w środowisku surowicy, mniejszą w roztworze fizjologicznym NaCl, najmniejszą w płynie Krebsa-H. Spostrzeżenia te są zgodne z wynikami otrzymanymi przez innych autorów [9].



Ryc. 2. Synteza hemu *in vitro* w erytrocytach krwi obwodowej kur po napromienianiu krwinek, wyrażona w procentach próby kontrolnej w zależności od dawki. — Ilość zsyntetyzowanych moli porfiryny N_p; - - - Zdolność układu do syntezy heminy W_h.

Fig. 2. In vitro haeme synthesis in irradiated red cells of hen peripheral blood, plotted as percent of that in control experiments according to dosage. — synthesis of moles of porphyrin N_p; - - - capacity of the system to synthesize haemin W_h.



Ryc. 1. Synteza hemu *in vitro* w erytrocytach krwi obwodowej kur napromienianych promieniami X dawką 750 r. I — krzywa wyrażająca ilość zsyntetyzowanych moli porfiryny (N_p) przedstawioną w %/0/0 próby kontrolnej. II — krzywa wyrażająca zdolność układu do syntezy heminy (W_h) przedstawioną w %/0/0 próby kontrolnej.

Fig. 1. In vitro haeme synthesis in the peripheral-blood red cells of hens treated with a dose of 750 r. I — synthesis of porphyrin (N_p) in moles, plotted as %/0/0 of that in control experiments. II — capacity of the system to synthesize haemin (W_h), plotted as %/0/0 of that in control experiments.

Można z tego wyciągnąć wniosek, że najodpowiedniejszym środowiskiem byłaby surowica lub roztwór fizjologiczny NaCl. W drugim dniu po napromieniowaniu dawką 750 r stwierdzono największy wzrost syntezy. Po dawce 1000 r wzrost ten osiąga maksimum również w drugim dniu, lecz jest wyższy jak widać z zestawienia na tab. 1. Dla porównania warunków

Tabela 1. Synteza hemu *in vitro* w erytrocytach krwi obwodowej kur napromienianych promieniami X. Dawka 1000 r.

Table 1. In vitro haeme synthesis in the erythrocytes of peripheral blood of hens irradiated with X-rays. Dosis 1000 r.

Lp. 1)	Okres czasu dzielący badanie <i>in vitro</i> od chwili naprom. kury 2)	Aktywność 5 mg heminy w imp/min. 3)		Ilość zsyntetyzowanych moli porfiryny Np. x 10 ⁻⁷ 6)		Różnica w % 9)	Średnia w % 10)	Zdolność układu do syntezy heminy Wh x 10 ⁻¹⁰ mol min. g białka 11)		Różnica w % 9)	Średnia w % 10)
		próba badana 4)	próba kontr. 5)	w badanej próbie 7)	w kontr. próbie 8)			w badanej próbie 7)	w kontr. próbie 8)		
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	15 godz.	145		2,05		+ 47		5,02		+ 60	
2	15 „	130	86	2,02	1,39	+ 45	+46	4,90	3,14	+ 56	+58
3	1 doba	139		1,63		+ 3		3,99		0	
4	1 „	146		1,08		- 32		2,64		- 34	
5	1 „	153	134	1,67	1,57	+ 6	- 1	3,94	3,99	- 1	- 7
6	1 „	150		1,85		+ 18		4,35		+ 9	
7	2 doby	149		0,88		+ 24		2,99		+ 29	
8	2 „	136		1,44		+102		4,79		+107	
9	2 „	153	104	1,45	0,71	+103	+82	4,18	2,31	+ 81	+73
10	2 „	157		1,42		+100		4,08		+ 76	

No. 1); Interval between irradiation of the hen and the *in vitro* experiment 2); Activity of 5 mg. haemin, in counts/min. 3); Experimental sample 4); Control sample 5); Porphyrin synthesized, in moles 6); In the experimental sample 7); In the control sample 8); Difference 9); Average 10); Capacity of the system to synthesize haemin, in mole/min. g. protein 11).

syntezy *in vitro* z warunkami *in vivo*, wstrzyknięto kurom 0,15 $\mu\text{C/g}$ wagi glicyny 2-C¹⁴ po upływie tego samego czasu od napromieniowania zwierzęcia, jak w doświadczeniach *in vitro* (tab. 2). Wyniki są rozbieżne, obserwuje się zarówno wzrost jak i spadek inkorporacji u różnych zwierząt. Wzrost stopnia inkorporacji glicyny do heminy zauważony w pierwszych 2 seriach doświadczeń pozwalał przypuszczać, że pod wpływem promienio-

wania może zachodzić aktywacja enzymów erytrocytów czynnych w pierwszych fazach biosyntezy hemu. W celu wyjaśnienia tego zjawiska napromieniowano erytrocyty kury *in vitro* różnymi dawkami promieni X i oznaczono ich zdolność syntezy hemu. Wyniki porównywano z wartościami

Tabela 2. Badanie inkorporacji glicyny 2 C-14 do heminy *in vivo* po napromieniowaniu dawką 750 r i podaniu glicyny 0,15 $\mu\text{c/g}$ wagi.

Table 2. In vivo incorporation of glycine 2 C-14 into haemin after treatment with 750 r. and administration of glycine, 0,15 $\mu\text{c/g}$ body weight.

L. p. 1)	Czas od napromieniowania do wstrzyknięcia glicyny (w dniach) 2)	Czas od chwili napromieniowania do zabicia (w dniach) 3)	Aktywność 5 mg heminy w imp./min. 4)		Różnica w % 7)	Wartość średnia w % 8)
			w próbie badanej (krwinki kury naprom.) 5)	w próbie kontrolnej (krwinki kury nie naprom.) 6)		
1	0	1	78	88	- 12	- 11
2	0	1	57	63	- 10	
3	1	2	58	85	- 32	
4	1	2	100	114	- 12	- 12
5	1	2	150	138	+ 8	
6	2	3	111	54	+105	+106
7	2	3	112		+107	
8	3	4	57	75	- 24	
9	3	4	91		+ 21	
10	4	5	118	84	+ 40	+ 40
11	11	12	81	80	+ 1	+ 1

No. 1); Interval between irradiation and glycine injection (in days) 2); Interval between irradiation and killing (in days) 3); Activity of 5 mg. of haemin, in counts/min. 4); In the experimental sample (irradiated-hen erythrocytes) 5); In the control sample (nonirradiated-hen erythrocytes) 6); Difference in % 7); Average value in % 8).

ciami otrzymanymi dla erytrocytów tej samej krwi nie napromieniowanej. Wyniki tych badań przedstawiono na ryc. 2.

Jak widać synteza hemu *in vitro* w erytrocytach krwi obwodowej kury jest wyraźnie hamowana, począwszy od dawki 10 000 r proporcjonalnie do wielkości stosowanej dawki.

W dalszych doświadczeniach badano wpływ na syntezę hemu *in vitro* niektórych wyciągów tkankowych, surowicy i hemolizatów pochodzących ze zwierząt zdrowych i napromieniowanych dawką 750 r. Badania te przeprowadzono w ten sposób, że do typowego układu inkubacyjnego dodawano wyciągi tkankowe względnie surowicę lub hemolizat w ilości podanej na tab. 3 i 4.

Tabela 3. Wpływ wyciągów tkankowych na syntezę hemu badaną *in vitro* przy pomocy glicyny 2 C-14

Table 3. The effect of tissue extracts on *in vitro* synthesis of haeme, investigated with the aid of glycine 2 C-14

Inkubacja nr 1)		Aktywność 5 mg heminy w imp/min. 6)			$W_h \times 10^{-10}$				
		próba kontrolna inkubacji 7)	A*	B**	różnica między A i B w % 8)	próba kontrol. 9)	A*	B**	różnica między A i B w % 8)
21	Układ inkubacyjny kontrolny w pł. Krebsa-Hens. 2)	48				1,18			
	Układ inkubacyjny + wyciąg wątr. w płynie Kr.-Hens. kury zdrowej A i naprom. B 3)	46	55	+19		1,0	2,08	+108	
	Układ inkubacyjny + wyciąg szpiku kury zdr. A i napr. B 4)	50	47	- 6		1,26	1,03	- 18	
	Układ inkubacyjny + wyciąg śledziony kury zdr. A i napr. B 5)	51	48	- 6		1,07	1,17	+ 9	

A* — układ zawierający surowicę wzgl. hemolizat pochodzący z kury nienapromieniowanej.

A* — mixture containing either serum or haemolizate from a nonirradiated hen.

B** = układ zawierający surowicę wzgl. hemolizat pochodzący z kury nienapromieniowanej.

B** — mixture containing either serum or haemolizate from a nonirradiated hen.

1) Incubation Na 1); Control incubation mixture in Krebs-Hens. solution 2); Incubation mixture + liver extract in Krebs-Hens. solution of A normal hen, and B irradiated hen 3); Incubation mixture + bone marrow extract of A normal hen, and B irradiated hen 4); Incubation mixture + spleen extract of A normal hen, and B irradiated hen 5); Activity of 5 mg. of haemin in counts/min 6); Control incubation 7); Difference between A and B in percent 8); Control sample (test) 9).

Wyciągi sporządzono hemogenizując 1,6 g tkanki mokrej w 6 ml płynu Krebsa-H. i wirując przy 2500 g przez 15 min. Do badania używano płyn zebrany z nad osadu po odwirowaniu.

Surowicę otrzymano z krwi pobieranej bez antykoagulantu po odwirowaniu skrzepu.

Nie stwierdzono istotnego wpływu badanych wyciągów tkankowych na inkorporację glicyny 2-C¹⁴ do hemu. Nie zaobserwowano także różnicy

Tabela 4. Wpływ surowicy oraz hemolizatów krwinek czerwonych na syntezę hemu badaną *in vitro* przy użyciu glicyny 2 C-14.

Table 4. The effect of serum and red-cell haemolyzates on *in vitro* haeme synthesis investigated with the aid of glycine 2 C-14.

Inkubacja nr 1)		Aktywność 5 mg heminy w imp/min. 7)				$W_h \times 10^{-10}$			
		próbka kontrol. 8)	A*	B**	różnica między A i B w % 9)	próbka kontrol. 10)	A*	B**	różnica między A i B w % 9)
17	Układ inkubacyjny kontrolny zawier. 2,5 ml 0,9% NaCl	397				9,40			
	Układ inkubacyjny zawier. 2,5 ml surowicy kury zdrowej A i napr. B 2)		592	525	-20		12,5	11,4	-9
19	Układ inkubacyjny kontrolny	130							
	Układ zawierający 2,5 ml surowicy kury zdr. A i naprom. B 3)		234	249	+6		4,83	5,10	+6
	Układ inkubacyjny zawierający 5 ml 0,9% NaCl	235				4,55			
	Układ inkubacyjny zawier. 22,5 mg NaCl+2,5 ml hemolizatu krwinek kury zdr. A i naprom. B 4)		193	210	+9		4,15	4,80	+15
	Układ inkubacyjny zawier. 2,5 ml zmieszanej w stos. 1:1 surowicy i hemolizatu krwinek kury zdr. A i naprom. B 5)		271	263	-3		7,17	5,83	-19
	Układ inkubacyjny zawier. 2,5 ml mieszaniny 1:1 hemolizatu krwinek czerw. i surowicy ogrzanej do 55° 6)		250				6,08		
22	Układ inkubacyjny kontrolny	113				3,07			
	Układ inkubacyjny + 2,5 ml hemolizatu krwinek kury zdrowej A i naprom. B 3)		107	117	+9		2,59	3,02	+16

A* — układ zawierający surowicę wzgl. hemolizat pochodzący z kury nienapromieniowanej.

B** — " " " " " " " " napromieniowanej.

A* and B** — as in Table 3.

Incubation 1): Control incubation mixture containing 2,5 ml. 0,9 NaCl. Incubation mixture containing 2,5 ml. of serum of A normal hen, and B irradiated hen 2); Control incubation mixture. Mixture containing 5 ml. 0,9 NaCl, and 22,5 mg NaCl+2,5 ml. red-cell haemolyzate 4); Incubation mixture containing 2,5 ml. serum mixed 1:1 5); Incubation mixture containing 2,5 ml. mixture, red-cell haemolyzate, heated serum 6); Activity of 5 mg of haemine, in counts min. 7); Control sample (test) 8); Difference between A and B in percents 9); Control sample (test) 10).

w inkorporacji glicyny w obecności wyciągów surowicy i hemolizatów napromieniowanych i nienapromieniowanych zwierząt.

Dla porównania rzędu wielkości syntezy heminy przez erythrocyty kury z erythrocytami człowieka przeprowadzono jedno doświadczenie. Stwierdzono, że synteza heminy *in vitro* w krwinkach obwodowych człowieka wyrażona w wartości N_p wynosi $2,9 \cdot 10^{-9}$ moli heminy, a $W_h = 6,3 \cdot 10^{-12}$ moli heminy/min/g białka.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Bezwzględne wartości wyników otrzymywanych w badaniach nad biosyntezą hemu można porównywać jedynie w obrębie tej samej inkubacji.

Porównywania wyników pochodzących z równych inkubacji dokonuje się po uprzednim wyrażeniu otrzymanych wartości w % odniesionych do próby kontrolnej tej samej inkubacji. Dla prowadzących badanie nad biosyntezą hemu na podobnym modelu doświadczalnym jest to znany fakt, a potwierdziły go także nasze spostrzeżenia.

Metoda stosowana w naszej pracy daje dobre wyniki. Rozrzut wartości wyników tej samej inkubacji identycznego materiału biologicznego wynosi około 12%.

Interpretacja wyników otrzymanych w badaniach *in vivo* wpływu promieniowania na zdolność biosyntezy hemu u kury stwarza trudności, gdyż nie ma możliwości odniesienia wyników do identycznego układu kontrolnego. Poza tym jest wiadome, że układ krwiotwórczy kury cechuje się dużą zmiennością fizjologiczną, oraz względną odpornością na promieniowanie. Z tego powodu częściej obserwuje się u napromieniowanych kur śmierć jelitową niż „hematologiczną”. W badaniach *in vivo* obserwuje się wyraźny wzrost syntezy hemu co jest zgodne z wynikami innych autorów [18, 19, 20], należy jednak zaznaczyć, że wzrost ten nie jest wystarczająco pod względem statystycznym udokumentowany.

Należy w tym miejscu zaznaczyć, że powyższa uwaga daje się uogólnić w stosunku do dużej części badań substancji lub układów biochemicznych pod wpływem promieniowania jonizującego. Często nie wiadomo czy zauważone zmiany są wynikiem zaburzeń ogólnoustrojowych, czy są wynikiem przemieszczeń płynów ustrojowych i zmian cytologicznych, czy wreszcie dotyczą rzeczywiście określonego układu biochemicznego. Różnice w zachowaniu się między surowicą, roztworem fizjologicznym NaCl oraz płynem Krebsa-H. jako środowiskiem inkubacyjnym są trudne do wytłumaczenia. Istnieje możliwość, że w surowicy znajduje się czynnik stymulujący inkorporację glicyny do hemu, albo że surowica jest po prostu najbardziej fizjologicznym środowiskiem dla inkubacji.

Kwestii tej na podstawie naszych badań rozstrzygnąć nie można. Można przypisywać większe znaczenie tylko tej części naszych badań, w której porównywano jednakowe układy biologiczne *in vitro*.

WNIOSKI

Po napromieniowaniu erytrocytów krwi obwodowej kury zauważa się stały spadek syntezy hemu *in vitro* dopiero od dawki 10 000 r. W badanych wyciągach tkankowych nie stwierdzono czynników wpływających na syntezę hemu, być może z powodu nieodpowiedniej metody przygotowania wyciągów.

Porównanie średniej wielkości inkorporacji glicyny do erytrocytów kury i erytrocytów człowieka wykazało, że krwinki obwodowe kury wcielają ok. 50 razy więcej niż ludzkie krwinki czerwone. Potwierdza to ogólnie przyjęty pogląd o zachowaniu zdolności biosyntetycznej *in vitro* w dojrzałych jądrzastych krwinkach kur.

Э. Шот, Т. Малиновска, Э. Ковальски

ВЛИЯНИЕ РЕНТГЕНОВСКИХ ЛУЧЕЙ НА СИНТЕЗ ГЕМА IN VITRO И IN VIVO В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ КУРИЦ

Содержание

Исследовалось влияние рентгеновских лучей на синтез гема в периферической крови куриц с применением глицина $2c^{14}$.

Установлено, что синтез гема в эритроцитах куриц, облучаемых дозой 750-1000 r увеличивается.

Если эритроциты периферической крови облучались *in vitro* дозами $0,2 \times 10^3$ r — $1 \cdot 10^4$ r, наблюдалось понижение синтеза, начиная от дозы 1000 r, и дальнейшее его уменьшение при повышении дозы лучей.

Исследовалось также влияние водных экстрактов некоторых органов, сыворотки и гемолизатов крови здоровых и облучаемых животных на синтез гема.

Обнаружено, что наличие сыворотки в изучаемой системе увеличивает синтез гема. Авторы проводят дискуссию полученных результатов.

Z. Szot, T. Malinowska, E. Kowalski

THE EFFECT OF X-RAYS ON IN VITRO AND IN VIVO HAEME SYNTHESIS IN THE PERIPHERAL BLOOD OF HENS

Summary

The effect of X-rays on haeme synthesis in the peripheral blood of hens was investigated with the aid of $2c^{14}$ — labelled glycine.

This synthesis was found to increase in red cells irradiated with 750 or 1000 r doses.

On irradiation in vitro of peripheral blood red cells with doses of 0.2×10^3 to 1×10^5 r, doses of 10 000 r and higher were found progressively to inhibit haeme synthesis.

Aqueous extracts of various organs and serum and haemolysates of the blood of various animals both normal and irradiated ones were investigated with reference to their effects on haeme synthesis.

Presence of serum enhanced haeme synthesis in the system investigated. The results obtained are discussed in the paper.

PIŚMIENNICTWO

1. Altman K. I., Casarett G. W., Masters R. E. i in.: J. Biol. Chem. 1948, 176, 319.
2. Borsook H., Deasy C. L., Haagen A. J. i in.: J. Biol. Chem. 1952, 196, 669.
3. Calvin M., Heidelberger C. i in.: Isotopic Carbon. New York 1949.
4. Crosby, Munn, Furth: U. S. Armed Forces Med. J. 1954, 5, 693, cyt. wg Handbook for Leitz Photometer. E. Leitz Inc. New York.
5. Drabkin D. L., Austin J. H.: J. Biol. Chem. 1935, 112, 51.
6. Fischer K.: Organic Syntheses V. 21 (1941) N. Y.
7. Grinstein M., Kammen M. D., Moore C. V.: Biol. Chem. 1948, 174, 767.
8. Grinstein M., Kammen M. D., Moore C. V.: J. Biol. Chem. 1949, 179, 359.
9. Kassenaar A., Morell H., London I. M.: J. Biol. Chem. 1957, 229, 423.
10. Krebs H. A., Henseleit K.: Z. Physiol. Chem. 1932, 210, 33.
11. Kruh J., Dreyfus J. C., Shapira G., Padiou P.: J. Biol. Chem. 1957, 228, 113.
12. Krzymowski T., Malinowski W.: Acta Physiol. Pol. 1959, 9, 179.
13. Linman J. W., Bethell F. J.: J. of Lab. a Clin. Med. 1958, 51, 8.
14. Muir H., Neuberger A.: Biochem. J. 1949, 45, 163.
15. Muir H., Neuberger A.: Biochem. J. 1950, 47, 97.
16. Radin N. S., Rittenberg D., Shemin D.: J. Biol. Chem. 1950, 184, 745.
17. Radin N. S., Rittenberg D., Shemin D.: J. Biol. Chem. 1950, 184, 755.
18. Richmond J. E., Altman K. I., Salomon K.: J. Biol. Chem. 1951, 190, 817.
19. Salomon K. i in.: Federation Proc. 8, 247 (1949) cyt. wg Isotopic Tracers in Biochemistry and Physiology — J. Sacks Edt. Mc. Graw-Hill Book Co. N. Y. 1953.
20. Schulman M., Altman K., Salomon K.: Radiation Research 1958, 9, 179.
21. Shemin D., London I. M., Rittenberg D.: J. Biol. Chem. 1948, 173, 799.
22. Shemin D., London I. M., Rittenberg D.: J. Biol. Chem. 1950, 183, 757, 767.
23. Shemin D., Rittenberg D.: J. Biol. Chem. 1945, 159, 567.
24. Shemin D., Rittenberg D.: J. Biol. Chem. 1946, 166, 621.
25. Shemin D., Wittenberg J.: J. Biol. Chem. 1951, 192, 315.
26. Shemin D., Russel C. S.: J. Amer. Chem. Soc. 1953, 75, 4873.
27. Spector W. S.: Handbook of Biological Data W. B. Saunders Comp. Philadelphia-London 1956, 471.
28. Stearner S. P., Sanderson M. H., Christian E. J., Bues A. M.: Amer. J. Physiol. 1958, 192 (3), 620.
29. Wirth D.: Grundlagen einer klinischen Hämatologie der Haustiere 1950, Wien-Innsbruck.
30. Wittenberg J., Shemin D.: J. Biol. Chem. 1949, 178, 47.

Otrzymano: 24. 9. 1960.

Adres autorów: Zakład Ochrony Zdrowia Instytutu Badań Jądrowych PAN.