



Jeszcze w r. 1941, Kleczkowski i Bawden (8), (9), (10) starali się wykazać powstawanie kompleksów międzybiałkowych podczas ogrzewania roztworów białek.

Kleczkowski zauważył, że w wyniku podgrzewania frakcji euglobulinowej w obecności innych frakcji białkowych surowicy powstają zmienione przeciwciała, oraz że podczas ogrzewania mogą powstawać połączenia pomiędzy poszczególnymi frakcjami białkowymi.

Proces ten jest związany z pojawianiem się nowych grup sulfhydrylowych co wskazuje na wczesne stadium denaturacji a zarazem pozwala na wysunięcie wniosku, że powstające kompleksy międzybiałkowe składają się częściowo z rodzimego a częściowo ze zdenaturowanego białka. Możliwości powstawania tego rodzaju kompleksów międzybiałkowych potwierdzili później Turner i Boyer (11). Scheer, Wyckoff i Clarke (12) zaobserwowali, że w surowicach podgrzewanych przez jakiś czas do  $65^{\circ}\text{C}$  można stwierdzić obecność nowej frakcji białkowej dającej na krzywej elektroforetycznej maksimum pomiędzy albuminami a gamma-globulinami i powstającej prawdopodobnie na koszt tychże frakcji. Ardry (13) śledził zmiany w obrazie elektroforetycznym surowicy po ogrzaniu jej do 57, 59, 62 i  $65^{\circ}\text{C}$  i zauważył, że po ogrzaniu zwiększa się frakcja alfa-globulinowa.

Z zagadnieniem kompleksów międzybiałkowych wiąże się też oddawna znany fakt, że wzajemny stosunek ilościowy poszczególnych frakcji białkowych może również w sposób istotny wpływać na przebieg koagulacji cieplnej białek surowicy.

Zjawisko to wykorzystano przy opracowaniu niektórych prób diagnostycznych, takich, jak próba Weltmana, czy też próba Horsta (14).

Ponieważ wydawało się, że powiązanie zagadnienia kompleksów międzybiałkowych powstających podczas ogrzewania, ze zjawiskami hamowania względnie przyspieszenia koagulacji cieplnej białek przez różne związki może rzucić nowe światło na mechanizm niektórych prób koagulacyjnych szeroko stosowanych w diagnostyce laboratoryjnej, jak również na niektóre problemy związane z koagulacją cieplną białek, szczególnie zaś złożonych układów białkowych, takich jak np. surowica, postanowiliśmy przeprowadzić następujące badania:

- a) przebadać jaki wpływ wywierają na siebie w procesie koagulacji cieplnej poszczególne frakcje białkowe.
- b) przebadać jak przebiega koagulacja cieplna białek surowicy w obecności kationów i anionów barwnikowych, przy pomocy których próbowano zmieniać stosunek ciał elektroujemnych i elektrododatnich w środowisku.

## CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

### A. Materiał doświadczalny:

- a) Surowica ludzka pochodząca od zdrowych osób, świeża lub przechowywana w temp. 4° najwyżej przez 24 godz.
- b) Albumina surowicza wypreparowana z krwi ludzkiej met. C o h n a (15)
- c) Frakcja II-R składająca się z beta i gamma-globulin wypreparowana wg K r a w c z y ń s k i e g o (16)
- d) Fibrynogen wypreparowany wg C o h n a (15).
- e) Barwniki kwaśne:
  - alfa/Eozyna — prod. krajowej
  - beta/Oranż metylowy — prod. krajowej.
- f) Barwniki zasadowe:
  - alfa/Riwanol — prod. „Bayer“.
  - beta/Trypaflawina — prod. „Bayer“
  - gamma/Akryflawina — prod. „Abbott“
  - delta/Oranż akrydynowy — prod. węgierskiej
  - eta/Fuksyna — prod. krajowej.

### B. Metodyka oznaczeń:

Badania nad wpływem frakcji białkowych na przebieg koagulacji cieplnej wykonano wg K l e c z k o w s k i e g o (8) z tą różnicą, że zamiast oznaczania azotu w roztworze przed i po denaturacji posługiwano się próbą biuretową wg K i n g s l e y a (17). Jeżeli po ogrzaniu powstawał osad, to odwirowywano go przez 30 min. na 4000 obr. Jeżeli osad nie dawał się odwirować zostawiono próbkę na 48 godz. W niektórych wypadkach uzyskiwano w ten sposób oddzielenie osadu od roztworu. Natężenie opalescencji określono wg umownej skali podobnej do skali używanej przy wykonywaniu próby kadmowej (18). Roztwory białek ogrzewano do temp. 60, 80 i 100°C przez 10 min. Temperaturę regulowano przy pomocy ultratermostatu Hoeplera, pH kontrolowano na pH-metrze „Radiometer“ typ. 21 b.

Badania nad wpływem jonów barwnikowych na przebieg koagulacji cieplnej wykonano wg K l i n g e n b e r g a (5) odczytując wartości zmętnienia na nefelometrycznej Pulfricha przy użyciu tarczy Nr 1 i filtra L<sub>2</sub>. Wielkości zmętnienia podano w wartościach bezwzględnych. Surowice, w których uprzednio oznaczono zawartość białek całkowitych metodą biuretową (17) oraz wyliczono stosunek A/G, rozcieńczono w ten sposób, aby końcowe stężenie białka w próbówce wahało się w granicach od 10 do 800 mg. Barwniki dawano w takiej ilości, że końcowe stężenie wynosiło od  $3 \cdot 10^{-4}$  M do  $3 \cdot 10^{-3}$  M.

### C. Wyniki doświadczeń:

#### a) Przebieg koagulacji cieplnej pojedynczych frakcji białkowych.

Przebieg wytrącania jest nieco inny dla każdej z przebadanych frakcji. Największą oporność wobec ciepła wykazuje frakcja II-R składająca się z beta i gamma-globulin, najmniejszą fibrynogen. We

Tabela I  
Czas ogrzewania — 10 min.

pH 6,1

Tempe- ratura	Ilość białka w mg. w 100 ml. roztworu	Albuminy		Frakcja II-R		Fibrynogen	
		Wygląd pływu po ogrzaniu	Ekstynkcja		Wygląd pływu po ogrzaniu	Ekstynkcja	
			przed denatu- racją	po de- natu- racji		przed denatu- racją	po de- natu- racji
60°	20	kl.	15	15	opl. +	10	10
"	50	kl.	40	35	opl. os.	30	10
"	100	kl.	75	70	opl. os.	55	20
"	250	zm	180	130	opl. os.	130	50
80°	20	zm	20	15	opl. ++	10	10
"	50	os	40	40	opl. os	30	10
"	100	os	70	80	opl. os	60	0
"	250	zm	180	160	opl. os	140	0
100°	20	zm	20	15	opl. ++	15	0
"	50	os	35	35	zm. os	os	0
"	100	os	70	80	zm. os	os	0
"	250	os	180	150	zm. os	os	0

E — ekstynkcja — E × 10, Kl — klarowny, Opl — opalescencja, Os — osad, Zm — zmętnienie.

Tabela II

Czas ogrzewania — 10 min.

Stosunek frakcji białkowych 1 : 1

pH 6,0

Temperatura	Ilość białka w mg w 100 ml roztworu	Albumina—Fibrynogen			Albumina—II-R			Fibrynogen II-R			
		Wygląd		Ekstynkcja	Wygląd		Ekstynkcja	Wygląd		Ekstynkcja	
		przed ogrzaniem	po ogrzaniu		przed ogrzaniem	po ogrzaniu		przed ogrzaniem	po ogrzaniu		
60°	20	kl	20	20	kl	15	15	kl	15	15	15
"	50	zm	55	20	kl	35	35	kl	30	30	30
"	100	os	70	0	kl	65	70	opl. +	70	70	70
"	250	os	170	0	kl	140	140	opl. +	135	135	135
80°	20	opl. + +	20	20	opl. +	15	15	kl	20	20	20
"	50	os	35	0	opl. +	40	40	opl. +	35	35	35
"	100	os	70	0	opl. + +	75	75	opl. os.	80	80	50
"	250	os	180	0	opl. + + +	160	165	opl. os.	140	140	100
100°	20	opl. + +	15	15	opl. + +	15	15	opl. + +	20	20	20
"	50	os	30	0	opl. + + +	35	35	opl. + +	35	35	35
"	100	os	75	0	opl. + + +	70	70	opl. os.	75	75	30
"	250	os	170	0	zm. os.	160	120	opl. os.	150	150	50

E — ekstynkcja — E × 100, Kl — klarowny, Opl — opalescencja, Os — osad, Zm — zmętnienie.

Tabela III

Czas ogrzewania — 10 min.

pH 6,0

Temperatura	Ilość białka w mg. w 100 ml. roztworu		Stos. frakcji I/II	Albumina (I)—fibryn. (II)		Albumina (I)—II-R (II)		Fibrynogen (II)—R-II (II)				
				Ekstynkacja		Ekstynkacja		Ekstynkacja				
				Wygląd pływu po ograniczeniu	przed denatu- racją	po denatu- racji	Wygląd pływu po ograniczeniu	przed denatu- racją	po denatu- racji	Wygląd pływu po ograniczeniu	przed denatu- racją	po denatu- racji
60°	50	—	—	kl.	45	45	kl.	45	45	opl. os.	35	20
"	37,5	12,5	3 : 1	opl. ++	52	50	kl.	45	45	opl. +	35	35
"	25	25	1 : 1	zm.	35	20	kl.	40	40	kl.	35	35
"	—	50	—	opl. os.	30	10	kl.	35	35	kl.	35	35
80°	50	—	—	os.	40	0	os.	45	0	os.	40	0
"	37,5	12,5	3 : 1	zm.	45	30	opl. ++	40	40	opl. os.	30	10
"	25	25	1 : 1	os.	35	0	opl. ++	45	45	opl. +	30	30
"	12,5	37,5	1 : 3	zm.	35	20	opl. ++	40	40	opl. ++	40	40
"	—	50	—	opl. os.	50	10	opl. os.	40	20	opl. os.	35	20
100°	50	—	—	os.	35	0	os.	45	0	os.	40	0
"	37,5	12,5	3 : 1	zm.	45	30	zm.	40	25	zm. os.	40	10
"	25	25	1 : 1	os.	30	20	opl. ++	40	40	opl. ++	35	35
"	12,5	37,5	1 : 3	zm.	40	20	zm.	40	20	zm. os.	35	15
"	—	50	—	os.	40	0	zm. os.	45	10	zm. os.	35	10

E — ekstynkacja — E × 100, Kl — klarowny, Opl — opalizujący, — Zm — zmętnienie, Os — osad.

wszystkich wypadkach pojawienie się opalescencji, zmętnienia, czy też osadu, zachodzi najwcześniej w tych próbkach, w których znajduje się największa ilość białka (Tab. I.).

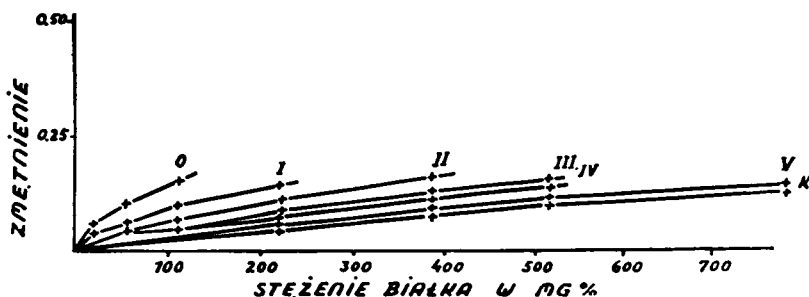
*b) Przebieg koagulacji cieplnej przy zmiennym stosunku ilościowym frakcji białkowych i zmiennej zawartości białka.*

Przy badaniu dwuskładnikowych układów białkowych zaobserwowano, że podobnie, jak w przypadku pojedynczych frakcji, ogólna ilość białka w roztworze wyraźnie wpływa na pojawienie się opalescencji, zmętnienia czy też skłaczkania roztworu. Zaobserwowano też, że mieszanina w stosunku 1 : 1 albuminy z fibrynogendem ulega szybciej zmianom niż sama albumina, a czasem nawet szybciej niż sam fibrynogen.

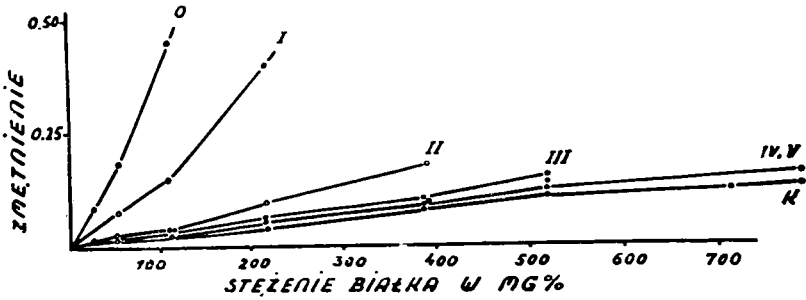
W mieszaninie fibrynogenu z frakcją II-R zmiany zachodzą szybciej niż przy ogrzaniu samej frakcji II-R, a wolniej niż przy ogrzaniu roztworu samego fibrynogenu. Przy zmiennym stosunku fibrynogenu do frakcji II-R daje się zauważyć, że przy przewadze ilościowej tej ostatniej frakcji zmiany pod wpływem ogrzewania zachodzą wolniej niż wtedy, kiedy jest przewaga fibrynogenu.

Najwolniej zachodzą zmiany w układzie dwuskładnikowym albumina - frakcja II-R. W układzie tym jeszcze po ogrzaniu do 80°C przy małej ilości białka uzyskano roztwór zupełnie przejrzysty. Przy zmiennych stosunkach ilościowych obydwu składników najmniejsze zmiany zauważono, gdy stosunek ten wynosił 1 : 1. (Tab. II i III).

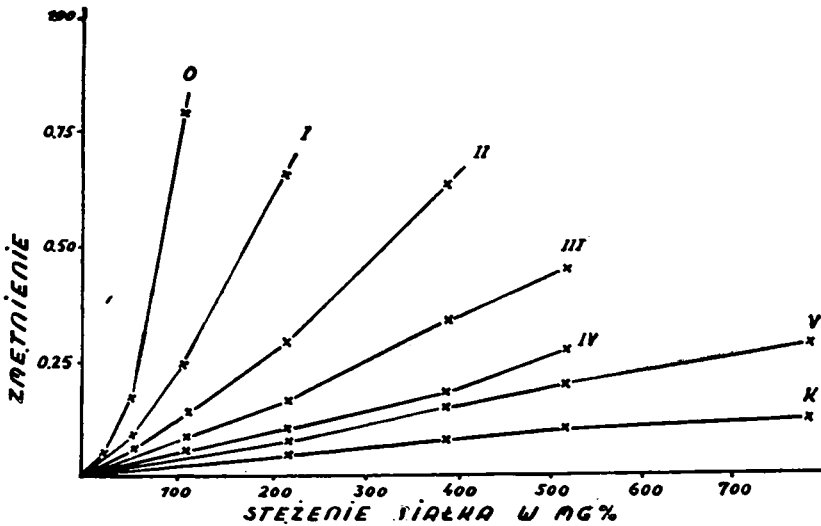
*c) Wpływ jonów barwnikowych na przebieg koagulacji cieplnej białek surowicy.*



Ryc. 1 a. Eozyna. Temp. 60°. Tarcza 1. Filtr L<sub>2</sub>. Białka całk. 7 · 8 g<sup>0</sup>/o A/G — 1,25. Stęż. barwnika: I — 3 · 10<sup>-4</sup> M. II — 9 · 10<sup>-4</sup> M. III — 15 · 10<sup>-4</sup> M. IV — 21 · 10<sup>-4</sup> M. V — 3 · 10<sup>-3</sup> M. K — surowica nieogrzewana O — surowica bez barwnika.



Ryc. 1 b. Eozyna. Temp. 80°. Objasnienia Ryc. 1 a.



Ryc. 1 c. Eozyna. Temp. 100°. Objasnienia Ryc. 1 a.

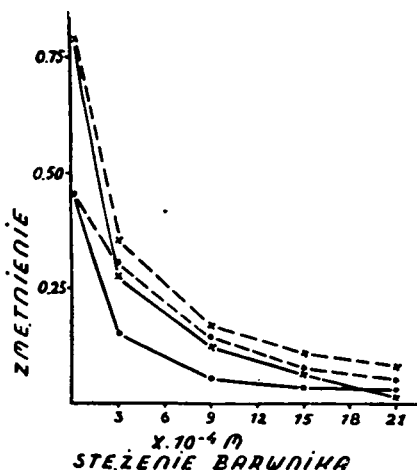
alpha (Wpływ barwników kwaśnych).

Po ogrzaniu do temp. 60° wielkość zmętnienia jest zależna od stężenia barwnika tylko w niewielkim stopniu. Przy ogrzaniu do 80° zależność zmętnienia od stężenia białka i barwnika jest już bardzo wyraźna. Po ogrzaniu do 100° krzywe zmętnienia przebiegają bardziej stromo, niż krzywe zmętnienia otrzymane po ogrzaniu do 80°.

W temperaturze tej przy końcowym stężeniu barwnika wynoszącym  $3 \cdot 10^{-3}M$  nie udaje się uzyskać całkowitego zahamowania wzrostu zmętnienia. Przy równoważnych stężeniach w obecności

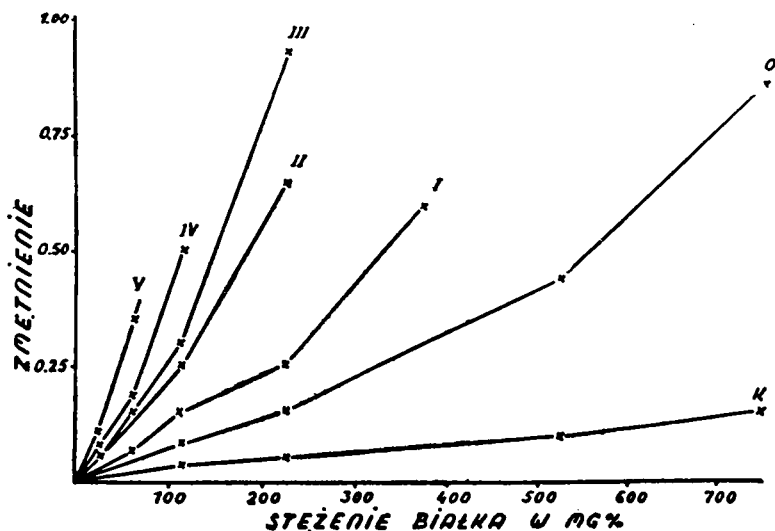


oranżu metylowego zmętnienie jest zawsze większe niż w obecności eoizyny.

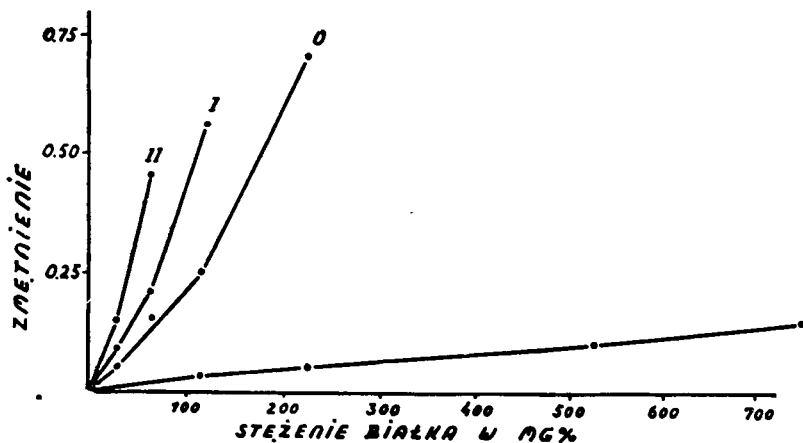


Ryc. 2. Wpływ eoizyny i oranżu metylowego na koagulację cieplną białek surowicy. Fot. Pulfricha. Tarcza 1. Filtr L<sub>2</sub>. A/G = 1,25. Stęż. białka — 110 mg<sup>0</sup>/<sub>o</sub>.

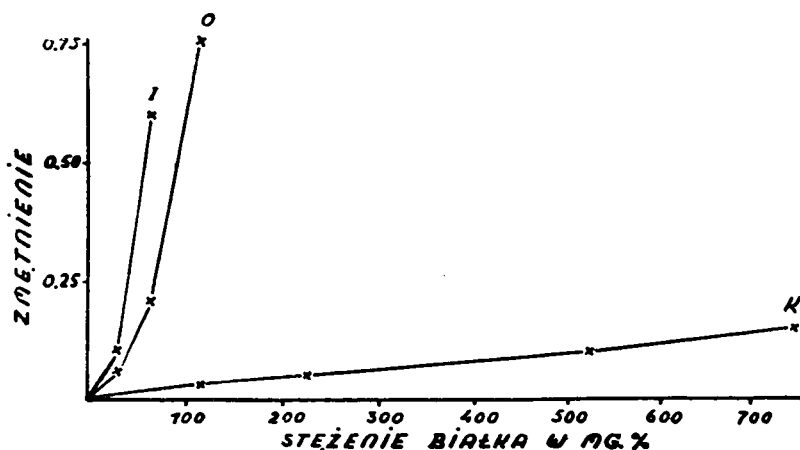
— • — • — eoizyna 80°                      --- • --- • --- oranż metylowy 80°  
 — × — × — eoizyna 100°                    --- × --- × --- oranż metylowy 100°



Ryc. 3a. Trypaflawina. Temp. 60°. Tarcza 1. Filtr L<sub>2</sub>. Białka całk. 7.5 g<sup>0</sup>/<sub>o</sub> A/G = 1.18. Stęż. barwnika: I —  $3 \cdot 10^{-4}$  M; II —  $9 \cdot 10^{-4}$  M; III —  $15 \cdot 10^{-4}$  M; IV —  $21 \cdot 10^{-4}$  M; V —  $3 \cdot 10^{-3}$  M. K — surowica nieogrzewana; O — surowica bez barwnika.



Ryc. 3b. Trypaflawina. Temp. 80°. Tarcza 1. Filtr L<sub>2</sub>. Białka całk. 7.5 g<sup>0</sup>/. A/G = 1.18. Stęż. barwnika: I — 3.10<sup>-4</sup> M. II — 9.10<sup>-4</sup> M. K — surowica nieogrzewana. O — surowica bez barwnika



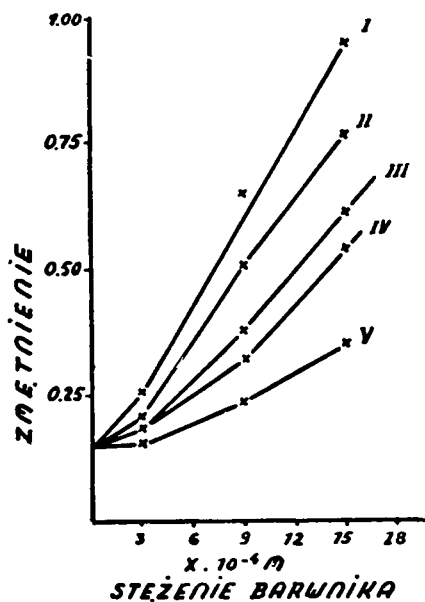
Ryc. 3c. Trypaflawina. Temp. 100°. Tarcza 1. Filtr L<sub>2</sub>. Białka całk. 7.5 g<sup>0</sup>/. A/G 1,18; Stężenie barwnika 3.10<sup>-4</sup> M; K — surowica nieogrzewana; O — surowica bez barwnika.

beta: (Wpływ barwników zasadowych).

Po podgrzaniu do temp. 60° wielkość otrzymanego zmętnienia jest wprost proporcjonalna do stężeń białka i barwnika. Po podgrzaniu do 80° już przy stężeniu 1.5 do 2.1.10<sup>-3</sup>M powstaje podczas ogrzewania osad uniemożliwiający pomiar zmętnienia. Po podgrzaniu do 100° osad powstaje już przy stężeniu barwnika 9.10<sup>-4</sup>M.

Przy użyciu równoważnych stężeń barwników, a przy stałej ilości białka, najwyższe wartości zmętnienia otrzymuje się przy użyciu riwanolu, a najmniejsze w obecności fuksyny. Pozostałe barwniki można uszeregować następująco:

Trypaflawina > akryflawina > oranż akrydynowy



Ryc. 4. Wpływ kationów barwnikowych na koagulację cieplną białek surowicy. Temp. 60°C. Stęż. białka 212 mg<sup>0</sup>%. A/G = 1.18. I — Riwanol. II — Trypaflawina. III — Akryflawina. IV — Oranż akrydynowy. V — Fuksyna.

## OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ

Biorąc pod uwagę oporność poszczególnych frakcji wobec ogrzewania, można na podstawie naszych badań uszeregować je następująco:

Fracja II-R > Albumina > Fibrynogen.

Stwierdziliśmy też, że układ: frakcja II-R — albumina najtrudniej koaguluje pod wpływem ciepła, trudniej niż sama frakcja II-R i sama albumina.

Klingenberg (6) określił wrażliwość surowicy na działanie ciepła („Hitzstabilität“) stosunkiem globulinowym ( $\chi$ ).

$$\chi = \frac{\text{gamma — globuliny}}{\text{alfa — globuliny} + \text{beta — globuliny}}$$

Im większy ten stosunek, tym większa wrażliwość surowicy, przejawiająca się szybszym i intensywniejszym wystąpieniem skłaczkania. Albuminy wg tego autora nie wpływają w sposób zasadniczy na wrażliwość surowicy wobec ciepła, ponieważ są równomiernie wiązane przez poszczególne frakcje globulinowe. Opierając się na tych rozważaniach, należałoby przypuszczać, że frakcja II-R składająca się w 33% z beta, a 67% z gamma — globulin będzie najbardziej wrażliwą na działanie ciepła, i że układ albumina — frakcja II-R będzie zachowywał się podobnie. Tymczasem okazało się że jest inaczej. Frakcja II-R i układ: frakcja II-R — albumina najtrudniej koagulują pod wpływem ciepła ze wszystkich przebadanych przez nas frakcji i układów. Tego rodzaju sprzeczność nie podważa w zasadzie słuszności założeń Klingenberga jeśli przyjmie się, że frakcja II-R sama przez się stanowi osobny kompleks białkowy o własnościach nie będących sumą własności beta- i gamma-globulin. W poprzedniej pracy (16) stwierdziliśmy już, że zmieszanie albuminy z frakcją II-R zwiększa kwaśny charakter albuminy. Próbowaliśmy wyjaśnić to zjawisko opierając się na teorii Klotza (19), wg której grupy kationowe albuminy mogą być połączone wiązaniem wodorowym z grupami hydroksylowymi globulin posiadających te grupy w nadmiarze.

Dlatego też wydaje się, że w przypadku samej frakcji II-R nie jest wogóle słuszne posługiwanie się podanym wyżej wzorem Klingenberga (6), natomiast w przypadku układu albumina — frakcja II-R wzór ten możnaby zmodyfikować w następujący sposób:

$$\chi = \frac{\text{gamma — globuliny}}{\text{Albuminy} + \text{beta — globuliny}}$$

tymbardziej, że przypuszczenie Klingenberga (6) o powstawaniu połączeń między albuminami a poszczególnymi frakcjami globulinowymi oparte jedynie na różnicach wartości punktów izoelektrycznych, nie jest przekonujące. Tak zmodyfikowany wzór pozwala nam dać przypuszczalne wyjaśnienie zjawiska, dlaczego układ:

albumina — frakcja II-R najtrudniej koaguluje pod wpływem ciepła jeżeli stosunek — albumina/II-R wynosi 1:1, a łatwiej, gdy stosunek komponent wynosi 1:3 wzgl. 3:1.

Jeżeli stosunek 1:1 uznamy za optymalny, to w przypadku 1:3 przeważa obniżający odporność wpływ gamma—globulin, stanowiących główną część frakcji II-R. W przypadku zaś, gdy stosunek ten wynosi 3:1, ilość beta-globulin, stabilizujących wg K l i n g e n b e r g a surowicą, może być już niedostateczna.

Fibrynogen w naszych doświadczeniach zachowuje się tak, jak wg K l i n g e n b e r g a powinna zachowywać się gamma—globulina. Odpowiada to w zupełności jego punktowi izoelektrycznemu, jak również jego położeniu na proteinogramie, na którym zajmuje zawsze pozycję między beta i gamma—globulinami.

Przyjęty na ogół pogląd, że wyniki niektórych prób koagulacyjnych, takich jak próba W e l t m a n a, czy też próba H o r s t a (14), zależą jedynie od zmian zachodzących w obrębie białek surowicy. Okazał się on w świetle nowszych badań niewystarczający, ponieważ nie uwzględnia całokształtu zjawisk związanych z koagulacją cieplną białek. W procesie tym, jak już wspomniano wyżej, ważna rola przypada także różnego rodzaju związkom występującym w środowisku w formie jonów. W naszej pracy wykazaliśmy, że jony barwnikowe w dużym stopniu mogą modyfikować przebieg koagulacji cieplnej białek surowicy i to mniej więcej w ten sam sposób, jak przebieg koagulacji poszczególnych frakcji białkowych opisany przez K l i n g e n b e r g a (5), H u g g i n s a i J e n s e n a (2) M o r a w i e c k i e g o (4) i innych. Nie powinno się porównywać naszych wyników i wyników K l i n g e n b e r g a (5) ściśle pod względem ilościowym, ale porównując przebieg krzywych koagulacji cieplnej albuminy jaja kurzego i krzywych koagulacji cieplnej białek surowicy można powiedzieć, że zjawisko hamowania, czy też przyśpieszenia koagulacji cieplnej przez jony przebiega w zasadzie jednakowo w wypadku pojedynczej frakcji białkowej, jakoteż w wypadku złożonego układu białkowego, jakim jest surowica.

K l i n g e n b e r g (5) charakteryzuje krzywe koagulacji cieplnej albuminy jaja kurzego wzorem:

$$p = \frac{T}{C^2}$$

gdzie  $p$  — parametr krzywej mówiący o stopniu nachylenia stycznej do krzywej wobec osi  $X$ , którego wartość wzrasta, gdy kąt nachylenia zwiększa się,  $T$  — zmętnienie bezwzględne, a  $C$  — stężenie albuminy jaja kurzego.

Wielkość  $p$  jest również zależna od stężenia barwnika i w wypadku eozyny maleje ze wzrostem stężenia. Z naszych badań wynika, że wielkość ta jest zależna i od temperatury, ze wzrostem której rośnie, jak również od tego jaki barwnik został zastosowany. Wielkość  $p$  w jednakowych warunkach jest dla oranżu metylowego zawsze większa niż dla eozyny. Dla barwników kationowych zakres działania powyższego równania jest znacznie mniejszy i szybko maleje ze wzrostem temperatury. Parametr krzywych zmętnienia, podobnie jak przy użyciu barwników anionowych, rośnie ze wzrostem temperatury. Zależność  $p$  od stężenia barwnika jest natomiast zupełnie inna, niż wtedy, gdy dodajemy do środowiska anionów, a mianowicie parametr krzywej rośnie ze wzrostem stężenia kationu. Wyraźna jest też zależność od rodzaju barwnika.

Ustalając pozostałe, najmniejsze wartości  $p$  otrzymujemy dla fuksyny, a największe dla riwanolu. Analiza naszych wyników uzupełnia więc wyniki Klingenberga przez wykazanie zależności  $p$  od temperatury i od rodzaju użytego jonu oraz wskazuje, że przy zmianach stosunku ciał elektrododatnich i elektroujemnych w środowisku, surowica zachowuje się, jak jednolity układ.

Różny wpływ poszczególnych jonów barwnikowych zależy prawdopodobnie od ich struktury. Z analogicznym zjawiskiem zetknęliśmy się badając wpływ kationów akrydynowych na białka surowicy. (16).

Należy zaznaczyć, że w pracy obecnej posługiwano się tylko takimi stężeniami barwników akrydynowych, które w temperaturze pokojowej nie wytrącały zupełnie białek surowicy. Może się jednak nasunąć przypuszczenie, że przyspieszające koagulację cieplną działanie kationów akrydynowych na białka surowicy polega tak samo na łączeniu się ich z grupami karboksylowymi białek i zmniejszeniu przez to ujemnego ładunku cząsteczki, jak w wypadku działania w temperaturze pokojowej.

Jeżeli wytrącanie zachodzi w podwyższonej temperaturze przy małych stężeniach barwnika i jeżeli w tych warunkach nie dochodzi do rozdziału białek na frakcje, należy prawdopodobnie przypię-

sać to zmianom, jakie zachodzą podczas denaturacji cieplnej w cząsteczce białka. Zmiany te między innymi doprowadzają do ujawnienia się większej ilości grup COOH i zmniejszają różnice w budowie cząsteczek poszczególnych frakcji, szczególnie gdy dotyczy rozmieszczenia ładunku elektrycznego. W podobny sposób wyjaśniają zjawisko hamowania i przyspieszenia koagulacji cieplnej białek: Huggins, Jensen (2) oraz Klingenberg i współ. (5, 6, 7).

Z omówionych badań może wynikać, że działanie jonów barwnikowych na przebieg koagulacji cieplnej białek surowicy zachodzi już po częściowym przynajmniej ich zdenaturowaniu.

Zjawia się więc pytanie, czy w wypadku, gdy denaturacja białka zachodzi pod działaniem innego czynnika niż temperatura, będziemy również mogli zapobiec względnie przyspieszyć ich koagulację, regulując dowolnie skład jonowy środowiska.

Zagadnienie to stanowić będzie przedmiot dalszych badań.

## PIŚMIENICTWO

- 1) Bawden F., Pirie W.: *Bioch. J.* 34, 1258, 1940.
- 2) Huggins Ch., Jensen E.: *J. Biol. Chem.* 179, 645, 1949.
- 3) Mandl I., Neuberger C., Grauer A.: *Biochim. Biophys. Acta* 8, 654, 1952.
- 4) Morawiecki A.: *Acta Biochim. Polonica* 1, 47, 1954.
- 5) Klingenberg H.: *Ztschr. Physiol. Chemie* 291, 16, 1952.
- 6) Klingenberg H.: *Ztschr. Physiol. Chemie* 293, 63, 1953.
- 7) Klingenberg H., Moro E.: *Ztschr. f. d. ges. inn. Med.* 33, 392, 1952.
- 8) Kleczkowski A.: *Brit. J. exp. Pathol.* 22, 188, 1941.
- 9) Kleczkowski A.: *Brit. J. exp. Pathol.* 22, 192, 1941.
- 10) Bawden F., Kleczkowski A.: *Brit. J. exp. Pathol.* 22, 208, 1941.
- 11) Turner E., Boyer P.: *Arch. Bioch.* 37, 353, 1952.
- 12) Scheer V.J., Wyckoff R., Clarke F.: *J. Immunology* 40, 39, 1941.
- 13) Ardry L.: *Bull. Soc. Chem. Biol.* 33, 236, 1951.
- 14) Horst A.: *Pol. Tyg. Lek.* 4, 1145, 1949.
- 15) Cohn E.: *Science* 101, 51, 1945.
- 16) Krawczyński J.: *Annales UMCS 9 Sec. D.* 1954.
- 17) Kingsley G.: *J. Lab. Clin. Med.* 27, 840, 1942.
- 18) Wunderly Ch., Wuhrman F.: *Schw. med. Wschr.* 1128, 1945.
- 19) Klotz J.: *Amino acids and proteins XIV*, 198, 1950.



## РЕЗЮМЕ

Исследовано какое влияние оказывают на себя в процессе тепловой коагуляции отдельные белковые фракции и подтверждено, что весьма трудно коагулирует под влиянием теплоты фракция II-R состоящая в 33% из  $\beta$ -глобулина и в 67% из гамма-глобулина. Легче коагулирует альбумин — II-R, II-R — фибриноген весьма трудно коагулирует состав альбумин — II-R. Обсуждено предполагаемый механизм этого явления и причины несогласия с сообщенной Клингенбергом глобулиновой формулой, предполагаемым мерилем сопротивляемости сыворотки на влияние теплоты. Сообщено возможную модификацию этой формулы. В позднейших научных исследованиях проанализировано влияния красящих анионов и катионов на процесс тепловой коагуляции системы белковой нормальной сыворотки.

Доказано, что анионы оказывают защищающее действие перед тепловой коагуляцией, катионы же ускоряют тепловую коагуляцию белка сыворотки. Из исследованных анионов более сильное защищающее действие проявил эозин нежели метиловый оранжевый. Из катионов больше всего ускорял коагуляцию риванол, дальше триафлавин, акрифлавин, акридиновый оранжевый и фуксин. Выдвинуто предположение, что механизм действия акридиновых ионов на процесс тепловой коагуляции сыворотки белков может быть такой же, как механизм реакции тех же белков на белки сыворотки в комнатной температуре. В одном и другом случае доходит вероятно к нейтрализации свободных карбоксильных групп через пигментные катионы, что в результате уменьшает электрический заряд белковой молекулы. Обращено внимание также на то, что и иные коагуляционные реакции, применяемые в лабораторной диагностике будут вероятно модифицированы через прибавление к среде пигментационных анионов или катионов.

## SUMMARY

Studies were conducted to determine, what is the mutual influence in the process of thermic coagulation of the separate protein fractions and it was found that the most resistant to thermic coagulation is the fraction R-II, which consists in 33 per cent of beta-globulins and in 67 per cent of gamma-globulins. More easily is coagulated albumin — II-R, II-R — fibrinogen coagulates with great difficulty the composition albumin — II-R. The supposed mechanism of this phenomenon is discussed and the causes of discrepancies with the globulin formula cited by Klingenberg which is regarded to be a measure of resistance of the serum to the action of heat are analysed. Possible modification of this formula is given. In further studies investigations were conducted on the influence of pigment anions and cations on the course of thermic coagulation of the protein system of a normal serum.

It has been proved that anions exert a protective action against thermic coagulation; cations, however, accelerate thermic coagulation of serum proteins. Among the examined anions eosine possessed a stronger protective action than methyl-orange. Among cations rivanol possessed the greatest accelerating effect on coagulation, next tryptaflavine, acriflavine, acridine - orange and fuchsin. A supposition has been drawn, that the mechanism of action of acridine ions on the course of thermic coagulation of serum proteins may be the same as in the mechanism of their action on serum proteins at the room temperature. In the first and second case most likely are neutralized free carboxyl groups by pigment ions, that decreases the electric charge of the protein molecule. Attention has been drawn to the fact, that also other coagulation reactions used in laboratory diagnosis will most likely be modified by an addition of anions or cations to the medium.