

Biblioteka  
U. M. K.  
Toruń

018788  
3

NR. 3.

ADAM WODZICZKO.

**BADANIA NAD ROZMIESZCZENIEM  
FERMENTÓW UTLENIAJĄCYCH  
U ROŚLIN.**

**I. LOKALIZACJA OKSYDAZ W TKANKACH ROŚLIN  
WYŻSZYCH I RÓWNOLEGEOŚĆ ICH WYSTĘPOWANIA  
Z SUBSTANCJAMI PEKTYNOWEMI.**

**RECHERCHES SUR LE LIEU DE L'APPARITION  
DES FERMENTS OXYDANTS CHEZ LES VÉGÉTAUX  
SUPÉRIEURES.**

**LA LOCALISATION EXTRACELLULAIRE DES OXYDASES DANS  
LE TISSUS DES PLANTES SUPÉRIEURES ET  
LA CONCOMITANCE QUI EXISTE ENTRE LEUR APPARITION  
ET CELLE DES SUBSTANCES PECTIQUES.**

POZNAŃ

... CZCIONKAMI DRUKARNI ZJEDNOCZENIA MŁODZIEŻY ...  
SKŁAD GŁÓWNY W KSIĘG. GEBETHNERA I WOLFFA W POZNANIU  
1921.

ad M. 200 a. o. b. / s. m. G. W. S.

## Wydawnictwa Poznańskiego Tow. Przyjaciół Nauk.

**Roczniki Towarzystwa Przyjaciół Nauk Poznańskiego** 47 tomów  
(1860—1920).

**Prace Komisji filologicznej.** Tom I, zeszyt 1. Seweryn Hammer „O wpływie tragedji Eurypidesa „Hippolytos“ na poezję hellenistyczną“ 1921, str. 83. — Zeszyt 2. Roman Pollak „Goffred Tassa — Kochanowskiego“ (w druku).

**Prace Komisji filozoficznej.** Tom I, zeszyt 1. Stefan Błachowski „O niektórych związkach zachodzących między typami pamięciowemi“ 1921, str. 30. — Tom II, Adam Zółowski — „Dogmat Krytyki“ (w druku).

**Prace Komisji historycznej.** Tom I, zeszyt 1. Jan Rutkowski. „Skup sołectw w Polsce w XVI wieku“ 1921, str. 26. — Zeszyt 2. Kazimierz Tymieniecki: „Wolność kmiecia na Mazowszu w XV wieku“ 1921, str. 87. — Zeszyt 3. Jan Rutkowski: „Poddaństwo włościan w XVIII wieku w Polsce i niektórych innych krajach Europy“ 1921, str. 157. — Zeszyt 4. Adam Skałkowski: „Polacy na San Domingo“ 1921, str. 199. — Tom II, zeszyt 1. Marjan Gumowski: „Biskupstwo Kruszwickie w XI wieku“ 1921, str. 68. Zeszyt 2. Grodecki Roman „Przywilej menniczny biskupstwa poznańskiego w r. 1232“ (w druku).

**Prace Komisji matematyczno-przyrodniczej.**

Seria A. (geografia, geologia, paleontologia, mineralogia) Tom I, zeszyt 1. Stanisław Pawłowski: „O jeziorkach dyluwjalnych na południowej krawędzi zlodowacenia“ 1921, str. 17 + 1 tab.

Seria B. (nauki biologiczne) Tom I, zeszyt 1. Bolesław Namysłowski: „Studja hydrobiologiczne I“. — Jan Grochmalicki: „Materiały do fauny skorupiaków Polski. *Ostracoda* Małżoraczki i *Copepoda*-Widłonogie“ — Jan Czekanowski „Z badań nad uwarstwieniem etniczno-społecznem Polski“ — Jerzy W. Szulczewski: „Przyczynek do fauny czerwców wielkopolskich“ (*Coccidae*) 1921, str. 84 + 1 tab. — Zeszyt 2. Wacł. Baehr: „Dziedziczność i pleć w świetle cytologii i genetyki“. — Jan Grochmalicki: „Przyczynki do znajomości fauny słodkowodnej wschodniej Afryki (*Phyllopoda*-Liścionogie)“ — A. W. Jakubski: „Kilka uwag w sprawie czerwca polskiego“ 1921, str. 85—182 + 1 tab.

Seria C. (chemja) Tom I, zeszyt 1. Adam Jurkowski: „Studja nad metodami ilościowego oznaczania alkaloidów“ 1921, str. 21.

Seria D. (matematyka i fizyka). Tom I, zeszyt 1. W. Smosarski: „Kilka obserwacyj zanikania obłoków kłębiastych“ — W. Ślebodziński. „Kilka twierdzeń o toczeniu się powierzchni“ — K. Abramowicz: „Przyczynek do przekształcenia 7-go stopnia pewnej funkcji automorficznej“ 1921, str. 35 + 3 tab.

PRACE NAUKOWE UNIWERSYTETU POZNAŃSKIEGO.  
SEKCJA MATEMATYCZNO-PRZYRODNICZA.  
NR. 3.

---

ADAM WODZICZKO.

**BADANIA NAD ROZMIESZCZENIEM  
FERMENTÓW UTLENIAJĄCYCH  
U ROŚLIN.**

I. LOKALIZACJA OKSYDAZ W TKANKACH ROŚLIN  
WYŻSZYCH I RÓWNOLEGEŃŚC ICH WYSTĘPOWANIA  
Z SUBSTANCJAMI PEKTYNOWEMI.

**RECHERCHES SUR LE LIEU DE L'APPARITION  
DES FERMENTS OXYDANTS CHEZ LES VÉGÉTAUX  
SUPÉRIEURES.**

LA LOCALISATION EXTRACELLULAIRE DES OXYDASES DANS  
LE TISSUS DES PLANTES SUPÉRIEURES ET  
LA CONCOMITANCE QUI EXISTE ENTRE LEUR APPARITION  
ET CELLE DES SUBSTANCES PECTIQUES.



POZNAŃ  
... CZCIONKAMI DRUKARNI ZJEDNOCZENIA MŁODZIEŻY ...  
SKŁAD GŁÓWNY W KSIĘG. GEBETHNERA I WOLFFA W POZNANIU  
1921.

10 11 12 - 9

018788



ZBIORNICA  
Kolekcji  
Zabezpieczonych

D. 1010/56.

## 1. Wstęp.

Oddychanie to podstawowy proces życiowy. Bliższe zbadanie jego mechanizmu rzuciłoby światło na wszystkie inne zjawiska życia. Nic więc dziwnego, że to centralne zagadnienie biologiczne stanowiło oddawna przedmiot szczególnego zainteresowania badaczy, dzięki pracy których istota tego procesu została w ogólnych zarysach wyjaśniona.

Lavoisier odkrył, że palenie się ciał polega na tworzeniu się  $\text{CO}_2$  z organicznych substancyj przy udziale tlenu atmosferycznego i uznał pierwszy oddychanie zwierząt za proces powolnego spalania, przy którym uwalnia się energia, będąca źródłem ciepła i siły mięśniowej organizmu.

Pasteur wykazał, że fermentacja alkoholowa, to proces utrzymujący życie przez oddychanie śródcząsteczkowe, a w braku tlenu zastępujący oddychanie normalne.

Godlewski wykrył, że również wyższe rośliny nie straciły zdolności życia przy pomocy fermentacyjnych rozszczepień, tak jak to drożdże czynią normalnie i że niema zasadniczej różnicy między temi dwoma procesami.

Równocześnie z tem wyjaśnianiem istoty oddychania zwrócono uwagę, że w oddychaniu nie mamy przed sobą zwykłego procesu utlenienia; w organizmach bowiem ulegają bez pomocy wysokich temperatur szybkiemu i to zupełnemu spaleniu na  $\text{CO}_2$  i  $\text{H}_2\text{O}$  ciała jak tłuszcze i węglowodany, które poza żywą komórką tlen atmosferyczny utlenia tylko nieznacznie i to nadzwyczaj powoli.

Trudność tę pierwszy usiłował przezwyciężyć Schoenbein, który (już od 1845 r.) z niezwykłą bystrością śledził analogie, jakie zachodzą między niebieszczeniem roztworu żywicy gwajakowej przez nieorganiczne środki utleniające (jak Cl, Br, J, nadtlarki Mn i Pb i odkryty przez niego ozon), a przez tkanki

i soki roślinne. Zwrócił również uwagę na błękitnienie pewnych grzybów kapeluszowych po przełamaniu (*Boletus luridus* i in.). Udało mu się wykazać, że substancja powodująca samorzutne błękitnienie tych grzybów (t. zw. dziś boletol) zachowuje się zupełnie podobnie jak gwajak. Alkoholowy wyciąg tej substancji nie zmienia się w zetknięciu z tlenem powietrza, lecz niebieszczaje natychmiast, tak za dodaniem nieorganicznych środków utleniających, jak również soku wyciśniętego ze świeżego grzyba.

Schoenbein stwierdził, że tę zdolność utleniania gwajaku lub alkoholowego wyciągu siniaka posiadają liczne tkanki roślinne.

Przyjmował on, że tkanki te zawierają substancję, która tlen atmosferyczny zamienia na ozon, wchodzi z nim w luźne połączenie i następnie ten czynny tlen przenosi na gwajak, chromogen siniaka, czy też inne utleniające ciała w komórce.

Substancja ta ma być więc aktywatorem tlenu powietrza (przeprowadza go w czynną formę  $O_3$ ) i zarazem przenosicielem tlenu. Daje się wyciągnąć wodą, a ogrzana do  $100^{\circ}$  traci zupełnie „ożywiające i przenoszące tlen“ własności.

Tejże samej substancji zawdzięcza, według Schoenbeina, wiele tkanek roślinnych i zwierzęcych zdolność rozkładania wody utlenionej na  $H_2O$  i  $O_2$ , jak również niebieszczenia gwajaku w obecności  $H_2O_2$ .

I chociaż dzisiaj wiemy, że ozon jest dla plazmy silną trucizną i nie bierze udziału w procesie biologicznego spalania, jak również rozkład  $H_2O_2$  na  $H_2O$  i  $O_2$  przypisujemy odrębnemu fermentowi katalazie, to jednak w ideach Schoenbeina znajdujemy wszystkie zasadnicze podstawy dzisiejszych wiadomości o mechanizmie utleniania w żywym organizmie. Jego trwałą zasługą pozostanie przeniesienie pojęcia katalizatorów procesu utleniania z chemii do biologii i zwrócenie uwagi na ich szerokie rozpozsechnienie w żywych komórkach.

Ostateczny dowód istnienia w ciele roślin specyficznych katalizatorów, powodujących wyłącznie tylko przyspieszenie utleniania musimy jednak przyznać Bertrandowi.

Podstawowe prace tego badacza stanowią początek nowożytnego studjum nad fermentami utleniającymi w organizmach roślinnych.

Bertrand zbadał szczegółowo ferment występujący w soku mlecznym drzewa lakowego *Rhus vernicifera* DC. Ferment ów, t. zw. przez niego lakkaza, katalizuje utlenienie zawartego również w soku mlecznym ciała fenolowego lakkolu, zamieniając go na ów przedziwny i jedyny w swoim rodzaju czarny lak japoński, któremu lakierowe wyroby japońskie zawdzięczają swą światową sławę.

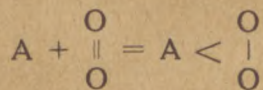
Owa lakkaza utlenia dalej pyrogallol (na purpurogallinę przy odszczepieniu  $\text{CO}_2$ ), hydrochinon (na chinon), kwas gwa-jakonowy w gwa-jaku i liczne dwu- i wielohydroksylowe orto- i parafenole, nie działa zaś zupełnie na skrobię, czem różni się od diastazy.

Bertrand dowiódł wreszcie, że lakkaza nie działa na tyro-zynę, a utlenienie tyrozyny na ciemne ciała barwikowe (melaniny) powoduje specjalny ferment tyrozynaza i wykazał w ten sposób istnienie dwu różnych od siebie, specyficznie działających fer-mentów utleniających.

Ogół fermentów utleniających nazwał oksydazami. Dzia-łanie oksydaz odnosi do obecności w nich manganu, który znany jest w chemji jako silny katalizator w procesach utlenia-nia, podobnie jak sole żelaza, chromu, miedzi i inne ciała, które mogą istnieć w kilku stopniach utlenienia.

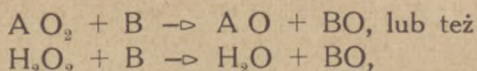
Nie jest wykluczone, że pewne utlenienia w żywych komórkach odbywają się wedle teorii Bertranda, jednak dla oksydaz typu lakkazy (dla których teoria ta pierwotnie została stworzoną), jest dziś prawie powszechnie przyjęta inna teoria Bacha i Chodat'a, której korzenie tkwią również w ideach Schoenbeina o aktywowaniu tlenu.

Według badań chemicznych Englera i Bacha, przy zjawiskach powolnego samoutleniania powstają stale nadtlenki przez zwią-zanie całej drobiny tlenu z ciałem samoutleniającem się.



Połączenia te o charakterze wody utlenionej, zawierają tlen w formie bardziej czynnej i w obecności wody łączą się z nią na wodę utlenioną. Jeżeli przytem jest obecne jakieś inne ciało, którego tlen powietrza w danych warunkach nie

zmienia, to powstający nadtlenek lub też woda utleniona mogą owe ciało (t. zw. akceptor) utlenić.



Przedstawiony wyżej proces jest właściwie tylko szczególnym przypadkiem t. zw. „zależnych utlenień“, których dobrze wystudjowanym przykładem jest utlenianie błękitu indygowego w obecności olejku terpentynowego.

Błękit indygowy ulega utlenieniu pod wpływem tlenu atmosferycznego tylko niesłychanie powoli. Tymczasem olejek terpentynowy przyjmuje łatwo tlen atmosferyczny i rozbijając jedno z jego wiązań, tworzy z nim połączenie typu nadtlenu.

Nadtlenek ten oddaje połowę luźnie związanego tlenu błękitowi indygowemu, przez co przyspiesza bardzo wydatnie jego utlenienie.

Zasługą Bacha i Chodat'a jest zużytkowanie tych zjawisk dla biologji.

Utlenianie w żywej komórce przebiega wedle nich w następujący sposób:

Tworzenie nadtlenu jest konieczną fazą swobodnego utleniania i należy do stałych czynników, grających w życiu komórki pewną rolę, do których komórka musi się w odpowiedni sposób przystosować. To przystosowanie wyraża się w tem, że komórka wytwarza ciała o naturze fermentów, za pośrednictwem których zużytkowuje te nadtenki, ewentualnie je unieszkodliwia. Te organiczne ciała w komórce, które przybierając tlen drobinowy tworzą nadtenki, B. i Ch. zowią *o k s y g e n a z a m i*. Dzięki nim rozporządza roślina w nadtenkach zapasem tlenu niezależnym od światła, ciepła itd. Ponieważ jednak same nadtenki działają bardzo leniwo, więc dla ich aktywowania wytwarza roślina specjalne fermenty *p e r o k s y d a z y*. Peroksydazami nazywamy za Linoissier'em (1898) fermenty, które utleniają tylko w obecności  $H_2O_2$  lub podobnych nadtlenu, w przeciwieństwie do „bezpośrednich oksydaz“ (Bourquelot) czyli oksydaz w sensie ściślejszym, które mogą utleniać już przy pomocy tlenu atmosferycznego. Według B. i Ch. te bezpośrednie oksydazy są mieszaniną oksygenazy i peroksydazy.



W warunkach korzystnych dla powstawania nadtlenków mogłoby się ich wytworzyć ze szkodą dla komórki zbyt wiele; wtedy pełni swą rolę katalaza, która rozkłada nadtlenki lub  $H_2O_2$  uwalniając nieczynny tlen i działa w ten sposób jako regulator procesu utleniania.

Nazwiska Schoenbeina, Bertranda i Bacha i Chodat'a znaczą główne etapy rozwoju nauki o oksydazach, które są dzisiaj jednym z najwięcej badanych działów nauki o fermentach. Stara idea Hoppe-Seylera, że przemiana materji w żywej substancji polega na enzymatycznych działaniach, powszechnie się utwierdziła i w zjawiskach życiowych, a w szczególności w procesie oddychania widzimy dziś skomplikowany łańcuch enzymatycznych procesów.

Żywa komórka przyspiesza utlenianie różnych organicznych substancyj i posługuje się przy tem specjalnemi fermentami, których dzisiaj wykryto cały szereg. Bakterje octowe utleniają alkohol na kwas octowy przy pomocy fermentu alkoholazy, zasady purynowe w organizmie zwierzęcym są stopniowo utleniane przy pośrednictwie specjalnych oksydaz, samorzutne ciemnienie soku wyciśniętego z buraków przypisywano utlenieniu zawartej w nim tyrozyny przez tyrozynazę itd.

Najszerzej w organizmach roślinnych i zwierzęcych rozpowszechnione są jednak oksydazy, utleniające liczne ciała aromatyczne, jak fenole i pokrewne związki, na ciała barwne. Są to oksydazy typu lakkazy, zwane dziś najczęściej fenolazami, lub peroksydazami, o ile utleniają dopiero w obecności wody utlenionej lub podobnych nadtlenków. Fenolazy zwano dawniej wprost oksydazami, gdyż były badane najpierw i to najczęściej z pomiędzy wszystkich fermentów utleniających. Mimo, że w badanie fenolaz włożono wiele pracy i literatura poświęcona tej kwestji jest dziś niezwykle bogata, to tak natura ich, jak sposób działania w organizmie bynajmniej nie są wyjaśnione. Starsi badacze (Schoenbein, Traube) nie wahali się przyjmować, że istnieje ścisły związek między „oksydazami niebieszczącemi gwajak“ (jak zwano fenolazy), a biologicznem utlenianiem materiału oddechowego komórki. Dalsze badania wykazały, że utlenianie przez fenolazy rozciąga się tylko na ciała, które albo są organizmom obce, lub też odgrywają nieznaczną rolę w przemianie materji, tymczasem ważne substancje odżywcze

komórki, jak cukry, tłuszcze i białka, zupełnie nie są dostępne w probówce utleniającemu działaniu wyosobnionych fermentów. Stąd wielu badaczy odmawia oksydazom wszelkiej roli w przemianie materji, ograniczając ją do tworzenia substancyj ochronnych lub pigmentowych.

Po tym okresie rezygnacji, nowe fakta skłoniły przecież do uznania możliwości, że oksydazy utleniają ważne substancje komórki. Poglądy, jakie uzyskaliśmy w ostatnich latach na odbudowę cukrów w organizmie, pozwalają nam przypuszczać, że choć oksydazy na same cukry zupełnie nie działają, to jednak produkty rozszczepienia cukrów przez fermenty zymatyczne mogą być dalej przez oksydazy zmieniane.

Boysen Jensen (1912) uważa dwuoksyaceton za ten produkt zymatycznego rozszczepienia glikozy, który jest przez oksydazy roślinne bezpośrednio utleniany na  $\text{CO}_2$  i  $\text{H}_2\text{O}$ . Według teorii Pałladina (1909) rola oksydaz polega na dołączaniu tlenu do szeroko w świecie roślinnym rozpowszechnionych aromatycznych chromogenów. Powstające z chromogenów pigmenty redukują się znów łatwo na bezbarwne chromogeny, przyczem uwolniony tlen idzie na utlenienie związków wytwarzanych podczas rozkładu beztlenowego. Te pigmenty oddechowe obejmuje Pałladin nazwą *fithematyn*, aby wskazać na ich znaczenie fizjologiczne, analogiczne do hematyny krwi. Hypoteza Pałladina, choć daleka od ścisłego uzasadnienia, ma tę zaletę, że tłumaczy szerokie rozpowszechnienie fenolaz i aromatycznych chromogenów w świecie roślinnym. W ostatnich jednak czasach Pałladin, pod wpływem prac Wielanda (1912—1913) porzuca pogląd, że chromogeny oddechowe są przenosicielami tlenu na ciała, które mają być utlenione, lub spichrzami tlenu („fithematyn”) i przypuszcza, że rola ich polega wyłącznie na wiązaniu wodoru, powstającego przy oddychaniu roślin wyższych, dzięki anaerobicznemu rozszczepieniu glikozy. Wodór, związany przez chromogeny oddechowe, utleniony zostaje tlenem powietrza przy pomocy peroksydazy. Działalność utleniająca oksydaz jest więc nadzwyczaj szczupła i ogranicza się do odjęcia wodoru z akceptorów, jakimi są chromogeny oddechowe i utlenienia go na wodę (1914).

Obszerne przedstawienie obecnego stanu nauki o oksydazach, wraz z całą nowszą literaturą, zawierają prace znanych badaczy jak Czapek (1910), Clark (1911), Batteli & Stern (1912),

Oppenheimer (1913). Sumienne studjum tej literatury prowadzi nas do wniosku, że nasza istotna wiedza o fenolazach, mimo całej pracy, włożonej w ich badanie, jest tak skąpa, że nie możemy nawet twierdzić, iż wedle swej roli w organizmie zasługują na nazwę „fermentów utleniających“.

Co więcej, badacze nie są zgodni nawet w tem, czy mamy uważać je za fermenty, czy też ciała wchodzące w reakcje według praw stechiometrycznych. Nie wiemy dalej, czy w fenolazach mamy do czynienia z jakimś jednolitem ciałem chemicznym, czy może tylko z własnościami różnych nieraz ciał; czy ciało to należy do zakresu organicznych czy nieorganicznych połączeń chemicznych; czy gra jaką rolę w mechanizmie życiowego utleniania ważnych związków oddechowych komórki roślinnej, czy pełni jaką inną funkcję w życiu komórki; czy jest wydalną bez żadnego znaczenia, czy może ważną ekologicznie wydzieliną? Wszystko to są pytania, na które każdy z zajmujących się oksydazami coś odpowiada, choć nasze istotne wiadomości nie dają do tego dostatecznej podstawy. Powstały więc liczne teorie i hipotezy, które starają się wypełnić te olbrzymie luki w naszej wiedzy o oksydazach. Zadaniem niniejszej pracy jest, niezależnie od wszelkiej teorii zbadać w tkankach roślin wyższych lokalizację fenolaz i peroksydaz. Zadaniu temu poświęcano dotychczas niezwykle mało uwagi, tymczasem „ze względu na wielkie znaczenie fermentów w przemianie materji i w życiu organizmów wogóle, byłoby rzeczą wielkiej doniosłości, gdybyśmy posiadali dokładniejsze wiadomości o umiejscowieniu ich w komórce i gdybyśmy posiadali w ręce środki, pozwalające na wykrywanie fermentów w miejscu ich występowania w komórkach, tkankach i organach“ (Molisch: Mikrochemie der Pflanze. 1913).

Ogólny pogląd na rolę poszczególnych ciał w procesach życiowych będzie dopiero wtedy możliwy, gdy poznamy dokładnie ich rozmieszczenie w tkankach tak roślinnych jak zwierzęcych. O ile w badaniach mikrochemicznych największy postęp zrobiono z botanicznej strony (dzięki łatwiejszemu polu badania, jakim są tkanki roślinne), to kwestja siedliska oksydaz w tkankach i komórkach była badaną w latach ostatnich prawie wyłącznie przez zoologów, podczas gdy botanicy niezwykle mało poświęcali jej uwagi.

W pracy niniejszej starałem się zebrać to, co dotychczas pisano o lokalizacji oksydaz w komórce roślinnej, sprawdzić krytycznie i rozszerzyć przez własne badania. Wyniki są uderzające przede wszystkim w tym względzie, że o ile dotychczas *consensu omnium* uważano fenolazy za endofermenty, (tylko Raciborski wskazywał na zewnątrz komórkową lokalizację oksydazy przestworów powietrznych roślin wodnych), to obecnie stwierdzam na podstawie poszukiwań mikrochemiczno-lokalizacyjnych, że występowanie fenolaz (i peroksydaz) w tkankach roślin wyższych ma miejsce tylko w błonach komórkowych i subtelniejsza ich lokalizacja idzie zawsze w parze z obecnością substancyj pektynowych.

Pracę tę zacząłem w r. 1915 w Instytucie botanicznym Uniwersytetu Jagiellońskiego pod kierownictwem nieodżałowanej pamięci Profesora Raciborskiego; przerwana wskutek służby wojskowej w l. 1916-1918, wykończyłem w Zakładzie anatomji i fizjologii roślin w r. 1919.

## 2. Przegląd dotychczasowych badań lokalizacyjnych nad oksydazami.

Pierwsze obszerniejsze dane o lokalizacji ciał niebieszcących gwajak w tkankach roślinnych zawierają prace Grüssa. W rozprawie: „Die Diastase im Pflanzenkörper“ (1895) pierwszy stosuje reakcję gwajakową do celów mikroskopowych, uważając ją za Lindnerem (Zeitschrift f. Spiritusindustrie 1886) za specyficzną reakcję na diastazę. Metodę badania poleca następującą: „Die pflanzlichen Objekte lässt man kürzere oder längere Zeit in einer dunkelbraunen Lösung von Guajak-Harz in absolutem Alkohol liegen. Dieser Lösung darf kein Aether zugesetzt sein, welcher die Wirkung beeinträchtigen würde. Nachdem die Objekte genügend durchtränkt sind, lässt man den Alkohol abdunsten und bringt sie in eine mehr oder weniger verdünnte Lösung von Wasserstoffsperoxyd. Sofort erscheint eine prächtig blaue Färbung in denjenigen Zellen vom Gewebe, welche Diastase enthalten. Im Uebrigen muss sich die speziellere Behandlungsweise nach dem Material richten“ (str. 2).

W parę lat później Raciborski wprowadza reakcję gwajakową (z dodatkiem wody utlenionej) jako mikrochemiczną reakcję na leptominę (Ein Inhaltkörper des Leptoms. 1898) i wykazuje, że diastazę można tak dalece oczyścić, że nie daje już reakcji gwajakowej. Wobec tych badań Grüss nie porzuca jednak całkiem swego stanowiska, lecz przyjmuje, że jeden i ten sam enzym może wywoływać różne działania, np. zcukrzac skrobię i utleniać gwajak. Te własności hydrolityczne i katalityczne mają być związane z różnymi grupami atomów jej drobiny, i można zniszczyć jedną grupę bez naruszenia drugiej. Spostrzeżenia, jakie podaje o lokalizacji diastazy, są więc równocześnie miarodajne dla rozmieszczenia fermentów utleniających (Ueber

Oxydasen und die Guajakreaktion. 1898). Fermenty utleniające (i diastatyczne) dzieli na:

1.  $\alpha$ -oksydazy, które mogą utleniać różne ciała przy pomocy tlenu atmosferycznego i
2.  $\beta$ -oksydazy, które utleniają tylko przy pomocy tlenu wody utlenionej, jak leptomina (Raciborski) lub peroksydaza (Linoissier).

Wartość tego podziału już z innej strony została dostatecznie ocenioną (Raciborski: Einige Demonstrationsversuche mit Leptomin. 1898), nie większą też wartość posiadają spostrzeżenia lokalizacyjne, a to przede wszystkim dzięki nieodpowiedniej metodzie badania (o czym niżej). Z poszczególnych spostrzeżeń i luźnych dat nie można wysnuć żadnego uogólnienia, jakie organa, tkanki lub komórki zawierają oksydazę i w jakim ona stoi stosunku do anatomicznych elementów komórki. Grüss nie jest botanikiem, dane lokalizacyjne podaje przygodnie, a interesuje się przede wszystkim funkcją oksydaz, którym przypisuje dominującą rolę w życiu komórki roślinnej. Jaka jednak ma być ta rola oksydaz, nie łatwo powiedzieć, gdyż w każdej niemal pracy podaje nową teorię ich działania.

Ciała niebieszczące gwajak są według Grüssa w tkankach roślinnych szeroko rozpowszechnione. W rozwijających się wiosną drzewach obfituje w nie przede wszystkim kora, a w szczególności części sitowe, dalej miękisz drzewny, sok wielkich naczyń najmłodszych pierścieni rocznych i liczne komórki korony rdzeniowej. W liściach występują głównie w komórkach zawierających zieleń, w kielkujących nasionach zbóż w warstwie aleuronowej i pojedynczych komórkach bielma, w drożdżach zaś w granulach protoplazmy i soku komórkowego. W drożdżach wyróżnia Grüss oprócz oksydaz, działających na gwajak, także drugą grupę oksydaz, które działają tylko na aromatyczne aminy t. zw. aminooksydazy (Ueber Oxydaseerscheinungen der Hefe. Wochenschr. f. Brauerei 1901).

Obecność tych aminooksydaz można wykazać obok oksydaz działających na gwajak, także w tkankach roślin wyższych. Dobrym materiałem demonstracyjnym ma być jemiola, skrawki jednak musiały być w następujący sposób traktowane: „Die Schnitte blieben mehrere Stunden in Aceton und dann in einer Mischung von Aether-Aceton liegen, der etwas Glycerin zuge-

setzt war. Die extrahierten Schnitte wurden mit der Reagenzlösung (Tetramethylparaphenylendiaminchlorid- oder Sulfat) auf Fliesspapier befeuchtet, auf welchem sie bei 50-facher Vergrößerung beobachtet wurden. Nachdem ein genügender Farbunterschied eingetreten war, wurden sie für eine stärkere Vergrößerung in Glycerin gelegt. Eine frappierende Erscheinung bot sich: Die mit verdickter Wandung versehenen Sklerenchymzellen waren stets und vorherrschend tief violett gefärbt; auch in den verfolgten Strängen, welche das Grundgewebe durchziehen und sich den Kiefertracheiden anschliessen, machte sich eine schwächere Tingierung geltend, und schliesslich auch in den cambialen Elementen, wo die Färbung wegen der anwesenden Gerbstoffe rein blau auftritt. In den Sklerenchymzellen färbt sich Inhalt und Wandung. 1903). W dalszych pracach, prócz licznych teoryj i przypuszczeń na temat działania oksydaz, podaje Grüss metodę badania, pozwalającą rzekomo odróżnić w tkankach oksydazę od peroksydazy (jak nazywa te fermenty, nie troszcząc się o wprowadzoną przez siebie nazwę  $\alpha$ - i  $\beta$ -oksydazy).

Odczynnikiem takim ma być winian ursolu (Ursoltartrat) z dodatkiem wody utlenionej. O ile wodny roztwór tego związku wniknie do wnętrza komórki zawierającej peroksydazę, następuje charakterystyczna zmiana barwy: od zielonej, przez niebieską w ceglastą. Ta zmiana barw ma być charakterystyczną dla utleniania przez tlen atomistyczny, odszczepiany od  $H_2O_2$  przez peroksydazę; przy utlenianiu bowiem przez drobinowy tlen powietrza roztwór barwi się żółto-brunatno (Abhandlungen über Enzymwirkungen. Zeitschr. f. Pflanzenkrankh. 1907). Do wykrywania oksydaz tj. ciał, które molekularny tlen powietrza przenoszą na chromogeny poleca gwajak, a zwłaszcza chlorowodorek czterometyloparafenylenodwuaminu, jak go krótko nazywa „Aminviolett“, choć w następnej już pracy wprowadza na oznaczenie tego związku inną skróconą nazwę „Violamin“.

W dalszej pracy: Biologie und Kapillaranalyse der Enzymen (Berlin 1912), w której zbiera rezultaty swych prac nad fermentami utleniającymi wogóle, uważa Grüss wyróżnianie dwóch fermentów utleniających (tj.  $\alpha$ - i  $\beta$ -oksydazy, czy też oksydazy i peroksydazy) za stanowisko przewyżczone, jak również teorię Bacha i Chodat'a („Die Oxydase ist gar kein einheitliches Enzym, sondern ein Gemisch von Peroxydase und einem Pero-

xydbildenden Stoff“. Bach i Chodat. Ber. chem. Ges. 1903). Na podstawie doświadczeń kapillarno-analitycznych przyjmuje, że jeden i ten sam enzym działa równocześnie jako oksydaza, peroksydaza i katalaza, a często także jak diastaza. Ciało to nazywa oksydo-peroksydazą lub oksygenperoksydazą, a gdy działa diastatycznie, peroksydiastazą.

I mimo całego postępu nauki o enzymach, Grüss pozostaje jednym z nielicznych już dziś obrońców teorii, że jeden enzym może wywoływać tak różne działania.

Obszerniejsze streszczenie prac Grüssa było konieczne wobec tego, że są one do dziś dnia brane za dobrą monetę. Podane przez niego metody badań mikrochemicznych weszły bezkrytycznie do nowszych podręczników mikrochemji (Molisch, Tunmann), jego dane o lokalizacji oksydaz są w literaturze niemieckiej prawie wyłącznie znane i cytowane. Tymczasem dane te pozbawione są wszelkiej istotnej wartości. Nieliczne spostrzeżenia faktyczne co do lokalizacji oksydaz, gubią się w istnym lesie przypuszczeń, teoryj i nowych pojęć, tworzonych bez uzasadnionej potrzeby i dostatecznej podstawy; o które do tego w pracach następnych często zupełnie się nie troszczy. Odczynniki, proponowane przez Grüssa, tak ursol d, jak „violamin“, zupełnie się nie nadają do badań lokalizacyjnych, gdyż reagują nadzwyczaj szybko, a produkty ich utlenienia dyfundują łatwo w otoczenie. Wskazówki metodyczne co do przygotowywania materiału, nie są oparte na żadnej ogólnej racjonalnej podstawie, metody badania zaś nieraz wprost barbarzyńskie<sup>1)</sup>. Grüss wzbogacił literaturę o oksydazach, ale w myśl zasady „non multum sed multa“.

Pierwsze ścisłe dane o rozpowszechnieniu i rozmieszczeniu oksydaz u roślin zawierają prace Raciborskiego (1898, 1905). W pierwszych pracach (z r. 1898) stwierdził, że u wyższych roślin, po zniszczeniu bezpośrednich oksydaz reagujących z samym

<sup>1)</sup> Np. „Die Objekte gelangen in alkoholische Guajaklösung (10 bis 15 Minuten) und werden nach Abdunsten des Alkohols mit einer mehr oder weniger verdünnten Lösung von  $H_2O_2$  bepinselt. Nun wird von der Oberfläche ein Schnitt angefertigt und nach dem Abtupfen mit Fliesspapier mikroskopisch untersucht“ (1899). Że po takich zabiegach, jak smarowanie pędzeliem, osuszanie bibułą itp. wykryta lokalizacja oksydaz, nie wiele ma wspólnego z ich pierwotnem rozmieszczeniem, nie trzeba dowodzić.



gwajakiem) przez stosowne podgrzanie lub traktowanie absolutnym alkoholem, pozostaje jeszcze szeroko rozpowszechnione ciało, które utlenia gwajak dopiero w obecności  $H_2O_2$ . Ciało to nazwał leptominą, z powodu obfitego i stałego występowania w komórkach leptomu<sup>1)</sup>.

Oprócz w elementach leptomu (rury sitowe i komórki przyrurkowe) leptominę znajdujemy w naczyniach mlecznych, śluzowych i innych komórkach parenchymatycznych, przede wszystkim zaś w komórkach szparkowych, przetchlinkach, komórkach przepuszczających śródskórni korzeni powietrznych storczyków, w tkankach i organach obfitujących w przestwory powietrzne, jak aërenchymie, aëroforach itp. Wszystko to są komórki i tkanki czynne przy pobieraniu tlenu powietrza w interesie oddychania. Ta lokalizacja, jak również fakt, że hemoglobina i hemocyjanina dają analogiczną reakcję gwajakową, naprowadziły Raciborskiego na przypuszczenie, że leptomina gra w życiu roślin podobną rolę, jak hemoglobina w życiu zwierząt, a mianowicie jako obładowany tlenem wehikul podtrzymuje wewnętrzne oddychanie, pomiędzy zawierającymi ją rurami sitowymi i mlecznymi, a otaczającymi tkankami.

Prace te wykonał Raciborski przy pomocy gwajaku ( $+ H_2O_2$ ), lecz posiadają one w stosunku do prac Grüssa pod względem metody badania tę wielką zaletę, że używał stale materiału należycie utrwałonego. Małe kawałki roślin wrzucał do absolutnego alkoholu, przez co leptomina zostawała strącona na miejscu swego występowania. Mimo to i mimo niezwykle bystrą obserwację, wskutek nieodpowiedniego do badań lokalizacyjnych odczynnika, jakim jest gwajak, nie mógł Raciborski stwierdzić subtelniejszego rozmieszczenia leptominy w komórkach i tkankach i do prac tych musiały się wkręcić pewne nieścisłości.

Tak leptomina, jak oksydazy mają według Raciborskiego występować wewnątrz odpowiednich komórek. W pracy: „Einige Demonstrationsversuche mit Leptomin“ (Flora 1898) użył dla badań lokalizacyjnych prócz gwajaku, alkoholowego roztworu  $\alpha$ -naftolu, który do tego celu nadaje się znacznie lepiej

<sup>1)</sup> Należy pamiętać, że powszechnie dziś przyjęta nazwa peroksydazy, jak nazwał Linoissier w Paryżu analogicznie działające ciało, wyosobnione z ropy, wówczas jeszcze nie istniała i jest o kilka miesięcy młodsza.

i zauważył zabarwienie błon komórkowych, nie przypuścił jednak obecności w nich leptominy<sup>1)</sup>.

W r. 1902 opisuje „leptominową“ reakcję powierzchni chłonnej korzenia jawnokwiatowych, zaś w r. 1905 powraca znów w kilku rozprawach do badań nad oksydazami, których niestety nie zakończył. Na polu badań nad oksydazami są to prace klasyczne, pozostały jednak w literaturze naukowej prawie zupełnie nieznanne, a zwłaszcza z wielką dla nauki szkodą nie były znane żadnemu z badaczy, którzy później zajmowali się kwestją lokalizacji oksydaz.

Przy pomocy pomysłowych metod i doskonale dobranych odczynników (przedewszystkiem naftylaminu i benzydyny) demonstruje utleniającą działalność powierzchni chłonnej korzenia roślin wyższych, a przez badania anatomiczno-lokalizacyjne wykazuje, że ciało utleniające (oksydaza) znajduje się na powierzchni włókników i komórek skórki korzenia i może w obwodowych częściach plazmy, ale nie we wnętrzu komórek. Gdy hodował rośliny w słabych, nietrujących roztworach odpowiednich chromogenów, które wnikały do wnętrza korzenia, to utlenienie następowało nie tylko na powierzchni korzenia, ale także na wewnętrznej stronie naczyń i cewek, w starszych zaś naczyniach przedewszystkiem w jamkach. Szczególnie pięknie reaguje zatyczka (torus) jamek lejkowatych iglastych. Zainteresowany tą zewnątrz-komórkową lokalizacją oksydazy korzenia, zwrócił Raciborski uwagę, że również w tkankach obfitujących w przestwory powietrzne występuje obficie oksydaza na powierzchni komórek (t. zw. „Interzellulároxydase“).

Ponieważ w roślinach mogą występować różne oksydazy, więc starał się ową oksydazę przestworów powietrznych otrzymać w stanie możliwie czystym, by zbadać dokładnie jej własności i dopiero na podstawie tych wiadomości wypracować metody, pozwalające na wykrywanie jej lokalizacji. Sposób otrzymywania oksydazy przestworów międzykomórkowych był następujący:

<sup>1)</sup> „Auch soll man vorsichtig sein, und bei der eventuellen Färbung mancher Zellmembrane nicht gleich auf die Anwesenheit des Leptomins oder der Oxydasen in den Membranen schliessen. Manche Zellmembrane imbibieren bekanntlich stark verschiedene Flüssigkeiten und Farbstoffe und die eintretende Färbung kann eben durch Diffusion aus dem Zellsaft stattfinden“ (str. 365).

Przez szparki liści odpowiednich roślin (*Nymphaea* i in.) ssal aspiratorem wodę destylowaną, która przepływając obszerne przestwory powietrzne liścia i ogonka liściowego, zabierała z powierzchni ich oksydazę w stanie tak czystym, w jakim prawdopodobnie dotychczas jej nie otrzymano, a w każdym razie wolną od składników treści komórkowej.

Mając w ręku tak czystą zewnątrz-komórkową oksydazę, zbadał jej własności. Nie dawała ona reakcji na białko, cukry, aldehydy,  $H_2O_2$ , natomiast charakteryzowała się zdolnością utleniania przy pomocy tlenu atmosferycznego licznych ciał aromatycznych jak gwajak, pyrogallol, hydrochinon,  $\alpha$ -naftol,  $\alpha$ -naftylamin itp., należała zatem, podobnie jak oksydaza powierzchni korzenia, do oksydaz typu lakkazy, zwanych obecnie fenolazami. W 76% alkoholu była rozpuszczalna, w 86% już nierozpuszczalna, również w eterze i benzolu. Stężonym roztworem siarczanu amonu można ją było zupełnie wysolić.

Te własności oksydazy wskazały drogę, jakiej się trzymać należy przy badaniach lokalizacyjnych. W celu należytego utrwalenia materiału zatapiał Raciborski małe kawałki roślin pod pompą w siarczanie amonu lub absolutnym alkoholu, a jako odczynników w celu wykrycia strąconej na miejscu oksydazy używał związków, które reagują szybko i dają nierozpuszczalne barwne produkty utlenienia. Gwajak okazał się do subtelnych badań lokalizacyjnych zupełnie nieodpowiednim, z licznych wypróbowanych odczynników najodpowiedniejszym okazał się alkoholowo-wodny roztwór benzydyny z dodatkiem wody utlenionej.

Przy tym sposobie badania było oczywiście niemożliwe rozstrzygnięcie, gdzie mamy do czynienia z bezpośrednią oksydazą, a gdzie z leptominą (peroksydazą).

W powyższej pracy jednak Raciborski nie interesował się tą kwestją, lecz badał tylko własności i rozmieszczenie oksydazy zewnątrzkomórkowej przestworów powietrznych, zaś kwestję oksydaz wewnątrzkomórkowych, jakoteż stosunek ich do leptominy (peroksydazy) zamierzał opracować w następnych rozprawach<sup>1)</sup>.

<sup>1)</sup> Plan całego cyk'u rozpraw nad utleniającymi i redukującymi własnościami komórki roślinnej pozostawił w zapiskach rękopiśmiennych, które miałem sposobność przeglądać w Instytucie botanicznym Uniwersytetu Jagiellońskiego, dzięki uprzejmości Profesora D-ra Wł. Szafera.



Głównym rezultatem badań lokalizacyjnych Raciborskiego jest stwierdzenie, że w komórkach mięksizowych roślin wodnych i innych, które badał, oksydaza nie występuje wewnątrz żywych komórek, ani w plazmie, ani w soku komórkowym, lecz jedynie na powierzchni błon komórkowych i to głównie tych, które graniczą z przestworami powietrznymi.

Z enzymami oksydaza ta nie ma nic wspólnego, gdyż bierze udział w reakcji według praw stechiometrycznych. Kwestję znaczenia tej zewnątrzkomórkowej oksydazy w życiu komórki pozostawia Raciborski zupełnie otwartą.

Że plazmatyczne wnętrze komórek jest pozbawione ciał utleniających, działających podobnie jak  $H_2O_2$ , to było prawdopodobne dla wielu komórek od czasu badań Pfeffera nad utleniającym działaniem  $H_2O_2$  na chromogeny soku komórkowego (Beiträge zur Kenntnis der Oxydationsvorgänge in lebenden Zellen. 1889), Raciborski pierwszy jednak wykazał, że siedliskiem oksydaz w wielu wypadkach, jest błona komórkowa.

Ten kapitalny rezultat badań Raciborskiego pozostał w literaturze naukowej zupełnie zapoznany.

Po Raciborskim żaden z badaczy oksydaz na polu botanicznym nie zajmuje się już szczegółowej ich lokalizacją. Chodak i Bach (1904) polecają przygodnie dla badań lokalizacyjnych wodny roztwór pyrogallolu z dodatkiem cukru gronowego, który ma ułatwiać wnikanie tego chromogenu do wnętrza komórek. W obecności oksydazy tworzą się wewnątrz komórki czerwone kryształy purpurogalliny i to szczególnie naokoło chromatoforów (np. leukoplastów w obwodowych komórkach ziemniaka). Na podstawie takich spostrzeżeń uważają chromatofory za siedzibę oksydaz, które mają występować równolegle z katalazą. W fermenty utleniające ma obfitować przede wszystkim mięksiz assymilujący liści.

Też metody używał do wykrywania lokalizacji oksydaz O. Bege mann w swej obszernej i bogatej w teorie pracy nad oksydazami (1915). Teoretyczna strona tej rozprawy, opracowana wspólnie z Dr. Gertrudą Woker, posiada niewątpliwie tę ważną zaletę, że sprowadza różne reakcje t. zw. fermentów utleniających do jednej zasady, opiera się jednak na licznych dowolnych założeniach, więc charakter jej jest czysto hipotetyczny.

Begemann i Woker przypuszczają, że w żywych komórkach znajduje się ciało o naturze aldehydu (odpowiadające oksygenazie Bacha i Chodat'a), które może przenikać przez błony komórkowe. Obok aldehydu występuje w komórkach nieprzechodzący przez błony nadtlenek. Oba te ciała, reagując wzajemnie, tworzą wtórny nadtlenek, który posiada silne własności utleniające. Jeżeli więc wprowadzimy do komórki np. pyrogallol, to ów wtórny nadtlenek utleni go na purpurogallinę, które to działanie przypisujemy t. zw. „oksydazie“.

Ciało o naturze aldehydu przenika łatwo przez błony już w żywej roślinie, a zwłaszcza przy badaniu mikroskopowym rozłazi się z wnętrza komórek do naczyń, cewek i przestworów międzykomórkowych. Jeżeli teraz dodamy z zewnątrz jakiegoś nadtlenku np.  $H_2O_2$ , to ów aldehyd +  $H_2O_2$  tworzy znów wtórny nadtlenek (sztuczny), który również może utleniać pyrogallol, gwajak, benzydynamę i inne chromogeny (t. zw. działanie „peroksydazy“), a także równocześnie, zależnie od warunków, rozkładać nadmiar  $H_2O_2$ , uwalniając  $O_2$  (t. zw. działanie „katalazy“). Tak utlenianie chromogenu, jak wywiązywanie  $O_2$  z  $H_2O_2$ , może mieć miejsce wszędzie, gdzie rozchodzący się z komórek aldehyd wchodzi w reakcję z sztucznie dodanym nadtlenkiem  $H_2O_2$ . Te dwie reakcje konkurują ze sobą, są to jednak reakcje sztuczne, нефизjologiczne, mające naogół miejsce na zewnątrz komórek, do których  $H_2O_2$  nie wnika. „Peroksydaza“ i „katalaza“ nie są to więc żadne fermenty o jakiejś funkcji fizjologicznej, lecz tylko różne formy reagowania jednej i tej samej substancji. Istotny fizjologiczny ferment, który działa jako „bezpośrednia oksydaza“, znajdujemy tylko wewnątrz komórek, gdzie spotyka się oksygenaza o naturze aldehydu z działającym na nią organicznym nadtlenkiem.

Wobec takiego stanowiska, Begemann nie poszukuje siedliska fermentów jak katalaza i peroksydaza, lecz tylko miejsc, gdzie występują te sztuczne, нефизjologiczne zjawiska. Badaniu temu poświęca cały rozdział (Kap. 3. „Lokalisation der Oxydationsfermente im pflanzlichen Organismus“), który jednak niestety zawiera przedewszystkiem teoretyczne rozważania, a tylko bardzo nieliczne, niezależne od teorii spostrzeżenia.

Używa metody pyrogalloywej Chodat'a, którą uważa za wymienią dla badań lokalizacyjnych (1% wodny roztwór pyrogallolu z dodatkiem 1% cukru gronowego). Wszystkie istotne spostrzeżenia zawiera w następującym ustępie:

„Es wurde ein Stückchen Wurzel eines Pelargoniumkeimlings mit einem Tropfen Pyrogalllösung und einem Tropfen Traubenzuckerlösung versetzt. Nachdem die Lösung etwas eingetrocknet war, bildeten sich prachtvolle, ziegelrote Kristalle von Purpurogallin. An einigen Stellen fanden sich dichtere Kristallkonglomerate. In nächster Nähe der Gefäße waren keine oder nur wenig Kristalle zu beobachten. Zwei kleinere Drüsen schienen innerhalb eines Gefäßes zu sein. Zu dem gleichen Objekte wurde dann Wasserstoffsperoxyd zugesetzt; die Sauerstoffentwicklung erschien besonders dort, wo Kristalle lagen, lebhaft; einmal konnte die Entstehung direkt an einer Purpurogallindrüse beobachtet werden. Bei Schnitten durch den Stiel des Keimlings wurde folgendes beobachtet. Die Kristalle lagen innerhalb der Zelle, meist den Zellwänden an, was sich dadurch erklärt, dass das eindringende Pyrogallol sogleich beim Eintritt in die Zelle oxydiert wird. Dies wäre also die echte mit dem Phaenomen ohne Wasserstoffsperoxydzusatz übereinstimmende direkte Oxydasenwirkung. Daneben finden sich in Gegenwart von Wasserstoffsperoxyd in Interzellularen und zwischen den Zellen. Einige Zellen waren ganz kristallfrei, ihre Wände aber stark braungefärbt“ (str. 179). Skrawek przez liścień, wykazał wiele kryształów przedewszystkiem w miększu gąbczastym.

I to jest cały faktyczny materiał spostrzeżeń, który ma popierać daleko idące wnioski, jak:

„Es wurde als Sitz des physiologischen Ferments hauptsächlich das Mesophyll und sonstiges Parenchymgewebe erkannt. Der Ort der unphysiologischen Katalase ist überall da, wo einerseits  $H_2O_2$ , andererseits Oxygenase hingelangen kann d. h. in den Gefäßen, Tracheiden, auch Interzellularen. Gleich der Katalase hat man überall dort Peroxydasereaktion, wo Wasserstoffsperoxyd hingelangen und mit vorhandenr Oxygenase reagieren kann. Die Epidermis und ihre Organe besitzen keine Oxydationsfermente. Oxydationsferment ist nicht an das Chlorophyll gebunden“ (str. 207).

Teorie Begemanna i panny Woker powinny zostać naprzód lepiej uzasadnione, zanim krytyka naukowa będzie się mogła nimi zająć, i to przez spostrzeżenia i doświadczenia nad samymi oksydazami roślinnymi, a nie tylko, jak to czyni Woker w pracach chemicznych, przez analogie z nieorganicznymi katalizatorami, działającymi jako sztuczne fermenty utleniające. Co się zaś tyczy samych badań lokalizacyjnych, to kilku luźnym spostrzeżeniom Begemanna nad siewkami pelargonji nie możemy przypisywać większego znaczenia, gdyż metodą pyrogalloyową Chodat'a trudno badać subtelniesze umiejscowienie czynników utleniających. Wodny roztwór rozpuszcza oksydazy, a przytem pyrogallol w wodnym roztworze reaguje zbyt powoli, by można być pewnym, że kryształy purpurogalliny powstają w miejscach pierwotnego rozmieszczenia oksydaz.

Ciekawe, że do badania na zawartość oksydaz wyciągów z rozmaitych roślin używa Begemann benzydiny, rozpuszczonej w wodzie destylowanej przy 45° C, nie zastosował jednak tego odczynnika do badań mikroskopowych.

Obszerny użytek z benzydiny, jako mikrochemicznego odczynnika na oksydazy, czynią badacze angielscy (Armstrong, Keeble), jednak metoda jej stosowania nasuwa poważne wątpliwości, pozatem prace te poruszają kwestję lokalizacji oksydaz tylko ubocznie, w związku z teorią Miss Wheldale o powstawaniu barwików u roślin (1910, 1911). Według tej interesującej teorii barwinki roślinne, zwłaszcza antocyjan, powstają przez utlenienie bezbarwnego chromogenu, który znajduje się w roślinach jako glikozyd. Glikozyd ów ulega hydrolizie pod wpływem enzymu typu emulzyny i wtedy dopiero zostaje utleniany przez oksydazy.

Armstrong (1910) wnioskuje, że jeśli hipoteza ta jest prawdziwą, to powinna występować pewna równoległość w lokalizacji antocyjanu i oksydaz, i równoległość taką istotnie znajduje badając rozmieszczenie oksydaz przy pomocy następującej metody.

„In the case of benzidine, a 1 per cent solution is made in 50 per cent. alcohol which is then diluted with so much water as not to cause a precipitate. The object to be examined is taken from the plant and placed immediately in the reagent in a corked specimen tube. The tube is incubated at 37° C., and if no direct oxydase reaction is obtained the material is removed

from the tube, washed lightly with water and treated with 1 to 2 drops of 10 vols. hydrogen peroxide, or the latter reagent may be added directly to the tube containing benzidine" (str. 281).

Ponieważ jednak materiał (głównie płatki korony), trzyma przeważnie od 1—3 godzin w tym ciepłym, alkoholowo-wodnym roztworze benzydyny, więc nie mamy pewności, że oksydaza jest wykrywana tylko tam, gdzie znajduje się w żywej roślinie.

Znajduje i rysuje oksydazy stale wewnątrz komórek, choć na podstawie spostrzeżeń nie wyklucza możliwości, że i błona komórkowa zawiera je pierwotnie, czego oczywiście przy tej metodzie badania nie może rozstrzygnąć.

Oдноśny ustęp przytaczam tutaj, gdyż jest to ciekawy szczegół z historii badań lokalizacyjnych, a znany z historii badań wogóle, że często nawet oczywiste spostrzeżenia zostają zapoznane lub na opak tłumaczone, gdy nie wchodzą w ramy panującej teorii — w danym wypadku, że oksydazy są endofermentami.

„If preparations of sections treated with the benzidine reagent are examined microscopically, the localisation of the brown product of oxydase action may be seen in the cytoplasm of the tissues rich in oxydase. It happens very frequently that the walls of these cells take on also a brown stain. Although this staining of the wall may be due to diffusion of the oxidized benzidine derivative from the cell, yet the possibility is not precluded that in the living plant oxydase may occur in the walls of the cells" (str. 282).

Z innych rezultatów badaczy angielskich warto zaznaczyć, że Miss Wheldale (1911), wbrew teorii Bacha i Chodat'a odnosi bezpośrednią reakcję oksydaz do obecności w wyciągach z roślin dwuhydroksylogowego fenolu pirokatechiny, zaś Keeble i Armstrong (1912) wyróżniają u *Primula sinensis* (a rozszerzają to bez dowodu na inne rośliny) oksydazy skórki i oksydazy wiązki na tej podstawie, że benzydyna +  $H_2O_2$  daje z oboma zabarwienie brunatne, zaś  $\alpha$ -naftol +  $H_2O_2$  reaguje tylko z oksydazą wiązki na kolor fioletowo-błękitny.

Według tych autorów szczególnie ubogie w oksydazy mają być obfitujące w chloroplasty tkanki assimilacyjne, co odnoszą do obecności w nich czynnika hamującego („There is good reason to believe that the chloroplast act as inhibitor of oxydases". str. 287).



Warto przypomnieć, że Begemann uważa właśnie skórkę i jej organa za zupełnie pozbawione oksydaz, zaś Chodat skłonny jest uważać chromatofory za główne siedlisko oksydaz! Spostrzeżenia poprzednich badaczy rozszerza Atkins (1913—1915) dowodząc, że t. zw. oksydaza wiązki (bundle oxidase) występuje tak w wiązce, jak w korze pierwotnej, a rozmieszczenie oksydaz u wielu roślin (np. *Iris germanica*) daje równocześnie obraz rozmieszczenia substancji redukujących, wykazując te ostatnie jako miejs.a, gdzie reakcja oksydaz nie występuje. Usunąwszy te czynniki hamujące (przedewszystkiem tanninę i cukier) można często otrzymać reakcję oksydaz, co świadczy o ich bardzo szerokiem rozpowszechnieniu. Kwestji subtelniejszej lokalizacji oksydaz badacze angielscy nie posuwają jednak naprzód, również jak badacze amerykańscy, z których osobną uwagę poświęcają tej sprawie Clark (1911) i Reed (1915, 1916). Clark stwierdza niezwykle szerokie rozpowszechnienie oksydaz, ale tylko z grubsza w poszczególnych organach roślin kwiatowych, a nie znajduje ich jedynie w tkankach t. zw. kwaśnych.

Reed wykazuje, że nawet w tak kwaśnych organach, jak owoce cytryn, dadzą się wykazać oksydazy przy pomocy innych metod niż zwykły sposób badania na obecność oksydaz wyciśniętych soków lub wodnych wyciągów odpowiednich roślin. Izolował ostrożnie, nie naruszając błony olbrzymie workowate komórki owocni cytryny i zanurzał całe do roztworów gwajakaju,  $\alpha$ -naftolu i innych chromogenów, a wtedy powierzchnia komórek pokrywała się barwnymi produktami utlenienia tych ciał.

Reed wnioskuje stąd: „This indicates the presence of oxidases in the cells of the sacs which contain the juice. It seems probable, that this condition is a general one in acid tissues. The acid and ferment are separated in the tissue probably in a variety of ways, but the grinding destroys the separating surface, bringing acid and ferment in contact and inhibiting the action of the latter“.

Wniosek zupełnie słuszny, tylko Reed nie idzie dosyć daleko w stwierdzeniu, że oksydaza i czynnik hamujący w tkankach kwaśnych są oddzielone od siebie nie wewnątrz komórki, lecz, że oksydazy wewnątrz komórek brak, a występuje tylko na ich powierzchni.

from the tube, washed lightly with water and treated with 1 to 2 drops of 10 vols. hydrogen peroxide, or the latter reagent may be added directly to the tube containing benzidine" (str. 281).

Ponieważ jednak materiał (głównie płatki korony), trzymając przeważnie od 1—3 godzin w tym ciepłym, alkoholowo-wodnym roztworze benzydyny, więc nie mamy pewności, że oksydaza jest wykrywana tylko tam, gdzie znajduje się w żywej roślinie.

Znajduje i rysuje oksydazy stale wewnątrz komórek, choć na podstawie spostrzeżeń nie wyklucza możliwości, że i błona komórkowa zawiera je pierwotnie, czego oczywiście przy tej metodzie badania nie może rozstrzygnąć.

Odnosny ustęp przytaczam tutaj, gdyż jest to ciekawy szczegół z historii badań lokalizacyjnych, a znany z historii badań wogóle, że często nawet oczywiste spostrzeżenia zostają zapomniane lub na opak tłumaczone, gdy nie wchodzą w ramy panującej teorii — w danym wypadku, że oksydazy są endofermentami.

„If preparations of sections treated with the benzidine reagent are examined microscopically, the localisation of the brown product of oxydase action may be seen in the cytoplasm of the tissues rich in oxydase. It happens very frequently that the walls of these cells take on also a brown stain. Although this staining of the wall may be due to diffusion of the oxidized benzidine derivative from the cell, yet the possibility is not precluded that in the living plant oxydase may occur in the walls of the cells" (str. 282).

Z innych rezultatów badaczy angielskich warto zaznaczyć, że Miss Wheldale (1911), wbrew teorii Bacha i Chodat'a odnosi bezpośrednią reakcję oksydaz do obecności w wyciągach z roślin dwuhydroksylogowego fenolu pirokatechiny, zaś Keeble i Armstrong (1912) wyróżniają u *Primula sinensis* (a rozszerzają to bez dowodu na inne rośliny) oksydazy skórki i oksydazy wiązki na tej podstawie, że benzydyna +  $H_2O_2$  daje z oboma zabarwienie brunatne, zaś  $\alpha$ -naftol +  $H_2O_2$  reaguje tylko z oksydazą wiązki na kolor fioletowo-błękitny.

Według tych autorów szczególnie ubogie w oksydazy mają być obfitujące w chloroplasty tkanki asymilacyjne, co odnoszą do obecności w nich czynnika hamującego („There is good reason to believe that the chloroplast act as inhibitor of oxydases". str. 287).

Warto przypomnieć, że Begemann uważa właśnie skórkę i jej organa za zupełnie pozbawione oksydaz, zaś Chodat skłonny jest uważać chromatofory za główne siedlisko oksydaz! Spostrzeżenia poprzednich badaczy rozszerza Atkins (1913—1915) dowodząc, że t. zw. oksydaza wiązki (bundle oxidase) występuje tak w wiązce, jak w korze pierwotnej, a rozmieszczenie oksydaz u wielu roślin (np. *Iris germanica*) daje równocześnie obraz rozmieszczenia substancyj redukujących, wykazując te ostatnie jako miejs. a, gdzie reakcja oksydaz nie występuje. Usunąwszy te czynniki hamujące (przedewszystkiem tanninę i cukier) można często otrzymać reakcję oksydaz, co świadczy o ich bardzo szerokiem rozpowszechnieniu. Kwestji subtelniejszej lokalizacji oksydaz badacze angielscy nie posuwają jednak naprzód, również jak badacze amerykańscy, z których osobną uwagę poświęcają tej sprawie Clark (1911) i Reed (1915, 1916). Clark stwierdza niezwykle szerokie rozpowszechnienie oksydaz, ale tylko z grubsza w poszczególnych organach roślin kwiatowych, a nie znajduje ich jedynie w tkankach t. zw. kwaśnych.

Reed wykazuje, że nawet w tak kwaśnych organach, jak owoce cytryn, dadzą się wykazać oksydazy przy pomocy innych metod niż zwykły sposób badania na obecność oksydaz wyciśniętych soków lub wodnych wyciągów odpowiednich roślin. Izolował ostrożnie, nie naruszając błony olbrzymie workowate komórki owocu cytryny i zanurzał całe do roztworów gwajakaju,  $\alpha$ -naftolu i innych chromogenów, a wtedy powierzchnia komórek pokrywała się barwnymi produktami utlenienia tych ciał.

Reed wnioskuje stąd: „This indicates the presence of oxidases in the cells of the sacs which contain the juice. It seems probable, that this condition is a general one in acid tissues. The acid and ferment are separated in the tissue probably in a variety of ways, but the grinding destroys the separating surface, bringing acid and ferment in contact and inhibiting the action of the latter“.

Wniosek zupełnie słuszny, tylko Reed nie idzie dosyć daleko w stwierdzeniu, że oksydaza i czynnik hamujący w tkankach kwaśnych są oddzielone od siebie nie wewnątrz komórki, lecz, że oksydazy wewnątrz komórek brak, a występuje tylko na ich powierzchni.

W następnej pracy (1916), w której zajmuje się przede wszystkim wykazaniem obecności oksydaz u glonów, u których inni badacze ich nie znajdowali, stwierdza powszechną ich obecność w granulach protoplazmy, a nigdy w soku komórkowym.

Na zakończenie tego przeglądu literatury o lokalizacji oksydaz u wyższych roślin warto wspomnieć, że przygodnie zajmowali się tą kwestją jeszcze Molisch (1913), Haberlandt (1913), i Schmidt (1917), pobudzeni do tego dawniejszymi pracami Raciborskiego nad leptominą, ja zaś (1916) stwierdziłem stałą, niezwykle obfitą obecność oksydaz na powierzchni komórek śródskórni za wyłączeniem paska Casparego.

O ile lokalizacyjna literatura botaniczna w stosunku do ilości innych prac nad oksydazami przedstawia się niezwykle ubogo, to literatura zoologiczna, a w ostatnich czasach także medyczna, kwestji tej poświęca znacznie więcej uwagi. Wszyscy badacze mikrochemji komórek zwierzęcych są zgodni w tem, że oksydazy występują tylko wewnątrzkomórkowo, co do subtelniejszej lokalizacji jednak zdania są podzielone. Przeważająca większość widzi siedlisko sił utleniających wyłącznie w protoplazmie i to przedewszystkiem w zawartych w niej granulach. (Plato 1900, Fischel 1910, Vitangelo Nalli 1910, Schultze 1913, Loele 1913 i inni), jednak nie brak również metodycznie ważnych spostrzeżeń, że granule chłoną chciwie gotowy już barwik, lecz same danego chromogenu nie utleniają, czyli nie są siedliskiem oksydaz, które to siedlisko na razie pozostaje nieznanne (Winkler 1907, Dietrich 1908).

Druga grupa badaczy przypisuje jądro komórkowemu własności utleniające (Lillie 1902, Loeb 1906, Golodetz 1912, Unna 1915). Warto wspomnieć, że Lillie uważa, że oprócz jądra także powierzchnia komórek (np. krwinek żaby) gra w utlenianiu biologicznem pewną rolę. Naogół prace te nie mają większej doniosłości dla mikrochemji botanicznej, ani ze względu na metody, ani na rezultaty. Oryginalne metody Unny dla wykrywania miejsc utleniających i redukujących próbował zastosować do tkanek roślinnych Schneider (1914), jednak z wynikiem całkowicie ujemnym. Obszerniejsze zestawienie odnośnych poszukiwań zawiera wspomniana już praca: Batelli-

Stern, Die Oxydationsfermente (Kap. XVI. Mikrochemische Untersuchungen der Oxydationsfermente in den Zellen). Erg. der Physiol. 1912.

Jak widzimy, dotychczasowe badania nie tylko, że nie wyjaśniły zasadniczej kwestji działania „oksydaz“ w organizmie, tj. czy zasługują one istotnie na miano „fermentów utleniających“, ale także nie dają nam poglądu na przestrzenne rozmieszczenie tych ciał w komórkach i tkankach. Tymczasem w zjawisku katalizy, z jakim mamy do czynienia w żywych komórkach, przyspieszających utlenianie organicznych substancyj, prócz istnienia samych katalizatorów, równie ważną rolę gra t. zw. fizyko-chemiczna kataliza (Warburg 1914), to jest szczególnie rozkład tychże substancyj w komórce. Samo stwierdzenie, że dana substancja jest składnikiem komórki, jest dla poznania jej znaczenia w życiu komórki — jak się A. Kanitz słusznie wyraża — nie wiele więcej warte, niż gdy jakąś wysoko uorganizowaną istotę ze skórą i kośćmi rozdrobnimy i z tej mieszaniny wyizolowaną substancję uznamy za ogólny składnik owego organizmu.

### 3. Metoda badań i odczynniki.

Z przeglądu dotychczasowych badań nad lokalizacją oksydaz widzimy, że racjonalne metody mikrochemiczne podał jedynie Raciborski (1905), a otrzymane rezultaty zawdzięcza przede wszystkim szczęśliwie dobranym odczynnikom. Najchętniej posługiwał się alkoholowo-wodnym roztworem benzydyny (dwuamidodwufenyl  $\text{NH}_2\text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{C}_6\text{H}_4\text{NH}_2$ ) z dodatkiem wody utlenionej. Rozpuszczał drobną ilość benzydyny w alkoholu (97%) i dodawał następnie tyle wody destylowanej, by benzydyna zaczynała się z roztworu wytrącać. Po dodaniu kilku kropli wody utlenionej otrzymywał gotowy do badań odczynnik, bezsprzecznie najlepszy z pośród licznych aromatycznych chromogenów, jakie polecano do wykrywania oksydaz. Tak przyrządzony odczynnik dla grubszych badań zupełnie odpowiedni, posiadał jednak pewne braki, gdy szło o badanie całkiem subtelne. Ponieważ fenolazy są rozpuszczalne w wodzie, zaś powstający przez utlenienie benzydyny błękit benzydynowy jest rozpuszczalny w alkoholu, przeto zawsze należało się liczyć z drobnymi niedogodnościami, jakie z tego wynikają. Gdyby użył wodnego roztworu benzydyny, to pomijając tę okoliczność, że benzydyna w zimnej wodzie jest tak mało rozpuszczalna, że otrzymany roztwór, jako zbyt słaby, reaguje tylko powoli, naraziłby się na niebezpieczeństwo, że z powodu rozpuszczania się oksydaz w wodzie odczynnika, nie możnaby po wystąpieniu reakcji ściśle określić ich pierwotnego rozmieszczenia w tkankach. Używając zaś alkoholowego roztworu benzydyny, wykrywamy wprawdzie oksydazy na miejscu ich występowania, jednak powstające kryształki błękitu benzydynowego rozpuszczają się w alkoholu i barwna reakcja przestaje być ściśle umiejscowioną. Używanie roztworu alkoholowo-wodnego, w którym tak fenolazy, jak krystaliczny błękit benzydynowy są tylko częściowo rozpuszczalne, łączy dobre strony, ale i wady obu roztworów tj. wodnego i alkoholowego. Przy tej metodzie badania spo-

strzeżenia lokalizacyjne będą więc trafne, o ile reakcja występuje momentalnie i o ile umiejscowienie jej stwierdzamy w pierwszych chwilach jej przebiegu.

Aby uwolnić się od tch niedogodności, zdecydowałem się przy badaniu oksydaz śródskórni (1916) używać roztworu benzydyny (+ ślad  $H_2O_2$ ) w absolutnym alkoholu (aby zapobiec rozpuszczaniu się oksydaz), obserwowałem przebieg reakcji pod mikroskopem i dopiero w chwili jej występowania puszczałem na preparat kroplę gliceryny, w której błękit benzydynowy jest, zarówno jak w wodzie, nierozpuszczalny. W ten sposób miałem pewność, że do chwili wystąpienia reakcji oksydaza pozostaje w tkankach *in situ*, zaś po dodaniu gliceryny był czas na dokładne stwierdzenie lokalizacji nierozpuszczającego się błękitu benzydynowego. Wogóle do badań lokalizacyjnych nadają się tylko te chromogeny, których barwne produkty utlenienia są nierozpuszczalne w wodzie (i przez to w soku komórkowym) i które reagują szybko, ale nie są znów tak czułe, by reagowały już z tlenem powietrza. Jest zasługą Raciborskiego, że w benzydynie wprowadził taki odczynnik do mikrochemii botanicznej. Jeżeli późniejsi badacze (Armstrong, Sartory, Bege-mann), nie znając dotyczących prac Raciborskiego, nazywają benzydynam „odczynnikiem Adlera“, to należy stwierdzić, że O. i R. Adlerowie zastosowali benzydynam nieco wcześniej (1904), jednak tylko w znanej klinicznej próbie do wykrywania śladów krwi. Raciborski pierwszy, niezależnie od Adlerów, wprowadził benzydynam jako mikrochemiczny odczynnik na oksydazy.

Raciborski poprzestał na praktycznym stwierdzeniu, że odczynnik ten dla badań lokalizacyjnych nadaje się wyjątkowo dobrze, pozatem jednak reakcja ta ma nad innymi tę wyższość, że tak produkty początkowe, jak końcowe, są to ciała względnie proste, których konstytucję znamy lub możemy poznać. Jest to bardzo ważne dla zrozumienia warunków reakcji i pozwala na wnioski co do natury oksydaz.

Według Willstättera w początkowych niebieskich produktach utlenienia benzydyny przez dowolne czynniki utleniające, mamy do czynienia z ciałami chinoidowymi, które stoją do benzydyny w podobnym stosunku, jak chinhydron do hydrochinonu. Te niebieskie połączenia obejmujemy zbiorową nazwą „błękitu

benzydynamowego". Dalsze utlenianie prowadzi do Łrnatnego dwuchloroimidu. Madelung (1911) badał szczegółowo warunki utlenienia benzydiny przez nieorganiczne katalizatory. I tak związki żelazowe mogą same utleniać benzydynam, zaś związki żelazawe nie mają tych własności, ale aktywują  $H_2O_2$ , jak to już Schoenbeinowi było wiadomem. Utlenianie to przebiega zależnie od środowiska neutralnego czy kwaśnego, bądź jako zwykła reakcja zależna (indukowana), bądź też jako reakcja katalityczna.

Podobnie działają sole miedziowe i miedziawe. Pozatem istnieje cały szereg ciał nieorganicznych, jak sole kobaltowe, kwas chromowy, molybdenowy itd., które aktywują katalitycznie  $H_2O_2$ , tak że ta utlenia benzydynam na błękit benzydynamowy. Wszystkie te ciała występują w kilku stopniach utlenienia i w wyższych już same przez się wywierają działanie utleniające. Sole manganu, tak w sztucznych oksydazach Trillat'a i Dony-Henault'a, jak w zawierającej je lakkazie, działają tylko w słabo alkalicznym roztworze. Alkaliczna reakcja wyklucza jednak tworzenie się błękitu benzydynamowego i możemy z pewnością twierdzić, że ilekroć jakaś oksydaza czy peroksydaza powoduje tworzenie się błękitu benzydynamowego, to nie można tego objaśniać zawartością manganu.

Rozmaite uderzające zjawiska przy tworzeniu się błękitu benzydynamowego, które dotychczas trudno było zrozumieć z powodu nieznamomości mechanizmu utleniania benzydiny i natury błękitu benzydynamowego, zyskują teraz proste wyjaśnienie.

W roztworze benzydiny +  $H_2O_2$  i przy obecności peroksydazy reakcja nie wystąpi, o ile brakuje zupełnie kwasu czy soli. Ślad kwasu (kropla rozcieńczonego kwasu octowego) wystarczy, by wystąpiła reakcja z intensywnością, zależną od ilości peroksydazy<sup>1)</sup>. Większe ilości kwasów przeszkadzają reakcji. Dla powstawania błękitu benzydynamowego i to w postaci nierozpuszczalnych kryształów, wystarczy obecność neutralnych soli kwasów mineralnych np. NaCl.

Te przedewszystkiem nas interesujące własności błękitu benzydynamowego tkwią więc w tem, że jest to sól. Możliwość

<sup>1)</sup> Że ilości wytworzonego błękitu benzydynamowego dokładnie są proporcjonalne do ilości zużytej oksydazy wykazali już wcześniej Raciborski i Niklewski (1905, str. 693).



jej powstawania istnieje tylko w obecności ciała, które może dostarczyć anjonów dla wytworzenia się tej soli tj. w obecności kwasów lub soli. Gdy używamy kwasu, znikają z roztworu przy utlenianiu H-jony, przy użyciu soli rośnie odpowiednio ilość OH-jonów, co znów przeciwdziała powstawaniu błękitu benzydynowego i tylko w miarę, jak działanie OH-jonów bywa paraliżowane, mogą wytwarzać się dalsze ilości błękitu benzydynowego. Ponieważ również wolny kwas w nadmiarze (zwłaszcza mineralny) działa szkodliwie na tworzenie się błękitu benzydynowego, przeto optimum działania otrzymujemy w warunkach, które wykluczają większą koncentrację H-jonów, np. w obecności kwasu octowego i nadmiaru octanu sodowego, przez co ilość wolnych jonów wodorowych zostaje zredukowana do minimum.

Teorią utleniania benzydyny zajmuje się również G. Woker (1916) i podobnie stwierdza, że aktywowania i zahamowania przez kwasy i zasady odnieść należy do wpływu na benzydynę, a nie na oksydazy, jak często przyjmowano. Ogólne poglądy panny G. Woker na fermenty, przypominające koncepcje Grüssa, spotkały się z ostrą krytyką (Kaufmann 1917, Madelung 1917).

Eksperymentalne badania Sartory'ego (1911) nad wpływem różnych nieorganicznych i organicznych związków na utlenianie benzydyny stoją w zupełnej zgodzie z teorią Madelunga. Podobne badania nad innymi indykatorami oksydaz przeprowadzili Senter (1907), Cushny (1908), Kastle (1908, 1910), Wolff i Stoecklin (1911), Ewart (1914), Kionka (1916) i ważnym dla nas rezultatem tych prac jest z jednej strony stwierdzenie, jakie związki działają utleniająco na te indykatory, z drugiej zaś strony poznanie szerokiego zakresu ciał, na które rozciąga się utleniająca działalność oksydaz.

W niniejszej pracy posługiwałem się początkowo roztworem benzydyny w alkoholu absolutnym ( $+ H_2O_2$ ) i choć w większości wypadków otrzymywałem zadawalniające rezultaty, to jednak w wypadkach wątpliwych, które przede wszystkim wymagały się wyjaśnienia, nawet przy pomocy tej metody nie można było uzyskać jasnej odpowiedzi. Długie igły błękitu benzydynowego, powstające po wewnętrznej stronie błon i sterzące głęboko do wnętrza komórek, nie pozwalały na wnioski o subtelnej lokalizacji oksydaz. Ponieważ inne związki benzydynowe

używane w histologii zoologicznej przez Kreibicha (1910) i Fischela (1910) tem mniej nadają się do badań lokalizacyjnych, zacząłem używać roztworu benzydyny (zasady) w innych rozpuszczalnikach jak aceton, chloroform, benzol, ksyloł, eter i to z doskonałym wynikiem. Dla praktyki okazał się najprzyjemniejszy roztwór benzydyny w acetonie z dodatkiem śladu  $H_2O_2$  (Perhydrol Mercka). Przedewszystkiem zyskuje niesłychanie szybkość i czułość reakcji. Reakcja występuje momentalnie i co szczególne, że występuje także w tych miejscach, w których alkoholowym roztworem benzydyny, nawet po aktywowaniu kwasem octowym, nie można wykazać ani śladu oksydaz. Ten wpływ środowiska (rozpuszczalnika) na szybkość reakcyj chemicznych znamy z chemii np. z badań Menszutkina nad szybkością łączenia się w różnych rozpuszczalnikach jodków alkilów z aminami trzeciorzędniemi. Proces ten przebiega w roztworach alkoholu benzylowego prawie tysiąc razy szybciej, aniżeli w odpowiednich roztworach heksanowych. Otóż w benzydynie rozpuszczonej w acetonie mamy jeden z najczulszych odczynników oksydazowych, a powstający produkt utlenienia jest przytem nierozpuszczalny w wodzie, a mało w acetonie i występuje zazwyczaj w postaci tak drobno krystalicznej, że nie nasuwa poważniejszych wątpliwości co do szczegółowej lokalizacji oksydaz. W wypadkach wyjątkowych i krytycznych używałem roztworu benzydyny w eterze, puszczając odczynnik na preparat pipetą i obserwując równocześnie przebieg reakcji pod mikroskopem. W ten sposób otrzymywałem reakcję najdokładniej zlokalizowaną, przy równoczesnej pewności, że oksydaza zostaje wykazywana na jej istotnem miejscu występowania w tkankach. Reakcja występuje bowiem momentalnie (zresztą oksydaza jest w eterze nierozpuszczalną), a nadzwyczaj drobne ziarenka barwika znajdując fizykalne warunki powstawania nawet w najcieńszych błonach komórkowych i dzięki szybkiemu ulatnianiu się eteru, a nierozpuszczalności w treści komórek, pozostają długo na miejscu powstania. W ten sposób otrzymany preparat może być w glicerynie dłużej badany i przechowywany, przyczem niebieska barwa błękitu benzydynowego nie ulega tak łatwo dalszej zmianie na brunatną, jak przy używaniu benzydyny w alkoholu. Przy używaniu eteru jako rozpuszczalnika unikamy również całkiem dodawania wody utlenionej, gdyż w dłużej przechowywanym eterze powstają samo-

czynnie nadtlarki, których obecność najzupełniej zastępuje  $H_2O_2$ <sup>1)</sup>. Dodawanie zaś  $H_2O_2$  posiada te ujemne strony, że przez to odczynnik staje się bogatszym w wodę, co prowadzi za sobą niebezpieczeństwo rozpuszczenia się w nim oksydaz, a obfite wywiązywanie się banieczek tlenu, wskutek rozkładu  $H_2O_2$  przez katalazę, przeszkadza obserwacji mikroskopowej. Aby uniknąć tej niedogodności rozkładu  $H_2O_2$  przez katalazę, przyrządziłem według przepisu Chodat'a (1910) organiczny nadtlarek (Äthylhydroperoxyd  $CH_3 \cdot CH_2 \cdot O \cdot OH$ ), na który katalaza nie działa, a który przy reakcji peroksydaz, ma zastępować zupełnie wodę utlenioną. Przyrządzony przezemnie odczynnik zawierał jednak wiele wody i działał bardzo słabo, tak że musiałem zrezygnować z używania go, a w wypadkach, gdzie obfitość katalazy uniemożliwiała dokładną obserwację, używałem benzydyny w eterze.

Porównawcze badania analogicznych preparatów, traktowanych różnymi odczynnikami doprowadziły mnie do przekonania, że nie ma dostatecznej podstawy do wyróżniania w tkankach roślin wyższych rozmaitych, specyficznie odrębnych oksydaz (fenolaz), jak to czynią niektórzy badacze (Aso, Grüss i inni), gdyż rzekoma gwajakaza, będzie najczęściej równocześnie pyrogallazą, hydrochinazą, benzydynamą, p-fenylendwuaminazą itd. Różnice w obrazach lokalizacyjnych, otrzymanych przy pomocy różnych odczynników, pochodzą przedewszystkiem od rozmaitej łatwości, z jaką pewne oksydazy utleniają różne chromogeny. Więc odczynnik łatwiej utleniający jak dwumetyloparafenylenodwuamin wykrywa momentalnie oksydazy tam, gdzie  $\alpha$ -naftol w tymże czasie nie wykazuje ich istnienia. Wystarczy jednak, by  $\alpha$ -naftol działał dostatecznie długo, albo podnieść temperaturę odczynnika lub też dodać substancji aktywującej jego działanie (Kastle 1910), a otrzymamy również reakcję z  $\alpha$ -naftolem. Pewną rolę odgrywają także występujące w roślinach substancje przyspieszające lub hamujące specyficznie daną reakcję, choć ten czynnik ma niewątpliwie większe znaczenie przy badaniu wyciągów, niż w badaniach lokalizacyjnych. O ile większość badaczy podziela to zapatrywanie, że u roślin nie ma różnych, specyficznie działających fenolaz, to stoi jednak przeważnie na gruncie teorii Bacha i Chodat'a, że oksydazy (fenolazy) są

<sup>1)</sup> Używałem „Aether pro narcosi”. D. H. chem. Fabrik. E. Heuer, Aussig, również jednak innego pochodzenia.

mieszaniną oksygenaz i peroksydaz. Praktycznie wyróżniamy oksydazy i peroksydazy na tej podstawie, że gdy pierwsze są same zdolne utleniać odpowiednie chromogeny, to drugie czynią to tylko za dodaniem nadtlenków.

Otóż nie wchodząc w teoretyczne i doświadczalne uzasadnienie przypuszczenia B. i Ch. musimy stwierdzić, że w badaniach mikrochemicznych nie mamy dotąd możności wykazywania jednych obok drugich. Dotychczasowe spostrzeżenia, rzekomo przemawiające za możliwością ich wyróżniania w tkankach, robione przy pomocy jednego odczynnika, najczęściej gwajaku, (z dodatkiem, lub bez wody utlenionej) mają tylko bardzo ograniczone i względne znaczenie. Przy badaniach lokalizacyjnych ustawicznie bowiem spotykamy się ze zjawiskami, że ta sama tkanka utlenia jedne z odczynników bezpośrednio, inne zaś dopiero po dodaniu  $H_2O_2$ , jednak i te ostatnie mogą być przez tę tkankę utlenione, tylko w dłuższym okresie czasu, lub w wyższej temperaturze, albo w innym rozpuszczalniku. Oczywiście w tych warunkach jest rzeczą zupełnie dowolną twierdzić, że mamy tu do czynienia bądź z oksydazami bezpośrednimi, bądź też peroksydazami. Zupełnie te same trudności zachodzą przy badaniach wyciśniętych lub ekstrahowanych soków z roślin, na co z naciskiem wskazywał Sartory. Nawet sama woda destylowana w temperaturze wrzenia ma utleniać gwajak. Praktycznie powiększa trudność odróżniania oksydaz bezpośrednich od peroksydaz okoliczność, że w starszych odczynnikach samorzutnie tworzą się nadtlenki (Chodat) i że także alkohol, który czas dłuższy stoi na świetle w pracowni ma zawierać wodę utlenioną (Hunger).

Benzydyna w alkoholu, a także w acetonie, jest odczynnikiem, który bez dodatku wody utlenionej utleniany jest przez oksydazy bezpośrednie tylko bardzo powoli. Przy badaniach lokalizacyjnych używałem więc roztworu benzydyny z dodatkiem  $H_2O_2$ , wobec czego oczywiście nie można było wyróżniać, gdzie mamy do czynienia z oksydazami bezpośrednimi, a gdzie z peroksydazami. Ścisłe więc biorąc, wyniki otrzymane odnoszą się tylko do rozmieszczenia peroksydaz, zaś bezpośrednio oksydazy (oksygenazy Bacha i Chodat'a) mogą być znacznie mniej rozpowszechnione; z drugiej jednak strony nawet tam, gdzie badacze wyciągów znajdują tylko

peroksydazy (chrzan, cebula, pomidory), udawało mi się w tkance świeżym roztworem gwajaku wykazywać obecność oksydaz bezpośrednich.

Być może, że kiedyś będziemy w stanie wykrywać oba te ciała w tkankach obok siebie, jednak badania lokalizacyjne nasuwają ustawicznie wątpliwości, czy istotnie należy wyróżniać oksydazy i peroksydazy, czy nie mają słuszności coraz liczniejsi dziś badacze, którzy przyjmują bliższy związek między obu temi działaniami, niż to chce teoria Bacha i Chodat'a (Vines 1903, Madelung 1911, Ewart 1914 i inni).

Do badań lokalizacyjnych używałem materiału bądź świeżego, bądź utrwalonego w alkoholu absolutnym. Drobne kawałki odpowiedniej tkanki wrzucałem do większej ilości absolutnego alkoholu, ewentualnie zatapiałem pod pompą, by przyspieszyć wnikanie alkoholu i przeszkodzić rozpuszczaniu się fenolaz w mieszaninie alkoholu i soku komórkowego. Ponieważ dłuższe leżenie w alkoholu niszczy oksydazy, tj. alkohol rozpuszcza prawdopodobnie substancje, które przeszkadzają następnie reakcji, przeto w wątpliwych wypadkach badałem zazwyczaj tak materiał utrwalony w alkoholu, jako też świeży.

---

#### 4. Lokalizacja oksydaz w tkankach roślin wyższych.

Badalem przede wszystkim organa wegetatywne paprotników i roślin kwiatowych. Badania przeprowadziłem na przeszło 350 gatunkach, (a kilku tysiącach skrawków), biorąc bez wyboru tak rośliny krajowe, jak egzotyczne, szklarniowe. Z powodu zupełnej jednolitości otrzymanych rezultatów i ogólności wniosków do jakich doszedłem, nie wyszczególniam tu całego materiału badań, zwłaszcza, że otrzymane wyniki można niewątpliwie zastosować do ogółu roślin wyższych.

Dotychczasowi badacze niejednokrotnie wskazywali na szerokie rozpowszechnienie fenolaz u wyższych roślin, badania lokalizacyjne doprowadziły mnie jednak do wniosku, że nie brak ich żadnej żywej, fizjologicznie czynnej komórce, przynajmniej w pewnej fazie jej rozwoju, a rzekome wyjątki dają się w naturalny sposób wyjaśnić obecnością czynników hamujących.

Drugim ważnym wynikiem moich badań lokalizacyjnych jest stwierdzenie, że poza rzadkimi wypadkami komórek i przewodów wydzielinowych, fenolazy nie występują nigdy wewnątrz w treści komórek, lecz tylko w błonie komórkowej.

Porównawcze badanie tych samych tkanek, naprzód przy pomocy benzydyny w alkoholu, następnie benzydyny w acetonie, przekonuje naocznie, jak zupełnie bez wartości są spostrzeżenia różnych autorów nad rozmieszczeniem oksydaz, robione przy pomocy jednego tylko odczynnika. Podczas gdy w pierwszym wypadku reagują tylko poszczególne niezbyt liczne komórki i tkanki, w drugim reaguje zazwyczaj cały przekrój, z wyjątkiem nielicznych komórek szczególnie obfitych w substancje hamujące (np. garbniki). Często nawet błony i tych komórek dają reakcję za dodaniem większej ilości  $H_2O_2$ . Benzydyna w roztworze

alkoholowym czy alkoholowo-wodnym jest niewątpliwie dobrym i wystarczającym odczynnikiem dla wykazywania oksydaz w tkankach szczególnie w nie bogatych, ale też z niewystąpienia reakcji nie można bynajmniej wnosić o braku oksydaz. Wystarczy dodać ślad kwasu octowego lub użyć benzydyny w acetonie, albo też zastosować próbę indofenolową, aby stwierdzić obecność oksydaz nawet w takich tkankach, w których innymi odczynnikami wykazać ich nie można. Próba indofenolowa, choć do badań lokalizacyjnych nieodpowiednia, gdyż powstający indofenol jest rozpuszczalny w wodzie, jest jednak reakcją niesłychanie czułą, zwłaszcza gdy używa się prócz odpowiedniego fenolu łatwo utlenialnego dwuaminu np. dwumetyloparafenylenodwuaminu<sup>1)</sup>.

Używanie porównawcze kilku różnych odczynników jest też z tego względu wskazane, że znamy wypadki, w których obecność pewnych substancji hamujących przeszkadza tylko utlenieniu danego chromogenu, a jest zupełnie bez wpływu na utlenianie innego.

Według danych literatury, wykrywaniu oksydaz w tkankach mają przedewszystkiem przeszkadzać garbniki (Grüss, Raciborski), cukry redukujące (Hunger, Atkins), kwasy organiczne (Clark, Reed), antienzymy (Grüss, Lubimenko), nadmiar katalazy (Bege-mann, Woker) i inne nieznanne bliżej ciała hamujące t. zw. paralizatory. Z ciał przeszkadzających reakcji oksydazowej garbniki niewątpliwie najwięcej są rozpowszechnione, gdyż w większości wypadków dają się wykazać w wielkiej obfitości w komórkach, których błony nie dają reakcji oksydazowej. Hunger twierdzi, że wykrywał oksydazy nawet w komórkach korka, po wyciągnięciu garbników 80<sup>0</sup>/<sub>0</sub> alkoholem. Doświadczenie to nie jest przekonywujące, gdyż alkohol 80<sup>0</sup>/<sub>0</sub>, przy mieszaniu się z sokiem komórkowym, rozadnia się dalej i niewątpliwie rozpuszcza oksydazy, które wtórnie mogą się osadzić w tkance korkowej.

<sup>1)</sup> Należy jednak pamiętać, że indofenol jest barwikiem tłuszczowym, który liczne ziarenka protoplazmy chłoną nadzwyczaj chciwie. A. Meyer poleca wprost próbę indofenolową jako odczynnik na tłuszcze u bakterij („Naphtolblau als Reagens auf Bakterienfett“. Bakteriol. Centralbl. 1903), nazywając niewłaściwie powstający barwik „Naphtolblau“. Należy przypuszczać, że prawdopodobnie i w tym wypadku u bakterij utlenienie, prowadzące do powstania indofenolu ma miejsce peryferycznie, a dopiero gotowy barwik rozpuszcza się w ziarenkach tłuszczu, nadając im barwę błękitną.

Próby, które przedsiębrałem, aby związać garbniki przy pomocy roztworów białka lub pewnych alkaloidów (morfina, brucyna, kokaina) i w ten sposób unieszkodliwić je, nie niszcząc oksydaz, nie dały dodatnich rezultatów, choć w kilku wypadkach, jak np. w poduszeczce u nasady ogonka liściowego *Mimosa pudica* można w ten sposób otrzymać reakcję oksydazową także na powierzchni wielu garbnikowych komórek, które bez takiego zabiegu reakcji nie dają. Zupełnie wykluczają reakcję oksydazową garbniki, zawarte nie jak zwykle w soku komórkowym, lecz w błonie. „Nieznaczące“ rozpowszechnienie oksydaz w tkankach paproci możemy odnieść niewątpliwie do hamującego działania flobafenów (produktów utlenienia garbników), którym błony paproci zawdzięczają brunatne zabarwienie. W liściach mchów Czapek (Flora 1899) i Schoenau (Flora 1913) wykazali bezpośrednio obecność garbników w błonie komórkowej.

Według Hungera (1901) wykrywaniu oksydaz w tkankach i sokach roślinnych przeszkadza obecność większej ilości cukrów redukujących, zwłaszcza glikozy.

Aso (1902) i Raciborski (1905) wykazali jednak, że to nie zawsze ma miejsce i że w doświadczeniu Hungera działały hamująco zapewne jakieś inne ciała towarzyszące glikozie.

Przy badaniach lokalizacyjnych zauważyłem jednak niejednokrotnie, że tkanki obfitujące w glikozę, np. miękisz asymilujący liści, zazwyczaj wykazują słabą reakcję oksydazową. Armstrong (1910) uważa tu chloroplasty za „inhibitora“ reakcji oksydazowej, Atkins (1916) otrzymał zaś z wyciągami liści stale dodatnie reakcje, ale dopiero po usunięciu substancji redukujących. Reed (1915) wykazał obecność oksydaz w tkankach kwaśnych, zaś Begemann i Woker (1915) przyjmują, że reakcja peroksydazowa nie występuje tam, gdzie konkurująca z nią reakcja katalazowa zyskuje przewagę.

To byłyby wszystkie ważniejsze czynniki, które według dotychczasowych badań przeszkadzają wykrywaniu oksydaz w tkankach roślinnych. Czynniki te występować muszą nadto w znacznym natężeniu, by reakcję oksydazową zupełnie unie możliwić.

Każdy skrawek jakiegokolwiek wyższej rośliny, traktowany odpowiednim odczynnikiem, wykazuje reakcję oksydazową błon olbrzymiej większości komórek i zgodnie z doświadczeniem



innych badaczy możemy twierdzić z wielkim prawdopodobieństwem, że te nieliczne komórki i tkanki, w których nie udaje się wykazać obecności oksydazy, przecież nie są jej pozbawione, a tylko wykrycie jej następuje szczególne trudności. Co do ilości oksydaz, to sądząc kolorymetrycznie z intensywności reakcji benzydynowej, różne tkanki zawierają je w stopniu bardzo rozmaitym. Obfitują w nie przedewszystkiem tkanki twórcze rosnących korzeni czy pędów, pozatem miazga, rury sitowe, naczynia mleczone, śródskórnia i tkanki mięksiszowe, bogate w przestwory powietrzne. Nie wykazują reakcji komórki o silnie zdrewniałych ścianach, jak np. starsze elementy drewna (za wyjątkiem zatyczek w jamkach), zaś słabą tylko skórka roślin lądowych i obfitujący w chloroplasty mięksisz asymilacyjny<sup>1)</sup>.

Wobec tak szerokiego rozpowszechnienia oksydaz głównym pytaniem, które starałem się rozstrzygnąć, była sprawa ich subtelnej lokalizacji w komórkach i tkankach.

We wszystkich badanych wypadkach znajdowałem oksydazy stale w błonach komórkowych tkanek mięksiszowych i to w błonach młodych, chemicznie i strukturalnie niezróżnicowanych w całej ich grubości, w tkankach starszych zaś w blaszce środkowej czyli substancji międzykomórkowej.

Po badaniach Raciborskiego nad zewnątrzkomórkowym umiejscowieniem oksydazy przestworów powietrznych rezultat taki był prawdopodobny dla wielu grup komórek, szczególną przeto uwagę zwróciłem na te tkanki i komórki, których Raciborski szczegółowiej nie badał, a zwłaszcza na te, które miały zawierać oksydazy wewnątrzkomórkowe. Przedewszystkiem zająłem się rurami sitowemi, które według Raciborskiego zawierają wewnątrz leptominę (peroksydazę), podobnie jak komórki przyrurkowe. Chciałem stwierdzić, czy oksydaza zawarta jest w plazmie czy soku komórkowym rur sitowych. Rezultat badań był o tyle nieoczekiwany, że odmiennie od Raciborskiego stwierdziłem, że u wszystkich paprotników brak oksydazy w treści rur sitowych, natomiast często daje się wykazać w błonie komórkowej. Badałem szereg gatunków paproci (z rodzajów *Adiantum*, *Pteris*, *Polypodium*, *Staenochlena*,

<sup>1)</sup> Wogóle organa nadziemne, zwłaszcza silnie naświetlone, zawierają oksydaz mniej, niż części roślin ukryte w ziemi, a w szczególności chłonec wodę.

Nephrolepis, Osmunda) i nigdy nie zauważyłem w treści rur sitowych ani śladu reakcji benzydynowej. Kwestji tej nie można jednak rozstrzygnąć na skrawkach poprzecznych, gdyż błona sitek reaguje niezwykle intensywnie, przez co powstaje obraz, jak gdyby reakcja miała miejsce wewnątrz rur sitowych. Na skrawkach podłużnych można się z łatwością przekonać (doskonałym materiałem demonstracyjnym są gatunki paproci *Staenochlena* np. *St. scandens*, *cretica*), że miejscem reakcji są tylko same sitka. W błonie sitek pozostają jednak niezabarwione drobne punkty, które zdają się odpowiadać połączeniom plazmatycznym sąsiednich rur sitowych.

Tak więc u paproci (również u pospolitych krajowych gatunków skrzypów i widłaków) nie znalazłem nigdy fenolazy, tj. tak oksydazy bezpośredniej, jak peroksydazy (leptominy) wewnątrz rur sitowych. Odmiennie twierdzenie Raciborskiego łatwo zrozumiemy, gdy sobie uprzytomnimy, że dotyczące badania robił przy pomocy gwajaku, który był powodem już tylu błędów, skoro zaś do badań nad zewnątrzkomórkową oksydazą przestworów powietrznych zastosował benzydynę, wtedy na rury sitowe nie zwracał już większej uwagi.

Znacznie trudniej stwierdzić lokalizację oksydaz w leptomie jawnokwiatowych, a to z powodu niezwykle niestałości treści rur sitowych, wobec której nawet utrwalanie materiału nie wiele jest pomocne. Plazmatyczna treść komórek przyrurkowych jest zawsze pierwotnie pozbawiona oksydaz, posiada jednak na równi z treścią rur sitowych, a także wielu innych komórek mięksizowych tę właściwość, że chłonie niezwykle chciwie wytworzony w błonie barwik, co oczywiście łatwo powoduje błędne mniemanie o siedlisku oksydazy. O ile brak oksydazy w treści komórek przyrurkowych nie przedstawia żadnych wątpliwości, to treść samych rur sitowych pozostaje dla nas do dziś dnia pod wielu względami zagadką. Według Raciborskiego zawierać ma tak leptominę, jak oksydazę bezpośrednią. Odpowiednim materiałem badań mają być wyrosnięte łodygi jednoliściennych. Istotnie, u jednoliściennych można przez odpowiednio długie trzymanie w alkoholu zniszczyć wszystkie inne oksydazy, za wyjątkiem oksydaz leptomu, jednak stwierdzenie ich umiejscowienia w poszczególnych elementach leptomu napotyka na niezwykle trudności. Komórki są bardzo drobne, błony

komórkowe niezwykle cienkie, kryształki błękitu benzydynowego powstają dzięki temu zazwyczaj po ich wewnętrznej stronie i sterczą ku środkowi komórek. Dopiero porównawcze badania prowadzą do wniosku, że tu powodem takiego obrazu jest nie wewnątrzkomórkowa lokalizacja oksydaz, lecz trudności metodyczno-techniczne. Z podobnym zjawiskiem spotykamy się bowiem w wielu cienkościennych komórkach, co do których nie ulega najmniejszej wątpliwości, że oksydaza siedzi w błonach, a tylko brak odpowiednich warunków fizycznych dla wytworzenia się błękitu benzydynowego w samej błonie. Tak np. na ściankach promieniowych komórek śródkórni, w bezpośrednim sąsiedztwie paska Casparego, błękit benzydynowy wytwarza się zawsze nie tylko w samej błonie, ale również po wewnętrznej jej stronie, sama treść komórek jest jednak zawsze wolna od oksydaz. jak to się łatwo można w tym wypadku przekonać na komórkach splazmolizowanych<sup>1)</sup>.

Ponieważ badanie jednoliściennych nie dało pożądaných wyników, zwróciłem się do dwuliściennych, wybierając przede wszystkim gatunki z wielkimi i obszernymi rurami sitowymi. U dyni (*Cucurbita Pepo*) na świeżym materiale, reagują silnie ściany rur sitowych, a szczególnie intensywnie same sitka za wyjątkiem perforacyj. Ewentualne zasklepki z kallózy nie reagują nigdy. Same błony rur sitowych z nieznaných powodów ulegają zazwyczaj wtórnemu odbarwieniu. Wydaje się, jak gdyby w błonach czy treści rur sitowych były zawarte ciała, które samej reakcji nie przeszkadzają, jednak wytworzony barwik po pewnym czasie odbarwiają. Wobec znanych własności redukujących soku komórkowego rur sitowych, nie ma w tem nic nieprawdopodobnego, zwłaszcza, że to samo zjawisko wtórnego odbarwiania reagujących błon wykazują niektóre komórki garbnikowe.

Na utrwalonym w alkoholu materiale (*Bryonia dioica*, *Vitis vinifera*) udaje się nawet zauważyć, że oksydazy występują prze-

<sup>1)</sup> Wogóle plazmoliza niejednokrotnie pozwala w wątpliwych wypadkach wykazać obecność oksydazy w błonie, a brak jej w protoplasmie. I tak w komórkach skórki, zwłaszcza pokrytej grubą kutikulą, oksydaza często zdaje się występować nie tylko po wewnętrznej stronie błon komórkowych, lecz także w obwodowych częściach cytoplazmy. Dzięki plazmolizie możemy się przekonać, że siedliskiem oksydazy jest wyłącznie błona komórkowa.

dewszystkiem w blaszce środkowej i narożnikach wszystkich komórek leptomu. W samych sitkach winorośli reaguje silnie pektynowa błonka środkowa, t. zw. „median node“ Hill'a, nie reaguje kalloza zasklepek. U innych roślin o drobnych rurach sitowych nie można wykazać tego przy pomocy dotychczasowych metod. W starych niefunkcyjnych rurach sitowych często zdarza się, że reaguje pierwotnie również z dezorganizowana treść komórkowa. Mimo tych trudności metodycznych, na podstawie rezultatów pewnych dla kilku, szczególnie dla badań korzystnych roślin, uważam za usprawiedliwione twierdzenie, że plazmatyczne wnętrze czynnych elementów leptomu jest stale pozbawione oksydaz. Głęboki pomysł Raciborskiego o funkcji leptominy w rurach sitowych musi więc ulec modyfikacji w tym kierunku, że pierwotnym siedliskiem oksydaz także w tej tkance jest błona komórkowa.

Stale i obficie występują dalej oksydazy w przewodach żywicznych i to również nie — jak sądził Raciborski — we wnętrzu komórek, lecz tylko w t. zw. warstwie żywicorodnej błony (resinogene Schicht Tschirch'a) i ewentualnie w samej wydzielinie.

Doniosłe badania Tschircha nad miejscem powstawania żywic wykazują interesującą analogję do badań lokalizacyjnych nad oksydazami. Mimo licznych twierdzeń przeciwnych, Tschirch przyzwyciężywszy trudności metodyczne wykazał, że w plazmatycznym wnętrzu komórek nigdy nie można znaleźć gotowych żywic i balsamów, lecz, że substancje te, podobnie jak olejki eteryczne, powstają w warstwie żywicorodnej błony komórkowej. Ta warstwa żywicorodna, to nic innego, jak substancja międzykomórkowa, do której należą również wiele badane wyściółki przestworów powietrznych. Otóż w warstwie żywicorodnej znajdowałem stale oksydazy i występowanie ich było ograniczone tylko do tej warstwy błony komórkowej, pozatem występowały jednak również w wydzielonej do światła przewodów żywicy. Szczegółowo zbadałem te stosunki u baldaszkowych *Archangelica officinalis* (korzeń) i *Pimpinella Saxifraga* (korzeń), a także u iglastych *Abies pectinata*, *Pinus silvestris*, *Larix europaea* (szpilki i kora).

Tschirch stwierdził również w swych rozległych badaniach nad żywicami, że liczne żywice zawierają oksydazy. Wyróżnia

nawet na tej zasadzie osobną grupę żywic jako „enzymożywice“ („Enzymoresine d. i. Harze, deren Harzkörper von einer Gummase (Lakkase) begleitet wird“). Tym enzywożywicom towarzyszą stale ciała gumowate, powstające również w śluzowate zazwyczaj warstwie żywicorodnej błony komórkowej i oksydazy są właśnie z temi gumami nierozzerwalnie złączone. Przynajmniej wszelkie usiłowania Tschircha, aby oddzielić oksydazę od gumy okazały się bezskuteczne, również nie udało się zniszczyć jednego z tych ciał, by drugie otrzymać w czystej postaci, tak, że Tschirch przypuszcza, iż mamy tu do czynienia z chemicznym połączeniem gumy z oksydazą. Poglądy Tschircha na występowanie i powstawanie żywic mają w całej pełni zastosowanie do fenolaz. Nigdy nie spotykamy ich w plazmie, lecz zawsze w błonie komórkowej, skąd analogicznie można wnosić, że miejscem ich powstawania jest błona komórkowa.

Jeżeli przejdziemy do rur mlecznych, to w soku mlecznym, zgodnie z twierdzeniem Raciborskiego, spotykamy istotnie wewnątrzkomórkową „oksydazę“. Jednak i tutaj oksydaza występuje nie w plazmatycznej wyściółce rur mlecznych, lecz w samym soku mlecznym, który uważa się zazwyczaj za homologiczny z sokiem komórkowym. Pamiętać jednak należy, że sok mleczny zawiera cały szereg ciał, mogących wywoływać reakcję oksydaz. I tak według O. Dony'ego (1908), utlenienia, jakie wywiera sok mleczny, należy odnieść nie do obecności w nim oksydaz, lecz soli manganu i metali alkalicznych. Sok mleczny jest bardzo skomplikowaną mieszaniną najrozmaitszych ciał organicznych i nieorganicznych, o różnym jakościowym i ilościowym składzie u różnych roślin i tylko szczegółowe badania mogą rozstrzygnąć, do jakich ciał są przywiązane jego utleniające własności. U Aroideae i Musaceae sok mleczny zupełnie nie daje reakcji oksydazowej, co niewątpliwie możemy odnieść do bardzo obfitej zawartości garbników, tak, że u tych rodzin słusznie możemy mówić o przewodach garbnikowych. Rury z sokiem mlecznym należą pozatem do kategorii zbiorników wydzielinowych. Skład chemiczny ich treści, ich stosunki anatomiczne i wreszcie eksperyment fizjologiczny (H. Kniep: Über die Bedeutung des Milchsafte. Flora 1905) ostatecznie

to stwierdziły i nie można ich żadną miarą homologizować z rurami sitowemi. Nie mogłem też potwierdzić spostrzeżenia Raciborskiego, że systemy te zastępują się niejako ze względu na zawartość „leptominy“, pomijając już wyżej wspomnianą różnicę co do jej lokalizacji w obu tkankach. Badałem *Euphorbia Cyparissias*, *E. Lathyris*, *Nerium Oleander*, *Vinca major*, *Campanula glomerata*, *Lactuca scariola*, *Cichorium Intybus*, *Taraxacum officinale*, *Papaver Rhoeas*, *Chelidonium majus*, tak łądogę jak korzeń, lecz nigdy nie stwierdziłem wzajemnego zastępowania się oksydaz w tych tkankach, co by pozwalało wnosić o ich fizjologicznej funkcji zastępczej<sup>1)</sup> Utleniające działanie soku mlecznego i pochodzenie ciał utleniających w nim zawartych, pozostaje na razie kwestją otwartą, podobnie jak pochodzenie występujących w nim żywic, skoro w ścianach rur mlecznych nie widzimy warstwy żywicorodnej, w której jedynie według Tschircha ma miejsce wytwarzanie żywic, a nawet wewnątrzkomórkowo zlokalizowanych olejków eterycznych. Oksydaza soku mlecznego, a oksydaza błon komórkowych, to najprawdopodobniej rzeczy różne, jednak potrzeba dopiero dalszych badań, aby uzasadnić ich oddzielenie i nie mieszanie razem. Tak więc występowanie oksydaz w soku mlecznym nie czyni właściwie wyłomu w tej ogólnej zasadzie, że żywy protoplast komórki nigdy oksydaz nie zawiera, a siedliskiem ich jest przedewszystkiem błona komórkowa i jej produkty. Występowanie oksydaz w soku mlecznym owszem wspiera przypuszczenie o wydzielinowym, czy wydalinowym charakterze oksydaz. Lokalizacja oksydaz w błonach komórkowych, w wydzielinach powierzchni chłonnej korzeni i w soku mlecznym zdaje się wskazywać, że nie mamy w nich do czynienia z fizjologicznie ważnym fermentem, lecz raczej z wydzieliną, nie pozbawioną może znaczenia ekologicznego, podobnie jak oksydazy w mleku różnych zwierząt.

Niezależnie jednak od przypuszczeń o funkcji fenolaz w organizmie roślinnym, ogólnym rezultatem powyższych poszu-

<sup>1)</sup> Natomiast można stwierdzić, że rury mleczne i typowe przewody żywiczne wzajemnie się wykluczają i zastępują. W rodzinach *Araceae* i *Compositae* jedne rodzaje posiadają rury mleczne, inne zaś tylko przewody żywiczne. Dotychczas znamy tylko jeden wyjątek.

kiwań jest stwierdzenie, że ciała te nie są bynajmniej endofermentami (Vernon 1910), za jakie je powszechnie uważano i że występowanie ich nie jest związane z żywą plazmą, natomiast, ze względu na stałą lokalizację w błonie komórkowej i jej produktach, musimy uważać je za wydzielinę, przynajmniej o tyle, o ile i błona komórkowa jest wydzieliną protoplazmy.

## 5. Równoległość w występowaniu oksydaz i substancyj pektynowych.

Raciborski badając oksydazę zewnątrzkomórkową zwrócił uwagę na interesujący szczegół, że zatyczki (torus) jamek lej-kowatych iglastych, które jak wiadomo chłoną intensywnie barwki pektynowe, dają równocześnie silną reakcję oksydazową (1905). Badając oksydazy śródskórni (1916) zbadałem porównawczo kilka roślin ze względu na rozmieszczenie oksydaz i substancyj pektynowych, obecnie zaś przy badaniu lokalizacji oksydaz zawsze zwracałem uwagę na interesujący parallelizm w występowaniu tych ciał w tkankach roślin wyższych.

Mikrochemja pektynów pozostawia jeszcze wiele do życzenia i ogranicza się przedewszystkiem do znajomości ich reakcyj barwnych<sup>1)</sup>, właściwości optycznych i zachowania się względem kwasów i zasad. W badaniu rozpowszechnienia pektynów szedłem przedewszystkiem za znakomitemi pracami Mangin'a (1892) i Devaux (1901). Wiadomo z nich, że pektyny są podstawową substancją błon komórkowych na równi z cellulozą. Młode błony komórkowe składają się z mieszaniny cellulozy z peктоzą, w starszych peктоza zamienia się na kwas pektynowy i zostaje zwolna umiejscowiona na obwodzie komórki w t. zw. blaszce środkowej jako pektynian wapna, lub tworzy jako śluz pektynowy powłoki przestworów międzykomórkowych.

Z barwików pektynowych miałem do dyspozycji i wypróbowałem następujące: brunat Bismarka, fiolet Hoffmanna i metylowy, błękit metylenowy i nilowy, zieleń jodową, malachitową i świetlną, czerwień Kongo, Magdala i neutralną, chrysojdynę, Dahlię, koralinę, fuksynę, safraninę i tioninę.

<sup>1)</sup> Nie są to bynajmniej właściwe „reakcje mikrochemiczne“, lecz zjawiska czysto fizykalne, polegające na różnej absorbcji poszczególnych barwików.



Istotnie wartościowemi znalazłem tylko czerwień rutenową, błękit naftylenowy R., fiolet neutralny i hematoksylinę Delafiélda i temi barwikami stale się posługiwałem.

Głównem miejscem występowania pektynów w wyrośniętych tkankach roślinnych są według Mangin'a blaszki środkowe. Mikrochemiczne badanie blaszki środkowej i jej przemian przedstawia jednak wiele ciemnych punktów. Twierdzono kolejno, że zawiera ona przedewszystkiem ciała białkowate (Wiesner), tyrozynę (Correns), hemicellulozę (Schellenberg), wreszcie aminy aromatyczne (Raciborski). W ciągu moich badań stale znajdowałem w niej oksydazy, przynajmniej w pewnej fazie jej rozwoju, wiadomo bowiem, że blaszki środkowe nawet w wyrośniętych tkankach ulegają daleko idącym przemianom (Allen). Terminu „blaszka środkowa“, inaczej „substancja międzykomórkowa“, używam stale w rozumieniu Dippla (Das Mikroskop 1893. II. Bd. „mittlere Platte der Mittellamelle“). Wielu autorów rozumie przez blaszkę środkową („Mittellamelle“ Hofmeister, Sachs Sanio), nie tylko pierwotną błonkę kambjalną, dzielącą dwie komórki, lecz także nakładającą się od wewnątrz cienką warstwęką wtórną, ponieważ obie wykazują silniejsze i odmienne załamywanie światła, niż reszta grubiejącej błony. Dipplowska blaszka środkowa jest zawsze optycznie równoosiowa, rozpuszczalna w mieszaninie Schultzego, a nierozpuszczalna w kwasie siarkowym i według Mangin'a złożona jest wyłącznie z pektynów.

Otóż badając analogiczne skrawki roślinne, raz przy pomocy barwików pektynowych, następnie zaś odczynników oksydazowych, znajdowałem zupełnie identyczne rozmieszczenie tych substancyj. Substancja międzykomórkowa chłonie zarówno chciwie barwiki pektynowe, jak energicznie utlenia benzydynę, tak, że na podstawie samych badań lokalizacyjnych musimy twierdzić, że w świeżych tkankach roślinnych substancje pektynowe utleniają benzydynę i inne analogiczne odczynniki, choć zdolność tę tracą znacznie łatwiej, niż zdolność barwienia się czerwiecią rutenową. O ile tak oksydazy, jak pektyny występują przedewszystkiem w substancji międzykomórkowej, to spotykamy jednak tkanke, w której substancja międzykomórkowa nie zawiera oksydaz. Jest to tkanka drzewna, a właściwie tylko starsze naczynia i cewki, a więc komórki martwe, podczas gdy cienkościenny miękisz naczyniowy

zawsze w oksydazy obfituje. W młodych naczyniach i cewkach oksydazy występują w błonie, a także według Raciborskiego mają być obecne wewnątrz naczyń, w starszych tylko w zatyczkach tj. w błonach, odgraniczających komunikujące ze sobą jamki. W zdrewniałej zaś błonie naczyń, jak również w substancji międzykomórkowej, która podobnej uległa metamorfozie, oksydaz nie znajdujemy. W młodym drewnie sosny na skrawkach promieniowych reagują obok zatyczek poprzeczne pasemka błony pomiędzy poszczególnymi jamkami lejkowatymi. Zestawiając ten obraz ze skrawkami stycznych i poprzecznych, barwionymi czerwienią rutenową, dochodzimy do wniosku, że w tych najmłodszych partiach drewna (także łyka) mamy do czynienia z obfitem nagromadzeniem się substancji międzykomórkowej (znanem już Dipplovi), która później znika, dzięki rozpuczeniu i wessaniu, a w tkankach młodych (zwłaszcza miążdże twórczej) jest podścieliskiem tak intensywnej reakcji oksydazowej. W miarę drewnienia ścian naczyń i cewek reakcja oksydazowa ogranicza się tylko do jamek. Co jest powodem, że blaszka środkowa w tkankach zdrewniałych nie daje reakcji oksydazowej, trudno powiedzieć. Nie wiemy również, czy oksydaza jamek lejkowatych iglastych jest ciałem wydzielonym tam przez plazmę i utrzymującym się w zatyczkach tak długo, czy też obecność jej w jamkach jest zjawiskiem wtórnym, (np. oksydaza może być tu przyniesiona i złożona prądem krążącej wody). Za pierwszym przypuszczeniem zdawałoby się świadczyć znajdywanie w jamkach lejkowatych małych ziarenek skrobi i tłuszczu, co tłumaczy się tem, że ginąca w cewkach protoplazma w jamkach najdłuższej się utrzymuje i działa (G. Lakon, Ber. d. deutsch. bot. Ges. Bd. XXIX. 1911); z drugiej jednak strony, woda w naczyniach i cewkach niewątpliwie zawiera oksydazy wypłukane ze ścian komórek mięksizu, który współdziała w jej podnoszeniu i te oksydazy wykrywa badanie lokalizacyjne w minimalnej ilości na powierzchni wewnętrznej naczyń i cewek, a obficie w zatyczkach jamek, przez które się woda filtrująco przesącza. Nie jest również wykluczone, że mamy tu do czynienia z nieorganicznymi katalizatorami, jak np. drobnymi ilościami soli manganu lub żelaza, osadzonemi również prądem wody.

O ile substancja międzykomórkowa tkanek drzewnych — za wyjątkiem zatyczek — oksydaz nie zawiera, to już w łyku

grubościennem stale można w niej wykazać oksydazy. Piękny obraz zupełnej zgodności w występowaniu pektynów i oksydaz, nawet na powierzchni martwych włókien łykowych, dają zwłaszcza Apocynaceae i Asclepiadaceae. Subtelna siatka, jaką tworzy substancja międzykomórkowa między włóknami łykowymi oleandra, barwi się tak czerwienią rutenową, jak benzydynam<sup>1)</sup>, podczas gdy same błonnikowe ściany włókien pozostają całkowicie bezbarwne.

Podobnie jak w blaszce środkowej, tak samo w narożnikach występują obficie oksydazy na powierzchni błon komórkowych, w warstwie pektynowej (identycznej z substancją międzykomórkową), która powstała z rozklejenia blaszki środkowej. Szczególnie obficie nagromadzone są oksydazy na powierzchni obszernych przestworów międzykomórkowych, zwłaszcza u roślin wodnych. Śluzowatą wyściółkę przestworów międzykomórkowych, występującą tak wybitnie np. u Nymphaeaceae, opisał Frank jako utwór kutikularny, Russow i inni jako plazmę zewnątrzkomórkową, wreszcie Schenk („Ueber die Auskleidung der Interzellulargänge“, Ber. d. deutsch. bot. Ges. 1885) stwierdził, że mamy tu do czynienia z tą samą substancją, co w blaszkach środkowych. Przestwory te bowiem powstają przez rozklejanie i rozstępowanie się komórek (schizogen) i międzykomórkowa substancja stanowi następnie zewnętrzną powłokę błon cellulozowych, biorąc dalszy udział w ich wzroście i ulegając jeszcze chemicznym przemianom. Badałem te wyściółki przestworów powietrznych w ogonkach liściowych i szypułkach kwiatowych *Nymphaea alba* i *Nuphar luteum* z następującym wynikiem: czerwień rutenowa i neutralna, zieleń metylova, błękit metylenowy i brunat Bismarka barwiły śluz ten intensywnie, natomiast nie barwiły go czerwień Kongo, koralina w sodzie, błękit anilinowy, jod z kwasem siarkowym, jod w jodku potasu (lekko żółto). Na podstawie tych reakcyj wnoszę, że mamy tu do czynienia z czystym śluzem pektynowym, jaki Mangin podawał dla Malvaceae, Rosaceae, Tiliaceae i in. Śluz ten doskonale rozpuszczalny w wodzie ulega wyflukaniu przy otrzymywaniu oksydazy przestworów powietrznych metodą Raciborskiego, tak

<sup>1)</sup> Oczywiście barwienie pektynów polega tylko na absorbcji poszczególnych barwików, podczas gdy reakcja benzydynamowa jest istotną reakcją mikrochemiczną.

że badacz ten, jak z jednej strony otrzymywał tą drogą niezwykle czystą oksydazę, bo wolną od składników treści komórkowej, tak z drugiej strony w preparacie tym miał do czynienia z tak czystym związkiem pektynowym, jakiego dotychczas może nie otrzymano. Raciborski nie zwrócił jednak uwagi na ten interesujący szczegół.

Z wyściółkami przestworów powietrznych niewątpliwie jest homologiczna warstwa żywicorodna Tschircha i jest jak one zbudowana przede wszystkim z ciał pektynowych. Wydzielina tej warstwy, to (według Tschircha) mieszanina żywicy, ciał gumowatych i oksydaz (typu lakkazy), przyczem ciał gumowatych i oksydaz nie można rozdzielić. Te ciała gumowato-śluzowate Tschircha, to nic innego, jak śluz pektynowe innych badaczy. Aby podkreślić ich ścisły choć niezbadany bliżej związek z oksydazami, Tschirch wprowadza dla nich nazwę gumazy (Gummase-Gummioksydase<sup>1</sup>). Tak więc w samej warstwie żywicorodnej, jak w jej wydzielinach spotykamy fenolazy i ciała pektynowe nierozłącznie ze sobą spojone. Zupełnie analogicznie do warstwy żywicorodnej Tschircha można warstwę pektynową błon komórkowych nazywać „warstwą oksydazorodną“.

Według badań Raciborskiego powierzchnia chłonna korzenia wywiera silne działania utleniające. Badając włośniki fasoli i grochu łatwo stwierdzić, że siedzibą reakcji jest przede wszystkim śluzowaciejąca zewnętrzna warstwa błony. Na podstawie zachowania się względem barwików uważam, że warstwę tę tworzy śluz celulozowo-pektynowy (według terminologii Mangin'a).

Tkanką, która zawiera oksydazy w ilości stosunkowo największej, jest śródskórnia. Oksydaza występuje w niej w narożnikach i blaszce środkowej za wyjątkiem paska Casparego.

<sup>1</sup>) Nazwa to mojem zdaniem nieszczęśliwa, mogąca wprowadzić tylko zamieszanie w już i tak skomplikowaną nomenklaturę fermentów utleniających. Według powszechnie przyjętej zasady Duclaux'a, gumaza byłaby oksydazą działającą na gumy. Ponieważ jednak o fizjologicznej roli oksydazy stowarzyszonej z gumą — jak wogóle o roli fenolaz — nie wiemy nic pewnego, więc samo występowanie jej łącznie z gumami nie usprawiedliwia dostatecznie tej nazwy. Interesujące, że również inni badacze znajdowali śluzowate i gumowate substancje (pektynowe?) towarzyszące oksydazom, od których nie dawały się oddzielić (Cazeneuve, Compt. rend. 1879, Bach i Chodat, Ber. chem Ges. 1904).

Barwienie na pektyny nie wykazuje tak wybitnej różnicy błon komórek śródskórni od innych i zazwyczaj trzeba pewnych zabiegów, by wykazać, że w błonach śródskórni ma miejsce obfite nagromadzenie tak pektynów, jak oksydaz<sup>1)</sup>.

Korzonki *Stratiotes aloides* (mat. alkohol.), barwione błękitem naftylenowym R. lub błękitem nocnym, następnie przepłukiwane wodą, można odbarwić tak dalece, że pozostają zabarwione tylko błony komórek śródskórni (często także skórki). Podobnie zachowują się *Hippuris vulgaris*, *Jussieua repens*, *Equisetum hiemale* (łód.) i in. Bardziej uderzającym jest brak, tak oksydaz, jak pektynów w pasku Casparego. Pasek Casparego jest tą częścią błony komórkowej, w której u paprotników nigdy nie udało mi się wykazać oksydaz, ani też pektynów. Skrawki poprzeczne *Equisetum hiemale*, barwione czas dłuższy czerwiecią rutenową lub błękitem naftylenowym R, wykazują bezbarwny pasek Casparego na tle intensywnie zabarwionych błon, zupełnie analogicznie jak przy reakcji benzydynowej. Inne barwiki pektynowe barwią pasek Casparego na materiale świeżym jak drewno (fiolet neutralny) lub plazmę (błękit metylenowy), nigdy jednak jak substancje pektynowe<sup>2)</sup>. Tak więc ta drobna część błony komórkowej, jaką stanowi pasek Casparego jest jedynym miejscem całego przekroju, zupełnie pozbawionem pektynów i oksydaz, podczas gdy w całej reszcie błon obie te substancje z łatwością dają się wykazać. Fakt ten niewątpliwie jest niemniej wymowny, niż zupełnie pokrywające się rozmieszczenie obu tych ciał.

Zestawiając wyżej przytoczone dane o lokalizacji oksydaz i pektynów widzimy, że tak jedne jak drugie są składnikami błon komórkowych i głównym miejscem ich występowania są

<sup>1)</sup> Na obecność pektynów w błonach komórek śródskórni korzeni *Equisetum hiemale* zwracał uwagę Vidal (Journ. de Bot. 1896), zaś kallozę w narożnikach śródskórni wykrył Poirault (Compt. rend 1891).

<sup>2)</sup> Brak oksydaz i substancji pektynowych w pasku Casparego paprotników, jak również jego zachowanie się względem różnych odczynników i barwików doprowadziło mnie do wniosku, że mamy w nim do czynienia z plazmą zewnątrzkomórkową. Kwestję tę zamierzam później dokładniej opracować. Fakt, że pasek Casparego w korzeniach niektórych roślin okrytonasiennych (np. *Iris germanica*) daje się łatwo zabarwić czerwiecią rutenową, świadczy tylko, że dotychczas nie mamy jednoznacznego barwika na pektyny i wart jest szczegółowszego zbadania.

t. zw. blaszki środkowe czyli substancja międzykomórkowa. Wszędzie tam, gdzie znajdowałem oksydazy, zawsze udawało mi się wykazać obecność substancyj pektynowych, choć obecność tych ostatnich niekoniecznie pociąga za sobą występowanie oksydaz (np. w blaszkach środkowych tkanek drzewnych).

Ta uderzająca zgodność w występowaniu nasuwa nowe przypuszczenia o stosunku oksydaz do substancyj pektynowych: 1<sup>o</sup> albo oksydazy i pektyny są substancjami w części identycznymi, t. zn. oksydazy są jakimś związkiem pektynowym, 2<sup>o</sup> albo substancje te stoją w związku genetycznym, więc np. plazma może wydzielać jako substancję macierzystą jakiś związek pektynowy, który dopiero w samej błonie, ewentualnie w kąpeli tlenu atmosferycznego zamienia się na oksydazę, 3<sup>o</sup> albo wreszcie są to substancje różne, a tylko obecność pektynów ułatwia przez absorbcję nagromadzenie się w nich oksydaz.

Pytania te czekają na rozstrzygnięcie przy pomocy innych metod. Same badania lokalizacyjne skłaniają do przyjęcia jakiegoś bliższego związku genetycznego między obu temi substancjami i to, co wiemy o ich naturze, bynajmniej nie stoi temu na przeszkodzie.

## **6. Wyniki badań lokalizacyjnych, a teorje o roli i sposobie działania oksydaz w organizmie roślinnym.**

Wnioski z samej lokalizacji o funkcji danego związku w życiu komórki, są zawsze nadzwyczaj niepewne, jednak poznanie lokalizacji fenolaz, pozwala nam przynajmniej z góry odrzucić pewne przypuszczenia o ich naturze i roli, jako niezgodne z ich zewnątrzkomórkowym umiejscowieniem. Ani jądro komórkowe, ani plazma nie są siedliskiem sił, działających utleniająco na chromogeny aromatyczne, a jedynie tylko pektynowe substancje błony komórkowej. Wszelkie teorje więc, które widzą główny czynnik utleniający, bądź w jądrze komórkowym, bądź w pewnych ziarenkach protoplazmy, dzięki rzekomej obecności w nich fenolaz, nie mają żadnej podstawy w rozmieszczeniu fenolaz w tkankach roślin wyższych.

Niewątpliwie istnieją w organizmie roślinnym liczne fermenty utleniające, które katalizują poszczególne stadja biologicznego spalania ważnych materiałów oddechowych jak cukry lub tłuszcze, jednak tak umiejscowienie fenolaz w błonach, jak zakres ich działania zdają się wskazywać, że nie mają one nic wspólnego z owymi istotnymi fermentami oddechowymi. Czy jednak owe właściwe fermenty utleniające będą utleniać również związki fenolowe, czy też nawiązują swą działalność do jakichś nieznanych bliżej ogniwi pośrednich w respiratoryjnym rozszczepianiu cukru, to pytanie dotyczące procesu tak skomplikowanego, że usprawiedliwioną jest wątpliwość, czy poszczególne jego stadja zostaną kiedykolwiek w zupełności wyjaśnione.

Występowanie fenolaz poza obrębem żywej plazmy w błonach i to w szczególności w substancji międzykomórkowej, następnie w wydzielinach jak żywice, lub wydzielinach korze-

niowych, świadczy niewątpliwie, że ciała te nie odgrywają żadnej wybitnej roli w przebudowie ważnych materiałów oddechowych komórki i że mają raczej charakter wydzieliny, o której ewentualnym ekologicznym znaczeniu nie wiemy jednak nic pewnego.

Z drugiej jednak strony uniwersalne rozpowszechnienie fenolaz na powierzchni żywych komórek, a szczególnie obfite w organach i tkankach oddechowych, nasuwa mimowoli w odniesieniu do nich hipotezę Raciborskiego o funkcji leptominy. Drogą, którą za pośrednictwem oksydaz dostaje się tlen w głąb tkanek zbitych, byłaby jednak nie treść rur sitowych, lecz blaszki środkowe ścian komórkowych, tj. pektynowa substancja międzykomórkowa.

Według przypuszczenia Raciborskiego, którego już jednak w druku nie wyraził, gdyż zagadnienia te miały być tematem dalszych, niewykończonych prac, ciałem pierwotnym, wydzielanym przez plazmę ma być leptomina (peroksydaza), która przybierając tlen, zamienia się na oksydazę. Oksydaza jako wehikul tlenu oddaje usługi przy oddychaniu i przenosząc tlen w głąb tkanek zbitych, redukuje się na leptominę, analogicznie jak oksyhemoglobina na hemoglobinę.

Ten pogląd na rolę oksydaz i stosunek oksydazy do peroksydazy, odmienny od popularnych teoryj Bacha i Chodat'a i Palladina, pozostaje jednak li tylko przypuszczeniem, gdyż na razie brak mu zupełnie eksperymentalnego poparcia.

Jakakolwiek jednak jest funkcja fenolaz w tkankach roślinnych, a trzeba przypuszczać, że substancje tak szeroko rozpowszechnione mają jakieś znaczenie dla życia roślin, to występowanie ich w błonach komórkowych wskazuje, podobnie jak ważne spostrzeżenia Tschircha nad powstawaniem żywicy w warstwie żywicorodnej i H. Crannera nad lipidami w błonie, na błony komórkowe, jako na podścielisko ważnych procesów biochemicznych.



## 7. Streszczenie wyników.

Przedmiotem badania były tkanki wegetatywne roślin wyższych ze względu na rozmieszczenie fenolaz i peroksydaz.

1. Nigdy nie zauważono utleniającego działania jądra, plastydów, ani też żywej plazmy wraz z zawartymi w niej ziarenkami.
2. Siedliskiem własności utleniających są przedewszystkiem błony komórkowe, a w szczególności substancje pektynowe w nich zawarte.
3. Własność ta jest tak rozpowszechniona, że nie brak jej żadnej błonie żywych, fizjologicznie czynnych komórek; nie występowanie reakcji oksydazowej w pewnych błonach odnieść należy do obecności czynników hamujących.
4. Wewnątrzkomórkowo występują fenolazy tylko w niektórych zbiornikach i przewodach wydzielinowych, lecz i tutaj pochodzenie ich odnieść można z wielkim prawdopodobieństwem do substancji wydzielonych przez błonę komórkową, zupełnie analogicznie, jak to Tschirch przyjmuje dla żywic.
5. To zewnątrzkomórkowe występowanie fenolaz świadczy przeciw wybitnemu ich udziałowi w przemianie materji komórki, z drugiej jednak strony wskazywać może na podobną rolę, jaką Raciborski przypisywał leptominie, przyczem jednak drogą, którą wędruje tlen w głąb tkanek zbitych, byłyby błony komórkowe, a w szczególności pektynowa substancja międzykomórkowa.

### Ważniejsza nowsza literatura.

- Armstrong, H. E. and E. F.: The function of hormones in stimulating enzymic change. Proc. Roy. Soc. B. 1910.
- Atkins, W. R. G.: Oxidases and their inhibitors in plant tissues. Sci. Proc. Roy. Dublin Soc. 1913, 1914, 1915.
- : Some recent researches in plant physiology. London 1916.
- Aso, K.: On oxidizing enzym in the vegetable body. Bull. Coll. Agricult., Tokio 1902 3.
- : Do sugars prevent the color reactions? Ibid.
- Bach A. und Chodat, R.: Über den gegenwärtigen Stand der Lehre von den pflanzlichen Oxydationsfermenten. Biochem. Zentralbl. 1903.
- Battelli, F. und Stern, L.: Die Katalase. Ergeb. der Physiol 1910.
- : Die Oxydationsfermente. Ibid. 1912.
- : Zur Nomenklatur der Polyphenoloxidasen. Biochem. Zeitschr. 1912.
- Begemann, H. K.: Beiträge zur Kenntnis pflanzlicher Oxydationsfermente. Pflüger's Archiv 1915.
- Boysen-Jensen, P.: Die Zersetzung des Zuckers während des Respirationprocesses. Ber. bot. Ges. 1908.
- : Über synthetische Vorgänge im pflanzlichen Organismus. Biochem. Zeitschr. 1912.
- Brocq-Rousseau et Gain, E.: Oxydases et peroxydases des graines. Rev. gen. de Bot. 1909.
- Chodat, R.: Darstellung von Oxydasen und Katalasen tierischer und pflanzlicher Herkunft. Methoden ihrer Anwendung. Handb. biochem. Arbeitsmeth. III, 1910.
- und Bach, A.: Untersuchungen über die Rolle der Peroxyde in der Chemie der lebenden Zelle. Ber. chem. Ges. 1902-1905.
- Clark, E. D.: The nature and function of the plant oxidases. Torreyia. 1911.
- Cushny, R. Arthur: Über die oxydierende Wirkung der Salze. Arch. für exp. Pathol. u. Pharm. 1908.
- Czapek, F.: Die Atmung der Pflanzen. Ergebn. d. Physiol. 1910.
- Devaux, M.: Sur le réactifs colorants des substances pectiques. Proc. Soc. Lin. Bordeaux 1901.
- Dietrich: Naphtolblausynthese und Lipoidfärbung. Zentralbl. f. Pathol. 1908.
- Dony-Hénault: Contribution à l'étude méthodique des oxydases. Bull. Ac. Roy. Belg. 1908.
- Euler, H.: Allgemeine Chemie der Enzyme. Ergebn. d. Physiol. 1907

- Ewart, A. J.: A comparative study of oxidation by catalyst of organic and inorganic origin. Proc. Roy. Soc. B. 1914.
- Fischel, R.: Der histochemische Nachweis der Peroxydase. Wien. Klin. Woch. 1910.
- Golodetz, L. und Unna, P. jun.: Über Peroxydase und Katalase innerhalb der Zelle. Berl. Klin. Woch. 1912.
- Grüss J.: Die Diastase im Pflanzenkörper. Ber. bot. Ges. 1895.
- : Beiträge zur Physiologie der Keimung. Landw. Jahrb. 1896.
- : Über die Oxydasen und die Guajakreaktion. Ber. bot. Ges. 1898.
- : Die Abhängigkeit der Bildung transitorischer Stärke von der Temperatur und der oxydasischen Wirkung. Wochenschr. f. Brauerei 1899.
- : Über die Oxydasen. Ibid. 1899.
- : Über Oxydaseerscheinungen der Hefe. Wochenschr. f. Brauerei 1901.
- : Peroxydase, das Reversionsenzym der Oxydase. Ber. bot. Ges. 1903.
- : Untersuchungen über die Atmung und die Atmungsenzyme der Hefe. Zeitschr. f. ges. Brauwesen 1904.
- : Abhandlungen über Enzymwirkungen. Zeitschr. f. Pflanzenkrankh. 1907.
- : Über den Nachweis mittelst Chromogramm-Methode, dass die Hydrogenase aktiv bei der Alkoholgärung beteiligt ist. Ber. bot. Ges. 1908.
- : Kapillaranalyse einiger Enzyme I u. II. Ber. bot. Ges. 1908, 1909.
- : Biologie und Kapillaranalyse der Enzyme. Berlin 1912.
- Hunger: Über Oxydasen und Peroxydasen in der Cocosmilch. Bull. Inst. bot. Buitenzorg 1901.
- Kastle, J. H.: Peroxydaseacceleratoren und deren mögliche Bedeutung für biologische Oxydationen. Chem. Zentralbl. 1908.
- : The oxidases and other oxygen-catalyst concerned in biological oxidations. Washington 1910.
- Keeble, F. and Armstrong, E. F.; The rôle of oxydases in the formation the anthocyan pigments of plants. Journ. of Genetics 1912.
- : The distribution of oxydases in plants and their rôle in the formation of pigments. Proc. Roy. Soc. B. 1912.
- Kionka, H.: Über anorganische Katalysatoren. Zeitschr. f. exp. Pathol. u. Therap. 1916.
- Kreibich, C.: Über Oxydasen und Peroxydasen. Wien. Klin. Woch. 1910.
- Liebermann, Leo und Paul: Ist zur Guajakreaktion die Gegenwart einer Katalase notwendig. Pflüger's Arch. 1905.
- Loele, W.: Über den farbchemischen Nachweis einiger oxydierender Substanzen des Körpers. Münch. Med. Woch. 1910.
- Lubimenco, M.: Quelques expériences sur l'antioxydase des fruits de la Tomate. Compt. rend. Ac. Sc. 1915.
- Madelung, W.: Über die Beziehungen der Hämoglobinderivate und Peroxydasen zu anorganischen Katalysatoren. Zeitschr. f. physiol. Chem. 1911.
- : Die Theorie der Benzidinoxidation in ihrer Bedeutung für Peroxydase-Untersuchungen. Ber. chem. Ges. 1917.
- Mangin, L.: Propriétés et réactions d. comp. pectiques. Journ. de Bot. 1892.
- Molisch, H.: Die Mikrochemie der Pflanze. Jena 1913.

- Nalli, Vitangelo: Sulla sede intracellulare del fermento ossidante. *La Clin. Med. Ital.* 1910.
- Oppenheimer, C.: Die Fermente und ihre Wirkungen. Leipzig 1913.
- Palladin, W.: Über das Wesen der Pflanzenatmung. *Biochem. Zeitschr.* 1909.
- Palladin, W.: Über die Bedeutung der Atmungspigmente in den Oxydationsprozessen der Pflanzen und Tiere. *Zeitschr. f. Gärungsphysiol.* 1912.
- : Über die Bedeutung des Wassers bei den Prozessen der alkoholischen Gärung und der Atmung der Pflanzen. *Biochem. Zeitschr.* 1914.
- Plato: Über die vitale Färbbarkeit der Phagozyten des Menschen mit Neutralrot. *Arch. f. mikr. Anat.* 1900.
- Portier, P.: Les oxydases dans la série animale. Leur rôle physiologique. Paris. 1897.
- Pozzi-Escot, C.: Sur une importante cause d'errer dans la recherche des diastases. *Bull. soc. chim.* 1902.
- Raciborski, M.: Ein Inhaltkörper des Leptoms. *Ber. bot. Ges.* 1898.
- : Weitere Mitteilungen über das Leptomin. *Tamže* 1898.
- : Einige Demonstrationsversuche mit Leptomin. *Flora* 1898.
- : Über eine chemische Reaktion der Wurzeloberfläche. *Bull. Acad. Crac.* 1902.
- : Oxydierende und reduzierende Eigenschaften der lebenden Zelle. I-III. *Bull. Acad. Crac.* 1905.
- Reed, G. B.: Evidence for the general distribution of oxidases in plant. *Bot. Gaz.* 1915.
- : Die Rolle der Oxydase bei der Respiration. *Journ. of biol. Chem.* 1916.
- Sartory, A.: Sur la propriété oxydasiques d'une eau minérale. *Compt. rend. Soc. Biol.* 1911.
- : Action de quelques sels sur la teinture de gaïac. *Tamže* 1911.
- : Sur quelques réactions fournies par la teinture de gaïac. *Tamže* 1911.
- : Quelques réactions données par le réactif à la benzidine acétique avec ou sans addition d'eau oxygénée. *Tamže* 1911.
- Schaer, Ed.: Die neuere Entwicklung der Schoenbeinschen Untersuchungen über Oxydationsfermente. *Zeitschr. f. Biol.* 1899.
- Schmidt, E. W.: Bau und Funktion der Siebröhre der Angiospermen. Jena 1917.
- Schreiner and Sullivan: Concurrent oxidation and reduction by roots. *Bot. Gaz.* 1911.
- Schultze, W. H.: Sauerstofforte der Zelle. *Zentralbl. f. Pathol.* 1913.
- Senter: Some experiments on the quaiacum reaction of blood. *Journ. of Physiol* 1907.
- Slowtzoff, B.: Zur Kenntnis der pflanzlichen Oxydasen. *Zeitschr. f. physiol. Chem.* 1901.
- Tschirch, A.: Die Harze und Harzbehälter mit Einschluss der Milchsäfte. Leipzig 1906.
- : Die Membran als Sitz chemischer Arbeit. *Arch. Pharm.* 1914.
- Unna, P. G.: Die Sauerstofforte und Reduktionsorte. Eine histochemische Studie. *Arch. f. mikr. Anat.* 1915.

- Unna, P. G. und Golodetz L.: Zur Chemie der Haut. Dermatol. Woch. 1912.
- Vernon, H. M.: Intrazelluläre Enzyme. *Ergebn. d. Physiol.* 1910.
- Vines, S. H.: Proteolytic enzymes in plants. *Ann. of Bot.* 1903.
- Warburg, O.: Beiträge zur Physiologie der Zelle, insbesondere über die Oxydationsgeschwindigkeit in Zellen. *Ergebn. d. Physiol.* 1914.
- Wheldale, M. Miss: Plant oxidases and the chemical interrelationships of colour varieties. *Progr. rei bot.* 1910.
- : On the direkt guaiacum reaction given by plant extracts. *Proc. Roy. Soc. B.* 1911.
- : On the formation of anthocyan. *Journ. of Genetics* 1911.
- Wieland, H.: Über den Mechanismus der Oxydationsvorgänge. *Ber. chem. Ges.* 1913.
- Willstätter, R. und Stoll, A.: Über Peroxydase. *Ann. d. Chem.* 1918.
- Winkler, F.: Der Nachweis von Oxydasen in den Leukoziten mittelst der Dimethylparaphenyldiaminalfanaphtolreaktion. *Fol. Haem.* 1907.
- Wisseling v. C.: Sur les bandolettes des Ombellifères. *Arch. Neerland.* 1895.
- Woker, G.: Die Theorie der Benzidinoxidation in ihrer Bedeutung für Peroxydaseuntersuchungen. *Ber. chem. Ges.* 1916, 1917.
- Wolff, I.: Quelques propriétés nouvelles du catalyseur dit „Peroxydase“. *Ann. Pasteur* 1913.

### Treść:

	Str.
1. Wstęp . . . . .	3
2. Przegląd dotychczasowych badań lokalizacyjnych nad oksydazami . . . . .	11
3. Metoda badań i odczynniki . . . . .	26
4. Lokalizacja oksydaz w tkankach roślin wyższych . . . . .	34
5. Równoległość w występowaniu oksydaz i substancyj pektynowych . . . . .	44
6. Wyniki badań lokalizacyjnych a teorie o roli i sposobie działania oksydaz . . . . .	51
7. Streszczenie wyników . . . . .	53
8. Literatura . . . . .	54

**Adam Wodziczko.**

**Recherches sur le lieu de l'apparition des ferments oxydants  
chez les végétaux supérieures.**

**La localisation extracellulaire des oxydases dans le tissu  
des plantes supérieures et la concomitance qui existe entre leur  
apparition et celle des substances pectiques.**

*Résumé.*

Les ferments oxydants végétaux constituent depuis de longues années déjà un objet d'étude spéciale pour de nombreux savants, en Europe en Amérique et au Japon. Malgré cela, jusqu'à présent ni la nature de ces ferments ni leur mode d'action ne sont point élucidés.

On a porté en particulier très peu d'attention sur le mode de leur disposition dans les cellules et dans les tissus. Pourtant la connaissance exacte de cette question est d'une valeur considérable, vu le rôle très important que les susdits ferments oxydants paraissent jouer dans les fonctions de transformation des substances dans la cellule vivante.

Ce sont M. M. J. Grüss et M. Raciborski qui se sont préoccupés d'examiner de plus près ce problème. Les recherches de Mr. Grüss qui sont généralement connues et sont citées dans la littérature scientifique (surtout dans la littérature allemande) n'ont aucune valeur réelle par suite des méthodes erronées dont ce savant s'est servi dans ses travaux. Tandis que les travaux de Mr. Raciborski sur le même sujet, que l'on peut compter comme des travaux classiques dans ce domaine, sont restés, au contraire, presque inconnus.

Dans le présent ouvrage on s'est efforcé d'examiner à l'aide de méthodes microchimiques, introduites par Mr. Raciborski, partiellement modifiées par l'auteur, et sur un matériel aussi vaste que possible, le mode de disposition dans les tissus des plantes supérieures des ferments oxydants appartenants au type de lakkase (appelés phénolases et peroxydases). Ces recherches

ont conduit à des résultats qui prouvent, que les susdits ferments oxydants sont propres à chaque cellule vivante et physiologiquement active et que le manque de réaction chimique correspondante dans certaines cellules et dans certains tissus, est du non pas à l'absence de ferments oxydants dans ces cellules et dans ces tissus, mais à la présence dans ce cas, de facteurs empêchant ou annulant la réaction. Quant à la localisation précise des ferments oxydants, ces recherches ont permis d'établir que, contrairement à l'opinion généralement admise, d'après laquelle ces ferments seraient des ferments intracellulaires, le siège des oxydases est toujours la membrane cellulaire et jamais l'intérieur plasmique de la cellule. Dans les limites de la membrane cellulaire l'apparition des ferments oxydants est toujours liée à la présence des substances pectiques et a donc lieu dans la lamelle moyenne ou substance intercellulaire. Cette concordance est d'une nature générale: partout où une réaction oxydase a lieu on peut découvrir la présence de la substance pectique.

La localisation extracellulaire des oxydases est un argument contre la supposition qu'ils participent à la reconstruction des matériaux cellulaires importants de la respiration. D'un autre côté, quant à leur fonction, ce fait permet d'admettre une hypothèse pareille à celle énoncée par Mr. Raciborski à propos de la leptomine, avec cette différence que dans ce cas le chemin par lequel l'oxygène pénètre à l'aide d'oxydases jusqu'aux couches profondes des tissus compactes serait non plus le contenu de tubes criblés, mais la membrane cellulaire et en particulier la substance pectique intercellulaire.





**Wydawnictwa źródłowe Komisji historycznej.** Tom I. Korespondencja Księcia Józefa Poniatowskiego z Francją. Tom I. (1807—1808) wydał A. M. Skałkowski 1921, str. 206.

**Wydawnictwa Wydziału Teologicznego.** Serja I. Materiały. Poszyt 1. A. O. Okęcki: „Ecclesiae cathedralis posnaniensis visitatio“ (1781—1784) 1917, str. 148. — Poszyt 2 i 3. A. O. Okęcki: „Visitatio generalis decanatus Posnaniensis“ (1871) 1918, str. 149—510. — Serja II. Rozprawy. Poszyt 4—1918 str. 210.

**Zapiski Archeologiczne Poznańskie** wydawane przez Komisję Archeologiczną T. P. N. pod redakcją Wł. Jażdżewskiego i Dr. B. Erzepkiego Tom I (5 zeszytów) 1887—1889.

**Album zabytków przedhistorycznych Wielkiego Ks. Poznańskiego,** zebranych w Muzeum Towarzystwa Przyjaciół Nauk w Poznaniu zeszyt I. wydali Dr. K. Koehler i Dr. B. Erzepki, 1893, str. 18+20 tab. zeszyt II wydał Dr. K. Koehler r. 1900 str. 41+21 tab.; zeszyt III i IV wydali Dr. B. Erzepki i Dr. J. Kostrzewski 1914 i 1915, str. 20+19 tab. oraz str. 13+11 tab.

**Przegląd Archeologiczny,** czasopismo poświęcone archeologii przedhistorycznej i numizmatyce średniowiecznej; organ Komisji Archeologicznej T. P. N. oraz Polskiego Towarzystwa Prehistorycznego, wychodzi pod redakcją Prof. Dr. J. Kostrzewskiego. Tom I (1919—1921) str. 320.

**Nieznane zabytki piśmiennictwa polskiego,** zeszyt I, „Kazania niedzielne i świąteczne nieznanego autora spisane około r. 1555“, wydał Dr. B. Erzepki, 1899, str. 114. (wyczerpane).

#### OSOBNO WYDANE PRACE. :

Ks. Kozierowski Stanisław: „Badania nazw topograficznych w dzisiejszej archidiecezji gnieźnieńskiej“ 1914, str. 440 (wyczerpane). — „Badania nazw topograficznych w dzisiejszej archidiecezji Poznańskiej“ 1916 2 tomy, str. 577 i 765. — Badania nazw topograficznych na obszarze dawnej zachodniej i środkowej Wielkopolski“ Tom I, A—L (z mapą) 1921, str. 502, Tom II, M—Z (w druku).

Grabowski Tadeusz: „Literatura luterska w Polsce w. XVI“ 1920, str. 221.

Pamiętniki z r. 1831 generała Jakóba Lewińskiego, wydane przez K. Kozłowskiego 1895, str. 152.

Rastawiecki Edward: „Słownik rytowników polskich, tudzież obcych“ 1886 str. 316 (wyczerpane).

---

## Prace Naukowe Uniw. Poznańskiego

### Sekcja humanistyczna

Nr. 1. Tadeusz Grabowski: „Juljusz Słowacki, jego żywot i dzieła na tle epoki“. Tom pierwszy, 1920, str. 386.

Nr. 2. Ryszard Ganszyniec: „Brata Mikołaja z Polski pisma lekarskie“ 1920, str. 236.



- Nr. 3. Severinus Hammer: „Neograeca“ 1920, str. 31.  
Nr. 4. Bolesław Orłowski: „Krytyka wartości kultury u Rousseau'a i przed Rousseau'em“ 1921, str. 244.  
Nr. 5. Witold Klinger: „Z motywów wędrownych pochodzenia klasycznego. Serja pierwsza“ 1921, str. 60.  
Nr. 6. Ludwik Piotrowicz: „Plutarch a Appjan, studia źródłowe do historii Rzymu w epoce rewolucji, okres I (133–70)“ 1921, str. 181  
Nr. 7. Adam Kleczkowski „Dialekt Wilamowic“ składnia (szyk (w druku).

### Sekcja prawno-ekonomiczna.

- Nr. 1. Alfred Ohanowicz: „Przyrzeczenie publiczne, studjum z prawa cywilnego“, 1920, str. 52.  
Nr. 2. Tadeusz Brzeski: „Psychologiczna teoria gospodarcza w zarysie“ (w druku).

### Sekcja matematyczno-przyrodnicza.

- Nr. 1. Alfred Denizot: „O termodynamicznem uzasadnieniu ciśnienia promieniowania“ 1921, str. 13.  
Nr. 2. Wilhelm Friedberg: „Ramienionogi mioceńskie zachodniego Podola“ 1921, str. 20+3 tab.

### Sekcja rolniczo-leśna.

- Nr. 1. Józef Rivoli: „Badania nad wpływem klimatu na wzrost niektórych drzew europejskich“, 1921, str. 99+4 tab.

---

## Wydawnictwa Instyt. Zachodniosłowiańskiego przy Uniwersytecie Poznańskim.

*Slavia Occidentalis* T. I. 1921, str. X+217.

---

## Ruch prawniczy i ekonomiczny

organ wydziału prawno-ekonomicznego Uniwersytetu Poznańskiego, Towarzystwa Przyjaciół Nauk i Towarzystwa prawniczego i ekonomicznego, wychodzi raz na kwartał pod naczelną redakcją Prof. Dr. A. Peretiatkowicza. :-: Skład główny w księgarni św. Wojciecha w Poznaniu.

---

## Zapiski Muzealne

wydawnictwo Towarzystwa Muzealnego w Poznaniu,  
zeszyt I, (1917), II, III, (1918), IV, V, (1920).