

UNIVERSITATEA „REG. FERDINAND I.” DIN CLUJ  
FACULTATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE

---

No. 546

# DETERMINAREA VALOAREI PEROXIDAZICE A SÂNGELUI



DOCTORAT ÎN MEDICINĂ ȘI CHIRURGIE  
PREZENTATĂ ȘI SUSȚINUTĂ LA ..... 1930.

DE

**GEORGE PURGE**  
ASISTENT LA INSTITUTUL DE CHIMIE BIOLOGICĂ.

---

CLUJ  
INSTITUTUL DE ARTE GRAFICE „ARDEALUL”  
STRADA MEMORANDULUI 22  
1930.

UNIVERSITATEA DE MEDICINA, FARMACIE SI TIPOGRAFIE  
BUCURESTI

ANUL I  
SEMESTRUL I  
MATERIA DE CURS



1954

**E**

# DETERMINAREA VALOAREI PEROXIDAZICE A SÂNGELUI

TEZĂ  
PENTRU  
DOCTORAT ÎN MEDICINĂ ȘI CHIRURGIE  
PREZENTATĂ ȘI SUSTINUTĂ LA \_\_\_\_\_ 1930.

**GEORGE PURGE**

ASISTENT LA INSTITUTUL DE CHIMIE BIOLOGICĂ.



~~0 JUN. 32~~ 50 AUG 1973

27391

30 DEC 1980

UNIVERSITATEA „REGELE FERDINAND I.” DIN CLUJ  
FACULTATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE

---

**Decan : D-nul Prof. DRĂGOIU I.**

*Profesori :*

Bacteriologia (agr.) . . . . .	D-l. Dr. <i>Baroni V.</i>
Patologia generală și experimentală . . . . .	„ „ <i>Botez M.</i>
Istologia și embriologia umană . . . . .	„ „ <i>Drăgoiu I.</i>
Clinica infantilă . . . . .	„ „ <i>Gane I.</i>
Semiologie Medicală . . . . .	„ „ <i>I. Goia.</i>
Clinica ginecologică și obstetricală . . . . .	„ „ <i>Grigoriu C.</i>
Istoria medicinei . . . . .	„ „ <i>Guiart I.</i>
Clinica Medicală . . . . .	„ „ <i>Hațieganu I.</i>
Clinica chirurgicală	
Medicina operatoare   . . . . .	„ „ <i>Iacobovici I.</i>
Farmacologia și farmacognozia . . . . .	„ „ <i>Martinescu Gh.</i>
Clinica oftalmologică . . . . .	„ „ <i>Mihail D.</i>
Clinica neurologică . . . . .	„ „ <i>Minea I.</i>
Medicina legală . . . . .	„ „ <i>Minovici N.</i>
Igiena și Igiena socială . . . . .	„ „ <i>Moldovan I.</i>
Radiologia medicală . . . . .	„ „ <i>Negru D.</i>
Fiziologia umană . . . . .	„ „ <i>Nițescu I. I.</i>
Farmacia chimică și galenică . . . . .	„ „ <i>Pamfil Gh.</i>
Anatomia descriptivă și topografică . . . . .	„ „ <i>Papilian V.</i>
Clinica oto-rino-laringologică . . . . .	
Clinica stomatologică (supl.)   . . . . .	„ „ <i>Predescu-Rion I.</i>
Clinica dermato-venerică . . . . .	„ „ <i>Tătaru C.</i>
Clinica căilor urinare (agr.) . . . . .	„ „ <i>Țeposu E.</i>
Chimia biologică . . . . .	„ „ <i>Thomas P.</i>
Clinica psihiatrică . . . . .	„ „ <i>Urechia C.</i>
Anatomia patologică . . . . .	„ „ <i>Vasilii I.</i>

**JURIUL DE PROMOȚIE:**

**Președinte : D-l Profesor Dr. P. Thomas.**

Membrii :  $\left\{ \begin{array}{l} \text{„ „ „ } V. \text{ Papilian} \\ \text{„ „ „ } I. \text{ Hațieganu} \\ \text{„ „ „ } I. \text{ Iacobovici} \\ \text{„ „ „ } T. \text{ Gane} \end{array} \right.$

**D-l Docent Dr. I. Kernbach**



*Dlui Prof. PIERRE THOMAS*  
*respect și stimă*



## Prefața.

Problema puterilor fermentative și catalitice, cari se petrec în organismul viu, este una din problemele biologice cari pătrund mai adânc în fenomenele vitale, pe cari ni le prezintă viața pe partea ei morfo-fizico-chimică.

Fenomenele naturii nu pun în joc decât două elemente: materia și energia. Tot ce se manifestă, se arată, pe una sau cealaltă formă a unei singure realități obiective, energia. Energia vitală își are originea în energia chimică potențială înmagazinată în principiile imediate, pe cari le împrumută din mediul ambiant. Antecedenta unui fenomen vital e un fenomen chimic, fenomenul consecvent e un fenomen caloric. Într'un cuvânt fenomenele vieții sunt metamorfoza energetică. Este un „circuitus materiae“ mai bine spus „circuitus energiae“. Acesta este principiul energeticii biologice, studiul fenomenelor vieții — după Helmholtz și R. Mayer — învederate din punct de vedere energetic.

Procesele de reducere și sinteză, de oxidație și desfacere, respectiv aprovizionare sau eliberare de energie, sunt un lung șirag de reacțiuni care se preced și se succed, fără încetare, în economie. Toate aceste procese chimice a proceselor vitale, sunt reacțiuni în unitate de timp. Economia nu este pentru efectul minim în unitate de timp fără să prefere excesul: „omnia in mensura et numero et pondere“. Nici pentru reacțiuni, cari decurg momentan, nici pentru stabilitate, dar întreg sistemul practic să fie în odihnă. Această exigență se pare efectuat de către fermenți și catalizatori. Reacțiunile specifice a fermenților sunt eforturi minime cu o consumare de energie neînsemnată, ca atare o activitate disproporționată față de entitatea lor. În consecință există un număr enorm de fermenți cari conlucrează la desfacerea sau refacerea totală a principiilor materiei.

Pe lângă fermenți îndeplinesc un rol foarte important și catalizatorii ne putând spune, cu toată activitatea lor fermentativă, că acestea sunt enzime.

Reacțiunile fermentative și catalitice singure nu pot începe reacțiunea, singure nu determină sfârșitul reacțiunilor biologice, intervine „pasivarea“, „activarea“ (Lesser), cari sunt legături adsorbitive, antagonismul ionilor (G. Embden), natura colloid chimică, raportul între ferment acțiune și secrețiune, raporturi de permeabilitate etc... Reacțiunile chimice fermentative și catalitice impletite în întreg convoiul de reacțiuni hormonale și nervoase, formează acel „ritm interior“ a unor autori.

„Rolul vieții este a înșira indeterminațiunile, cari sunt în materie“ (Bergson). Orice fenomen biologic, atât cele voluntare, cât și involuntare, au un sfârșit determinat.

Scopul cercetărilor biologice este căutarea formei sau a structurii de care este legată funcțiunea. Un ferment este o substanță, care face parte din celulă, ca atare dependentă de ea în constituția și în acțiunea ei, vom ajunge deci la celulă la individ, unde este originea și consecința fenomenelor în ordinul biologic. Acțiunea de catalizator este legată de structura chimică și cercetările vor sfârși în eprubetă.

Deosebirea între reacțiunile fermentative la plante și la animale, între fermentația anaerobă și aerobă este numai cantitativă. Fenomenele fundamentale sunt comune, pentru că compoziția e comună, fondul anatomic universal, celula are peste tot proprietăți identice. Fermentația alcoolică a levurei, fermentația lactică a bacteriilor, glicoliza țesuturilor reacțiile catalitice sunt fazele aceleiași categorii de reacții enzimatice. Activitatea destructivă a diastazelor nu se mai deosebește de activitatea organizatrică, ambele sunt faze aceleiași reacțiuni enzimatice.

Dacă punem față'n față acțiunile fermentative a microorganismelor cu reacțiunile catalizatorilor chimici, între ele despărțite prin domeniul diastazelor solubile: avem puse cap la cap reacțiunile determinațiunilor cu reacțiunile indeterminațiunilor. Nu se știe până unde în aceste domenii noțiunile biologice sau chimice vor domina, în orice caz, *un fenomen pur chimic nu va putea explica determinațiunea și sfârșitul biologic*. La acest nivel se vor întâlni din nou domeniile inteligenței, a științei, cu a inteligenței animalice, a instinctului metafizic, și fața bunului simț. (Dealtfel „Inteligența nici la om, nici la animal nu se separă de instinct și motricitate, ci se încorporează în organizația psihico-fizică completă a cărei finalitate în mare linii o determină“, Spaiër). „Inteligența procedă mecanic, — cum



spune Bergson — e caracterizat prin incomprehensiunea naturală a vieții, instinctul turnat pe viață procedă organic”.

Inteligența dusă în exces aduce lumina orbitoare instinctul întuneric misterios asupra fenomenelor vieții. De multe ori în fața unei probleme suntem orbiți de lumina prea mare a științei și dorim umbra instinctului. Astăzi biologia stă sub tirania științelor, după cum stătea sub tirania filozofiei și a metafizicii. Cu toate cercetările și inteligența indigestă de descoperirile zilnice, nu se dă nici o soluție „coordonăției“, „consensului“, „individualității“, „principiul vital“, „ideei directrice“, „ritm interior“. Eroare cu adevărul sunt înjuțați pentru vecie. Trei pătrimi din erori sunt datorite inteligenței. „A present comme toujours je me suis conduit par mon instinct et je ne me suis jamais tromper“, îmi scrie un coleg, mi se pare seducător.

În știința biologiei deci „rațiunea își are locul și inima al său“, spunea Pascal.

Știința biologiei cuprinzând o sumă de cunoștințe asupra fenomenelor naturale, este plină cu ipoteze și teorii, este un edificiu plin cu uși în loc de o singură încăpătoare hală și de multe ori se pierde adevărul prin acest labirint de uși eronate. Este foarte adevărat că știința nu se poate mărgini numai la lucruri concrete, progresiunea ar fi enorm încetinită, traiul inteligenței progresive se amplifică printr-teorii și ipoteze. „Cari se apropie mai mult sau mai puțin dela adevărul definitiv, ea servește ca un instrument constant de comprehensiunea a faptelor și într'un moment dat instrumentul cel mai bun“, spune Claude Bernard. La fel știința nu servește a ști adevărul absolut, ea este pentru înțelegerea faptelor. „Ce un secol ne spune, ceilalți o deszic“, este principiul absolut a logicei umane.

Impotența simțurilor noastre de percepțiune trebuie s'o admitem față de fenomenele cele mai minuțioase. Mareu avem nevoie de noi și noi achiziții pe cari ni le procură știința pentru a ajuta percepțiunea minuțioasă. Microscopul și ultramicroscopul nu sunt instrumente definitive în morfologie. Deci noțiunile de morfologie nu sfârșesc nici la microorganismele cele mai mici, nici la micelii, nici la amicroni sau submicroni. Identificarea morfologică în domeniul diastazelor solubile astăzi încă este imposibilă și nu este exclus să nu fie o parte a microbiologiei. Portier P. într'o recentă carte revoluționantă (foarte discutată), se exprimă „j'ai regardé la microbiologie par la fenêtres

de la fiziologie comparée", iar într'un studiu recent asupra țesuturilor vii A. Lumière și D-ra Montoloy sunt obligați a admite existența germenilor în stare de diniste în țesuturi. Natura hemofagică a muștei țețe este datorită prezenței unei levure care se nutrește exclusiv cu sânge de vertebrat superior. Pupa paritatea la glossine este o consecință a hemofegiei pure. La termite nu este germinațiune fără prezență de microorganisme. Este imposibil de înșirat toate exemplele de asociațiuni hereditare enzimo-bacterio-celulară. A. Euler și Nilson (1929) constată că peroxidazele și catalazele sunt hereditare la sămânțe și că unii fermenți urmează legea mutației lui Mendel, deci asociații hereditare de enzimă în sămânțe. Fecundația este însămânțarea ovulului sărac în simbiote cu spermatozoidul bogat în simbiote. Simpla înțăpătura partenogenetică este un aport de simbiote. După Portier sferule, vacuolide, mitochondrii și macrosimas sunt simbiote. Prin imaginațiune, în parte și prin probe, există multă analogie între microorganisme și fermenți pe deoparte și cu simbiote de altă parte. Fermentul este legat exclusiv de celula vie, în celula moartă cei mai mulți fermenți mor, deci fermentul e legat de simbioză. În general cercetările de până acuma sunt în calificarea prin simbioză a actelor vitale. Prin simbioză se explică maladiile cari nu ar fi decât simbiote anarchice. Vaccinul lui Callmette Guérin este un exemplu de lupte de triburi simbiote contra triburilor anarchice de aceeași speță (celule bacillose). „Solidaritatea universală domnește viața, interdependența conuniunea ființelor este o lege generală evidentă în celul", scrie Dr. Mauriac. Aceasta este evident peste tot, pentrucă progresul unei organizații se câștigă prin concurență și nu prin luptă ardentă. „Mai puțin superioritatea mijloacelor de a strica decât mijlociul de a profita de resursele vieții dau succesul" (Anthony). Deci simbioza este o organizațiune în acest sens, după cum simbioza foarte fi utilă, poate deveni și un element ostil. Deci simbioza nu este o fraternitate pură fără desarmament obligatoriu, este un state unite enzimo-bacterio-celulară.

Lucrarea care urmează este teza mea de promovare. Ea este prima mea încercare de analiză și sinteză, prima diastolă și sistolă a individualității mele. Trebuie să mă consolez dacă nu am mare talent, căoi putem să fim deasupra lucrurilor și

prin inimă. Dealtfel lucrările noastre de promovare nu au exclusiv meritul prin concluziunile lor, mai mult metoda cu care lucrăm, filiațiile și ghidurile prin care ne-am luminat inteligența, spiritul fin, observare și raționament și travai sunt adevăratele merite cari le-am înțeles asistând la părerea măștrilor mei. Spirit fin și nu americanism este patrimoniul cu care plecăm dela alma mater. Și mai cu seamă noi medicii avem nevoie mai mult ca oricine de spiritul fin de observație ca să nu fim amețiți de scânteile mici a supraproducerilor de lucrări, căci nu aceasta este totul în știință. „Scientia est velut mulier: si costa apud virum maniat, colitur, publica velescet“.

Georges Clémenceau absolventul în medicină scria în teza lui de doctorat (1865): „je fais ce travail parceque je l'avais“. Dela 1865 până la 1930 tezele de promovare în fața absolvenților au aceeași considerare. Studentul Clémenceau a făcut confesiunea sinceră în locul multora de atunci și de acum. Scopul sfintește teza, este o părere generală. Clémenceau studentul a spus-o pentru că era sigur că nu va face medicină și nici nu a arătat nostalgie față de aceasta știință. Niciodată n'am considerat aceasta, cu lucrarea mea m'am ocupat ca de un travai, ca teză am sacrificat o mică parte din lucrare.

## Introducere și istoric.

Ecuatiunea reacțiunilor peroxidazice este :

$H_2O_2 + \text{Peroxidază, Hbina, Fe. Zn. Ce. Mg. etc.} + \text{Acceptor (pirogalol HJ gaiacol)} = H_2O + O$  (rodusul de oxidare a acceptorului.

Schönbeim (1865) a fost primul care a observat producerea de oxigen activ. Löew a numit fermentul care desvoltă oxigen inactiv, din tabac, catalază. Linnossier (1898) numește fermentul care desvoltă oxigen activ peroxidază. Peroxidaza a primit următoarele sinonime: Sauerstoffüberträger (Schönbeim) Leptomin (Raciborski) Peroxid-dias-tază (Betrand) oxidează adevărată și indirectă (Bourquelot) oxidaze  $\alpha, \beta, \gamma$ , (Grüss) ozonidă. Bach și Chodat au arătat importanța peroxidazelor în procesele de oxidație. Mai târziu s'a aflat că peroxidazele se lasă înlocuite în multe proprietăți ale lor prin: Hemoglobină (Czyharz Fürth) platină coloidală, fer (Warburg Thunberg), săruri de Mangan (Manchot, Bach, Be-trand), săruri de zinc Na-Fe-Phosphat complex (Spöhr), Cytochrom (Keilin). A fost pregătită din sucuri vegetale de Bach, Chodat, Willstätter, A. Stoll, etc.

A fost găsită peroxidaza în: Diplococcus gonoree, stafilococcus aureus, bacilul coli au activitatea peroxidazică în raport de 10:10:1 (O. Kirchner, H. Nagell). Prin extracțiunea alcoolică și cu acid clorhidric din granulele euzinofile a corpusculilor sanguine, obținem un corp, care dă reacțiunea cu benzidină și unde s'a constatat absența substanței porfirinurice (A. Nauman). Extracte de leucociți conțin peroxidaze și cari se distrug prin fierbere (N. Nicolaer). Laptele crud dă reacția peroxidazică. După Marfan peroxidaza colostrului e derivat din polinucleare. În sânge reacțiunea peroxidazică apare deodată cu apariția hemoglobinei. Hemoglobina apare în stadiul mezenchimatous până în a patra lună, acidofilia hematilor crește cu cantitatea de hemoglobină (P. Weil, M. Bloch). Peroxidazele se mai găsesc în ser, grăunțe de porumb și de dovleac, în o splină, ganglioni limfatici, măduva osoasă. Conținutul în peroxidaze a

diferitelor ogane, după abondență, este următorul: ficat, rinichi, splină, plămân, pancreas, ganglioni limfatici, mușchi, creier, testicol, timus capsula supra renală și amigdalele (Battelli, Stern). Se mai găsește în leucociți, în mononucleare, Phanerogame, în cartofi, în sfeclă, hrean.

Reacțiunea peroxidazică a mai fost dată prin sucuri de ciuperci *Aspergillus Orizae*, *Penicillium Africanum*, — *Brevicula*, — *Purpurogenum*. *Mucor mucedo*, — *corymbifer*, — *ryzodopiformis*, — *racemosus*, — *javanicus*, *Monilia sithofila*, *Hypomyces rosellius*, *Rhizopus tonkinensis*, *Fusarium muschatum* — *vasinfectum* (Pringsheim). Aproape în toate celulele vegetale (Pfeffer, 1898). În foarte multe semințe și în cele mai uscate până și la cele vechi de 200 ani însă nu mai mult de această vârstă (Braq, Rousseau, Cain, 1907). Grăunțele de pe timpul faraonilor și-au pierdut vitalitatea și numai prezintă reacțiunea peroxidazelor. Se contestă însă dacă semințele găsite ar fi de fapt așa de vechi. În cel mai multe semințe în primele zile a încolțirii, la *Trifolium* și *Agrostis stolonifera* prima dată la a 5-a zi (Deleano). În grâu, sfeclă de zahăr, în sucuri lăptoase, în gumă de accacia. Se găsește în portocale și banane. Lipsese în sucul de fructe de lămâie și mere, prezintă însă în semințele lor sdrobite (B. Moore, Whitley, 1909).

Nu se găsește reacțiunea peroxidazică, în sucul de lămâie nici după neutralizarea acidității, urmărind pe secțiune de fruct se găsește mai mult în coaja fructului și a semințelor, se găsește în abondență la nivelul cicatricelor fructelor (reacțiunea fuge spre oxigen). Reacțiunea se urmărește pe scheletul stromic a fructului chiar în prezență de suc acid, este o reacțiune peroxidazică la o aciditate destul de ridicată (Purge).

La foarte multe animale inferioare, în conținutul intestinal a viermelui de făină, în conținutul intestinal și corpul larvelor insectelor de apă, la crustacee inferioare, în omidă după expunerea la lumină (W. Ostwald). Ar lipsi la broaște și la găini la început. La embrionul de găină la început este prezent reacțiunea mai târziu cu apariția sistemului vascular dispăre. la embrionul de broască apare cu hemoglobina (Herlitzka). În spermă, în puroi, ficat, mai mult, în laptele de vacă, decât în cel de femeie. Conținutul în peroxidaze din *Ricinus communis* crește până în a 14 zi a încolțirii după aceea rămâne neschimbată.

Din aceasta scurtă înșirare de cercetări reese, că reacțiunea peroxidaxică a fost cercetată aproape în tot regnul vegetal și animal și pe unde s'a căutat s'a găsit aproape în totdeauna. Reacțiunea peroxidază, cum vom discuta mai târziu, este produs nu numai de *enzimă*, ci și de alte complexe, *Hemoglobina* și toți derivați cu fer a grupului prostetic hemoglobinic, care s'a găsit în toate celulele vegetale și animale, precum și în drojzii, *citochromul* reproduc reacțiunea. Combinațiunile organice și anorganice de *Fer.*, *Mg.*, *Ce.*, *Zn.*, ec. ar putea acționa analog. Reacțiunea este comună în regnul anorganic, organic vegetal și animal. Enzima în multe locuri a fost declarată ca neexistentă în favoarea combinațiunilor de fer, fără să fie detronată cu totul. Incontestabile sunt diferențele de kinetică în acțiunea acestor agenți, după cum vom vedea, se găsește optimă la enzimă mijlocie la hemoglobină și mai mică la combinațiunile anorganice. Este o diferențiere în putere de reacțiune, după cum este o diferențiere de structură, precum se constată o tendință la analogie reacțiunii a combinațiunilor mai simple cu combinațiuni complexe.

Această reacțiune imensă a peroxidazelor sau pseudo-peroxidazelor constituie o importanță fiziologică sau nu? Trebuie să aibă o importanță. Reacțiunea peroxidazelor, fie prin ridicare dublă a potențialului de oxigen, fie că e o dehidrază specifică, își are locul în ambele teorii principale a oxidațiunilor și reducțiunilor biochimice.

Problema prezintă însă dificultăți în următoarele puncte:

1.) Peroxidazele grefează oxigenul asupra cromogenilor fenolici, dar e fără nici o influență de ex. asupra acidului sau aldehidei succinice, care e ușor oxidabil. Oxidația HJ. este neclară.

2.) Contrar peroxidazelor, cari acționează cu  $H_2O_2$ , sunt câteva preparate cari acționează fără adăogare de peroxid de hidrogen.

## Reacțiuni calitative.

Reacțiunile calitative se bazează, pe schimbarea de culoare care se produce prin acțiunea peroxidazelor, în prezență de  $H_2O_2$ , asupra fenolor cromogeni.

Cel mai întrebuintat este pirogallolul (Bach, Willstätter),



gaiacolul (Bach), cresolul (Bourquelot),  $\alpha$ -naptolul (Loele), adrenalina, branzcatehina, acid cofeic (Onslow), rezina de gaiac (Palladin), aldehida salicică (Dony-Hénault), acid gaiaconic (Schaer), hidrochinon, fenolftalină (Engler, Kastle Thomas), dihidrovanilin (Herzog). Sinteza de indofenil albastru (Röhmman), pe care Schultze (1908) a introdus-o în histologie și a suferit modificări de Gräff. Formare de indofenil albastru din dimetil-para-fenilen-diamină și  $\alpha$ -naptol. (Se întrebuintează în anatomia patologică). Reacția lui *Storch* tot cu parafenilen-damină se întrebuintează în lapte: 10 cc. de lapte, două picături apă oxigenată 1 %, două picături de parafenilendiamin 2 % (proaspăt) colorația albastră. Parafenilendiamin cu  $\alpha$ -naptol, carbonat de natriu culoare violetă. *Technica Bourquelot*: Amestecăm părți egale de apă gaiacolată 1 % și lichid cefalo-rachidian cu câteva picături de  $H_2O_2$ . Rezultatul este pozitiv cu lichid care conține sânge. Reacția slabă este orange, puternică roșu brique. Reacțiunea pozitivă în lichidul cefalo-rachidian indică polinucleoză și exclude limfocitoza. *Reacția lui Schönben* e cu tinctură de gaiac și cu  $H_2O_2$  culoare albastră.

S'a mai întrebuintat benzidina ac. iodhidric (Chylharz, Fürth), formare de malachit verde din leucomalachit (Willstätter), oxidația ac. formic (Battelli, Stern).

## Determinarea cantitativă.

Scopurile metodei de determinare sunt următoarele :

1.) Servesc ca metode de control a metodelor de preparatiune, acest control constă :

a) materialul câștigat raportat la materialul brut;

b) asupra concentrației de enzimą, gradul de puritate a preparatelor și a soluțiilor obținute.

2.) Pentru determinarea specificității. Dacă într'un material brut avem o acțiune față de diferite substanțe, se pune întrebarea, dacă această acțiune variată este datorit aceleași substanțe active sau mai multor substanțe.

3.) Pentru studiul proprietăților enzimactice, analiza kinetică etc.

„Pentru determinarea cantitativă justă trebuie să avem în vedere toate condițiunile pentru posibilitatea de activitate a enzimei, observarea și excluderea greșelilor“, spune Grassmann.

să vedem cari sunt aceste condițiuni. (Intâi vom studia condițiunile în general și la metodele de determinare în parte vom înca condițiunile specifice).

Măsurarea cantității de enzimă e relativă și asemănarea diferențelor preparate de enzimă se bazează pe constaarea rapidității, cu care enzima în anumite condiții acționează asupra substratului. Astfel se oferă ca și constantă de reacțiune o simplă cantitație a iutelei reacțiunei dacă reacțiunea e monomoleculară. Independent de forma kinetică, determinarea timpului în care enzima o anumită cantitate de substrat desface, este aplicabil în general: acesa este „Zeitwert“-ul.

Alte dăfi ne servim pentru determinarea cantității de enzimă de curbe empirice, cari constau în legătura dintre cantitatea de enzimă și produsul de reacțiune, în condiții determinate. Pentru anumit timp produsul de reacțiune este constant. La o concentrațiune destul de mare a substratului (în exces), cu o cantitate mică de enzimă, într'un timp de reacțiune scurt și dacă măsurarea interesează rapiditatea inițială, aceste curbe pot fi liniare și produsul de reacțiune rămâne proporțional cu cantitate de enzimă.

Ecuatiunea:

Cantitatea de enzimă „Zeitwert“ = constant

corespunde la foarte multe reacțiuni enzimatice, reacțiunea peroxidazică, fiind o reacțiune mononucleară avem:

Cantitatea de enzimă/constantă de reacțiune = constant.  
Aceasta însemnează că, cantitățile de enzimă cari se raporta cu 1:2:4, vor transforma 50 % din substrat în timpuri cari se vor raporta ca 4:2:1.

Determinarea cantitativă depinde de variațiunile cari depind de anumiți factori, cum este concentrația substratului, concentrația enzimei încărcare electrică, temperatura etc.

Viteza reacțiunii este proporțional cu concentrația de enzimă, produsul de oxidare este proporțional cu cantitatea de substrat însă numai până la o anumită limită, de ex. concentrația optimă pentru metoda cu pirogalol sau gaiacol este de 5 gr. substrat la 2 litri apă. Aceasta este datorit schimbării Ph-ului prin disociația substratului. Concentrația de  $H_2O_2$  are influență și mai mare asupra reacțiunii enzimatice și mici variațiuni au influență considerabilă asupra reacțiunii enzimatice tot influențând Ph-ul mediului prin disociație. După Willstätter re-



acțiunea peroxidazică este aceeași în țesuturi ca și cu peroxidazele pure, deci rolul machroheterogen-sistemului este contestat.

#### *Unități convenționale.*

Unitățile de măsură a cantității și concentrațiunii enzimactice sunt convenționale și realitive, ele depind de raporturi de aciditate de cantitate etc.

*Unitate enzimatică*: cantitatea de enzimă care dă o schimbare chimică definitivă (Willstätter-Kuhn).

*Valoare enzimatică*: numărul unităților conținute într-o cantitate definitivă de substanță (Willstätter-Kuhn).

De ex. „unitatea peroxidazică“ este cantitatea de peroxidază care ne produce o anumită cantitate de purpurogallină, „valoarea peroxidazică“ numărul unităților de peroxidază conținute de ex. într'un centigran, de material de studiat. Deci concentrația în peroxidază va fi exprimat prin „valoarea peroxidazică“ și cantitatea de enzimă va fi exprimat prin „unitatea de peroxidază“.

*Purpurogallinzahl* (PGZ), *Gaiacolzahl* (GZ), *kresolzahl* (KZ), cantitatea de produs de oxidare a pirogalolului gaiacoluului ori a kresolului produs de o cantitate de enzimă într'un timp și condițiuni determinate, deci aceste valori se referă atât la cantitatea cât și la concentrația de ferment.

„Purpurogallinzahl“ și „Kresolzahl“ a diferitelor preparate de enzimă sunt la fel, „gaiacolzahl“-ul este cu 5—15 % mai mare ca „purpurogallinzahl prin purificare „Purpurogallinzahlul“ se poate reduce la jumătate. Se pare că în oxidația gaiacoluului iau parte și substanțele însoțitoare al enzimei și în care mare rol joacă enzima.

Aci trebuie să mai amintim *valoarea de adsorbțiune* a enzimei (Willstätter) A. W., care este egal cu cantitatea unității de enzimă, care în condiții determinate e luată de un gram de adsorbens, ea servește pentru măsurarea electivității adsorbitive a enzimei. Ea depinde ca și celelalt unități de raporturi de cantitate, aciditate și de substanțele însoțitoare. Unitățile de determinarea cantității și concentrațiunii enzimactice sunt unități de măsură relativă, dacă legile reacțiunii masselor se vor adăveri, atunci vom avea unități mai generale și absolute.

#### *Metode.*

Determinările cantitative dacă în mare parte se fac asupra preparatelor de enzimă nu însemnează că determinarea nu se

poate face și în țesuturi. Astfel Gräss recomandă pentru determinări intra-celulare metoda de capilarizare a gaiacolului. Schimbarea de structură, reacții de colorare formare de structuri artificiale pot servi pentru determinările intra-celulare. În general determinările interesează preparatele de enzimă soluții, sucuri și se bazează pe determinări colorimetrice, gravimetrice, gazometrice, titrimetrice, polarometrice, stalagmometrice etc. Cele mai generalizate și uzate sunt determinările colorimetrice de cari ne vom ocupa în particular, amintind și de celelalte metode de importanță istorică sau bibliografică. Cele mai bune metode sunt cele colorimetrice, ceea ce este dificil este amestecul de culori care se observă la unele metode (Slowtsoff, 1901).

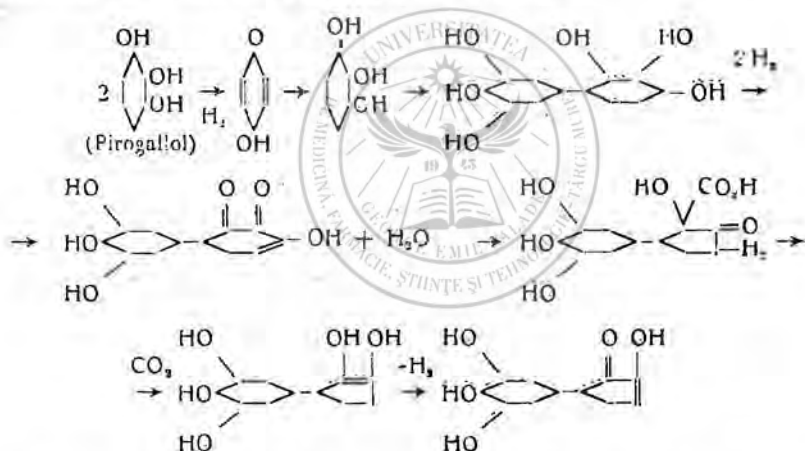
*Acceptor: HJ.* Această metodă a fost întrebuițată de Battelli și Stern. Cercetarea a fost făcută cu 2 cc. de reactiv, 2 pic. sol. de amidon și o pic. lichid de analizat. Czylharz și Fürth susțin că Hemoglobina nu ar avea nici o acțiune asupra HJ. în prezență de  $H_2O_2$  aceasta s'ar explica că în prezență de  $H_2O_2$  acesta ar reacționa cu hemoglobina și se formează o legătură cu J liber.

*Acceptor acidul formic.* Acidul formic se oxidează în prezență de apă oxigenată, la temperatura camerei în acid carbonic (în ultimul timp studiat de Dakin), Battelli a observat o grăbire a oxidației acidului formic prin extracte de organe precipitate cu alcool. De această metodă s'a servit și Cervallo, Pitini ei oxidau însă aldehida formică, au găsit o dezvoltare abundentă de  $CO_2$  mai cu seamă cu țesut renal decât cu alte țesuturi, datorit faptului că afară de aldehidă formică se oxidează și aldehidele valeriană propionică și isobutirică. Battelli a găsit o putere oxidativă mai mică a țesutului renal (probabil nu au lucrat în aceleași condițiuni). În mediu acid reacțiunea e mai puternică ca în mediu neutru. Această metodă nu se poate compara cu alte metode, aci e vorbă de o grăbire a reacțiunii a peroxidului asupra substratului, e excelentă prin constanța sa și potriveală cu legea timpului (Bach)<sup>1)</sup>.

<sup>1)</sup> *Acceptor Benzidină.* Această metodă a fost introdusă de Madelung (1911) și a mai fost întrebuițată de Wu. Benzidina se oxidează în substanțe chinoid. Primul produs este trecerea direct în chinon apoi se formează săruri colorate difenochinon cu benzidină (Albastru de benzidină). Această metodă a fost părăsită pentru că se obține un amestec de culori, cari încurcă determinarea.

*Acceptori Leuchomalachit.* Intrebuințat întâi de Czylharz și Fürth, Madelung, în urmă de Willstätter și Stoll. Se face în soluție diluată acetică de acetat de natriu acid în prezență de H peroxid și determinat colorimetric. Concentrațiunea reactivilor inhibează reacțiunea conc. optimă: ac. acetic 0,05N, acetat de natriu N:100 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,25%. E greu oxidabil. În cantit. mici se poate colorimetra<sup>1)</sup>.

*Acceptor Pirogalol.* Palladin la metoda cu pirogalol a măsurat volumetric CO<sub>2</sub> degajat. Foă înregistrează schimbările de presiune într'un tub închis, prin consumarea oxigenului. Brussell și Herbert măsoară absorbția de oxigen la pirogalol printr'un tub special. Bach Chodat după extracțiunea cu eter a purpurogallinei fac determinarea gravimetrică. Willstätter determină colorimetric purpurogallina formată.



Trei atomi de Oxigen se leagă asupra unei molecule de purpurogallină. Determinarea peroxidazei cu pirogalol este dependentă de conținutul în Oxigen și ea a mediului, substituția H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> cu etil hidroperoxid dă rezultate inconcluzive. Metoda după Willstätter: Într'un volum de 2 litri apă 5 gr. pirogalol, 50 mgr. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> la 20.5° Ucko și Bansi rămânând în concordanță cu principiul willstätterian reduc cantitățile de sus la  $\frac{1}{3}$  parte și canti-

<sup>1)</sup> *Acceptori mai puțin întrebuințați.* Orto-fenilen-diamina, meta-fenilen diamină (Gries), Di-tetrametil-p-phenilendiamină, Phenolphtalin, vanilia și dihidrovanilia, sinteza albastrului de indofenol (Gräff), ac. gaiaconic (Bolin).

lătea de purpurogallină va fi multiplicat cu 5. Pentru studiul reacțiunii în timp iau 20 cc. din amestecul de enzimă substrat și se întrerupe reacțiunea cu ac. sulfuric (liber de fer) 10 % 10 cc. extracțiune cu eter, colorimetrare cu o soluție eterică de purpurogallină 0,1 gr. la mie. (Purpurogallina se pregătește oxidând pirogalol cu peroxidază, chiar nu prea purificată, produsul filtrat și purificat prin solvare în eter și precipitare cu apă sau sublimare, punctul de fuziune 273°). Colorimetrarea să face în așa condițiuni ca purpurogallina formată să nu întrecă de o 100 mgr., căci altfel colorimetrare e nesigură (produsi de oxidare). Evaporarea soluției tip iarăși e cauză de eroare, în timpul de 20 minute, cât e necesar pentru o determinare se pierd 1,02 mgr. din 17,57 mgr., deci 5,805 % din cantitatea dela început. La analiză timpul de lucru fiind mai scurt, evaporarea va fi mai mică. S'a căutat o substanță de comparat, cum este acidul cromic soluția de ac. cromic 1 gr. % corespunde cu o soluție de purpurogallină 0,1 % pusă la diviziunea zece în colorimetrul lui Dubosq și soluția de ac. cromic la 5,7 înălțime.

$$5,7/10 = 0,57 \text{ la mie.}$$

Prin urmare soluția de ac. cromic de 0,57‰ are aceeași culoare ca și o soluție de purpurogallină 0,1‰. Culoarea ac. cromic se poate compara numai la limite foarte strâmte până la diviziunea 10 la analiza de porțiuni cu mică concentrație diluăm la  $\frac{1}{4}$  sau la  $\frac{1}{2}$  sol de acid. Willstätter a lucrat foarte mult cu această metodă în urmă și arătat preferință metodei de verde de malachit, pentru că metoda cu purpurogallină are inconvenientele de comparare sus amintite.

*Acceptor Kresol.* S'au întrebuintat toți kresolii

ortokresolul dă o culoare verde,

meta " dă o culoare cum e a cărnii,

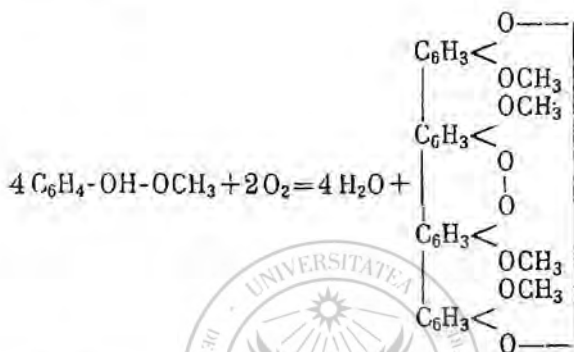
para " dă o turburare lăptoasă (det. nephelometric).

Acțiunea peroxidazei asupra orto- și parakresolului este particular de energetică. (Bertrand). Parakresolul e mai preferat ca ortokresolul și se întrebuintează următoarele concentrațiuni: kresol 0,1—1 %  $H_2O_2$  la mie. Bansi și Ucko au lucrat cu ortokresol în următoarele condițiuni: 1 gr. ortokresol, 2 cc.  $H_2O_2$  0,5 % 500 cc apă la 20 grade. (Kresolul e higroscopic). Întreru-

perea reacțiunii se face cu 10 cc de sublimat 5% și imediat comparat în colorimetru cu o soluție de 15 cc ac. acetic N/10 acetat de Na N/10 22 cc dinitrofenol.

#### Acceptor Gaiacolul.

Gaiacolul prin acțiunea peroxidazică va fi condensat în tetra gaiacol (Bertrand).



Indeosebi Bach și colaboratorii, Ucko și Bansi au lucrat cu această metodă. Cu acest acceptor se poate lucra în aceleași condițiuni willstätteriene ca și cu pirogaloul. Comparația colorimetrică după Bach și Zoubkova se face cu un etalon pregătit în felul următor: 5 gr. albumină de ou 2 gr. clorură de kobalt în prezență de 10 gr. sodă și 250 cc. de apă, lichidul se filtrează și se diluează sistematic dela 1—10 și introdus în tuburi închise. Comparația se face la sticlă lăptoasă și la lumină electrică.

Colorimetrarea gaiacolului e deteminabil până la limita de 0,05 mgr. gaiacol (Werner, Liepschitz).

Ucko și Bansi fac compararea cu testul Engelhardt (Moseva) (vezi la partea experimentală).

Dintre aceste trei metode din urmă: pirogalolul în prezență de alcali fără apă oxigenată sau fără ferment se oxidează într'un corp brun-gălbui, care nu se aseamănă cu purpurogallina. Deci pirogalolul în mediu alcalin nu este întrebuintabil nici la tamponare prin fosfați cari accelerează formarea de purpurogallină (Neuberg, Kikkay) nici cu preparatele cari conțin toluol care accelerează reacțiunea de oxidare (Purge).

Metoda cu cresol este greu colorimetrabil, cele mai bune rezultate le obținem cu metoda cu gaiacol. Pentru fiecare metodă

în particular avem diferențe cari depind de natura electro-chimică a substratului și a fermentului. (Ph optim variază la pirogalol = 7, la gaiacol 6. Kresol 5. Rezultatele obținute cu o metodă, de cele mai multe ori este comparabilă cu celelalte rezultate obținute, metoda cu gaiacol dă însă cifre mai mari datorită faptului că intervin alte elemente însoțitoare a fermentului, dar în care mare rol joacă fermentul.

## Peroxidaza preparare proprietăți.

### Preparare.

Metoda de preparare willstätteriană a dat până acuma peroxidaza cea mai pură, este următoarea:

A) Dializa. Materialul de plantă tocat bine în bucăți mici de 0,5—1 mm. lăsat patru zile pentru așa numită dializă, pentru care se supune la apă curgătoare 4—6 zile. În ultimile zile bucățile de hrean se colorează închis printr'un fel de anaerobioză. Autorii cred că prin trecerea substanțelor ușor deflexibile și peroxidaza trece în apă și se concentrează.

B) Se adaugă o sol. de ac. oxalic 4 % care se adsoarbe în materialul de plantă la bucățelele filtrate și uscate și se lasă 4—6 ore (o prea mare concentrare de ac. oxalic distruge enzima). Astfel enzima va fi precipitată, după care trebuie filtrat de lichidul uleios acid. ( $\frac{1}{5}$  parte din ac. oxalic va fi adsorbit de plantă și greutatea bucățelor va fi micșorat cu  $\frac{2}{5}$ ). Aceste bucățele se transformă într'un terciu închis, suc lăptos nu dă reacțiunea peroxidazică așa încât se poate arunca. Cu două părți apă amestecăm terciul și o filtrăm prin pânză și o spălăm mai de parte cu o soluție de ac. oxalic 1 la mie. După filtrare rapidă massa va fi presată, acest suc nou conține multe enzime.

C) Extracțiunea fracționată cu alcali. După presare materialul va fi adăugat cu o egală cantitate de hidroxid de bariu saturat la 20 gr. și lăsăm așa o oră. După aceea presăm lichidul, care lichid va fi imediat acidificat cu ac. carbonic. Această extracțiune se face de două-trei ori și fiecare din aceste porțiuni purificat după Bach, Chodat (precipitare fracționată cu alcool).

D) Purificarea peroxidazei. Enzima până acum lucrată se disolvă în apă și se precipită cu alcool. Bariul va fi precipitat cu ac. sulfuric în așa fel ca reacțiunea să nu întreacă acidita-



tea slabă. Din peroxidazele astfel pregătite prin precipitare cu acetat sau cu clorură de mercur, s'a obținut o substanță glicozidă. Peroxidaza astfel pregătită nu trebuie imediat uscată pentru că la redizolvările și precipitățile ulterioare mercurul devine insolubilă. (Se poate întâmpla la precipitare cu alcool să se formeze oxid de mercur care nu se precipită).

Altă purificare e prin adsorbțiune. (Hidroxid de aluminiu, talc, kaolin). Hidroxidul de aluminiu se prepară în felul următor: o sol. caldă suprasaturată de sulfat de aluminiu adăugat lent cu sol. de amoniac 15 % și lăsat 10—12 ore, precipitatul îl spălăm până ce solvat în HCL prin încălzire îndelungată nu dă reacțiunea sulfatului. Se lucrează cu o suspensie aproximativă de 3 gr. hidroxid la sută. Adsorbentul va fi eliberat de barită prin ac. carbonic de ac. carbonic printr'un curent de aer. Adăugăm hidroxidul prin porțiuni de 20—30 cc. și agităm puternic 2—3 minute. Adsorbatul roșu brun se așează la fund și se poate separa de lichid prin centrifugare. Din acest adsorbat vom câștiga peroxidaza adăugând apa distilată rece ca gheața sub un curent de acid carbonic până ce reacția va fi slab acidă. Lichidul va fi filtrat, filtratul clar liber de hidroxid după depărtarea carbonatului de bariu va fi redus la 60—80 cc. în vid. După o nouă filtrare precipităm cu alcool 1%. Cantitatea de ferment obținut atât prin această metodă cât și celelalte diferă după varietatea plantei și starea ei fiziologică.

Putem să întrebuițăm organe de plante superioare fără clorofilă, sfeclă albă, sparagă, cartof, ridichi. Sucurile de plantă cari la aer să înbrunesc sub acțiunea tirosinazei după Raciborschi putem să le distrugem prin încălzire la 60—65°. Separăm peroxidaza de cristaloizi prin ultrafiltrațiune. Această peroxidază ultrafiltrată corespunde în acțiunea sa cu peroxidaza lui Bach și Chodat. Peroxidaza lui Bach oxidează în prezența de apă oxigenată orcina, pe când cealaltă nu oxidează datorit mediului slab acid în care orcina nu se oxidează, din contra aminele aromatice pretind o reacțiune slab acidă.

Vom descrie și metoda de preparare a lui Bach și colaboratori bazat pe precipitare cu alcool cu toată că această metodă nu este cea mai bună, însă precipitare cu alcool în scop de purificare face parte și din metodă precedentă.

5 gr. de hrean vor fi tocate și lăsate să stea o oră pentru ca să se facă desfacerile glicozidice enzimatic. Se extrage cu

alcool 96° o zi prin care se disolvă uleurile eterice. Se filtrează și filtratul se spală cu 80% alcool și se presează. Spălăm din nou cu alcool 40% și se lasă să stea 5 zile. Presăm din nou, filtrăm și adăugăm două volume de alcool puternic (filtratul). Precipitatul alb sau alb brun va fi dizolvat în apă și iarăși precipitat cu alcool. Dacă vrem să crățăm alcoolul procedăm în felul următor :<sup>1)</sup>

Prin ambele metode obținem o masă cristalină albă care se poate păstra mai mult de doi ani nealterată la exsicator și întuneric, (cel mai bine în exsicator cu acid sulfuric). Putem să eliberăm peroxidază de zahărul și substanțe minerale prin metoda lui Deleano (dializă), și obținem o substanță amorfă a cărei acțiune proxidazică este de 4 ori mai mare decât a celei cristalizate.

*Metoda lui A. Deleano.* 50 cc. soluție de peroxidază cu 2—3 cc. de sol. de fer (liquor ferrioxidati dializat colloidal) precipitat. Prin această vor fi precipitate substanțele însoțitoare, albumine, iar din filtrat prin precipitare cu alcool obținem peroxidază. Acest produs este distrus deja la 55° și după autor rezistența mare a peroxidazelor este datorită substanțelor însoțitoare (albumine). Preparatul lui Chodat și Bach sunt rezistente din cauza substanțelor minerale. Metoda de dializare a

- 1) 1. Rad. de hrean tocat lasă să stea un ceas într'un vas închis.
2. Presăm (A).
3. Restul se adaugă cu apă, atât cât să întrecă nivelul hreanului, lăsăm 20 de ore.
4. Presăm (B).
5. Disolvăm din nou în apă și presăm (C).
6. A+B+C adaugat lent cu alcool concentrat până la apariția unui precipitat. Filtrăm, adăugăm din nou alcool 96%. Primiul precipitat este mai sărac, al doilea mai bogat în peroxidază.

*După Stocklin:*

1. Terciul de hrean lăsăm să stea o oră la aer.
2. Presăm (A).
3. Se adaugă apă, lasă să stea 10 o.
4. Presăm (B).
5. Repetăm 3, 4 de două ori (precipitat B. C).
6. B + C precipitat cu exces de alcool.



făcut-o și Bach cu Tscherniak a căror preparat dă reacțiunea biuretului și cea xanto-proteică, reacția lui Milon nu este dată, Preparatul lor nu este mult deosebit de peroxidază brută. A mai servit ca metodă de purificare katoforeza electro-dializă, punctul isoelectric.

Separarea peroxidazelor de catalaze, după A. Kasanski, se face cu pirogalol, după autor pirogalol 2% este suficient pentru purificarea peroxidazelor și pentru separarea de catalaze cu pirogalol 50%. Oxigenază a fost separată de peroxidază prin precipitare cu alcool 40% (Bach, Chodat, din *Russula* și *Dacterius*). Catalaza din sânge a fost micșorată prin cristalizarea oxihemoglobinei (Willstätter).

După Loeb peroxydul de hydrogen s'ar împărți în mod egal între catalază și peroxidază. Battelli pentru separarea peroxidazelor de catalază întrebuițează temperatură înaltă și acțiunea acizilor sau alcalilor.

Prin metodele de preparare, amestecare și precipitare nu ajungem la un corp chimic pur, și fermenții purificați devin sau nu recomandabili nu prin puritatea lor, ci prin puterea lor de activitate.

Tercul de organe mai puțin fermentul pur, nu este analog cu un complex de celule, unde avem o sumă de reacțiuni cari intervin. Prin excitarea funcțiunii fiziologice normale, prin puterea regulatoare internă a celulei, a concentrației ionilor de H, OH prin localizările în vacuole a fermenților prin rolul membranelor semi-permeabile, se desfășoară pas cu pas reacțiunile pentru reducere, sinteză și condensățiune.

Prin autoliză sau narcoză, prin schimbarea semipermeabilității și micșorarea vitalității, fermenții vor acționa liber. Sucurile presate duc țesuturi la vii, cari prin filtrațiune și centrifugare se eliberează de anumite elemente celulare vii, nu sunt altceva decât o necrobioză experimentală, un amestec mort de combinațiuni, cari se găsesc în plante. Prin presare nu sunt transportați combinațiunile cari iau parte în metabolismul chimic, cele mai multe rămân ca substanțe adsorbate sau amestecate, prin schimbarea reacțiunii chimice, iar altele se desfac așa încât nu avem oglinda fidelă a combinațiunilor cari se găsesc în plantă. După cum este deosebire între un extract viu sau mort de un țesut, la fel se pune întrebarea dacă sângele după extracțiune este viu sau mort, în acest caz în loc de ter-

minul mort preferim termenul de „izolat” (Pfeffer). Activitatea enzimatică ne interesează și din alt punct de vedere, reacțiunile enzimactice se petrec într'un mediu capilar și este o deosebire între activitatea enzimei în eprubetă sau mediul capilar din celulă.

Cercetările asupra Manganului din fermentii oxidanți au fost începute de Bertrand, continuate de van Haar, ei au arătat că preparatele cele mai sărace în Mangan sunt cele mai active. Bach, Chodat au arătat că preparatele lor sunt lipsite de Mangan. Willstätter și Stoll, după o metodă foarte complicată au pus în evidență fer în preparatele lor, mai târziu ei au observat că prin reducerea cantității de fer activitatea peroxidazică nu s'a micșorat. Neuberger și Kikkay, prin purificare de fer, au obținut o peroxidază mai activă. Bach și Chodat au arătat că preparatele lor nu conțin substanțe proteice și nu dau reacțiunea pentru fer, însă conțin mangan și Aluminiu. Stoecklin prin metoda lui de preparare a îndepărtat ferul și Manganul. Peroxidaza pregătită din sfeclă de zahăr este liber de fer și mangan, în schimb dă reacțiune a biuretului. Peroxidaza lui van Haar conține Mangan 0,0003%, părțile cari conțin Mangan sunt mai active.

Bach, Chodat și Stoecklin au arătat că peroxidazele conțin substanțe reducătoare, zahăruri după Willstätter și Stoll pentoză și glucoză conțin deci azot, dar sunt libere de substanțe proteice. Peroxidaza lui Bach încălzită cu Na, dă întâi amoniac, apoi o bază care e bogat în piridină, amestecat cu K. pulverizat și încălzit într'un tub căpătăm  $\text{NH}_3$  și pirol. Peroxidaza lui Willstätter și Stoll conține 5,57—8,005% Azot 5,5% cenușă 36,3% corpuri pentozice, 58% zahăruri, cari sunt zahăruri cu pondere moleculară mare, 0,17—0,46% fer. Acțiunea peroxidazei prin adăogare de fer nu se mărește.

În orice caz dacă peroxidaza conține sau nu fer, acțiunea lor mărită nu este datorită absenței ferului, ci îndepărtării substanțelor proteice în primul rând și altor substanțe minerale. Dealtfel ferul este inimitabil de nici un metal în acțiunea sa peroxidazică. Prin proporțiunea de 58% a zahărurilor ei. joacă un rol oarecare în respirațiunea și oxidațiile din plantă. Ceace este mai interesant și caracteristic, că toți autorii au găsit grupul pirol în aceste enzime. Grupul pirol se găsește în toți derivații hemoglobinei în citochrom și în peroxidaze, deci impor-

tanța acestui grup nu este neînsemnată. Mai departe știm, după Willstätter, că activitatea peroxidazică a hemoglobinei depinde în mod determinant de combinațiunile grupului prostetic cu globina și aceasta posedă mai mare importanță în combinațiunile porfirinurice ca fierul care poate fi chiar inactiv prin distrugerea Hbinei. Ar fi foarte interesant cercetarea acestui grup specific în constituția enzimelor, precum și rolul său în specificitatea enzimelor oxidanți. În concordanță cu cele stabilite la alți fermenți de către Kuhn și Grassmann aș putea spune că *peroxidaza este un complex coloidal care poartă un grup chimic caracteristic pirovul și ioni activi (îndeosebi fer) și a cărei activitate și putere este determinat prin raporturile acestor elemente între ele.*

## **Substanța colorată a sângelui și substanțele analoge.**

Reacțiunea peroxidazică a sângelui este o noțiune legată de substanța colorată sanguină atât în structura ei specifică, cât și conținutul de fier. Reacțiunea peroxidazică a sângelui apare deodată cu apariția Hbinei și determinarea vol. peroxidazice e acelaș lucru cu determinarea Hbinei.

Chylarz și Fürth cu metoda lor de verde de malachit și HJ. au studiat acțiunea hemoglobinei în comparație cu a peroxidazelor și au aflat o deosebire fundamentală între ele. E Stoecklin a arătat că hemoglobina este o peroxidază bună. Willstätter și Stoll au studiat cu metoda cu pirogalol hemoglobina și au găsit că ea este o peroxidază slabă. Buckmeister numește hemoglobina pseudo-peroxidază. După Bredig „oxihemoglobina joacă un rol nu de catalizator, ci de înmagazinător de oxigen, ca și  $H_2O_2$  la oxidarea indogoului... Pe lângă oxihemoglobină sunt prezenți fermenții de oxidare, cari ar fi în stroma țesuturilor și cari ar avea un rol analog cu platina la oxidarea indigoului“. Ville și Moitessier susțin că în sânge există pe lângă acțiunea peroxidazică a hemoglobinei și acțiunea peroxidazelor. Extracțiunea alcoolică a grăunțelor eozinofile ar conține o substanță cu acțiune peroxidazică fără să fie identică cu substanța colorată (Naumann, 1927). Bach cu Zoubkova susțin că în sângele diluat reacțiunea peroxidazică ar fi datorită peroxidazelor, iar în sân-

gele concentrat oxihemoglobinei. După Willstätter și Pollinger sîngele diluat înainte de fierbere și după fierbere are aceeași acțiune peroxidazică, deci sunt nevoiți a nega existența unei enzime pe lângă hemoglobină. Însă Willstätter a lucrat cu hemoglobină, cristalizată. Deci în sânge afară de hemoglobină avem peroxidazele conținută în elementele celulare și leucociți. Lucrând cu oxihemoglobină de la diferite animale, debarasate de acțiunea catalazică prin cristalizare, au găsit diferite valori pentru diferitele hemoglobine.

1 mgr.  $O_2Hb$  de cal 0,152 mgr. purpurogalină;

1 mgr.  $O_2Hb$  de căine 0,115 mgr. purpurogalină;

1 mgr.  $O_2Hb$  de porc 0,095 mgr. purpurogalină.

Această deosebire face să presupunem că grupul specific, adică cel prostetic, în activitatea sa depinde de asociațiunea de globină. (Prin diferite feluri de solubilitate și cristalizare de oxihemoglobină). Se pare deci că globina din diferitele feluri de sânge se constituie diferit, deci diferite globincomplexe de fer. Kuhn a arătat posibilitatea dependenței acțiunii enzimei de substanțele însoțitoare ori aceasta este evident în cazul oxihemoglobinei unde schimbarea grupului coloid purtător influențează activitatea ionilor activi, ca atare oxihemoglobina este un model pentru diferențierea raportului de afinitate a unei enzime (Willstätter).

După cum este deosebire între enzimile de diferite origini, avem la fel diferite feluri de complexe coloidale în substanța colorată sanghină de la diferite animale. În sânge avem diferite feluri de hemoglobină, după Bohr  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , cu diferite feluri de constituție, conținut în fer și diferită putere de legare de oxigen. „Schimbări în molecula totală aduce schimbări în specificitatea catalitică și în proprietățile enzimatică caracteristică“ (Grassmann). Hämina are puterea peroxidazică micșorată în schimb puterea catalazică enorm mărită. (Și Hämina este mult mai slabă ca cea mai bună cataliză din ficat). Mezohämina este mai bogat în doi atomi de oxigen însă îi lipsește puterea catalitică. Analogia între peroxidaze și substanțele porfirinurice este prin conținutul de fer, grupul pirolic, colorația și mai cu seamă prezența acestui grup pirolic în pigmenții respiratorii din plante și drojdii. Nu este exclus că formarea de culoare roșu brună care se observă la cele mai multe preparate, nu aparține însăși enzimei, interesant că peroxidazele sunt proporționale cu culoarea.

După Keilin (1925), în celulele animale și vegetale, putem urmări un pigment „pigment respirator“, cytochrom“, pe care Alac Munn a numit-o Miohamatin și care este caracterizat prin 4 bande de adsorbțiune. Bierich și Kosenbohm pe lângă spectrul cytochromului a găsit și pe al hemoglobinei, în celulele epiteliale. În mușchii lipsind în țesutul conjunctiv, deci hemoglobina și cu cytochromul pot fi prezenți în același timp. Spectrul cytochromic este foarte influențabil prin temperatură și timp. Conținutul în cytochrom și hemoglobină a celulelor normale este constantă și e foarte variabil la celulele canceroase. Deja Gola (1922) a găsit în multe plante inferioare cari seamănă cu hematina și cari la reducere dau pirrol derivați. Fischer, Hilger și Fischer și Fink au găsit spectrul hemoglobinic, dat de un comp. ce era conținut în levuri ei constată mai departe că în afară de Koproporfirina și porfirina lui Kämmer ( $\alpha$  hematina fără fer), care se găsește în levuri, trebuie să fie prezent un complex de fer. Keilin a numit acest complex de fer cytochrom. Anson și Mirsky au arătat că grupul prostetic din cytochrom este identic cu hematina fer complex. Schumm constată că cytochromul poate funcționa ca purtător de oxigen, dă spectrul miohamatinei, dă fer și pirol la desfacere. Deci peroxidaza cytochromul hemoglobina sunt analoage nu numai prin conținutul de fer, care probabil este numai un ajutor, ci prin complexul pirolic, care este totdeauna prezent și variază respectiv determinat în puterea acțiunii peroxidazice.

Identificarea fermenților cu catalizatorii anorganici până acuma e numai ipotetic. Cercetările în aceasta privință au fost începute de Berzelius și în ultimul timp s'a ocupat de această chestiune G. Bredig. Bertram aduce puterea oxidativă a fermentului, care nu e distrus prin căldură în legătură cu manganul în prezență de alcali sau săruri alcalino-terose și acizilor organici slabi și coloidali. După Warburg „fermentul respirator“ este suma acțiunilor catalitice a complexului de fer, care este prezent în celulă. În sensul școlii lui Willstätter ferul ar juca un alt rol, ar fi introducerea oxigenului într'o combinație peroxidică care, după cercetările lui Manchot, este verosimil. Reacțiunea peroxidazică a combinațiilor de fer nu sunt reacțiuni tipice de peroxidază. Manchot și Wilhelms au arătat că activarea peroxidului prin săruri de fier nu este o acțiune catalitică, propriu zisă este o reacțiune prin inducere. (Oxigenul nu-



este dat în totalitate mai departe de către combinațiunea de fier, rămâne legat și de fier).

## Kinetica.

În literatură găsim câteva lucrări relativ la kinetica peroxidazelor și multă vreme lucrarea lui Abel a fost singura. Primele cercetări nu au fost prea sistematice pentru că întreaga chestiune a fermentilor nu prea era pus la punct, însă prin cercetările școlii lui Willstätter și lucrările lui Ucko și Bansi, chestiunea kineticii peroxidazice, în raport cu cunoștințele actuale asupra fermentilor, au fost puse la punct. În urma acestor cercetări dela început putem să spunem că în ceea ce privește kinetica peroxidazelor posedăm două noțiuni importante:

1.) Fermentii fiind electroliți amfoteri cu structură coloidală de moleculă mare înclină spre formare de valențe laterale, formarea de valențe laterale — după Willstätter — trebuie pusă în legătură cu substratul fermentilor.

2.) Fenomenele de adsorbțiune joacă un rol enorm în kinetică și ele au aceeași importanță — în urma lucrărilor lui Michaëlis și Rona — ca și afinitatea chimică și depind de încărcarea electrică a fermentului și a substratului. Astfel fermentul ar adsorbi la suprafața sa micelică substratul (fenomen chimic) și pe urmă prin grupul activ ar acționa asupra substratului.

În ceea ce privește cercetarea enzimelor, avem de a face cu sisteme macro- și micro-heterogene. Soluții optice de fermenti nu se cunosc cu toată siguranța. Enzimele aparțin la clasa coloizilor hidrofili și această proprietate este datorită în mare parte substanțelor însoțitoare. Densitatea mare, viscozitatea mare, presiunea osmotică, difuziunea, dializa mică. Miceliile sunt complexe analoge cu complexele cristaloidale și tind spre combinațiuni adsorbitive. Michaëlis și Rona au studiat mult adsorbțiunea și deosebesc:

1.) Adsorbțiune echivalentă, când cationii și anionii unei sări vor fi adsorbite în mod egal.

2.) Adsorbțiune hidrolitică, când cationul va fi adsorbit și anionul va fi pus în libertate sau invers.

3.) Adsorbțiune de schimb, când cationul va fi numai adsorbit, anionul însă nu rămâne liber, ci va fi legat de un

cation care în schimbul unui ion adsorbit trece în soluție (numai la săruri insolubile).

4.) Adsorbțiune de încărcare. Se bazează pe puterea de adsorbțiune diferită a anionului și a cationului, contrar adsorbției de echivalență, duce la o schimbare de încărcare electrică. Aceasta adsorbțiune este analog cu un fenomen de afinitate chimică și toate substanțele cari vor fi adsorbate de kaolin, trebuie să fie baze cele adsorbite de tonerde, vor fi acizi.

Este natural deci ca o cantitate determinată de adsorbent să adsoarbe o cantitate anumită de ferment și aceasta depinde de:

- 1.) raporturi de cantitate absolută;
- 2.) aciditate;

3.) de substanțele însoțitoare (cu cât fermentul este mai pur cu atât va fi mai bine adsorbit).

Influența substanțelor însoțitoare este datorit următoarelor motive:

1.) enzima este legată de astfel de substanțe, cari prin încărcarea lor electrică sau prin distribuirea lor la adsorbens, micșorează adsorbțiunea.

2.) Datorit asociației enzimelor cu substanțe însoțitoare, vor fi mai adsorbabile, aceștia fac legătura dintre ferment și substrat, se numesc coadsorbate.

3.) Pot acționa în așa fel încât ele vor fi luate de adsorbens și fermentul va fi adsorbit mai puțin.

Evoluția este eliberarea fermentului din adsorbat și aceasta cere timp și depinde de temperatură pe când adsorbția se face repede. Se cunosc enzime adsorbate unde activitatea este pe deplin suprimată în altele de ex. kaolin adsorbat de lipază pancreatică e numai jumătate din activitate, însă prin eluție regăsim toată puterea enzimatică.

Reacțiunea enzimatică deci va fi în primul rând o reacțiune de adsorbțiune între ferment și substrat care constă:

1.) în legarea substratului de enzimă;

2.) desfacerea produselor de acțiune dela suprafața enzimei și fermentul nealterat gata pentru o nouă reacțiune.

Intre aceste două acțiuni adsorbitive va decurge acțiunea enzimatică propriu zisă prin acțiunea ionilor activi.

I. B. C. Halgam (1928) clasifică enzimele în acord cu determinarea valorii de constantei de disociațiune a complexului enzim substrat:

- a) cu afinitate slabă, enzime hidrolitice, substrat cristaloid;
- b) cu afinitate mijlocie, enzime hidrolitice, substrat coloidal;
- c) cu afinitate înaltă, enzime oxidoreducătoare.

Cu toată afinitatea înaltă a peroxidazelor constatăm diferențe în ce privește afinitatea enzimei față de diferitele substraturi de fenoli. Aceasta ar fi în legătură cu oxidabilitatea diferită a substratului cu diferită stare de activitate a substratului adică după starea electronică.

Combinățiunile și desfacerile complexului enzim substrat va depinde deoparte de concentrația substratului de altă parte de schimbarea gradului de disperzitate a sistemului heterogen. S'a determinat că avem un maxim de concentrațiune de substrat și că produsul de reacțiune este proporțional cu cantitatea de substrat, precum și raportul dintre enzima liberă și combinată depinde tot de concentrațiunea substratului. Cu cantități mici de sacharoză avem 
$$\frac{[\text{Sacharoză}] \cdot [\text{Sacharază}]}{\text{Sacharază} - \text{Sacharoză}} = K_s.$$
 Deci raportul sacharază și sacharoză nu depinde de concentrațiune, ci de viteza hidrolizei, că atare valoarea  $K_s$  reciproc măsoară afinitatea enzimei la substrat. Exactitudinea legii maselor în sfera substanțelor coloidale e cam îndrăzneată, însă putem să spunem că, acțiunea grupului caracteristic de moleculă ferment în multe cazuri e pur chimică și ca atare dominată de legea maseilor, iar sfera de acțiune a purtătorilor rămâne știută. Curba de activitate se deosebește însă de curba disociație, pentru că în afară de desfacerea complexului enzim substrat accelerația totală a reacțiunii va fi influențată de către reacțiunile cari iau parte. Factorii determinanți a curbei de activitate ( $p_s$ ) pot fi în legătură cu concentrația prea mare a substratului prin care se produce un deranj secundar, prin schimbarea proprietăților mediului și din care cel mai important este concentrația ionilor de hidrogen.

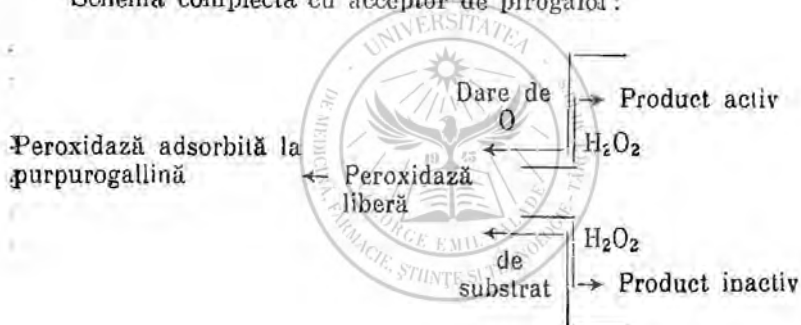
Prima dată Sørensen a studiat influența concentrațiunii ionilor de hidrogen în activitatea pepsinei. Mult timp se credea că peroxidaza este un complex de mai mulți fermenți, datorit faptului că peroxidazele aveau un Ph optimum diferit după acceptori. Ph-ul însă nu este o proprietate a fermentului, ci depinde de substrat și de reacțiunea enzimatică. Deci nu putem vorbi de un Ph optim sau Ps curbă de activitate în sensul a unei proprietăți a enzimei, ci de un Ph și Ps optim a unei



enzime în acțiunea sa asupra unui substrat anumit. Și Nortrop a arătat că Ph curba depinde de disociația substratului. Concentrația ionilor de Hidrogen la peroxidază va fi determinat nu numai de concentrația substratului, ci și de concentrația peroxidului și știm că enzima este mult mai sensibilă la concentrațiile de peroxid ca cea de substrat. Schimbările gradului de dispersitate iarăși vor avea influență asupra activității fiind dat natura coloidală a fermentilor ori starea de dispersiune se schimbă atât prin șederea sau scuturarea soluției de enzimă, cât și prin concentrația substratului și a noilor produși de oxidare. Oxigenul s'ar lega de peroxidază sub două forme una activă, alta inactivă.

1.)  $\text{HO} \cdot \text{OH}$ ; 2.)  $\text{H}_2\text{O} \cdot \text{O}$ .

Schema completă cu acceptor de pirogalol :



Această descompunere, în sensul lui Willstätter, într'un product inactiv și altul activ, ar interesa oxigenul ca o ridicare dublă de potențial de activare. Prima activare de oxigen ar fi făcut de oxidaze, probabil sistemul de fier a lui Warburg; activarea care consistă în desechilibrarea electronilor din orbita lor normală, a doua de peroxidaze sau sistemul colorant din sânge etc.

Peroxidul care este prezent pe lângă peroxidază (în sensul lui Bach oxigenaza în sensul warburgian fier), are influență asupra puterii de reacțiune și schimbarea mică de concentrațiune de peroxid întrebuintează reacțiunea. Cauza nu se știe, dar această sensibilitate este mai accentuată față de hemoglobină (concentrația optimă este de 30 miligrame de peroxid la 2 litri mediu). Concentrațiunea substratului de 5 gr. la 2 litri.

Bach studiind tirozinaza, observă că iuțala de reacțiune este proporțională cu concentrațiunea fermentului și invers proporțional cu cantitatea de substrat. Euler cu Bohr observă că produsul reacțiunii este proporțional cu rădăcina pătrată a cantității de ferment. După Willstätter produsul reacțiunii este proporțional cu concentrația de ferment. Deci reese din aceste constatări că produsul reacțiunii eset proporțional nu cu cantitatea de ferment, ci cu concentrațiunea.

$$k = c \cdot K$$

$k$  = produsul de reacțiune,  $c$  = factor proporțional,  $K$  = conc. de ferment,  $m$  = constantă caracteristică pentru un ferment, în acest caz  $m = 1$ , deci

$$k = c \cdot K.$$

Această formulă corespunde cu pirogalol și la metoda cu gaiacol între  $1 < K > 4$ . Mărirea cantității de substrat are ca urmare o mărire a cantității produsului, însă numai până la o limită. Aceasta este în legătură cu rolul substratului și a produșilor de oxidare asupra Ph-lui. După Wohrtrop curba Ph-lui corespunde cu curba de disociațiune a substratului, deci Ph-ul nu este o proprietate a fermentului, ci depinde de reacțiunea enzimatică. Astfel Ph optim pentru pirogalol este 7 Kresol 3—3,5 etc. (Legea masselor despre care am vorbit încă nu este clarificat și am amintit în ce fel aplicarea legii masselor ar fi posibil).

Am ajuns la concluziunea că productul de oxidațiune format în fiecare timp este proporțional cu concentrațiunea de ferment, fără ca în regulă cantitatea produsului în unitate de timp să fie acelaș. În primele 10—15' putem privi ca constantă cantitatea de enzimă. Din cercetările lui Bansi, Ucko reese că reacțiunea în primele 10' decurge linear, deci produsul în acest caz este direct proporțional cu timpul

$$p = k \cdot t \quad (k = \text{const}) \quad 1 \dots \dots \dots 1 \quad 1)$$

1) Dacă diferentiem această ecvație după timp avem

$$\frac{dp}{dt} = k \quad \dots \dots \dots 2.$$

Deci viteza reacțiunii  $\frac{dp}{dt}$  este astfel o constantă (Curbele pro-

Deci reese (vezi 6) că rădăcina patrată a cantității de produs de oxidare este drept proporțional cu accelerația reacțiunii (legea lui Schütz). Ultima ecuațiune (6) conține două constante: a, k. Factorul a arată că la schimbarea cantității de enzimă și a substratului (în anumite limite) variarea cantității de  $H_2O_2$  pentru un anumit preparat este constantă. Acest factor va fi influențat prin Ph și schimbarea condițiilor de temperatură; crește cu ridicarea temperaturii și a concentrației ionilor de Hidron (la un Ph mai acid constanta va fi mai mare ca 2). Când avem concentrații mici de  $H_2O_2$  (10—20 mgr.  $H_2O_2$  0,5 gr. substrat la 400 cc. de apă), factorul a rămâne constantă. Dacă crește cantitatea de  $H_2O_2$  asupra unei limite, atunci unghiul de depărtare va fi mai mic. Deci prin concentrația puternică de  $H_2O_2$  obținem o puternică inhibare a reacțiunii (a de obicei e 1, 7—1, 2). Factorul k a produsului de oxidare este proporțional cu cantitatea de fer-

ductului de oxidare sunt parabolice la met. cu gaiacol). Forma parabolică a curbelor obținute cu diferite cantități de substrat trebuie să fie în legătură cu o funcțiune exponențială, deci

$$\lg . p = \frac{1}{a} \log . t + \log . k \dots \dots \dots 3.$$

1—a = tangenta unghiului înclinat, log. k = cantitățile de pe ordonată, astfel

$$p = k \cdot t \frac{1}{a} \dots \dots \dots 4.$$

k ca produs pentru timp e egal cu 1 după timp diferențiat

$$\frac{dp}{dt} = \frac{k}{a} \cdot t a \frac{1}{a} - 1 \dots \dots \dots 5.$$

$$t \frac{1}{a} = \frac{p}{k} \quad t = \left(\frac{p}{k}\right)^a \text{ înlocuit în 5}$$

$$\frac{du}{dt} = \frac{k \cdot p^{1-a}}{a \cdot k^{1-a}}$$

$$\frac{dp}{dt} = \frac{k^a}{a} \cdot p^{1-a} \quad \text{sau} \quad \frac{dp}{dt} = \frac{k^a}{a} \cdot \frac{1}{p^{1-a}} \dots \dots \dots 6.$$

ment și se schimbă cu variația cantității de  $H_2O_2$  și de substrat, se mărește până la un maximum<sup>1)</sup>).

Arhenius a clarificat regula lui Schutze în felul că accelerația reacțiunii nu depinde numai de cantitatea moleculelor de substrat ne oxidate, ci în acelaș timp este proporțional și cu cantitatea de produs oxidat. Arhenius a găsit accelerația de saponificare a esterului acetic în exces prin micii cantități de  $NH_3$  ecuația :

$$\frac{dp}{dt} = k \cdot \frac{A-p}{p}$$

Această acțiune se deosebește de reacțiunile monomoleculare numai prin numitorul  $p$  este identică cu

$$\frac{dp}{dt} = \frac{k^2}{2} \cdot \frac{1}{p}$$

legea lui Schutze, după diferențierea de timp. Deci regula lui Schutze se poate defini mai bine că inhibarea rapidității reacțiunii este proporțional cu cantitatea produsului de oxidare. Decurgerea reacțiunii peroxidazice este caracterizat prin aceea că inhibarea reacțiunii în acelaș sens este proporțional cu cantitatea produsului neformat. Dacă  $a = 1$

$$\frac{dp}{dt} = k \cdot \frac{1}{p} = k$$

Aceasta este identică cu ecuația funcțiunii lineare dintre timp și produsul de reacțiune

$$\frac{dp}{dt} = k$$

Dacă  $a = 2$  avem cazul regulei lui Schutze la care inhibarea poate fi în raport cu o reacțiune monomoleculară.

Dacă  $a = 1-2$  cele mai frecvente cazuri, atunci exponentul  $\frac{1}{a}$  a ecuației care exprimă raportul între timp și produsul de

1) Legea lui Schütz  $p = k \sqrt{t}$  după  $t$  diferențiat  $\frac{dp}{dt} = \frac{k}{2} \cdot \frac{1}{\sqrt{t}}$

înșă  $\sqrt{t} = \frac{p}{k} \frac{dp}{dt} = \frac{k^2}{2} \cdot \frac{1}{p}$ . Când  $a$  este egal cu 2, atunci avem ca și la 6.

reacțiune va fi ca și exponentul la isoterma de adsorbțiune a lui Freund.

Deosebirea dintre reacțiunile enzimatică și catalitice zace în următoarele puncte :

1.) La activitatea enzimatică tot oxigenul disponibil va fi transpus asupra substratului pe când la acțiunile catalitice de ex. a combinațiilor de fer, o parte din oxigen va fi numai transpus asupra substratului și o parte va fi reținut de combinație însuși.

2.) La acțiunea enzimatică Ph optimum punctul isoelectric activitate optimă se coincid pe când la oxihemoglobină de ex. la punctul isoelectric a substanței colorate, Ph 6,8 numai 50 % din puterea maximală a substanței este prezent.

Willstätter și Pollinger constată că cantitatea și product de reacțiune este proporțional cu cantitatea de hemoglobină și curba de activitate este analog cu curba isotermei de adsorbțiune, cum se observă în acțiunea enzimei când  $a = 1,2-1,7$ . Kataliza hemoglobinei se pare independent de tensiunea superficială și ceea ce este foarte interesant după Lipschitz cu metoda de hidroxilamină că formarea de  $NH_2$  este independent dacă avem o soluție de oxihemoglobină 10—40—100 la sută.

Kuhn și Braun în cercetările asupra activității  $O_2Hb$  și  $CO_2Hb$  cu acestor KJ ajung la concluzii contrare cu Lipschitz, anume este proporționalitate între cantitatea de hemoglobină și produsul de oxidare, conc. de peroxid este determinant în acțiunea peroxidazică a hemoglobinei, însă concluziunea curioasă, la care ajung acești autori, este că activitatea ar fi independentă de concentrația substratului ceea ce la enzimă este chiar contrarul. Tot după acești autor acțiunea  $CO_2Hb$  nu ar fi diferită de a  $O_2Hb$  și anume că în  $CO_2Hb$  s'ar face un loc pentru  $H_2O_2$  prin dare la o parte a  $CO_2$ -lui. Toate aceste concluziuni sunt a se revedea pentru că după toate presupunerile nu este mare diferență în activitatea enzimei și a hemoglobinei, diferența este numai cantitativă. Este știut de Bohr că în sânge avem de a face cu mai multe hemoglobine,  $\alpha$ ,  $\beta$  și  $\gamma$ , cari ar fi caracterizate prin diferită adsorbțiune diferit conținut de fer și diferită putere de absorbție față de oxigen. După Küster în sânge două feluri de hemoglobină: Aa și Bb cari s'ar deosebi prin aceea că grupul carboxil în Aa este legat puternic, iar în Bb e legat mai slab; dacă aceasta este adevărat, atunci putem explica observația lui

Kuhn că  $\text{CO}_2\text{Hb}$  are aceeași acțiune peroxidazică ca și  $\text{O}_2\text{Hb}$ ,  $\text{CO}_2$  din forma Bb este slab legat și de fapt prin îndepărtarea ușoară se face loc  $\text{O}_2$ -lui. Se știe mai departe că între Hbina adultului și a copilului este o diferență care constă în aceea că Hbina copilului este mai rezistentă față NaOH ca cea a adultului, aceasta datorită faptului că în sângele copilului am avea două Hbini: una mai rezistentă și alta mai puțin rezistentă, la adult forma rezistentă ar lipsi, acțiunea peroxidazică a sângelui copilului față de cea a adultului ar fi interesant de studiat.

Am expus diferitele procese enzimative și catalitice, în cari am constatat că toate reacțiunile se pot reduce la acțiunea ionilor, accelerația noțiunii este proporțional cu concentrația unei anumite cantități de ioni. Forma în care enzimele acționează — după Michaelis — va fi determinat prin concentrația ionilor de hidrogen deoparte la punctul isoelectric de altă parte la acțiunea optică.

## Importanța determinațiilor activității peroxidazice.

În cercetarea fermenților unui organ avem de a face cu două feluri de enzime:

- enzimele cari acționează asupra metabolismului organismului și cari se găsesc în toate organele;
- enzimele cari sunt specifice țesutului.

Sângele nu conține fermenți specifici, el conține fermenții cari obvin accidental în curentul sanghin, iar prezența de oxidaze nu este o particularitate a sângelui, ea fiind un caracter al oricărui țesut.

Incontestabil că elementele albe conțin proteoză lipază peroxidază etc. aceasta este în legătură cu originea lor. Împărțirea enzimelor între ser și corpusculi e foarte variatică, cele mai multe sunt legate de elemente albe și celule organice. Hemoglobina legată de elementele roșii are funcțiunea peroxidazică cea mai bogată din sânge, funcțiune legată de metabolismul general. Limfa conține puține enzime. În lichidul cefalo-rachidian fermenții lipsesc complect și dacă se găsesc sunt în legătură cu elementele figurate și Marfan aplicând tehnica lui Bourquelot (pentru peroxidaze) demonstrează indirect prezența polinuclea-



relor. În ficat mușchi lapte se găsește catalaza și oxidaze. În piele să găsește oxidaza care acționează numai asupra difenolor (adrenalin). Tumorile melanosarcomatoase conțin oxidaze în raport cu formarea de pigment. După Zlatarow (1930) mărirea zincului este o apărare a organismului contra chimismului anormal și exaltat a celulei canceroase și constă:

- 1.) modifică influența exaltată a enzimei proteolitice;
- 2.) se opune la catalază;
- 3.) stimulează acțiunea mărită a peroxidazelor;
- 4.) se opune la mărirea activității coloidale a țesutului canceros intinerit. După Andriewitsch sărurile de zinc influențează foarte mult peroxidazele, la fel manganesul după Delbet. Cercetarea fermenților în mod normal sau patologic asupra organismului human este în curs de un mare număr de autori. Scopul determinării valorii peroxidazice a sângelui — pentru care am pus la punct metoda cu gaiacol — este de a urmări sângele în stare normală sau patologică, după valoarea lui funcțională și nu după indicațiunile morfologice sau chimice cantitative, cari nu sunt suficiente. Sângele poate prezenta caractere morfologice normale și poate fi vicinat în funcțiunea sa care nu este totdeauna în legătură cantitativă cu elementele chimice cari se găsesc în mod normal. De ex. un sânge anemic din punct de vedere morfologic poate fi normal sau puțin alterat pe când materia colorantă poate să fie mai puțină, după cum cu materia colorantă în cantitate corespunzătoare normalului poate avea o acțiune peroxidazică mai slăbită de ex. prin mărirea puterei catalazice. Deci nici ni aceste noțiuni nu vom putea avea noțiuni importante numai din determinare unei acțiuni, ci după valoarea și raportul diferitelor putințe de reacțiune enzimatică, vom putea să stabilim un tablou fidel asupra adevăratei activității a elementelor sângelui.

Lucrarea se va încheia cu partea experimentală asupra determinării valorii peroxidazice a sângelui cu acceptor de gaiacol urmând să pun la punct afară de această metodă alta convenabilă pentru urmărirea rezultatelor și compararea lor, iar pe urmă a studia fermentul care este în legătură tot cu substanța colorată sanghină, adică puterea catalizică din a căror raport cred că voi putea avea un indice funcțional asupra materiei colorante a sângelui.

## Partea experimentală.

Pentru scopul ce l-am propus, determinarea valorii peroxidazice, mă servese de metoda cu acceptor de gaiacol, care prezintă din mai multe puncte de vedere avantajii asupra celorlalte metode.

Determinarea cu piragalolul nu se poate face precis, numai gravimetric ceea ce este dificil prin timpul care se consumă la determinare.

Piragalolul se oxidează lesne la aer în produși cari se asca-mână cu purpurogalina. Colorimetric metoda cu piragalolul este nesigură din cauza evaporării soluției de purpurogalină în eter.

Acceptorul krezol dă un amestec variabil de produși de oxidare cari încurcă colorimetrarea. Metoda cu acceptor de verde de malachit este inconvenientă cu cantitățile mici de sânge cu care lucrăm oxidându-se cu greu, obținem o nuanță prea slabă pentru comparare.

Metoda cu gaiacol în determinarea valorii peroxidazice mi-a dat rezultate foarte convenabile comparând gaiacolul oxidat (tetra gaiacol) cu testul preparat de Engelhardt în proporțiile următoare:

50 c. c. nitrat de cobalt 10 %.

1,2 c. c. bicromat de potasiu 5 %.

În cazul când ouloarea obținută nu este analoagă cu cea a gaiacolului oxidat adăugăm din una sau cealaltă soluție până la obținerea analogiei.

Principiul este bazat pe crearea de curbe empirice corespunzând la produsele de oxidare a cantităților variabile de gaiacol.

Pentru oxidarea gaiacolului avem nevoie de un preparat de peroxidază care nu este nevoie să fie prea pur și care se poate obține prin metoda lui Bach-Chodat sau Stoecklin. Această peroxidază pregătită o întrebuițăm în soluție de apă nu prea diluată. Peroxidul de Hidrogen se procură în concentrație de 0,5 %, iar gaiacolul în soluție de 1 %.

În acelaș timp facem 3 diluți din soluția de test Engelhardt :

a) 1 : 10 = test 2;

b) 1 : 5 = test 1;

c) 1 : 2,5 = test  $\frac{1}{2}$ .



Care datorită diferitelor intensități de culoare, ne vor servi la compararea culorii obținută prin oxidarea de gaiacol care se potrivește mai bine.

Luăm cantități de gaiacol 0,1 mlgr.—3 mlgr. și cari le vom completa în felul următor:

1. 0,1 c. c. gaiacol 1%,  
0,4 c. c. sol. de peroxidază,  
0,1 c. c.  $H_2O_2$  0,5%,  
29,4 c. c. apă bidistilată.

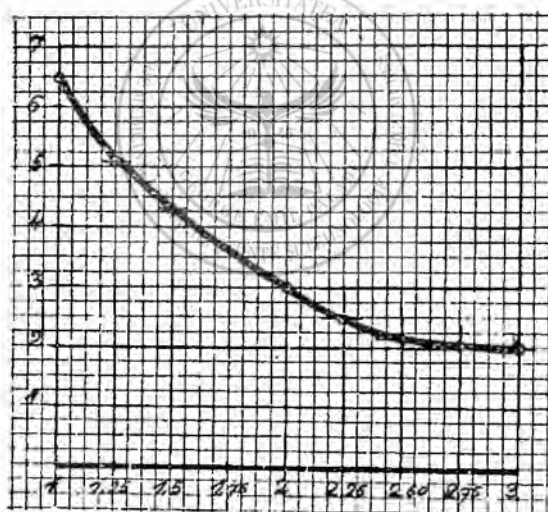
2. 0,15 c. c. gaiacol 1%,  
0,4 c. c. peroxidază,  
0,1 c. c.  $H_2O_2$ ,  
29,35 c. c. apă bidistilată.

etc.....

În aceste proporțiuni vom face diluții de jumătate în jumătate mlgr. de gaiacol ca întreaga cantitate de mediu să fie 30 c. c. (este foarte important ca Erlenmayer-ile să fie special curățite și din sticlă de Jena, spălate cu apă bidistilată). Oxidarea gaiacolului se face la temperatura constantă de 25 grade și culoarea obținută după 10 minute, se compară în colorimetrul Dubosq cu una dintre soluțiile test cu care se potrivește mai bine. Culoarea obținută depinde de cantitatea de gaiacol întrebuințată și fața de care e în funcțiune lincară, a cărei factor e mai mic ca 1. De ex. culoarea obținută cu cantitățile dela 0,1—0,8 mlgr. gaiacol se vor putea compara cu testul 1 : 10, iar cantitățile între 0,8 mlgr.—1,8 mlgr. la testul 1,5, în orice caz se prepară diferențele de înălțime dintre test și soluțiile de analizat între 4 și 10, de ex. cantitatea de 0,8 mlgr. de gaiacol în cazul când punem testul la diviziunea 10 este 4, iar cu testul 1 : 5 este 8,4, aceasta din urmă este mai ușor colorimetrabil. Colorimetrarea se face mai bine la lumina zilei (norii albi), decât la cea electrică, și este mai fină cu oglinda decât cu sticla lăptoasă. Culoarea obținută cu cantitățile mici de gaiacol se intensifică cu mult mai încet decât cantitățile mari de gaiacol (cantitățile mai mici se oxidează mai încet), de ex.: Cu 0,1 mlgr. de gaiacol după 5 minute obținem o culoare care nu este comparabil cu testul 1:10 așezat la diviziunea 10, după 10' soluția de analizat va fi analog la diviziunea 40. La fel cu celelalte cantități, chiar dacă oxi-

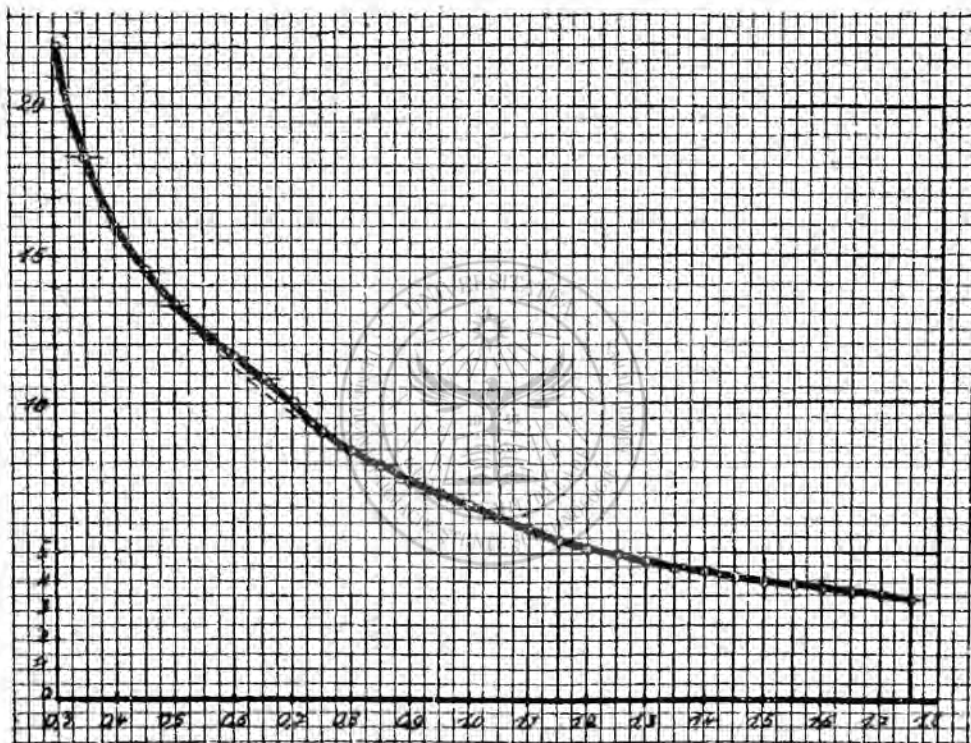
darea se face mai rapid, însă oxidarea maximă nu se ajunge în mediu decât după 10'. Ca atare în loc de 5' precum și la sânge am fixat timpul de oxidare la 10 minute. După 30' în mediu sol de gaiacol oxidat trece într'o culoare roșietică.

Inălțimile de culori obținute cu lichidul de analizat le vom înscrie pe ordinață, iar cantitățile de gaiacol pe abscisă astfel vom obține o curbă parabolică care denotă funcțiunea exponențială a activității peroxidazice. Mai departe știm că produsul de oxidare în timp relativ scurt, în concentrații mici de ferment de substrat este proporțional cu concentrație de ferment ca atare cantitatea de produs de oxidare într'un preparat va fi cantitatea care măsoară concentrația de ferment. Această concentrație va fi exprimat prin „Gaiacol Zahl“ și diferitele preparate se vor asemăna între ele după valoarea de gaiacol.

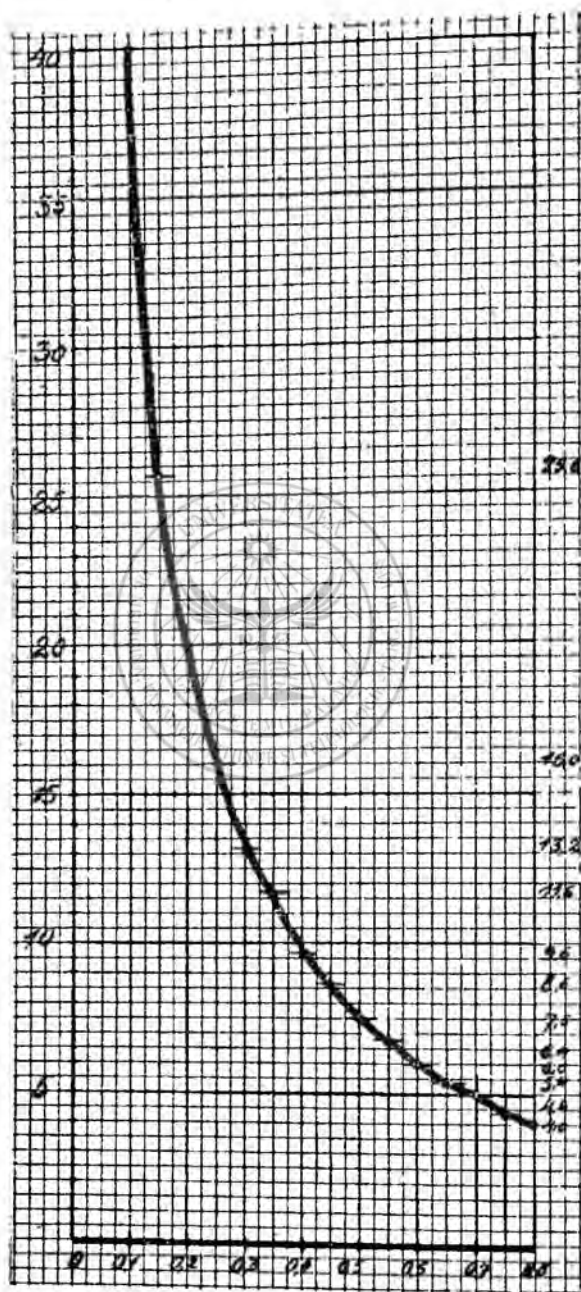


Test 1 : 2,5  
Test fix la div. 10.

Bineînțeles că aceste curbe vor varia foarte mult cu proporția de compus din test, ca atare pentru diferitele proporții vom avea diferite curbe. După aceste curbe este foarte ușor a exprima valoarea de gaiacol a unui preparat nu avem decât să punem o parte din enzima de analizat la probă în condițiunile de sus, după zece minute vom face comparația cu un test con-



Test 1 : 5. Test fix la div, 10.



Test 1 : 10, Test fix la div. 10.

venabil și vom găsi că cele două culori vor fi egale la o anumită diviziune ne uităm în tabelă la înălțimea de culoare corespunzătoare și cetim depe abcisă cantitatea de gaiacol oxidat care dă această culoare, care este valoarea de gaiacol a preparatului.

Această metodă cu acceptor de gaiacol, care a fost întrebuințat de Bach și Zoukkowa pentru determinarea valorii peroxidazice a sângelui și de Ucko și Bansi pentru studiul peroxidazelor vegetale, prin acest fel se poate foarte ușor aplica la determinarea valorii peroxidazice a sângelui.

În ceea ce privește determinarea valorii peroxidazice a sângelui primul inconvenient este culoarea proprie a sângelui care este însă ușor de îndepărtat și anume: dacă luăm dintr'o soluție homolizată 1 : 20 0,2 sau 0,1 cc. de sânge în cantitatea totală a mediului de determinare, vom obține o slabă culoare în galben palid a mediului fără ca reacțiunea colorată, care se va produce să fie slabă. Deci vom utiliza sângele în diluție de 1 : 20 din care luăm 0,1 sau 0,2 cc. Cantitățile de sânge trebuiesc măsurate cu mare exactitudine pentru că produsul de reacțiune este strict proporțional cu cantitatea de sânge.

Sângele pentru determinarea va fi încoagulat ce se obține cu anticoagulante, cum este citratul-oxalatul-florura de Natriu sau prin defibrinarea prin perle și agitare. Reacțiunea peroxidazică nu este deosebită după anticoagulantul întrebuințat. În cazul când luorăm cu mici cantități pentru o singură determinare se poate lua sângele prin înțeparea unui deget și imediat hemolizat la diluția de 1 : 20.

Reacțiunea peroxidazică a sângelui nu se începe fără adăugare de o anumită cantitate de ac. acetic 1 % prin care schimbăm Ph-ul mediului în așa fel ca să fie acid care condițiune este indispensabilă pentru reacțiunea peroxidazică cu acceptor de gaiacol.

Dacă facem o serie de concentrațiuni de ac. acetic 1 % dela 0,15 cc. până la 1,7 cc. în mediu total de 5 cc. gaiacol 1 %, 0,1 cc. de sânge 1 : 20 completat cu apă bidistilată până la 30 cc., vom constata că reacțiunea peroxidazică este optimă în acele diluții unde ac. acetic 1 % este în cantitatea de 0,35—0,7 cc. Dacă determinăm Ph-ul acestor amestecuri, la cromocionometrul lui Dr. Abt. găsim Ph-ul corespunzător la aceste concentrațiuni 4,1—4,5, un Ph mai acid decât Ph-ul optim dela plante, după Ucko—Bansi. Acest exemplu servește ca dovadă că Ph-ul unei enzime sau

biocatalizator nu depinde de enzimă, ci de reacțiunea enzimatică. În determinările noastre luăm 0,5 cc. de acetic 1% pentru potrivirea Ph-ului.

Concentrațiunea de peroxid de hidrogen față de cercetările făcute asupra sângelui total nu au aceeași importanță ca și cu oxihemoglobina cristalizată, după Willstätter. Eu găsesc că enzima este mult mai sensibilă față de concentrațiuni de peroxid ca sângele, bineînțeles sângele este un complex de elemente cari toate intervin în echilibrarea de concentrațiune de hidrogeni ioni. Dacă încercăm acțiunea peroxidazică a unei cantități de 0,1 cc. sânge 1 : 20 cu diferite cantități de  $H_2O_2$  vom vedea că produsul de oxidare este proporțional numai până la o limită cu concentrația de peroxid, după care proporțiune constatăm excesul de peroxid și reacțiunea mai intensă, iar dela concentrația 40 mgr. de  $H_2O_2$  constatăm că concentrațiunea de  $H_2O_2$  în exces devine nocivă față de reacțiune.

Iată cantitatea produsului de oxidare cu diferite cantități de  $H_2O_2$  (sânge 0,1 cc. dil. 1 : 20) :

$H_2O_2$ în mgr.	Cantitatea de gaiacol oxidat
200	0,45
150	0,5
100	0,55
80	0,65
60	0,65
40	0,7
30	0,95 (optim)
20	0,9
10	0,85.

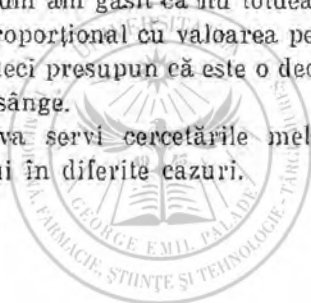
Deci pentru proporțiunile optime de determinare a valorii peroxidazice a sângelui cu acceptor de gaiacol sunt următoarele:

- 0,1 cc. de sânge 1 : 20;
- 0,5 cc. ac. acetic 1% ;
- 6,0 cc.  $H_2O_2$  0,5 %
- 5,0 cc. Gaiacol 1% ;
- 18,4 cc. Apă bidistilată.



După 10 minute la temperatura de 25 grade comparăm culoarea obținută prin oxidarea gaiacolului cu una din țesuturile de mai sus cu care se potrivește cel mai bine, de obicei test 1 : 5. Înălțimea lichidului de analizat la egalitate de nuanțe se va citi în tabelele dinainte construite și vom avea valoarea de gaiacol (Gaiacolzahl) a sângelui. Această valoare este direct proporțională cu cantitatea și concentrația de ferment, adică cu cantitatea și concentrația de oxihemoglobină, ca atare după cum au găsit mai mulți autori, determinarea valorii peroxidazice a sângelui este determinarea cantității de oxihemoglobină fără ca în realitate să fie acelaș. Nu am determinat încă o serie de cercetări cari le-am făcut determinând cantitatea de oxihemoglobină și valoarea peroxidazică a sângelui, însă până acum am găsit că nu totdeauna cantitatea de oxihemoglobină este proporțională cu valoarea peroxidazică a aceleiași probe de sânge, deci presupun că este o deosebire funcțională a diferitelor probe de sânge.

Această metodă va servi cercetările mele asupra valorii peroxidazice a sângelui în diferite cazuri.



## Concluzii.

1.) Prin metoda cu acceptor de gaiacol se poate determina valoarea peroxidazică a sângelui.

2.) Prin această metodă primele determinări indică că, 0,05 cc. de sânge normal oxidează aproximativ 0,95 mgr. de gaiacol.

3.) Metoda poate servi pentru studierea puterii oxidative a sângelui în diferite stări normale sau patologice.

4.) Valoarea peroxidazică a sângelui este proporțională cu cantitatea de oxihemoglobină; dacă această proporționalitate persistă atunci se poate utiliza în loc de determinarea oxihemoglobinei pentru interesul clinic.

5.) Cercelările confirmă opinia deja emisă că Hemoglobina este analoagă cu peroxidaza.

6.) Concentrațiile de  $H_2O_2$  asupra activității peroxidazice a sângelui nu au aceeași influență ca și asupra activității peroxidazice a oxihemoglobinei cristalizate cu acceptor de pirogalol studiat de Willstätter.

Văzut și bun de imprimat.

Cluj, 18 Oct. 1930.

Președinte :  
PIERRE THOMAS.

Decan :  
VICTOR PAPILIAN

## Bibliografie.

*E. Agasse—Lafont*: Les applications pratiques du laboratoire à la clinique.

*Allendy*: Orientation des idées médicales.

*Al. Andriewitsch*: Propriété péroxidazique des sels du zinc. Bull. Société de chimie biologique. I. XII. 1930, Nr. 1.

*Anthony*: Droits et forces.

*Hans Aron*: Über Lichtabsorption und dem Eisengehalt des Blutfarbstoffes. Bioch. Zeitschrift. 1907. 3.

*Bach și Zaubkova*: Valeur enzymatique du sang. C. R. + 170, p. 967. 1920.

*M. W. Bansi, H. Ucko*: Über peroxidaze. I—IV. Mitteilungen. Hoppe Seyler's. Zeitschrift für Physiol. Chemie. 1926. 157—58, 159—60, 164, 169.

*Battelli, L. Stern*: Über peroxidazen der Tiergewebe. Bioch. Zeitschrift, 1908. 13.

*Lucie Buelow*: Zur Kenntnis des Hipophyzen enzyme. Bioch. Zeitschrift. 54. 1913.

*H. Calmette*: Manuel technique de Microbiologie et sérologie. 1926.

*R. Chodat, A. Bach*: Über peroxidaze. Compar Abstract. 1093. 2. 219. 378.

*R. Chodat*: Darstellung und Nachweis von Oxidase und Katalaze pflanzlichen und tierischen Herkunft. Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden. Abt. IV. Teil I. Heft. I.

*H. Euler, H. Nilsson*: Caractères mendélien des enzymes.

*H. Euler, I. Bolin*: Zur Kenntnis biologisch wichtigen Oxidationen. III. Abteil. Hoppe Seyler's. Zeitschrift für physiolog. chemie. 61.

*S. Gräff*: Die micro-morphologischen Methoden der Fermentforschung in tierischen „und pflanzlichen“ Organismus.

Handbuch der biologischen Arbeits-Methoden. Abt. IV. Teil I. Heft. I.

W. Grassmann: Neue Methoden und Ergebnisse der Enzymforschung, 1928.

I. Grüss: Die Kapilarisation zur Untersetzung micro-chem. Arbeitung. Handbuch der biologischen Arbeits-Methoden. Abt. IV. Teil I. Heft I.

I. B. C. Halgane: Classification des enzymes Natur. 1928. 121.

Adolf Solles, M. Oppenheimer: Blood ferments. Chemie Zentralblatt. 1905. 2. 1695.

Kasanski: Über abtrennung der Peroxidaze von der Katalaze. Bioch. Zeitschrift, 1912. 39.

O. Kirchner, H. Nagel: Oxidations ferment in bac. Coli. Streptococcus und Stafilococcus. Biochem. Zeitschrift. 1926. 174.

Kulljugin: Peroxidatische und Katalitische Wirkung. Oxihemoglobins. Bioch. Zeitschrift. 1926. 167.

W. Kuster: Über Wertigkeit Eisens in Blutfarbstoff.

Hoppe Seyler's Zeitschrift für physiolog. Chemie. 71.

E. Lambling: Precis de biochimie.

Werner, Liepschietz.: Katalize von Oxidoreduktionen durch die Blutfarbstoffe. Hoppe Seyler's. Zeitschrift für physiologische chemie. 145—146.

A. Lomy și Baltarow: An Introduction to organic Chemistry, p. 353.

Madelung: Über Beziehung der Hämoglobin-derivate und Peroxidaze zur anorganischen Katalizatoren. Hoppe Seyler's. Zeitschrift Physiologische Chemie. 55.

Micheliu și Kopielovici: Oxidations Fermente in Phanerogame. Biochem. Zeitschrift. 1929. 208.

V. Mielke: Oxidationsenzyme in Blutkörperchen Klin. Wochenschrift. 1925. 4. 2201.

H. Morel: Precis de Technique Chimique.

K. Nauberg, K. Oppenheimer: Nomenclatura enzimelor Biochem. Zeitschrift. 1926. 166.

K. Nauberg: Enzimproblem. Zeitschrift für phiziol. Chemie. 1926. 157.

A. Neumann: Chemische Zentralblatt. 1927. 2686.

M. Onaka: Oxidationen in Blut. Zeitschrift für phisiol. Chemie.

K. Oppenheimer: Enzymforschung, 1927.

*W. Ostwald*: Über Lichtempfindlichkeit tierische Oxidaze und über die Beziehungen dieser Eigenschaft, zu dem Erscheinungen des tierischen. Photothrophismus. *Biochim. Zeitschrift*. 1908. 10.

*Palladin*: Die Atmungsspigmente der Pflanzen. *Hoppe Seyler's Phziol. Chemie*. 1908. 50.

*V. Sadikov*: Actiunea curentului electric asupra enzimelor. *Bul. Acad. U. R. S. prin British Chemical Abstracts*.

*R. Sbarski*: Peroxidazen in Milch. *Biochem. Zeitschrift*. 1925. 164.

*B. A. Smorodincer*: *Bul. Acad. U. R. S. Nomenclatura fermentilor*.

*Thomas P.*: *Cours de Chimie biologique. T. I—II*.

*Thomas P.*: *Guide pour les manipulations de Chimie biologique*.

*O. Warburg*: Zelloxidationen *Zeitschrift für Phisiol. Chemie*. 1910. 69.

*P. Weil, M. Bloch*: *Maladie du sang. et des organes hématopoetique*.

*Ville I. Moitlessier*: Peroxidase du sang. *Bul. Soc. Chimie-biologique*. 1902. 30.

*Willstätter, H. Weber*: Über Peroxidaze. *Anal.* 1906. 449.

*Willstätter, A. Pollinger*: Über der Peroxidatische Wirkung. Oxihemoglobins. *Hoppe Seyler's Phisiol. Chemie*. 130.

