

je. We wszystkich takich przypadkach następuje w mniejszym lub w większym stopniu zaburzenie w przesuwaniu się mas pokarmowych i gazów, wskutek czego powstaje atonia przedżołądków.

Nagle zatkanie kulami włosianymi otworów między przedżołądkami lub odzwiernika spotyka się przeważnie u cieląt lub owiec, rzadziej natomiast u zwierząt dorosłych. Występuje przy tym silne wzdęcie brzucha, niepokój i stękanie zwierzęcia, a nawet ruchy wymiotne, przy których zatykająca kula włosiana może być wyrzucona na zewnątrz przez jamę gębową, co prowadzi do szybkiego wyzdrowienia. — W przeciwnym wypadku występuje ucisk gazów, przyspieszenie tętna oraz oddechów i szybka śmierć zwierzęcia. Dla rozpoznania ma wielkie znaczenie nagłe pojawienie się wzdęcia przy podejrzeniu możliwości występowania w żołądku kul włosowych wzgl. roślinnych. Objaw ten jest zwłaszcza wówczas ważny, jeżeli przed jego zaistnieniem zaobserwowano objawy lizowości u zwierzęcia lub w czasie wymiotów zostały wyrzucone kule wzgl. wychodziły z odchodami.

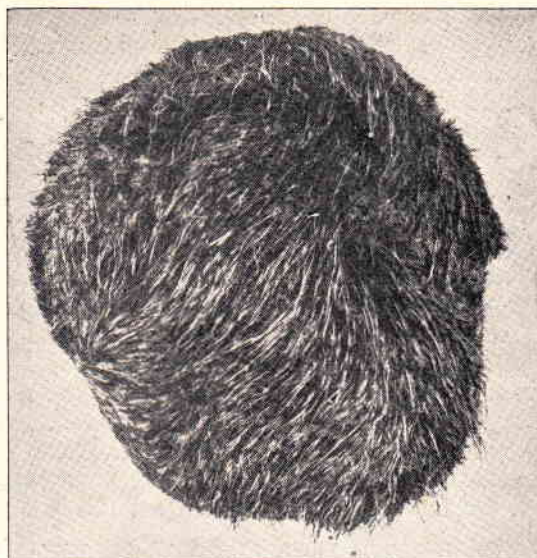
Przypadek własny

Przypadek, który obserwowałem ostatnio w październiku 1955 r., dotyczył cieliczki 4-mies., czarno-białej, własność spółdzielni produkcyjnej w S. Cieliczka była chowana wraz z byczkiem 3 mies. i obie sztuki nawzaajem się lizały. Nagle u cieliczki wystąpiło silne wzdęcie. Po zastosowaniu ruminolu, masażu słabizny i odpowiedniego ustawienia wzdęcie ustąpiło. Badanie detektorem wykłuczyło obecność metalicznego ciała obcego. W następnych dniach wzdęcie powtórzyło się, a zastosowanie oleju rzepakowego do wewnątrz złagodziło stan chorobowy. Po 2 tyg. wystąpiło wzdęcie tak gwałtowne i połączone z tak silną dusznością, że musiano sztukę dobić bez dokonania punkcji żwacza.

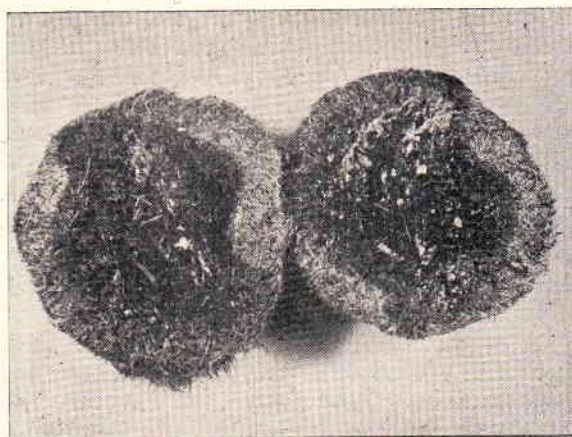
Po wezwaniu przeprowadziłem badanie poubojowe mięsa, które wykazało obecność w czepcu bezoaru w postaci kuli włosowej wielkości dużego jabłka (ryc. 1 i 2), co było powodem przypadłości żołądkowej.

Wnioski:

1) Bezoary u bydła objawiają się nagłymi, gwałtownymi wzdęciami, nie dającymi się wytłumaczyć skarmianiem pasz fermentujących. 2) Dla rozpoznania wielkie znaczenie ma ujemny wynik badania detektorem (wyklucza *reticulitis traumatica*) jak również występowanie wymiotów, obecność włosów w odchodach oraz uprzednio zaobserwowana skłonność do lizowości. 3) W razie podejrzenia obecności bezoaru należy zastosować punkcję żwacza, podawać w większej ilości oleiste środki przeczyszczające, jak olej rycynowy w odwarze siemienia lnianego w dodatkiem Rhiz. Veratri. Najpewniejsze jest chirurgiczne usunięcie bezoaru z żołądka poprzez rumenotomię.



Ryc. 1. Zaiłączone zdjęcie przedstawia zbitą kulę włosianą (bezoar) wielkości dużego jabłka wyjętą z żołądka jałówki



Ryc. 2. Powierzchnia przekroju bezoaru

Piśmiennictwo

- 1) Joest: Handbuch d. spez. pathol. Anatomie d. Haustiere T. I. 1926. 2) Myszkín: Bolezni krupnowo rogotowo skota. 1940. 3) Oppermann: Lehrbuch der Krankheiten des Schafes. 1929. 4) Orłowski: Nauka o chorobach wewnętrznych. Tom VI — narząd trawienia — 1952. 5) Zuliński: Przypadek pilobezoara w żołądku świni. Med. Wet. Nr 4, 1951.

Z PRAKTYKI LABORATORYJNEJ

JADWIGA JUŚKO-GRUNDBOECK

Metoda elektroforetycznego rozdziału białek surowicy*)

Z Zakładu Biochemii Instytutu Weterynarii w Puławach

Elektroforeza jest dziś nieodzowną metodą do rozwiązywania wielu zagadnień z dziedziny chemii fizjologicznej. Wysuwa się ona na czoło fizyko-chemicznych metod, przy pomocy których można scharakteryzować przede wszystkim białka, jak również cały szereg prostych

i złożonych związków chemicznych. Przy pomocy tej metody można przy zastosowaniu izotopowego P^{32} obserwować przemiany fosforowe w erytrocytach; określać poziom fosforu i żelaza. Elektroforezę zastosowano również do badania enzymów w różnych wyciągach. Przeprowadzono elektroforetyczną analizę β — glukuronidazy, badano przy pomocy tej meto-

*) Referat wygłoszony w dniu 20 grudnia 1956 r. na posiedzeniu PTNW i Tow. Przyr. im. Kopernika w Puławach.

dy cytochrom C, oddzielano aktywną hyaluronidazę od nieaktywnych jej zanieczyszczeń. Metoda ta posłużyła również Latnerowi i wsp. do określania poziomu wit. B₁₂. Hosoya analizował przy jej pomocy sulfonamidy. Również w immunochemii metoda ta znalazła szerokie zastosowanie. Gros przy użyciu waliny z C¹³ badał niektóre przeciwciała; Wieland i Wirth określali przy pomocy elektroforezy aktywność niektórych toksyn. Elektroforeza jest również zabiegiem technicznym, bez którego współczesna praktyka medycyny ludzkiej nie potrafiłaby się już obejść. Na łamach prasy zagranicznej i krajowej pojawiają się coraz liczniejsze doniesienia o przydatności elektroforezy w diagnozowaniu takich schorzeń, jak schorzenia wątroby, nerek, choroby nowotworowe. Elektroforeza używana jest do analizy surowicy krwi i płynu mózgowo-rdzeniowego.

Pojawiło się również szereg prac na temat rozdzielania elektroforetycznego białek surowicy zwierząt domowych. Z badań tych wynika, że przydatność elektroforezy do diagnostyki weterynaryjnej będzie prawdopodobnie bardziej ograniczona niż w medycynie ludzkiej. Wskazuje na to znaczna wariancja poziomu białek oraz poszczególnych jego frakcji w surowicach zdrowych zwierząt. Elektroforeza znajduje jednakże zastosowanie w naszych placówkach weterynaryjnych o charakterze badawczo-naukowym, służy pogłębieniu naszych wiadomości o mechanizmie walki ustroju z chorobami.

Praca niniejsza ma za zadanie przedstawić w miarę możliwości popularnie, najbardziej dostępną dla większości naszych pracowni technikę elektroforezy bibułowej białek surowicy.

Białko surowicy krwi nie jest substancją jednorodną chemicznie. Składa się ono z szeregu frakcji: albumin oraz globulin α , β , i γ , które różnią się własnościami fizycznymi, fizykochemicznymi i immunologicznymi. Doskonałą charakterystykę poszczególnych frakcji daje Choppard (4).

Największą ilościowo frakcją, bo stanowiącą około połowę białek surowicy są albuminy. Masa cząsteczkowa albumin = 69000. Na ich powierzchni jest duża ilość ładunków ujemnych, stąd największa ich ruchliwość w elektroforezie. Według badań Keckwicka (1948) albuminy nie są białkiem homogennym, składają się bowiem z trzech frakcji różniących się między sobą rozpuszczalnością, zdolnością krystalizacji i zawartością węglowodanów. Albuminy jako białko silnie zjonizowane odgrywają dużą rolę w buforowaniu krwi. Podobnie ważne znaczenie mają w utrzymywaniu objętości krwi, co wiąże się z ich dużym powinowactwem do wody.

Goldsteinowi (1949) i Bennholdowi (1950) udało się wykazać zdolność wiązania się albumin z różnymi związkami, jak alkaliczne i kwaśne barwniki, aromatyczne kwasy

karboksylowe, acetylowane aminokwasy, pochodne sulfonamidów, naftochinony, barwniki żółciowe, witamin C, K, P, glikozydy nasercowe, penicylina, chloromycetyna, streptomycyna i wiele jeszcze innych środków leczniczych. Z każdą substancją albumina wiąże się w różnym stopniu. Jeśli przekroczona zostaje ta zdolność, związki łączą się z globulinami, lub znajdując się wolne we krwi.

Alfa i beta globuliny zawierają dużo węglowodanów i lipidów. Edsall (1947) ekstrahował z α i β globulin następujące substancje: cholesterinę, barwniki żółciowe, fosfolipidy, kwasy tłuszczowe, rozpuszczalne w tłuszczach witaminy i hormony. Oestrogen znajduje się w 75% w lipidowej frakcji beta globulin. Ponadto frakcja ta wiąże miedź (β_1 globulin), żelazo (1 mg wiąże 0,38—1,25 Fe⁺⁺) i około $\frac{3}{4}$ trombinę tzw. protrombinę.

W 1936 r. Tiselius stwierdził niehomogenność γ -globulin. Whurmann, Wunderley i Nicola dowiedli później jeszcze raz przy pomocy precypitacji, adsorpcji w ultrafioletcie i wysalania, że γ -globuliny są białkiem niejednorodnym. Raubert (1947) rozfrakcjonował γ -globulin na dwanaście podgrup. Cann, Brown, Kirkwood rozłożyli bydlęcy γ -globulin na osiem składników. Dla γ -globulin przyjmuje się masę cząsteczkową równą 156.000. Spośród globulin α , β , globuliny γ wypadają z roztworu przy najmniejszym nasyceniu 33% (NH₄)₂SO₄. Wg Cohna we frakcji γ -globulinowej znajduje się 98% globulin odpornościowych. Dotychczas znaleziono w tej frakcji przeciwciała przeciw dyfterii, dyzenterii, paratyfusowi, tyfusowi, szkarlatynie i wielu innym chorobom.

Zwiększenie poziomu globulin odbywa się zwykle kosztem spadku albumin. Ma to miejsce przy ostrych i chronicznych stanach zapalnych, przy uszkodzeniu wątroby, nerek, układu limfatycznego, przy czym następuje charakterystyczny dla danego schorzenia wzrost jednej z frakcji. Np. przy schorzeniach nerek zwiększają się α i β globuliny, przy γ -plazmocytomie limfogranulomie zwiększają się γ -globuliny, przy β -plazmocytomie β -globuliny. Poziom γ -globulin wzrasta po przebyciu chorób zakaźnych.

Stąd ważne dla praktyki i nauki medycznej jest otrzymywanie poszczególnych frakcji białka surowicy. Można je uzyskać i oznaczyć wieloma sposobami. Cohn i współpr. frakcjonowali białko w różnym stężeniu alkoholu etylowego, w obecności określonych niewielkich stężeń elektrolitów. Proces cały przeprowadzano w niskiej temperaturze. Gornall (7) wysalał białko w punkcie izoelektrycznym siarczanem amonu w różnym nasyceniu. Wytrącone frakcje rozpuszczał w 1% chlorku sodu i oznaczał kolorymetrycznie przy pomocy reakcji biuretovej. Aull i Mc Card (10) zastosowali fosforan

potasu jednozasadowy w różnym stężeniu do wytrącenia poszczególnych frakcji, które ilościowo oznaczali fotometrycznie.

Obecnie do ilościowego oznaczania frakcji białkowych stosuje się coraz częściej metodę elektroforezy. Pod nazwą elektroforezy rozumie się wędrówanie jonów w roztworach wodnych w polu elektrycznym. — Rozróżniamy elektroforezę wolną i bibułową. Obie metody różnią się między sobą środowiskiem, w którym przebiega rozdział. Dla elektroforezy wolnej jest nim bufor, dla bibułowej matryca bibułowa nasyciona buforem.

Różne też są sposoby ilościowej oceny otrzymanych frakcji. W elektroforezie wolnej stężenie frakcji oznacza się na podstawie współczynnika refrakcji, który da się rejestrować fotograficznie, zaś w elektroforezie bibułowej ocenia się ilość otrzymanych w rozdziale frakcji na podstawie zdolności adsorbowania przez nie barwnika. Przy porównywaniu obu technik należy zwrócić uwagę i na to, że przy wolnej elektroforezie uzyskuje się całkowite wydzielenie obu składników.

W zależności od ilości użytego białka mówi się o:

makroelektroforezie — 100 mg suchej substancji białka,
półmikroelektroforezie — 10 mg suchej substancji białka,
mikroelektroforezie — 1 mg suchej substancji białka.

Odpowiada to przy 5% białka w surowicy krwi 2 ml surowicy dla makroelektroforezy, 0,2 ml dla półmikro i 0,02 ml dla mikroelektroforezy.

Makroelektroforezą jest klasyczna elektroforeza Tiseliusa — elektroforeza „wolna”. Na aparacie Tiseliusa oparta jest aparatura Zeissa. Białko, to znaczy surowicę krwi daje się do rurki w kształcie litery U (o różnej średnicy w zależności od typu aparatu), w której jednym ramieniu znajduje się roztwór buforowy o pH 9,2 i sile jonowej 0,1. Nieco tego roztworu znajduje się również i ponad surowicą w drugim ramieniu rurki U. Do obu ramion przykładają się różnoimienne bieguny. Przez surowicę i bufor płynie prąd, o napięciu 100—215 V i natężeniu 10/20 mA, który w ciągu 2 do 3 godz. powoduje rozdział surowicy na frakcje. W aparaturze Zeissa uzyskuje się od razu wykres ramienia wstępującego i zstępującego rozdzielonych frakcji. Wykres taki interpretuje się później ilościowo przy pomocy planimetru. Podobne postępowanie zastosowali między innymi Deutsch i Goodle (5).

Opisana tu w skrócie metoda jest bardzo skomplikowana. Wystarczy powiedzieć, że dla pomyślnego przebiegu elektroforezy konieczny jest system chłodniczy, który wymaga osobno skonstruowanej chłodni. Aparaty do wolnej elektroforezy ze względu na osobne urządzenia

chłodnicze, termostaty, urządzenia elektryczne do regulowania napięcia i natężenia prądu, skomplikowane urządzenia optyczne do odczytywania rozdzielonych frakcji, są bardzo kosztowne i dlatego trudno dostępne wielu pracownikom naukowym. Znaczny koszt aparatury do wolnej elektroforezy, oraz konieczna duża ilość materiału do rozdziału zmusiły dość wcześnie różnych badaczy do szukania innych sposobów rozdzielania substancji w polu elektrycznym.

König i Kloubusitzky (1937 i 1939) zastosowali po raz pierwszy bibułę filtracyjną, jako matrycę do rozdziału w polu elektrycznym jadów węży i barwników. W 1948 roku. Wieland i Fischer zastosowali tę metodę do rozdziału białek, peptydów i aminokwasów. Poszczególne frakcje uwidaczniano specjalnymi barwnikami. W 1950 r. Tiselius i współpracownicy opisali dość szczegółowo metodę elektroforezy przy zastosowaniu bibuły filtracyjnej. Dalsze prace Tiseliusa, Turby, Cramera, Durum przyniosły szereg ulepszeń w tej dziedzinie.

Zaletą elektroforezy bibułowej jest prosta aparatura, mała ilość materiału do analizy, możliwość przeprowadzenia seryjnych oznaczeń, oraz uzyskiwanie poszczególnych frakcji w stanie nadającym się do dalszych oznaczeń. Wadą metody jest mniejsza dokładność oraz trudność bezpośredniego wymierzenia ruchliwości cząsteczek.

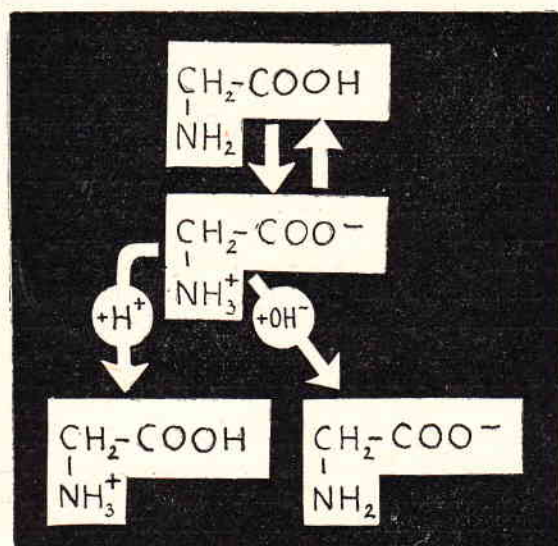
Zasada elektroforezy bibułowej jest taka sama jak i elektroforezy wolnej: rozdział pod wpływem prądu elektrycznego, białek, składających się z różnych frakcji, z których każda w danym roztworze, jakim jest stosowany do tych celów alkaliczny bufor, ma różną ilość ładunków ujemnych, warunkujących ich różną szybkość wędrówki.

Elektroforeza (jak już wspomniano) polega na ruchu drobin opatrzonych ładunkiem elektrycznym dodatnim lub ujemnym w polu elektrycznym. Elektroforeza białek zakłada zatem istnienie drobin białka elektrycznie nieobojętnych. Dla zobrazowania tego zagadnienia przedstawie zachowanie się cząsteczki aminokwasu glicyny w roztworze o różnym pH.

Glicyna w roztworach wodnych występuje jako dipol, to znaczy cząsteczka opatrzona różnoimiennymi znakami. W środowisku kwaśnym glicyna ma ładunek plus (jest formą kationową), w środowisku alkalicznym przeważa glicyna anionowa (tabl. I).

W cząsteczce białka aminokwasy $R-CH-NH_2-COOH$ łączą się ze sobą tworząc wiązania peptydowe $-CO-NH-$, ze znajdującymi się na zewnątrz łańcucha wolnymi grupami NH_2 i $COOH$. Oddziaływanie białek zależy od ilości wolnych grup karboksylowych $COOH$, lub aminowych NH_2 . Przy pewnym określonym stężeniu jonów wodorowych roztworu, grupy karboksylowe i aminowe są zdysocjowane w jednakowym stopniu, to znaczy

Tabl. I



ilość ładunków dodatnich jest równa ilości ładunków ujemnych. To stężenie jonów wodorowych, charakterystyczne dla każdego białka, zwane jest punktem izoelektrycznym. Wzajemny stosunek różnoimiennych ładunków, przewaga jednego z nich, na powierzchni cząsteczki białka określa rodzaj ładunku całej cząsteczki, a tym samym jej charakter. — Podana za Carpenterem (2) tabela wymownie ilustruje przytoczone fakty (tabl. II).

Tabl. II

Ruchliwość elektroforetyczna i punkt izoelektryczny 4 frakcji białkowych surowic normalnych

pH	ruchliwość w $\text{cm}^2/\text{volt}/\text{sec} \times 10^3$			
	albuminy	α -globuliny	β -globuliny	γ -globuliny
6.02	-4.60	-3.34	-2.55	+0.01
8.03	-7.15	-6.16	-4.20	-1.51
punkt izoelektr.	4.64	5.06	5.12	6.00

Ujemnie naładowane cząsteczki białka (formy anionowe) wędrują w polu elektrycznym do bieguna dodatniego (anody), przy czym szybkość poruszania się tych cząsteczek zależy od absolutnej ilości wolnych protonów lub elektronów.

Jeśli cząsteczka białka znajdzie się w roztworze o niższym stężeniu jonów wodorowych, niż jej punkt izoelektryczny, wtedy staje się ona kationem i wędruje w polu elektrycznym do bieguna ujemnego (katody).

Elektroforezę przeprowadza się z reguły w roztworze o pH dużo wyższym niż punkt izoelektryczny rozdzielanych białek. Wynika stąd, że białka w tych warunkach będą miały ładunek ujemny, a więc będą wędrowały do anody.

Zgodnie z działaniem pola elektrycznego ruch cząsteczek powinien zachodzić w kierunku zbliżonym do prostoliniowego. Jednakże spleciona błonnikowa kapilar tworzących bibułę sprawia, że ruch drobin białka jest nieregularnie falisty, wskutek czego szybkość wędrowania omawianych anionów jest dużo mniejsza niż to ma miejsce w elektrorezie wolnej. Bufor, w którym przebiega elektroforeza, stanowiący fazę zawieszającą koloidu białkowego posiada ładunek dodatni, wędruje więc do katody. Zjawisko to nosi nazwę elektroosmozy. Sama substancja bibuły naładowana jest ujemnie, stwarzając w ten sposób warunki do adsorpcji cząsteczek różnoimiennych.

Na ruch cząsteczek ma również wpływ zjawisko dyfuzji. Dzięki niemu np. próbka materiału nałożona na pasek pod postacią kropli, przyjmuje po pewnym czasie kształt smugi, leżącej w poprzek paska. Zasadnicze znaczenie dla dobrego rozdzielania się poszczególnych frakcji ma nawilgocenie paska bibuły. Już samo nałożenie próbki powinno nastąpić na niezbyt suchy i niezbyt nawilgocony pasek. W czasie elektroforezy należy utrzymywać stopień i równomierność nawilgocenia na stałym poziomie. Uzyskuje się to drogą odpowiedniego zanurzenia końców pasków w buforze, dobranie prądu o odpowiednim napięciu i natężeniu (zależne od tego tworzące się ciepło Joule'a wzmagają parowanie wody z pasków) a przede wszystkim zastosowanie szczelnej komory wilgotnej zapobiegającej parowaniu.

O ruchliwości cząsteczek białka oprócz ich ładunku decydują stężenie jonów wodorowych i siła jonowa roztworu, od której zależy przewodnictwo roztworu, oraz prąd cieczy przeciwny kierunkowi wędrowania białka, parowanie, osmoza, adsorpcja na bibule, i system kapilarny bibuły. O prawidłowym rozfrakcjonowaniu białka decydują w znacznym stopniu dwa komponenty: stężenie jonów wodorowych i siła jonowa roztworu.

Szersze omówienie aparatury używanej do elektroforezy bibulowej, środowiska w jakim odbywa się rozdział białka oraz sposobów ilościowej interpretacji rozdzielonych frakcji wydaje się celowe.

Aparatura konieczna do elektroforetycznego rozdziału białek składa się z:

1) Prostownika lampowego, który prostuje prąd płynący z sieci. Prostownik taki zaopatrzony jest w transformator, który pozwala na transformowanie prądu z napięcia 220 V do potrzebnego napięcia. Prąd wychodzący z aparatu kontroluje się na urządzeniach pomiarowych wmontowanych w prostownik.

2) Komory wilgotnej, wykonanej z akwarium, płyt winidurowych lub plexiglasu. Wewnątrz komory znajdują się naczynia na bufor połączone elektrodami węglowymi, platynowymi, lub sporządzonymi ze specjalnego metalu z prądem płynącym z prostownika. Najdogodniejsze

w stosowaniu są elektrody platynowe. Ze względów ekonomicznych często stosuje się elektrody węglowe, które muszą mieć jednak odpowiednio dużą powierzchnię, na co zwraca uwagę również Magas (16). Na każdy 1 mA natężenia prądu przepływającego przez układ wystarczy około 10 cm² powierzchni elektrody. Przy stosowaniu elektrod węglowych należy pamiętać o tym, że łatwo rozpylają się one w buforze, a ponad to na ich powierzchni gromadzą się produkty elektrolizy buforu.

W komorze znajduje się również dodatkowe naczynie na bufor, w którym zanurzone są arkusze bibuły do nawilżania komory. Wytworzona wilgotność ma zapobiegać nadmiernemu wysychaniu pasków, (zdolność przewodzenia przez pasek bibuły zależy bowiem od jego nawilgocenia).

3) Urządzenia do suszenia pasków w takiej temperaturze, w której nastąpi zdenaturowanie poszczególnych frakcji białkowych.

4) Aparatu do odczytywania pasków. Może nim być kolorymetr przy eluowaniu barwnych plam, lub fotoabsorpcjometr przy odczytywaniu współczynnika absorpcji wprost z zabarwionych pasków.

5) Planimetru do ilościowej interpretacji uzyskanych krzywych rozdziału.

Środowiskiem w jakim odbywa się rozdział białka w elektroforezie bibułowej jest, jak już wspomniano, bibuła i roztwór buforowy. Bibuła do elektroforezy musi odpowiadać pewnym warunkom. Nie może adsorbować białka, musi mieć taki układ kapilar, który pozwala na szybkie przesuwanie cząsteczek białka, a włókna celulozowe muszą być odporne na kwasy i zasady. Warunkom tym odpowiada bibuła z czystej celulozy alfa. W dobrej bibule jest około 99,8% alfa celulozy, 0,1% beta i około 0,07% części mineralnych. Najczęściej do elektroforezy używa się bibuły Whatman nr 1, bibuły frmy Mecherey i Nagel, Schieicher-Schüuu. W związku z różnym układem systemu kapilarnego bibuły ważny jest kierunek cięcia dużych arkuszy bibuły na mniejsze paski (Foto I). Wymiar tych pas-

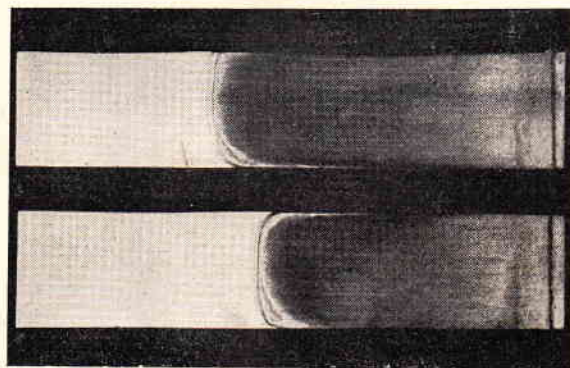


Foto 1. Szybkość nawilżania pasków bibuły w zależności od kierunku cięcia arkusza (Bibuła Whatmana nr 1, czas nawilżania 6 godz.) a) pasek cięty w poprzek arkusza b) pasek cięty wzdłuż arkusza (a — pasek dolny, b — pasek górny).

ków jest różny, w zależności od warunków w jakich przebiega rozdział. W literaturze podają różne wymiary pasków 4×40 cm (Grassman Hannig 9), 1×29 cm (Pućar 21), 2×40 cm (Bielański 1), 4×25 cm (Moncke 17), 3,5×32 cm (Magas 16).

Drugą składową środowiska, w którym przebiega rozdział jest bufor. Najczęściej używany do elektroforezy jest bufor weronalowy wg Michaelisa o pH 8,6 i sile jonowej 0,1. Skład tego buforu przedstawia się następująco:

29,43 g Veronal Nat.
19,43 g CH₃COONa · 3H₂O
180,0 ml. 0,1 N HCl
ad 3 l H₂O bidest.

Rzadziej, ale z równie dobrymi skutkami stosuje się bufory o składzie:

- 1) 4,5 g Veronal Nat. siła jonowa = 0,048
3,6 g CH₃COONa · 3H₂O pH = 8,6
30,6 ml 0,1 N HCl
ad 1000 ml H₂O dest. (Pućar 21)
- 2) 5,9 g Veronal Nat. siła jonowa = 0,07
3,88 g CH₃COONa · 3H₂O pH = 8,6
1,5 g NaCl
40,0 ml 0,1 N HCl
ad 1000 ml H₂O (Moncke 17)
- 3) 18,419 g Veronalu (= 0,1 M) siła jonowa = 0,1 pH = 8,6
85,2 ml 1 N NaOH rozpuścić w gorącej wodzie i po ostygnięciu dopełnić do 1000 ml H₂O (Magas 16)
- 4) 1,769 g kwasu bornego
3,893 g fosforanu potasu jednozas.
5,266 g Veronalu
6,008 g Kwasu cytrynowego
ad 1000 ml H₂O — doprowadzić N/5 NaOH do pH 7,2 (Hartung 12)

Przed włożeniem pasków do komory zwilża się je roztworem buforowym, po czym nakrapla się na nie, na zewnątrz lub w komorze płyn. Miejsce nakroplenia jest różne u każdego niemal autora, znajduje się ono jednak zwykle od strony katody.

Przez włożone do komory paski z nakropionym płynem przepuszcza się prąd. Stosowane na 1 cm napięcie waha się w bardzo szerokich granicach. Wiadomo, że nie powinno ono być zbyt wysokie, bo nie uzyskuje się wtedy prawidłowych rozdziałów. Bardziej ustalone są poglądy na natężenie prądu. Autorzy wielu prac są na ogół zgodni co do tego, że nie powinno ono przekraczać 0,5 mA na 1 cm szerokości paska. Czas przepływu prądu przez pasek zależy od zastosowanego natężenia i napięcia. Zwykle leży ono w granicach 24 godz.

Po skończonym rozdziale paski utrwalą się, to znaczy denaturuje białko rozdzielonych frakcji przez suszenie pasków w temp. 105—115° przez 15—30 min. (w zależności od metodyki). Utrwalone paski poddaje się barwieniu. Do tego celu stosuje się obecnie czerń amidową 10B/Amidoschwarz 10 B/, błękit bromofenolowy i azokar-

min B lub G. Najczęściej używany jest pierwszy z podanych barwników Grassmanna i Hannig, Pućer, Bielański, Hartung i nni). Stosuje się nasycony roztwór czerni amidowej w kwasie octowym i alkoholu etylowym lub metylowym w stosunku 1:9. Barwienie trwa 10 min. odbarwianie w roztworze kwasu octowego lod. i alkoholu w podanym uprzednio stężeniu, około 4 godz. Dość często stosuje się 0,1% błękit bromofenolowy w etanolu zawierającym 10% chlorku rtęciowego (Magaś). Barwienie tym roztworem trwa 30 min. Bibułę odbarwia się 5% kwasem octowym w ciągu 40—60 min. Wielu autorów używa jako barwinka azokarminu B. 1 g azokarminu w kwasie octowym lod. i alkoholu met. w stosunku 1:9. Barwienie trwa 15 min. Odbarwianie w kwasie i alkoholu (w tym samym stosunku jak w barwniku) oraz w 10% kwasie octowym trwa około 2 godz. Każdy z tych barwników ma inną zdolność wiązania się z białkiem. Pućkar podaje, że 1 mg standardowej albuminy ludzkiej związała 0,85 mg czerni amidowej 10 B.



Foto 2. Surowica kury nr 14, rozdzielona elektroforetycznie dn. 27.XI.56 r., (napiecie 3,5 V/cm., natężenie 0,5 mA/cm.). Zastosowano trzy metody barwienia: a) błękitem bromofenolowym; b) czernią amidową 10 B; c) azokarminem B. Wykresy uzyskano za pomocą fotoabsorpcjometru przy zastosowaniu lampy sodowej.

Rozdzielone i zabarwione frakcje można oznaczyć ilościowo drogą eluowania lub fotometrowania. Czerni eluuje się w 50% metanolu z dodatkiem 0,02% NaOH i oznacza stopień absorpcji światła przy długości fali $\lambda = 610 \text{ m}\mu$. Błękit bromofenolowy eluuje się 2% Na_2CO_3 w 50% CH_3OH , a pomiaru absorpcji dokonuje się dla długości fali $\lambda = 595 \text{ m}\mu$. Do wypłukiwania azokarminu używa się 0,1 N NaOH, a absorpcję światła oznacza się dla fali $\lambda = 530 \text{ m}\mu$.

Z uzyskanych wartości absorpcji wykresła się krzywe, które planimetruje się, celem ilościowego oznaczenia składu poszczególnych frakcji. Ten sposób oznaczania jest jednak bardzo żmudny. Dlatego czyniono dość wcześnie próby odczytywania współczynnika absorpcji wprost z zabarwionych pasków bibuły, które zanurza się w płynie o takim współczynniku refrakcji, który pozwala na możliwie bezbłędne odczytywanie pasków. Płynem takim okazał się olej pa-

rafinowy, do którego niektórzy (Grassman 9) dodają alfa bromoftaleiny. Z otrzymaną z fotometrowania krzywą postępuje się dalej tak, jak przy eluowaniu pasków. Odpada tu kłopotliwe wypłukiwanie zabarwionego białka. Dlatego też metoda fotoabsorpcji znalazła wielu zwolenników, a ponadto uważana jest za dokładniejszą od eluowania.

Innym sposobem ilościowego oznaczania zabarwionych pasków jest fotografowanie pasków i odczytywanie na mikrofotometrze stopnia zaciemnienia kliszy (Bielański 1). Z uzyskanych wartości wykresła się krzywą, którą interpretuje się podobnie jak w poprzednich metodach. Również polarograf (Homolk) może być stosowany do ilościowego oznaczania frakcji białkowych.

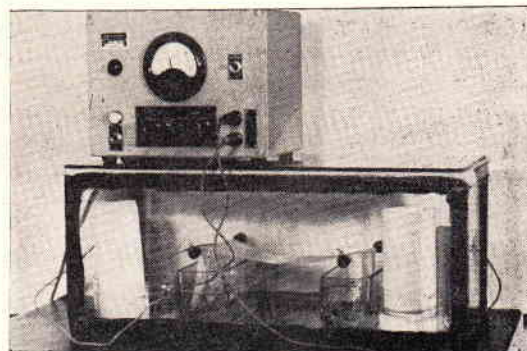
Opracowanie własne

Metodą wyjściową, na której oparto się przy opracowywaniu elektroforezy bibułowej była technika podana przez Grassmana i Hanniga (9).

Przy ścisłym jej stosowaniu nie udało się uzyskać oczekiwanych wyników. Możliwe, że w obu przypadkach materiały użyte do oznaczeń były różne. U Grassmana była to surowica ludzka, u mnie przede wszystkim kur. Tu muszę zaznaczyć, że o ile surowice różnych gatunków ssaków nie sprawiały trudności przy rozdziale, o tyle surowice kur nasuwały masę kłopotów.

Aparatura używana do oznaczeń składa się z:

1) Prostownika lampowego wykonanego przez Katedrę Radiotechniki Politechniki Gdańskiej. Prostownik daje prąd wyjściowy o napięciu 40—500 W i natężeniu 1—50 mA. Pobór mocy przy pełnym obciążeniu wynosi około 45 W.



Fot. 3

2) Komory wilgotnej, o wymiarach $60 \times 23 \times 24 \text{ cm}$.

3) Fotoabsorpcjometru (wykonanego przez p. Mgr K. Wójcika z Zakładu Fizjologii Zwierząt WSR w Krakowie).

4) Planimetru.

Do elektroforezy używano bibuły Whatman nr 1, którą wyselekcjonowano jako najlepszą z innych numerów tej bibuły oraz z bibuły firmy Mecherey i Nagel. Paski cięto o wymiarach $4 \times 40 \text{ cm}$ wzdłuż arkusza bibuły, gdyż okazało

się, że taki jest kierunek sieci kapilarnej bibuły.

Roztwór buforowy przygotowywano w zasadzie w/g Michaelisa, z tym że zakwaszono go bardziej, do pH 8,5 dla surowic świń, i pH 8,3 dla surowic kur. Siła jonowa buforu wynosiła 0,1.

Trzy paski o podanych uprzednio wymiarach zawieszano w komorze wilgotnej w pozycji poziomej i zanurzono przed nakropleniem surowicy do zlewarowanych naczyń z buframi. Głębokość zanurzenia wynosiła 2 cm. Po całkowitym nawilgnięciu pasków, co trwa 60 min., na 15 cm od poziomu buforu, na przy katodowym krańcu nakraplano w postaci kreski, pipetą do krwi 0,01 ml nierozcieńczonej surowicy kur, 0,005 ml surowicy świń. Nakraplanie większych ilości surowicy powodowało zaciemnienie obrazu elektroforetycznego.

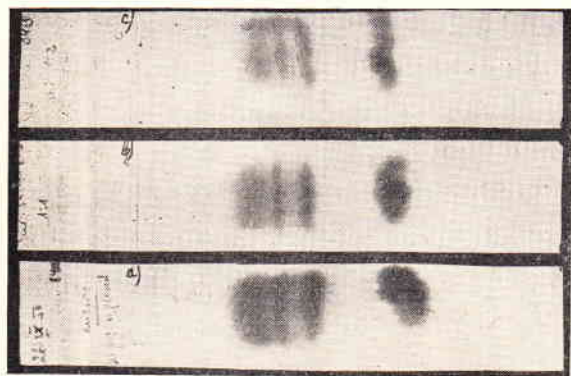


Foto 4. Rozdział elektroforetyczny surowicy świni nr 8413, nakropionej w różnym rozcieńczeniu, a) nierozcieńczona surowica, b) rozcieńczenie 1:1, c) rozcieńczenie 1:2 (1 cz. sur. 2 cz. buforu).

Do naczyń z buforami doprowadzano prąd, przez zanurzenie w nich elektrod platynowych o wymiarach $1 \times 27,8 \times 0,01$ cm. Obok naczyń z buforami umieszczano dodatkowe naczynia z walcami bibuły służącej do utrzymywania odpowiedniej wilgotności w komorze. Natychmiast po nakropleniu surowicy zamykano szczelnie komorę i włączano prąd.

Dla surowic świń stosowano prąd o napięciu 180—190 V (4,5—4,75 V/cm), natężeniu 0,5 mA

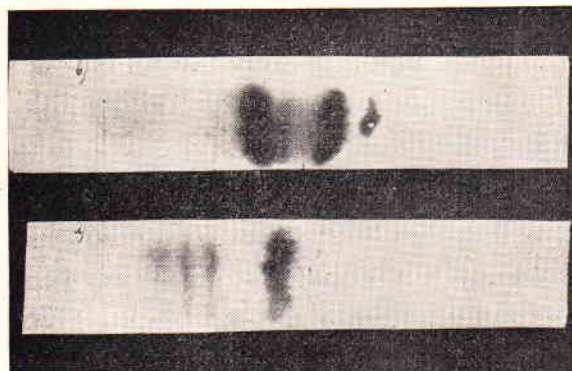


Foto 5. Elektroforetyczny rozdział surowicy świni i kury w tych samych warunkach — pH buforu 8,5, napięcie 4,5 V/cm, natężenie 0,5 mA/cm, czas elektroforezy 18 godz. a) surowica świni — warunki odpowiednie do rozdziału, b) surowica kury — warunki nieodpowiednie do rozdziału.

na 1 cm szerokości paska, dla surowic kur prąd o napięciu 140—180 V (3,5—4,5 V/cm) i natężeniu 0,5 mA na cm. Czas elektroforezy dla surowic świń wynosił 18—20 godz., dla surowic kur 18—19 godz.

Stosowanie zbyt małych napięć np. 130 V dla surowic kur powodowało słaby rozdział surowicy.

Również zbyt wysokie napięcia nie wpływają korzystnie na rozdział białek. Przy stosowaniu wysokich napięć wytwarza się duża ilość ciepła Joula, którą trzeba likwidować dodatkowym układem chłodniczym.

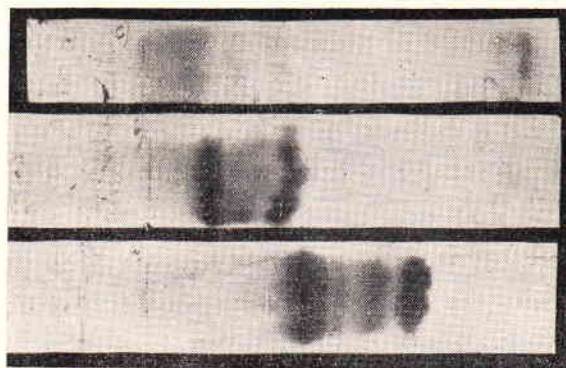


Foto 6. Rozdział elektroforetyczny surowic tego samego gatunku zwierzęcia przy różnych napięciach. (Czas elektroforezy 19,5—20 godz.). a) napięcie 4,5 V/cm, natężenie 0,5 mA/cm; b) napięcie 5,0 V/cm, natężenie 0,5 mA/cm; c) napięcie 10,3 V/cm, natężenie 0,5 mA/cm.

Temperatura w czasie przebiegu elektroforezy wynosiła od 17° do 20°C, w zależności od temperatury otoczenia. Zauważono, że takie wahania nie mają zasadniczego wpływu na przebieg rozdziału białka. Po ukończonym rozdziale paski bibuły rozpinano sztywno na ramkach, aby uniemożliwić spływanie białka do punktów najniższej położonych, i wstawiano na 15 min. do suszarki o temp. 110°C, celem zdenaturowania białka. Utrwalanie pasków w tej temperaturze daje ostre obrazy rozdzielonych frakcji.

Po zdenaturowaniu białka wybarwiano poszczególne frakcje. Jako barwnik stosowano azokarmin B — 1% roztwór w kwasie oct. lod. i metanolu w stosunku 1 : 9. Paski zanurzano do barwnika na przeciąg 15 min., a następnie do naczyń z kwasem octowym 10% również na 15 min. do każdego naczynia, aż do zupełnego odbarwienia bibuły wolnej od białka.

Najczęściej uzyskiwano widoczne cztery frakcje, niekiedy tylko pięć. Podobne wyniki uzyskali dla tych samych gatunków zwierząt Stöckl i Choppard.

Zabarwione paski suszono na powietrzu między arkuszami bibuły. Po wysuszeniu paski fotometrowano. W tym celu zanurzano je do waniek z olejem parafinowym, a następnie wkładano między dwie szklane płyty, uważając, aby nie było pęcherzyków powietrza. Płyty umieszczano na drodze promieni światła sodowego padającego po przejściu przez płytę na

fotokomórkę. Prąd wzbudzony w fotokomórcie powoduje wychylenie strzałki galwanometru wycechowanego w jednostkach absorbcji. Przez odpowiednie przesuwanie wiązki światła nad różnie absorbującą promienie świetlne bibułą, uzyskuje się wykres obrazujący rozdział białka na bibule.

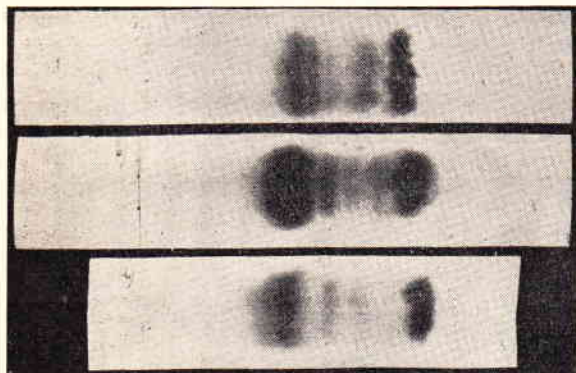


Foto 7. Rozdział elektroforetyczny białek surowicy kury w tych samych warunkach. Poszczególne paski wykazują różne ilości frakcji, od 4 do 5. a) cztery frakcje, b) c) po pięć frakcji.

Przed zastosowaniem fotoabsorpcjometru próbowano eluować paski w roztworze 0,1 N NaOH i odczytywać poziom wypłukanego białka przy pomocy kolorymetru Pulfricha, przy długości fali $\lambda = 530$ m μ . Metoda ta jest jednak bardzo kłopotliwa w zastosowaniu, zajmuje dużo czasu, a uzyskane tą drogą wyniki nie odzwierciedlają faktycznego rozdziału białek.

Z otrzymanego wykresu wyznaczano planimetrycznie procentowy skład poszczególnych frakcji.

Absolutną ilość białka w każdej frakcji wyliczano z azotu białkowego surowicy, którego poziom uzyskiwano metodą Kjeldahla.

Poziom białka i frakcji białkowych surowic świń i kur elektroforezą, oraz metodą wystalania wg Gornalla w zestawieniu z danymi innych autorów przedstawia tabela nr III.

Tabl. III

Poziom frakcji białkowych w surowicy świń i kur, oznaczony różną techniką

Gatunek i liczba zwierząt	Metoda i sprzęt	Granice wahań wzgl. średnie			
		albuminy	globuliny		
			α	β	γ
Świnia					
13	Tiselius	39,9-52,0	13,5-21,0	12,3-17,7	18,2-32,4
9	Antweiler	32,7-53,7	12,4-22,7	10,1-19,0	17,5-28,0
89	a) Stöckel	31,2-59,0	13,8-25,1	10,5-19,9	15,8-32,4
6	b) Bad. własne	31,21	21,7	23,12	28,07
Kura					
8	Tiselius	32,8-46,1	13,8-22,7	8,3-10,7	28,0-36,4
83	Bib. elektrof.	27,5-54,8	8,4-23,4	6,1-19,9	20,5-38,8
	Bad. własne				
4	a) Bib. elektrof.	45,03	8,56	14,04	35,79
4	b) frakc. Gornall	44,00		36,00	

Uzyskane dane dla frakcji białkowych rozdzielonych elektroforetycznie, oraz frakcji otrzymanych drogą wysolenia jak i porównanie wyników badań własnych z wynikami prac innych autorów pozwalają przypuszczać, że podana metoda elektroforetycznego rozdziału białek daje prawdziwy obraz i może być stosowana do dalszych prac laboratoryjnych.

Ze względu jednak na dużą labilność organizmu zwierzęcego, co podaje w przekonującej tabeli Stöckl, (tabl. nr IV), nie udało się dotychczas zastosować elektroforezy do badań klinicznych w diagnostyce weterynaryjnej.

Tabl. IV

Indywidualne wahania poziomu frakcji białkowych u zwierząt wg Stöckla

Gatunek zwierzęcia	dzień										
	1	7	14	21	28	35	42	49	56	63	
Świnia											
albuminy	38,6	39,8	44,9	37,0	40,1	43,4	34,9				
α -globuliny	12,4	19,9	19,3	22,0	20,7	18,3	21,8				
β -globuliny	15,2	42,3	14,6	15,9	14,3	14,8	15,6				
γ -globuliny	28,8	28,0	24,2	25,4	24,9	23,5	27,7				
Kura											
albuminy	51,9	49,8	52,7	59,3	52,0	50,2	47,1	49,9	48,6	46,7	
α -globuliny	10,8	12,0	13,2	13,7	13,0	14,4	13,1	13,1	12,9	11,2	
β -globuliny	12,3	14,0	12,2	15,6	12,0	10,3	13,6	13,2	14,2	12,8	
γ -globuliny	26,0		22,0	25,1	22,4			23,7	23,4		

Nie umniejsza to jednak możliwości jej szerszego stosowania do badań nad budową białek, ich składu aminokwasowego, do badań nad lokalizacją przeciwciał, ich stosunku do odpowiednich antygenów, do przeprowadzania doświadczeń z izotopami itp.

Piśmiennictwo

- 1) Bielawski Wl.: Acta Bioch. Pol. II, 4, 409, (1955).
- 2) Carpenter P.: Immunology and serology — Philadelphia, London (1956).
- 3) Choppard P.: Schweizer Arch. f. Tier. 96, 5, 252, (1954).
- 4) Choppard P.: Zeit f. Tierzucht u. Zuchtungsbiologie 63, 21, (1954).
- 5) Deutsch H. R., Goodie M. B.: J. Biol. Chem. 161, 1, (1945).
- 6) Fuchs W.: Flach. Klin. Woch. 903—906, (1955).
- 7) Gornall A. G., Bardwill M. J.: J. Biol. Chem. 177, 751, (1949).
- 8) Gralheer M., Pehl H. H.: Archiv. f. Exp. Vet. X, 616, (1956).
- 9) Grassman H., Hanning K.: Hoppe Seyl. Zeit. 290, 1—2, (19522).
- 10) Garlej T.: Wiad. Lek. 19, 879, (1956).
- 11) Hoch H., Barr G. H.: Science 122, 243224, (1955).
- 12) Hartung D.: D. Tier. Woch. 61, 29/30, 300, (1954).
- 13) Holt C. V., Voigt K. D., Gaede K.: Bioch. Zeit. 323, 345, (1952).
- 14) Jencks W. P., Jetton M. R.: Durrum. Bioch. J. 60, 2, 205, (1955).
- 15) Kemula W., Bartosiewicz W.: Roczn. Chem. 28, 100, (1954).
- 16) Magas S.: Po-sepy Bioch. II, 1, (1956).
- 17) Moncke C.: Fol. Haemat. 71, 616, (1953).
- 18) Mathers J., Buthala D. A.: Vet. Research XVII, 64, 485, (1955).
- 19) Martin N. H., Franglen G. F.: J. Clin. Path. 7, (1954).
- 20) Ostrowski Wl.: Wiad. Chem. IX, 1, 21, (1955).
- 21) Pucar L. J.: Hoppe Seyl. Zeit. 296, 62, (1954).
- 22) Parker L. J.: The Analyst 80, 954, 638, (1955).
- 23) Stöckl W.: Wien Tier. Wochenschr. 43, 3, (1956).
- 24) Stöckl W.: Wien Tier. Wochenschr. 43, 4, (1956).
- 25) Stöckl W.: Wien. Tier. Wochenschr. 43, 7, (1956).
- 26) Słota K., Bril S., Balleska A.: Hoppe Sey. Zeit 296, 141, (1954).
- 27) Sanders E., Huddleson I. F.: Schabbl. J. Biol. Chem. 155, 469, (1944).
- 28) Ulrich J., Scheidegggen J. J.: Bull. Soc. Chim. Biol. 37, 165, (1955).
- 29) Williams F. G., Pickels G. G.: Science 121, 828, (1935).

Я. ЮСЬКО — ГРУНДВЕК

ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКИЙ МЕТОД РАЗДЕЛА БЕЛОК СЫВОРОТКИ КРОВИ В СВЕТЕ ИССЛЕДОВАНИЙ РАЗЛИЧНЫХ АВТОРОВ И СОБСТВЕННОГО ИЗУЧЕНИЯ

Приводится метод электрофоретического разделения сывороток крови свиней и кур. Применяли буфер по Мичелису при pH 8,5 для сывороток свиней и pH 8,3 для сывороток кур. Ионная сила растворов 0,1, напряжение тока 4,5—4,75 В/см при 0,5 мА/см для сывороток свиней и 3,5—4,5 В/см при 0,5 мА/см для сывороток кур. Время электрофореза для сывороток свиней — 18—21 часов и для сывороток кур 18—19 часов. Получаемые фракции определяли количественно при помощи фотоабсорбциометра и планиметра. Результаты определений очень сходны с результатами при классическом методе Тиселиуса (табл. III)

J. JUŠKO — GRUNDBOECK

ELECTROPHORETIC METHOD OF PARTITION OF BLOOD SERUM PROTEINS

Summary

A description of the electrophoretic method of partition of blood sera of normal pigs and hens. Michaelis' buffer of pH 8,5 for swine and pH 8,3 for hen sera was used. The ionic force of the two buffers = 0,1. Voltage of the current 4,5—4,75 V/cm and 0,5 mA/cm for hen sera. The time of electrophoresis was for swine sera 18—20 hours, for hen sera 18—19 hours. The obtained fractions were quantitatively determined by the use of a photoadsorptionmeter and subsequently by the use of a planimeter. The obtained results are close to classic electrophoresis of Tiselius (table III).

LECH DZIAŁOSZYŃSKI, MIROSLAWA MACIEJEWSKA

Frakcje białkowe surowicy krwi końskiej

Z Katedry Fizjologii Zwierząt WSR w Poznaniu
Kierownik: Doc. dr LECH DZIAŁOSZYŃSKI

Określenie frakcji białkowych surowicy krwi ma znaczenie diagnostyczne i prognostyczne, to też w ostatnich latach pojawiło się mnóstwo prac poświęconych temu zagadnieniu w odniesieniu do krwi człowieka. Określono średnie wartości dla poszczególnych frakcji surowicy krwi ludzkiej w stanach fizjologicznych, oraz w przypadkach niektórych schorzeń. (1)

Jeśli idzie o zwierzęta to sprawa frakcji białkowych surowicy krwi jest znacznie słabiej opracowana, a przy tym jest ona bardziej skomplikowana ze względu na różnice gatunkowe, lecz nawet w ramach tego samego gatunku spotyka się duże różnice w wartościach uzyskanych dla poszczególnych frakcji. Wg. *Choparda* (3,2) u koni należących do tej samej rasy i żyjących w tych samych warunkach spotyka się poważne różnice w zawartości białka w odnośnych frakcjach surowicy.

Ze względu na znikomą ilość danych w literaturze dotyczących zagadnienia frakcji białkowych w osoczu krwi końskiej, postanowiliśmy przebadac grupę koni roboczych, półciężkich, pracujących w zakładach doświadczalnych WSR w Poznaniu. Grupa składała się z pięciu wałachów i jednej klaczy. W trakcie wykonywania pracy jeden z wałachów został oddany na rzeź na skutek choroby kopyt (rak strzałki). Uzyskane wyniki odnoszą się więc do czterech wałachów i jednej klaczy. Celem pracy jest określenie średnich wartości dla grupy zwierząt.

Przebadane konie miały następujące imiona i wiek:

Bohun	—	wałach	—	9 lat
Budrys	—	„	—	9 „
Fryc	—	„	—	16 „
Leń	—	„	—	13 „
Benita	—	klacz	—	14 „

Metodyka pracy.

Krew pobierano z żyły jarzmowej rano o godz. 7-mej przed wyjściem koni do pracy i pozostawiano w temperaturze pokojowej na kilkanaście godzin. W tym czasie następowało opadanie krwinek, skrzepnięcie osocza, ściągnięcie skrzepu i wyciśnięcie surowicy, którą oddzielano przez dekantację i wirowanie. Ogółem pobrano od każdego konia krew dziesięciokrotnie na przestrzeni czterech miesięcy.

Rozdział elektroforetyczny (4) przeprowadzano na aparacie podobnym do tego, jaki opisał *Magas* (6). Naczynia elektrodowe miały pojemność 0,75 litra, a powierzchnia elektrod węglowych wynosiła 70 cm². Roztwór buforu mieścił się w podłużnych rynienkach szklanych długości 60 cm o przekroju półkolistym i promieniu około 3 cm. Stosowaliśmy bufor fosforanowy o pH = 7,6 i sile jonowej I = 0,09. Źródło prądu stałego stanowił zasilacz lampowy wyposażony w woltomierz i amperomierz.

W odróżnieniu od innych autorów stosujących wąskie paski bibuły o szerokości 2 do 5 cm, używaliśmy odcinków bibuły o wymiarach 17,5 × 38 cm., na których odkreślaliśmy ołówkiem pięć pasków o wymiarach 3,5 × 38 cm. Surowicę nakładaliśmy na każdy z nakreślonych pasków, które stanowiły jedną całość. Na każdym odcinku bibuły umieszczaliśmy pięć surowic. Stwierdziliśmy, że taki sposób postępowania, wprowadzony przez asystenta tutejszego Zakładu inż. T. Kotika, daje bardziej jednorodne rozdziały, niż używanie luźno leżących wąskich pasków. Używaliśmy bibuły *Macherey Nagel* nr 61 i rozdziały prowadziliśmy w poprzek biegu włókien bibuły. W komorze wilgotnej mieści-