

ACTA BIOLOGIAE EXPERIMENTALIS

LITTERAE
SOCIETATIS PHYSIOLOGORUM POLONORUM

VOL. XI, FASC. 1 – 2

SUBVENTIONNÉ PAR LE FOND NATIONAL POUR LA PROTECTION
DE LA CULTURE POLONAISE

VARSOVIE
RÉDACTION ET ADMINISTRATION:
INSTITUT NENCKI (SOC. SCI. VARS.)
8, RUE ŚNIADECKI
1937

Acta Biologiae Experimentalis.

Czasopismo, ogłaszające rozprawy naukowe z zakresu fizjologii i chemii fizjologicznej roślin i zwierząt, morfologii doświadczalnej, zoopsychologii oraz dziedzin pokrewnych.

Tom X, 1936 (pod redakcją K. Białaszewicza) zawiera następujące rozprawy:

R. Truszkowski and S. Gubermanówna (Warszawa): Conditions of extraction of ox-kidney uricase. — M. Wierzuchowski i H. Fiszel (Warszawa): Badania nad istotą swoisto-dynamicznego działania. Część IV. — T. Vieweger i M. Szulzingerówna (Warszawa): O rytmie dobowym w mnożeniu się wymoczków. — F. Goebel i Zb. Bartosiewicz (Warszawa): Praca gruczołów trawiennych a równowaga kwasowo-zasadowa. — R. Truszkowski and S. Gubermanówna (Warszawa): Isolation and nature of active products from uricase extracts. — E. J. Bieńka i Cz. Szczepański (Warszawa): Skład i właściwości śliny w zależności od charakteru i siły bodźca. — N. Bałzam (Warszawa): Losy flory bakteryjnej podczas metamorfozy muchy mięsnej. — M. Szulzingerówna i H. Kałuska (Warszawa): Hodowle wymoczków na różnych podłożach naturalnych. — A. Sławiński (Poznań): Nowy sposób badania koloidów drogą przewodnictwa. — J. M. Müller (Lwów): W sprawie heteromorfizmu kryształów barwika krwi konia. — A. Sławiński (Poznań): Wewnętrzna budowa erytrocytów. — G. Szwejkowska (Warszawa): Wpływ temperatury na przebieg krzywej dysocjacji oksyhemoglobiny we krwi zółwia. — T. Baranowski (Wilno): Sacharozuria i sacharozemia. — F. Bonder (Warszawa): O zachowaniu się przestrzeni martwej dróg oddechowych w okresie początkowym pracy i w czasie wypoczynku. — J. Konorski i L. Lubińska (Warszawa): Próba analizy zjawiska narkozy magnezowej. Część III. — Br. Zawadzki (Warszawa): Über die gleichzeitige Wirkung zweier Elektrolyte auf die Viskosität von Eigelblösungen. — J. Konorski, L. Lubińska i S. Miller (Warszawa): Wytwarzanie się odruchów warunkowych w zahamowanej indukcyjnie korze mózgowej. — H. Rozenberg (Warszawa): Badania nad zjawiskami regulowania składu mineralnego cieczy ciała. Część III. — K. Białaszewicz (Warszawa): O odżywianiu się jedwabnika w ostatnim okresie wzrostu. — St. B. Bartosiewicz (Warszawa): Skrócenie metody mikro-Kjeldahla w aparacie Parana - Wagnera.

Cena pojedynczego tomu (około 20 arkuszy): w prenumeracie — 15 zł., oddzielnie — 20 zł. Współpracownicy czasopisma otrzymują 10% ustępstwa.

Zgłoszenie do prenumeraty przyjmuje:

Administracja Instytutu im. Nenckiego T. N. W.
(Warszawa, ul. Śniadeckich 8, tel. 826-31).

Skład główny:

„Ekspedycja Kasy im. J. Mianowskiego”.

(Warszawa, Nowy-Świat 72, Pałac Staszica).

[Zakład Chemii Lekarskiej Uniwersytetu J. K. we Lwowie].

J. K. Parnas i Irena Mochnacka.

O funkcji kwasu inozynowego w przemianie mięśniowej¹⁾.

La rôle de l'acide inosique dans le métabolisme musculaire.

Podczas badań nad kinetyką glikogenolizy stwierdzaliśmy, że wyciągi mięśniowe dializowane bardzo długo, albo też autolizowane w temperaturze wyższej (40°) tracą zdolność fosforolityczną: jako fosforolizę określamy przemianę glikogenu i fosforanu w ester cukrowo-jednofosforowy. Glikogen dodany do takich wyciągów, zadanych poza tym fosforanem, nie znika, albo też znika o wiele powolniej, aniżeli w obecności wyciągów mięśniowych świeższych. Wyciągi mięśniowe czynne fosforolityczne nie zawierały ani kwasu adenozynotrójfosforowego, ani kwasu adenilowego; nie rozkładają one glikogenu na kwas mlekowy; widocznie jednak zawierają jakiś czynnik, który jest nieodzowny dla fosforolizy glikogenu, czynnik, który usuwa dopiero bardzo długa dializa, elektrodializa, albo autoliza w wyższej temperaturze. Wyciągi nieczynne można uczynić, jeżeli dodać do nich bądź to kwasu adenilowego, bądź też kwasu inozynowego, który w takich wyciągach z kwasu adenilowego przez dezaminację powstaje. Kwas adenilowy uczynnia nieco silniej, aniżeli kwas inozynowy, ale różnica jest nieznaczna. Ponieważ kwasu adenilowego nie ma w mięśniu, a kwas inozynowy w mięśniu powstaje i gromadzi się, przeto musimy właśnie kwas inozynowy uważać za czynnik, który w mięśniu żywym współdziała przy fosforolizie glikogenu. Tym samym ukazuje się — po raz pierwszy — pewna funkcja kwasu inozynowego, ciała

¹⁾ Rzecz przedstawiona na posiedzeniu Oddziału Polskiego Towarzystwa Fizjologicznego we Lwowie w dniu 27.I.1937 r.

znanego blisko od wieku, które wydawało się do niedawna tylko produktem odpadkowym w przemianie mięśniowej.

Wyobrażamy sobie, że funkcja kwasu inozynowego nie polega na tym, że to ciało przenosi fosfor w przemianie tak, jak go przenosi system adenilowy; roli tego ciała dopatrujemy się raczej w funkcji czynnika, który działa przez to, że zbliża reszty fosforanowe do wielocukrowca, i przez to umożliwia reakcję. Podobnie jak reakcją między glikogēnem a fosforanem ulega wstrzymaniu przez działanie floryzyny, tak aktywuje ją kwas inozynowy. Znamiennym jest, że kwasu adenilowego i inozynowego nie można zastąpić przez nukleotyd gwaninowy, zawierający resztę fosforową w pozycji 3 rybozy; natomiast analogiczna do kwasu adenilowego pochodna adeniny ma — co prawda bardzo słaby — wpływ na fosforolizę glikogenu.

[Zakład Fizjologii Akademii Medycyny Weterynaryjnej we Lwowie].

A. Klisiecki i W. Holobut.

Historia wstrząsu histaminowego ¹⁾.

The ultimate cause of histamin shock.

Zapoczątkowały ją prace Dale'a i Laidlaw'a w 1911/12 r., którzy sądzili, że ciśnienie krwi po wlewniu histaminy do naczyń krwionośnych opada z powodu rozszerzenia naczyń trzew jamy brzusznej, później mniemali, że rozszerzenie następuje w naczyniach mięśni i skóry i że naczynia płuc się kurczą, a pogarszając przez to dopływ krwi do serca lewego — dopomagają do wystąpienia wstrząsu krążeniowego. U zwierząt, u których po histaminie zjawiają się wybitne zaburzenia oddechowemu (świnka morska), zapora płucna ma mieć decydujący wpływ na wstrząs. W r. 1915 Mauthner i Pick wysunęli tezę, że skucz żył wątrobowych (zapora wątrobowa) jest przyczyną wstrząsu. Ale przebieg wstrząsu, zjawiającego się i po ewisceracji zwierząt, zachwiał hipotezą tych badaczy i coraz bardziej kierowano myśl w stronę obwodowych naczyń. Chcąc to zagadnienie zbadać przy pomocy pomiaru prądu krwi w różnych obszarach krwionośnych po wlewniu histaminy, mierzyliśmy ruch krwi w żyłę bramnej, w tętnicy krezkowej, tętnicy płucnej i tętnicach kończyn. Badania były prowadzone na psach.

Wątroba we wstrząsie nie odgrywa żadnej roli, jak się okazało, bo prąd krwi w żyłę bramnej maleje późno po spadku tętniczego ciśnienia, a przecie teza zapory wątrobowej wymaga, aby ruch bramny zmniejszył się przed obniżką ciśnienia tętniczego.

1) Rzecz przedstawiona na posiedzeniu Oddziału Polskiego Towarzystwa Fizjologicznego we Lwowie w dniu 27.I.1937 r.

Naczynia krezkowe po histaminie wlanej do nich rozszerzają się wydatnie, i po 10 sekundach zaczynają się zwężać. W czasie rozszerzenia ciśnienie tętnicze się nie zmienia zupełnie; zaczyna ono opadać po ok. 20 — 30 sek. od chwili wiania histaminy, i to niezależnie od stanu naczyń krezkowych, które wtedy mogą być już zwężone — jeśli dawka histaminy jest mała — lub być jeszcze w stanie nieznacznego rozszerzenia. Gdy się mierzy ruch w tętnicy krezkowej i wleje histaminę do żyły szyjnej, wtedy rozszerzenia, wyprzedzającego spadek ciśnienia, nie widać, ciśnienie krwi po 6—10 sek. ostro zaczyna opadać, a wraz z niem maleje szybko ruch, który, wiadomo, bezpośrednio od lewej komory zależy. Gdyby rozszerzenie krezkowe było przyczyną wstrząsu, to i przy wlewaniu histaminy do żyły szyjnej powinienby się zjawić najpierw wzrost ruchu, a potem dopiero spaść powinno ciśnienie.

Ruch tętnicy płucnej też nie zdradza działania zapory płucnej we wstrząsie. Po wlewaniu histaminy do żyły częściej np. po 6 sek. ciśnienie tętnicze zaczyna szybko opadać, w tym czasie ruch w płucnej tętnicy jest nawet nieco większy. Maleje on dopiero wtedy, gdy ciśnienie tętnicze jest na dnie spadku, gdy krążeniowy wstrząs w całej pełni się ujawnił. Teza zapory płucnej wymaga, by najpierw się dopływ do serca lewego z płuc zmniejszył, by ciśnienie krwi po osłabieniu prądu w tętnicy płucnej spadało.

W naczyniach kończyn też nie znaleźliśmy dowodu, by ich rozszerzenie miało mieć wpływ na wstrząs. Po wlewaniu histaminy do żyły, ciśnienie krwi opada a równocześnie maleje prąd krwi tętniczej. Po wlewaniu histaminy do badanej tętnicy kończynowej rozszerzają się naczynia, prąd wzrasta, ale ciśnienie krwi się nie zmienia. Opada ono dopiero po nawrocie ruchu prawie do normy, gdy działanie histaminy na ten obszar przeminęło. Po małych dawkach histaminy dotętniczo wlewanej widać wyraźnie oddzielenie fazy naczyniowej od fazy sercowej, widać, że rozszerzenie naczyń nie powoduje wstrząsu, ale czyni to zadziaływanie histaminy na samo serce. Że osłabienie serca wstrząs wywołuje, mamy dowody następujące. Najprędzej wstrząs wywołać można przez wianie histaminy do przedsionka lewego (1 sek.). Najmniejsze dawki histaminy (1 γ)

obniżają ciśnienie, gdy są podane do tego przedsionka. Ruch w aorcie piersiowej maleje równoległe z opadającym ciśnieniem tętniczym i nigdyśmy nie mogli ujrzyć wzrostu prądu w aorcie przed spadkiem ciśnienia tętniczego. Jeśli się wleje histaminę do aorty, w której bada się ruch, widać, że prąd wzrasta najpierw ale o tak nieznaczne wielkości, że spadku ciśnienia we wstrząsie (40—60% w 10 sek.) wyłumaczyć nie jest w stanie. Gdy ciśnienie zaczyna opadać, prąd krwi w aorcie wzrasta np. o 40 cm³ ponad stan wyjściowy. Zresztą widywać można i w aorcie oddzielenie sprawy naczyniowej od sercowej. Po 200 γ histaminy wlanej do aorty, prąd krwi rośnie i po paru sek. maleje, lecz ciśnienie tętnicze zmiany żadnej w tym czasie nie okazuje. Opada ono dopiero wówczas, gdy histamina, wlana do aorty w odpowiednim stężeniu, do serca dopłynie. Przyczyną wstrząsu nie jest brak krwi w lewym sercu, bo wlewanie płynu Ringera do lewego przedsionka przed wstrząsem nie chroni. Infuzja płynu tylko skraca czas nawrotu do normy ciśnienia we wstrząsie opadłego.

Fakt działania histaminy na naczynia krwionośne i serce zarazem, jest czynnikiem, chroniącym narząd krążenia przed skrwawieniem się serca do własnych naczyń, któreby w sposób nieodwracalny zjawiać się musiało po przedostaniu się histaminy do krwiobiegu. Serce normalnie silnie bijące rychłoby przeloczyło krew całą do rozszerzonych naczyń. Spadek ciśnienia wywołany słabą czynnością serca sprawia, że mimo rozszerzonych naczyń krążenie krwi się odbywa, że jest możliwy powrót do normy.

[Zakład Chemii Lekarskiej Uniwersytetu J. K. we Lwowie].

B. Umschweif i K. Gibaylo.

Zagadnienie występowania pyrofosforanu w tkankach zwierzęcych¹⁾.

Le pyrophosphate existe t'il dans les tissus animales?

Pyrofosforan, wykryty w mięśniach przez L o h m a n n a w roku 1927, okazał się, jak wiadomo, nie pyrofosforanem wolnym, lecz częścią kwasu adenozynotrójfosforowego.

W ostatnich latach wypłynęło ponownie zagadnienie, czy mięśnie jednak nie zawierają pyrofosforanu wolnego, na skutek publikacji F e r d m a n a i jego współpracowników, którzy na podstawie różnic w wynikach, otrzymanych przez pośrednie metody obliczania zawartości kwasu adenozynotrójfosforowego, oraz na podstawie metod posługujących się fermentami o raczej wątpliwej swoistości twierdzili, że w mięśniu znajduje się pyrofosforan wolny, i że podczas czynności mięśniowej zawartość pyrofosforanu wzrasta.

Poszukując sposobu wykrywania i oznaczania pyrofosforanu, który by był bezpośredni, a zatem nie wywodził twierdzenia o obecności tego ciała z oznaczeń różnicowych, dokonanych na ciałach innych, trafiliśmy na reakcję dosyć swoistą, która p o z w a l a w y k r y ć drobne ilości pyrofosforanu w wyciągach z mięśnia; a w każdym razie, jeżeli wypada ujemnie, pozwala w y k l u c z y ć obecność tego ciała. Odczyn ten polega na tym, że dodany do wyciągu mięśniowego pyrofosforan — w ilościach odpowiadających 1 mg fosforu pyrofosforanowego w 100 g mięśnia — daje silne zmętnienie, i to zme-

¹⁾ Rzecz przedstawiona na posiedzeniu Oddziału Polskiego Towarzystwa Fizjologicznego we Lwowie w dniu 27.I.1937 r.

nienie trwałe, dające się doskonale mierzyć nefelometrem. Metodę tę zastosowano do wyciągów mięśniowych i wyciągów z innych tkanek króliczych i żabich, ale nigdzie pyrofosforanu nie stwierdzono; natomiast można było pyrofosforan zawsze w tych wyciągach wykryć, jeżeli go do wyciągu — w ilości 0.025 mg P na 5 cm³ — dodano. W eksperymentach, w których mięśnie nużono, niekiedy nawet do zupełnego wyczerpania, również pyrofosforanu nigdy nie znaleziono; natomiast w drożdżach łatwo było obecność pyrofosforanu stwierdzić. Wyciągamy stąd wniosek, że pyrofosforan, jeżeli się jako taki w tkankach zwierzęcych odszczepia, to niewątpliwie musi ulegać natychmiastowemu rozkładowi na ortofosforan podobnie, jak powstająca w utlenieniach ustrojowych woda utleniona przetwarza się, pod działaniem katalazy, w wodę i tlen. Widocznie pyrofosfataza odgrywa tu rolę ochronną, analogiczną do roli katalazy.

[Zakład Fizjologii Uniwersytetu J. K. we Lwowie].

M. Wierzuchowski i Z. Borkowski.

Czynniki, wpływające na odzyskanie glikozy w cukrzycy z nadmiaru¹⁾.

Factors affecting the recoveries of glucose in overflow-diabetes.

Wykazano w poprzednich pracach, że glikoza, podana śródżylnie ustrojowi ponad miarę jego zdolności przetwórczych, zostaje prawie w całości (97%) wydalona z moczem²⁾. Temperatura rozczyńców wprowadzanych wynosiła +26°. Dawniejsi badacze nie znaleźli górnej granicy podczas przetwarzania glikozy. Wprowadzali oni jednak ssakom rozczyzny glikozy o temperaturze ciała. Powstało zatem zagadnienie, czy otrzymane wyniki były zależne od temperatury rozczyńca.

Aby rozstrzygnąć tę sprawę, wprowadzano dwu psom glikozę śródżylnie ze stałą prędkością, wynoszącą 7, 8 i 9 g/kg/godz. Rozczyńcy te posiadały temperaturę +10°, lub +26°, albo też +38°. Okres wlewania trwał 6 godzin, po czym trwała dalej obserwacja, dopóki zjawiska asymilacyjne nie wygasły.

Podczas dowozu rozczyńców o temp. +10° zwierzęta miały dreszcze przeważnie podczas całego okresu wlewania, jako objaw regulacji cieplnej chemicznej. Natomiast podczas dowozu rozczyńców o temp. +38° ziajały one, często silnie, sposobem właściwym psom, usuwając w ten sposób wraz z parą wodną nadmiar ciepła (regulacja fizyczna). Podczas dowozu rozczyńców o temp. +26° pojawiały się niekiedy krótkotrwałe dreszcze przy końcu 1-szej godziny dowozu; poza tym zwierzęta były spokojne.

¹⁾ Rzecz przedstawiona na posiedzeniu Oddziału Polskiego Towarzystwa Fizjologicznego we Lwowie w dniu 27.I.1937 r.

²⁾ M. Wierzuchowski: Journ. Physiol., 87, 311, 1936.

Przy wprowadzaniu roztworów o temp. $+10^{\circ}$ i $+26^{\circ}$, temperatura ciała nie podnosiła się wybitniej ponad wartość wstępną. Natomiast przy wprowadzaniu roztworów o temp. $+38^{\circ}$ temp. ciała wzrastała o cały jeden stopień. Liczba tętna wzrasta podczas dowozu rozczyńców o temp. $+10^{\circ}$ o 55 uderzeń na minutę, podczas dowozu rozczyńców o temp. $+38^{\circ}$ o 62 uderzenia na minutę, a przy dowozie rozczyńców o 26° o 36 uderzeń. W doświadczeniach z rozczyńcami o $+38^{\circ}$ oddechy były częstsze.

Przyswajanie glikozy, wyrażone jako procent wartości wprowadzonej, wynosiło przy rozmaitych temperaturach rozczyńców prawie identyczną wartość: przy $+10^{\circ}$ zwierzę przyswajało 55.1%, przy $+26^{\circ}$ — 54.6%, zaś przy $+38^{\circ}$ — 55.2%. Średnie krzywe stężenia cukru we krwi są nieco wyższe dla rozczyńców 26-stopniowych, niż dla obu innych.

Jeżeli w tych warunkach wprowadzano dodatkowe dawki glikozy śródżylnie, zupełnie niedwuznacznie rozczyńcy o temp. $+10^{\circ}$ dawały niezupełne odzyskania wprowadzonej dodatkowo glikozy w postaci przyrostu cukromoczu, gdyż tylko 74% podanej ilości. Przy wprowadzaniu rozczyńców o temp. $+38^{\circ}$ również odzyskania nie były zadowalające, gdyż wynosiły 91%. Dopiero rozczyńcy o temp. $+26^{\circ}$ dawały odzyskania niemal zupełne, wynoszące 97.5%, podobnie jak w poprzednich badaniach. Niniejsze badania potwierdzają więc istnienie jednostki „cukrzycy z nadmiaru” u zwierząt prawidłowych.

Stosowność rozczyńców o temp. $+26^{\circ}$ do tego rodzaju badań zdaje się wynikać z następujących rozważań: Przy wprowadzaniu rozczyńców o temperaturze niższej, niż temp. ciała, ustrój musi je podgrzać. Ponieważ traci on ciepło w postaci ciepłego moczu, obficie w tych warunkach oddawanego, więc jeżeli temperatura rozczyńcy jest nazbyt niska, nie wystarcza na podgrzanie rozczyńcy przyrost cieplny swoisto-dynamiczny, wywołany krańcowo silnym spoczynkowym przetwarzaniem glikozy, ale jeszcze dodatkowo występuje regulacja chemiczna w postaci dreszczy, a wraz z nimi przyspieszenie czynności serca, lekkie obniżenie krzywej cukru we krwi i gorsze odzyskanie dodatkowo wprowadzonej glikozy, gdyż część wprowadzanej glikozy zostaje zużyta wprost przez pracę drgających mięśni

Z drugiej znów strony, gdy podać rozczyzny podgrzane do temperatury ciała, ustroj nie potrzebuje ich podgrzewać i cały swój przyrost cieplny swoisto-dynamiczny musi wydalić na zewnątrz, używając do tego celu regulacji fizycznej w postaci zianania. Podnosi się przy tym temperatura ciała, liczba tętna, zwiększa się praca mięśni oddechowych, pojawia się niepokój zwierzęcia i wzrasta zużycie glikozy, wskutek czego zmniejsza się odzyskanie dodatkowo podanego cukru, zmniejsza się ciężkość zjawisk cukrzycowych.

Tylko rozczyzny o temp. 26°, według wykonanych przez nas obliczeń, posiadają niemal dokładnie taki niedobór cieplny w stosunku do ustroju, że swoisto-dynamiczny przyrost cieplny właśnie wystarcza, aby podgrzać te rozczyzny do temperatury ciała. Ustrój wtedy nie potrzebuje ani wytwarzać osobno ciepła, aby rozczyzny te podgrzać, ani też wydalać nadmiaru ciepła, o ile byłyby już podgrzane. Dlatego dodatkowa dawka glikozy, podana przy dowozie glikozy o takiej temperaturze, jest niemal w zupełności wydalana z moczem, świadcząc o przeciążeniu warsztatów węglowodanowych spoczywającego zwierzęcia, nie wprowadzającego w ruch dodatkowych urządzeń regulacyjnych cieplnych,

O ile więc dawniejsi autorowie używali rozczyznów glikozy o temp. ciała, to jednym z powodów, że nie natrafiali na zjawiska cukrzycowe, mogły być zjawiska regulacyjne, opisane powyżej.

[Institut für physiologische Chemie der Freien Universität zu Warschau].

A. Dmochowski und M. Pracowity.

Die Ammonsulfatmethode für Reinigung der Ejakulat- und Prostataphosphatase¹⁾.

Im Jahre 1933 hat *Dmochowski* (1) grosse Schwankungen in der Ausscheidung von „saurer“ Phosphatase (pH-Optimum 5.5) im Urin bemerkt. Im Jahre 1935 wurden diese Schwankungen teilweise erklärt, als *Kutschner* (2) grosse Mengen „saurer“ Phosphatase im Ejakulat feststellte. Mittels Elektrodialyse hat er vom Ejakulat und Prostataextrakt die inaktiven Eiweisstoffe abgetrennt und stark konzentrierte, wässrige Enzymlösungen erhalten (bis 3.400 PE/1 mg Trockensubstanz). Bei Alkoholfällung wurde die Phosphatase inaktiviert und blieb tätig nur in der wässrigen Lösung. Da die Ejakulatphosphatase, im Gegensatz zur „sauren“ Urinphosphatase (*Dmochowski*) (3) gegen Alkohol äusserst empfindlich ist, haben wir uns die Aufgabe gestellt reine, trockene, haltbare Ejakulatphosphatasepräparate mittels fraktionierter Ammonsulfatfällung zu erhalten. 15 cm³ Ejakulat wurden auf 2—5 Tage abgestellt, zentrifugiert, die aktive Flüssigkeit mit 50%-gen Ammonsulfat gefällt, der inaktive Rückstand abgesondert, das aktive Zentrifugat bis auf 66% Ammonsulfat gebracht, dann die ganze Phosphatase-enthaltende Fällung wieder abzentrifugiert. Diese Fällung wurde in 10 cm³ H₂O aufgelöst, 1—2 mal mit Ammonsulfat umgefällt, schnell dialysiert (der Kjeldahlkolben wurde mit Celofan in dem sich eine dünne Flüssigkeitsschicht befand umgewickelt). Nach 3—6 Stunden Dialyse blieben nur minimale Spuren Ammonsulfat; die Lösung wurde in

¹⁾ Vorgestellt in der Sitzung der Polnischen Physiologischen Gesellschaft am 21. Januar 1937.

Vacuum bei 20° abgedampft. Es blieben ungefähr 20 mg Schup-pensubstanz übrig, die Aktivität von über 3000 PE/1 mg auf-wiesen (in 4.5% Glycerophosphatlösung, bei 37° und pH 5.5, machen 0.004 mg Phosphatase in 5 Minuten 0.1 mg P. frei, d. h. 1 mg in 1 Stunde — 300 mg P). Manchmal wurden noch stärkere Präparate erhalten. Unsere Ejakulatphosphatasenprä-parate sind leicht lösbar, und geben, wie die stärksten Lösungen von K u t s c h e r (4) nur Spuren von Biu-ret- und negative M o l i s c h - Reaktion. Die wässerigen, salzhaltigen Extrakte von Menschenprostata weisen bis 1400 PE/1 g auf. Die, mittels der Ammonsulfatmethode erhaltenen Prostataphosphatasenpräparate bleiben jedoch stets von Eiweiss-stoffen stark verunreinigt. Die Verluste reichen bis 70%. Die Prostata des Stieres, des Ochsens und des Kalbes zeigt nur eine geringe Aktivität der „saurer“ Phosphatase.

L i t e r a t u r.

D m o c h o w s k i A. C. R. Soc. Biol. 113, 956 (1933). — K u t s c h e r W. und W o l b e r g s H. Zeit. physiol. Chem. 236, 237 (1935). — D m o c h o w s k i A. und A s s e n h a j m D. Naturwiss. (1935), 501.—K u t s c h e r W. und W ö r n e r A. Zeit. physiol. Chem. 239, 109 (1936).

[Zakład Medycyny Sądowej Uniwersytetu S. B. w Wilnie].

S. Schilling-Siengalewicz i B. Puchowski.

Wykrywanie tlenu węgla we krwi przy pomocy fotografii w podczerwieni ¹⁾.

Drogą uczulania płyt fotograficznych przy pomocy pewnych barwików (przede wszystkim z grupy polymethinowej) stało się obecnie możliwym dokonywanie niektórych określeń spektrograficznych w podczerwieni. Eger t, zajmując się tym zagadnieniem, stwierdził między innymi, że CO-Hb oznacza się dużą przepuszczalnością dla promieni pozaczzerwonych (infra czerwonych), zwłaszcza w porównaniu z O-Hb i Hb. M e r k e l b a c h, badając zdolność przepuszczalności CO-Hb dla promieni infra-czerwonych wykazał, że największa różnica w tym kierunku między CO-Hb i O-Hb leży w obrębie długości fal 9000 Å. Autor ten stwierdził również, że po zatruciach tlenkiem węgla przez dłuższy czas, zapomocą fotografii w podczerwieni można wykazać CO-Hb i to wówczas jeszcze, kiedy badania spektroskopowe i inne na CO-Hb wypadają już ujemnie.

Celem przekonania się, czy wykrywanie CO-Hb przy pomocy fotografii w podczerwieni może mieć szersze zastosowanie, zwłaszcza w dziedzinie badań sądowo-lekarskich, wykonano szereg doświadczeń, które doprowadziły do następujących wyników i wniosków:

1°. Metoda jest bardzo czuła i przewyższa pod tym względem spektroskopową i badania chemiczne, polegające na strącaniu białka krwi tlenkowęgłowej i kontrolnej różnymi odczynnikami.

¹⁾ Referat wygłoszony na posiedzeniu Oddziału Polskiego Tow. Fizjologicznego w Wilnie w dniu 27 lutego 1937.

2°. Na wykrycie tlenkowej krwi w podczerwieni nie wpływa, ani jej gnicie, ani też wysychanie.

3°. Już najmniejsze ilości krwi tlenkowej (jedna kropla krwi świeżej lub zaschniętej) można tą metodą wykryć.

4°. Materiał w przypadkach podejrzanych na zatrucie CO może być nadesłany do badań nawet na skrawku papieru, czy też bibule.

[Department of Anatomy, Columbia University]

R. Truskowski and R. L. Zwemer.

Experimental hyperpotassaemia in relation to corticoadrenal function¹⁾.

Experiments are presented which illustrate the effect of single intraperitoneal injections of 10% KCl on blood K in cats; the injections ranged from those giving a barely perceptible effect to a lethal dose. The residual effects of previous potassium administration have been demonstrated by repeated injections at both short and long intervals, and by following the effect of injections in animals which had been previously potassified. When the results with normal animals are compared with those obtained in adrenalectomised cats after K injection, it is found that adrenalectomy impairs the ability to eliminate potassium from the blood stream. The anorectic, muscular, and shock symptoms which accompany experimental hyperpotassaemia are comparable to those of corticoadrenal insufficiency, provided blood potassium is maintained at high levels over several hours by appropriately spaced injections of K salts.

¹⁾ Presented before the Polish Physiological Society, 18.II.1937.

[Zakład Chemii Fizjologicznej Uniwersytetu J. P. w Warszawie]

E. M. Mystkowski.

Rola amylazy w glikolizie mięśniowej ¹⁾.

The rôle of amylase in the glycolysis in muscle.

Rękopis nadesłany w dniu 18.II.1937 r.

Istnienie obok siebie w wyciągach mięśniowych dwóch układów enzymatycznych, jednego prowadzącego do powstawania cukrów prostych z glikogenu, drugiego, bardziej złożonego, prowadzącego do powstawania kw. mlekowego, nasuwało przypuszczenie, że oba te układy stoją ze sobą w jakimś związku w procesie rozpadu glikogenu. Z badań L o h m a n n a ('26) wynikało, że produktem hydrolizy glikogenu w wyciągach oraz w miazdze mięśniowej jest cukier, wykazujący podobieństwo do amylotriozy P r i n g s h e i m a.

W naszych doświadczeniach interesowały nas dwie możliwości rozpadu glikogenu w wyciągu mięśniowym: pierwsza, to fosforylacja nienaruszonej jeszcze cząsteczki glikogenu, druga — to rozpad pod wpływem amylazy z następowem fosforylowaniem produktów rozpadu.

W tym celu staraliśmy się nagromadzić produkty rozpadu glikogenu w dializowanych wyciągach, by potem po dodaniu układu koenzymatycznego prześledzić powstawanie kw. mlekowego. Jednocześnie staraliśmy się przeprowadzić bilans węglowodanowy podczas przemian, zachodzących w wyciągu.

Doświadczenia te wykazały, że ilość cukrów redukujących nagromadzonych w pierwszej fazie doświadczenia (t. j. bez koenzymu) zmniejsza się po dodaniu koenzymu w miarę powstawa-

¹⁾ Rzecz zgłoszona na posiedzenie Oddziału Polskiego Towarzystwa Fizjologicznego w Warszawie w dniu 18.II.1937 r.

nia kw. mlekowego. Jednocześnie okazało się, że po dodaniu koenzymu krzywa rozpadu glikogenu nie ulega żadnym większym zaburzeniom, natomiast zmniejsza się całkowita ilość cukrów, oznaczana po hydrolizie HCl. Wyniki te przemawiały za tym, że rzeczywiście w pierwszym etapie powstawały najpierw produkty rozpadu glikogenu, które po dodaniu układu koenzymatycznego ulegały dalszym przemianom do kw. mlekowego. Istotę tego zagadnienia udało się jednak wyjaśnić w związku z pracami P a r n a s a i współpracowników, którzy wykazali, że w pierwszym etapie powstaje kw. heksozomonofosforowy, który ulega dalszym przemianom po dodaniu układu koenzymatycznego. Tym samym sprawa udziału amylazy w rozpadzie glikogenu nie została rozstrzygnięta, przesunęła się tylko jeszcze bardziej w bezpośrednie sąsiedztwo glikogenu.

Metodyka, którą zastosowaliśmy w następnej serii doświadczeń była taka sama, jak poprzednio: do dializowanego wyciągu dodawaliśmy glikogenu i oznaczaliśmy ilość glikogenu, cukrów redukujących oraz fosforu nieorganicznego.

Tabela I.

A.

	Cukier mg		Fosfor mg	
	1	2	1	2
0	0	0	0.0199	0.0199
2 h	13.2	13.2	0.0059	0.0111

1 wyciąg + glikogen + woda

2 „ + „ + amylaza

B.

	Fosfor w mg			
	1	2	3	4
0	1.6180	1.6180	1.6180	1.5232
10'	1.4768	1.5232	0.9174	1.2106
1 h	1.2778	1.4768	0.4028	1.1105
ubytek	0.3402	1.1412	1.2152	0.4074

1 wyc. A + fosforany

2 „ + „

3 wyc. + glik. + fosf. + woda

4 „ + „ + „ + amylaza

Do dializowanego wyciągu dodano glikogenu i pozostawiono na 2 godz. w termostacie przy 37°; jedna z kolbek zawierała

rozcieńczoną ślinę, druga odpowiednią ilość wody (A). Po 2 godz. oznaczono cukry redukujące oraz dodano odpowiednią ilość fosforanów (B). W układzie (B) oznaczono fosfor po 10 min. i 1 godz. Fosforylacja w obu tych układach była niewielka, tam gdzie mniej glikogenu pozostało nierozłożonego mniejsza, niż tam, gdzie amylazy nie dodano. Kontrolą w tym doświadczeniu był układ, gdzie fosforany oraz amylazę dodawano od początku doświadczenia. W tym układzie, gdzie ślina była dodana od początku doświadczenia, fosforylacja była również niewielka w porównaniu z układem bez śliny.

Wyniki te wskazują, że ani produkty rozpadu glikogenu, nagromadzone w ciągu dwugodzinnego rozkładu, ani też wyższe produkty, powstające bezpośrednio podczas działania amylazy, nie ulegają fosforylacji. Stwierdza się natomiast zjawisko konkurencji o substrat między amylazą a układem glikolitycznym, w tym sensie, że jeśli amylaza atakuje glikogen, wówczas fosforylacja ulega zahamowaniu, przy czym zahamowanie to jest tym większe, im mniej nierozłożonego glikogenu pozostało w układzie.

Proces fosforylacji jest procesem bardzo szybkim, szybkość rozpadu glikogenu tą drogą w wyciągu mięśniowym jest znacznie większa, niż w układach, gdzie fosforanów nie dodano.

Dla porównania przytaczamy odpowiednie liczby.

Tabela II.

	Wyciąg + glikogen + fosforany				Wyciąg + glikogen bez fosforanów			
	Glikogen	Glukoza	Fosfor	Ubyt. fosf	Glikogen	Glukoza	Fosfor	Ubyt. fosf.
0	10.1	—	1.6284	—	10.1	—	0.0615	—
1 h	1.8	2.1	0.5850	1.0434	6.4	—	0.0229	0.0386
2 h	1.5	2.3	0.5694	1.0590	5.4	1.2	0.0276	0.0339
3 h	—	2.8	0.5538	1.0746	1.76	4.2	0.0336	0.0279
4 h	0.78	2.3	0.5070	1.1214	1.6	4.0	0.0388	0.0228

po 2 h dodano amylazę.

W układach, gdzie fosforanów nie dodano, zachodzi również fosforylacja; odbywa się to kosztem fosforanów, zawartych w wyciągu. Pomimo bardzo długotrwałej dializy, do 26 godzin, nie udawało się nam nigdy uwolnić całkowicie wyciąg od fosforanów. Ilość ich jest wprawdzie niewielka, jednak po dodaniu

glikogenu fosforylacja zachodzi, ilość fosforu nieorganicznego zmniejsza się.

Wobec tego powstało zagadnienie, czy rozkład glikogenu w warunkach, gdy do wyciągu nie dodano fosforanów, jest zależny od amylazy, czy też jest to jedynie powolny rozpad drogą fosforylacji. Innymi słowy zagadnienie sprowadza się do tego, czy wogóle można mówić o istnieniu amylazy w mięśniu. Sprawa ta nie jest jeszcze całkowicie wyjaśniona, jednak za istnieniem amylazy przemawia doświadczenie, w którym w wyciągu dializowanym przez 36 godz., po dodaniu glikogenu, stwierdzono pomimo braku zmian w ilości fosforu po 8 godz. powstanie dość dużej ilości cukrów redukujących.

Wyciągi długo dializowane tracą znacznie na aktywności, jeśli idzie o fosforylację. W przypadku dializy 36 godz. ilość fosforu po 1 godz. zmniejszyła się z 1.208 mg do 0.908 mg, w tym samym czasie rozłożyło się zaledwie około 3.3 mg glikogenu.

Nie bez znaczenia dla procesu fosforylacji jest obecność pewnych jonów. Tak więc stwierdziłem, że fosforylacja w obecności NaCl przebiega wolniej, niż w obecności KCl. Doświadczenia te jednak nie są zakończone i wymagają potwierdzenia.

Wnioski z dotychczas wykonanych doświadczeń dają się wyprowadzić następujące: amylaza nie bierze udziału w procesach glikolitycznych w wyciągach mięśniowych; fosforylacji ulega nierozłożona cząsteczka glikogenu; ilość amylazy w wyciągach mięśniowych jest bardzo niewielka; istnieje pewien antagonizm między działaniem amylazy w wyciągach mięśniowych a działaniem układu glikolitycznego.

W świetle tych doświadczeń nieco inaczej przedstawiają się badania L o h m a n n a nad amylazą mięśniową; autor ten oznaczał bowiem w swych doświadczeniach w obecności fosforanów nie cukry redukujące, lecz kwas heksozomonofosforowy.

[Zakład Fizjologii Instytutu im. Nenckiego T. N. W. i Zakład Fizjologii
Zwierząt Uniwersytetu J. P. w Warszawie].

K. Białaszewicz.

**Badania nad przemianą materii i energii w czasie rozwoju
owadów. IV. Zmiany składu chemicznego jedwabników
w ostatnim okresie ich życia larwalnego.**

*Recherches sur le métabolisme chimique et énergétique au cours
du développement des Insectes. IV. Variations de la composi-
tion chimique des vers à soie pendant la dernière période de
leur vie larvaire.*

Rękopis nadesłany w dniu 1.III.1937.

Le travail présent a eu pour but l'étude des variations de la composition chimique des vers à soie pendant la cinquième, c'est-à-dire dernière période de leur vie larvaire. A cet effet on effectuait tous les jours chez des chenilles élevées dans des conditions constantes de température (25^o) et d'humidité (70%), des dosages d'azote total, de la chitine, du glycogène, des acides gras et des substances non-saponifiables (v. tabl. I). Les méthodes d'analyse chimique dont on s'est servi permettaient d'effectuer tous ces dosages sur un seul échantillon de chenilles.

Au point de vue de l'évolution de la composition chimique des chenilles nous traitons séparément la période de croissance, où nous déterminons la marche de l'assimilation des constituants du corps et la période consécutive à la croissance qui précède l'état de chrysalide, où nous tâchons de suivre les transformations chimiques subies par les substances organiques accumulés au cours de la croissance.

Nous pouvons résumer ainsi les résultats de notre travail.

La teneur relative des chenilles en eau (tabl. II) subit pendant la dernière période de leur vie larvaire des variations notables. Pendant la période de croissance proprement dite le pourcentage d'eau — après un court accroissement de rétention au début de l'alimentation — diminue régulièrement à cause de la prédominance d'assimilation toujours plus grande des composants organiques. L'augmentation constante de la quantité relative de ces composants, observée pendant toute la période consécutive à la croissance, résulte uniquement des pertes d'eau (fig. 1), subies par les animaux soit par perspiration, soit par l'élimination du liquide de tube digestif (purgation), soit, enfin, par le dessèchement des sécrétions des appareils séricigènes pendant le filage du cocon.

Les variations de la composition chimique des substances organiques des chenilles qui ont lieu pendant la période de croissance proprement dite consistent, en grandes lignes, en une augmentation progressive de la teneur relative en acides gras et en glycogène (tabl. III). Ces variations résultent du parcours particulier et de la succession dans le temps d'ondes assimilatrices, caractéristiques des composants du corps (fig. 2). C'est ainsi que l'assimilation des protides — processus le plus intense qui débute avec les premiers moments de l'alimentation — présente deux maxima d'intensité correspondant probablement: le premier aux accroissements maxima des protides qui prennent part à l'organisation du corps, le second à la production maximale des constituants protéiques de la soie. De même la synthèse de la chitine est un processus qui commence relativement tôt, mais son maximum d'intensité tombe déjà au cours des premiers jours de la croissance et finit rapidement. La vitesse d'accumulation des substances non-saponifiables a une allure à peu près pareille. L'accumulation des acides gras est par contre un phénomène plus tardif: elle devient plus marquée à partir du troisième jour de l'alimentation et manifeste alors une vitesse presque constante jusqu'à la fin de la croissance. Enfin le processus de glycogénèse est relativement le plus tardif, car il ne s'active que pendant les dernières étapes de la croissance.

Pendant la période d'après-croissance les composés organiques, assimilés pendant l'alimentation des chenilles, ne subissent que des variations insensibles (fig. 3). Cela concerne surtout la chitine et les acides gras qui jusqu'au moment de nymphose restent en quantité accumulée pendant la période de croissance. Les substances non-saponifiables subissent une diminution visible. Par contre, pendant cette période, le glycogène présente le caractère le plus labile, car la réserve de cette substance diminue notablement pendant le travail du filage, après quoi, pendant la période qui précède la transformation de la chenille en chrysalide, il régénère promptement.

W poprzedniej pracy, dotyczącej fizjologii rozwoju jedwabnika (B i a ł a s z e w i c z '36), zostały podane wyniki poszukiwań nad bilansem przemian chemicznych i energetycznych, które zachodzą w czasie odżywiania gąsienic w ostatnim okresie ich życia. Wyniki te dały podstawę do ustalenia globalnego zużycia substancyj, pobieranych w pokarmie, i ich udziału w procesach przemiany katabolicznej i anabolicznej u rosnących zwierząt.

W dalszym rozwinięciu naszych poszukiwań nad jedwabnikiem wysunęła się uzasadniona potrzeba przeprowadzenia analizy przebiegu procesów asymilacyjnych w okresie wzrostu oraz zbadania przekształceń chemicznych, jakim przyswojone w tym okresie substancje organiczne ulegają w końcowej, poprzedzającej metamorfozę, fazie życia gąsienic.

Jako jedną z dróg, wprowadzających w to zagadnienie, wybraliśmy poznanie składu chemicznego gąsienic w kolejnych momentach wzrostu i okresu przygotowawczego do metamorfozy.

W badaniach nad składem chemicznym gąsienic jedwabnika¹⁾ stosunkowo najwięcej uwagi poświęcono ostatnim momentom ich życia, przy-

¹⁾ Doskonałe zestawienie krytyczne wyników badań nad zmianami chemicznymi w czasie późnych stadiów larwalnych i metamorfozy u jedwabników i u innych owadów znajduje się w referacie D o r o t h y M. N e e d h a m ('29).

padającym na okres od początku snucia jedwabiu do chwili zapoczwarczenia się. Głównym tematem tych poszukiwań była sprawa zmian w zawartości składników węglowodanowych i tłuszczowych w ciele gąsienic.

B a t a i l l o n i C o u v r e u r ('92), a następnie — B a t a i l l o n ('93) poraz pierwszy stwierdzili, że w okresie snucia, w którym jak wiadomo gąsienice nie pobierają pokarmu, zawartość glikogenu zwiększa się prawie dwukrotnie i że jednocześnie zjawia się wolna glukoza, której zawartość wzrasta równolegle do glikogenu. Opisane zachowanie się glikogenu zostało następnie potwierdzone przez V a n e y ' a i M a i g n o n ' a ('06), natomiast późniejsze badania K o t a k e i S e r a ('09), przeprowadzone na pięciu hodowlach jedwabników, stwierdzają w większości przypadków wyraźny ubytek zawartości glikogenu w miarę snucia kokonu i zbliżania się do stadium poczwarki.

W pracy późniejszej C o u v r e u r ('95), nawiązując do swoich poprzednich obserwacji nad zachowaniem się glikogenu i stwierdzając stałe w okresie snucia zmniejszanie się w ciele gąsienic zawartości tłuszczów, przychodzi do wniosku, że źródłem powstającego glikogenu są tłuszcze. Przypuszczenie to zostało silnie podważone przez badania K o t a k e i S e r a ('09), którzy zarówno w okresie przedpoczwarkowym, jak i w czasie metamorfozy jedwabników stwierdzają jednoczesne zużywanie się obu tych składników.

Sprawie zachowania się ciężaru ciała gąsienic oraz związanej z tym straty wody w czasie snucia jedwabiu i w okresie przedpoczwarkowym poświęcono liczne i wyczerpujące obserwacje (K e l l n e r '84, L u c i a n i i L o M o n a c o '97, L u c i a n i i T a r u l l i '95, F a r k a s '03, V a n e y i M a i g n o n '06, J u c c i '22, A k a o '32).

Wcześniejsze stadia rozwoju larwalnego jedwabników, a zwłaszcza okresy wzrostu, były badane z punktu widzenia chemicznego przez nielicznych autorów. Do rzędu dawniejszych w tym zakresie poszukiwań należy praca K e l l n e r a ('84), który oznaczał w gąsienicach, znajdujących się w czterech kolejnych okresach snu larwalnego, niektóre składniki (azot, chitynę, tłuszcze, bezazotowe substancje wyciągowe, popiół, niektóre składniki mineralne) i nie znalazł w tych stadiach wybitniejszych różnic w składzie chemicznym, oraz badania L u c i a n i e g o i L o M o n a c o, którzy podają wyniki ważeń gąsienic i oznaczeń w nich azotu przez cały czas trwania rozwoju larwalnego. Z prac nowszych należy wymienić publikację A k a o ('32), zawierającą wyniki codziennych ważeń gąsienic oraz oznaczeń azotu całkowitego, azotu zasad purynowych, kwasu moczowego i fosforu, oraz znaną mi w krótkim streszczeniu pracę autorów japońskich (Y o n e z a w a i Y a m a f u j i '35), którzy — uwzględniając różnice płci gąsienic — badali w ostatnim okresie wzrostu i w czasie metamorfozy zawartość niektórych składników chemicznych ciała (woda, węglowodany, tłuszcze, azot białkowy, popiół, fosfor całkowity i organiczny, tłuszcze i ich liczbę zmydlania, jodową i kwasową, oraz skład aminokwasowy białek).

W zakresie chemizmu wzrostu larwalnego innych gatunków owadów istnieje dosyć obfita literatura. Znajdujący się w niej materiał faktyczny nie daje jednak podstaw dostatecznych do wyprowadzania ogólniejszych wniosków o charakterze porównawczo-fizjologicznym. Z pośród najważniejszych prac wymieniamy następujące.

Przed wszystkim — badania nad rozwojem larwalnym wilczomlecza (*Deilephila euphorbiae*), przeprowadzone przez A b d e r h a l d e n a ('23), który w rosnących gąsienicach oznaczał zawartość wody, azotu i popiołu, oraz prace Hellera ('26, '28). W pracach tego autora — obok dokładnych i wielostronnych poszukiwań nad przemianą materii w czasie metamorfozy — znajdujemy również dane, dotyczące zużycia tłuszczów i „wyciągowych związków bezazotowych” w okresie przepoczwarczenia się gąsienicy wilczomlecza: dane te dają autorowi asumpt do wykazania różnicy w przemianie materii, jaka w tym okresie rozwoju zachodzi między gąsienicami wilczomlecza i jedwabnika (Kellner '84).

Następnie podajemy serję prac Rudolfs'a ('26, '27, '29, '32) nad składem chemicznym rozwijających się jaj, gąsienic i poczwerek prądkki *Malacosoma americana*: wykonane przez tego autora oznaczenia wody, tłuszczów, azotu, popiołu, siarki i glikogenu dają obraz zmian składu chemicznego, które zachodzą w rocznym cyklu rozwojowym zwierzęcia.

W zakresie rozwoju d w u s k r z y d ł y c h istnieją badania W e i n l a n d a ('06) nad *Calliphora vomitoria*, T a n g l a ('09) nad *Ophyra cadaverina* oraz B l a n c h a r d ' a i D i n u l e s c u ('32) nad *Gastrophilus equi*.

Rozwój larwalny p s z e z ó ł stanowił przedmiot poszukiwań S t r a u s s a ('11) oraz N e l s o n a i S t u t e v a n t a ('24).

Wyniki wyżej wymienionych badań, przeprowadzonych na różnych gatunkach owadów, jak również wyniki, otrzymane na jednym i tym samym gatunku przez różnych autorów, są w znacznej mierze nieporównywalne z sobą. Przyczyną tego jest nie tylko niejednorodność warunków, w jakich były hodowane zwierzęta doświadczalne, oraz różnorodność i niejednakowa dokładność stosowanych metod chemicznych, ale w stopniu nie mniejszym — niejednorodność materiału analizowanego.

W poszukiwaniach niniejszych ten moment niejednorodności starano się — przynajmniej częściowo — ominąć, przeprowadzając oznaczenia wszystkich badanych składników w jednej i tej samej próbce materiału, który był pobierany w kolejnych stadiach ostatniego okresu życia larwalnego jedwabników.

Metodyka.

Gąsienice, przeznaczone do analiz chemicznych, pochodziły z jednej wspólnej hodowli jedwabników (*Bombyx mori* L., francuzka rasa warska), prowadzonej w stałej temperaturze i wilgotności. Doświadczenia obejmują okres rozwoju, poczynający się od czwartej wylinki a kończący się momentem zapoczwarczenia się.

Hodowlę doświadczalną prowadzono w sposób następujący.

Z ogólnej hodowli gąsienic, które znajdowały się po czwartym okresie snu i w momencie zrzućcia skórki, wybrano pewną ilość osobników samicych, możliwie zbliżonych do siebie pod względem ciężaru ciała (0.9 — 1.0 g). Gąsienice te, w liczbie około 100, przeniesiono do powietrznego termostatu szklanego o pojemności 0.2 m³, który ogrzewano prądem elektrycznym do stałej temperatury 25⁰ (± 0.1) i w którym powietrze, często odświeżane, było nasycone parą wodną do 70%. W termostacie tym zwierzęta pozostawały przez cały czas trwania doświadczenia, a więc — zarówno w okresie odżywiania i wzrostu, jak i w stadiach późniejszych, poprzedzających metamorfozę.

Z hodowli tej brano co pewien czas określoną (2—5) liczbę gąsienic, ważono je (ciężar brutto) i przenoszono — celem usunięcia z przewodu pokarmowego resztek wydaliny — na przeciąg jednej doby do krystalizatorów, które pozostawiano w termostacie. Po upływie tego czasu, który wystarczał do wydalenia resztek niestrawionego pokarmu, gąsienice ponownie ważono (ciężar netto) i w stanie świeżym używano do analiz.

W zwierzętach, przygotowanych do analizy w powyższy sposób, oznaczano azot całkowity (t. j. azot chityny i resztę azotu), glikogen, kwasy tłuszczowe i substancje niezmydlające się.

W celu uzyskania możności wykonywania wszystkich tych oznaczeń w jednej próbie gąsienic, metody Kjeldahla, Pflügera i Kuma g a w a - S u t o połączono razem i wykonywano w następującej kolejności.

Przede wszystkim — znajdujące się w próbce żywe gąsienice krajano nożyczkami każdą na kilka kawałków i wrzucano do kolbki, zawierającej ogrzany do 100⁰ 60% roztwór KOH w ilości, która po wprowadzeniu wody, zawartej w zwierzętach, odpowiadałaby ostatecznie 30% stężeniu ługu. Po zmieszaniu zawartości, kolbkę zamykano korkiem gumowym z wentylem szklanym, w którym umieszczano — celem uniknięcia strat azotu w postaci powstającego w czasie hydrolizy amoniaku — kilka kropeł rozcieńzonego HCl w indykatorom. Kolbkę wstawiano następnie na łaźnię wodną i ogrzewano w przeciągu trzech godzin, niezbędnych do uwolnienia glikogenu z tkanek, przeprowadzenia białek w stan rozpuszczalny i zmydlenia tłuszczów obojętnych.

Po ukończeniu hydrolizy zasadowej, zawartość kolbki i wentyla przenoszono ilościowo do zlewki, optókując taką samą w przybliżeniu objętością wody destylowanej i dodawano podwójną objętość 95⁰ alkoholu etylowego. W osadzie po upływie doby znajdowała się całkowita ilość glikogenu oraz nierozpuszczalna w ługu na gorąco chityna. Chitynę oddzielano od glikogenu na sączku, rozpuszczając glikogen, przemyty poprzednio alkoholem i eterem, w strumieniu wrzącej wody. Chitynę wraz z sączkiem spalano i oznaczano w niej azot metodą Kjeldahla, z roztworem zaś wodnym glikogenu postępowano według wskazówek metody Pflügera, oznaczając w oczyszczonym i zhydrolizowanym roztworze glukozę według Bertranda.

Przesącz i zlewki, po oddzieleniu glikogenu i chityny, łączono razem, przenoszono do parowniczk, zlekką zakwaszano kwasem solnym i odparowywano do małej objętości. Ciecz, pozostałą po odpędzeniu alkoholu i nadmiaru wody, przenoszono następnie do rozdzielacza, dodając stężonego HCl, i postępowano dalej w ekstrahowaniu, oddzielaniu i oznaczaniu kwasów tłuszczowych i substancyj niezmydlających się ściśle według wskazówek metody K u m a g a w a - S u t o.

Roztwór, pozostały w rozdzielaczu po wyekstrahowaniu substancyj rozpuszczalnych w eterze, przenoszono do kolby miarowej, uzupełniano do znaku i w części jego oznaczano azot metodą K j e l d a h l a. Po przeliczeniu na ilość całkowitą, otrzymywano azot związków rozpuszczalnych w ługu. Azot całkowity gąsienic obliczano jako sumę azotu rozpuszczalnego w ługu i azotu, zawartego w chitynie.

Wyniki analiz (por. tab. I) wyrażano w procentach zawartości składników oznaczanych w masie żywej (ciężar netto) gąsienic.

Powyższy sposób postępowania wyłączał oczywiście możliwość oznaczenia w tej samej próbce gąsienic zawartości wody i substancyj stałych (wzgl. organicznych). Z tego powodu zawartość tych składników oceniano pośrednio, obliczając ilość substancji organicznej jako sumę znalezionych w gąsienicy białek ($N \times 6.25$), glikogenu, tłuszczów obojętnych (kwasy tłuszczowe $\times 1.053$) i substancyj niezmydlających się¹⁾, ilość zaś wody — z różnicy między ciężarem świeżym a obliczoną w powyższy sposób zawartością substancji organicznej, nie uwzględniając w tych wyliczeniach małych zresztą ilości składników popielnych (por. tab. II).

C z ę ś ć d o ś w i a d c z a l n a.

W badanym odcinku rozwoju larwalnego jedwabników odróżniamy szereg następujących po sobie okresów, ważnych z punktu widzenia zachodzących w tym czasie procesów fizjologicznych:

1°, okres ż e r o w a n i a, rozpoczynający się zaraz (w kilka lub kilkanaście minut) po zrzuceniu czwartej skórki: w tym stadium rozwoju wypada nam jeszcze wyróżnić okres właściwego w z r o s t u, kończący się z chwilą osiągnięcia największego przyrostu ciężaru ciała, oraz krótkotrwały okres ż e r o w a n i a

¹⁾ Obliczona w ten sposób ilość substancji organicznej jest mniejsza od znalezionej z różnicy między ciężarem masy suchej i popiołu. Główną przyczyną tej różnicy należy, zdaniem naszym, upatrywać we współczynniku azotowym białek ciała, którego wartość dla gąsienic jedwabnika nie jest znana. Rozbieżność ta nie wpływa jednak zasadniczo na ostateczne nasze wyniki, które dotyczą względnych zmian składu chemicznego gąsienic, jako funkcji czasu.

Tabela I.

Skład chemiczny gąsieniec w różnych momentach ostatniego okresu larwalnego, w procentach ciężaru ciała. Początek doświadczenia dn. 2.VII, 23.00, 1935. Temperatura stała 25°.

Composition chimique des chenilles à différents moments de la dernière période larvaire en pour cent du poids du corps. Début de l'expérience le 2.VII, 23.00, 1935. Température constante 25°.

1	2	3	4		5		6			7		8		9		10		11	
			Ciężar gąsienicy Poids		Azot Azote		Glikogen Glycogène		kwas acides		substancje substances		kwas acides		substancje substances		kwas acides		substancje substances
Nr. analizy	Czas od początku odżywiania Temps à partir de début de l'alimentation	Liczba gąsieniec w próbie Nombre de chenilles prises comme échantillon	brutto brut d'une chenille	netto net d'une chenille	chityny de chitine	rozpuszczalny w KOH soluble dans la KOH	całkowity total	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
1 ¹⁾	0	5	—	0.985	0.048	0.998	1.046	0.089	0.568	0.151	0.089	0.568	0.151	0.089	0.568	0.151	0.089	0.568	0.151
2 ²⁾	0.87	5	1.387	1.336	0.043	0.891	0.934	0.069	0.471	0.108	0.934	0.471	0.108	0.934	0.471	0.108	0.934	0.471	0.108
3 ³⁾	1.87	4	2.199	2.097	0.054	0.926	0.980	0.060	0.845	0.111	0.926	0.845	0.111	0.926	0.845	0.111	0.926	0.845	0.111
4 ²⁾	2.78	3	3.626	3.365	0.047	1.011	1.058	0.114	1.488	0.115	1.011	1.488	0.115	1.011	1.488	0.115	1.011	1.488	0.115
5 ²⁾	3.67	2	4.005	3.753	0.046	1.201	1.247	0.159	1.751	0.118	1.201	1.247	0.159	1.201	1.247	0.159	1.201	1.247	0.159
6 ²⁾	5.63	2	5.385	4.891	0.030	1.568	1.602	0.646	2.405	0.106	1.568	1.602	0.646	1.568	1.602	0.646	1.568	1.602	0.646
7 ³⁾	6.58	2	5.005	4.327	0.048	1.770	1.818	0.663	2.562	0.120	1.770	1.818	0.663	1.770	1.818	0.663	1.770	1.818	0.663
8 ³⁾	7.79	3	—	3.557	0.051	2.032	2.083	0.982	3.403	0.107	2.032	2.083	0.982	2.032	2.083	0.982	2.032	2.083	0.982
9 ⁴⁾	8.62	3	—	3.393 ⁶⁾	0.057	2.297	2.354	0.727	3.290	0.111	2.297	2.354	0.727	2.297	2.354	0.727	2.297	2.354	0.727
10 ⁴⁾	9.75	3	—	2.586 ⁶⁾	0.066	2.601	2.667	0.809	4.175	0.128	2.601	2.667	0.809	2.601	2.667	0.809	2.601	2.667	0.809
11 ⁴⁾	10.52	3	—	2.700 ⁶⁾	0.069	2.904	2.973	1.088	3.917	0.191	2.904	2.973	1.088	2.904	2.973	1.088	2.904	2.973	1.088
12 ⁵⁾	11.58	5	—	2.313 ⁶⁾	0.081	3.234	3.315	1.789	4.797	0.078	3.234	3.315	1.789	3.234	3.315	1.789	3.234	3.315	1.789

1) Gąsieniec w okresie czwartej wylinki. — Chenilles pendant leur quatrième mue.

2) Okres wzrostu gąsieniec. — Période de croissance des chenilles.

3) Okres powrotowy żerowania. — Période d'alimentation consécutive à la croissance.

4) Okres snucia kokonu. — Période de filage du cocon.

5) Poczwarka. — Chrysalide.

6) Ciężar zwierzęcia wraz z oprzędem. — Poids de l'animal avec le cocon.

p o w z r o s t o w e g o, w którym gąsienice pomimo pobierania dużych ilości pokarmu tracą na wadze; 2°, okres p r z y g o t o w a w c z y d o s n u c i a (lub — okres wspinania się), który charakteryzuje się tym, że zwierzęta porzucają pokarm, stają się ruchliwe, poszukują odpowiedniego miejsca do snucia i zakładają wreszcie pierwsze przęśla pod budowę kokonu, tracąc w tym czasie — wskutek wyrzucania z przewodu pokarmowego cieczy i resztek wydaliny stałych — około $\frac{1}{3}$ ciężaru ciała; 3°, okres s n u c i a, połączony z nieustającym ruchem wahadłowym przedniej części ciała oraz 4°, okres p r z y g o t o w a w c z y d o m e t o m o r f o z y (lub przedpoczwarkowy), rozpoczynający się od chwili ukończenia snucia kokonu, a kończący się zapoczwarczeniem się nieruchomej gąsienicy.

Średni czas trwania tych czterech okresów ma się względem siebie, jak 72 : 3 : 18 : 7, z czego wynika, że około 90% czasu przypada na żerowanie i na snucie i tylko 10% na procesy przygotowawcze do snucia i do metamorfozy.

W przedstawieniu wyników niniejszej pracy zastanowimy się głównie na okresie wzrostu, który trwa stosunkowo najdłużej i w którym odbywają się największe zmiany w składzie chemicznym substancji organicznej gąsienic. Bliższą analizę tych procesów poprzedzimy jednak ogólną charakterystyką zmian, jakie zachodzą w ustosunkowaniu się w gąsienicach substancji organicznej do wody w całym ostatnim okresie rozwoju larwalnego.

I. Zawartość wody i substancji organicznej.

Okres rozwoju, zawarty między czwartą wylinką a początkiem metamorfozy, charakteryzuje się bardzo wybitnymi zmianami w ustosunkowaniu się składników stałych do wody.

Jak wynika z tab. II, największy stopień uwodnienia wykazują gąsienice w okresie ostatniej wylinki i w czasie pierwszych dwu dni żerowania. W tym czasie, gdy ciężar gąsienicy zwiększa się więcej niż dwukrotnie, zawartość wody w organizmie wynosi średnio ok. 93%, zwiększając się przejściowo w pierwszym dniu odżywiania do 95.4%.

W okresie zatym pierwszych dwu dni żerowania udział substancji organicznej i wody w przyroście ciężaru ciała jest

Tabela II.

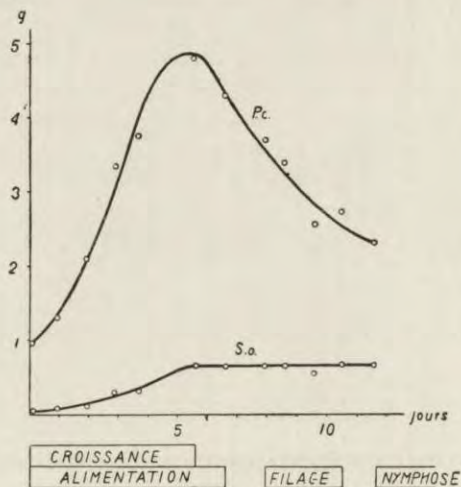
Zawartość w gąsienicach składników organicznych (białek, glikogenu, tłuszczów, substancji niezmydlających się) i wody w ostatnim okresie rozwoju larwalnego.

Teneur des chenilles en composants organiques (protides, glycogène, graisses, substances non-saponifiables) et en eau pendant la dernière période du développement larvaire, calculée d'après les données du tabl. I.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Nr. analizy	Czas od początku odżywiania <i>Temps à partir de début de l'alimentation</i> dni - jours	Przeciętny ciężar netto jednej gąsienicy <i>Poids net moyen d'une chenille</i> g	Zawartość w jednej gąsienicy <i>Teneur d'une chenille en</i>						wody <i>eau</i> g	Zawartość substancji organicznej w gąsienicy <i>Teneur des chenilles en subst. organique</i> %
			białek (N X 6,25) <i>protides</i> mg	glikogenu <i>glycogène</i> mg	tłuszczów obojętnych (kw. tl. X 1,053) <i>graisses neutres</i> mg	substancji niezmydlających się <i>substances non-saponifiables</i> mg	substancji organicznej <i>substance organique</i> g	g		
1	0	0,985	64,6	0,87	5,89	1,48	0,0728	0,912	7,4	
2	0,87	1,336	78,8	0,92	6,63	1,44	0,0878	1,248	6,6	
3	1,87	2,097	128,5	1,22	18,7	2,32	0,1507	1,946	7,2	
4	2,78	3,365	222,7	3,82	52,7	3,88	0,2831	3,082	8,4	
5	3,67	3,753	292,6	6,00	69,2	4,49	0,3723	3,381	9,9	
6	5,63	4,891	492,9	31,6	124,0	5,18	0,6537	4,237	13,4	
7	6,58	4,327	492,9	28,7	116,8	5,19	0,6436	3,683	14,9	
8	7,79	3,557	463,2	34,9	127,5	3,80	0,6294	2,927	17,7	
9	8,62	3,393	499,0	24,7	117,5	3,78	0,6449	2,748	19,0	
10	9,75	2,586	431,0	20,9	113,7	3,32	0,5689	2,017	22,0	
11	10,52	2,700	502,0	29,4	115,6	5,16	0,6521	2,048	24,1	
12	11,58	2,314	479,5	45,0	116,9	1,78	0,6432	1,671	27,8	

prawie jednakowy, z tym jedynie ograniczeniem, że w pierwszych chwilach po wylince gąsienice zatrzymują w swoim ciele więcej wody, niż składników organicznych, pobranych w pokarmie.

Momentem przełomowym pod tym względem jest trzeci dzień odżywiania się: w dniu tym bowiem następuje zasadnicza zmiana w stosunku nasilenia asymilacji składników organicznych do szybkości inkorporowania wody. Od tej chwili począwszy stwierdzamy istotnie aż do końca wzrostu stałą przewagę przyswajania części stałych organizmu nad retencją wody. W wyniku tej przewagi zawartość substancji organicznej zwiększa się w ciągu całego wzrostu z 7.4% do 13.4% wagi świeżej gąsienic.



Rys. 1. Zmiany ciężaru ciała (krzywa P.c.) i bezwzględnej zawartości substancji organicznej (krzywa S.o.) w gąsienicach jedwabnika, w ostatnim okresie rozwoju larwalnego. Według danych tabeli II.

Fig. 1. Variations du poids du corps (courbe P.c.) et de la quantité absolue de substance organique (courbe S.o.) chez les chenilles du bombyx pendant la dernière période du développement larvaire. D'après les données du tabl. I.

Zakończenie wzrostu jest jednocześnie chwilą osiągnięcia przez gąsienicę największej bezwzględnej zawartości substancji organicznej (por. tab. II, kol. 8 i rys. 1), której ilość nie wykazuje — praktycznie biorąc — widocznych zmian ani w okresie powzrostowym żerowania, ani też w późniejszych poprzedzają-

cych metamorfozę okresach życia larwalnego, w których procesy przemiany odbywają się wyłącznie kosztem nagromadzonych w czasie wzrostu składników ciała.

Stwierdzone już p o u k o ń c z o n y m w z r o ś c i e (tab. II, kol. 10) stałe zwiększanie się procentowej zawartości substancji organicznej jest więc wynikiem prawie wyłącznie eliminowania wody z ciała gąsienicy. W samym tylko czasie od ukończenia wzrostu do rozpoczęcia snucia zwierzęta nasze straciły przeszło 30% wody (= 1.31 g, por. rys. 1). Na początek tych strat należy odnieść oprócz wody perspiracyjnej tę ilość wody, którą gąsienice wyrzucają z przewodu pokarmowego bezpośrednio przed rozpoczęciem snucia kokonu.

Późniejszy wzrost względnej zawartości substancji organicznej w gąsienicy wraz z kokonem (z 17.7 do 27.8%), zachodzący w czasie snucia i w okresie przygotowawczym do metamorfozy, należy przypisać przeważnie stracie wody w czasie schnięcia kokonu.

II. Zmiany składu chemicznego substancji organicznej.

Rzut oka na tab. II wystarczy, by stwierdzić, że główne zmiany w składzie procentowym substancji organicznej gąsienic zachodzą w okresie ich wzrostu. Z tego powodu procesy chemiczne, odbywające się w tym okresie, rozpatrzmy przede wszystkim.

1. Okres wzrostu gąsienic.

O zmianach, jakie występują we wzajemnym stosunku ilościowym składników organicznych ciała, jako funkcji wzrostu, dają ogólne pojęcie obliczenia składu procentowego substancji organicznej w poszczególnych momentach rozwoju gąsienic (tab. III). Wyliczenia te przeprowadzono w założeniu, że substancję organiczną stanowią wyłącznie składniki przez nas oznaczane, t. j. białka, glikogen, tłuszcze obojętne i substancje niezmydlające się.

Tabela III.

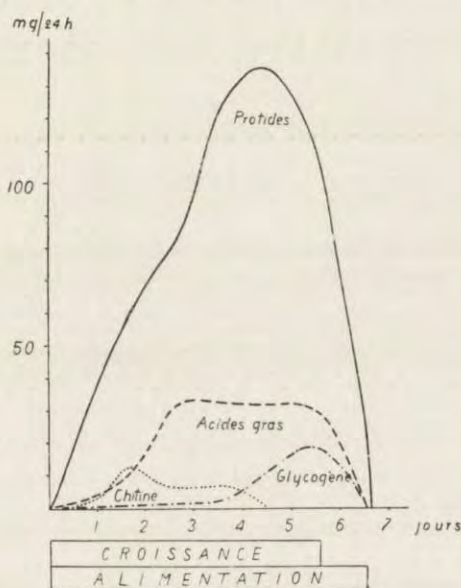
Skład procentowy substancji organicznej gąsienic w ostatnim okresie życia larwalnego.
Composition de la substance organique des chenilles pendant la dernière période larvaire (en %).

Nr. analizy Nr. de l'analyse	Czas od początku odżywiania Temps à partir de début de l'alimentation	Zawartość substancji organicznej w jednej gąsienicy Teneur d'une chenille en substance organique	Zawartość w substancji organicznej Teneur de la substance organique en			
			glikogenu glycogène	kwasów tłuszczowych acides gras	substancji niezmydlających się substances non-saponifiables	białek (N × 6.25) protides
			mg	%	%	%
1	0	72.8	1.2	7.7	2.0	88.7
2	0.87	87.8	1.0	7.2	1.6	89.9
3	1.87	150.7	0.8	11.7	1.5	85.4
4	2.78	283.1	1.3	17.7	1.4	78.7
5	3.67	372.3	1.6	17.6	1.2	78.6
6	5.63	653.1	4.8	18.0	0.8	75.4
7	6.58	643.6	4.5	17.2	0.8	76.6
8	7.79	629.4	5.6	19.2	0.6	73.6
9	8.62	644.9	3.8	17.3	0.6	77.4
10	9.75	568.9	3.7	18.9	0.6	75.8
11	10.52	652.1	4.5	16.2	0.8	77.0
12	11.58	643.2	7.0	17.3	0.3	74.5

Z tabeli tej wynika, że w drugiej połowie wzrostu zachodzi wyraźna zmiana składu chemicznego substancji organicznej w kierunku zwiększenia się procentowej zawartości kwasów tłuszczowych (z 7.7 do 18.0%) i glikogenu (z 1.2 do 4.8%) i odpowiedniego zmniejszenia się zawartości względnej białek (z 88.7 do 75.4%) i substancji niezmydlających się. Bardziej szczegółowa analiza wyników naszych oznaczeń wskazuje ponadto, że ewolucja składu organicznego nie odbywa się równomiernie w miarę wzrostu, ale przeciwnie — zarówno momenty uruchomienia asymilacji poszczególnych składników, jak i maksyma nasilenia tych procesów przypadają w różnym czasie.

Celem uwydatnienia przebiegu i następstwa w czasie tych procesów przeprowadzono obliczenia dziennych przyrostów czte-

rech następujących składników: białek, chityny, kwasów tłuszczowych i glikogenu. Obliczenia te oparto na typowej krzywej wzrostu jednej z gąsienic, hodowanej w temperaturze 25°, oraz na wynikach masowych analiz, przedstawionych w niniejszej pracy (tab. I): posługując się interpolacją graficzną, ustalono średnią dla każdego dnia wzrostu zawartość bezwzględną tych składników w gąsienicy, a następnie — dzienne ich przyrosty (w mg). Przedstawiając te ostatnie na wykresie (rys. 2), otrzymano krzywe, ilustrujące przebieg szybkości przyswajania czterech wymienionych powyżej składników organicznych.



Rys. 2. Krzywa dziennych przyrostów (w mg) białek, chityny, kwasów tłuszczowych i glikogenu w ostatnim okresie wzrostu gąsienicy jedwabnika.

Fig. 2. Courbes des accroissements journaliers des protides, de la chitine, des acides gras et du glycogène pendant la dernière période de croissance du ver à soie.

Jak ze wspomnianych obliczeń i rysunku wynika, już w pierwszym dniu odżywiania daje się stwierdzić wyraźny przyrost w ciele gąsienicy wszystkich czterech składników. Przyrost ten zarówno absolutnie, jak i w stosunku do ilości wyjściowej, jest największy dla białka i wynosi już w końcu pierwszego dnia odżywiania około 16 mg, co stanowi zwiększenie o 30%.

Również i w dalszym swym przebiegu krzywa białka różni się od pozostałych trzech krzywych.

Cechą charakterystyczną tej krzywej jest jej asymetria oraz wpuklenie ramienia wstępującego. Te właściwości krzywej możnaby interpretować jako wynik występowania w ostatnim okresie wzrostu dwu maksymów szybkości przyswajania białka, z których pierwsze przypada na trzeci dzień odżywiania, drugie zaś — wykazujące największe nasilenie asymilacji — występuje w końcowych momentach wzrostu. Nie jest wyłączone, że mamy tutaj do czynienia z nakładaniem się dwu krzywych, odpowiadających niezależnym od siebie i w różnych momentach wzrostu zachodzącym falam asymilacyjnym. Tłumaczenie to mogłoby mieć uzasadnienie, gdyby zdołano uzyskać możliwość wyróżnienia w gąsienicy białek, asymilowanych na cele organizacyjno-wzrostowe, od białek o charakterze produkcyjnym, i gdyby udało się stwierdzić, że szybkość przyswajania tych dwu rodzajów białek posiada swe maksyma w różnych momentach wzrostu. Istnieją wskazówki w literaturze (C a l u g r e a n u '30), że to drugie maksimum asymilacyjne odpowiadałoby wzmożonemu pod koniec wzrostu gromadzeniu się białek w gruczolach przednich jedwabnika.

O ile proces przyswajania białek rozciąga się na cały okres wzrostu, to gromadzenie się innych składników organicznych przypada na ściśle określone odcinki tego okresu. Ponadto przebieg natężenia asymilacji tych składników posiada odrębny charakter pod względem zarówno momentu aktywacji, jak i — największego nasilenia.

Tak np. wytwarzanie chityny jest procesem, aktywującym się stosunkowo najwcześniej i trwającym dosyć krótko: rozpoczyna się ono już w końcu pierwszego dnia, w drugim — ujawnia maksimum natężenia, w końcu zaś czwartego dnia wzrostu proces syntezy chityny można uważać za całkowicie zakończony.

Zbliżony do powyższego przebieg posiada również proces odkładania się substancji niezmydlających się, z tą jedynie różnicą, że punkt największego nasilenia przypada o jeden dzień później i zakończenie tego procesu ulega również jednodniowemu opóźnieniu.

Na szczególną natomiast uwagę zasługuje przebieg asymilacji kwasów tłuszczowych i glikogenu.

Z odnośnych krzywych (rys. 2) widzimy, że procesy te ujawniają wybitne różnice zarówno co do czasu aktywacji, jak i trwania i nasilenia. Gdy mianowicie znaczniejsze przyrosty kwasów tłuszczowych stwierdzimy już dosyć wcześnie, bo w końcu drugiego dnia odżywiania i gdy od tego czasu począwszy ilość tych związków, odkładanych w jednostce czasu, pozostaje prawie bez zmiany do końca okresu wzrostowego, to proces gromadzenia się na większą skalę glikogenu rozpoczyna się dopiero pod koniec żerowania i ulega zahamowaniu prawie jednocześnie z procesem adipogenetycznym.

Reasumując powyższe, możemy zatem — z punktu widzenia zmian, jakie zachodzą w składzie chemicznym gąsienic — cały piąty okres wzrostu podzielić na dwie fazy, z których pierwsza zajmuje $\frac{1}{3}$ okresu i trwa w temperaturze 25° około dwu dni.

Tę pierwszą fazę, którą możnaby nazwać fazą organiczną wzrostu, charakteryzuje przewaga syntezy substancyj białkowych i chityny nad przyswajaniem innych związków organicznych (glikogenu, kwasów tłuszczowych), których zawartość w gąsienicach wprawdzie stale się powiększa, lecz proces ten nie dotrzymuje kroku głównemu procesowi, jakim jest budowa elementów komórkowych i substancyj oporowych.

Druga faza, wypełniająca $\frac{2}{3}$ okresu wzrostu, którą możnaby nazwać fazą tworzenia rezerw, jest okresem akumulowania bezazotowych substancyj zapasowych (glikogenu i kwasów tłuszczowych) i składników jedwabiu. Jest zjawiskiem charakterystycznym, że proces adipogenetyczny znacznie wyprzedza w czasie proces glikogenetyczny: fala narastania glikogenu ujawnia swój punkt szczytowy w ostatnich momentach wzrostu, po nagromadzeniu

się w ciele gąsienicy znacznej części definitywnego zapasu kwasów tłuszczowych i po całkowitym ukończeniu procesu syntezy chityny.

2. Okres powzrostowy.

Jak zaznaczyliśmy wyżej, najgłębsze zmiany w składzie chemicznym gąsienic zachodzą w okresie właściwego wzrostu, t. j. w czasie od ostatniej wylinki do chwili osiągnięcia przez nie ciężaru największego. W tym momencie zwierzęta uzyskują cały zapas substancji organicznych, których kosztem realizują się wszystkie procesy przemiany materii, zachodzące do końca metamorfozy. W okresie powzrostowego życia gąsienicy substancje te ulegają przemianom w stopniu stosunkowo nieznacznym.

Tabela IV.

Zawartość składników organicznych, obliczona na 1 g azotu w gąsienicach w okresie wzrostu i w okresie powzrostowym ich życia.

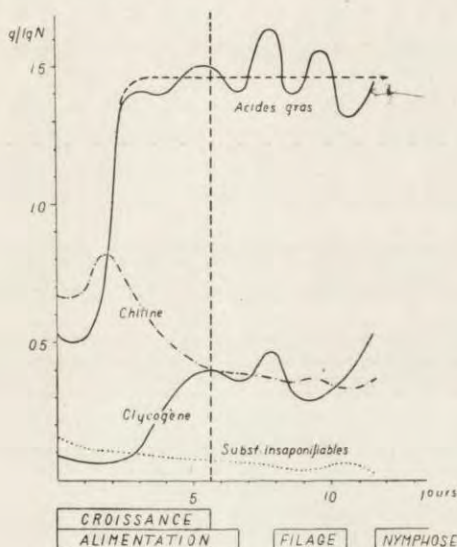
Teneur des chenilles en composants organiques, pendant la période de croissance et pendant la période consécutive à la croissance calculé pour 1 gr. d'azote.

Okresy <i>Périodes</i>	Nr. analizy <i>Nr. de l'analyse</i>	Czas od początku odżywiania <i>Temps à partir du début de l'alimentation</i>	Ciężar jednej gąsienicy <i>Poids d'une chenille</i>	Obliczona na 1 g azotu zawartość w gąsienicach <i>Teneur des chenilles, calculée pour 1 gr. d'azote, en</i>			
				kwasów tłuszczowych <i>acides gras</i>	chityny (N × 14,8) <i>chitine</i>	substancji niezmydlających się <i>substances non-saponifiables</i>	glikogenu <i>glycogène</i>
	dni - jours	g	g	g	g	g	
Okres wzrostu <i>Période de croissance</i>	1	0	0,985	0,543	0,681	0,147	0,086
	2	0,87	1,336	0,504	0,681	0,116	0,074
	3	1,87	2,097	0,862	0,814	0,113	0,061
	4	2,78	3,365	1,406	0,666	0,109	0,108
	5	3,67	3,753	1,401	0,548	0,095	0,127
	6	5,63	4,891	1,501	0,400	0,066	0,403
Okres powzrostowy <i>Période consécutive à la croissance</i>	7	6,58	4,327	1,409	0,386	0,066	0,365
	8	7,79	3,557	1,634	0,370	0,051	0,471
	9	8,62	3,393	1,398	0,355	0,043	0,309
	10	9,75	2,586	1,565	0,370	0,048	0,303
	11	10,52	2,700	1,317	0,340	(0,064)	0,336
	12	11,58	2,313	1,447	0,355	0,024	0,540

Celem uwidocznienia tych przekształceń, w obliczeniach naszych znalazoną ilość składników organicznych odnieśliśmy do azotu, jako do składnika stałego, nie biorącego udziału w wy-

mianie gazowej owadów (P é l i g o t '67, K r o g h '06, P i l e w i c z ó w n a '26). W ten sposób wyeliminowano wahania indywidualne zawartości wody w próbkach gąsienic, branych do analizy (por. tab. IV).

Rys. 3, wykreślony na podstawie liczb tej tabeli, uwidacznia zmiany, jakie w ciągu całego badanego okresu zachodzą w stosunku kwasów tłuszczowych, substancyj niezmydlających się, glikogenu i chityny do azotu całkowitego. W okresie powzrostowym wykres ten przedstawia — w przeciwieństwie do okresu wzrostu — zmiany bezwzględne.



Rys. 3. Zawartość kwasów tłuszczowych, chityny, glikogenu i substancyj niezmydlających się, obliczona na gram azotu, w czasie ostatniego okresu larwalnego rozwoju jedwabnika. Według danych tab. IV.

Fig. 3. Variations de la teneur en acides gras, chitine, glycogène et substances non-saponifiables, calculée pour 1 gr. d'azote pendant la dernière période larvaire du développement du ver à soie.

Z przebiegu krzywych wynika przede wszystkim, że zapas kwasów tłuszczowych, nagromadzony w czasie wzrostu gąsienic, nie ulega w czasie późniejszym zmianom, które mogłyby pozostawać w związku bądź z zużyciem ich w procesach oddechowych, bądź też z przebudową jednych związków w inne. — Innymi słowy, stwierdzone wahania stosunku kwasów tłuszczowych do azotu są tego rzędu, że nie uwidaczniają przypuszczal-

nych zmian w ilości kwasów tłuszczowych, jakie mogą zachodzić czy to wskutek ich utlenienia się, czy też powstawania na nowo lub przekształcenia się w inne związki bezazotowe.

To samo mniej więcej można powiedzieć o zachowaniu się chityny, której ilość, powstała w okresie wzrostu gąsienicy, nie ulega aż do momentu zapoczwarczenia się widocznym zmianom, a w każdym bądź razie nie zwiększa się.

Inaczej natomiast zachowują się substancje niezmydlające się i glikogen.

Analizy nasze ujawniają nie ulegające wątpliwości zmniejszenie się stosunku substancyjnie zmydlających się do azotu w okresie powzrostowym: jeżeli pominiemy przedostatnie oznaczenie (tab. IV), rzekomo wykazujące po ukończonym snuciu kokonu chwilowy przyrost, to w całym rozpatrywanym okresie stwierdzimy redukcję substancyjnie zmydlających się do 40% (z 0.066 do 0.024 g na gram azotu).

Najbardziej jednak prawidłowe i charakterystyczne zmiany ujawnia glikogen, którego zachowanie się pozwala wyróżnić dwa momenty.

Pierwszym z nich jest wyraźne zmniejszenie się zapasu wytworzonego w okresie wzrostu glikogenu, które przypada na czas snucia kokonu. Ponieważ w tym czasie ilość chityny nie zwiększa się, nasuwa się przypuszczenie, że stwierdzona glikogenoliza pozostaje w związku ze wzmożoną przemianą węglowodanów, zachodzącą wskutek zwiększonych ruchów gąsienicy w czasie snucia.

Drugim momentem charakterystycznym jest regeneracja glikogenu, zużytego na pracę przedzenia. Zjawisko to, występujące w czasie między wykończeniem kokonu a momentem zapoczwarczenia się, było obserwowane u jedwabników poraz pierwszy przez badaczy francuskich Bataillona i Couvreura ('92), Bataillona ('93) i Dubois i Couvreura ('01).

Znaczenie występowania tego procesu w końcowych momentach życia gąsienic jest zrozumiałe, jeśli się zważy, że gli-

kogen jest materiałem, z którego syntetyzuje się chityna, powstająca w czasie metamorfozy owadów (W e i n l a n d '06). Z moich, nieogłoszonych poszukiwań wynika, że w pierwszych dniach metamorfozy zachodzi w poczwarkach motyli ściśły ilościowy związek między syntezą chityny wzgl. chitozaminy a zużyciem znajdujących się w poczwarcie węglowodanów.

Ten drugi proces glikogenezy jest — w przeciwieństwie do pierwszego, występującego pod koniec wzrostu — procesem endogenicznym. Dalszym badaniom należy pozostawić wyświetlenie kwestii, czy substancją wyjściową tego procesu syntetycznego są kwasy tłuszczowe, czy raczej, jak przypuszcza W e i n l a n d ('06) — substancje białkowe, które w ostatnich chwilach życia larwalnego owadów ulegają głębokim przemianom przygotowawczym, poprzedzającym okres kataboliczny metamorfozy.

Streszczenie wyników.

1°. Względna zawartość wody w gąsienicach jedwabnika ulega w ostatnim okresie ich życia wybitnym zmianom. W okresie właściwego wzrostu procent wody — po przemijającym wzmożeniu jej retencji na początku odżywiania — zmniejsza się prawidłowo wskutek wzrastającej asymilacji składników organicznych. Obserwowany w ciągu całego okresu powzrostowego stały przyrost względnej zawartości tych składników ma swe źródło wyłącznie w stratach wody, jakie gąsienice ponoszą wskutek bądź perspiracji, bądź eliminowania cieczy z przewodu pokarmowego, lub wreszcie — wysychania wydzieliny gruczołów przednich w czasie snucia kokonu.

2°. Zachodzące w czasie wzrostu gąsienicy zmiany składu chemicznego substancji organicznej ciała polegają w głównych zarysach na zwiększaniu się z biegiem czasu procentowej zawartości kwasów tłuszczowych i glikogenu. Zmiany te są wynikiem swoistego przebiegu i następstwa w czasie fal asymilacyjnych, charakterystycznych dla poszczególnych składników organicznych ciała. Tak więc przyswajanie białek — proces najintensywniejszy i rozpoczynający się już w pierwszych momentach po podaniu pokarmu — posiada dwa maksyma natężenia, odpowiadające prawdopodobnie: pierwsze z nich — największe

szym przyrostom białek, wchodzącym w skład tkanek gąsienicy, drugie zaś — największej produkcji białkowych składników jedwabiu. Również i synteza chityny jest jednym z procesów, rozpoczynających się stosunkowo wcześniej, ujawnia jednak największe nasilenie już w pierwszych dniach wzrostu i prędko się kończy. Podobny mniej więcej przebieg posiada krzywa szybkości odkładania się substancyj niezmydlających się. Natomiast gromadzenie się kwasów tłuszczowych jest zjawiskiem późniejszym: rozpoczyna się ono na większą skalę dopiero w trzecim dniu żerowania, wykazując od tej chwili szybkość prawie niezmienną do końca wzrostu. Wreszcie zjawiskiem najpóźniej występującym jest proces glikogenezy, aktywujący się dopiero w ostatnich chwilach odżywiania.

3°. Przyswojone w czasie odżywiania się gąsienic organiczne składniki ciała ulegają stosunkowo nieznacznym zmianom w okresie powzrostowym. Dotyczy to zwłaszcza chityny i kwasów tłuszczowych, które aż do momentu zapoczwarczenia się pozostają w ilości, nagromadzonej w okresie wzrostu. Widoczne natomiast zużycie wykazują substancje niezmydlające się. Wreszcie cechy składnika najbardziej labilnego posiada glikogen, którego zapas, nagromadzony w czasie wzrostu gąsienicy, zmniejsza się wybitnie podczas pracy snucia kokonu, a następnie — przed rozpoczęciem się metamorfozy — szybko regeneruje się.

P i ś m i e n n i c t w o .

Abderhalden E. 1923. Studien über das Wachstum von Raupen. Zeitschr. f. physiol. Chem. 127 (93). — A k a o A. 1932. Etudes sur le phénomène de croissance au point de vue des individus chimiques. I. Expériences sur les vers à soie. The Keijo Journ. of Medicine. 3 (360). — B a l z a m N. 1933. Badania nad przemianą materii i energii w rozwoju owadów. II. Stosunek produkcji cieplnej do procesów oddechowych w czasie rozwoju pozarodkowego owadów. Acta Biol. Exper. 8 (59). — B a l z a m N. 1933. Recherches sur le métabolisme chimique et énergétique au cours du développement des Insectes. II. Relation entre la chaleur dégagée et les échanges respiratoires au cours du développement des Insectes. Arch. intern. de Physiol. 37 (317). — B a t a i l l o n E. 1892. Sur le déterminisme physiologique de la métamorphose chez le ver à soie. C. R. Acad. des Sc. 115 (61). — B a t a i l l o n E. 1893. La métamorphose du ver à soie et la déterminisme évolutif. Bull. Sc. de la France et de la Belgique. 25 (Cyt. wdł. Vaney et Maignon '06). — B a t a i l l o n E. et E. C o u v r e u r. 1892. La fonction

glycogénique chez ver à soie pendant la métamorphose. C. R. Soc. de Biol. 44 (669). — Bernard C. I. 1879. Leçon sur les phénomènes de la vie. Paris. — Białaszewicz K. 1933. Badania nad przemianą materii i energii w rozwoju owadów. I. Produkcja ciepła w okresie wzrostu larwalnego i metamorfozy *Lymantria dispar*. L. „Kosmos”. 58 (21). — Białaszewicz K. 1933. Recherches sur le métabolisme chimique et énergétique au cours du développement des Insectes. I. Thermogenèse pendant la période de croissance larvaire et pendant la métamorphose de *Lymantria dispar* L. Arch. intern. de Physiol. 37 (1). — Białaszewicz K. 1936. Badania nad przemianą materii i energii w czasie rozwoju owadów. III. O odżywianiu się jedwabnika (*Bombyx mori* L.) w ostatnim okresie wzrostu. (Sur l'alimentation du ver à soie pendant la dernière période de sa croissance). Acta Biol. Exper. 10 (352). — Blanchard L. et G. Dinulescu. 1932. Le métabolisme glucidique chez la larve de *Gastrophile*. C. R. Soc. de Biol. 110 (340). — Calugareanu D. 1930. Eine funktionelle Eigentümlichkeit der Spinnrüse des Seidenspinners (*Bombyx mori*). Zeitschr. f. vergl. Physiol. 13 (223). — Couvreur E. 1895. Sur la transformation de la graisse en glycogène chez ver à soie pendant la métamorphose. C. R. Soc. de Biol. 10-e série t. II (796). — Dubois R. et E. Couvreur. 1901. Études sur le ver à soie pendant la période nymphale. Ann. Soc. Linn. de Lyon (Cyt. wdł. Vaney et Maignon '06). — Farkas K. 1903. Beiträge zur Energetik der Ontogenese. III. Über den Energieumsatz des Seidenspinners während der Entwicklung im Ei und während der Metamorphose. Arch. f. d. ges. Physiol. 98 (490). — Heller J. 1926. Untersuchungen über die Metamorphose der Insekten. IV. Spinner und Schwärmer. Bioch. Zeitschr. 172 (59). — Heller J. 1928. Badania nad przeobrażeniem owadów. (Untersuchungen über die Metamorphose der Insekten). Acta Biol. Exper. 1 (225—315). — Jucci C. 1922. Sulla curva di sviluppo del baco di seta. Istit. Bacol. della Scuola Super. d'Agricol. in Portici (59—136). — Jucci C. 1929. Capacità d'accrescimento in razze cinesi di bachi da seta. Boll. Soc. ital. Biol. sper. 4 (288). — Kellner O. 1884. Chemische Untersuchungen über die Entwicklung und Ernährung des Seidenspinners (*Bombyx mori*). Landw. Versuchst. 30 (59). — Kotake Y. and Y. Sera 1909. Findet die Umwandlung von Fett in Glykogen bei der Seidenraupe während der Metamorphose statt? Zeitschr. f. physiol. Chem. 62 (115). — Krogh A. 1906. Experimentelle Untersuchungen über die Ausatmung des freien Stickstoffs aus dem Körper. Sitzb. d. Akad. d. Wiss. Wien. Math. naturw. Klasse. 115. Abt. 3. — Luciani L. et Lo Monaco. 1897. L'accroissement progressif en poids et en azote de la larve du ver à soie, par rapport à l'alimentation nécessaire dans les âges successifs. Arch. ital. de Biol. 27 (340). — Luciani L. et Tarulli. 1895. Poids des cocons du *Bombyx mori* du commencement de leur tissage à la naissance des papillons. Arch. ital. de Biol. 24 (237). — Needham D. M. 1929. The chemical changes during the metamorphosis of insects. Biol. Rev. 4 (307 — 326). — Nelson J. A. and A. P. Stutevant. 1924. Growth and feeding of honey bee larvae. U. S. Dept. Agric. Bull. Nr. 1222 (1—23). — Pélégot E. 1867. Études

chimiques et physiologiques sur les vers à soie. Ann. de Chim. et Phys. Sér. IV, 12 (445). — Pilewiczówna M. 1926. O przemianie azotowej u owadów. (Sur le métabolisme azoté des Insectes). Trav. de l'Institut Nencki (Varsovie). 4 (1—25). Rudolfs W. 1926. Studies on chemical changes during the life cycle of the tent caterpillar (*Malacosoma americana* Fab.). I. Moisture and fat. Journ. of the New York Entomolog. Soc. 34 (249). — Rudolfs W. 1926. Studies etc... II. Nitrogen and its relation to moisture and fat. Ibidem. 34 (319). — Rudolfs W. 1927. Studies etc... III. Soluble ash and sulfates. Ibidem. 35 (219). — Rudolfs W. 1929. Studies etc... IV. Glycogen. Ibidem. 37 (17). — Rudolfs W. 1932. Studies etc... V. Weight and data. Ibidem. 40 (481). — Strauss J. 1911. Die chemische Zusammensetzung der Arbeitsbienen und Drohnen während ihrer verschiedenen Entwicklungsstadien. Zeitschr. f. Biol. 56 (347). — Tangl F. 1909. Zur Kenntnis des Stoff- und Energieumsatzes holometaboler Insekten während der Metamorphose. Arch. f. die ges. Physiol. 130 (1). — Vaney Cl. et Fr. Maignon. 1906. Contribution à l'étude physiologique des métamorphoses du ver à soie. Rapp. du Labor. d'Études de la Soie. 12 (5—60). Lyon (A. Rey). — Weinland E. 1906. Über die Stoffumsetzungen während der Metamorphose der Fleischfliege (*Calliphora vomitoria*). Zeitschr. f. Biol. 47 (186). — Yonezawa Y. und Yamafuji. 1935. Die Veränderungen der Körperbestandteile während der Metamorphose von *Bombyx mori* (Auszug.). Bulteno Scienca de la Fakultato Terkultura, Kjusu J. Universitato. 6 (125).

[Zakład Fizjologii Roślin Uniwersytetu J. P. w Warszawie].

N. Balzam.

**Aseptyczna hodowla zwierząt. I. Aparatura i metodyka.
II. Aseptyczna hodowla kur na pokarmie witaminowym
i bezwitaminowym ¹⁾**

*Elevage aseptique des animaux. I. Appareillage et méthode. II.
Elevage aseptique des poules maintenues aux régimes complets
et déficients.*

Rękopis nadesłany w dniu 29.I.1937.

1) On a élaboré une méthode de l'élevage aseptique des animaux et décrit un appareil permettant:

- 1°. d'y introduire les oeufs stérilisés ou les mammifères prélever aseptiquement de l'utérus maternel,
- 2°. d'introduire des aliments et de recueillir fèces au cours de l'expérience,
- 3°. l'adjonction des extraits vitaminés dépourvus de microbes filtrants.

2) On a élevé 5 poussins aseptiques jusqu'à l'âge de 2 mois. Le poids des poussins aseptiques était de: 615, 570, 550, 450, 395 gr., celui des témoins — de: 505, 485, 420, 385 g.

3) La flore intestinale des poules n'exerce pas d'influence notable sur la digestibilité des aliments.

4) La flore intestinale n'influe nullement sur le besoin de vitamines et en particulier elle n'est pas la cause de l'insensibilité des oiseaux à la suppression de la vitamine C dans les aliments.

¹⁾ Rzecz przedstawiona na posiedzeniu Oddziału Polskiego Towarzystwa Fizjologicznego w Warszawie w dniu 18.II.1937 r.

Możliwość życia zwierząt wyższych bez bakteryj została zasadniczo udowodniona przez badania C o h e n d y'e g o ('12), C o h e n d y'e g o i W o l l m a n a ('14 i '22), K ü s t e r a ('12 i '25) i G l i m s t e d t a ('32 i '36). Ostatni z wymienionych autorów zdołał wyhodować 3 aseptyczne świnki morskie w wieku 60 dni. Przegląd dotychczasowych wysiłków w tym kierunku znajduje się w artykułach L i s b o n n a ('31) i S c h i e b l i c h a ('32) oraz w pracy G l i m s t e d t a ('36).

Celem badań niniejszych było opracowanie takiej m e t o d y hodowli aseptycznej, któraby pozwalała na:

1°, wprowadzanie do aparatu bez obawy zakażenia jaj sterylizowanych lub zwierząt, wyjętych aseptycznie z łona matki,

2°, podawanie tym zwierzętom pokarmu i zbieranie kału w trakcie doświadczenia i

3°, podawanie uzupełnień witaminowych w postaci nie zawierającej drobnoustrojów przesączalnych.

Zadanie to zostało rozwiązane w sposób następujący:

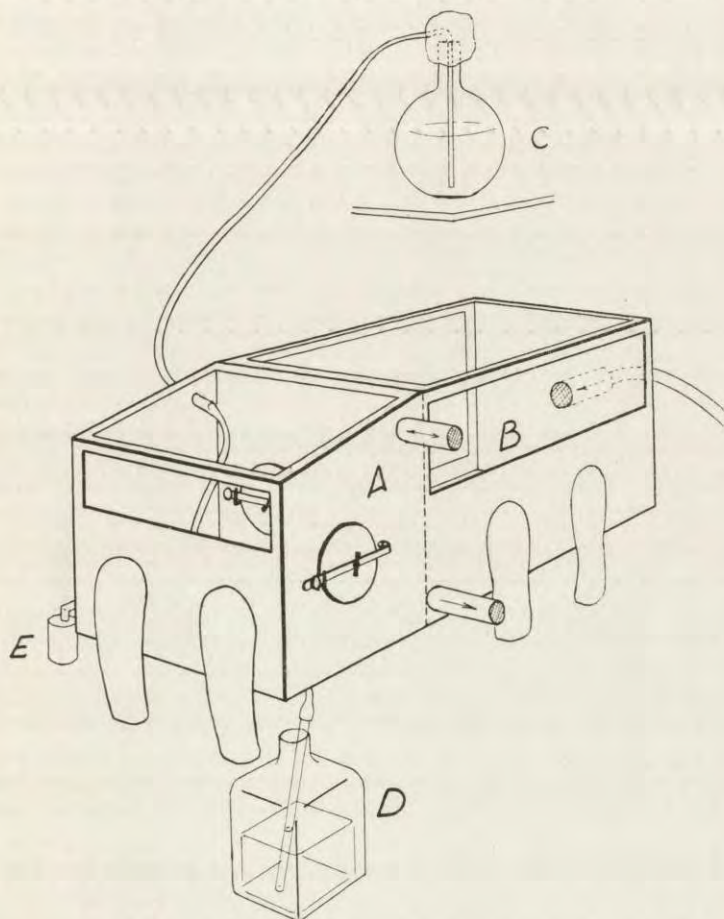
I. Aparatura i metodyka.

Aparat do hodowli (rys. 1) składa się z dwóch komór, z których jedna (A) umożliwia aseptyczne wprowadzanie pokarmów i innych przedmiotów do drugiej komory (B), służącej do właściwej hodowli. Między komorą A i B znajdują się hermetyczne drzwiczki, zamykane i otwierane za pomocą pary rękawic gumowych, wmontowanych w ścianę komory A. Takie same drzwiczki znajdują się w jednej ze ścian zewnętrznych komory A. Zasada działania aparatu zostanie objaśniona na przykładzie wprowadzania pokarmu.

Pokarm sterylizuje się w autoklawie w otwartym słoiku, owiniętym papierem i umieszczonym w puszcze blaszanej. Puszka ta jest zaopatrzona w kominek, zatkany korkiem z waty, i w bandaż zabezpieczający szparę pomiędzy jej częścią dolną i pokrywą.

Po wyjęciu z autoklawy puszkę umieszcza się w komorze A. Zabieg ten nie może zakazić zwierząt, znajdujących się w jałowej komorze B, ponieważ drzwiczki na granicy komory A i B pozostają szczelnie zamknięte. Po zamknięciu drzwiczek zewnętrznych do komory A wprowadza się nieco pary wodnej z kociołka E, znajdującego się z zewnątrz aparatu. Po upływie kilkunastu minut powietrze w aparacie jest już jałowe, ponieważ skraplająca się para wodna strąca bakterie na ściany i dno komory. Sposób ten jest stosowany w t. zw. komorach do szczepień lub szafach H a n s e n a, znajdujących się w każdej pracowni bakteriologicznej. Posługiwałem się nim również w mojej poprzedniej pracy (B a l z a m '36).

Po oczyszczeniu powietrza pozbywamy się bakterij, znajdujących się na ścianach komory. W tym celu ściany te oraz wszystkie przedmioty, znajdujące się wewnątrz komory A (puszka!), wycieramy starannie, posługując się rękawicami gumowymi, szmatką nasyoną 2% roztworem sublimatu. Słoik z sublimatem oczywiście musiał być wprowadzony do komory A przed rozpoczęciem doświadczenia. Roztworem sublimatu nasycy-



my również bandaż, uszczelniający puszkę z pokarmem. Po upływie kilkunastu minut sublimat zmywamy za pomocą prądu wody sterylizowanej, płynącej przez rurkę gumową z kolby C. Ponieważ komora A ma dno podwójne, ciecz spływa do słoja D, połączonego z dnem komory za pomocą rurki gumowej. Oczywiście koniec rurki, sięgającej do słoja D, musi być zanurzony pod powierzchnię warstwy sublimatu. Teraz już możemy, również za pomocą rękawów gumowych, otworzyć drzwiczki do komory B

i włożyć do niej słoik, wyjęty z puszkki. Następnie z powrotem zamykamy drzwiczki do komory B i otaczamy je bandażem, nasyconym sublimatem. Pokarm jest już wprowadzony. Można obejść się bez zmywania sublimatu wodą sterylizowaną, ponieważ opakowanie słoika papierem umożliwia wyjęcie go z puszkki i przeniesienie do komory B w ten sposób, aby zwilżony sublimatem rękaw nie dotknął bezpośrednio ścian słoika. Papier zostawiamy w komorze A. Aby uniknąć zmian ciśnienia powietrza w komorze podczas manipulowania rękawami, w jedną ze ścian komory jest wmontowany filtr z waty, nasyczonej sublimatem.

Wodę do picia można oczywiście podawać w ten sam sposób, co pokarm stały. Jednak wygodniej mieć stale większy zapas wody sterylizowanej w kolbie, umieszczonej ponad aparatem i połączonej z komorą A za pomocą długiej rurki gumowej, zakończonej kaniulą szklaną. Przed sterylizacją (3 godz. pod ciśnieniem 2 atm.) na koniec kaniuli nakładano ślepo zamknięty kawałek rurki gumowej. Po wyjęciu kolby z autoklawu koniec rurki przesuwano przez specjalny kominek w jednej ze ścian komory A. Odcinek rurki gumowej, znajdujący się w kominku, był uprzednio usztywniony za pomocą kawałka rurki szklanej, wsuniętej do środka rurki gumowej w odległości około 50 cm od końca kaniuli. Szparę pomiędzy ścianami rurki gumowej i kominka uszczelniano watą, nasyconą sublimatem. Po wyjąłowaniu komory A odcinano jałowymi nożyczkami kapturek zamykający kaniulę i wlewano wodę do naczynia, znajdującego się w komorze B. Po napełnieniu tego naczynia dopływ wody zamykano ściskaczem i koniec kaniuli wpuszczano do naczynia z sublimatem, znajdującego się w komorze A.

Cały aparat powinien być przed rozpoczęciem doświadczenia wysterylizowany parami formaliny. W tym celu w kociołku, służącym później do wywiązywania pary wodnej, ogrzewa się pewną ilość 10% roztworu formaliny. Jednocześnie włącza się urządzenie termostatowe i podnosi temperaturę aparatu do 40°. Po upływie 3 dni puszcza się w ruch urządzenie wentylacyjne. Urządzenie to, które od tej chwili powinno działać bez przerwy aż do końca doświadczenia, składa się z co najmniej dwóch kompresorów, tłoczących powietrze przez filtry z waty. Jeden filtr, zmieniany co kilka dni, znajduje się przed kompresorem, drugi, również zmieniany co pewien czas, za kompresorem, a trzeci jest przytwierdzony na stałe do ściany komory B. Bezpośrednio po wyjściu z kompresora, a przed wejściem do filtru II, powietrze przechodzi przez oddzielną oliwy. Tłoczenie powietrza musi zachodzić w sposób ciągły tak, aby wewnątrz aparatu zawsze panowało ciśnienie większe od atmosferycznego (o 3 do 4 cm słupki wody). Jeżeli działanie kompresorów jest dostatecznie pewne, otwory wylotowe mogą być zakończone prosto wąskimi rurkami gumowymi. Filtry wylotowe stanowiły puszkki, wzgl. rury blaszane, o średnicy 8 cm i wysokości 15 cm, napełnione watą i przed przyłączeniem do aparatu sterylizowane w autoklawie. W aparacie, którym posługiwałem się w tej pracy, urządzenie wentylacyjne dostarczało do 10 m³ powietrza na godzinę. Po

kilku dniach wietrzenia powietrze, wychodzące z aparatu, nie zdradzało już zapachu formaliny i aparat był gotowy do użytku.

Opis aparatu należy uzupełnić tym, że komora B jest zaopatrzona w parę lub więcej rękawów gumowych i w urządzenie termostatowe. Poza tym znajduje się w niej waga do ważenia zwierząt, karmniki, poidełka i t. d. Aparat, na którym pracowałem dotychczas, posiadał tylko jedną parę rękawów gumowych. Jednak w trakcie doświadczenia bardzo dotkliwie dawał się odczuć brak drugiej pary rękawów, wmontowanych naprzeciwko pierwszej. Pozwoliłoby to również na powiększenie rozmiarów aparatu. Waga była zabezpieczona pokrywą, składającą się z trzech ścian i przysuniętą do jednej ze ścian aparatu.

Przy podawaniu dostatecznej ilości witaminy D i właściwym stosunku wapniowo-fosforowym zbytecznym jest naświetlanie zwierząt światłem krótko-falowym, jednak dla celów specjalnych w komorze B może być zainstalowana lampa kwarcowa lub jakieś inne źródło światła ultrafioletowego.

Należałoby jeszcze powiedzieć kilka słów o sposobie osadzenia szyby i rękawów gumowych. Szyby powinny mieć grubość co najmniej 3 mm i nie mogą mieć zbyt wielkiej powierzchni (ze względu na nadciśnienie, panujące w aparacie). Osadzano je na zewnętrznej stronie konstrukcji żelaznej za pośrednictwem warstwy kitu miniowego i dociskano za pomocą silnych płaskich sprężyn stalowych. Pomiędzy szkłem a sprężyną znajdowała się podkładka drewniana. W celu osadzenia sprężyn ramy żelazne były zaopatrzone w szereg śrub, wystających na zewnątrz. Rękawy naciągano na kołnierze blaszane, wystające na zewnątrz aparatu, a następnie obwiązywano je sznurkiem, na który nakładano elastyczny krążek gumowy. Przed nałożeniem rękawów brzegi kołnierzy wycierano watą zwilżoną roztworem sublimatu. Rękawy były zabezpieczone przed uszkodzeniem przez zwierzęta za pomocą specjalnych kłapek (Küster '12).

U z u p e ł n i e n i a w i t a m i n o w e Witaminy tłuszczowe A i D podawano w tranie, autoklawowanym w ampułkach szklanych uprzednio doskonale opróżnionych z powietrza. W tych warunkach obie te witaminy wytrzymują bez szkody nawet długotrwałe ogrzewanie. Wewnątrz komory B ampułki rozbijano i tran mieszano z pokarmem stałym.

Witaminy z kompleksu B podawano w drożdżach (pH — 5,8), sterylizowanych 6 razy po 1 h. w temp. 100° w aparacie Kocha. Do sterylizacji używano erlenmeyerek na 300 cm z dolutowaną z boku długą rurką szklaną, zamkniętą kapturkiem gumowym. Główna szyjka erlenmeyerki była zamknięta korkiem z waty. Kolbki tej nie wprowadzano w całości do komory B, a zawartość jej (30 g suchych drożdży w 150 cm³ cieczy) wlewano przez otwarte drzwiczki do naczynia, ustawionego w komorze B. Uprzednio owijano całą kolbę szmatą, zwilżoną roztworem sublimatu, a zakończenie gumowe rurki bocznej, po wysterylizowaniu sublimatem i obmyciu wodą sterylizowaną, odcinano jałowymi nożyczkami. Do sterylizacji brano drożdże możliwie pozbawione bakterij (zarodowe drożdże piwne). Drożdże pier-

karskie do tego celu nie nadawały się zupełnie, ponieważ były zbyt silnie zanieczyszczone bakteriami sporowymi.

W dotychczas prowadzonych doświadczeniach nie miałem potrzeby posługiwać się witaminą C. Przypuszczam jednak, że zadawalniające wyniki dałoby jednorazowe ogrzanie do temp. 100° (w atmosferze pozbawionej tlenu i w reakcji silnie kwaśnej) roztworu kwasu askorbinowego czy soków roślinnych, przesączonych uprzednio przez świecę C h a m b e r l a n d a. W ten sam sposób możnaby przygotować roztwory czystych preparatów witaminy B₁ i innych. Zestawienie odpowiedniego urządzenia filtracyjnego nie przedstawia żadnych trudności.

Dodawanie termostabilnych witamin E i K w danym przypadku było oczywiście zbędne.

II. Aseptyczna hodowla kur na pokarmie witaminowym i bezwitaminowym.

Kury bez bakterij hodowano dotychczas dwukrotnie (S c h o t t e l i u s '99 i '08, C o h e n d y '12). Obie prace prowadzono w okresie, gdy nie znano witamin, to też dzisiaj mają one już tylko wartość historyczną. Niemniej jednak lektura ich jest niezmiernie zajmująca i nasuwa cały szereg ciekawych zagadnień.

S c h o t t e l i u s wyciągnął z swych doświadczeń wniosek, że flora przewodu pokarmowego jest niezbędnym warunkiem normalnego funkcjonowania organizmu zwierzęcego. C o h e n d y, przeciwnie, nie widział żadnej zasadniczej różnicy w zachowaniu się kurcząt aseptycznych i zakażonych (prócz gorszej strawności pokarmów u kurcząt aseptycznych). Jednak wzrost jego kurcząt, zarówno aseptycznych, jak i kontrolnych, był tak słaby, żeby nie pozwalał na wyciągnięcie żadnego wniosku co do roli bakterij w procesach trawienia u kur w warunkach fizjologicznych. Tak np. w 45 dniu życia (najdłuższe doświadczenie C o h e n d y' e g o) kurczęta aseptyczne ważyły 74 i 58 g, a kontrolne 62, 57, 58, i 57 g.

Zakażenie kurcząt aseptycznych czystą kulturą *Bact. coli* u S c h o t t e l i u s a ratowało je przed śmiercią i zapewniało normalny rozwój. Przeciwnie C o h e n d y nie zauważył żadnego dodatniego wpływu *Bact. coli*, ani innych mikroorganizmów.

1. Wybór i sterylizacja jaj.

Doświadczenia prowadzono na kurach z rasy Białe Leghorny. Aby uniknąć zakażenia treści jaj bakteriami białej bie-

gunki i innych podobnych chorób, jaja do sterylizacji wybierano od kur zupełnie zdrowych, sprawdzonych serologicznie przeciwko białej biegunce i noszących powyżej 200 jaj rocznie. Wybierano jaja o zupełnie gładkiej i nie zabrudzonej kałem skorupie.

Podobnie jak obaj autorzy poprzedni, jaja sterylizowałem sublimatem. Do sterylizacji brano jaja z 18 dnia rozwoju, sprawdzone przez prześwietlanie. Jaja sterylizowano w ciągu 2 minut przez zanurzenie do kotła z 1% roztworem $HgCl_2$ o temp. 38° — 40° i silne szczotkowanie ryżową szczotką do paznogi. (Oczywiście na ręce wkładano rękawice gumowe). Następnie przenoszono je za pomocą szczypiec, używanych w gospodarstwie do wyjmowania jaj z gorącej wody, do sterylizowanej w autoklawie puszki, wyłożonej grubą warstwą waty hygroskopijnej. Puskę wstawiano do komory A aparatu do hodowli i postępowano jak przy podawaniu pokarmu, to jest oczyszczano powietrze w komorze A przez skroplenie pary wodnej i sterylizowano ściany puszki i inne przedmioty sublimatem. Następnie puszkę otwierano, wyjmowano z niej jaja za pomocą szczypiec i kolejno zanurzano je do słoika z 2% roztworem $HgCl_2$ i z wodą sterylizowaną. Oplókanie jaja przenoszone do komory B (temperatura 39° , wilgotność 70%). Opisany sposób sterylizacji zupełnie nie szkodzi pisklątom. Przekonano się nawet, że pisklęta wykluwały się z jaj wcale nie płókanym wodą po zanurzeniu do sublimatu (a tylko osuszonym watą hygroskopijną). Część embrionów zostaje zabita przez wstrząsanie przy szczotkowaniu, ale te, które pozostają przy życiu (powyżej 50%) nie wykazują żadnych objawów nienormalności.

Następnego dnia po wylęgu obniżano wilgotność i temperaturę, a po 48 godzinach rozpoczynano karmienie piskląt.

Aby zapobiec kondensacji pary wodnej w filtrach wylotowych (przy dużej wilgotności powietrza, wychodzącego z aparatu), nakładano na nie specjalne grzejniki elektryczne.

2. Hodowla piskląt.

Pisklęta karmiono systemem „al mash”, stosowanym przez hodowców angielskich. Skład paszy był następujący:

Kasza kukurydzowa żółta	60 części
Otręby pszenne grube	20 „
Mączka mięsno-kostna	10 „
Mączka rybia	10 „
Węglan wapnia	3 „
Sól kuchenna	1 „

Pokarm ten sterylizowano w autoklawie 3.5 godz. w temp. 134^o — 140^o. Do słoika wsypywano 0.5 kg paszy, co tworzyło warstwę wysokości około 15 cm.

Już wewnątrz komory B paszę mieszano z 2 częściami traw, sterylizowanego jednocześnie z paszą w ampulkach, doskonale opróżnionych z powietrza i z zawiesiną drożdży, sterylizowaną 6 razy po 1 godz. w temp. 100^o. Procent drożdży zmieniał się w ciągu doświadczenia. Przekonano się, że normalny wzrost kurcząt zapewnia dawka drożdży, wynosząca około 10% suchej masy pokarmu.

Poważny problem techniczny stanowiło dodawanie zawiesiny drożdżowej do pokarmu zwierząt kontrolnych. Chodziło o to, aby wilgotny pokarm niegnił i niepleśniał. Dlatego pokarm ten po zmieszaniu z drożdżami rozkładano w cienkiej warstwie na arkuszu papieru i przesuszano.

Pokarm umyślnie zestawiony był w ten sposób, że zupełnie nie zawierał witaminy C. Miało to na celu sprawdzenie hipotezy, wypowiedzianej przez F u n k a, A b d e r h a l d e n a i wielu innych autorów, że różnice w zapotrzebowaniu witamin przez różne zwierzęta mogą być wywołane przez działalność syntetyczną mikroflory jelitowej. Jeżeli chodzi o owady, to obecnie nie ulega wątpliwości, że korzystają one z syntezy witamin przez bakterie (H o b s o n '32). Jednak wiele faktów przemawia również za możliwością syntezy witaminy C przez sam organizm niektórych zwierząt. Fakty te i prace (R a y, M a r t i n i i B o n s i g n o r e, G u h a i G h o s h, R o h m e r i B e s s o n o f f, B a n e r j i e) są omówione w referatach H a r r i s a ('35), E u l e r a ('36) i K o ł d a j e w a ('36). W danym przypadku szczególnie interesująca jest praca R a y'a ('34), który stwierdził powstawanie kwasu askorbinowego w toku rozwoju zarodkowego kurczęcia.

Zwierzętom nie podawano żwiru, ponieważ mogłoby to zmącić wyniki oznaczania suchej masy kału, a badania P a r k-

h u r s t a wykazały, że kury hodowane bez dostępu do żwiru doskonale trawią paszę suchą mieloną.

Zwierzęta kontrolne hodowano w 2 klatkach wielkości tej samej, co powierzchnia komory B aparatu (60×100 cm). W jednej klatce (A) hodowano zwierzęta, karmione pokarmem sterylizowanym + tran i drożdże, w drugiej (B) zwierzęta karmiono pokarmem surowym, również zmieszonym z tranem i drożdżami. Ze względu na to, że zwierzęta otrzymywały dostateczną ilość tranu, nie należało się spodziewać różnic, wywołanych tym, że zwierzęta aseptyczne otrzymywały światło przechodzące przez szyby szklane. Zresztą hodowlę prowadzono w pokoju, wychodzącym na północną stronę gmachu, o oknach stale zamkniętych.

D o ś w i a d c z e n i e I. Doświadczenie to rozpoczęło się dn. 4.VIII.36. (wyląg kurcząt) i trwało do dn. 2.X.36., kiedy musiało być przerwane z powodu przypadkowego uszkodzenia aparatu (pęknięcie szyby). W każdej serii hodowano z początku 5, a później, od dn. 16.IX., 4 kurczęta. Ciężar początkowy 5 kurcząt jednodniowych (ważonych razem) w grupie aseptycznej wynosił 180 g., w grupie kontrolnej A, żywionej pokarmem sterylizowanym 193 g, a w grupie B, żywionej pokarmem surowym 198 g. Ciężar końcowy (dn. 2.X.36.) kurcząt 59 dniowych został podany w tabeli I.

T a b e l a I.

Ciężar ciała kurcząt aseptycznych i kontrolnych (w gramach).
Poids du corps des poules aseptiques et des temoins (en grms.).

Płeć <i>Sexe</i>	Zwierzęta aseptyczne <i>Animaux aseptiques</i>	Grupa kontrolna A <i>Lot témoin A</i>	Grupa kontrolna B <i>Lot témoin B</i>
♂	615,570,550	505	875,865,820
♀	395	485,420,385	705

Jak widać, ciężar ten jest zupełnie normalny i nie ustępuje wynikom, uzyskanym na rozmaitych dietach przez innych autorów.

Duży przyrost ciężaru kur aseptycznych świadczy o tym, że hipoteza syntezy witaminy C przez florę jelitową nie spraw-

dza się w przypadku kur. Pozostaje otwarta kwestia, czy kury aseptyczne syntezują witaminę C, czy też omijają ją w swej przemianie materii i obywają się bez niej zupełnie. Na podstawie wspomnianej już pracy Ray'a ('34) oraz ciekawej pracy Waldmana i Goushvy ('36) jestem skłonny uważać za prawdopodobniejsze to pierwsze przypuszczenie.

Pomiędzy dniem 27.VIII i 16.IX oznaczano ilość zjedzonego pokarmu i suchą masę kału, a właściwie kałomoczu oraz przyrost żywej wagi u kur aseptycznych i kontrolnych z grupy A. W okresie tym hodowano jeszcze po 5 kur w każdej grupie. Zestawienie odpowiednich danych zawiera tabela II.

Tabela II.

Spożycie pokarmu, produkcja kałomoczu i przyrost żywej wagi u kur aseptycznych i kontrolnych (A) w okresie od 27/VIII do 16/IX.
Consommation de la nourriture, production de fèces et accroissement du poids chez les poules aseptiques et témoins (A) (entre le 27/VIII et le 16/IX).

	Kury aseptyczne <i>Poules aseptiques</i> kg	Kury kontrolne (grupa A) <i>Poules témoins</i> (Lot A) kg
Ilość spożytego pokarmu <i>Quantité de nourriture consommée</i>	3.50	3.50
Sucha masa kałomoczu <i>Poids sec des fèces</i>	1.12	1.17
Ciężar początkowy ciała <i>Poids initial du corps</i>	0.68	0.80
Przyrost żywej wagi <i>Accroissement du poids</i>	1.05	0.84

Widzimy, że nie ma żadnej zasadniczej różnicy pomiędzy wykorzystaniem pokarmu u kur aseptycznych i kontrolnych. Większy przyrost żywej wagi w grupie aseptycznej był wywołany prawdopodobnie różnicami płciowymi, ponieważ w tej grupie były 3 koguty i 2 kury, gdy natomiast w grupie kontrolnej tylko 1 kogut i 4 kury. Oczywiście, lepsze wyniki dałaby dokładna analiza kałomoczu według wzorów K a t a y a m y i T i t u s a, ale w pierwszym przybliżeniu sucha masa kałomoczu, wyprodukowanego z identycznej ilości pokarmu (dawanego ad libitum), wydaje mi się, że jest wystarczającą wielkością orientacyjną.

Duża różnica w przyroście (również w zapotrzebowaniu pokarmu) zwierząt aseptycznych i grupy kontrolnej A z jednej

strony, a grupy kontrolnej B z drugiej strony jest wywołana stanem lekkiej hipowitaminozy B, w której umyślnie trzymano dwie pierwsze grupy.

Chodziło o to, czy w tych warunkach nie ujawni się jakaś działalność syntetyczna flory jelitowej w stosunku do witamin z grupy B. Kurczęta dostawały (z wyjątkiem okresu pomiędzy 6.IX i 11.IX) 6% drożdży (suchej masy), a jak już wspomniano, optymalny wzrost (i zapotrzebowanie pokarmu) zapewnia dopiero dodatek ca. 10% drożdży do pokarmu autoklawowanego. Z tabeli widać, że obecność bakterij nie wpływa na stan kurcząt trzymany w lekkiej hipowitaminozie B.

W okresie pomiędzy 6.IX i 11.IX, kiedy kurczęta dostawały 12% drożdży (dwie kolbki zawiesiny drożdżowej do 0.5 kg pokarmu suchego autoklawowanego) kurczęta aseptyczne wykazały przyrost nawet nieco większy, niż grupa żywiona pokarmem surowym (również uzupełnionym drożdżami). Duże zapotrzebowanie witamin z grupy B przez młode kury podkreślał również H o g a n ('33) i wielu innych autorów. W dietach „syntetycznych” dla kur dodatek drożdży wynosi zwykle 10 — 15% (B o m s k o v '35, D a m '33), a w jednej z diet H o g a n a nawet 40%.

D o ś w i a d c z e n i e II. Hodowla na pokarmie bezwitaminowym. Wracając do zagadnienia syntezy witamin przez florę bakteryjną w jelicie kury, należy podkreślić, że nie udało się stwierdzić żadnej różnicy w wyglądzie i zachowaniu się kur aseptycznych i kontrolnych również w warunkach awitaminozy kompletnej. Pisklęta aseptyczne, hodowane na pokarmie autoklawowanym bez dodatku drożdży ginęły w tym samym czasie (po upływie 6 do 10 dni), co pisklęta kontrolne. Obie grupy wykazywały typowe objawy beri-beri. Na podstawie lektury pracy S c h o t t e l i u s a można było oczekiwać, że awitaminoza u piskląt zakażonych nastąpi znacznie później. Być może, że w doświadczeniach S c h o t t e l i u s a chodziło o syntezę witamin, przeprowadzoną przez bakterie, rozwijające się nie w przewodzie pokarmowym zwierzęcia, a w wilgotnym i zakażonym pokarmie.

D o ś w i a d c z e n i e III. Doświadczenie to zostało przeprowadzone w celu ustalenia wpływu drożdży na rozwój

kur aseptycznych na jednym osobniku, hodowanym w ciągu 68 dni na pokarmie, zawierającym zmienny % drożdży.

Hodowlę rozpoczęto na pokarmie bezwitaminowym. Po upływie 9 dni, kiedy z 7 piskląt początkowych pozostało przy życiu już tylko jedno, również zdradzające objawy *polineuritis*, przeniesiono je na pokarm, zawierający 10% drożdży. Kureczkę wyzdrowiało i w przeciągu tygodnia podwoiło wagę ciała. Następnie dawkę drożdży obniżono do 2.5%. Kureczkę pozostało zdrowe, ale tempo wzrostu zaczęło stopniowo maleć, aż wreszcie przyrost skurczył się do 20 g na tydzień. Wtedy kureczkę podano pokarm, zawierający ca. 8% drożdży. Przyrost natychmiast podniósł się do 105 g na tydzień. W chwili zakończenia doświadczenia po 68 dniach hodowli aseptycznej kogut ważył 450 g. Przeniesiony na pokarm surowy, do ogrodu, rozwijał się dalej w tym samym tempie (100 g przyrostu na tydzień).

3. Badanie jałowości.

Kał kurecząt, hodowanych w aparacie zasiewano na agar bulionowy oraz na agar i żelatynę, przygotowaną na brzeczce piwnej. Ciekawym zjawiskiem było aseptyczne rozrzedzanie żelatyny przez enzymy proteolityczne, znajdujące się w kale.

Kał kur aseptycznych miał zapach przyjemny, miodowy, zupełnie nie przypominający ostrego zapachu kału kur zakażonych.

Na początku każdego doświadczenia zatapiało jedno kureczkę w słoiku z wodą peptonową, wstawionym na stałe do aparatu. Substancje, dyfundujące z ciała kureczęcia do wody peptonowej zamieniały ją w znakomitą pożywkę, szybko zdradzającą zakażenie. Dopóki w aparacie nie było bakteryj, ciecz w słoiku pozostawała zupełnie przezroczysta.

Streszczenie wyników.

- 1) Skonstruowano aparat i opracowano metodę aseptycznej hodowli zwierząt, pozwalającą na:
 - 1°, wprowadzanie do aparatu bez obawy zakażenia jaj sterylizowanych lub zwierząt wyjętych aseptycznie z łona matki;

- 2°, podawanie tym zwierzętom pokarmu i zbieranie kału w trakcie doświadczenia,
- 3°, podawanie uzupełnień witaminowych w postaci nie zawierającej drobnoustrojów przesączalnych.
- 2) Wyhodowano 5 kurcząt aseptycznych w wieku 2 miesięcy. Ciężar ciała kurcząt aseptycznych wynosił: 615, 570, 550, 450, 395 g, kurcząt kontrolnych 505, 485, 420, 385 g.
- 3) Stwierdzono, że flora jelitowa u kur nie wywiera żadnego wyraźnego wpływu na strawność pokarmów.
- 4) Stwierdzono, że mikroflora jelitowa nie wpływa na zapotrzebowanie witamin, a w szczególności nie jest przyczyną niewrażliwości ptaków na brak witaminy C w pożywieniu.

Panu Profesorowi Dr. K. B a s s a l i k o w i, Kierownikowi Zakładu Fizjologii Roślin U. J. P., najuprzejmiej dziękuje za udzielone mi cenne wskazówki.

P i ś m i e n n i c t w o .

E. A b d e r h a l d e n. 1931. Lehrbuch der physiologischen Chemie. — N. B a l z a m. 1936. Losy flory bakteryjnej podczas metamorfozy muchy mięsnej *Calliphora erythrocephala*. Acta Biol. Exp. 10 (99 — 132). — C. B o m s k o v. 1935. Methodik der Vitaminforschung. (1 — 301). — M. C o h e n d y. 1912. Expériences sur la vie sans microbes. Ann. Inst. Past. 26 (106—137). — M. C o h e n d y et E. W o l l m a n. 1914. Expériences sur la vie sans microbes. Elevage aseptique de cobayes. Compt. Rend. Acad. Sc. 158 (1283—1284). — M. C o h e n d y et E. W o l l m a n. 1922. Quelques résultats acquis par la méthode des élevages aseptiques. I. Scorbut expérimental. II. Infection cholérique du cobaye aseptique. Compt. Rend. Acad. Sc. 174 (1082 — 1084). — H. D a m. 1933. The antihaemorrhagic vitamin of the chick. Bioch. Journ. 29 (1273 — 1285). — C. A. E l v e h j e m and V. F. N e u. 1932. Studies in vitamin A avitaminosis in the chick. Journ. biol. Chem. 97 (71—82). — C. A. E l v e h j e m, O. L. K l i n e, I. A. K e e n a n and E. B. H a r t. 1932. A study of the heat stability of vitamin B. factors required by the chick. Journ. biol. Chem. 99 (309 — 319). — H. E u l e r. 1936. The water soluble vitamins. Ann. Rev. Bioch. (355 — 378). — C. F u n k. 1924. Die Vitamine (1 — 522). — G. G l i m s t e d t. 1936. Bakterienfreie Meerschweinchen. Acta Patholog. et Microb. Scand. Suppl. 30 (1 — 295). — L. H a r r i s. 1935. The vitamins. Ann. Rev. Bioch. (331 — 382). — R. P. H o b s o n. 1933. Growth of blow-fly larvae on blood and serum. Bioch. Journ. 27 (1899 — 1909). — A. G. H o g a n and R. V. B o u c h e r. 1933. The nutritional requirements of the chick. Agricult. Exp. Station Research. Bull. 198

— O. L. Kline, J. A. Keenan, C. A. Elvehjem and E. B. Hart. 1932. The use of chick in vitamin B₁ and B₂ studies. *Journ. biol. Chem.* 99 (295 — 307). — B. Koldayew. 1936. *Biologičeskiei sintez wit.* C. Priroda, Nr. 5. (121). — E. Küster. 1912. Die keimfreie Züchtung von Säugetieren und ihre Bedeutung für die Erforschung der Lebensfunktionen. *Centralbl. f. Bakt. Ref.* 54, Beiheft (55 — 58). — E. Küster. 1925. Aufzucht keimfreier Säugetiere. *Handb. biol. Arbeitsm.* IV. 9 (419 — 436). — M. Lisbonne. 1931. Microbes et actions microbiennes dans le tube digestif. *Traité de Physiol. norm. et path.* 11 (445 — 484). — G. H. F. Nuttall u. H. Thierfelder. 1895/1896. Thierisches Leben ohne Bakterien im Verdauungskanal. *Zs. physiol. Chem.* 21 (109 — 121). — G. H. F. Nuttall u. H. Thierfelder. 1896/1897. Thierisches Leben ohne Bakterien in Verdauungskanal. *Ibid.* 22 (62 — 73). — G. H. F. Nuttall u. H. Thierfelder. 1897. Thierisches Leben ohne Bakterien im Verdauungskanal. *Ibid.* 23 (231 — 235). — S. N. Ray. 1934. A note on the presence of vitamin C in the chick embryo. *Bioch. Journ.* 28 (189 — 191). — M. Schieblich. 1932. Methoden bei Arbeiten über Zusammensetzung und Wirkung der Magendarmflora. *Handb. biol. Arbeitsm.* Abt. 4, Bd. 2. (1894 — 1920) — M. Schottelius. 1899. Die Bedeutung der Darmbakterien für die Ernährung. I. *Arch. f. Hyg.* 34 (210 — 243). — M. Schottelius. 1902. Die Bedeutung der Darmbakterien für die Ernährung. II. *Ibid.* 42 (48—70). — M. Schottelius. 1908. Die Bedeutung der Darmbakterien für die Ernährung. III. *Ibid.* 47 (177 — 208). — M. Schottelius. 1913. Die Bedeutung der Darmbakterien für die Ernährung. IV. *Ibid.* 79 (289 — 300) — A. Waldman, O. Goushva. 1936. About the synthesis of vitamin C in fowls. *Sbornik po fizjologji ptic.* t. II (143 — 157).

[Zakład Biologii Ogólnej Uniwersytetu S. B. w Wilnie].

Stanisław Wawrzyńczyk.

Badania nad pamięcią *Spirostomum ambiguum* major.

Untersuchungen über das Gedächtnis von Spirostomum ambiguum major.

Rękopis nadesłany w dniu 21.X. 1936 r.

Die im Heuaufguss nach Specht's Methode gezüchteten Spirostomen kamen einzeln in ein flaches kreisrundes Gefäss von 0.5 ccm Fassung, welches auf einem Objektträger aufgeklebt wurde. In bestimmten Zeitabständen wurde der Objektträger durch Schläge eines Hammers (4 g Gewicht, Fallhöhe 6 cm) erschüttert, wobei sich die Tiere kontrahierten. Die Frequenz der Schläge, automatisch geregelt, betrug bei regelmässiger Reizung 6 Schläge pro Minute, bei unregelmässiger Reizung dagegen variierte sie zwischen 6 und 12 Schlägen pro Minute. Die Kontraktionen wurden allmählich schwächer und seltener, schliesslich hörten sie ganz auf. Bei unregelmässiger Reizung verschwanden sie durchschnittlich nach 156 Minuten, die Tiere führten in dieser Zeit 322.5 Kontraktionen aus (Fig. 1 A und Tab. I). Bei regelmässiger Reizung dauerten die Kontraktionen 194 Min., deren Zahl war 307.9. (Fig. 1 B). Die Kurve des Kontraktionenschwundes weist einen periodischen Charakter auf, was bei Berücksichtigung einzelner Individuen besonders klar hervortritt. Auf Seite 65 ist die Anzahl der Kontraktionen für aufeinander folgende Zeitspannen von je 5 Min. und für 10 Einzeltiere angegeben worden. Tab. II enthält die betr. Werte als Durchschnitt für 25 Tiere. Auf Tab. III sieht man die Dauer der Kontraktilität von 25 Infusorien, die Anzahl der ausgeführten Kontraktionen, sowie die Zeit, nach welcher die be-

reits erloschene Kontraktilität wiederkehrt. Das Verhalten der Spirostomen wurde ferner in einer 24 Stunden dauernden ununterbrochenen Beobachtung überwacht. 8 Individuen kamen in ein gemeinsames Gefäss, wo sie während 5 Stunden regelmässigen Hammerschlägen ausgesetzt wurden. Nach dieser Zeit hörten die Kontraktionen auf. Dann wurden die Tiere in 8 Einzelgefässe übertragen und in Abständen von je 3 bzw. 5 Min. prüfte man deren Kontraktilität mit einzelnen Hammerschlägen. Durchschnittlich 50 Min. nach dem ersten Einstellen der Kontraktionen konnte keine Reaktion auf vereinzelte Schläge beobachtet werden, dann aber kehrte die ursprüngliche Kontraktilität allmählich zurück. Jetzt reizte man die Tiere wieder mit regelmässigen Schlägen, bis die Kontraktionen aufhörten, was nach etwa 100 Min. eintrat. Die Periode der Unempfindlichkeit dauerte wiederum 50 Min., wonach die Kontraktilität einsetzte usw. Die deutliche Periodizität der Erscheinung ist auf Fig. 2 zu sehen.

Es ist von besonderem Interesse, dass sich in vielen Fällen die Zeit als reizender Faktor erwiesen hatte. Wird das Tier jede 10 Min. mit einem Schlag gereizt und nach einiger Zeit der Schlagrhythmus verlangsamt, so behalten die Tiere oft den ursprünglichen Rhythmus der Kontraktionen bei, es erfolgt also eine Reaktion in Abwesenheit des effektiven Reizes. Dieses Verhalten trat manchmal schon nach 4—5 Min. ein, meist jedoch nach einer längeren Frist.

Kontrollversuche zeigten, dass die bei sonst identischen Bedingungen gehaltenen, aber ungereizten Tiere keine Spontankontraktionen ausführen. Eine Intoxikation als Ursache des Kontraktionenschwundes liess sich durch verschiedenen häufigen Wechsel des Aussenmediums sicher ausschalten. Was die Ermüdung anbelangt, so kommt dieselbe ebenfalls nicht in Frage, was aus Experimenten mit verlangsamttem Schlagrhythmus folgt. Werden die Kontraktionen bei 12 Schlägen pro Min. eingestellt und wendet man sofort einen zweimal langsameren Rhythmus an, so kontrahieren sich die Tiere, obwohl der Reiz ein schwächerer geworden ist. Die Tiere reagieren auf eine Veränderung des Rhythmus. Die Anzahl der in Methylblaulösung gebildeten Nahrungsvakuolen war dieselbe bei gereizten,

wie bei ungeretzten Tieren (Tab. IV), somit ist keine Ermüdung der Zelltätigkeit eingetreten. Schliesslich zeigten Versuche mit verschiedenen präparierten Medien, dass die Periodizität in der Kontraktionsfähigkeit nicht auf periodische Schwankungen der Eigenschaften des Mediums zurückgeführt werden kann.

Es lässt sich feststellen, dass die Kurven der Lernfähigkeit von *Spirostomum* dem Verhalten höherer Tiere durchaus entsprechen. Selbst die Lernfähigkeit des Menschen (Ebbin g h a u s) folgt quantitativ denselben Regeln.

Problemat istnienia zdolności pamięciowych u pierwotniaków wyłonił się w trakcie badań nad pobieraniem pokarmów przez wymoczki.

Na podstawie takich badań S t e i n i E n t z G. ('67) doszli do wniosku, że wymoczki posiadają zdolność rozróżniania i wyboru pokarmów. Badania E h r e n b e r g a ('38), V e r w o r n a ('89) i J e n n i n g s a ('14) wskazują na to, że wymoczki mogą pochłaniać substancje obojętne. M e t a l n i k o w ('14) stwierdził, że wymoczki uczą się odrzucać zawiesiny pozbawione własności odżywczych w czasie od 20 godz. do 10 dni, zależnie od rodzaju zawiesiny. Nabyta zdolność odrzucania zawiesin trwa tylko do chwili podziału wymocзка. M e t a l n i k o w przypisuje wymoczkom, oprócz zdolności rozróżniania i wyboru pokarmów, pewne zdolności pamięciowe.

Wartość tych wyników zakwestjonowali W l a d m i r s k i ('16) i D e m b o w s k i ('21), którzy stwierdzili, że M e t a l n i k o w nie uwzględnił w swej pracy szeregu czynników, a mianowicie toksycznego wpływu środowiska, w którym badany wymoczek przeżywa, krótkiego czasu obserwacji, oraz nie przeprowadził dostatecznych doświadczeń kontrolnych, wskutek czego wyniki jego badań nie mają należytego uzasadnienia. Nie przesądza to jednak kwestii istnienia u wymoczków zdolności pamięciowych.

Osobną grupę badań zjawisk pamięciowych stanowią doświadczenia nad zdolnością uczenia się pierwotniaków. S m i t h S. ('08) obserwował obroty *Paramecium* w rurce kapilarnej. O ile na początku doświadczenia wykonywa *Paramecium* pierwszy obrót po upływie dwudziestu godzin, o tyle pod koniec doświadczenia robi to po pięciu, dwóch, a nawet jednej minucie.

Badania zdolności pamięciowych *Paramecium* (kojarzenie ciemności i ciepła, ciepła i grawitacji) dały wynik ujemny.

D a y L. M. i B e n t l e y M. ('11) wykonali szereg podobnych doświadczeń i znaleźli, że czas, jaki upływa między kolejnymi obrotami, maleje, zależnie od liczby powtórzeń i wykonanych prób obrotu. Jak widać z tej pracy, sposób uczenia się *Paramecium* nie różni się zasadniczo od tego, jaki cechuje inne zwierzęta.

Podobne badania, ze względu na metodę, przeprowadził D a n i s c h F. ('20) nad *Vorticella nebulifera* Ehrbg. Stosował on szereg bodźców chemicznych, jak również bodziec mechaniczny w postaci spadkownicy A t w o o d a; określił próg podniety, na którą *Vorticella* reaguje jeszcze skurczem. Według tego autora, stopień wrażliwości organizmu może zmieniać się zależnie od siły bodźca. Na słabe podniety przestaje *Vorticella* reagować po krótkim czasie.

Podobnie doświadczenia J e n n i n g s a nad *Stentor roeselii*, *Epistylis* i *Carchesium* wskazują na to, że pierwotniaki przestają reagować na słabe bodźce już po pierwszym podrażnieniu, a silniejsze podniety wywołują szereg reakcyj, które stopniowo zanikają. Dalsze próby drażnienia nie wywołują już reakcji, gdyż *Stentor* przystosował się do zmienionych warunków życia. To przystosowanie się do nowych podniety ma charakter regulacyjny, a nie przypadkowy, jest następstwem zmian, zachodzących w organizmie pierwotniaka.

B r a m s t e d t F. ('35) w drażnieniu wymoczków stosował następujące pary bodźców: ciemność—zimno, światło—ciepło, ciepło—wstrząs, zimno—wstrząs, dla *Paramecium*, a dla *Stylonychia*: światło—wstrząs, ciemność—brak wstrząsu, jasność—chropowatość dna naczynia, ciemność—gładkość dna naczynia. Doświadczenia trwały od dwóch do 6-ciu godzin. Wymoczki wyuczyły się szybko odróżniać podniety. Kombinacje bodźców, z jakimi się spotykają wymoczki w życiu naturalnym, dają rezultaty pozytywne. Negatywne wyniki uzyskał B r a m s t e d t, gdy stosował nie-naturalne kombinacje bodźców (np. jasność—zimno, ciemność—ciepło).

Na podstawie tych badań, wyciąga B r a m s t e d t daleko idące wnioski, które ujmuję w streszczeniu:

- 1°. *Paramecium* kojarzy światło—ciepło, ciemność—zimno, ciepło—wstrząs, a nawet może rozróżnić prawą i lewą stronę naczynia.
- 2°. *Paramecium* ujmuje nie tylko formę, ale i wielkość przestrzeni.
- 3°. *Stylonychia* kojarzy również wszelkie stosowane bodźce.
- 4°. Tresowane osobniki zachowują nabytą umiejętność w ciągu 15 minut.

Wnioski te, ze względów metodycznych, nasuwają pewne wątpliwości nawet w doświadczeniach najbardziej ważnych dla pracy.

W przyjętym przez autora sposobie drażnienia bodźcami ciemność—zimno i światło—ciepło nie można wyznaczyć linii granicznej dla części ciepłej i zimnej kropli, w której przebywa badany wymoczek, gdyż wskutek prądów konwekcyjnych granica ta jest zupełnie rozmyta. Również i sposób obserwacji rozróżniania przestrzeni u *Paramecium* jest niepewny, gdyż przy przenoszeniu wymoczka z naczynia o mniejszej objętości do naczynia o większej objętości, lub odwrotnie, przenosimy go zawsze w kropli poprzedniej pożywki; w tych warunkach ruchy wymoczka dają się wytlumaczyć reakcją chemotaktyczną na granicy poprzedniej pożywki a nowego środowiska. Rozróżnienie strony lewej i prawej naczynia, jak sam autor przyznaje, nie jest zbyt wyraźne. Pomijając omówione wyżej zastrzeżenia, należy zaznaczyć, że wyniki doświadczeń nad *Stylonychia*, oraz wyniki uży-

skane przy drażnieniu *Paramecium* przez stosowanie pary bodźców ciepło—wstrząs, przemawiają za istnieniem u pierwotniaków pewnych zdolności skojarzeniowych.

Problemata występowania skurczów u *Spirostomum* interesuje już od kilkudziesięciu lat wielu autorów. J e n n i n g s ('99) dotykał *Spirostomum* pałeczką szklaną i obserwował kolejne skurcze pierwotniaka. Stwierdził, że część przednia wymocзка reaguje szybciej na podniecie. Najważniejszym w tym przypadku spostrzeżeniem J e n n i n g s a było to, że *Spirostomum* po pierwszym skurczu reaguje ucieczką na działanie następných bodźców, a po pięciu, lub sześciu próbach nie reaguje zupełnie. P ü t t e r ('04) przeprowadził badania nad czasem rozkurezu *Spirostomum*, który wynosi przeciętnie, według jego obliczeń, 1.098 sek. Podobne badania przeprowadził B i s h o p A. ('23).

Doświadczenia nad kuczliwością są uzależnione od rodzaju pożywki. Według S a u n d e r s a J. T. ('24) ruchy *Spirostomum* zależą od koncentracji pożywki, jej optymalne pH wynosi 7.4.

Badania J e n n i n g s a podjął B l ä t t n e r ('26), który drażnił pojedynczego osobnika pałeczką szklaną 100 razy i zaobserwował 74 skurcze. Niestety dalsza obserwacja stała się niemożliwa, gdyż przy tym sposobie drażnienia *Spirostomum* przestaje reagować na wszelkie bodźce, a wreszcie zamiera. Objawy zmęczenia występowały u wymocзка już za 30-ym dotknięciem. Jak widać z pracy B l ä t t n e r a, sposób reagowania na bodźce jest u *Spirostomum* bardziej skomplikowany od sposobu, opisanego przez J e n n i n g s a. Ponieważ jednak rodzaj reakcji *Spirostomum* zależy od intensywności podniecia zewnętrznej, drażnienie pierwotniaka ręką, czyli stosowanie bodźców o zmiennym i nieprawidłowym natężeniu, jak to czynił B l ä t t n e r, nie umożliwia jeszcze dokładniejszego poznania zjawiska skurczu.

W pracy obecnej próbowano wyeliminować braki metodyczne, z jakimi spotykamy się w pracach wymienionych autorów.

Praca ma na celu:

1°. Opis zachowania się *Spirostomum* wobec wstrząsów.

2°. Stwierdzenie, czy zanik skurczów wiąże się w jakiś sposób z objawami pamięci?

M e t o d y k a.

Spirostomum były hodowane początkowo w pożywce sianowej (pH = 7.2 do 7.0), w czasie badania pierwszych 10-ciu osobników. Jednak w tym środowisku bardzo często pierwotniaki opadają na dno naczynia i przestają reagować skurczem na wszelkie bodźce, wskutek czego nie nadają się zupełnie do doświadczeń.

O wiele lepsza okazała się pożywka S p e c h t a ('35), która umożliwia hodowlę pierwotniaków w ciągu dłuższego czasu.

Pojedyncze osobniki, używane do każdej serii doświadczeń, pochodziły z podziału 2-ch pierwotniaków, umieszczonych w naczynku szklanym na

przeciąg 2—3 dni w komorze wilgotnej. Na podstawie wstępnych obserwacji dało się zauważyć, że osobniki młode, pochodzące z podziału, reagują żywo i dłużej na wszelkie bodźce.

We wszystkich doświadczeniach, przeprowadzonych w temperaturze pokojowej, przenoszono pierwotniaki pipetą o stosunkowo dużej średnicy do krystalizatora o objętości 0.5 cm³, przyklejonego do szkiełka podstawowego. Z klinostatem o napędzie elektrycznym (prąd zmienny) sprzężono tarczę, posiadającą 12 zębów. Zęby zahaczały o rękojeść młoteczka i unosiły go w górę, poczem młoteczek spadał na szkiełko podstawowe, wstrząsając krystalizator z pierwotniakiem. Ciężar główki młoteczka — 4 g, długość ramienia drażniącego — 17 cm, główka spadała z wysokości 6 cm. Częstość obrotu klinostatu, a zatem i częstość uderzeń, regulowano za pomocą suwaka, włączonego w obwód opornicy. W tych warunkach odbywały się obserwacje mikroskopowe pojedynczych pierwotniaków. Przy użyciu dwóch krystalizatorów na jednym szkiełku podstawowym, obserwowano pierwotniaki za pomocą binokularu. Częstość uderzeń młoteczka wahała się od 6—12 na min.; 12 uderzeń na min. stosowano w początkowej fazie doświadczeń w przypadkach drażnienia nierównomiernego t. zn., że w trakcie doświadczenia, w chwili gdy ustawały skurcze pierwotniaka wskutek drażnienia w rytmie 12/min., zmniejszano dowolnie liczbę uderzeń od 12 do 6-ciu na minutę. Przy drażnieniu równomiernym stosowano 6 uderzeń na min. przez cały czas trwania doświadczenia. Ze względu na to, że każdorazowa obserwacja trwała od 2-ch do 5-ciu godz., zmieniano pożywkę co $\frac{1}{2}$ lub co 1 godz., nie przerywając obserwacji. W wielu przypadkach zmieniano pożywkę raz tylko w ciągu trwania doświadczenia lub też robiono to nieregularnie, w różnych odstępach czasu. Zmieniana każdorazowo pożywka pochodziła z tego samego naczynia, w którym przebywał pierwotniak przed rozpoczęciem doświadczenia.

Inne szczegóły metodyczne będą podawane przy omówieniu doświadczeń.

O p i s d o ś w i a d c z e ń .

Z chwilą umieszczenia *Spirostomum* w krystalizatorze, obserwowano jego ruchy. Przednia część ciała wymoczką zwraca się początkowo na wszystkie strony, przy czym cały pierwotniak pozostaje w miejscu. Po chwili takiego „zapoznawania się” z nowymi warunkami środowiska, *Spirostomum* posuwa się naprzód, lecz spotyka na drodze przeszkody w postaci ścianki naczynia. Czasami kureczy się już po pierwszym zetknięciu się ze ścianką, poczem zawraca i zmierza w stronę przeciwną. Następne obroty od ścianki naczynia powodują zmianę kierunku ruchu już nie w stronę przeciwną, lecz na boki. W ten sposób już po

2—3 min. takich ruchów *Spirostomum* posuwa się przy ściance krystalizatora, przy czym od czasu do czasu zmienia kierunek ruchu, wciąż zakreślając koło.

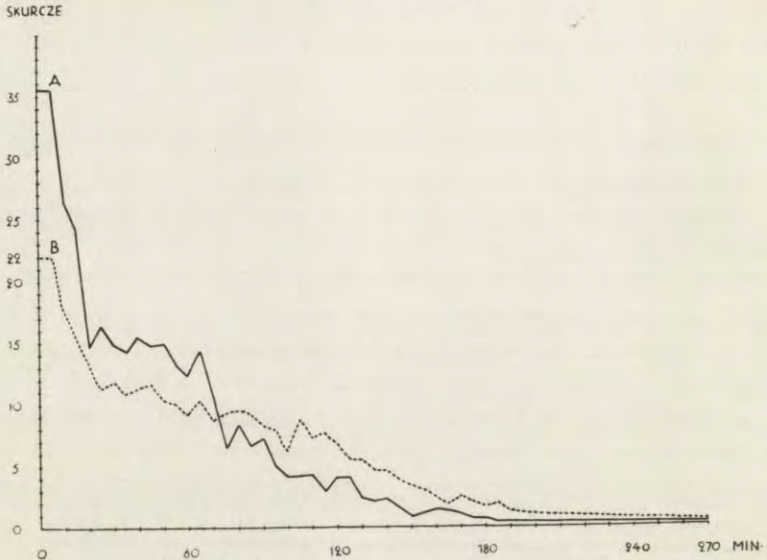
W ciągu pierwszych 15 min. przebywania w krystalizatorze *Spirostomum* nie wykonywa samowolnych skurczów, o ile nie wstrząsamy naczyniem. Po upływie 15 min. od chwili umieszczenia wymocзка w krystalizatorze rozpoczyna się drażnienie.

Pierwsze uderzenie powoduje natychmiastowy skurcz, a po rozkurczu zmienia wymoczek poprzedni kierunek ruchu. Następne uderzenia wywołują ten sam skutek. W tych warunkach ruchy *Spirostomum* są niespokojne, chaotyczne, odbywają się we wszystkich kierunkach i stan ten trwa w okresie pierwszych 10—20 uderzeń, kiedy wymoczek kurczy się za każdym razem. Następne uderzenia nie zawsze wywołują skurcze i ruchy *Spirostomum* odbywają się już po kole, z częstymi zmianami kierunku.

1. Drażnienie nierównomierne.

W miarę trwania doświadczenia, *Spirostomum* kurczy się coraz rzadziej, aż wreszcie przestaje zupełnie reagować na podniecie, działającą 12 razy na min. W momencie zaniku skurczów zmniejszono częstość uderzeń. Przy zmianie rytmu *Spirostomum* reaguje natychmiast skurczem, lecz już po upływie kilku minut przyzwyczajają się do nowego rytmu drażnienia i przestaje reagować. Wtedy stosowano ponownie 12 uderzeń na min. W ten sposób zmieniano rytm drażnienia *Spirostomum* aż do zupełnego zaniku skurczów.

Na drażnienie nierównomierne wymoczek reaguje częstymi skurczami w ciągu pierwszych 5-ciu minut. Liczba skurczów w tym okresie czasu waha się od 21 do 60 i wynosi przeciętnie około 35.5 na 60 możliwych skurczów. Liczba skurczów w następnych okresach czasu stopniowo maleje, wreszcie skurcze zanikają zupełnie. Zanik ten nie jest jednak ciągły, lecz ma charakter nieprawidłowo okresowy, co jest zwłaszcza wyraźne, gdy się uwzględni pojedyncze osobniki. Okresy te dla poszczególnych wymoczków wypadają w nieco różnym czasie i dlatego na krzywej A, wyobrażającej przebieg zaniku skurczów 10-ciu osobników łącznie, okresowość jest zatarta.



Rys. 1. Przebieg zaniku skurczów *Spirostomum*.
 A — przy drażnieniu nierównomiernym (6—12 uderzeń na min.); B ---- przy drażnieniu równomiernym (6 uderzeń na min.).

Fig. 1. Das Aufhören der Kontraktilität.
 A — bei unregelmässiger Reizung (6—12 Schläge pro Min.); B ---- bei regelmässiger Reizung (6 Schläge pro Min.).

Tabela I.

Czas reagowania skurczem i liczby skurczów przy drażnieniu nierównomiernym.

Die Dauer und die Anzahl der Kontraktionen bei unregelmässiger Reizung.

Nr.	Zanik skurczów po min. Aufhören der Kontraktionen nach Min.	Liczba skurczów Anzahl der Kontraktionen
1	135	168
2	170	386
3	250	447
4	160	168
5	130	279
6	95	332
7	150	390
8	120	259
9	185	453
10	165	343
	156	322.5

Nasuwa się pytanie, czy szybkość zaniku skurczów zależy od czasu drażnienia, czy też od liczby wykonanych skurczów. Wyniki, uzyskane z obserwacji pojedynczych osobników, różnią

się znacznie od siebie, wobec czego trudno jest w tej fazie doświadczeń dać dostateczną odpowiedź na to pytanie. Jak widać z tab. I. czas, po którego upływie ustają skurcze, jest niezależny od liczby wykonanych skurczów (por. osobniki: Nr. 1. 5. 6. i t. d.; często przy małej liczbie skurczów okres kurczliwości *Spirostomum* jest stosunkowo długi i odwrotnie). Różnica ta, jak wynika z obserwacji poszczególnych osobników, jest wynikiem mniej lub bardziej powolnego zaniku skurczów.

Poniżej podaję liczby skurczów dziesięciu pojedynczych wymoczków w ciągu kolejnych okresów 5-cio minutowych:

1) 28; 12; 8; 8; 15; 11; 6; 2; 17; 12; 8; 5; 10; 15; 2; 1; 0; 0; 0; 1; 0; 1; 2; 0; 3; 1; 0. Liczba skurczów: 168.

2) 22; 12; 18; 11; 23; 17; 21; 27; 30; 34; 21; 24; 30; 8; 5; 19; 10; 2; 6; 5; 6; 11; 4; 10; 8; 2; 0; 0; 1; 0; 0; 0; 1; 2; 0; 0; 0. Liczba skurczów: 386.

3) 26; 23; 18; 17; 17; 14; 16; 15; 20; 14; 10; 12; 16; 10; 11; 9; 10; 9; 11; 8; 7; 9; 11; 11; 8; 13; 15; 10; 7; 11; 10; 7; 10; 7; 6; 2; 2; 3; 2; 2; 0; 0; 3; 1; 0; 1; 1; 0; 0; 0. Liczba skurczów: 447.

4) 33; 24; 14; 22; 9; 9; 13; 7; 9; 6; 5; 6; 0; 1; 1; 2; 0; 1; 0; 0. Liczba skurczów: 168.

5) 25; 22; 28; 20; 23; 19; 15; 18; 9; 15; 9; 11; 13; 6; 6; 10; 8; 0; 0; 2; 0; 2; 1; 1; 2; 1; 0; 0; 0. Liczba skurczów: 279.

6) 41; 32; 46; 13; 18; 8; 8; 14; 16; 30; 16; 13; 12; 14; 8; 14; 16; 9; 4; 0; 0; 0. Liczba skurczów: 332.

7) 60; 48; 27; 14; 2; 2; 4; 13; 6; 6; 4; 14; 6; 8; 10; 3; 4; 13; 6; 15; 17; 8; 1; 4; 7; 2; 0; 6; 0; 0; 0. Liczba skurczów: 390.

8) 21; 12; 14; 22; 18; 24; 18; 22; 15; 16; 15; 20; 15; 9; 1; 3; 0; 7; 3; 3; 0; 0; 1; 0; 0; 0; 0. Liczba skurczów: 259.

9) 51; 42; 42; 13; 19; 18; 23; 22; 13; 11; 19; 8; 21; 18; 8; 12; 10; 15; 12; 6; 3; 11; 8; 9; 9; 7; 5; 2; 2; 1; 2; 4; 5; 2; 0. Liczba skurczów: 453.

10) 48; 36; 31; 6; 25; 24; 20; 14; 11; 15; 16; 7; 23; 9; 11; 15; 4; 7; 8; 4; 7; 3; 3; 5; 3; 3; 3; 0; 2; 0; 0; 0; 1; 0. Liczba skurczów: 343.

Jak widać z powyższych zestawień, *Spirostomum* reaguje w charakterystyczny sposób na drażnienie o nierównomiernym rytmie. Z przebiegu krzywej A widzimy, że w pierwszych 5-ciu minutach reaguje wymoczek najsilniej, a następnie powoli przestaje reagować na podniecie. Przy zastosowaniu nierównomiernego rytmu drażnienia *Spirostomum* przestaje się kurczyć w czasie od 95-ciu do 250-ciu minut, licząc od chwili rozpoczęcia

drażnienia, czyli przeciętny okres kurczliwości wynosi 156 min., przy czym wymoczek kurczy się w tym okresie czasu około 322.5 razy.

2. Drażnienie równomierne.

W następnej serii doświadczeń drażniono pojedyncze osobniki uderzeniami o jednakowym rytmie 6 razy na minutę, a więc o rytmie dwa razy wolniejszym od poprzedniego. Zachowanie się *Spirostomum* w okresie pierwszych 10—20 uderzeń było podobne, jak w doświadczeniach poprzednich. Liczba skurczów w ciągu pierwszych 5-ciu min. wahała się od 7 do 28 (przeciętnie 22 skurcze). Tab. II. przedstawia liczbę skurczów w kolejnych okresach 5-minutowych.

Tabela II.

Liczba skurczów w kolejnych okresach 5-minutowych przy drażnieniu równomiernym (średnia dla 25 osobników).

Anzahl der Kontraktionen während aufeinanderfolgender Perioden von je 5 Min. (Durchschnittszahl für 25 Spirostomen).

Minuty <i>Minuten</i>	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50
Skurcze <i>Kontraktion</i>	22	17.8	15.5	12.9	11.3	11.8	11.0	11.2	11.6	10.4
Minuty <i>Minuten</i>	55	60	65	70	75	80	90	90	95	100
Skurcze <i>Kontraktion</i>	10.0	9.2	10.3	8.5	9.2	9.4	9.2	8.3	7.8	6.0
Minuty <i>Minuten</i>	105	110	115	120	125	130	135	140	145	150
Skurcze <i>Kontraktion</i>	8.6	7.2	7.5	6.8	5.5	5.5	5.0	5.0	4.0	3.4
Minuty <i>Minuten</i>	155	160	165	170	175	180	195	190	195	200
Skurcze <i>Kontraktion</i>	3.1	2.2	1.7	2.4	2.1	1.7	1.9	1.3	1.1	1.0
Minuty <i>Minuten</i>	205	210	215	225	225	230	235	240	245	250
Skurcze <i>Kontraktion</i>	0.8	0.7	0.6	0.5	0.5	0.3	0.2	0.3	0.1	0.2

Przebieg zaniku skurczów niewiele różni się w tym przypadku od przebiegu przy nierównomiernym rytmie drażnienia. Zaznaczyć jednak należy, że w przypadku drażnienia uderzeniami o jednakowym rytmie, spadek liczby skurczów jest bardziej powolny (krzywa B, rys. 1).

Jak widać z tab. III, czas trwania skurczów *Spirostomum* jest w tym przypadku dłuższy, bo waha się od 145 min. do 255

min., przeciętnie wynosi 194 min. W porównaniu do czasu trwania skurczów przy drażnieniu o nierównomiernym rytmie uderzeń, czas ten jest średnio o 29% dłuższy.

Tabela III.

Czas trwania skurczów 25 pojedynczych wymoczków, liczba skurczów i czas, po którego upływie zanikłe skurcze występują ponownie.

Die Dauer und die Anzahl der Kontraktionen von 25 Individuen, sowie die Zeit, nach welcher die bereits aufgehörten Kontraktionen wieder auftreten.

Nr.	Zanik skurczów po min. <i>Aufhören der Kontraktionen nach Min.</i>	Liczba skurczów <i>Anzahl der Kontraktionen</i>	Czas zapamiętania w min. <i>Wiederaufnahme der Kontraktionen nach Min.</i>
1	245	182	40
2	150	243	40
3	255	147	45
4	160	321	55
5	215	197	45
6	195	421	30
7	235	209	45
8	220	201	40
9	210	428	35
10	185	459	35
11	205	392	40
12	205	276	40
13	250	441	40
14	155	337	45
15	180	323	30
16	190	409	40
17	180	254	45
18	155	328	80
19	255	312	50
20	200	300	45
21	145	409	40
22	165	165	45
23	155	201	55
24	170	389	85
25	170	354	85
	194	307.9	47

Podobnie, jak w przypadku drażnienia nierównomiernego, proces zaniku skurczów u wymoczków pojedynczych jest wyraźnie okresowy.

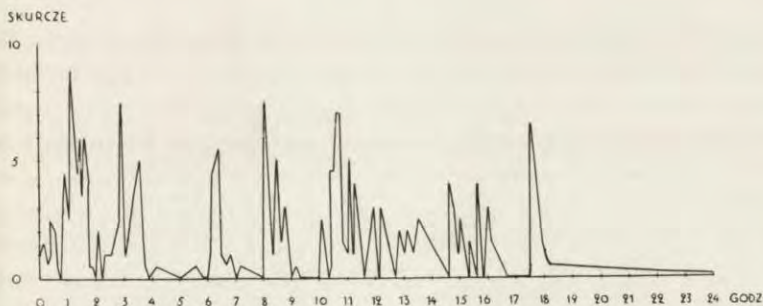
Te spostrzeżenia nasuwają pytanie, jak długo od chwili przerwania drażnienia nie reaguje *Spirostomum* na tę samą podniecię, czyli jak długo wymoczek może pamiętać drażnienie. Od chwili, gdy *Spirostomum* przestaje się kurczyć, przerywano drażnienie i pierwotniak pozostawał w spokoju. Następnie sto-

sowano po kilka uderzeń młotka w odstępach 5-cio minutowych. Po 5 min. nie zauważono żadnych zmian w zachowaniu się wymoczka. Po 10, 15, 20, 25 minutach *Spirostomum* reaguje słabo na podniecie. Dopiero po 30 minutach a nawet więcej, wymoczek reaguje skurczem na uderzenie podobnie, jak na początku doświadczenia. Jak widać z tab. III, okres czasu, w którym *Spirostomum* nie reaguje na ponowne drażnienie, waha się od 30 do 85 min. i wynosi przeciętnie 47 minut.

Zjawisko ponownego występowania skurczów u *Spirostomum* zachodzi niezależnie od długości i liczby przerw, jak również od sposobu drażnienia wymoczka. Sprawdzono to na 42 osobnikach w sposób następujący: w jednym krystalizatorze umieszczałem 5—10 wymoczków w dużej kropli pożywki. Następnie stosowałem drażnienie równomierne, 6 uderzeń na minutę w ciągu pięciu godzin (najdłuższy czas trwania poprzednich obserwacji). Po upływie tego czasu przerywałem drażnienie i ostrożnie przenosiłem pojedyncze wymoczki do osobnych krystalizatorów za pomocą pipety o szerokim otworze. Każdy pierwotniak pozostawał przez pewien czas w spoczynku, poczem następowało drażnienie. Długość przerw od chwili zaprzestania drażnienia, aż do chwili rozpoczęcia ponownych obserwacji, wahała się od 5—45 min. dla każdego wymoczka. Uderzenia młoteczka były także nierównomierne, gdyż następowały kolejno co 3, 5, 8, lub 10 sek. Okazało się, że *Spirostomum* nie reaguje skurczem przeciętnie w ciągu pierwszych 45 min. od chwili zaprzestania 5-cio godzinowego drażnienia. Ponowne skurcze występują niezależnie od tego, czy wymoczek był drażniony w ciągu tych 45 minut, czy też nie. Jeśli teraz drażnić wymoczka regularnymi uderzeniami, to występowanie ponownych skurczów trwa w ciągu 70—90 min., poczem wymoczek nie reaguje zupełnie na działanie bodźca. W tej fazie doświadczeń daje się zauważyć wybitnie okresowy charakter skurczów, ich występowania i zaniku. Widzimy to szczególnie wyraźnie w obserwacji, trwającej całą dobę. Obserwację dobową rozpocząłem od drażnienia 8 osobników, umieszczonych w jednym krystalizatorze na przeciąg 5 godzin. Po upływie tego czasu, gdy skurcze całkowicie zanikły, przenieśiono pojedyncze osobniki do osobnych krystalizatorów, poczem następowało drażnienie każdego z nich w przerwach 3 i 5 minu-

towych (licząc od momentu zaniku skurczów i zaprzestania drażnienia), celem stwierdzenia, po jakim czasie powraca kurczliwość. Przerwa 3 minutowa jest najkrótsza, jaką mi się udało uzyskać w czasie doświadczenia, bez narażania wymocзка na wstrząsy podczas przenoszenia szkiełka, przy czym mogłem jeszcze w tym czasie zmieniać dowolnie pożywkę, co w trakcie częstszych obserwacji byłoby bardzo utrudnione. Zmianę pożywki skutecznie w różnych okresach czasu: 30 min. do 90 min. Po 4 godz. takiej obserwacji t. j. po 9 godz. drażnienia wymocзка nastąpiła przerwa, która trwała 30 minut. Dalsze przerwy były dłuższe. Najdłuższa przerwa trwała 90 min.

Obserwacja 24-o godzinna potwierdziła wcześniejsze wyniki. Czas zaniku skurczów wynosił przeciętnie 50 min., poczem następowały skurcze, trwające przeciętnie 100 min., po nich niewrażliwość 50-cio minutowa i t. d. Okresowość występowania i zaniku skurczów jest widoczna. (rys. 2).



Rys. 2. Przebieg i zanik skurczów 4 *Spirostomum*, obserwowanych w ciągu 24 godz. Początkowe drażnienie bez obserwacji trwało 5 godz. poczem drażniono wymocзки 10 uderzeniami w odstępach 5 min. Inne 4 osobniki, drażnione w odstępach 3 min. dały podobną krzywą o charakterze okresowym.

Fig. 2. Verlauf und Schwund der Kontraktionen bei 4 *Spirostomen* binnen 24 Stunden. Anfangs reizte man die Tiere mit regelmässigen Schlägen binnen 5 Stunden, dann bekamen sie 10 Schläge in Abständen von je 5 Minuten. Andere 4 Individuen wurden je 3 Minuten gereizt, sie zeigten denselben periodischen Charakter der Kurve des Kontraktionsschwundes.

Należy tu jeszcze podkreślić fakt występowania bardzo ciekawego zjawiska. Jak podano poprzednio, częstość uderzeń klinostatu regulowano za pomocą suwaka cewki. Ze względu na to, że korzystano przez cały czas doświadczeń z pracy motoru, zasilanego prądem miejskim, rytm uderzeń młoteczka nie był jednakowy, lecz wahał się zależnie od wahań napięcia prądu. Że-

by temu zapobiec, regulowano co pewien czas długość przerw między uderzeniami, zmieniając położenie suwaka opornicy. W związku z tym zauważono podczas obserwacji *Spirostomum*, drażnionego uderzeniami o równomiernym rytmie, że kurczy się on często przed uderzeniem. Okazuje się, że w takich przypadkach, wskutek zmiany napięcia prądu, zwiększyła się przerwa między kolejnymi uderzeniami i wymoczek kurczy się nie w momencie uderzenia, lecz wtedy, kiedy to uderzenie, zgodnie z poprzednim rytmem drażnienia, powinno nastąpić. Jeżeli np. po dłuższym drażnieniu uderzeniami co 10 sek. zwiększano przerwę do 14 sek., wówczas *Spirostomum* kurczył się nie w momencie uderzenia (po upływie 14 sek.), lecz przed uderzeniem, po upływie 10 sek. Zjawisko to dało się zauważyć u kilku osobników, drażnionych uderzeniami o równomiernym rytmie, jak również u wymoczków badanych przez całą dobę. Wskutek zmiany częstości drażnienia zauważono skurcze wymocзка przed uderzeniem (gdy długość przerw między uderzeniami wynosiła od 12 do 20) po upływie 4.5 min., 32.6 min., 50.8 min., 120.3 min., 156.3 min. od chwili rozpoczęcia obserwacji. We wszystkich wymienionych przypadkach początkowa długość przerw między uderzeniami wynosiła 10 (drażnienia równomierne). Jak widać z powyższych przykładów, skurcze przed uderzeniem dają się niekiedy zauważyć po upływie stosunkowo krótkiego czasu, bo już po upływie 4.5 min. od chwili rozpoczęcia drażnienia. Zaznaczyć należy, że podobne przedwczesne skurcze zaobserwowałem w czasie izolacji wymocзка od innych wpływów, takich jak dodatkowe wstrząsy i zmiana pożywki. Dokładniejsze zbadanie tego zjawiska wymaga specjalnego urządzenia klinostatu i bardziej precyzyjnych sposobów drażnienia.

3. Doświadczenia kontrolne.

Doświadczenia kontrolne miały na celu stwierdzenie:

1°. Czy u niedrażnionych wymoczków występują w ciągu kilku godzin samowolne skurcze w podobny sposób, jak u osobników drażnionych?

2°. Czy zanik skurczów jest spowodowany zmęczeniem lub samozatruciem *Spirostomum*?

3°. Czy na okresowość zjawiska występowania skurczów nie wpływa mniej lub więcej częsta zmiana pożywki w czasie trwania doświadczeń?

1°. Znalezienie odpowiedzi na pierwsze pytanie nie nastąpiło z powodu trudności. Dłuższa obserwacja, prowadzona równolegle z drażnieniem wymoczków wykazała, że *Spirostomum* niedrażnione kurczy się jedynie pod wpływem wstrząsów, albo też, co się rzadko zdarza, wskutek zetknięcia się ze ścianką naczynia. Równolegle z obserwacją drażnionego wymoczka przechowywano w osobnym krystalizatorze osobnika niedrażnionego, który po upływie czasu drażnienia, gdy skurcze *Spirostomum* drażnionego zanikły zupełnie, zachował całkowicie swoją pierwotną kurczliwość.

2°. Pytanie drugie nie znalazło również potwierdzenia. Zjawisko zmęczenia i samozatrucia nasuwają się tu same przez się, jako przyczyna zaniku skurczów; moment zmęczenia jest stale wysuwany przez przeciwników istnienia pamięci u pierwotniaków. Samozatrucie pierwotniaka wyeliminowano przez częste zmiany pożywki. Poza tym stwierdzono, że *Spirostomum* przechowywane w krystalizatorze, umieszczonym w komorze wilgotnej na przeciąg 24, a nawet 48 godz. bez zmiany pożywki, nie tracą zdolności kurczenia się i reagują na bodźce tak samo, jak osobniki niedrażnione. Czynnikiem samozatrucia wymoczka nie wpływa zatem na wynik. Co się tyczy zmęczenia, to należało przypuścić, że znużenie aparatu ruchowego komórki jest objawem ogólnego wyczerpania, co powinno się uzewnętrznić w osłabieniu innych czynności wymoczka. Sprawdziłem to w przypadku pobierania pokarmu, licząc wodniczki pokarmowe przed i po drażnieniu. Aby obliczyć wodniczki próbowano różnych barwików neutralnych. Najlepszym barwikiem okazał się błękit metylowy (Methylblau), który dał mi możliwość obliczania wodniczek pokarmowych już po upływie 30 min. od chwili zabarwienia pożywki. Wprawdzie po upływie tego czasu nie wszystkie wodniczki były zabarwione, to jednak były zupełnie widoczne i obliczenie ich nie sprawiało trudności. Jak się okazało, niejednokrotnie liczby uzyskane przed drażnieniem są nawet mniejsze od liczb wodniczek pokarmowych, uzyskanych po drażnieniu, t. zn., że w wielu przypadkach po 5 godz. działania bodźca, liczba

wodniczków pokarmowych jest u wymocзка wyższa, niż przed drażnieniem. Ogólne zestawienie (tab. IV) wykazuje, że drażnienie *Spirostomum* nie wpływa na jego zdolność pobierania pokarmów.

Tabela IV.

Liczby wodniczków pokarmowych przed i po drażnieniu. 1. Liczba wodniczków z barwikiem przed drażnieniem. 2. Liczba wodniczków z barwikiem po drażnieniu. 3. Liczba wodniczków pokarmowych po drażnieniu bez barwika.

Anzahl der Nahrungsvakuolen vor und nach der Reizung. 1. Die Zahl der Nahrungsvakuolen im Methyblau vor der Reizung. 2. Die Zahl der Nahrungsvakuolen im Methyblau nach der Reizung. 3. Die Zahl der Nahrungsvakuolen nach der Reizung ohne Methyblau.

Nr.	Data Datum	Liczba wodniczków pokarmowych Anzahl der Nahrungsvakuolen		
		1	2	3
1	24.II.1936.	15	14	21
2	"	28	31	22
3	"	14	11	34
2	"	23	20	27
5	25.II.1936.	29	32	23
6	26.II.1936.	28	29	29
7	"	26	28	26
8	"	34	31	23
9	2.III.1936.	27	26	24
10	"	24	22	18
		24.8	24.4	24.7

Że zanik skurczów nie jest objawem zmęczenia wymocзка, świadczą skurcze, wywołane zmianą rytmu uderzeń. We wszystkich przypadkach drażnienia, tak równomiernego, jak i nierównomiernego, kurczy się *Spirostomum* przy zmianie rytmu uderzeń nawet po upływie 40—50 minut, gdy skurcze zupełnie znikły. Wystarczy wówczas z o l n i ć rytm uderzeń, a wymoczek kurczy się jak na początku doświadczenia. Po kilku, lub po kilkunastu skurczach przestaje wymoczek reagować na uderzenia, aż do ponownej zmiany rytmu. Powrót reakcji po zastosowaniu drażnienia dwa razy rzadszego, a także pod wpływem b o d ź c a s ł a b s z e g o dowodzi wyraźnie, że zanik skurczów nie może być sprawą zmęczenia.

3°. Okresowość występowania skurczów *Spirostomum* nie daje się wytłumaczyć zmianą pożywki. Można byłoby sądzić, że w samej pożywce, obfitującej w żywe bakterie, z tych czy innych powodów, niezależnych od wymocзка, zachodzą okresowe zmiany, na które *Spirostomum* okresowo reaguje. Jednak, jak

już poprzednio zaznaczyłem w części metodycznej, zmiany pożywki miały miejsce w różnych odstępach czasu: co 30 min., 1 godz., a nawet 4 godziny. Często zmieniano pożywkę raz w ciągu trwania obserwacji. Nie mniej we wszystkich doświadczeniach zachowanie się wymoczka miało charakter okresowy, bez względu na częstość zmian pożywki. Że fakt zmiany środowiska nie wpływa na sposób reagowania wymoczka, świadczy o tym dalsze doświadczenie kontrolne. Przygotowano dwie pożywki: jedną przechowywano w temperaturze 0°, a drugą w temp. 27° w ciągu 24 godz., wskutek czego liczba bakteryj musiała być różna w obu. Podczas drażnienia dwóch osobników jednocześnie, dodawano kroplami każdemu wymoczkowi inną pożywkę. Robiono to co 15 min. 20 min. 30 min. 45 min. i 60 min.. Okazuje się, że bez względu na rodzaj pożywki i częstość jej zmiany, występowanie i zanik skurczów mają w tych przypadkach podobny przebieg, jak w doświadczeniach poprzednich. Sprawdzono to na 100 osobnikach. Wobec tych doświadczeń okresowość występowania i zaniku skurczów nie da się wytłumaczyć zmianą środowiska.

U w a g i o g ó l n e.

Praca obecna stawia zjawisko skurczów *Spirostomum* w innym świetle, niż to zrobili J e n n i n g s i B l ä t t n e r. Ci dwaj autorzy badali *Spirostomum* w sposób zbyt prymitywny i szkodliwy dla wymoczka, wobec czego stwierdzony przez nich fakt zaniku skurczów mógł być spowodowany nie zmęczeniem, jak to przypuszczał B l ä t t n e r, lecz uszkodzeniem *Spirostomum*.

Zjawisko występowania skurczów u *Spirostomum* trwa dłużej, niż to stwierdził J e n n i n g s, według którego wymoczek ucieka przed podniętą już po pierwszym skurczu i nie reaguje na następne bodźce.

B l ä t t n e r zauważył u *Spirostomum* objawy zmęczenia już po 30-ym podrażnieniu, a całkowita liczba skurczów jednego osobnika wynosi, według niego — 74, podczas, gdy w obecnych badaniach *Spirostomum* wykonywa przeciętnie 322.5 skurczów.

Dzięki zastosowaniu nieszkodliwej dla wymocзка podniety i po wyłączeniu zmęczenia oraz zmian środowiskowych, zaobserwowane przez nas fakty przemawiają za istnieniem u *Spirostomum* pewnych zdolności pamięciowych.

Krzywa zaniku skurczów ma podobny przebieg do krzywej, jaką uzyskali dla *Paramecium* D a y L. M. i B e n t l e y M. Krzywa przebiegu skurczów *Spirostomum* ma identyczny przebieg z krzywymi, jakie otrzymujemy w przypadkach badania sposobu uczenia się innych zwierząt. Można tu przytoczyć cały szereg prac z dziedziny psychologii zwierząt wyższych. Wystarczy jednak powołać się na prace niektórych autorów, jak: D e m b o w s k a W. S. ('25), K r e c h e w s k y I. ('32), K r e c h e w s k y I. i H o n z i k C. H. ('33) lub T o l m a n E. C. ('34), aby stwierdzić, że przebieg procesu uczenia się *Spirostomum*, ujawniony w zaniku skurczów, nie różni się zasadniczo od procesu uczenia się, obserwowanego u kraba, kota, szczurów, małp i t. p.

W pracy D e m b o w s k i e j znajdujemy szereg danych, dotyczących przebiegu zaniku reakcji kraba *Dromia vulgaris* M. E. na bodźce świetlne. Po pewnej liczbie jednakowych podrażnień przestaje krab reagować na bodźce. Zanik reakcji jest tym szybszy, im częstszy jest rytm podrażnień. Podobnie i zanik skurczów *Spirostomum* występuje po upływie krótszego czasu, przeciętnie po upływie 156 min. przy drażnieniu nierównomiernym (12 uderzeń na min.), w porównaniu do czasu zaniku skurczów, przeciętnie 194 min. przy drażnieniu równomiernym (6 uderzeń na min.). Nie można tu mówić o proporcjonalności, nie mniej jednak czas ten jest dłuższy średnio o 52—29% w przypadku drażnienia równomiernego w porównaniu do drażnienia o częstszym rytmie uderzeń. Krzywa zaniku reakcji kraba ma podobny przebieg do krzywej zaniku skurczów *Spirostomum*. Początkowo intensywność reakcji kraba dosyć szybko spada, następnie wzrasta, poczem znów spada i t. d., wreszcie stopniowo maleje do wielkości minimalnej. Podobnie i zmienność form zachowania się szczurów (K r e c h e w s k y, T o l m a n, H o n z i k) da się przedstawić w postaci charakterystycznej krzywej błędów, nie różniącej się zasadniczo od krzywej zaniku skurczów *Spirostomum*.

Należy wreszcie zaznaczyć, że zachowanie się *Spirostomum* pod wpływem drażnienia nierównomiernego w porównaniu do drażnienia równomiernego, znajduje analogię w procesie szybkiego, lub powolnego uczenia się człowieka, małp i szczurów. Nasuwa się tu porównanie wniosków obecnej pracy z wynikami E b b i n g h a u s a ('19), który stwierdził, że chcąc nauczyć się czegoś w krótkim czasie, należy wykonać pewną liczbę następujących po sobie powtórzeń. Im częściej powtarzamy, tym szybciej utrwalimy w umyśle materiał pamięciowy. Przy powtórzeniu materiału po upływie $\frac{1}{2}$ godz., może człowiek zapamiętać 58% tego, czego się nauczył poprzednio, po upływie godziny zapamięta już tylko 44%, po 6-ciu dniach 25%, a po upływie miesiąca 21% przyswojonego materiału pamięciowego. F r ö b e s J. ('22), omawiając prawa J o s t a A. ('97), dotyczące roli powtórzeń w procesach uczenia się (str. 539—540), zaznacza, że wyniki dotychczasowych badań nad pamięcią człowieka znajdują analogię w rezultatach doświadczeń nad pamięcią kotów i zwierząt bezkręgowych. Sposób uczenia się i reagowania kota na pewne bodźce słowne jest analogiczny do sposobu reagowania człowieka. Po 8 dniach kot zapamiętał 87% tego, czego się poprzednio nauczył.

Jeśli porównamy krzywą zaniku skurczów *Spirostomum* z t. zw. krzywą pamięci E b b i n g h a u s a stwierdzimy, iż mają one podobny przebieg.

Wstępne badania nad pamięcią *Spirostomum* wskazują na to, że zachowanie się wymocзка w warunkach przeprowadzonych doświadczeń nie różni się zasadniczo od zachowania się innych zwierząt w ogólnych przypadkach uczenia się i zapominania.

Streszczenie wyników.

1°. Przy drażnieniu mechanicznym czas trwania skurczów *Spirostomum* zależy od częstości drażnienia:

a) przy drażnieniu nierównomiernym, gdy liczba uderzeń waha się od 12—6 uderzeń na min., *Spirostomum* przestaje się kurczyć w czasie około 156 min. i w tym czasie wykonywa przeciętnie 322.5 skurczów.

b) przy równomiernym rytmie drażnienia (6 uderzeń na min.) *Spirostomum* przestaje się kurczyć po upływie dłuższego czasu (od 52% do 29% w stosunku do czasu poprzedniego), który w tym przypadku wynosi średnio około 194 min.; przeciętna liczba skurczów wynosi 307.9.

2°. *Spirostomum*, drażnione aż do zupełnego zaniku skurczów, nie reaguje na bodźce w czasie około 47 min., od chwili zaprzestania drażnienia.

3°. Przebieg trwania i zaniku skurczów ma charakter okresowy.

4°. *Spirostomum*, drażnione uderzeniami o jednakowym rytmie, kurczy się przy zmianie rytmu nie w chwili działania bodźca, lecz wtedy, gdy p o w i n n o nastąpić uderzenie, czyli po upływie tego czasu, w jakim przed tym następowały kolejne uderzenia.

5°. Przebieg i zmiany zaniku skurczów pierwotniaka odpowiadają zjawiskom, z jakimi się spotykamy w ogólnych przypadkach uczenia się i zapominania zwierząt wyższych.

L i t e r a t u r a .

- Alverdes F. 1922. Studien an Infusorien über Flimmerbewegung, Lokomotion und Reizbeantwortung. Berlin. — Alverdes F. 1932. Die Tierpsychologie in ihren Beziehungen zur Psychologie des Menschen. Leipzig. — Bishop A. 1923. Some observations upon *Spirostomum ambiguum* Ehrbg. Quart. Journ. of Micr. Sc. 67 (391). — Bishop A. 1927. The cytoplasmic structures of *Spirostomum ambiguum* Ehrbg. Quart. Journ. of Micr. Sc. 71 (141). — Blättner H. 1926. Beiträge zur Reizphysiologie von *Spirostomum ambiguum* Ehrbg. Arch. f. Protistenk. 53 (253). — Bramstedt F. 1935. Dressurversuche mit *Paramecium caudatum* und *Stylonychia mytilus*. Zeitschr. f. vergl. Physiol. 22 (490). — Calkins G. N. 1926. The biology of the Protozoa. Philad. New York. — Czerniewski Z. 1930. *Spirostomum ambiguum* Ehrbg. Biologische Studien. Teil 1. Prace Inst. M. Nenckiego. 6 (151). — Day L. M. and Bentley M. 1911. A note on learning in *Paramecium*. The Journ. of Anim. Beh. 1 (67). — Dembowska W. S. 1925. Studja nad ruchami czułków wewnętrznych (antenul) kraba *Dromia vulgaris* M. E. Pr. Inst. Nenckiego. 3 (44). — Dembowski J. 1921. O wyborze pokarmu i tak zwanych zjawiskach pamięciowych u *Paramecium caudatum*. Prace Inst. Nenck. 1 (1—37). — Dembowski J. 1923. Über die Bewegungen von *Paramecium caudatum*. Arch. f. Protistenk. 47 (25). — Ebbinghaus H. 1919. Grundzüge der Psychologie. 2. Leipzig. — Fröbes J. 1922. Lehrbuch der experimentellen Psy-

chologie. 1. Freiburg. — Honzik C. H. 1933. Maze learning in rats in the absence of specific intra and-extra-maze stimuli. Univ. of Calif. Publ. in Psych. 6 (99). — Jennings H. S. 1914. Die niederen Organismen, ihre Reizphysiologie und Psychologie. Leipzig (Berlin). — Jennings H. S. 1899. Reactions to localized stimuli in *Spirostomum* and *Stentor*. Amer. Natur. 33 (372). — Krechewsky I. 1932. "Hypotheses" versus "chance" in the pre-solution period in sensory discrimination-learning and the genesis of "hypotheses" in rats. Univ. of Calif. Publ. in Psych. 6 (27) i Nr. 4 (45). — Krechewsky I. and Honzik C. H. 1932. Fixation in the rat. Univ. of Calif. Publ. in Psych. 6 (13). Berkeley. — Metalnikow S. 1914. Les infusoires peuvent-ils apprendre à choisir leur nourriture. Arch. Protistenk. 34 (60). — Metzner P. 1921. Zur Kenntnis der photodynamischen Erscheinung: die induzierte Phototaxis bei *Paramecium caudatum*. Biochem. Zeitschr. 113 (145). — Pütter A. 1904. Die Reizbeantwortungen der ciliaten Infusorien. Zeitschr. f. allg. Physiol. 3 (406). — Saunders J. T. 1924. The effect of hydrogen ion concentration on the behavior, growth and occurrence of *Spirostomum*. Proc. of the Cambr. Philosoph. Soc. 1 (189). — Schaefer A. 1910. Selection of food in *Stentor coeruleus*. The Journ. of Exp. Zoology. 8 (75). — Specht H. 1935. The culture of *Spirostomum ambiguum*. Arch. Protistenk. 85 (150). — Smith S. 1908. The limits of educability in *Paramecium*. Journ. comp. Neur. 18 (499). — Tolman E. C. 1934. Backward elimination of errors in two successive discrimination habits. Univ. of Calif. Publ. in Psych. 6 (145). — Vervorn M. 1899. Psychophysiologische Protistenstudien. Exper. Untersuch. Jena. — Wladimirski A. 1916. Are the infusoria capable of "learning" to select their food? Journ. russe de Zool. 1 (451).

[Zakład Chemii Fizjologicznej Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu
Poznańskiego].

Kierownik: Prof. Dr. Stefan Dąbrowski.

A. Sławiński.

Erythrocyty jako osmometry.

*Les érythrocytes comme osmomètres*¹⁾.

Rękopis nadesłano w dniu 15.I.1937.

On sait que les hématies se comportent d'une façon irrégulière dans un milieu hypo- ou hypertonique: tantôt elles suivent la loi osmotique, tantôt non. On a tâché d'expliquer ces irrégularités soit par l'action amphotère d'hémoglobine, soit par une libération d'eau „retenue”, soit par une perméabilité des hématies en plasma artificiel. Nos études osmotiques des hématies, à l'aide de la méthode de conductivité, ne confirment pas ces suppositions. Elles font penser que l'enveloppe des hématies est composée de molécules d'albumine et de liquide entre les molécules. Cette enveloppe semble être perméable *in vivo*, du moins au chlore, car il est difficile d'expliquer autrement l'égalité de concentration du chlore dans l'eau libre des hématies et du plasma. D'un autre côté on constate que la même enveloppe est semi-perméable *in vitro*. Elle paraît être limitée alors par deux membranes: une membrane intérieure, solide, dont la rupture se manifeste par hémolyse, et une membrane extérieure, moins solide, qui se rompt parfois sous pression osmotique ou centrifuge, sans signes visibles. Cette rupture, qui

¹⁾ Niniejsza praca była przedstawiona 20 listopada 1936 r. na posiedzeniu Polskiej Akademii Umiejętności. — Ce travail a été présenté à la séance du 20 novembre 1936 de l'Académie Polonaise des Sciences et des Lettres.

laisse échapper le liquide contenu dans l'enveloppe, entre les molécules d'albumine, semble être la cause principale des déviations occasionnelles des hématies de la loi osmotique. Il semble aussi qu'il se forme quelquefois dans le plasma dilué des dépôts d'albumine, qui faussent les résultats.

D'après les données des mesures, le volume d'eau libre des hématies, déterminé à l'aide d'une nouvelle formule tenant compte de l'albumine contenue dans le plasma, est de 54% dans les hématies humaines et de 48% dans les hématies de Cheval. Le volume de l'enveloppe des hématies, *in vitro*, avec membrane extérieure, rapporté au volume des hématies, semble être de 17%, à peu près.

En somme, d'après ces données, l'"intérieur" des hématies, sans enveloppe, est un osmomètre parfait *in vitro*, mais l'hématie entière ne suit la loi osmotique que si la membrane extérieure de son enveloppe est intacte, ou ne se forme pas, ce qui paraît arriver quelquefois. On comprend bien alors que l'état physique de l'enveloppe des hématies, influençant le volume des hématies, ne peut être négligé dans les études physiologiques du sang *in vitro*.

Osmotyczne zachowanie się krwinek nie jest dotychczas wyjaśnione. Pewni badacze uważają krwinki za dobre osmometry, inni (P o n d e r 4 s. 104) sądzą, że krwinki są osmometrami tylko we własnym osoczu, a niektórzy (K o p a c z e w s k i 1) nie przyjmują wcale półprzenikliwości otoczki krwinek. Liczne badania osmotycznych właściwości krwinek, polegające na pomiarach ich objętości we krwi naturalnej, hipo- i hipertonicznej, z zastosowaniem sposobu przewodnictwa (S ł a w i ń s k i 7), a więc na pomiarach wolnej wody krwinek, wykazały, że krwinki są zasadniczo dobrymi osmometrami *in vitro*. *In vivo* natomiast otoczka krwinek zachowuje się tak, jak gdyby była przepuszczalna lub selekcyjnie przepuszczalna, jak to wynika z równego stężenia chloru w wolnej wodzie krwinek i osocza (R a s z e j a i S ł a w i ń s k i 6).

Głównym powodem częstych odchyłeń w osmotycznym zachowaniu się krwinek wydaje się być niestałość zewnętrznej

blony pokrywającej *in vitro* otoczkę krwinek. W niektórych przypadkach mogą się tworzyć osady białka w osoczu i wpływać na pomiary.

Przed tem, niż mówić o doświadczeniach, które doprowadziły do tych wyników, należy objaśnić sposób obrachunku objętości wolnej wody krwinek, a potem omówić naszą hipotezę o budowie otoczki krwinek, która objaśnia dane liczbowe, otrzymane doświadczalnie.

C z ę ś ć t e o r e t y c z n a .

Obrachunek wolnej wody.

Dotychczas oznaczano objętość wolnej „cytoplazmy” krwinek (S ł a w i ń s k i 9), zakładając, że krwinki zawierają cytoplazmę podobną do osocza. Wobec tego, że płyn wewnątrz krwinek jest prawdopodobnie raczej elektrolitem, niż plazmą, jest wskazane, przy obrachowaniach toniczności rozcieńczonego, względnie solonego osocza, brać pod uwagę objętość tylko elektrolitu osocza (około 91.5%), a nie całego osocza, oznaczając takim sposobem rzeczywiście wolną „wodę” krwinek, a nie „cytoplazmę”.

By uniknąć skomplikowanego i niepewnego obrachunku, przyjmujemy, że ciśnienie osmotyczne wzrasta w stosunku do ilości soli dodanej do krwi, co nieco zmniejsza obrachowaną objętość wolnej wody. Spółczynnik 1.04, używany uprzednio, opuszczamy.

Zastosowujemy odpowiednio bardziej wyczerpującą listę oznaczeń, a mianowicie:

- c_o, c_d, c_s , = toniczność krwi naturalnej, rozcieńczonej, względnie solonej,
 w_o, w_d, w_s , = objętość krwinek w powyższych rodzajach krwi, w jednostce objętości krwi,
 v_o, v_d, v_s , = objętość fazy stałej krwinek w powyższych rodzajach krwi, w jednostce objętości krwinek,
 e_o, e_d, e_s , = objętość wolnej wody krwinek powyższych rodzajów krwi, w jednostce objętości krwinek = $1 - v_o, 1 - v_d, 1 - v_s$, odpowiednio,

$$d, \text{ stopień rozcieńczenia krwi} = \frac{\text{objętość przed rozcieńczeniem}}{\text{objętość po rozcieńczeniu}},$$

p , procent suchej soli dodanej do krwi (gramów na 100 cm³ krwi),

P , procent jednostek soli dodanej do krwi = p/c_0

α , objętość białka w jednostce objętości osocza,

β , objętość elektrolitu w jednostce objętości osocza = $1 - \alpha$,

1, 2... liczby wskazujące, do której krwi odnosi się dane oznaczenie.

Z tymi zmianami, uprzednio stosowane wzory (6) i (7 bis) stają się:

$$(1) \quad c = \frac{d [(1 - w_0) \beta c_0 + p]}{1 - d (1 - w_0) \alpha - w}$$

$$(2) \quad e_0 = \frac{(dw_0 - w) c}{(c - c_0) dw_0}$$

W tych wzorach c i w oznaczają toniczność i objętość krwinek we krwi rozcieńczonej, względnie solonej, przy czym $p = 0$ w przypadku krwi rozcieńczonej, a $d = 1$ w przypadku krwi solonej.

Z tych dwu zasadniczych wzorów wyprowadzamy wszystkie inne wzory.

W przypadku pobrania krwi na hirudynę.

1. Oznaczenie wolnej wody sposobem rozcieńczenia.

$$(a) \quad e_0 = \beta \cdot \frac{\frac{w_d}{w_0} - d}{\frac{1 - w_d}{1 - w_0} - d}$$

2. Oznaczenie wolnej wody sposobem solenia.

$$(b) \quad e_0 = \frac{(w_0 - w_s) [(1 - w_0) \beta + P]}{w_0 (P + w_s - w_0)}$$

Zważywszy, że wzór (a) jest niezależny od toniczności c można oznaczyć tym wzorem e_0 , a potem c_0 , przy pomocy następującego wzoru, wyprowadzającego się ze wzoru (b):

$$(c) \quad c_0 = p \cdot \frac{\frac{w_0 e_0}{w_0 - w_s} - 1}{(1 - w_0) \beta + w_0 e_0}$$

Ze wzorów (a) i (b) wyprowadzamy także, odpowiednio:

$$(d) \quad w_d = w_0 \cdot \frac{e_0 + d (1 - w_0) (\beta - e_0)}{\beta - w_0 (\beta - e_0)}$$

$$(e) \quad w_s = w_0 \cdot \frac{P + \beta - w_0 (\beta - e_0) - P e_0}{P + \beta - w_0 (\beta - e_0)}$$

W przypadku krwi pobranej na sól.

1. Oznaczenie wolnej wody sposobem rozcieńczenia.

Próbkę pierwotnie solonej krwi (w ściśle oznaczonym stosunku) rozcieńczamy wodą i mierzymy wielkości w_d i w_s . Objętość wolnej wody w krwinkach krwi solonej obrachowuje się wtedy wzorem (a), który pisze się w tym przypadku jak następuje:

$$(f) \quad e_s = \beta \cdot \frac{\frac{w_d}{w_s} - d}{\frac{1-w_d}{1-w_s} - d}$$

Z drugiej strony

$$(g) \quad e_o = 1 - v_o = 1 - v_s \frac{w_s}{w_o} = 1 - (1 - e_s) \frac{w_s}{w_o}$$

Z tego równania i równania (b) wyprowadzamy następujący wzór do obrachowywania e_o gdy e_s jest znane:

$$(h) \quad e_o = \frac{b - \sqrt{b^2 - 4ac}}{2a}$$

w którym

$$\begin{aligned} a &= (\beta + Pe_s) - v_s w_s \\ b &= 2(\beta + Pe_s) - v_s w_s (\beta + e_s) - \beta v_s \\ c &= (\beta + Pe_s) - v_s w_s \beta e_s - \beta v_s \end{aligned}$$

2. Oznaczenie wolnej wody sposobem solenia.

Pewną ilość pierwotnie solonej krwi soli się powtórnie i oznacza objętość krwinek, w_1 i w_2 , w jednorazowo i dwurazowo solonej krwi. Z tych danych oblicza się objętość krwinek w naturalnej krwi przy pomocy następującego wzoru, zamieniającego dawniejszy wzór (8):

$$(m) \quad w_o = \frac{\sqrt{b^2 + 4c\alpha} - b}{2\alpha}$$

w którym

$$\begin{aligned} b &= \beta \cdot \frac{p_2 w_1 - p_1 w_2}{p_2 - p_1} + \beta - w_1 - w_2 \\ c &= \beta \cdot \frac{p_2 w_1 - p_1 w_2}{p_2 - p_1} + \frac{p_1 p_2}{c_o} \cdot \frac{w_1 - w_2}{p_2 - p_1} - w_1 w_2 \end{aligned}$$

Znając w_o , oblicza się e_o ze wzoru (b).

Wzór (m) ma odpowiedni wzór w przypadku krwi rozcieńczonej. Rozcieńczywszy wodą dwie próbki tej samej krwi zadanej hirudyną lub solą, i to w różnym stopniu, i zmierzwszy objętości krwinek w_1 i w_2 w tak otrzymanych rozcieńczonych próbkach krwi, oblicza się objętość krwinek we krwi przed rozcieńczeniem za pomocą następującego wzoru (wyprowadzonego podobnie jak wzór (m)):

$$(n) \quad w = \frac{w_1 (1 - d_2) - w_2 (1 - d_1)}{d_1 - d_2}$$

Otoczka erytrocytów.

Według naszej hipotezy otoczka krwinek składa się ze skupień drobin białkowych i zawiera wolny płyn między skupieniami i płyn „związany” między drobinami. *In vivo* otoczka krwinek jest prawdopodobnie przepuszczalna, jak wspomniano we wstępie. *In vitro* ta sama otoczka wydaje się być półprzenikliwa, będąc pociągnięta z obu stron błonami. Wewnętrzna błona jest trwała, wytrzymuje wirowanie i dość znaczne ciśnienie osmotyczne; zewnętrzna błona jest mniej trwała i często pęka, ale wznawia się po wyrównaniu ciśnienia. W niektórych przypadkach zewnętrzna błona, zdaje się, nie tworzy się wcale.

Chociaż nieco osocza zawsze pozostaje w osadzie odwirowanych krwinek, objętość tego osadu jest zwykle mniejsza od objętości krwinek, zmierzonej kolorymetrycznie lub sposobem przewodnictwa ¹⁾. To może być uważane za wskazówkę obecno-

¹⁾ Oba te sposoby są pewniejsze od oznaczeń hematokrytem. Dokładność sposobu kolorymetrycznego jest według P o n d e r'a $\pm 1\%$, dokładność absolutnych oznaczeń sposobem przewodnictwa jest w granicach 1 lub 2% (S ł a w i ń s k i 8, s. 719, 371 i 606, odpowiednio), a dokładność tego ostatniego sposobu, ale w oznaczaniach względnych $\pm 0.2\%$ (S ł a w i ń s k i 9, s. 27, lub 988, odpowiednio). W celu rozproszenia pewnych wątpliwości co do możliwości zastosowania wzoru przewodnictwa do pomiaru krwinek (patrz 6, s. 453, lub 1701, odpowiednio), zrobiliśmy kilka pomiarów krwi zadanej lecytyną, która nadaje krwinkom kształt kulisty (patrz P o n d e r 4, s. 81). Rozpuszczając bardzo małą ilość lecytyny (około 0.02% objętości krwi) w eterze celem utworzenia cienkiej błony z lecytyny na ściankach próbki i dolewając krew następnie, można otrzymać dobre próbki całkiem kulistych, a jednak nie zhemolizowanych krwinek. Pomiaru przewodnictwa wykazują, że objętość krwinek po takim przygotowaniu nie zmienia się, co dowodzi, że wspomniany wzór przewodnictwa jest równie dokładny w przypadku wklęsłych jak i kulistych zawiesin.

ści *in vitro* zewnętrznej błony na krwinkach, lecz jej przzerwania przy wirowaniu, co powoduje całkowitą lub częściową utratę płynu zawartego w otoczce krwinek. Pod tym względem porównanie objętości, otrzymywanych kolorymetrycznie i z pomocą hematokrytu, według danych P o n d e r'a (4, s. 50), jest bardzo pouczające. Wielka zmienność oznaczeń hematokrytem, zależnie od rodzaju krwi, czasu i szybkości wirowania, musi pochodzić od pewnej niestałości „zwnętrza” krwinek, ponieważ ich „wnętrze” jest stałe, o ile nie wykazuje hemolizy. Według pomiarów osmotycznych, które doprowadzają do tego samego wniosku, owa niestałość jest znacznie większa we krwi końskiej (z rzeźni), niż w ludzkiej. Zależy też od toniczności ośrodka, w którym krwinki się znajdują. Wszystko to objaśnia znaczne wahania objętości w oznaczaniach hematokrytem.

Jest jeszcze inny powód niezgodności w oznaczaniach objętości krwinek różnych badaczy, niezależny od stosowanego sposobu. Jest on spowodowany wątpliwością co do dokładnej toniczności krwi. Tak na przykład W a l t e r s (12) przyjmuje, że 1.6% roztwór szczawianu sodowego jest izotoniczny względem krwi, gdy autor znajduje znacznie mniejszą wielkość (patrz dalej przykład 2): mówiąc ściśle, roztwór szczawianu, którego stężenie po strąceniu Ca jest około 1%, jest izotoniczny względem danej krwi. Jeżeli taka jest rzeczywiście toniczność krwi, to przeciętna procentowa objętość krwinek w naturalnej krwi w oznaczaniach W a l t e r s'a była 49.3, a nie 46.5% 1). Tak

1) Powołując się na pracę W a l t e r s'a, obrachowujemy tę objętość na zasadzie następujących danych: stopień rozcieńczenia krwi $d = \frac{5}{6}$, stopień solenia, z poprawką na strącanie Ca (patrz dalej przykład 2), $p = \frac{1}{2} \times 1.6 - 0.024 \times \text{około } 0.50 = 0.308$, $c_0 = 1.00$, $\beta = 0.915$, $e_0 = 0.54$ (przeciętne wielkości według autora), $w = \frac{5}{6} \times 0.465 = 0.3875$ (przeciętna wysokość osadu krwinek w hematokrycie według pomiarów W a l t e r s'a). Wprowadzając te dane do następującego równania, wyprowadzonego z równań (1) i (2),

$$(3) \quad w_0 = a - \sqrt{a^2 - b}$$

w którym

$$a = 0,5 \left[1 + \frac{w}{d} + \frac{c_0 e_0 + p d (1 - e_0)}{c_0 d (\beta - e_0)} \right]$$

$$b = \frac{w}{d} \cdot \frac{c_0 \beta + p}{c_0 (\beta - e_0)}$$

znajdujemy $w_0 = 49.3\%$.

poprawione oznaczenie Walters'a byłyby bardziej zgodne z oznaczeniem autora, który znalazł, jako przeciętną z 10 oznaczeń, że objętość krwinek we krwi młodych mężczyzn wynosi około 51% ²⁾). Przyjmując wciąż, że dane autora są słuszne, ta zgodność mówiłaby tylko, że normalne krwinki ludzkie tracą przy wirowaniu, w warunkach pracy Walters'a, nieco więcej płynu z otoczki, niż zatrzymują osocza między krwinkami.

Obecna hipoteza o budowie otoczki krwinek mogłaby objaśnić małą ilość sodu zawartego w krwinkach. Ona wykazuje, że ten sód mógłby być sodem osocza, zatrzymanym *in vitro* między wewnętrzną a zewnętrzną błonami otoczki krwinek; a wewnątrz krwinek mogłoby nie być wcale sodu. Ponieważ 100 cm³ osocza zawiera około 330 mg sodu, a objętość „wolnej wody” w otoczce krwinek wynosi około 9% objętości krwinek (patrz dalej przykład 4), więc 100 cm³ krwinek powinno zatrzymać $0.09 \times 330 = 30$ mg sodu, co się zgadza z przeciętną ilością sodu, znajdowanego w krwinkach (patrz O b e r s t 3, R a s z e j a 5).

²⁾ Niskie wielkości objętości krwinek, znajdowane przez Walters'a, W i n t r o h e ' a (13) i innych badaczy objaśniają, dlaczego wielkość stosunku

$$R = \frac{Cl_g}{Cl_p},$$

stężenia chloru w krwinkach do stężenia w osoczu (w całym osoczu), która według badaczy, używających hematokrytu, wynosi około 0.54, okazuje się równa 0.58, gdy się stosuje sposób przewodnictwa (6, s. 449 lub 1695). Rachunek wykazuje, że ta różnica całkowicie polega na różnicy oznaczeń objętości krwinek, gdy przyjąć, że jest zupełna zgodność w oznaczaniach chloru. Oznaczając odpowiednie wartości wspomnianego stosunku w oznaczaniach hematokrytem i sposobem przewodnictwa przez R_1 i R_2 , odpowiednie objętości krwinek przez w_1 i w_2 , a stężenia chloru w całej krwi i w osoczu odpowiednio przez Cl_k i Cl_p , piszemy

$$R_1 = \frac{Cl_k - Cl_p(1 - w_1)}{w_1} : Cl_p$$

$$R_2 = \frac{Cl_k - Cl_p(1 - w_2)}{w_2} : Cl_p$$

skąd

$$R_2 = 1 - \frac{w_1}{w_2} (1 - R_1)$$

Ponieważ $w_1 = 0.465$, $w_2 = 0.51$ i $R_1 = 0.54$, więc oznaczenia sposobem przewodnictwa powinny dawać $R_2 = 0.58$, co też rzeczywiście dają.

Ta sama hipoteza może też objaśnić badaną przez Maizels'a (2) przenikliwość krwinek w roztworach KCl i NaCl. Zgodnie z hipotezą zawartość K w krwinkach powinna zmaleć, gdy one znajdują się w hipotonicznym roztworze KCl, a wzrosnąć gdy znajdują się w hipertonicznym roztworze, ponieważ te roztwory przenikają do otoczki i są w niej uwięzione gdy zewnętrzna błona otoczki wznawia się; ale w hipo- lub hipertonicznych roztworach NaCl zawartość K w krwinkach powinna zawsze zmaleć, ponieważ te roztwory wymywają K z otoczki krwinek. Zestawiając dane mierzone Maizels'a z danymi obrachowanymi na zasadzie hipotezy, otrzymujemy:

Zewnętrzne stężenie równoważ. w litrze	Zmiany zawartości w K			
	Krwinki w KCl		Krwinki w NaCl	
	mierzone	obrachowane	mierzone	obrachowane
0.100	1.04	1.00	0.95	0.91
0.175	1.07	1.06	0.95	0.91
0.350	1.11	1.20	0.94	0.91
0.514	1.40	1.34	0.90	0.91

Rachunek jest następujący. Przyjawszy, że normalna zawartość K w litrze krwinek jest 0.107 równoważ., ta sama zawartość, ale po zawieszeniu krwinek w roztworze KCl, o stężeniu np. 0.514 równoważ., odniesiona do 0,107, powinna być $(0.91 \times 0.107 + 0.09 \times 0,514) : 0,107 = 1.34$, a w krwinkach zawieszonych w roztworze NaCl tego samego stężenia $(0.91 \times 0.107 + 0.09 \times 0) : 0.107 = 0.91$. Zważywszy przybliżony charakter tego obrachowania, zgodność wielkości mierzonych i obrachowanych jest dostateczna.

Wnioskując ostatecznie, należy sądzić, że otoczka krwinek jest selekcyjnie przepuszczalna *in vivo*, a mianowicie: przepuszczalna dla chloru, a nieprzepuszczalna dla sodu.

Ta próba objaśnienia fizjologicznych zjawisk wyłącznie na drodze fizycznej może być jednostronna; jest niemniej dobrze zaznaczyć, że niektóre z tych zjawisk mogą nie być natury fizjologicznej.

C z ę ś ć d o ś w i a d c z a l n a .

Wolna woda krwinek i toniczność osocza.

Przykład 1.

Krew końska

Nr.	Krew	Objętość krwinek w %	Objętość wolnej wody e_0 %	$\frac{Cl_g}{Cl_{ep}}$	Toniczność cytryn. sod. e_0 %
1	Nr. 0 rozcieńczona, $d=0.9091$	34.81	—	—	—
0	Naturalna z hirudyną	35.84	53.15	0.5293	2.90
2	Nr. 0 z cytryn. sod. $p=0.5200$	32.27	—	—	—

Jedna część krwi naturalnej z hirudyną Nr 0 była rozcieńczona wodą, a druga zadana cytrynianem sodowym. Objętość wolnej wody e_0 , obliczona według wzoru (a) przy pomocy danych rzędów 1 i 0, zgadza się, jak widać z danych tabeli, z wielkością stosunku Cl_g/Cl_{ep} , chloru w krwinkach do choru w elektrolicie osocza (patrz przykład 2). Toniczność osocza obrachowana według wzoru (c), przy pomocy wielkości e_0 i danych rzędów 0 i 2, okazała się równa toniczności 2.90% roztworu cytrynianu sodowego.

Hemolizy nie było ani w tym, ani w następnych przykładach.

Przykład 2.

Krew ludzka

Nr.	Krew	Objętość krwinek w %	Objętość wol. wody e_0 %	$\frac{Cl_g}{Cl_{ep}}$	Toniczność szczaw. sod. e_0 %
0	Naturalna z hirudyną	60.55	53.65	0.5424	1.02
1	Nr. 0 z cytryn. s. $p_1=0.5158$	53.86	—	—	—
2	Nr. 0 ze szczaw. s. $p_2=0.2400$	52.49	—	—	—

Te dane są wzięte z uprzedniej pracy (6, s. 1700, tabela IV). Objętość wolnej „cytoplazmy”, obrachowana na zasadzie danych rzędów 0 i 1, przyjmując $e_0 = 2.90$, była 59.28%. Objętość wolnego „elektrolitu”, którą obrachowujemy obecnie, wynosi 53.65%. Stosunek Cl_g/Cl_{ep} , który wynosił według poprzedniego rachunku 0.5929, zamienia się obecnie na $Cl_g/Cl_{ep} = 0.915 \times 0.5929 = 0.5424$, gdzie 0.915 jest objętością elektrolitu (ξ) w osoczu.

Obrachowując następnie toniczność osocza przy pomocy danych rzędów 0 i 2, należy uwzględnić wytrącanie szczawianu wapniowego i zmniejszyć odpowiednio p_2 . Wiedząc, że osocze ludzkie zawiera od 0.009 do 0.011% wapnia i że każdym trzem jonom szczawianu sodowego, wchodzącym w reakcję, odpowiadają tylko dwa jony związane w osadzie, wyprowadzamy następujący wzór dla obliczania ilości osmotycznie czynnego szczawianu sodowego dodawanego do krwi ludzkiej.

$$p \text{ poprawione} = p - 0.024/1 - w_0)$$

W przypadku krwi końskiej, której osocze zawiera mniej wapnia, znajdujemy

$$p \text{ poprawione} = p - 0.018/1 - w_o)$$

Wielkość p poprawionego w obecnym przykładzie, obrachowana przy pomocy pierwszego wzoru, wynosi 0.23%. Wprowadziwszy tę wielkość do wzoru (c), znajdujemy $c_o = 1.025$. W dalszych obrachunkach przyjmujemy, dla uproszczenia, że toniczność osocza jest równa toniczności 1% roztworu szczawianu sodowego.

Krwinki jako dobre osmometry.

Przykład 3.

Krew końska.

Nr	Krew		Objętość krwinek w %	Wolna woda e_o %
2	Nr. 3 rozcieńczona	$d_2 = 0.7143$	29.90	43.54
1	„ „	$d_1 = 0.8333$	31.85	43.10
0	Naturalna, teoretyczne obrachowanie		38.10	—
3	Nr. 0 ze szczawianem s.	$p_1 = 0.2020$	34.65	43.84
4	„ „	$p_2 = 0.7970$	29.46	43.84

W tym przypadku krew była pobrana na szczawian sodowy i jedna część tej krwi, Nr. 3, była jeszcze raz solona i dała krew Nr. 4, gdy druga część tej samej krwi była rozcieńczona wodą, i to w różnym stopniu, dając próbki krwi Nr. 1 i Nr. 2.

Objętość wolnej wody w krwinkach krwi Nr. 3, e_s , obrachowana na zasadzie wzoru (f), raz przy pomocy danych rzędów 1 i 3, a drugi raz przy pomocy danych rzędów 2 i 3, była równa odpowiednio 37.93 i 37.52%. Obrachowując następnie objętość wolnej wody e_o w naturalnych krwinkach, przy pomocy wzoru (h) i tylko co oznaczonych wielkości e_s , a także danych rzędu 3, znajdujemy 43.54 i 43.10%, odpowiednio.

Z drugiej strony możemy obrachować objętość krwinek w naturalnej krwi przy pomocy wzoru (m) i danych rzędów 3 i 4. Znajdujemy, że jest równa 38.10%. Wstawiając tę wielkość i dane rzędów 3 i 4 do wzoru (b), znajdujemy, że objętość wolnej wody w naturalnych krwinkach $e_o = 43.84\%$.

Zastosowując wzór (n) do obliczenia objętości krwinek we krwi Nr. 3, przy pomocy danych rzędów 1 i 2, znajdujemy 34.59%, a więc wielkość bardzo bliską wielkości 34.65%, znalezionej przez pomiar bezpośredni.

Zgodność powyższych oznaczeń dowodzi, że w danym przypadku krwinki zachowywały się jak prawdziwe osmometry.

Krwinki ludzkie.

We krwi ludzkiej zewnętrzna błona otoczki krwinek zwykle wytrzymuje ciśnienie osmotyczne i obrachowana wielkość e_o ,

równa około 54%, wydaje się być rzeczywistą objętością wolnej wody w całych krwinkach, pokrytych błoną zewnętrzną, albo w wewnętrznej części krwinek, w granicach wewnętrznej błony (przyjmując, że procentowa zawartość wolnej wody we „wnętrzu” krwinek i w otoczce jest ta sama). Tylko nieliczne odchylenia od wspomnianej objętości były zaznaczone. Mogły być one spowodowane przerwaniem zewnętrznej błony otoczki krwinek lub pewnym wytrącaniem białka w osoczu, o czym będzie mowa później.

Krwinki końskie.

Objętość wolnej wody w krwinkach końskich jest zwykle równa, według obliczenia, 43%, ale wyższe wartości, do 54%, i niższe, a mianowicie 39%, z brakiem wielkości pomiędzy 43 a 39% (patrz 9, s. 28 lub 989, odpowiednio), były też znalezione. Te dane wskazywałyby, że zewnętrzna błona otoczki krwinek końskich, utworzona *in vitro*, jest szczególnie niestała i najczęściej całkiem nieobecna, a mianowicie gdy obliczenie daje 43% wolnej wody. To przypuszczenie jest tem bardziej prawdopodobne, ponieważ objętość krwinek we krwi końskiej jest znacznie niższa niż w ludzkiej, a aglutynacja — większa.

Przyjąwszy, że objętość całych krwinek jest 1, objętość krwinek bez zewnętrznej błony i wolnej wody otoczki 0.91, a objętość krwinek bez otoczki ale z wewnętrzną błoną 0.82 (patrz przykład 4), znajdujemy, że jeżeli 43% jest objętością wolnej wody w krwinkach pozbawionych zewnętrznej błony na otoczce, to procentowa objętość wolnej wody „wnętrza” krwinek, równa procentowej objętości wolnej wody w całych krwinkach, gdy zewnętrzna błona otoczki jest nienaruszona, jest

$$\frac{0.91}{0.82} \cdot 43 = 47.73\%$$

Przypuszczamy, że normalna objętość wolnej wody w krwinkach końskich jest około 48%, jak obrachowano. Objętość 39% nie wydaje się być rzeczywistą. Jest to prawdopodobnie przypadek, gdy zewnętrzna błona otoczki się tworzy, przerywa i znowu tworzy, jak będzie objaśnione w następnym przykładzie. Objętość 54% może być rzeczywistą. W tym przypadku należy sądzić, że krwinki końskie mają otoczkę i wewnętrzny układ (hemoglobiny) podobne, jak w krwinkach ludzkich.

Krwinki jako wadliwe osmometry.

Przykład 4.

Krew końska

Nr.	Krew	Objętość krwinek		Zewnętrzna błona otoczki			
		4 g.	24 g.	obecna		nieobecna	
				Wolna woda	Wolna woda	Objętość krwinek	Wolna woda
		e_0	e_0	e_0	e_0	e_0	e_0
		%	%	%	%	%	%
2	Nr. 3 rozcieńczona $d_2 = 0.7235$	31.55	30.58	52.52	44.05	28.09	50.45
1	„ „ „ $d_1 = 0.8440$	33.30	32.69	55.88	46.26	29.79	53.13
0	Naturalna, obliczenie teoret.	38.14	38.12	—	—	34.62	—
3	Nr. 0 ze szczaw. s. $p_1 = 0.1952$	35.10	35.08	38.88	38.92	31.64	43.62
4	„ „ „ $p_2 = 0.4980$	32.13	32.11	38.88	38.92	28.67	43.62

W tym przypadku nie ma zgodności, jaką widzieliśmy w uprzednim przykładzie, choć ten sam sposób jest użyty. Wielkości e_0 w rzędach 1 i 2, oznaczone po 4 godzinnym osiadanju krwinek, nie zgadzają się z tymi samymi wielkościami, oznaczonymi po 24 godzinach. Powodem tej niezgodności mogło być przerwanie zewnętrznej błony otoczki krwinek. Ta błona musiała być cała przed pierwszym pomiarem, ale przerwana i odnowiona przed drugim pomiarem, co powodowało zanik pęcznienia otoczki krwinek. Przeciwnie, jest zgodność między podobnymi pomiarami w rzędach 3 i 4. Widocznie w tym przypadku, w obu pomiarach, po 4 i 24 godzinach, zewnętrzna błona musiała już być przerwana i wznowiona. Znaczna niezgodność oznaczeń sposobami rozcieńczenia i solenia może być powodowana wytrąceniem pewnej ilości białka z osocza, o czym w następnym przykładzie, gdzie to zjawisko jest jeszcze mocniej zaznaczone.

Dane krwi rozcieńczonej, w rzędach 1 i 2, pozwalają na następujące przybliżone obrachowanie całkowitej objętości otoczki w krwinkach *in vitro*:

Powiększenie objętości krwinek wskutek osmotycznego pęcznienia zarówno „wnętrza” krwinek jak i otoczki, w przypadku $d_2 = 0.7235$,

$$31.55 - 0.7235 \times 35.10 = 6.15$$

Podobne powiększenie objętości, ale tylko od pęcznienia otoczki krwinek, w przypadku tego samego rozcieńczenia,

$$31.55 - 30.58 = 0.97$$

Skąd objętość otoczki w jednostkach objętości krwinek

$$100 \times 0.97 : 6.15 = 15.8\%$$

Podobny rachunek w przypadku $d_1 = 0.8440$ daje 16.6%.

Objętość wolnej wody oznaczona przez solenie, przy pomocy danych w rzędach 3 i 4, była około 39%, prawdopodobnie z powodu zerwania i następnego wznowienia zewnętrznej błony krwinek. Można wykazać, że gdyby ta błona była całkiem nieobecna, jak w przykładzie 3, to podobnie jak wtedy obrachowanie dałoby objętość wolnej wody 43%.

Licząc, że objętość wolnej wody, zawartej w otoczce krwinek, wynosi 9% w stosunku do objętości krwinek, ta sama objętość, ale w stosunku do objętości całej krwi Nr. 0, wyniesie $9 \times 0.3812 = 3.44\%$. Odliczając tę liczbę od wielkości objętości krwinek podanych w rzędach 3 i 4, otrzymujemy objętości krwinek bez zewnętrznej błony i wolnej wody zawartej w otoczce krwinek. W przypadku rzędów 1 i 2, objętości, które należy odliczyć, są odpowiednio 0.8440×3.44 i 0.7235×3.44 . Tak obliczone objętości krwinek, bez zewnętrznej błony, są podane w przedostatniej kolumnie tabeli. Ostatnia kolumna przedstawia wielkości e_0 obrachowane według tych nowych objętości krwinek. Okazuje się, że wielkość e_0 , obrachowana z tą poprawką, wynosi, w oznaczeniach sposobem solenia, 43%, jak w przykładzie 3. Ale, podobnie jak i wtedy, nie jest to rzeczywista objętość wolnej wody. Rzeczywista objętość jest przypuszczalnie około 48%, jak objaśniono uprzednio.

Objętość 50%, otrzymana sposobem rozcieńczenia, wydaje się być również niedokładna, z powodu osadów białka w osoczu, jak wspomniano przedtem.

Przykład 5.

Krew końska

Nr.	Krew	Jest osad w osoczu		Brak osadu w osoczu	
		Ob. krwinek	Wol. woda	Ob. krwinek	Ob. osadu
		w	e_0	w	
		%	%	%	%
		1	2	3	4
2	Nr. 0 rozcieńczona $d_2 = 0.8317$	33.63	56.23	32.83	0.80
1	„ „ „ $d_1 = 0.9152$	34.83	69.15	34.07	0.76
0	Naturalna z hirudyną	35.34	—	—	—
3	Nr. 0 z cytrynjanem s. $p_1 = 0.5200$	32.38	43.13	—	—
4	„ „ „ $p_2 = 1.0540$	30.40	42.51	—	—

W tym przypadku objętość wolnej wody w krwinkach, oznaczona sposobem solenia, była około 43%, jak w przykładzie 3. I w tej krwi, widocznie, otoczka krwinek nie miała błony zewnętrznej. Nienormalnie wysoka objętość wolnej wody oznaczonej sposobem rozcieńczenia była prawdopodobnie spowodowana wytrąceniem pewnej ilości białka przez rozcieńczenie osocza. To mógł być przypadek adsorpcji białka na krwinkach.

Obrachujemy, według wzoru (d), jak należy zmienić objętości krwinek krwi rozcieńczonych, podane w kolumnie 1 tabeli, by rachunek wykazał $e_0 = 43\%$, jak w oznaczeniach sposobem solenia w tym przykładzie. Wielkości tak obrachowane są podane w kolumnie 3, a różnice wielkości podanych w kolumnach 1 i 3, to jest objętości osadów w osoczu, są podane w kolumnie 4. Fakt, że te objętości są prawie równe, może być uważany za wskazówkę, że jeden i ten sam powód, działający jednakowo w obu próbkach krwi Nr. 1 i Nr. 2, powyższa obrachowane wielkości wolnej wody z 43% na 69.15 i 56.23%, odpowiednio. A to dowodzi, że niema

przepuszczania jonów solnych przez otoczkę krwinek we krwi Nr. 2, jak się wydaje na pierwszy rzut oka.

Te przykłady wykazują, że najlepszym sposobem osmotycznego oznaczenia objętości wolnej wody jest sposób solenia, ale i ten sposób nie jest pewny, przeto dodatkowe chlorometryczne oznaczanie tej samej objętości jest zawsze pożądane.

Przykład 6.

Krew końska.

Nr.	Krew	Zewnętrzna błona otoczki krwinek			
		przerwana w Nr. 1		nienaruszona	
		ob. krw. w %	w. woda e_0 %	ob. krw. w %	ob. otoczki %
1	Nr. 0 rozcieńczona $d = 0.9260$	55.72	41.51	56.28	16.7
0	Naturalna z hiru dyną	57.17	—	—	—
2	Nr. 0 z cytrynjanem s. p. $= 0.5370$	50.51	56.69	—	—

W tym przykładzie zewnętrzna błona otoczki krwinek była przypuszczalnie nieuszkodzona w porcjach krwi Nr. 0 i Nr. 2, ale przerwana i wznowiona we krwi Nr. 1.

Obrachujmy, jaką powinny być objętość krwinek we krwi Nr. 1 by dać 56.69% objętość wolnej wody, jak w rzędzie 2. Ta objętość, obrachowana ze wzoru (d), okazuje się = 56.28. Stąd całkowita objętość otoczki krwinek *in vitro*, w jednostkach objętości krwinek, obrachowana podobnie jak w przykładzie 4, jest

$$100 \cdot \frac{56.28 - 55.72}{56.28 - 0.9260 \times 57.17} = 16.7\%$$

Badając sposobem przewodnictwa (patrz 10) osocze danej krwi, okazało się, że w tym przypadku zupełnie wyjątkowo objętość białka w osoczu (v) = objętości skupień białkowych (w) = 13.5%, co może oznaczać, że w danym przykładzie skupienia białkowe były pokryte mocną, półprzenikliwą błoną. A więc β było w tym przypadku = 0.865, której to wielkości odpowiada, w oznaczeniu sposobem solenia, $e_0 = 54.59$, a nie 56.69%, jak było obrachowane przyjmując, jak zwykle, $\beta = 0.915$.

Te ostatnie szczegóły podajemy, by zaznaczyć, że dobre badanie krwi wymaga wszechstronnych pomiarów zarówno krwi jak i osocza, bo w przeciwnym razie błędne wnioski są możliwe.

S t r e s z c z e n i e .

Poznanie fizycznego stanu otoczki krwinek jest niezbędne, chcąc sądzić o przenikliwości krwinek. Układ otoczki jest prawdopodobnie podobny do układu „wnętrza” krwinek. Przypuszczalnie, otoczka krwinek składa się ze skupień drobin białko-

wych, wolnego płynu między skupieniami i płynu „związanego” między drobinami. Otoczka krwinek wydaje się być ograniczona *in vitro* dwoma półprzenikliwymi błonami, wewnętrzną i zewnętrzną. *In vivo*, zdaje się, błon niema i otoczka jest przepuszczalna, lub selekcyjnie przepuszczalna, bo trudno objaśnić inaczej, dlaczego stężenia chloru są po obu stronach otoczki te same.

In vitro krwinki są dobrymi osmometrami, o ile nie pęka zewnętrzna błona otoczki krwinek lub nie wytrąca się białko z osocza. Ta nietrwałość zewnętrznej błony jest głównym powodem często zaznaczanych nieprawidłowości w osmotycznym zachowaniu się krwinek.

Nie widzimy wskazówek, w warunkach naszych prac, amfoterycznego działania hemoglobiny i zastosowywania prawa *Donnana* we krwi. Zmiany w ilości wody „związanej” w krwinkach, wskutek rozcieńczenia lub solenia, wydają się nie zachodzić.

Według nowego obrachunku wolnej wody krwinek, uwzględniającego obecność białka w osoczu, krwinki ludzkie mają około 54% wolnej wody, a końskie około 48%, może nieco więcej. Pewne odchylenia od tych liczb były zaznaczone, ale trudno powiedzieć obecnie, czy są rzeczywiste, czy tylko pozorne.

Są wskazówki, że całkowita objętość otoczki krwinek, *in vitro*, z zewnętrzną błoną, wynosi około 17% objętości krwinek.

Autor wyraża swą wdzięczność Prof. S. Dąbrowskiemu za jego wielce pomocną krytykę.

P i ś m i e n n i c t w o .

1. K o p a c z e w s k i W., *Traité de Biocolloïdologie*, Gauthier-Villars, Paris, 1934. IV. p. 365.
2. M a i z e l s M., *Biochem. Journ.* 1935. 29. 1970.
3. O b e r s t F. W., *J. Biol. Chem.* 1935. 108. 153.

- 4 P o n d e r E., The mammalian red cell and the properties of haemolytic systems, Borntraeger, Berlin, 1934.
- 5 R a s z e j a S., Bull. Ac. Sc. de Cracovie, Cl. de Médecine. W druku.
- 6 R a s z e j a S. et S ł a w i ń s k i A., Bull. Ac. Sc. de Cracovie 1934, Cl. de Médecine 445, lub Bull. Soc. Chim. biol. 1934. 16. 1692.
- 7 S ł a w i ń s k i A., Biochem. Journ. 1933. 27. 356; Bull. Ac. de Sc. de Cracovie 1934, Cl. de Médecine 1, lub Bull. Soc. Chim. biol. 1934. 16. 448.
- 8 S ł a w i ń s k i A., J. Ch. phys. 1926. 23. 710; 1929. 26. 368; 1930. 27. 604.
- 9 S ł a w i ń s k i A., Bull. Ac. Sc. de Cracovie 1933, Cl. de Médecine 21, lub Bull. Soc. Chim. biol. 1933. 15. 982.
- 10 S ł a w i ń s k i A., Bull. Ac. Sc. de Cracovie 1936, Cl. de Médecine 211, lub Acta Biol. Exp. 1936, 10, Nr. 9, 151.
- 11 S ł a w i ń s k i A., Bull. Ac. Sc. de Cracovie 1936, Cl. de Médecine 221, lub Acta Biol. Exp. 1936, 10, Nr. 11, 173.
- 12 W a l t e r s O. S., J. Lab. and Clin. Med. 1934. 19. 851.
- 13 W i n t r o b e M. M., Johns Hopkins Hosp. Bull. 1933. 53. 118.

[Zakład Chemii Fizjologicznej Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu
Poznańskiego].

Kierownik: Prof. Dr. S. Dąbrowski.

St. Raszeja.

**O rozmieszczeniu sodu pomiędzy czerwone ciała a osocze
krwi ludzkiej i niektórych zwierząt ¹⁾.**

*Sur la répartition du sodium entre les hématies et la plasma
du sang humain et de certains animaux.*

Rękopis nadesłany w dniu 24.XII.1936 r.

Les premières déterminations du sodium dans les hématies ont été faites par Bunge, qui a trouvé que les hématies de quelques animaux, entre autres celles du Cheval, ne contiennent point de sodium. Dès lors certains expérimentateurs (Kramer et Tisdall) ont mis en doute la présence du sodium même dans les hématies de l'Homme, contrairement à l'opinion d'autres auteurs (Dill, Talbot et Edwards; Oberst), qui y trouvent une quantité assez notable de cet élément. Dans ce travail on s'est appliqué à la recherche quantitative de sodium dans les hématies de l'Homme et des animaux, chez lesquels l'absence de cet élément fut considérée comme un fait acquis, en employant le microdosage pondérale du complexe aceto-uranylo-sodo-magnésien (méthode de Blanchetière). Grâce à ce procédé on a pu constater positivement la présence du sodium dans les hématies des cas considérés ainsi que sa répartition entre deux phases du sang.

Nous avons obtenu en particulier des valeurs concordantes soit par analyse directe des hématies, lavées avec

¹⁾ Niniejsza praca była przedstawiona na posiedzeniu Polskiej Akademii Umiejętności w Warszawie 20.XI.1936.

une solution isotonique de glucose, soit par méthode indirecte, dans laquelle on déduit la quantité du sodium de hématies de son contenu dans le sang et le plasma, ayant déterminée au préalable le volume des hématies. Ce dernier volume a été évalué par la méthode de conductivité de Sławiński, ainsi que par voie d'analyse purement chimique de deux phases du sang. La concordance de ces deux méthodes a été trouvée très satisfaisante, à condition de prendre des précautions relatives au temps de lavage et à la vitesse de centrifugation. La centrifugation des hématies trop intense leur fait perdre environ 6% de leur sodium; le lavage exagéré (30 h. p. ex.) modifie la structure interne des hématies et provoque une perte montant jusqu'à 20% de sodium qui passe dans les eaux de lavage.

La concentration du sodium dans les hématies de l'Homme et du Cheval a été trouvée 7 fois moindre que celle du plasma.

Prace o ilościowym rozmieszczeniu związków nieorganicznych pomiędzy krwinki a osocze we krwi ludzkiej i zwierzęcej datują się w literaturze już od bardzo dawna (Verdeil 1).

Dane te w miarę rozwoju analityki ulegały nieraz zasadniczym zmianom, np. chlor przez dłuższy czas uważano jedynie za składnik osocza (Zimmermann 2).

Obecnie, gdy zawartość chloru w czerwonych ciałkach krwi przestała już być sporną, to zagadnienie obecności sodu w krwinkach nie jest jeszcze w zupełności rozstrzygnięte. Jakkolwiek już Bunge (3) uważał za niesłuszne twierdzenie Sacharjina (4) o wyłącznej obecności sodu w osoczu krwi ludzkiej, to jednak pojawiają się jeszcze prace z lat ostatnich, jak Kramera i Tisdall'a (5), Cameron - Foster (6), w których powraca pogląd na tę sprawę z przed laty sześćdziesięciu. Autorzy ci bowiem obecność sodu w krwinkach ludzkich poddają w wątpliwość. Większość wszakże autorów, podobnie jak Bunge (3), wypowiada się za obecnością sodu w krwinkach ludzkich.

Dane o stężeniu sodu w czerwonych ciałkach krwi ludzkiej notowane w literaturze są dosyć różne, a mianowicie: na 100 g krwinek Wanaach (7) podaje jako przeciętne 55.9 mg; Dill, Talbott i Edwards (8) 28.8 — 40.0 mg, a wreszcie Oberst (9) 14.1 do 20.4 mg. Powyżsi autorzy stężenie sodu w krwinkach określali drogą pośrednią, bądź bezpośrednio.

S p o s ó b p o ś r e d n i — oprócz oznaczenia sodu w krwi całkowitej i osoczu, wymaga jeszcze określenia objętości krwinek w krwi analizowanej, które uskuteczniło za pomocą hematokrytu (O b e r s t 9).

W b e z p o ś r e d n i c h o z n a c z e n i a c h sodu w krwinkach używane były dwa sposoby postępowania, a mianowicie: określanie sodu w krwinkach, oddzielonych od osocza drogą wirowania, bez odmywania od pozostałego w nich osocza (W a n a c h 7, D i e l l, T a l b o t t i E d w a r d s 8); lub też z zastosowaniem przemywania, do którego K e r r (9) używał izotonicznego roztworu chlorku potasowego, O b e r s t (9) zaś dla uniknięcia zmian w krwinkach podczas ich przemywania, próbował je wymywać dializowanym osoczem, zadany następnie chlorkiem potasowym, aby izotoniczność tego roztworu wyrównać z pierwotnym osoczem; przemywając tym właśnie sztucznie sporządzonym roztworem białkowym, autor otrzymał te same wyniki, jak przy wymywaniu izotonicznym roztworem chlorku potasowego.

Brak sodu w czerwonych ciałkach krwi końskiej, króliczej i świńskiej, stwierdzony był przez B u n g e g o, następnie przez A b d e r h a l d e n a (11) i od tego czasu, zresztą dosyć odległego ze względu na rozwój mikrochemii, ten szczególny wyjątek nie został uwzględniony w literaturze.

G e l l h o r n (12) w swojej obszernej pracy, rozpatrując analityczno-chemiczne wyniki rozbiorów czerwonych ciałek zwierzęcych, opiera się na tabeli Abderhaldenowskiej.

Wymieniony brak sodu w krwinkach wyżej wyszczególnionych zwierząt, jak również próby tłumaczenia tego wyjątku przez A b d e r h a l d e n a (11) *) nie wydają się przekonywujące i dlatego też, mając w posiadaniu wypróbowaną już metodę ilościowego określania sodu we krwi, zastosowaliśmy ją w tym przypadku dla stwierdzenia, jakie jest rozmieszczenie sodu w krwi końskiej, króliczej i świńskiej, i czy w szczególności ten pierwiastek w czerwonych ciałkach jest nieobecny?

*) A b d e r h a l d e n tłumaczy nieobecność sodu w krwinkach końskich, króliczych i świńskich specjalną niechęcią do spożywania soli kuchennej u tych zwierząt. W dawniejszych pracach o sodzie we krwi V e r d e i l (1), B u n g e (3) i W a n a c h (7) autorzy podkreślają fakt zastępowania sodu potasem w krwinkach przy podawaniu pokarmów obfitujących w potas.

C z ę ś ć d o ś w i a d c z a l n a .

1. Metoda postępowania.

We krwi, pobieranej na hirudyne, sól oznaczano metodą octano-uranylo-magnezową (B l a u c h e t i è r e 13). Krew, osocze, czy też krwinki były uprzednio spalane kw. azotowym, a pod koniec spalania kw. nadchlorowym. Po spaleniu obecny kw. fosforowy oddzielano tlenkiem wapnia, a tak przygotowany roztwór zadawano odczynnikiem octano-uranylo-magnezowym. Strącony osad — $\text{NaMg}(\text{UO}_2)_3(\text{CH}_3\text{CO}_2)_9 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$, — po przeniesieniu na sączek szklany, przemyciu alkoholem 92°, uprzednio nasyconym octanem sodo-uranylo-magnezowym, był suszony przez pół godziny w temp. 105° i następnie ważony.

Powyższa metoda oznaczania sodu pozwala odnaleźć dodatkową ilość tego pierwiastka do krwi z przeciętnym błędem około $\pm 0.6\%$ (R a s z e j a 13).

We krwi końskiej (tabela I, nr. 1, 2, 3) oznaczono sól w osoczu i we krwi całkowitej, następnie objętość czerwonych ciałek zmierzona była sposobem elektrometrycznym S ł a w i ń s k i e g o (14). Z tych wyżej wymienionych danych [a), b), c)] wypadło, że w krwinkach końskich obecny jest sól.

We krwi końskiej (4, 5) następnie króliczej i świńskiej, oprócz określeń sodu we krwi i osoczu, zrobione były oznaczenia tego pierwiastka również w krwinkach.

W tym celu pobierano 3 cm³ krwi do naczynka od wirówki o pojemności 5 cm³, po krótkim (5') i słabym wirowaniu (1500 obrotów) odciągano pipetą osocze, następnie trzykrotnie przemywano izotonicznym roztworem glukozy (5.6 g w 100 cm³), biorąc za każdym razem do przemycia 1 cm³ glukozy i zachowując ten sam sposób wirowania.

Sól był określany w osoczu, oddzielnym od krwi i złączonym z roztworem glukozy, którym przemyto krwinki (d), jak również w przemytych krwinkach.

W celu sprawdzenia, czy strącony osad odczynnikiem octano-uranylo-magnezowym jest wynikiem obecności sodu, nie zaś niezupełnie oddzielonego kw. fosforowego, każdą analizowaną porcję krwinek, po spalaniu i oddzieleniu kw. fosforowego za

T a b e l a I.

Nazwa zwierz.	a	b	c	d	e	f		g	
	Objętość czerw. ciałek	Sód w osoczu w 1 cm ³	Sód w krwi w 1 cm ³	Sód w osoczu z 1 cc krwi mg	Sód w czerw. ciałk. z 1 cc krwi mg	Sód w czerwonych ciałkach mg		z obliczeń w 1 cm ³	z oznaczeń bezpośr. w 1 cm ³
Koń 1	0.6294	3.0740	1.5626	—	—	0.6727		—	
„ 2	0.5737	3.1230	1.7270	—	—	0.6885		—	
„ 3	0.3584	3.2160	2.2360	—	—	0.4827		—	
„ 4	0.3440	3.1320	1.1900	2.0530	0.1370	0.3936		0.3976	
„ 5	0.4703	3.1920	1.9955	1.7215	0.2745	0.6468		0.5816	
Królik	0.3432	2.5420	1.8515	1.6760	0.1725	0.5288		0.5114	
Świnia	0.4492	3.7010	2.1310	2.0290	0.1100	0.2059		0.2271	

pomocą tlenu wapnia, przenoszono do kolbki miarowej o pojemności 10 cm³, aby następnie w 5 cm³ strącić sól, a w pozostałym roztworze wykazać nieobecność kw. fosforowego molibdenianem amonowym, sporządzonym, jak podaje T r e a d w e l l (15).

Za pomocą oznaczeń sodu w osoczu z 1 cm³ osocza obliczono objętość czerwonych ciałek według wzoru:

$$1 - \frac{\text{sód w osoczu z 1 cm}^3 \text{ krwi}}{\text{sód w 1 cm}^3 \text{ osocza}}$$

T a b e l a II.

Nazwa zwierzęcia	a	b	c	d
	Objętość czerw. ciałek met. elektr.	Sód w osoczu w 1 cm ³	Sód w osoczu z 1 cm ³ krwi mg	Objętość czerwonych ciałek met. chemiczna
Koń (4)	0.3440	3.1320	2.0530	0.3445
Koń (5)	0.4703	3.1920	1.7215	0.4607
Królik	0.3432	2.5420	1.6760	0.3406
Świnia	0.4492	3.7010	2.0290	0.4518

We krwi ludzkiej stężenia sodu w krwinkach (tab. III) określone są sposobem pośrednim, a mianowicie na podstawie oznaczeń sodu we krwi całkowitej i osoczu.

Tabela III.

Objętość czerw. ciałek (met. elektrom.)	Sód w osoczu mg w 1 cm ³	Sód w krwi mg w 1 cm ³	Sód w czerw. ciałkach met. pośrednia mg w 1 cm ³
0.3400	3.5890	2.4480	0.2332
0.3970	3.4770	2.1430	0.1169
0.4290	3.2420	2.1380	0.6685
0.4490	3.0540	1.7840	0.2256

2. Wpływ długiego i silnego wirowania na wymywanie się sodu z czerwonych ciałek krwi końskiej.

D o ś w i a d c z e n i e 1. — Dwie próbki krwi a i a₁ po 3 cm³ wirowano w ciągu 5 min., przy 1500 obrotach, a po odzieleniu osocza, przemywano 3-krotnie krwinki izotonicznym roztworem glukozy, zachowując za każdym razem ten sam czas i tę samą szybkość wirowania.

Krwinki z dwu znów próbek tej samej krwi (b i b₁) po 3 cm³ równocześnie podobnie przemyto 3-krotnie izotonicznym roztworem glukozy, z tą różnicą, że przedłużono czas i wzmocznono szybkość wirowania (do 30 min. przy 3000 obrotach).

Sód krwinek w mg (z 3 cm ³ krwi)		Odsetek odmytego sodu
Przemywano przez 5'	30'	
przy 1500 obr.	przy 3000 obr.	
Próba a : 0.6501 mg	Próba b : 0.6098 mg	6%
„ a ₁ : 0.6514 „	„ b ₁ : 0.6108 „	6%

Wpływ czasu.

Pobraną krew końską, rozdzielono na części, po 2 cm³ każda, przed oznaczeniem sodu w czerwonych ciałkach tej krwi wprowadzono następujące między nimi różnice przy ich przemywaniu: próbę (c) krwinek odmywano 3-krotnie izotonicznym roztworem glukozy w ciągu 40', wirując za każdym razem 5' przy 1500 obrotach. Drugą porcję (d) krwinek też przemywano 3-krotnie i wirowano również 5' przy 1500 obrotach, czyniąc wszakże kilkogodzinne przerwy między jednym a drugim przemywaniem, tak że cały zabieg trwał 30 godzin.

Krwinki przemyte w c. 40'	Krwinki przemyte w c. 30 g.	Odsetek odmytego sodu
sód w mg z 2 cm ³ krwi		
0.2531 mg	0.2032 mg	20%

Rozbieżność wyników w rozmieszczeniu sodu w krwi ludzkiej możnaby wytłumaczyć tym, że określano ten pierwiastek metodami analitycznymi o wielce różnym stopniu dokładności. Zestawienie np. danych o stężeniu sodu we krwi ludzkiej czy też zwierzęcej, a określanych jeszcze metodą piro-antymonianową (K r a m e r i T i s d a l 5, K e r r 10), z wynikami, otrzymanymi metodą Blanchetierowską jest niewskazane ze względu na różnicę czułości obu metod.

Wobec bowiem znakomitej czułości octanu uranylo-magnezowego, strącającego sód z roztworu o stężeniu 20 mg w litrze (K o l t h o f f 17), piroantymonian przestał być używany do ilościowego określenia sodu, gdyż strąca on sód dopiero z roztworu o stężeniu 1 g w litrze. Mała stosunkowo czułość odczynnika piroantymonianowego, następnie tworzenie się w środowisku kwaśnym nierozpuszczalnych kw. antymonowych, wreszcie obecność we krwi innych katjonów, jak wapń i magnez, — wszystkie te warunki uzasadniają niewłaściwość i brak celowości w stosowaniu metody piroantymonianowej, zwłaszcza w mikroanalizie. Wyników otrzymanych tą metodą niepodobna uważać za dostatecznie ścisłe, nie mogą też stanowić podstawy do wyciągania jakichkolwiek wniosków, jak to czynią niektórzy autorowie (F e l d m a u s 18). W bezpośrednich określeniach stężenia sodu w krwinkach momentem równie ważnym, jak wykazaaliśmy wyżej, jest ich wymywanie.

Dowodem pośrednim, że przy zachowaniu wyżej opisanych warunków, sód nie wymywa się, mogą służyć dane tabeli II, a mianowicie z g o d n o ść, j a k a z a c h o d z i p o m i ę d z y o b j ę t o ś c i a m i c z e r w o n y c h c i a ń e k, o t r z y m a n y m i m e t o d ą e l e k t r o m e t r y c z n ą, a t y m i s a m y m i d a n y m i, k t ó r e z o s t a ły o b l i c z o n e z o z n a c z e ń b e z p o ś r e d n i c h s o d u, o d d z i e l n i e w o b u f a z a c h k r w i.

O b e r s t ogranicza się do jednorazowego przemywania krwinek. Z naszych jednak doświadczeń wynika, iż zachowaniu czerwonych ciałek krwi bez zmian szczególnie sprzyja nie tyle ilość przemywań, ile przede wszystkim ograniczenie czasu ich trwania oraz szybkość wirowania. Dwukrotnie zwiększona chyżość wirowania w tym samym odstępnie czasu wywołuje wy-

mycie około 6% sodu zawartego w krwinkach. Długotrwałe, np. 30-godzinne przemywanie krwinek, nawet przy zachowaniu umiarkowanej chyżości wirówki, powoduje tak daleko idące zmiany w budowie krwinek, że ilość wymytego z nich sodu dochodzi do 20%.

Streszczenie.

1°. Za pomocą metody octano-urynylo-magnezowej, w zastosowaniu mikrowagowym, stwierdzono obecność sodu i określono stężenie tego pierwiastka w krwinkach końskich, króliczych i świńskich sposobem pośrednim i bezpośrednim.

2°. Stężenia sodu w krwinkach tych zwierząt są podobne jak w krwinkach ludzkich, t. j. 7-krotnie mniejsze niż w osoczu.

3°. Stężenie sodu w krwinkach ludzkich było określane sposobem pośrednim, przy równoczesnym oznaczeniu objętości krwinek metodą pomiarów przewodnictwa.

4°. Stosowanie długiego i szybkiego wirowania przy przemywaniu krwinek powoduje wymywanie się z nich sodu, co zachodzi również przy długotrwałym przemywaniu i słabym wirowaniu wskutek zmian właściwości krwinek.

5°. Pomiary objętości czerwonych ciałek, określone na drodze analizy ściśle chemicznej, przy zachowaniu niezbędnych ostrożności przy wirowaniu i przemywaniu krwinek, są zgodne z wynikami pomiarów elektrometrycznych, według metody S ł a w i ń s k i e g o.

Uważam za swój miły obowiązek złożenie podziękowania p. Prof. S. Dąbrowskiemu za wskazówki udzielone mi życzliwie w czasie mojej pracy, oraz p. A. Sławińskiemu za wykonanie pomiarów elektrometrycznych.

Piśmiennictwo.

- 1) Verdeil, F. *Libg's Ann.* 1849. 69 (89).
- 2) Zimmermann G. 1847. *Über die Analyse des Blutes*, Berlin.
- 3) Bunge G. Z. 1876. *Z. Biol.* 12 (191).
- 4) Sacharjin. 1861. *Virchow's Archiv.* 21 (337).
- 5) Kramer B. and Tisdall F. F. 1922. *J. Biol. Chem.* 53 (241).

- 6) Cameron - Foxter. 1928. *Canad. Med. Ass. J.* 18 (673).
- 7) Wanach R. 1888-89. *Jahresbr. Fortschr. Thierchem.* 18 (88).
- 8) Diell D. B., Talbott, J. H. and Edwards H. T. 1930. *J. Physiol.* 69 (267).
- 9) Oberst F. W. 1935. *J. Biol. Chem.* 108 (153).
- 10) Kerr S. E. 1929-30. *J. Biol. Chem.* 85 (47).
- 11) Abderhalden Z. 1898. *Zeitschr. f. physiol. Chem.* 25 (65).
- 12) Gellhorn E. 1929. *Das Permeabilitätsproblem*, Berlin 96.
- 13) Blanchelière. 1923. *Bull. Soc. Chim. de France.* 4, 33 (807).
- 14) Raszeja. 1935. *Bull. d. l'Acad. Polon. d. Sciences et d. Lettres et 1935. Bull. Soc. de Chim. biol.* (817).
- 15) Sławiński A. 1934. *Bull. d. l'Acad. Polon. d. Sciences et des Lettres et 1934. Bull. Soc. de Chim. biol.* (448).
- 16) Treadwell F. P. 1922. *Analytische Chemie* (221).
- 17) Kolthoff I. M., *Zeitschr. f. anal. Chemie.* 70.
- 18) Feldmaus B. *Pol. Archiwum Med. Wew.* 13 (1).

Ernest A. Sym.

Stickstoffumsatz der Tuberkulosebacillen¹⁾.

Der Tuberkuloseerreger benötigt zu seinem Gedeihen auf Nährböden keiner komplizierten Verbindungen, deshalb ist er besonders zu Untersuchungen über den Stoffwechsel geeignet. Zur Züchtung der Tuberkulosebacillen gebrauchten wir die synthetische Nährflüssigkeit von S a u t o n, welche zwei Stickstoffspender und zwar Ammoniumsalze und Asparagin enthält. Der Zweck unserer Untersuchungen war die Aufstellung der Stickstoffbilanz der auf synthetischen Nährboden wachsenden Tuberkelbacillen Typus bovinus.

Das Verschwinden des Stickstoffes aus dem Kulturmedium verteilt sich auf die beidem erwähnten Stickstoffquellen während der Entwicklungsphase der Bacillen in verschiedener Weise je nachdem, welche Passage die Bacillen auf dem Nährboden durchmachen. In der ersten Passage wird am Anfang der Entwicklung der Kultur vor Allem Asparagin verbraucht und dann erst Ammoniumstickstoff in grösserer Menge. In der zweiten und dritten Passage verdoppelt sich beziehungsweise vervierfacht sich die Aufnahmegeschwindigkeit von Ammoniumstickstoff durch die Bacillen wobei auch das Verschwinden von Asparagin vom Medium beschleunigt wird, aber vergleichsmässig im bedeutend kleinerem Ausmasse. Diese Beobachtung zeigt wie gross die Anpassungsfähigkeit des Tuberkuloseerregers an den Nährboden ist. In der dritten und vierten Passage sind die Abweichungen in der Stickstoffaufnahme unbedeutend.

Der ganze aus der Nährflüssigkeit verschwundene Stickstoff konnte in den Bacillen während der Entwicklungsphase wiedergefunden werden. Während der Phase des Zerfallens der

¹⁾ Zusammenfassung des Vortrages, der während der Sitzung der Polnischen Physiologischen Gesellschaft am 3.XII.1936 abgehalten wurde.

Bacillen ist ein grosser Teil des Stickstoffes in das Kulturmedium von den Bacillen zurückgetreten und vor allem als Eiweiss aufzufinden.

In der Kulturflüssigkeit konnte man während der Entwicklungsphase der Bacillen eine folgende Stickstoffverteilung konstatieren:

Asparaginstickstoff (doppelte Menge des nach V a n - S l y k e ermittelten Aminostickstoff) + Ammoniumstickstoff (nach F o l i n) = Gesamtstickstoff (nach P a r n a s - W a g n e r). Diese Beziehung war eingehalten in der ersten Passage während eines Monates, in der zweiten Passage während 19 Tage, in der dritten und vierten während 12 Tage. In der Phase des Zerfallens der Bacillen übersteigt die Gesamtstickstoffmenge die Summe der Mengen des Ammonium- und Asparagin-stickstoffes.

Während der Untersuchungen über den Stickstoffumsatz wurden einige Beobachtungen gemacht, welche auf einen Zusammenhang zwischen diesen Umsatz und anderen Erscheinungen im Kulturmedium hinweisen. In den ersten Tagen der Züchtung der Bacillen beobachtet man im Kulturboden eine starke Abnahme des pH und grosse Schwankungen im Oxydoreduktionspotential. Nach einigen Tagen stellen sich diese Grössen ein und ändern sich nicht bis zum Moment des beginnenden Zerfallens der Bacillen. In der Zerfallsphase steigt nämlich der pH-Wert und fällt das Redoxpotential.

[Department of Anatomy, Columbia University].

R. Truskowski and R. L. Zwemer.

Effect of cortin injections on blood potassium¹⁾.

Injections of cortin to normal cats lead to a transient drop in blood potassium, the effect being most pronounced at the end of an hour, and being greater in the case of cats with initial high blood potassium than with low or normal initial values. The original level is in all cases regained 4 to 7 hours after the injections. A similar result is found for adrenalectomised cats, with the difference that the fall in blood K is greater, and that it is followed by a rise to values greater than the initial, reaching a maximum at the fourth or fifth hour after the injection, and then rapidly falling to approximately the initial value, or lower. The effect is ascribed to fixation of potassium by cells during the first phase of low blood K, followed by entry of K into the general circulation from previously stagnant venous blood, from the peripheral organs and muscles. The results suggest that better effects might be obtained with cortin by administering frequent small injections rather than large single doses.

¹⁾ Presented before the Polish Physiological Society, Warsaw, 18.III. 1937.

[Zakład Chemii Lekarskiej Uniwersytetu J. K. we Lwowie].

J. K. Parnas.

**Uwagi o destylacji amoniaku przy wykonywaniu oznaczeń
kjeldahlowskich w przyrządzie Parnasa i Wagnera.**

*Bemerkungen über die Ammoniakdestillation im Apparat von
Parnas und Wagner.*

Rękopis nadesłany w dniu 19.III.1937 r.

Die Modifikation der Ammoniak-Destillation im Apparat von Parnas und Wagner, der St. Zb. Bartosiewicz zwei Publikation gewidmet hat (1), (2), stellt gegenüber der ursprünglichen Methode (Parnas und Wagner 3), (Pregl 4) sicher keinen Fortschritt dar, sondern eine überflüssige und den automatischen Verlauf der Arbeit störende Komplikation. Die Angaben des Autors, dass die Dauer einer Destillation von 20 Minuten auf sieben bis acht Minuten verkürzt wird, ist unrichtig: die Füllung des Apparates dauert $\frac{1}{2}$ bis $1\frac{1}{2}$ Minuten, die Destillation, die im ursprünglichen Apparat sofort an die Füllung ansetzt, höchstens vier Minuten, die Entleerung aber nimmt nicht mehr Zeit in Anspruch, als 20 bis 30 Sekunden; dies hat natürlich zur Voraussetzung, dass der Apparat einigermaßen dicht ist, und dass der Dampfentwickler etwa zur Hälfte mit Wasser gefüllt ist. Im Ganzen nimmt also eine Destillation höchstens 5-bis 6 Minuten in Anspruch. Bartosiewicz spült den Destillationskolben anscheinend nach jeder Destillation, was überflüssig ist, ein wesentlicher Vorteil der Anordnung von Parnas und Wagner besteht eben darin, dass die Reinigung des Apparates zwischen den einzelnen Destillationen unnötig ist; dies hat zur Voraussetzung, dass der Destillationskolben richtig konstruiert ist, insbesondere, dass das

Dampfeinleitungsrohr ganz nahe der tiefsten Stelle des Destillationskölbchens endet.

Da die Destillation eigentlich den vollen Dampfstrom verbraucht, den ein starker Brenner liefert, so kann ein Dreiweghahn zwischen dem Dampfwickler und dem Rückflussrohr diesen Strom nur drosseln, und nur behinderlich sein. Der Autor spricht in seiner Publikation in der Biochemischen Zeitschrift von seiner Verbesserung der Methode. Sie ist es sicher nicht.

W publikacji pod tytułem „Skrócenie metody mikro-Kjeldahla w aparacie Parnasa - Wagnera”¹⁾ podaje St. Zb. Bartosiewicz następującą modyfikację pierwotnej metody: do ujścia zbiornika, do którego podczas wypróżniania przyrządu po skończonej destylacji obniżone w generatorze pary ciśnienie wciąga zawartość kolbki destylacyjnej, załącza pompkę próżniową; po ukończeniu destylacji otwiera się pompkę i wypróżnia w ten sposób kolbkę destylacyjną. Dla umożliwienia tej operacji wstawia między zbiornik a generator kurek trójdrożny.

Wprowadzenie tego dodatkowego urządzenia ma według autora skracać destylację trzykrotnie, jak autor pisze, destylacja w przyrządzie Parnasa i Wagnera ma trwać, wraz z oczyszczeniem, około 20 minut, natomiast przy zastosowaniu pompy ssącej czas ten skraca się do 7 lub 8 minut.

Obznajomieni z metodą Parnasa i Wagnera niewątpliwie zorientują się, że te dane są zupełnie mylne. Przy użyciu aparatury pierwotnej, więc takiej, jak ją opisano w pierwszej publikacji, i jak przeszła do książki Pregla i innych, destylacja trwa 3 minuty, a już z wielkim rąbem bezpieczeństwa 4 minuty, jak to podaje Pregl. Napełnianie przyrządu trwa, zależnie od zręczności pracownika, pół minuty do półtorej minuty; natomiast opróżnianie samoczynne, które było i jest istotnym w tej metodzie postępowaniem, trwa 20 do 30 sekund. Jeżeli parę

¹⁾ Cytuję tytuł oryginalny, i muszę wyrazić zastrzeżenie co do nazwy „Metoda mikro-Kjeldahla”; poprawniej i logiczniej byłoby nazwać ją mikro-metodą Kjeldahla.

wodną wywiązuje się w kolbie objętości jednego do dwu litrów, a kolby te są wypełnione wodą do połowy, to czas wypróżnienia kolby destylacyjnej do zbiornika nigdy nie trwa dłużej, licząc od chwili odstawienia palnika, niż 25 sekund. Założeniem tego jest naturalnie, że połączenia w przyrządzie są tak szczelne, jak się to uzyskuje przez użycie zwykłych korków gumowych. Przekonałem się o tym, stwierdzając przy pomocy stopera podczas ćwiczeń chemicznych studentów medycyny czas, po którym zawartość kolbki destylacyjnej przechodziła całkowicie do zbiornika.

Płukanie przyrządu Parnasa i Wagnera między poszczególnymi destylacjami jest zbędne i bezcelowe¹⁾: jeżeli rurka, doprowadzająca parę wodną do kolbki destylacyjnej sięga, jak to przepisano, na 0.5 — 1 mm do najgłębszego miejsca w kolbce destylacyjnej, to zawartość będzie wyssana do zbiornika tak kompletnie, że pozostająca w kolbce i rurkach ilość zasady będzie bardzo małą w porównaniu z ilością kwasu, własnego w kwaśnym roztworze przed następną destylacją. A ponieważ w poprzedniej destylacji amoniak zupełnie wypędzono, przeto nie ma zupełnie potrzeby usuwania alkalicznej pozostałości i czyszczenia przyrządu.

Destylacja w przyrządzie Parnasa i Wagnera trwa zatem w sumie, jeżeli się nawet nie przyjmuje u pracownika szczególnej zręczności i szybkości, sześć minut: czasu tego nie można skrócić poniżej pięciu minut. Muszę to stwierdzić z naciskiem, ponieważ czytelnik nie znający metody mógł by zarówno o metodzie pierwotnej, jak i o wartości nowej modyfikacji wyrobić sobie błędne wyobrażenie.

Modyfikację, wprowadzoną przez Bartosiewicza, uważam nie tylko za zbędną, ale za wadliwą. Destylacja przy pierwotnej metodzie Pregla—Parnasa—Wagnera zużywa cały prąd pary wodnej, który wytwarza się nad mocnym palnikiem laboratoryjnym: jeżeli Bartosiewicz umieszcza między generatorem pary a zbiornikiem kurek trój-

1) Pierwotnie Parnasi i Wagner (1921) płukali po opróżnieniu jednorazowo destylarkę, co zajmuje kilkanaście sekund; później zarzucono to nie tylko w naszej pracowni, ale, jak mogłem się przekonać, także i w innych, w których metodę tę się stosuje.

drożny, to musi to chyba być kurek o szerokich wierceniach, jeżeli tego prądu nie dławi? W pierwotnej metodzie wywiążemy parę już podczas napełniania przyrządu, para spłukuje wtedy zbiornik, uchodzi dolnym jego wylotem i destylację po wlewniu płynów do destylarki można zacząć natychmiast przez zamknięcie wylotu; nie wyobrażam sobie jak to się odbywa przy modyfikacji Bartoszewicza; czy tę parę wpędza się do pompki wodnej i czy nie powstaje wtedy w przyrządzie nadwyżka ciśnienia, która uniemożliwia jednocześnie napełnianie? Muszę wyrazić przekonanie, że wprowadzona przez Bartosiewicza komplikacja nie stanowi ulepszenia metody pierwotnej.

Piśmiennictwo.

Bartosiewicz, St. Zb. *Acta biologiae experimentalis*. 10 (383). 1936. — Bartosiewicz, Stanisław. Zb. *Biochemische Zeitschrift*. 289, (55). 1936. — Parnas J. K., i Wagner R. *Biochemische Zeitschrift*. 125, (253). 1921. — Pregl F. *Die quantitative organische Mikroanalyse*, II wyd. 1923, str. 118.

[Zakład Fizjologii Akademii Medycyny Weterynaryjnej we Lwowie].

A. Klisiecki i M. Szabuniewicz.

Pojemność naczyńowych obszarów psa¹⁾.

Capacity of the vascular bed in dog.

Nauka o regulacji krążenia, o przemieszczaniu krwi z narządów jednych do drugich przez zmianę oporu w naczyniach krwionośnych oraz szeroko rozbudowana sprawa zbiorników krwi i ich znaczenia dla spraw krążenia skłoniły nas do zbadania pojemności różnych obszarów naczyńowych, tętnic, naczyń włosowatych i żył. Badane były obszary z pomocą oliwy, wlewanej do odnośnych tętnic. Ilość oliwy, pozostającej w naczyniach nastrzykiwanych pod ciśnieniem ok. 100 mm Hg, oznaczała ich pojemność. Pojemność obliczyliśmy w procentach ogólnej ilości krwi ($\frac{1}{13}$ wagi ciała), nie zaś na wagę danego narządu, bo pierwszy sposób daje właściwą orientację o jej rozmieszczeniu i umożliwia prównanie anatomicznej pojemności naczyń w zastoju krwionośnym z pojemnością minutowego przepływu krwi, z pojemnością fizjologiczną. Nie były nam przydatne w tym względzie badania Gscheidlena i Rankego, polegające na oznaczaniu ilości krwi w jakimś narządzie i na wnioskowaniu o pojemności np. naczyń mózgu ze stosunku wagi mózgu do wagi np. mięśni.

Według naszych obliczeń pojemność ważniejszych obszarów tak wygląda:

¹⁾ Rzecz przedstawiona na posiedzeniu Oddziału Polskiego Towarzystwa Fizjologicznego we Lwowie w dniu 28.IV.1937 r.

Głowa z szyją	13.5—15.5, średnio	14%	ogólnej ilości krwi
Kończyna przednia	4.6— 5.5, „	10% (dwie)	„ „ „
Kończyna tylna	6.0— 6.0, „	„	„ „ „
Kończyny tylne z miednicą	15.0—15.0, „	15.4%	„ „ „
Płuca (20 mm Hg.)	9.8—10.7, „	10.0%	„ „ „
Jama brzuszna cała	44.4—50.6, „	46.6%	„ „ „
w tem wątroba	16—17		
śledziona	7— 9		
nerki	1— 1		
Serce, reszta aorty	„	4.0%	„ „ „
		100.0% ogólnej ilości krwi.	

Porównanie pojemności z ilością krwi krążącej w tych obszarach wskazuje na znaczenie obszarów jako zbiorników krwi. Obwód, t. j. mózg i kończyny, o pojemności łącznej 36% otrzymuje w minucie 70% krwi krążącej; krew tam odnawia się po dwakroć w minucie. Trzewia mieszczą w sobie ok. 46—50%, a w minucie dopływa do nich 25% krwi krążącej; odnowa krwi odbywa się tu raz w ciągu 2 minut. Z pośród trzew wątroba i śledziona odnawiają swą krew w 2 minutach, nerki w $\frac{1}{6}$ minuty, a jelita w ciągu 3 minut. Największą pojemność w stosunku do przepływu krwi mają jelita i im bodajże największa rola przypada w regulacji rozdziału krwi krążącej. Śledziona, choć ma pojemność 2 razy większą od minutowego wydatku, dzięki wielkiej kureczliwości też ma w tym poważny udział. Ale wątroba nie może dysponować 20%-ami krwi krążącej, działając jako zbiornik według *Reina* i *Barcrofta*, bo wówczas musiałaby się stawać prawie bezkrwistą, aby móc np. u psa 13 kg wagi ciała 200 cm³ krwi się pozbywać, i musiałaby potężnie brzęknąć w czasie pobierania krwi.

Płuca o pojemności 10% krwi ogólnej, otrzymują całą ilość krążącej krwi w czasie ok. 48—60 sekund. W tym czasie krew się tam 10 razy odnawia, i znaczenia jako zbiornik krwi ten narząd mieć nie może, wbrew sugestiom *Hochreina*.

Wydatek minutowy komory serca psa, mierzony kardiometrem, wynosi 100—120% krwi ciała, podobny jest on w sercu ludzkim i pokrywa się z czasem średniego obiegu krwi.

[Zakład Fizjologii Akademii Medycyny Weterynaryjnej we Lwowie].

R. Leśków.

Pojemność układu tętniczego psa¹⁾.

Capacity of the arteries in dog.

Z punktu widzenia regulacji krążenia, zagadnienia ciśnienia i ruchu w układzie tętniczym, pożytecznym jest zbadanie pojemności tętnic pod różnym ciśnieniem. Wiadomo bowiem, że tętnice są przepelnione krwią, rozdęte, ale nie znamy ile krwi one w różnych warunkach mieścić mogą. Kwestia została wyjaśniona przez napełnianie tętnic masą (z kredy, pokostu, oliwy, oleju maszynowego), która docierała do tętniczek o średnicy 0.09 mm. W stosunku do ogólnej ilości krwi (¹/₁₃ wagi ciała) tętnice mieszczą w sobie następujący % krwi:

	Ci ś n i e n i e mm Hg.					Waga ciała	
	40	60	80	100	120	140	kg
Tętn. głowy, szyi i kończ. przedn.	0.95—2.2;	1.35—3;	1.8—3.3;	2.3—4;	3—5;	3.4—5.8;	11.5—15.2
średnio:	1.42	2	2.7	3.2	3.5	4.5	5 pomiarów
Aorta piersiowa i t. mię-dzyżebr.	0.9	0.8—1.3;	1—1.7;	1.2—2;	1.35—2.7;	1.65—3.6;	13—17
Aorta brzuszna i t. jamy brzusznej	0.85—2.35;	1.1—3.9;	1.4—4.4;	1.6—5.5;	2.3—6.5;	2.6	13—20
średnio:	1.65	2.32	2.7	3.2	3.7		4 pomiarów
T. miednicy i kończ. tyl-nych	0.9—2;	1.25—2.15;	1.45—2.5;	1.7—2.8;	1.9—3.2;	2.1—3.8;	
średnio:	1.26	1.64	1.9	2.23	2.63	2.9	
	5.2	6.8	7.6	10.2	11.8	12.6	

¹⁾ Rzecz przedstawiona na posiedzeniu Oddziału Polskiego Towarzystwa Fizjologicznego we Lwowie w dniu 28.IV.1937 r.

W normalnym ciśnieniu mieści się w całym układzie tętniczym psa 7.6—12% ogólnej ilości krwi. Nieco większa pojemność znajduje się przez nastrzykanie całego układu tętniczego jednocześnie; mianowicie:

5.0	8.0	10	12	13.6	14.7%
-----	-----	----	----	------	-------

Gdy zachwiany zostaje stosunek pomiędzy dopływem krwi z komory a odpływem do naczyń włosowatych (zwolnienie lub wstrzymanie ruchów serca), krążenie tkankowe jest dalej zasilane przez krew z rozdętego obszaru tętniczego, i tak długo dopóki ciśnienie nie opadnie do 40—50 mm Hg, równoważących normalny opór naczyń obwodowych. Zanik krążenia pociąga rozszerzenie obwodowych naczyń skutkiem wzrostu pH lub zjawienia się ciał rozszerzających naczynia, a gdy się to stanie, krążenie tkankowe powraca mimo niskiego ciśnienia tętniczego.

Sama aorta, po podwiązaniu wszystkich odnóg piersiowych i brzusznych, zawiera następujące ilości krwi:

Ci ś n i e n i e mm Hg.							
0	20	40	60	80	100	120	140
0.92	1.37	1.76	2.07	2.6	3.02	3.45	3.56%

ogólnej ilości krwi ciała psa 17 kg.

Żyła bramna wraz z jej odnogami wątroby i jelit mieści następujące ilości:

Ci ś n i e n i e mm Hg.		
10	20	30
5.5	7.06	8.87%.

Żyła czoła dolna wraz z żyłami nerkowymi, przeponowymi i lędźwiowymi

2.5	3.26	4.06% krwi ogólnej.
-----	------	---------------------

Z 46% ogólnej ilości krwi ciała w jamie brzusznej się znajdujących, po odjęciu pojemności tętnic i żył, na naczyniach włosowate jelit, śledziony, wątroby przypada ok. 37%.

[Zakład Chemii Lekarskiej Akademii Medycyny Weterynaryjnej we Lwowie].

W. Moraczewski, St. Grzycki i W. Guca.

Wpływ pożywienia i ilości płynów na wydzielanie kłębuszków, mierzone liczbą R e h b e r g a. (Stosunek kreatyniny moczu do kreatyniny krwi) ¹⁾.

L'effet de la nourriture et de la quantité des liquides ingérés sur l'élimination globulaire exprimé par la relation de la créatinine de l'urine et la créatinine du sang. (Nombre de R e h b e r g).

Les auteurs ont vérifié leurs observations antérieures sur élimination augmentée après ingestion des albumins et retardée après l'ingestion des graises et du sucre par le nombre de R e h b e r g et ont trouvé en bon accord l'élimination globulaire étant en rapport direct avec élimination d'eau et le volume d'urine par minute.

Un retard d'élimination urinaire après introduction d'une grande quantité d'eau a été pareillement en coïncidence avec le nombre de R e h b e r g, soit pour le rein normal en rapport direct avec l'eau ingérée (sans eau 20, après 100 cc. 45 après 1000 cc. 49) au contraire chez les obèses, plus on boit moins on élimine: 48 sans eau, 33 après 100 cc. et 28 après 1000 cc.

Enfin on a trouvé chez un malade ayant les reins obstrués par la rétention des urines dans la vessie un nombre R o h b e r g au dessous du normale, bien que la quantité des urines dépassait 4000 cc. et le volume en minute était 2.0. Ainsi la relation de créatinine des urines et de la créatinine du sang en accord avec l'élimination dans les cas de reins normales subit une diminution considérable en cas d'obstruction de sécretion rénale.

¹⁾ Rzecz przedstawiona na posiedzeniu Oddziału Polskiego Towarzystwa Fizjologicznego we Lwowie w dniu 28.IV.1937 r.

Zamiarem naszym było sprawdzenie prawa Rehberga (1926), wedle którego ze stosunku % kreatyniny w moczu i % kreatyniny we krwi, pomnożonego przez wydzielenie minutowe, wnioskować można o wydzieleniu kłębuszkowym. Chcieliśmy sprawdzić w ten sposób znalezione przez nas dawniej zjawiska, jak zatrzymanie wody w ustroju po diecie tłuszczowej i wpływ moczopędny diety białkowej, a potem zachowanie się wody i rozczynów soli zależnie od objętości podanego płynu.

Okazało się, że zgodnie z naszym przewidywaniem białko powiększa kłębuszkowe wydzielenie, natomiast tłuszcz i cukier je zmniejsza: po białku 43.8, po tłuszczach 35.3, po cukrze 32.3. Jednocześnie ilość wody i objętość minutowa wzrasta lub maleje.

Podanie większe lub mniejszej ilości płynów wywiera na wydzielenie kłębuszkowe różny wpływ, zależnie od mniejszej lub większej sprawności nerek, albo raczej zależnie od mniejszej lub większej wsiąkliwości ustroju. Sprawdziliśmy bowiem wielokrotnie, że niektóre ustroje pomimo zupełnie zdrowych nerek zatrzymują 40% do 50% wypitej wody lub roztworu soli, nie tylko roztworu soli kuchennej — o czym oddawna wiemy — ale i roztworów soli rzekomo moczopędnych jak CaCl_2 lub Na_2SO_4 .

Otóż liczba Rehberga i tu potwierdziła nasze poprzednie doświadczenia. U jednych w miarę wzmożenia ilości wody ilość wydzielonej przez kłębuszki wody wzrastała: bez wody 20.0, po 100 cm^3 wody 45.0, po 1000 cm^3 wody 49.0.

To dziwne zachowanie widzieliśmy nawet po wypiciu roztworu siarczanu sodowego, bo po 100 cm^3 wydzielali jedni 30.4, a po 1000 roztworu 42.0, inni natomiast po 100 cm^3 roztworu wydzielali 44.0 a po 1000 cm^3 roztworu tylko 39.6.

Nie wszystkie roztwory jednak zachowują się w ten sposób. Wiadomo nam było z dawnych prac, że roztwór rodanku sodu zachowuje się odrębnie. Może na skutek zdolności rozpęczniania, którą posiada, może na skutek wielkiej rozpuszczalności, która zdaniem naszym z tą własnością pęcznienia w parze chodzi — dość że sole rodanowe różnią się od innych. Wywołują one wybitne rozrzedzenie krwi, czego inne nie robią, i zatrzymują się w ustroju znacznie dłużej, niż inne. Bądź co bądź podane 100 cm^3 roztworu rodanku sodu wywołało u obu kategorii ustrojów wynik podobny: po 100 cm^3 33.0 a 37.0 po 1000 cm^3 roztworu

albo 43.5 i 48.9. Widzimy zatem, że w tym przypadku ilość kłębuszkowego wydzielania stosuje się do ilości wydzielonej wody.

We wszystkich tu podanych doświadczeniach spotykamy, mimo różnego i paradoksalnego wydzielenia, liczbę *R o h b e r g a* zależną od wydzielonej wody, zgodną co do ilości zarówno z minutowym wydzieleniem, jak i z ilością wydzielonej wody. Dopiero w przypadku istotnego schorzenia nerek, wywołanego uciskiem mechanicznym na nerki wskutek zatrzymania moczu w pęcherzu — przekonaliśmy się o znaczeniu tej liczby *R e h b e r g a*. W tym razie mimo wzmożonej ilości moczu, dochodzącej do 4000 cm³ na dobę, mimo objętości minutowej 2.0, liczba *R e h b e r g a* spadła do 28 albo 30, co wedle normy uchodzi za liczbę małą.

Zaznaczyć musimy, że wymieniony przez nas wzrost po białku, a spadek po tłuszczu nie jest długotrwały i wyrównuje się po kilku godzinach, że jest zatem wyrazem chwilowej podaży wody, że podobnie obniżenie ilości po 1000 cm³ płynu jest tylko opóźnieniem wydzielenia. Metoda naszych badań polegała na tem, że wszelkie próby dotyczące wydzielenia robiliśmy w ciągu pierwszych czterech godzin po wypiciu na czczo tych ilości płynu, albo po zjedzeniu na czczo rozmaitych ciał: białka — jako suchy ser, masła lub cukru trzcinowego.

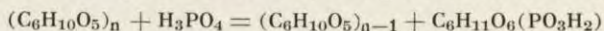
[Institut für medizinische Chemie der Universität, Lwów].

P. Ostern, J. Guthke i B. Umschweif.

Phosphorylierung von Stärke durch Muskelextrakt¹⁾.

In früheren Arbeiten dieses Institutes ist die Synthese sowie Isolierung und präparative Darstellung von Hexosemonophosphorsäure aus Glykogen und Phosphat unter Einwirkung von Muskelextrakten beschrieben worden. Nach den von P a r n a s und O s t e r n entwickelten Vorstellungen bildet diese Reaktion eines der ersten Glieder der glykogenolytischen Abbaureihe. Wir prüften nun, ob die Phosphorylierung von Glykogen zu Hexosemonophosphorsäure durch anorganisches Phosphat in kofermentfreien Extrakten eine für Glykogen spezifische Reaktion ist oder nicht. Die Versuche ergaben, dass weder Monosaccharide (Glukose, Fruktose, Galaktose) noch Disaccharide (Maltose, Laktose, Rohrzucker, Trehalose) in Muskelextrakten phosphoryliert werden. Das einzige Kohlehydrat, welches sich ähnlich verhält wie Glykogen ist Stärke. Das Phosphorylierungsprodukt von Stärke wurde isoliert und als Hexosemonophosphorsäure (Embdenscher Gleichgewichts-ester) identifiziert. Bei längeren Inkubationszeiten zerfällt die gebildete Hexosemonophosphorsäure unter Einfluss einer in Muskelextrakt vorhandenen Phosphatase in Hexose und Phosphorsäure. Dieser Zerfall ist aber keine Umkehrung der Phosphorolyse von Stärke oder von Glykogen sondern eine Reaction anderer art, wie aus folgenden Gleichungen hervorgeht.

Phosphorolyse des Glykogens (bzw. Stärke).



¹⁾ Zusammenfassung des Vortrages, der während der Sitzung der Polnische Physiologischen Gesellschaft am 28.IV.1937 abgehalten wurde.

Dephosphorylierung von Hexosemonosphorsäure:



Die optimalen Bedingungen für die Darstellung des Embden-Esters aus Stärke wurde studiert. Eine einfache präparative Methode ergibt eine Ausbeute von 1 g hexosemonophosphorsäuren Barium aus 1 g Stärke.

[Institut für medizinische Chemie der Universität, Lwów].

P. Ostern, J. Guthke, W. Slobodzian i J. Terszakowicz.

Wird Phosphoglukonsäure im Muskel umgesetzt? ¹⁾

W a r b u r g und seine Mitarbeiter haben nachgewiesen, dass isolierte Enzymsysteme aus Hefe in Gegenwart des Triphosphopyridinnukleotides den Glukose - 6 - Phosphorsäure - ester zu Proosphoglukonsäure oxydieren. Die Phosphoglukonsäure wird in Hefeextrakten (nach den Untersuchungen von L i p m a n n sowie W a r b u r g und C h r i s t i a n) oxydativ weiter abgebaut. W a r b u r g fand, dass von sechs C Atomen der Phosphoglukonsäure drei zu CO₂ verbrannt werden.

Wir haben untersucht, ob der Phosphoglukonsäure eine Funktion im Abbau des Glykogens im Muskel zukommt. Wir finden, dass autolytierte und mit Adenosintri-phosphorsäure reaktivierte Kaninchenmuskelextrakte Phosphoglukonsäure—im Gegensatz zu Hexosemonophosphorsäure (E m b d e n - Ester) und Fruktosediphosphorsäure (H a r d e n - Y o u n g - Ester) — nicht abzubauen vermögen. Zusatz von Phosphoglukonsäure zu Muskelbrei verlangsamt sogar sehr wesentlich die Geschwindigkeit der Milchsäurebildung. Die grösste Hemmung beobachtet man während der ersten Minuten der Inkubation. Später erfolgt die Milchsäurebildung mit ungefähr derselben Geschwindigkeit wie in der Kontrolle. Die Differenz in den Milchsäurewerten, die sich in der Anfangsperiode ergeben hat, bleibt jedoch während der weiteren Inkubation erhalten. Aerobe Versuche an Phosphatmuskelbrei zeigten, dass die Phosphoglukonsäure die Sauerstoffaufnahme in ähnlicher Weise hemmt, wie die Milchsäurebil-

¹⁾ Zusammenfassung des Vortrages, der während der Sitzung der Polnische Physiologischen Gesellschaft am 28.IV.1937 abgehalten wurde.

dung. Aus diesen Versuchen geht mit aller Klarheit hervor, dass die Phosphoglukonsäure keinen Intermediärglied im anaeroben Abbau des Glykogens, und der Hexosemonophosphorsäure zu Milchsäure ist. Der Mechanismus der eigentümlichen Hemmung der Milchsäurebildung und Atmung von Muskelbrei durch Phosphoglukonsäure wird weiter untersucht.

[Zakład Chemii Lekarskiej Uniwersytetu J. K. we Lwowie].

Julian Reis.

O 5 - nukleotydzie ¹⁾.

Über 5 - Nukleotidase.

Badając przemiany kwasu adenilowego w tkankach zwierzęcych, stwierdziłem istnienie wybiórczej fosfatazy, działającej wyłącznie na nukleotydy, posiadające grupę fosforanową związaną z 5-tym węglem rybozy, t. j. na kwas adenilowy i kwas inozynowy. Nazwano ją 5 - n u k l e o t y d a z ą. Izomeryczny z kwasem adenilowym (kw. adenozyno-5-fosforowym) nukleotyd adeninowy (kw. adenozyno-3-fosforowy) nie jest rozkładany przez 5 - nukleotydazę, ponieważ nie posiada wiązania rybozo-5 - fosforowego.

Ponieważ estry nukleozydo-5-fosforowe rozkładane są zarówno przez fosfatazę ogólną, jak i przez 5 - nukleotydazę, więc miarą aktywności tej ostatniej jest różnica między rozkładem jakiegoś estru nukleozydo-5-fosforowego, a rozkładem innego esteru fosforowego, rozkładanego wyłącznie przez fosfatazę ogólną. Dzięki temu, że działanie fosfataz jest początkowo proporcjonalne do czasu i ilości zaczynu, można było aktywność defosforylacji wyrażać przez liczbę γ -fosforu nieograniczonego, odszczepionego z kwasu adenilowego przez 10 mg badanej tkanki w czasie jednej godziny, t. 39°, pH 7.5, przeliczając odpowiednio wyniki, otrzymane w innym czasie lub z innymi ilościami tkanki. Obok tych wartości podaję w nawiasie dla porównania cyfry, odpowiadające fosforowi nieorganicznemu, odszczepionemu w tych samych warunkach z β -fosfoglicerolu. Próby były złożone

¹⁾ Rzecz przedstawiona na posiedzeniu Oddziału Polskiego Towarzystwa Fizjologicznego we Lwowie w dniu 28.IV.1937 r.

z 4 ml moderatora przeważnie weronalowego $\frac{1}{2}$ ml $^{31}/_{50}$ m substratu (kw. inozynowy lub β -fosfoglicerol) i $\frac{1}{2}$ ml zawieszony w wodzie miazgi z badanej tkanki. Przerwywano działanie zaczynów przez dodanie 1 ml 20% kw. tróchlorooctowego, potem w przesączu oznaczano fosfor nieorganiczny.

5-nukleotydaza z mózgu cielęcia posiada optimum swego działania przy pH 7.5, czasem jednak rozciąga się ono aż do pH = 9; jon magnezu nie działa na nią aktywnie.

Zaczyn ten jest bardzo rozpowszechniony w organizmie zwierzęcym. Przede wszystkim występuje on w tkankach nerwowych [mózg, nerw] u cielęcia: 81(0.7) [siatkówka], a także w płucach [u cielęcia: 29(0.3)] i w łożysku płodowym [człowiek: 181(17)].

Aktywność 5-nukleotydyzy, jak widać z przytoczonych liczb, w nerwie i płucach cielęcia przewyższa aktywność fosfatazy ogólnej około 100-krotnie. W mniejszej ilości i nie u wszystkich zwierząt znajduje się 5-nukleotydaza w mięśniach sercowych, a w jeszcze mniejszej ilości w szkieletowych; wyjątkiem jest szczur, u którego wymienione tkanki obfitują w 5-nukleotydzę, serce: 70(8), mięsień 10(2).

Razem ze zwyczajną fosfatazą występuje 5-nukleotydaza w jelitach [cielę 15(4)] i w wątrobie [cielę 22(3)]. W nerce i w kościach u jednych zwierząt (królik, cielę) znajduje się jedynie fosfataza ogólna, pozbawiona zupełnie 5-nukleotydyzy [nerka cielęca: 5(6)], u innych zaś (szczur, człowiek) znajdują się obydwa te zaczyny [zwłoki dziecka: nerka: 6.1(1.4), kość: 6.2(1.2)].

To szerokie rozprzestrzenienie 5-nukleotydyzy w organizmie zwierzęcym wymaga uwzględnienia w badaniach nad fosfatazami i nad przemianą fosforową tkanek. W tym celu należy w doświadczeniach używać jako podłoża dla działania fosfatazy obok ogólnie używanego β -fosfoglicerolu, także jakiegoś estru nukleozydo - 5 - fosforowego, t. j. kwasu adenilowego lub inozynowego, ten ostatni, ponieważ nie ulega zmianom przez dezaminację, jak kw. adenilowy, lepiej się nadaje do tego celu.

[Zakład Chemii Lekarskiej Uniwersytetu J. K. we Lwowie].

B. Umschweif i K. Gibayło.

Dalsze badania nad związkami wielosforowymi w komórkach drożdżowych i w mięśni szkieletowym ¹⁾.

Weitere Untersuchungen über die Polyphosphorsäuren in Zellen und Geweben.

Eine neue anorganische Polyphosphorsäure aus Hefe, und ein Beitrag zur Frage der Konstitution der Adenosin-polyphosphorsäuren.

W związku z zagadnieniem rzekomego występowania wolnego pyrofosforanu w mięśniach wykryliśmy reakcję, która pozwala wykazać drobne ilości pyrofosforanu nieorganicznego obok ortofosforanu i wszystkich organicznych związków fosforu, występujących w mięśni. Odczyn ten polega na tym, że dodany do wyciągu (odbiałcu) mięśniowego pyrofosforan, — już w ilościach odpowiadających 1 mg fosforu pyrofosforanowego na 100 g mięśnia, — daje z azotanem ołowiu, w obecności glikogenu mięśniowego, przy pH = 1.6, wyraźne zwiększenie początkowego zmętnienia, pochodzącego od glikogenu. Ten efekt zmętnieniowy daje się doskonale mierzyć nefelometrycznie. W roztworach nie zawierających glikogenu można przez dodanie odczynnika ołowiu przy pH = 1.6 strącić i oddzielić pyrofosforan od innych związków fosforowych. W roztworach o nieznannej zawartości pyrofosforanu można w powyższych warunkach, przy dodatku glikogenu mięśniowego (odbiałcu ze świeżych mięśni żabich) określić ilość pyrofosforanu przez porównanie efektu zmętnieniowego z efektami znanych ilości pyrofosforanu, w identycznych warunkach.

¹⁾ Rzecz przedstawiona na posiedzeniu Oddziału Polskiego Towarzystwa Fizjologicznego we Lwowie w dniu 28 IV.1937 r.

Przy badaniu drożdży na obecność pyrofosforanu wolnego natrafiliśmy na znaczną ilość fosforu, strącalnego ołowiem przy $\text{pH} = 1.6$ (około 400 mg na 100 g suchych drożdży). Frakcja ta, w całości nieorganiczna, z bardzo małą domieszką ortofosforanu, składa się z fosforu hydrolizującego się w całości na ortofosforan z tą samą stałą szybkości, co kwas adenozyotrójfosforowy.

Należało przypuszczać, że związek wyodrębniony z drożdży jest pyrofosforanem nieograniczonym. Jednakże, przy zestawieniu efektu zmętnieniowego z oznaczeniem fotometrycznym fosforu łatwo hydrolizującego się, okazuje się, że efekt zmętnieniowy jest trzy razy słabszy, aniżeli efekt tej samej ilości fosforu pyrofosforanowego, wywołany w takich samych warunkach. Ten znacznie słabszy, niż spodziewany, efekt Tyndalla wskazuje na obecność kompleksów wysokocząsteczkowych. Przypuszczenie to potwierdzają następujące szczegóły. Badany roztwór (sól sodowa) rozdziela się azotanem baru przy $\text{pH} = 1.6$ na dwie frakcje. Frakcja strącalna barem stanowi $\frac{1}{3}$ część całego fosforu i ścinania białko, podobnie jak metafosforan (jako metafosforany określamy wszystkie na drodze sztucznej otrzymane kompleksy wielofosforowe, posiadające własność ścinania białka). Frakcja nie strącalna barem przy $\text{pH} = 1.6$, wytrącona w oddziaływaniu alkalicznym, jako sól barowa, odpowiada w zupełności pyrofosforanowi. Stosunek atomowy baru do fosforu w wyodrębnionej soli jest jak 1 : 1. Roztwór soli sodowej nie ścina białka w obecności kwasu octowego. Nefelometrycznie znaleźliśmy w tej frakcji efekt odpowiadający przeszło 80% fosforu hydrolizującego się w 1 n. HCl, i 100° po 7 minutach. Frakcję pierwszą, strącalną barem przy $\text{pH} = 1.6$, ścinającą białko — określamy na razie ogólnie jako związek wielofosforowy. Dalsze badania okażą, czy ta forma występowania fosforu jest identyczna z którąkolwiek z licznych sztucznie otrzymanych odmian metafosforanu, czy też raczej stanowi kompleks w rodzaju kwasu tetrafosforowego ($\text{H}_6\text{P}_4\text{O}_{13}$), którego cząsteczka daje się w prosty sposób przedstawić przez trzy łączenia bezwodnikowe czterech cząsteczek kwasu ortofosforowego.

Nadmienić należy, że i kwas adenozyotrójfosforowy z mięśni odszczepia przy hydrolizie alkalicznej kompleks fosforowy, hydrolizujący się z tą samą stałą szybkością co

pyrofosforan i metafosforan, ale różny od przyjętego dotychczas pyrofosforanu, a raczej odpowiadający metafosforanowi swą własnością ścięcia białka, i efektem nefelometrycznym podobnie niskim, jak efekt związku wielofosforowego z drożdży, lub metafosforanu otrzymanego przez prażenie NaH_2PO_4 (dającego efekt odpowiadający ilości około 25% fosforu oznaczalnego fotometrycznie po hydrolizie kwaśnej). Należy zaznaczyć, że szybkości hydrolizy kwaśnej kompleksu wielofosforowego, oraz pyrofosforanu i metafosforanu są identyczne.

Przyjęcie kwasu czterofosforowego w połączeniu z dwiema cząsteczkami kwasu adenilowego jako składników kwasu adenylozynotrójfosforowego stawia w nowym świetle strukturę tego związku i tłumaczy w prosty sposób występowanie kwasu dwuadenozynopięciosfosforowego, oraz kwasu adenylozynodwufosforowego. Tym samym badania nasze zdają się potwierdzać hipotezę, wyrażoną przez Parnasa i Osternę, o wysokocząsteczkowej strukturze kwasu adenylozynotrójfosforowego i innych związków wielofosforowych kwasu adenilowego w komórkach.

[Department of Anatomy, Columbia University].

R. Truszkowski and R. L. Zwemer.

Variations in plasma and erythrocyte potassium following oral administration of potassium salts¹⁾.

Plasma and cell potassium, and blood cell volume have been determined in 11 individuals at intervals of 0.5, 1, 1.5, 2, and 2.5 hours after ingestion of 10—20 mg. of potassium (as chloride, phosphate, and citrate) per lb. body weight. Fifteen sets of curves were thus obtained for a number of controls and for persons suspected of hypoadrenalism, or suffering from other diseases. The following conclusions are drawn from the results.

1) Addison's disease may be diagnosed on the basis of the extreme rise in plasma K following ingestion of 10 mg. K/lb. body wt.

2) Erythrocyte K does not vary parallel with plasma K or with the hematocrit readings, whence it is inferred that potassium can move in and out of human erythrocytes *in vivo*.

¹⁾ Presented before the Warsaw branch of the Polish Physiological Society, 29.IV.1937.

[Zakład Biologii Ogólnej Uniwersytetu S. B. w Wilnie].

M. Chejfec.

Zachowanie się *Paramecium caudatum* w roztworach kwaśnych i zasadowych barwików przyżyciowych.

Das Verhalten von Paramecium caudatum in Lösungen von saueren und basischen Vitalfarbstoffen.

Manuskrypt nadany w dniu 9 III.1937 r.

Die vorliegende Arbeit stellt sich zum Zweck das Schicksal des von der Infusorienzelle aufgenommenen Farbstoffes zu verfolgen sowie das Wesen der Anpassung der Tiere an toxische Farbstoffmedien aufzuklären.

Den Ausgangspunkt bildeten die Arbeiten von *Strelnikow* ('24, '29). Nach diesem Autor findet zunächst eine sehr starke (10- bis 25000-malige) Kondensation des Farbstoffes in Nahrungsvakuolen statt. Überleben die Infusorien im farbigen Medium, so folgt dieser Kondensationsperiode eine Periode der Entfärbung der Zelle und es muss der Gehalt des Mediums an Farbstoff vermehrt werden, um eine weitere, übrigens nur kurz andauernde Färbung zu erzielen. Auf diese Weise gelang es *Strelnikow* Paramazien an hohe Konzentrationen der Farbstoffe zu gewöhnen, wobei sich die Tiere nicht färbten. Es soll sich hier um ein aktives Anpassungsvermögen der Infusorien handeln. Der Mechanismus dieser Anpassung soll darin bestehen, dass das Protoplasma Substanzen erzeugt, welche die toxischen Eigenschaften des Farbstoffes neutralisieren, zugleich aber dem Eindringen des Farbstoffes in die Zelle entgegengewirkt wird.

In vorliegenden Versuchen haben sich die Tiere gegen Lösungen von 0.2% Lichtgrün, 0.3% Methyl- und Trypanblau, 1% Fuchsin, 0.05% Methylenblau, 0.005% Neutralrot und 0.005% Nilblau als widerstandsfähig erwiesen. In angegebenen

Konzentrationen verhielten sich die Infusorien ganz normal und nur in stark verdünnten Lösungen liess sich eine etwas vermehrte Teilungsrate, sowie ein verstärkter Geotropismus feststellen.

In saueren Farbstoffen werden nur die Nahrungsvakuolen gefärbt. Das Färben des Protoplasmas, des Kernes und der Granulationen stellt eine prämortale Erscheinung dar.

Auch in basischen Farbstoffen bilden die Paramäzieren gefärbte Nahrungsvakuolen. Eine diffuse Protoplasmafärbung wird niemals beobachtet, wohl aber eine Färbung verschiedener Granulationsgebilde. Die Farbstoffe dringen in das Protoplasma durch die hintere untere Wand des Peristoms ein, und zwar erfolgt dies während der Ablösung der Nahrungsvakuole. Das Eindringen der Farbstoffe durch die Pellicula liess sich in keinem Falle beobachten. Aber die Hauptquelle des in das Protoplasma eindringenden Farbstoffes bilden doch die Nahrungsvakuolen.

Die Vermehrung der Färbungsintensität sowohl in den Nahrungsvakuolen wie im Protoplasma ist nicht etwa eine Folge der Kondensation des Farbstoffes, wie das *Strelnikow* meint, sondern sie bildet das Ergebnis chemischer Veränderungen des Farbstoffes, was sich *in vitro* nachahmen lässt. Übrigens war sie in den Versuchen des Verf. niemals so hoch, wie von *Strelnikow* angegeben, höchstens war sie etwa tausendfach.

In einer Farbstofflösung entfärben sich die Infusorien nach 60 — 100 Stunden. Wird jetzt die Konzentration der Aussenlösung erhöht, so tritt wiederum Färbung auf. Dasselbe geschieht, sobald die Tiere in einen anderen Farbstoff von gleicher molarer Konzentration überführt werden. Entfärbte Infusorien, die nach einer kurzen Spülung in denselben Farbstoff kommen, färben sich weiterhin nicht und erst nach einer 2 bis 10 Stunden währenden Spülung kehrt die ursprüngliche Färbbarkeit wieder.

Auch nach längerem Aufenthalt in einer Farbstofflösung wird der Farbstoff dauernd aufgenommen, doch erfolgt nach einiger Zeit eine Reduktion desselben, wobei der Farbstoff in eine optisch nicht feststellbare Leucobase übergeht.

In einer Mischung von zwei Farbstoffen findet nach einigen Tagen die Reduktion statt, wobei sie für einzelne Farbstoffe zu

werschiedenen Zeiten erfolgt. Gegenüber jedem Farbstoffe der Mischung verhalten sich die Tiere so, als ob er einzeln vorhanden wäre.

Stark toxische basische Farbstoffe können durch Zugabe von saueren neutralisiert werden. Auf die Weise können die Infusorien recht hohe Konzentrationen sonst giftiger Stoffe überstehen. Der Überschuss des basischen Farbstoffes kann aus dem Zellkörper in Gestalt von Exkretionsperlen entfernt werden.

Nach Fütterung mit Hefe bzw. Stärke in Farbstofflösungen entstehen in den Nahrungsvakuolen keine Leucobasen, indem die mit Verarbeitung der Nahrung verbundenen Oxydationsprozesse die Bildung solcher verhindern. Selbst eine mechanische Durchlüftung des Mediums genügt, um die Entfärbung der Paramazien zu verschieben und eine Entfärbung einzelner Tiere in kleinen Tropfen findet überhaupt nicht statt.

Die in dieser Arbeit mitgeteilten Versuche beziehen sich auf Massenkulturen. Einzeltiere verhalten sich ganz anders, und zwar ist der Unterschied so bedeutend, dass er einer besonderen Erklärung bedarf. Es ist uns auch sonst bekannt, dass ein scharfer Gegensatz zwischen den Eigenschaften des Einzeltieres und denjenigen der Kultur besteht, was den Gegenstand einer eigenen Untersuchung werden sollte.

Od roku 1830, w którym ukazała się rozprawa Ehrenberga, dotycząca pobierania przez wymoczki karminu i indygo, ukazały się liczne prace o barwieniu przyżyciowym pierwotniaków, a przede wszystkim wymoczków, jako doskonałego obiektu badań. Brandt ('81), Certes ('81), ('85), Przesmycki ('94), ('97), Prowazek ('98, '99), ('01), Rohde ('17), Nirenstein ('20), Strelnikow ('24, '29), Słoniński i Zweibaum ('22), Becker ('26), Dogieli i Issakowa ('27), Rumjantzew i Kedrowskij ('27), Ball ('27), Roberts ('29), Chambers ('30), Kono Takeo ('30), Guillermond ('30), Gellhorn ('31), Giecklhorn ('31), Kedrowskij ('32), Leber ('32), Gutstein ('32), Nassonow ('32), Ludford ('33), Seki Masai ('33), Semennoff ('34), Semennoff i Masłowa ('34), ('35) i wielu innych poświęcili swe prace powyższemu zagadnieniu.

W wynikach badań wymienionych autorów jest jednak wiele sprzeczności, które należy przypisać trudnościom metodycznym. Barwiki przyżyciowe należą do semikoloïdów. W rozcieńczonych roztworach posiadają własności dyfuzyjne i wywierają ciśnienie osmotyczne, a jednocześnie tworzą molekularne agregaty. W roztworach tych występują więc obok siebie drobiny barwika, jony metaliczne i produkty hydrolizy. Wszystko to stwarza środowisko chemiczne bardzo skomplikowane i zmienne. Jeśli dodam, że barwiki poszczególnych firm, a niejednokrotnie jednej firmy różnią się bardzo pod względem czystości, toksyczności itp., rozbieżność otrzymanych wyników staje się nieunikniona *).

Praca niniejsza miała na celu uzupełnienie tych danych przez poznanie losów pochłoniętych barwików kwaśnych i zasadowych w ciele wymoczka *Paramecium caudatum*, a przede wszystkim przez wyjaśnienie istoty przystosowania się wymoczków do barwików jako do środowisk toksycznych.

Punktem wyjścia moich badań były prace S t r e l n i k o v a ('24, '29). Autor ten, badając zachowanie się wymoczków w licznych barwikach przyżyciowych o różnych koncentracjach, stwierdził, że po początkowej fazie bardzo intensywnego wybarwienia wodniczków pokarmowych, względnie ciała wymoczków, gdy koncentracja barwika w wodniczkach jest często od 10 do 25 tysięcy razy większa od stężenia podawanego barwika, następuje w razie przeżycia faza odbarwiania się, i mimo obecności barwika wymoczki przestają się w nim barwić. Dopiero podniesienie koncentracji decyduje o ponownym ich zabarwieniu, ale po jakimś czasie wodniczki względnie ciało wymoczków staje się bezbarwne. W ten sposób można przyzwyczaić wymoczki do bardzo wysokich stężeń barwików, w których żyją, a jednocześnie nie zabarwiają się. Następuje więc, według tego autora, aktywne przystosowanie się do wysoko toksycznego środowiska i jednocześnie wymoczki wyrabiają w sobie odporność na przyjmowanie barwika. Mechanizm uodpornienia, według S t r e l n i k o v a, polegałby na uzdolnieniu protoplazmy wymoczków do wytwarzania substancji chemicznie neutralizującej toksyczne właściwości barwika i w wytwarzaniu środków przeciwdziałających przenikaniu barwika do protoplazmy.

Zadaniem tej pracy było także bliższe zbadanie tych przystosowań.

Metodyka.

*Paramecia*brane do doświadczeń były hodowane w wywarze sianowym zmienianym raz na tydzień, w temperaturze mniej więcej około 20° C.

Wymoczki przed doświadczeniem były odwirowywane od pożywki i umieszczane na 10 godzin w odstąłej wodzie wodociągowej (pH 7.4—7.5). Wszystkie doświadczenia przeprowadzono z bardzo gęstymi zawiesinami wymoczków, zawierającymi od 1 do 3 tysięcy osobników w cm³.

Stosowane barwiki F-my G r ü b l e r & Co zostały przygotowane w roztworach 1% i rozcieńczane przed doświadczeniami.

*) Fakt ten podkreśla także w swej pracy, która ukazała się w trakcie druku tej rozprawy, M. G e r s c h. 1937, Protoplasma, 27.

Aby otrzymać pożądanę roztwory barwików z wymoczkami, do określonej — zwykle 2 do 3 cm³ — objętości zawiesiny z wymoczkami dodawałem taką samą objętość barwika o dwukrotnie większym niż podane stężeniu.

Rurki z wymoczkami w roztworach barwika były trzymane podczas doświadczeń w miejscach zaciemnionych, ponieważ światło znacznie wpływa na własności barwików.

Stężenia barwików znoszone przez Paramecium.

W moich doświadczeniach, wykonanych z barwikami kwaśnymi: błękitem metylowym, błękitem trypanowym, fuksyną i lichtgrünem wymoczkki przeżywały w stosunkowo wysokich stężeniach bez żadnej dla siebie szkody i jedynie lichtgrün okazał się nieco bardziej toksyczny. Stężenie zabijające wymoczkki po 20 do 60 godzinach wynosi 0.5% w przypadku błękitu metylowego i trypanowego, 0.2% w przypadkach lichtgrün. W fuksynie natomiast wymoczkki przeżywały nawet w 1% roztworze.

Wyniki te nie zupełnie zgadzają się z danymi Strelnikova ('24, '29) i Neuschlos'a ('20), co z pewnością zależy od różnic w składzie chemicznym i zanieczyszczeń barwików różnego pochodzenia.

Większą zgodność naogół notuje się dla bardziej toksycznych barwików zasadowych. Z trzech stosowanych przeze mnie barwików zasadowych: błękitu metylenowego, czerwieni obojętnej i błękitu nilowego — pierwszy jest stosunkowo mniej toksyczny i był znoszony w roztworach 0.05%, drugi w roztworach 0.005%, ostatni był trujący nawet w śladach i dawał zawsze bardzo intensywne i piękne zielono-niebieskie zabarwienie najrozmaitszego typu ziarnistości protoplazmatycznych.

Zachowanie się wymoczków w niezabójczych roztworach barwików kwaśnych.

Wymoczkki w 1/5% roztworach barwików kwaśnych w ciągu krótkiego czasu wypełniają się barwnymi wodniczками pokarmowymi. Protoplazma, ani żadne ziarnistości nie ulegają przy tym nigdy wybarwieniu. Intensywność zabarwienia wymoczków jest zależna od stężenia barwika. Barwa wodniczków barwnych jest zawsze i to wielokrotnie intensywniejsza od barwy środowiska, ale w żadnym przypadku, jak wynika z pomiarów intensywności metodą stosowaną przez Strelnikova (porówna-

nie zabarwienia wodniczków z barwą odpowiednio stężonych barwików w rurkach szklanych umieszczonych obok wymoczków), dającą conajmniej 30% błędu, zabarwienie wodniczków nie przekracza od 100 do 1000 razy intensywności zabarwienia otoczenia. Z intensywnością 10 czy też 25 tysięcy razy większą, jak podaje Strelnikov, w żadnym przypadku nie miałem do czynienia.

Obserwacja pojedynczych wymoczków w roztworze barwika wskazała, że wymoczki połykają barwik. Zabarwienie tworzące się wodniczka pokarmowego z barwikiem nigdy nie jest intensywniejsze od otoczenia. Raczej wydaje się bardziej blade od tła otoczenia, co jest oczywiście wynikiem małych rozmiarów powstającego wodniczka, przysłonięcia go protoplazmą, oraz pewnego rozrzedzenia barwika fermentami trawiącymi, które w chwili powstawania wodniczka napływają już do niego z otaczającej go protoplazmy. Dopiero po oderwaniu się od peristomu i przesunięciu się ku tyłowi barwa wodniczka staje się intensywniejsza.

Nie zachodzi więc kondensacja barwika (Strelnikov '24, '29), lecz obserwuje się zmianę barwy, wskutek odbywających się w wodniczku procesów chemicznych. Zwyczajne zakwaszenie, względnie zalkalizowanie środowiska wodniczka, tak typowe dla procesów trawiennych, może decydować o blednięciu lub intensyfikacji barwika.

Analogiczne zmiany intensywności barwika obserwuje się *in vitro* przy zadaniu roztworu błękitu metylowego kwasem względnie ługiem.

Nieznaczne zakwaszenie środowiska decyduje o większym wzmoczeniu zabarwienia w wodniczkach, co zgadza się ogólnie z teorią Bethel-Rohde'go ('17), a jednocześnie pozwala się tłumaczyć równoległym wzrostem intensywności zakwaszenia w wodniczkach w środowiskach kwaśnych (Chejfec '33).

W środowiskach o pH 5.6 — 5.1 zgodnie z obserwacjami Rohde ('17) następowało także wybarwienie się protoplazmy barwikami kwaśnymi. Ale biorąc pod uwagę stan wymoczków w wymienionych pH, należy zgodzić się z poglądami Rummantzewa i Kedrowskiego ('27), Ludforda

i S e k i M a s a i ('33) oraz S e m e n o v a ('34), że mamy tu nie barwienie przyżyciowe, lecz premortalne.

W stężeniach barwików kwaśnych, nie przekraczających wymienionych poprzednio koncentracji, wymoczki zachowują się zupełnie normalnie. Tak charakterystyczne procesy życiowe, jak szybkość tętna wodniczków wydalniczych, liczba pobranych w jednostce czasu wodniczków pokarmowych, prędkość ruchu, charakter ruchu w małych kroplach, podzielność i t. p. nie ulegają żadnym zaburzeniom. Jedynie w niższych koncentracjach barwików, 0,01 do 0,001%, obserwujemy wzmożony geotropizm ujemny oraz nieco wzmożoną podzielność pojedynczych wymoczków na szkiełkach wydrążonych. Ten ostatni wynik jest zgodny z danymi R o b e r t s ' a ('29).

Wymoczki, pozostawione w wymienionych barwikach przez czas dłuższy, po 60 do 100 godzinach, w zależności od stężenia barwika, nie wykazują więcej barwnych wodniczków. Stare zostają wydalone, względnie odbarwiają się, nowopowstające, mimo pozostawienia wymoczków w barwiku, są bezbarwne. Wymoczki zachowują się więc tak, jak to opisuje S t r e l n i k o v ('24, '29). Rzeczywiście sprawiają wrażenie, jakby nauczyły się odrzucać barwik i nie pobierały go więcej, lub jakgdyby barwik stracił zdolność przenikania do wodniczków. Jeśli jednak dodać do środowiska bardziej stężonego barwika, lub do takiego wymoczki przenieść, wówczas na nowo tworzą się barwne wodniczki, aby po pewnym czasie odbarwić się znowu, ale ponownie zabarwić się po dodaniu wyższej koncentracji barwika.

Wymoczki, które po dłuższym przebywaniu w barwiku nie zawierają więcej barwnych wodniczków, przeniesione do takiej samej koncentracji molarnej innego barwika, bardzo szybko tworzą nowe wodniczki o barwie nowego barwika. Zatem ich przystosowanie się jest specyficzne.

O ile wymoczki, pozostawione w barwiku, przestające tworzyć barwne wodniczki, przemycie i po przemyciu przenieść do tego samego, względnie świeżo przygotowanego barwika o tej samej koncentracji, wodniczki barwne nie tworzą się nadal. Krótkie więc przemycanie nie „rozbraja” ochronnego mechanizmu wymoczka i świadczy pośrednio, że niepobieranie barwika nie stoi w związku z zmianami, jakie mogły zajść w roztwo-

rze wskutek przebywania w nim wymoczków, ale jest związane z jakimiś wewnętrznymi, uruchomionymi przez wymoczki mechanizmami.

Jeśli natomiast wymoczki po przemyciu pozostawimy w wodzie, którą zmienimy dwa lub trzy razy, to przekonamy się, że wymoczki takie, przeniesione do poprzedniego barwika, względnie świeżego o tej samej koncentracji, będą na nowo tworzyły wodniczki barwne. W poszczególnych doświadczeniach czas, po którego upływie powraca zdolność tworzenia barwnych wodniczków, wypadwał inny, nie udało mi się pod tym względem wykryć żadnej regularności. Wahał się od 2 do 20 godzin i więcej. O ile takie wymoczki podkarmić bakteriami i przemyc, wówczas przeniesione do barwika bardzo szybko tworzą one na nowo wodniczki barwne. Długość więc wymagalnego przemycania zależy od stopnia przegłodzenia wymoczków, który był różny w poszczególnych próbach, gdyż wymoczki różnie długo przebywały w roztworach barwika. W każdym razie przemycanie i przetrzymywanie wymoczków w czystej wodzie „rozbraja” je niejako, przywracając im zdolność tworzenia zabarwionych wodniczków.

Zachowanie się wymoczków w niezabójczych roztworach barwików zasadowych.

Barwiki zasadowe mogą być stosowane w rozcieńczeniach, wynoszących tylko setne i tysięczne części procentu.

W roztworach tych barwików obserwujemy nie tylko tworzenie się barwnych wodniczków pokarmowych, ale wybarwienie plazmy.

Obserwacje moje w pierwszej mierze dotyczą przenikania barwika do protoplazmy i wodniczków.

Pierwotniaki, umieszczone w 0.005% roztworach barwików zasadowych, tworzą przede wszystkim barwne wodniczki, dopiero po 20 do 60 minutach występuje zabarwienie protoplazmy. Liczba znajdujących w każdej obserwacji wodniczków jest stosunkowo niewielka, nigdy nie przekracza 18 dla czerwieni obojętnej przed zabarwieniem się protoplazmy, lub nawet 9 w błękitie metylenowym. Następnie w miarę wybarwiania się protoplazmy liczba barwnych wodniczków maleje w niej, aby

mniej więcej po 12 godzinach od początku doświadczenia ustabilizować się wynosząc od 0 do 4. Jednocześnie wybarwienie protoplazmy w ciągu całego doświadczenia jest intensywniejsze ku tyłowi, a w błękitie metylenowym charakteryzuje się nawet oczywistym nagromadzeniem barwika w kaudalnym końcu wymoczków. Mniej więcej po 100 do 120 godzinach od początku doświadczenia, o ile wymoczki przeżywają w barwiku, zaczyna się odbarwienie protoplazmy, postępujące także od przodu. Odbarwienie protoplazmy wyprzedza zawsze brak barwnych w niej wodniczków. Barwny aspekt plazmy powstaje wskutek wybarwienia w niej ziarnistości niewątpliwie dwóch typów (Słoniński i Zweibaum '22), t. j. silniej i słabiej przełamujących światło. Nie udało mi się nigdy, mimo najdokładniejszej obserwacji, stwierdzić, aby wybarwienie protoplazmy było niezależne od ziarnistości, czyli dyfuzyjne, co jest zgodne z obserwacjami Rumjana i Kędrowskiego ('27). Zabarwienie równomierne — dyfuzyjne charakteryzuje raczej zjawiska premortalne.

W roztworach barwików zasadowych, zgodnie z obserwacjami Strelnikova ('24, '29) widzimy wzmoczenie intensywności zabarwienia wodniczków i ziarnistości w protoplazmie, jednak w znacznie mniejszym stopniu, niż to opisuje Strelnikova.

Jeśli chodzi o wodniczki, to wzmoczona intensywność zabarwienia jest tu nawet mniejsza, niż wzmoczenie intensywności w barwikach kwaśnych. I w tym również przypadku powstający wodniczek nie jest intensywniejszy od otoczenia, jego intensyfikacja naogół jest zjawiskiem późniejszym, wyraźnie zależnym nie od kondensacji lecz od zmian chemicznych, zachodzących wewnątrz wodniczka.

W pracy mojej poświęciłem wiele uwagi sprawie przenikania barwika zasadowego do protoplazmy, obserwując w tym celu przede wszystkim pojedyncze osobniki w roztworach barwika.

Obserwacje prowadziłem w kroplach wiszących w środowisku czerwieni obojętnej. Nowotworzące się wodniczki odznaczają się nieznacznym zbijaniem się barwika w grudki przez fermenty wodniczkowe (Nirenstein '20), dlatego też za-

wartość wodniczka wydaje się niejednolita i nierównomiernie w wodniczku rozmieszczona. W chwili oderwania się wodniczka od peristomu obserwujemy wlokącą się za nim smugę barwika, która zostaje w protoplazmie, a w miarę nagromadzenia się tą drogą przenikającego do protoplazmy barwika tylna część wymoczka zabarwia się coraz bardziej. Niewątpliwie więc w chwili tworzenia się wodniczka pewna ilość barwika przenika do ciała pierwotniaka przez dno peristomu. W miarę dalszych obserwacji stwierdzamy, że barwik może przenikać także przez dolną tylną ściankę peristomu, gdyż w tym miejscu protoplazma zabarwia się coraz intensywniej. Nie ma natomiast żadnych wskazówek, by barwik mógł przenikać do protoplazmy w jakimś innym miejscu przez pellikulę.

Po fazie intensyfikacji zabarwienia, następuje stopniowe odbarwienie się wodniczka, jakby barwik przenikał z wodniczków do protoplazmy. Że tak jest istotnie, na to wskazuje nie tylko wybarwienie się protoplazmy w otoczeniu wodniczków, ale fakt, że mimo stałego tempa tworzenia się nowych wodniczków i coraz intensywniejszego wybarwienia się protoplazmy liczba wodniczków barwnych jest daleko niższa, niż w środowisku barwików kwaśnych, a jednocześnie utrzymuje się na pewnym poziomie. Ponadto odbarwienie się protoplazmy poprzedza zawsze stan wymoczków, w których barwnych wodniczków nie obserwujemy.

Aby się ostatecznie przekonać czy barwik w protoplazmie jest przede wszystkim pochodzenia wodniczkowego, wykonałem doświadczenie, którego celem było dłuższe zatrzymanie barwika w wodniczkach.

W tym celu wystarczy do barwika dodać w nadmiarze jakiejś zawiesiny pokarmowej — w moim doświadczeniu rolę tę spełniały drożdże. Obserwujemy wówczas stale wzrastającą liczbę barwnych, wypełnionych drożdżami wodniczków, ale minimalny lub zupełny brak barwika w protoplazmie. Wzmoczone procesy redukcji i oksydacji, związane z trawieniem drożdży, oraz absorbowanie barwika przez trawioną w wodniczku masę drożdży uniemożliwiają mu przenikanie do protoplazmy, która barwi się conajwyżej nieznacznie barwikiem przenikającym przez peristom.

Wyniki te wskazywałyby przede wszystkim na fagocytarną drogę przenikania barwików zasadowych do protoplazmy *Paramecium caudatum*, co jest w zgodzie z badaniami S e m i o n o v a i M a s ł o w o j ('35).

Zgodnie z danymi S t r e l n i k o v a ('24, '29), o ile wymoczki przeżywają przez czas dłuższy w barwiku zasadowym, możemy po ich odbarwieniu wywołać powtórne zabarwienie, jeśli podniesiemy stężenie barwika. Pasaże tego typu, podobnie jak w barwikach kwaśnych, można powtarzać kilkakrotnie, dzięki czemu wymoczki przystosowują się do roztworów o coraz wyższej koncentracji toksycznego barwika.

Dotyczy to przede wszystkim błękitu metylenowego i czerwieni obojętnej, natomiast błękit nilowy jest zbyt toksyczny i wszelkie próby przystosowania wymoczków do wyższych stężeń tego barwika kończą się ich śmiercią.

Zachowanie się wymoczków w mieszaninie barwików.

Wymoczki umieszczone w mieszaninie barwików kwaśnych o podobnej wielkości cząsteczek i tej samej koncentracji tworzą początkowo wodniczki pokarmowe o zabarwieniu mieszaniny. W miarę jednak trwania doświadczenia występuje jakby oddzielenie jednego z barwików co, jak powiem dalej, stoi w związku z niejednoczesnością redukcji jednego z komponentów mieszaniny i wskazuje na fakt, że w stosunku do każdego barwika w mieszaninie wymoczki zachowują się tak, jakby był podawany oddzielnie.

Szczególnie efektowne wyniki uzyskujemy w doświadczeniach, gdy umieszczamy wymoczki w mieszaninie kontrastowo zabarwiających barwików, jak np. błękit metylowy i fuksyna. Mimo raczej czerwonego tonu mieszaniny, nowotworzące się wodniczki są początkowo zabarwione na niebiesko granatowo, co może być związane z łatwiejszym połykaniem grubszcząsteczkowego błękitu metylowego. Po 20 godzinach jednak obok granatowych wodniczków błękitu metylowego, widzimy już liczne wodniczki o zabarwieniu mieszaniny, a po 30 do 40 godzinach, po wyraźnej redukcji błękitu metylowego, w poszczególnych wodniczkach prześwieca różowe tło fuksyny. Jeszcze póź-

niej przybywa zabarwionych fuksyną wodniczkwów, podczas gdy liczba mieszanych maleje. Wskutek szybszej redukcji błękitu metylowego, po 40—45 godzinach coraz więcej wymoczków zawiera tylko wybarwione fuksyną wodniczki.

Zupełnie analogiczne wyniki otrzymujemy w innych kombinacjach mieszanin j. np. błękit metylowy-lichtgrün, błękit trypanowy-lichtgrün, lichtgrün-fuksyna i t. d. Zawsze pierwotnie tworzące się wodniczki są barwy grubocząsteczkowego barwika, kolejno występują wodniczki o zabarwieniu mieszaniny, wreszcie mamy przewagę wodniczków zabarwionych barwikiem trudniej ulegającym redukcji.

O ile wymoczki w jakimś barwiku, które nie zawierają już zabarwionych wodniczków, przeniesie po szybkim przemyciu do mieszaniny, zawierającej barwik pierwszy z jakimś nowym, wówczas nowotworzące się wodniczki, po krótkotrwałej fazie barwy mieszaniny, przybierają barwę nowego barwika. Mechanizm ochronny w stosunku do pierwszego barwika trwa nadal, redukcja jego jest bardzo szybka, dominuje więc barwa nowego barwika.

Wszystkie opisane zjawiska występują szczególnie wyraźnie, gdy podawanie barwików łączymy z podawaniem obfitej zawiesiny bakteryjnej, a zwłaszcza drożdżowej.

Gdy umieszczamy wymoczki w mieszaninach barwików zasadowych, spotykamy się ze zjawiskiem wzajemnego wypierania się barwików. Ponieważ barwiki te są niejednakowo toksyczne, a w mieszaninie toksyczność ich wzrasta, jeśli je nawet przed zmieszaniem rozcieńczamy, szczególnie gdy jednym z komponentów jest błękit nilowy, stosowany również w moich doświadczeniach, dobrać więc należy mieszaniny empirycznie. Gdy umieszczamy wymoczki w mieszaninie błękitu metylenowego 0.05% na objętość i czerwieni obojętnej 0.005% na objętość, stwierdzamy, że nowotworzące się wodniczki, mimo wyraźnie przez błękit metylenowy zabarwionego środowiska, są zabarwione czerwienią obojętną z jednoczesnym obfitym występowaniem zabarwionej ziarnistości w protoplazmie. Dopiero po 20 do 25 godzinach obok wodniczków zabarwionych czerwienią obojętną widzimy wodniczki o barwie mieszanej, wreszcie występują wodniczki o barwie błękitu metylenowego. Barwik ten jed-

nak nie przenika do jakgdyby zablokowanych przez czerwień obojętną ziarnistości, których barwa, aż do rozpoczynającego się od przodu odbarwienia nie ulega zmianie. W takiej mieszaninie nie można oprzeć się wrażeniu, że szybciej przenikająca protoplazmę czerwień obojętna wypycha lub uniemożliwia błękitowi metylenowemu reagowanie z substancjami protoplazmatycznymi, z którymi reaguje uprzednio czerwień obojętna. Jednocześnie fakt ten w sposób pośredni wskazuje, że zabarwieniu ulegają przede wszystkim istniejące uprzednio inkluzje komórkowe — tworzące barwne ziarnistości.

O ile wymoczki najpierw umieścimy w błękitcie metylenowym, a następnie do tego roztworu dodamy czerwień obojętną, wówczas zajdzie nieco inne zjawisko, dosyć trudne do wyjaśnienia, polegające niejako na wypieraniu błękitu metylenowego przez czerwień obojętną. Następuje mianowicie początkowa faza zupełnego odbarwienia się wymoczków, po czym dopiero zaczyna się wybarwienie ich czerwiecią obojętną. Przez odpowiedni dobór koncentracji i czasu barwienia można w ten sposób uzyskać wiele barwnych efektów, umożliwiających wydatnienie pewnych struktur, względnie działanie organellów wymoczków.

Szczególne efekty uzyskujemy, gdy wymoczki umieszczamy w mieszaninie barwików zasadowych i kwaśnych. Przy stosowaniu tych mieszanin, dodatnio naładowane cząsteczki barwika zasadowego są częściowo lub całkowicie neutralizowane przez ujemnie naładowane cząsteczki barwika kwaśnego. Dzięki temu można wprowadzać takie stężenia barwików zasadowych, których w nieobecności barwików kwaśnych wymoczki nie znoszą zupełnie. Szczególnie duże ilości bardzo toksycznej czerwień obojętnej mogą być wprowadzone do wymoczków w mieszaninie z błękitem trypanowym. W takiej mieszaninie obserwujemy tworzenie się pierwotne wybitnie zabarwionych błękitem trypanowym wodniczków, które później stają się coraz bardziej różowe. Po pewnym czasie widzimy w protoplazmie pierwotniaków, obok wodniczków o barwie mieszanej i barwie błękitu trypanowego, zabarwione czystą czerwiecią obojętną wodniczki wraz z intensywnym zabarwieniem czerwiecią obojętną ziarnistości w protoplazmie.

Analogiczne, chociaż z wielu względów ciekawsze wyniki otrzymujemy w innej kombinacji barwików: błękit metylowy i czerwień obojętna. W tej kombinacji wymoczki znoszą doskonale 0.05% czerwieni obojętnej. Barwa mieszaniny mimo to pozostaje barwą błękitu metylowego i gdyby nie występowanie barwiącej się czerwieni obojętnej ziarnistości w protoplazmie, trudno by podejrzewać, że w mieszaninie znajduje się czerwień obojętna. Objawia się czerwień obojętna dopiero po 20—24 godzinach, gdy obserwujemy w wymoczkach obecność wodniczków o barwie mieszanej, a jednocześnie wzrastanie liczby wodniczków zabarwionych tylko czerwienią obojętną. Wodniczki te powstają jako wynik redukcji błękitu metylowego. Jednocześnie jednak na obu biegunach wymoczków zjawiają się obfite perły ekskrecyjne w postaci błyszczących kropelek barwy czerwieni obojętnej, rozmieszczone w układzie linii srebrzących się. Liczba wodniczków czerwieni obojętnej maleje i następuje wyraźne odbarwienie się wymoczków. Widzimy, że wprowadzony w kombinacji z błękitem metylowym nadmiar czerwieni obojętnej zostaje usuwany w postaci pereł ekskrecyjnych.

Przebieg opisanych zjawisk odmieni się, gdy do wskazanej mieszaniny dodamy obfitej zawiesiny drożdży. Mimo błękitnej barwy mieszaniny, nowotworzące się wodniczki, zawierające drożdże, są barwy czerwieni obojętnej, dopiero po 20—25 godzinach występują pierwsze wodniczki mieszane i zabarwione błękitem metylowym.

W tej kombinacji protoplazma pozostaje bezbarwna, co jest jeszcze jednym dowodem, że barwik zasadowy dostaje się do niej przede wszystkim z wodniczków. W tym przypadku zachodzą procesy analogiczne do opisanych na str. 137 i pod tym względem w mieszaninie nic się nie zmienia.

Wskutek zachowania się wymoczków w mieszaninie tak, jakby znajdowały się oddzielnie w każdym ze składników mieszaniny, dzięki nierównoczesności procesów redukcji i oksydacji, które odgrywają ogromną rolę w ujawnianiu jednych i znikaniu drugich barwików, uzyskujemy opisane efekty. Są one w poszczególnych przypadkach tak jaskrawe, że możnaby używać wymoczków jako indykatorów, umożliwiających różnicowanie obecnych w mieszaninie barwików.

Uzdolnienia redukcyjne i oksydacyjne wymoczków.

Już piękna praca E h r l i c h a ('86—87) obszernie omawia sprawy redukcji i oksydacji błękitu metylenowego w związku z barwieniem nerwów. Następnie w pracach P r o w a z k a ('98, '99, '01) znajdujemy wzmianki o możliwości redukowania barwika i przeprowadzania go przez wymoczki w leukozwiązki, co dopiero podejmuje w swej pracy B e c k e r ('26) wskazując na rolę redukaz, które udało się ujawnić nie tylko w tkankach wyższych zwierząt słodkowodnych oraz tkankach roślinnych, ale również w ciele niektórych wymoczków. W latach wreszcie ostatnich na te sprawy uwagę zwraca S e m e n o v ('34) i G e r s c h ('37) w związku z zagadnieniem barwienia przyżyciowego w środowiskach zakwaszonych oraz odtlenionych.

Istotnie przechodzenie barwików w leukozwiązki, względnie tych w oksyziwiązki tłumaczy wiele ważnych spraw, związanych z zachowaniem się wymoczków w barwikach, rzucając jednocześnie światło na chemizmy wewnątrzkomórkowe oraz zjawiska odpornościowe.

Według S t r e l n i k o v a, po fazie czynnego zagęszczania barwika przez przeżywające w nim wymoczki, następuje nowa faza, w której wymoczki aktywują pewne niezbadane przez niego bliżej mechanizmy, uniemożliwiające dalsze przenikanie barwika do ciała, względnie do wodniczków, prowadząc do uodpornienia na barwik. S t r e l n i k o v w ostatnim zdaniu swej rozprawy wyraża przypuszczenie, niczym zresztą nie uzasadnione, że odbarwienie wymoczków może być związane z powstawaniem leukobaz. Sprawie tej poświęciłem specjalne doświadczenia.

Przed wszystkim wykonałem kilka prób z zawiesinami pokarmowymi, które musiały spełniać kilka zadań. Zawiesina taka musiała się więc składać z dużych cząsteczek, być bezbarwna, nie barwić się stosowanymi barwikami przyżyciowymi w oznaczonych na wstępie koncentracjach, a co najważniejsze musiała być chętnie i w dowolnych ilościach pobierana przez pierwotniaki. Warunki te, jak się okazało po szeregu doświadczeń, dobrze spełniają drożdże i skrobia.

Gdy wymoczkom, które przebywały przez czas dłuższy w środowisku barwika i nie tworzyły już barwnych wodniczków,

podawałem gęstą zawiesinę skrobi lub drożdży, mogłem obserwować początkowe tworzenie się bezbarwnych, wypełnionych podawanymi zawiesinami wodniczzków pokarmowych, które jednak po pewnym czasie zaczynały się coraz intensywniej wybarwiać. Barwa ich staje się wówczas o wiele intensywniejsza od zabarwienia środowiska, a ponieważ w tej fazie aktywujący się w wodniczku barwik zaczyna barwić nie barwiącą się uprzednio zawiesinę, to nowe intensywne zabarwienie trwa aż do wydalenia wodniczka. Jeśli zawiesina pokarmowa nie będzie zbyt gęsta, uda się z całą dokładnością zaobserwować, jak w pozornie nie zawierającym barwika wodniczku barwik się aktywuje—po prostu z bezbarwnego leukozwiązku w trakcie trawienia drożdży pod wpływem procesów oksydacyjnych powstaje barwny oksyzwiązek.

Powtarza się to we wszystkich nowotworzących się wodniczkach. O ile więc w barwnym środowisku nie zabraknie zawiesiny pokarmowej, będą wymoczki przez czas dowolnie długi zawierać intensywnie zabarwione wodniczki, a opisywanego przez *S t r e l n i k o v a* odbarwienia nie będzie.

Naprawdopodobniej fermenty trawienne dostarczają w dostatecznej ilości czynników zdolnych do oksydacji barwika, uniemożliwiając zarazem powtórne przejście barwika w leukozwiązek. Nie ma więc mowy o jakimś niepobieraniu barwika przez wymoczki przystosowane do niego. W nowotworzącym się wodniczku takich przystosowanych wymoczków zachodzi redukcja barwika, dająca w wyniku jego postać niewidoczną. Jeśli jednak wraz z barwikiem dostaje się do wodniczka obfita zawiesina pokarmowa, procesy redukcyjne ustępuje oksydacyjnym i barwik obecny w wodniczku w postaci optycznie niewidzialnej aktywuje się w postaci oksyzwiązku.

Aby się przekonać, czy drożdże nie pochłaniają barwika i czy nie ujawniają go właśnie w wodniczku podczas zachodzących w nim procesów trawienia, zostało wykonane doświadczenie kontrolne. Drożdże w tym doświadczeniu przed podaniem ich wymoczkom zostały umieszczone na 24 godziny w barwiku, aby się mogły ewentualnie nim wysycić, następnie były przemywane w wodzie i podawane wymoczkom w wodzie.

Przed podaniem ich wymoczkom wykonano kilka prób na obecność barwika w drożdżach (alkalizacja i zakwaszenie).

Wymoczki, nakarmione tak przygotowaną zawiesiną drożdżową, tworzą dużą liczbę wodniczków pokarmowych wypełnionych drożdżami, ale mimo prawidłowego przebiegu procesów trawiennych, wodniczki nie ulegają zabarwieniu. Drożdże więc nie zawierają barwika w żadnej postaci, zabarwienie występujące w poprzednich doświadczeniach było wynikiem oksydacji istniejącego w wodniczkach leukozwiązku.

Wystarczyło jednak do środowiska drożdży i wymoczków dodać odrobinę barwika, aby wkrótce nowotworzące się wodniczki drożdżowe charakteryzowała intensywna barwa.

W wyniku więc udało się stwierdzić, że po dłuższym przebywaniu wymoczków w barwiku, nie przestają go one bynajmniej pobierać, ale w nowotworzących się wodniczkach od razu następuje redukcja barwika, a w postaci bezbarwnego związku nie sposób na drodze optycznej go ujawnić (udaje się to zrobić, jeśli wymoczki wydobyć z barwika, przemyć i zabić kwasem solnym, wówczas, szczególnie gdy przebywały w błękitnie metylowym, można ujawnić występowanie błękitnego zabarwienia w bezbarwnych uprzednio wodniczkach). Zawisko to nie zachodzi, jeśli pobudzimy wymoczki do oksydacji barwika na tej czy innej drodze.

Kontrolne doświadczenie wskazuje, że zdolność do odbarwienia występuje tym szybciej, im bardziej wymoczki są przegłodzone. Być może w tym właśnie stanie wzmagają się procesy redukcyjne, pobudzane przez mniej czy więcej toksyczne właściwości barwika. Na rolę pobudzającą barwika musimy zwrócić uwagę, chociażby dlatego, że dłuższe przemywanie usuwa ten czynnik i wymoczki ponownie przeniesione do barwika przez jakiś czas tworzą wodniczki barwne. Jednakże dzieje się to krócej i intensywność zabarwienia jest mniejsza, niż w początkowych fazach doświadczenia.

Gdy zamiast przemywania wzmagamy koncentrację barwika, tworzą się ponownie barwne wodniczki, ponieważ mechanizm uprzednio uruchomionej redukcji nie wystarcza do zredukowania dodanego barwika, który pobudza z kolei do wzmożo-

nej produkcji czynnika redukcyjnego. Jak mówi B e c k e r, ('26) wzmacnia się przy tym działanie redukaz.

Że wreszcie całe zjawisko daje się wyjaśnić na opisanej drodze, świadczą jeszcze wyniki doświadczeń, dotyczących zachowania się wymoczków w mieszaninach. Gdyby wymoczki tworzyły jakieś osłonki czy też rodzaj koloidów ochronnych, jak podaje B r e s s l a u ('24), to nie byłyby możliwe opisane zjawiska w mieszaninach; gdy po uprzedniej redukcji jednego z barwików obserwujemy wodniczki o barwie drugiego. Trudno jest bowiem pomyśleć o takiej substancji ochronnej, czy koloidalnej ochronnym, który w mieszaninie byłby specyficzny tylko dla jednego z barwików. Łatwo natomiast przypuścić, że ilość czynnika redukującego może być z początku wystarczająca do redukcji jednego barwika, a w miarę trwania bodźca podrażniającego wzmacnia się o tyle, że może zredukować także barwik drugi.

Że w grę tu wchodzi przede wszystkim takie czynniki jak redukcja i oksydacja, wskazują wreszcie przeprowadzone doświadczenia, w których najprostsze czysto mechaniczne utlenienie środowiska przez systematyczne wietrzenie opóźnia odbarwienie się wodniczków i tworzenie leukobaz. W doświadczeniach tych wymoczki umieszczane w błękitie metylowym rozdzielalem na cztery porcje. Wymoczki I porcji były umieszczone w rurce, połączonej z aparatem przewietrzającym w postaci mieszka, wdmuchującego do roztworu powietrze w jednakowych odstępach czasu. W II porcji wymoczki były umieszczone w takiej samej rurce nie wietrzonej. W III — wymoczki zostały umieszczone na płaskim szkiełku zegarkowym w tej samej objętości 10 cm³. W IV — wymoczki zostały umieszczone w małych płaskich kroplach pojedynczo.

Okazało się, że najintensywniejsze zabarwienie wodniczków i to zabarwienie nie ustępujące w ciągu 15 dni trwania doświadczenia, charakteryzowało wymoczki pojedyncze w małych kroplach. W naczyniu porcji I bezbarwność wystąpiła o 40 godzin później, niż w naczyniu II, w porcji III odbarwienie wystąpiło nierównomiernie, wymoczki zachowały się w poszczególnych próbach rozmaicie, gdy jedno odbarwiać się zaczynały już o 20

godzin później, niż w porcji II, to pozostałe odbarwiły się dopiero o 60 godzin później, niż w porcji II.

Jednocześnie doświadczenie to wysunęło nowe zupełnie zagadnienie, typowe zresztą dla badań nad wymoczkami. Niezdolność do tworzenia leukobaz, względnie wzmoczona oksydacja u pojedynczych wymoczków w porównaniu z hodowlami masowymi jest tak wielka, że nakazuje szukać jakichś przyczyn dodatkowych tego zjawiska. Rozwiązanie ich może leżeć w tej samej płaszczyźnie, w której należy poszukiwać wyjaśnienia, dlaczego wymoczki pojedyncze wobec badanych substancji toksycznych zachowują się zupełnie inaczej, niż w masie. We wszystkich próbach i doświadczeniach pomocniczych, które przeprowadzałem w trakcie mych badań z pojedynczymi wymoczkami, stwierdziłem, że np. koncentracje stosowanych barwików, toksyczne dla jednostki, nie były bynajmniej toksyczne dla masy. Wyjaśnienie tych różnic wymaga specjalnych badań.

Streszczenie wyników.

1°. Wymoczki w kulturach masowych znoszą: 1/5% roztwory lichtgrün, 1/3% roztw. błękitu metyloвого i błękitu trypanowego, 1% roztw. fuksyny, 0.005% roztw. czerwieni obojętnej, 0.05% roztw. błękitu metylenowego i 0.0005% roztwory błękitu nilowego.

2°. W barwikach kwaśnych barwią się tylko wodniczki. Zabarwienie protoplazmy, jąder, ziarnistości jest w barwikach kwaśnych wynikiem barwienia premortalnego.

3°. W barwikach zasadowych wymoczki także tworzą barwne wodniczki. Barwa protoplazmy nie jest dyfuzyna, barwią się w niej przede wszystkim przedistniejące ziarnistości.

4°. Barwiki zasadowe przenikają do protoplazmy w chwili odrywania się wodniczków od peristomu, przez tylną dolną ściankę peristomu, a przede wszystkim z wodniczków pokarmowych. Przenikanie barwika przez pellikulę w żadnym przypadku nie udało się zaobserwować.

5°. Zmiana barw, ich intensyfikacja w wodniczkach i ciele wymoczków nie jest wynikiem kondensacji barwika, ale jest rezultatem zmian chemicznych, zachodzących w barwikach.

6°. W wymienionych stężeniach barwików wymoczki zachowują się zupełnie normalnie. W bardzo rozcieńczonych bar-

wikach obserwuje się wzmożoną podzielność i wzmożony geotropizm ujemny.

7°. Wymoczki przeżywające w roztworach barwików po 60—100 godzinach są odbarwione. Podniesienie koncentracji barwika decyduje o ponownym wybarwieniu się. Wybarwienie ponowne występuje także o ile wymoczki przenieść do takiej samej koncentracji innego barwika.

8°. Wymoczki odbarwione, przeniesione do tego samego barwika, po krótkim przemywaniu nie barwią się ponownie, ale zabarwią się, jeśli przemywanie trwało od 2—10 godzin.

9°. Wymoczki w mieszaninie barwików zachowują się tak, jakby znajdowały się w jednym ze składników mieszaniny. W biegu doświadczenia składniki mieszaniny różnicują się w ciele wymoczków.

10°. W mieszaninie z barwikami kwaśnymi, wysoce toksyczne barwiki zasadowe mogą być podawane w nadmiarze, gdyż następuje ich neutralizacja. Nadmiar barwika zasadowego może być wydalany z ciała wymoczków w postaci pereł ekskrecyjnych (czerwieni obojętnej).

11°. Odbarwianie się wymoczków po dłuższym przebywaniu w barwikach nie jest wynikiem niepobierania tych barwików, jak sądzi S t r e l n i k o v, ani też nie jest rezultatem ochronnego oddziaływania substancji ochronnych, jak sądzi B r e s s l a u, jest jest wynikiem redukcji barwików przez wymoczki, które barwne oksydwiazki redukują na bezbarwne leukobazy — optycznie niewidoczne.

12°. W doświadczeniach z zastosowaniem karmienia drożdżami względnie skrobnią, mimo pozostawienia wymoczków w barwikach, można uniknąć powstawania leukobaz wskutek stale działających procesów oksydacyjnych, związanych z trawieniem tych substancyj pokarmowych.

13°. Zwycię utlenienie środowiska barwika odsuwa termin i intensywność odbarwienia się, a pojedynczym wymoczkom w małych kroplach uniemożliwia zupełnie odbarwienie się.

14°. Obserwacje zawarte w niniejszej pracy dotyczą kultur i zachowania się wymoczków w gęstej kulturze. Wymoczki pojedynczo zachowują się swoiście i zbadanie tych spraw winno się stać tematem odrębnej pracy.

Piśmiennictwo.

Zestawienie to zawiera tylko prace najważniejsze, oraz te, w których cytowana jest obszerna literatura zagadnienia.

- B a l l H. G. 1927. Studies on Paramecium. III. The effects of vital dyes on *Paramecium caudatum*. Biol. Bull. 52 (68). — B e c k e r E. R. 1926. Vital staining and reduction of vital stains by protozoa. Biol. Bull. 50 (235). — B e c k e r W. A. 1936. Vitale Cytoplasma- und Kernfärbungen. Protopl. 26 (439). — B r a n d t K. 1881. Färbung lebender einzelliger Organismen. Biol. Zentrbl. 1 (203). — B r e s s l a u E. 1924. Die Ausscheidung von Schutzstoffen bei einzelligen Lebewesen. Ber. d. Senckenberg. Naturf. Gesel. 54 (49). — C e r t e s M. A. 1881. Sur un procédé de coloration des Infusoires et des éléments anatomiques pendant la vie. Zool. Anz. 4 (208). — C e r t e s M. A. 1885. De l'emploi des matières colorantes dans l'étude physiologique et histologique des Infusoires vivants. Compt. R. d. Biol. 37 (197). — C h e j f e c M. 1933. Die Abhängigkeit der Dauer der sauren Reaktion in den Nahrungsvacuolen von *Paramecium caudatum* von dem pH des Aussenmediums. Acta Biol. Exper. 8 (186). — D o g i e l V. u. I s s a k o v a M. 1927. Der Einfluss der Salzlösungen auf die Ernährung von *Paramecium*. Biol. Zentrbl. 47 (577). — E h r l i c h P. 1886/7. Über die Methylblaureaktion der lebenden Nervensubstanz. Biol. Zentrbl. 6 (214). — G e l l h o r n E. 1931. Vital staining and permeability. Protopl. 12 (66). — G i c k l h o r n J. 1931. Zur Discussion einiger grundsätzlicher Fragen der Vitalfärbung. Biol. Zentrbl. 51 (469). — G u t t s t e i n M. 1932. Zur Theorie der Vitalfärbung. Z. exp. Med. 82 (479). — K o n o T a k e o. 1930. Untersuchungen zur Frage der Vitalfärbung und deren Beeinflussung durch Gifte. Protopl. 11 (118). — K e d r o w s k i B. 1932. Vitalfärbungsstudien an Infusorien. Z. Zellforsch. 15 (93). — L e b e r W. 1931. Über Spezifität und Genese des basischen Vitalgranulums. Z. Zellforsch. 14 (566). — L a u e r A. 1930. Über den Einfluss der Alkaloide auf die vitale Färbung mit basischen Farbstoffen. Pflüg. Arch. 224 (462). — L e v i n B. 1933. L'influence de quelques colorants vitaux sur la résistance de divers animaux. C. R. Soc. Biol. Paris. 114 (909). — L u d f o r d R. J. 1933. Vital staining in relation to cell physiology and pathology. Biol. Rev. Cambridge phil. Soc. 8 (357). — M e s n i l F. e t H. M o u t o n. 1903. Sur une diastase protéolytique extraite des infusoires ciliés. C. R. Sec. Biol. 55 (1016). — N a s s o n o v D. 1932. Vitalfärbung des Macronucleus aerober und anaerober Infusorien. Protopl. 17 (218). — N e u s c h l o s s S. M. 1920. Die Festigkeit der Protozoen gegen Farbstoffe. Pflüg. Arch. 178 (61). — N i r e n s t e i n E. 1920. Über das Wesen der Vitalfärbung. Pflüg. Arch. 179 (233). — P r o v a z e k S. 1898. Vitalfärbungen mit Neutralrot an Protozoen. Zeitschr. f. Wissensch. Zool. 63 (187). — P r o v a z e k S. 1899. Kleine Protozoenbeobachtungen. Zool. Anz. 22 (339). — P r o v a z e k S. 1901. Zelltätigkeit und Vitalfärbung. Zool. Anz. 24 (455). — P r z e s m y c k i M. 1894. Über die Zellkörnchen

bei den Protozoen. Biol. Zentrbl. 14 (624). — P r z e s m y c k i M. 1897. Über die intra-vitale Färbung des Kernes und des Protoplasmas. Biol. Zentrbl. 17 (321). — R o b e r t s R. 1929. Vitality stains. Science. 1929, II (556). — R o h d e K. 1917. Untersuchungen über den Einfluss der freien H-Jonen im Inneren der lebenden Zellen auf den Vorgang der vitalen Färbung. Pflüg. Arch. 168 (411). — R u m i a n t z e v A. u. K e d r o w s k y. 1927. Untersuchungen über Vitalfärbung einiger Protisten. Protopl. 1 (189). — S e k i M a s s a i. 1933. Zur Kenntniss der intra- und supravitalen Färbung. Z. Zellforsch. 19 (289). — S e m e n o v W. E. 1934. Die Bedeutung der Säurereizung der Zelle für die Vitalfärbung. Z. Zellforsch. 20 (778). — S e m e n o v W. E. u. M a s s l o v a. 1935. Vitale Infusorienfärbung durch Phagocytose von *B. prodigiosus*. Arch. f. Protistenk. 85 (224). — S ł o n i m s k i P. et Z w e i b a u m J. 1922. Sur quelques conditions de la coloration vitale des Infusoires. C. R. d. la Soc. Biol. 86 (71). — S t r e l n i k o v I. D. 1924. K woprosu o immunitietie u Infusorij. Bull. de l'Inst. Lesshaft. 10 (65). — S t r e l n i k o v I. D. 1929. L'adsorption des colorants basiques par *Paramecium caudatum*. C. R. Soc. d. Biol. 100 (1004).

[Pracownia Fizjologii Ogólnej Wolnej Wszechnicy Polskiej w Warszawie].
Praca N^o 12.

T. Vieweger i M. Szulzingerówna.

**Działanie surowicy zwierząt kręgowych na pierwotniaki
(*Paramecium caudatum*, *Colpidium colpoda*).**

*L'action de serum de différents vertébrés sur les infusoires
(Paramecium caudatum, Colpidium colpoda).*

Rękopis nadesłany w dniu 9.III.1937 r.

Les auteurs ont étudié l'action de serum des différents vertébrés sur les infusoires (*Paramecium*, *Colpidium*). Le serum des animaux suivants a été employé: carpe, brochet, loche, anguille, axoloti, crapaud, grenouille, orvet, tortue, canard, poule, homme, lapin, cobaye. Les auteurs ont déterminé le temps au bout duquel les infusoires périssent dans le sang non-dilué et les concentrations de serum (dilué avec de l'eau distillée) dans lesquelles les infusoires peuvent vivre plus que 24—48 heures.

Il résulte de ces recherches que l'échelle des concentrations toxiques du sang est très large pour les animaux appartenant aux différents groupes. P. ex. serum de la grenouille est toxique déjà dans les dilutions $\frac{1}{500}$ — $\frac{1}{1000}$, tandis que le serum du lapin n'est toxique qu'en solution $\frac{1}{5}$. Les différences dans la toxicité du serum sont moins prononcées pour les animaux appartenant à la même groupe des vertébrés. Le serum des amphibiens est le plus toxique. La toxicité du serum ne change pas sous l'influence des changements de la température dans les limites de 14° — 27°. Le serum chauffé pendant $\frac{1}{2}$ heure à 56° est en général moins toxique que le serum normal. Tout de même les différences dans la toxicité de serum des animaux appartenant aux différents groupes persistent dans ce cas dans une forte mesure. (P. ex. le serum chauffé de la grenouille est toxique en

dilution $\frac{1}{30}$, tandis que le serum chauffé du lapin n'est toxique qu'en solution $\frac{1}{4}$). L'addition du complément (le sang du cobaye) n'influe pas sur la toxicité du serum chauffé (de la grenouille). Les preuves d'adaptation des infusoires aux solutions plus concentrées de serum de la grenouille ont échoué. On peut remarquer enfin qu'il y a de faibles différences dans l'action du serum sur le *Colpidium* et *Paramecium*.

Zagadnienie wpływu surowicy zwierzęcej na pierwotniaki było kilkakrotnie podejmowane, jak dotychczas jednak w dość wąskim zakresie. Rössle ('05) wykazał, że surowica normalna królika działa ujemnie na *Paramecium* w stężeniu $1/10$ — $1/20$; surowica zwierząt uczulonych oddziaływała w stężeniach znacznie mniejszych, powodując aglutynację rzęsek, zmiany w funkcjonowaniu wodniczki tętniącej, pokarmowej itp.

Działanie specyficzne zanika przy ogrzewaniu do 56° . Levinson ('29) potwierdził wyniki Rösslego, wykazując jednocześnie, że ujemne działanie surowicy ssaków występuje w stężeniu $1/5$ po 20', $1/100$ po upływie 2 godzin itd. Czynniki oddziaływujące ujemnie jest termolabilny, jednakże nie posiada cech komplementu. Flaks i Ber ('33) stwierdzili przejściowe ujemne działanie (opadanie i aglomeracja) surowicy szczurów normalnych, rozcieńczonej w stosunku $1/40$, oraz zabójcze działanie surowicy w pewnych stanach patologicznych. Ogrzewanie surowicy w przeciagu $1/2$ godziny do 56° powoduje zanik własności toksycznych. Wysycanie surowicy czynnej wymoczkami wzgl. bakteriami żywymi lub zabitymi powoduje również zanik własności toksycznych. Wreszcie Oehler ('20) próbował hodować wymoczki na podłożu surowicy krowiej. Stwierdził, że w stężeniu $1/10$ *Colpidium* ginie po upływie krótkiego czasu, wykazując silną wakuolizację. Autor przypisuje to nadmiernemu rozwojowi bakteryj i zatruciu produktami przemiany materii. W rozcieńczeniu $1/100$ i $1/1000$ wymoczki mnożą się, nie wykazując wakuolizacji.

Jak widzimy, przytoczone wyżej badania dotyczyły wyłącznie działania surowicy zwierząt stałocieplnych i autorów (z wyjątkiem Oehlera) interesowała przytym głównie kwestia otrzymania surowicy specyficznej, wzgl. różnica w działaniu surowicy zwierząt normalnych i w stanach patologicznych. Zadaniem naszej pracy było natomiast wyjaśnienie, czy i w jakim stopniu występują różnice w działaniu surowicy różnych zwierząt kręgowych.

W badaniach naszych stosowaliśmy surowice następujących zwierząt: karp, piskorz, szczupak, węgorz, aksolotl, ropucha, żaba (*Rana esculenta*), wąż zaskroniec, żółw, kaczka, kura, człowiek, królik, świnka morska. Badaliśmy wpływ wymienionych surowic na *Paramecium* i *Colpidium*. Wymoczki, używane do doświadczeń, pochodziły z linii ciągłych, które hodowaliśmy w pracowni od dłuższego czasu. Przed rozpoczęciem serii doświadczeń oddzielaliśmy z hodowli jednego osobnika i pozostawialiśmy w klocku szklanym w 1 cm³ pożywki sianowej. Osobniki, pochodzące z podziału, przenosiliśmy do klocków, zawierających daną surowicę odpowiednio rozcieńczoną. Do doświadczeń używaliśmy zawsze surowicy krwi świeżo pobranej. Rozcieńczaliśmy surowicę wodą destylowaną, przegotowaną. Serie porównawcze doświadczeń wykonywaliśmy jednocześnie (w jednakowych warunkach temperatury i naświetlenia). Obserwowaliśmy: wpływ ogólny surowicy na pierwotniaki, czas, po upływie którego następuje śmierć wymoczków w surowicy nierozcieńczonej, szybkość mnożenia w surowicy rozcieńczonej, wpływ na wodniczkę tętniącą.

Pierwsza seria naszych doświadczeń obejmowała porównawczo działanie zabójcze surowic poszczególnych przedstawicieli różnych grup zwierząt kręgowych. Oznaczyliśmy czas, w ciągu którego wymoczki (*Paramecium*) giną w nierozcieńczonej surowicy. Czas ten wynosił (w minutach) dla surowicy:

karpia	żaby	kury	człowieka	królika	świnki morskiej
6—8	2—3	6—7	6—8	6—8	4—6

Z przytoczonego zestawienia wynika, że czas, po którego upływie następuje śmierć wymoczków w surowicy normalnej, nie wykazuje większych różnic dla poszczególnych zwierząt z wyjątkiem surowicy żaby, w którym to przypadku śmierć następuje znacznie szybciej. Ogólny charakter działania poszczególnych surowic jest jednakowy: zahamowanie działalności wodniczki tętniącej, zatarcie konturów wodniczek pokarmowych, aglutynacja rzęsek, zmętnienie protoplazmy.

W następnych seriach doświadczeń ustaliliśmy n a j w y ż s z e stężenia surowicy, w których wymoczki żyją w przeciągu 24 godz., względnie mnożą się (tab. I). Serie powyższe wykazały, że skala, w której granicach zawarte są stężenia śmiertelne surowic, jest bardzo szeroka. Najbardziej toksyczna okazała się surowica płazów: najwyższe stężenie, w jakim wymoczki żyły w przeciągu 24 godzin, wynosiło dla surowicy ropuchy $\frac{1}{1000}$, żaby $\frac{1}{500}$. Najmniej toksyczna jest surowica ssaków: w surowicy królika obserwowaliśmy podziały *Paramecium* w stężeniu $\frac{1}{5}$.

Tabela I.

Zestawienie najwyższych stężeń surowicy różnych zwierząt kręgowych, w których wymoczki żyły w przeciągu 24 wzgl. 48 godzin.
Les solutions le plus concentrées de serum de différents vertébrés dans lesquelles les infusoires peuvent vivre pendant 24 — 48 h.

	karp <i>carpe</i>	piskorz <i>loche</i>	szczupak <i>brochet</i>	węgorz <i>anguille</i>	axolotł	ropucha <i>crapaud</i>	żaba <i>grenouille</i>	zaskroniec <i>ornet</i>	żółw <i>tortue</i>	kaczka <i>canard</i>	kura <i>poule</i>	człowiek <i>homme</i>	królik <i>lapin</i>	świnia morska <i>cochaye</i>
<i>P a r a m e c i u m</i>														
Surowica normalna <i>Serum normal</i>	1/5	1/40	1/20	1/20	1/100	1/1000	1/500	1/20	1/20	1/100	1/50	1/10	1/5	1/3
Granice wahań w poszczególnych seriach <i>Les limites des écarts</i>	1/5	1/40		1/20	1/100		1/500					1/10		
Surowica ogrzewana na 1/2 god. do 56° <i>Serum chauffé pen- dant 1/2 h. à 56°</i>	1/5		1/10			1/50	1/30 1/50				1/8	1/8	1/4 1/5	1/2
<i>C o l p i d i u m</i>														
Surowica normalna <i>Serum normal</i>	1/20			1/8	1/50	1/100	1/100	1/8	1/8			1/5	1/3	1/3
Granice wahań w poszczególnych seriach <i>Les limites des écarts</i>							1/100 1/500					1/5	1/3	
Surowica ogrzewana na 1/2 god. do 56° <i>Serum chauffé pen- dant 1/2 h. à 56°</i>	1/5		1/5			1/20	1/10							

W poszczególnych seriach doświadczeń zwróciliśmy uwagę na to, w jakim stopniu występują różnice w działaniu toksycznym surowicy różnych gatunków, należących do jednej grupy kręgowców. Zwłaszcza interesowało nas pytanie, czy wystąpią większe różnice w działaniu surowic poszczególnych ssaków i płazów. Ta ostatnia kwestia wydała nam się ciekawa ze względu na wysoki stopień zabójczego działania surowicy żaby. Nasuwało się mimowoli pytanie, czy zjawisko powyższe nie pozostaje w związku z przebywaniem w jelicie żaby wymoczków pasorczytujących i co za tym idzie z uczuleniem organizmu. Z danych tab. I widzimy, że naogół surowice zwierząt, należących do jednej grupy, mniej się różnią pod względem swego działania, aniżeli surowice zwierząt, należących do różnych ugrupowań. Jednakże występują dość znaczne odchylenia w toksyczności surowic w obrębie jednej grupy kręgowców. Tak np. wśród badanych gatunków ryb surowica piskorza (1/40) okazała się znacznie

bardziej toksyczna, aniżeli karpia ($1/5$); w grupie płazów — surowica aksolotla ($1/100$) w mniejszym stopniu zabójcza, aniżeli żaby ($1/500$) i ropuchy ($1/1000$). Niewielkie wahania występują wśród ssaków. *Paramecium* żyje (48 godz.) w surowicy ludzkiej i królika, rozcieńczonej w stosunku $1/5$, świnki morskiej $1/3$; to ostatnie stężenie jest najwyższym stężeniem surowicy, w jakim *Paramecium* żyje ew. mnoży się.

Doświadczenia, prowadzone równolegle na *Colpidium*, dały wyniki podobne do poprzednio opisanych, aczkolwiek naogół *Colpidium* jest bardziej odporne na działanie surowic, aniżeli *Paramecium*. Tak np. surowica ropuchy i żaby jest zabójcza dla *Colpidium* w stężeniu $1/100$, węża $1/8$.

Porównanie toksyczności surowicy zwierząt zmiennocieplnych (żaba) i stałocieplnych nasunęło nam pytanie, czy słabsze działanie zabójcze surowicy ssaków nie pozostaje w związku z temperaturą otoczenia; jak wyżej zaznaczyliśmy, doświadczenia nasze wykonywaliśmy w temperaturze pokojowej ($15-16^{\circ}$), normalnej dla zwierząt zmiennocieplnych, natomiast bardzo znacznie odbiegającej od temperatury krwi stałocieplnych. W celu wyjaśnienia tej kwestii wykonaliśmy serię doświadczeń, w których pozostawialiśmy pierwotniaki w rozcieńczonej surowicy w termostacie w temperaturze 14 , 19 i 27° . Otrzymaliśmy graniczne stężenia dla surowicy żaby: $1/1000$ (temper. 27°), $1/500$ (19°), $1/1000$ (14°); dla surowicy królika: $1/5$ (27°), $1/2$ (19°), $1/2$ (14°). Widzimy zatem, że temperatura (w granicach rozpatrywanych $14-27^{\circ}$) nie wpływa na toksyczność surowicy. Wpływu wyższych temperatur nie badaliśmy ze względu na zgubne ich działanie na pierwotniaki.

Dalej interesowała nas kwestia, czy różnice w działaniu surowicy poszczególnych zwierząt pozostają w związku z aktywnością surowicy. W celu wyjaśnienia powyższego zagadnienia wykonaliśmy serię doświadczeń z surowicami inaktywowanymi przez ogrzewanie do 56° w przeciągu $1/2$ godziny. Z doświadczeń tego typu wynika przede wszystkim, że surowice inaktywowane na tej drodze są rzeczywiście znacznie mniej toksyczne, aniżeli surowice normalne; śmierć pierwotniaków w surowicy nierozcieńczonej następuje po upływie czasu dwukrotnie dłuższego, aniżeli w surowicy normalnej. Stężenia graniczne, w jakich

pierwotniaki żyją (w przeciagu 24 godzin), są wyższe, aniżeli dla surowicy normalnej. Jednakże różnica w działaniu surowicy normalnej i ogrzewanej zaznacza się w niejednakowym stopniu dla poszczególnych zwierząt. Tak np. różnica powyższa jest niewielka w przypadku surowicy ssaków (s. normalna królika $\frac{1}{5}$, ogrzewana $\frac{1}{4}$, świnki morskiej $\frac{1}{3}$ i $\frac{1}{2}$), natomiast jest ona znacznie większa dla surowicy płazów (s. normalna żaby $\frac{1}{500}$, ogrzewana $\frac{1}{30}$, ropuchy $\frac{1}{1000}$ i $\frac{1}{50}$). Widzimy zatem, że usunięcie czynnika termolabilnego zmniejsza w znacznym stopniu rozpiętość granic stężeń zabójczych poszczególnych surowic, tym nie mniej jednak surowica ogrzewana żaby (ropuchy) działa zabójczo w stężeniach kilkakrotnie większych, aniżeli surowice innych zwierząt. Warto zaznaczyć przy tym, że w przypadku surowicy ssaków wartość stężenia zabójczego jest tak wysoka, że Δ surowicy zabójczej niewiele odbiega od Δ najwyższego stężenia roztworów zrównoważonych soli, jakie pierwotniaki znoszą. Δ surowicy w rozcieńczeniu $\frac{1}{3}$ — $\frac{1}{2}$, w którym wymoczki jeszcze mogą żyć, wynosi ok. 0.18° — 0.27° . Wiemy zaś (J. V i e w e g e r '30), że wymoczki znoszą bezpośrednie przenoszenie do płynu R i n g e r a o Δ nieprzekraczającym 0.25 — 0.30° .

Wyżej zaznaczyliśmy, że zdaniem L e v i n s o n a czynnik termolabilny, zawarty w surowicy nie posiada cech komplementu. W naszych doświadczeniach stwierdziliśmy, że dodanie do ogrzewanej surowicy żaby świeżej surowicy świnki morskiej (w stosunku $\frac{1}{100}$) — nie wpływa na wysokość stężenia zabójczego surowicy.

Wreszcie interesowała nas kwestia, czy wymoczki mogą się przystosować przez pobyt w niższych stężeniach surowicy do stężeń wyższych aniżeli te, w jakich normalnie giną. Próby podjęte w tym kierunku dały jednakże wynik całkowicie ujemny.

W y n i k i.

1°. Występują znaczne różnice w działaniu zabójczym surowicy różnych zwierząt kręgowych (królik $\frac{1}{5}$, ropucha $\frac{1}{1000}$). W mniejszym stopniu różnice powyższe zaznaczają się w obrębie tej samej grupy zwierząt kręgowych. Najbardziej toksyczna dla *Paramecium* i *Colpidium* jest surowica płazów.

2°. Bardzo znaczna różnica w działaniu zabójczym surowicy płazów i ssaków nie zależy od temperatury środowiska (w granicach 14 — 27°).

3°. Surowica ogrzewana w przeciągu ½ godziny do 56° jest mniej toksyczna, aniżeli surowica normalna. Jednakże i w tym przypadku zachowują się dość znaczne różnice w stopniu toksyczności surowicy (żaba $\frac{1}{30}$, królik $\frac{1}{4}$). Dodanie surowicy świnki morskiej do surowicy ogrzewanej (żaby) nie wpływa na stopień zabójczości surowicy.

4°. Występują niewielkie różnice w działaniu badanych surowic na *Paramecium* i *Colpidium*.

5°. Pozostawienie wymoczków w słabych roztworach surowicy nie wpływa w kierunku zwiększenia odporności na działanie surowicy stężonej.

P i ś m i e n n i c t w o .

Flaks J. i Ber A. 1933. Wpływ surowic szczurów normalnych, szczepionych nowotworami i zakażonych bakteriami, na pierwotniaki — *Paramecium caudatum*. Warsz. czas. lekar. 10. — Levinson L. 1929. Die Anaphylaxie bei Protozoen. Zeitschr. f. Immunsforsch. 60. — Oehler R. 1920. Gereinigte Ciliatenzucht. Arch. f. Protist. 41. — Rössle R. 1905. Spezifische Sera gegen Infusorien. Arch. f. Hyg. 54. — Vieweger J. 1930. Études sur la multiplication des colpidies dans les différents milieux. Arch. d'Hydrob. et d'Ichtyol. 5.

[Zakład Chemii Fizjologicznej Uniwersytetu Poznańskiego].

Marian Górski.

O wolnym azocie α -aminowym moczu i jego stosunku do złożonych kwasów, ostatecznych produktów prawidłowej przemiany białkowej¹).

Sur l'azote α -aminé de l'urine et son rapport aux acides complexes, produits du métabolisme protéique normal.

Rękopis nadesłany w dniu 27.II.1937 r.

Par la titration au formol (Sørensen) on arrive à déterminer la quantité d'azote α -aminé dans l'urine normale qui oscille entre 1.5 ou 2 p. 100 par rapport à l'azote total, en dehors de toute ingestion des substances protéiques pendant le jeûne rigoureux.

Contrairement à l'opinion généralement admise on a pu établir qu'en moyenne plus de 90 pour cent d'azote α -aminé libre des urines normales ne correspond pas à des amino-acides simples, qu'on n'a pu jusqu'à présent isoler en quantité appréciable, mais qu'ils font partie des grands complexes azotés et sulfurés, produits de la désintégration des protéides. La majeure partie de l'acide aminé libre de l'urine normale (77 à 99 p. cent) entre dans la composition des amino-acides sulfurés complexes („acides oxyprotéiques”), dont les sels de baryum à l'état brut, mais privé d'ammoniaque, ont été examinés.

L'acétate cuivrique décolore l'urine et n'enlève qu'une faible fraction de l'azote aminé (environ 10 p. cent). Le filtrat privé de cuivre par la poudre de Zn est parfaitement limpide et incolore et facilite le titrage direct des urines au formol.

¹) Rzecz przedstawiona na posiedzeniu Polskiej Akademii Umiejętności w dniu 20 listopada 1937 r.

Le rapport (N - a m i n é : S - n e u t r e), déterminé pour des acides oxyprotéïques à l'état brut, sous différents régimes alimentaires, est environ égal à 1.53 (avec une erreur 0.47 sur un dosage isolé). Ce rapport calculé pour l'urine (N - a m i n é : S - n e u t r e t o t a l) s'approche sensiblement de l'unité pendant le métabolisme protéïque endogène (jeûne rigoureux) et revient à la valeur habituelle (1.59) quelques jours après le jeûne terminé. Par conséquent l'azote aminé titré au formol dans les urines, permet d'évaluer simultanément, en première approximation, le soufre neutre, dont la majeure partie, si non la totalité, entre dans la constitution des déchets ultimes du métabolisme protéïque normal à fonction nettement acide.

L'acide complexe qui ne précipite ni par l'acétate de plomb basique, ni par l'acétate de mercure en réaction acide contient le plus d'azote aminé libre (acide oxyprotéïque) (un quart de son azote total). Le clivage par hydrolyse acide des liaisons peptidiques met en évidence de nouvelles quantités d'azote aminé, mis en liberté.

I. Przegląd historyczny zagadnienia.

Nie podlega wątpliwości przyjęty już ogólnie fakt, że człowiek zdrowy wydziela stale małe ilości wolnego azotu ϵ -aminowego. Można go określić, oznaczając azot całkowity: amoniakalny i grupy aminowej (np. metodą formolową), a odejmując oznaczony bezpośrednio w drugiej porcji moczu azot amoniakalny. Wszakże podlega wątpliwościom i stanowi przedmiot dyskusji natura nieznaną i bliżej nieokreślona ciał, zawierających ową wolną, t. j. wprost oznaczalną grupę α -aminową. Mocz prawidłowy zawiera 0.05—0.2 g azotu aminowego, co stanowi 0.5—3% (1) przeciętnie 1.8% — 2% [H e n r i q u e s (2), R z ę t k o w s k i (3), P e t e r s i v. S l y k e (4)] azotu całkowitego w moczu¹⁾. W miarę wzrostu azotu całkowitego podnosi się również bezwzględna ilość azotu aminowego (L a m b l i n g 5).

Obecność tak nieznacznych ilości azotu aminowego w moczu prawidłowym znajduje wytłumaczenie w tym, że organizm szczególnie szybko rozkłada aminokwasy. Przyjęto, że wszelki nadmiar azotu aminowego zostaje natychmiast przez tkanki wychwytyany i w pewnym, dokładnie określonym porządku, poprzez kolejno po sobie następujące stany pośredniego metabolizmu zostaje ostatecznie rozłożony (5, str. 327).

¹⁾ Wartości azotu aminowego w stos. do całkowitego, według różnych autorów, wynoszą (R z ę t k o w s k i 3, s. 54): por. tab. w odnośniku na str. 159.

Tak np. z 12 g alaniny, podanej psu drogą dożylną w przeciągu 10 min.: po upływie 5 min. znajdujemy we krwi tylko 1.5 g, a po 35 min. jedynie 0.4 g, jakkolwiek w moczu ilość wydzielona wynosiła tylko 1.5 g (5, str. 304). E. A b d e r h a l d e n po spożyciu zrana 150 g tyrozyny i 75 g glikokolu, co przeliczone na azot aminowy wynosiło 25.48 g, wydzielił z moczem po upływie 48 godz. jedynie 1.1 g azotu. „I właśnie dlatego, że te kwasy stanowią w toku prawidłowej przemiany białkowej przejściowy, szybko mijający etap, jasnym jest, dlaczego w tkankach i wydalinach znajdujemy tak znikome ich ilości (5, str. 319). Zatem ustrój może rozłożyć duże ilości kwasów aminowych, a wydziela przez nerki tylko nieznaczne ilości tych aminokwasów, które zdołały ująć dezamidacji”.

Z kolei nasuwa się pytanie, które mianowicie z rozlicznych aminokwasów, uniknąwszy dezamidacji, zostają wydalone przez nerki i mogą być wyosobnione z prawidłowego moczu?

Lecz tu właśnie piętzą się trudności techniczne. Stąd też nieściśle wnioski, powstałe raczej z pewnych przedwczesnie powziętych sugestyj, aniżeli z dokładnego spostrzegania faktów.

W rzeczy samej poza glikokolem, który wyodrębniono w kwasie hipurowym, nie jest pewnym, czy rzeczywiście znajdują się proste kwasy aminowe w stanie wolnym w moczu prawidłowym. A jeżeli też są one obecne, to w tak znikomych śladach, iż niepodobna ich wyodrębnić i utożsamić (R z ę t k o w s k i 3, str. 58, P e t e r s i v. S l y k e 4, str. 391).

1. Zachowanie się azotu aminowego w endogennej przemianie białkowej.

Obecność wolnych kwasów aminowych w moczu prawidłowym jest tym więcej wątpliwa, że nawet wtedy, gdy się zaprzestanie podawania białka, lub pochodnych aminokwasów, nerki stale wydzielają podczas ścisłego głodu małe ilości azotu aminowego, jak wynika z powyższego zestawienia.

Autor	N aminowy		Uwagi
	Ilość absol.	% N całk.	
Magnus - Levy	—	2—6	—
Frey	0,2—0,5	—	—
Henriques	—	2	—
Mashuda	—	1—2	Dieta uboga w białko
"	—	4—5	Dieta obfituj. w białko
Joshida	—	0,5—2	—
Frank i Saxl	—	1,5—3	—
Galambosi Tausz	0,236—1,05	1,58—4,35	—
Anast. Landau	0,298—0,67	—	—
"	0,344—0,709	—	—
"	—	2,89	—
M. Labbé i H. Bith	0,05—0,35	0,5—3,5	—
"	0,10—0,30	—	—
v. Slyke	—	1,5—2,5	—

Azot aminowy w przebiegu głodu *).

Czas trwania głodu	Azot całkowity w ilości dobowej wyr. w g	Azot aminowy (NH ₂) wyr. w g **)	Azot aminowy w stosunku do azotu całk. %
2. dzień	10,27	0,141	1,37
4. „	10,93	0,190	1,74
5. „	10,04	0,196	1,95
6. „	9,31	0,151	1,63
5. „ po głodzie	11,85	0,370	2,35

*) Wyniki dotąd nie ogłoszonej pracy, udzielone mi łaskawie przez prof. S. Dąbrowskiego.

***) Oznaczenie całkowitego azotu amoniakalnego i aminowego dokonano metodą Sørensen'a, doprowadzając roztwór do zabarwienia wyraźnie czerwonego za pomocą 1/5 N ługu sodowego. Oznaczenie bezpośrednie amoniaku przeprowadzono drogą destylacji moczu z tlenkiem magnezu, wyprażonego poprzednio do czerwoności według metody Folin'a i Berthelot'a (6).

Wątpliwym jest, by nerka w czasie ścisłego głodu wydzielala wolne α -aminokwasy. W rzeczy samej, w czasie ścisłego głodu ustrój ogranicza przemianę własnego białka przy równoczesnej konieczności obrony przed samozakwaszeniem, które występuje tak wybitnie, jako skutek głodu. Aby usunąć wzrastającą kwasotę moczu, ustrój uruchamia w pierwszym rzędzie amoniak, powstały z dezamidacji przez tkankę nerkową aminokwasów. Wydaje się tedy nieprawdopodobnym, by w ciągu długiego i ścisłego głodu mogła uniknąć dezamidacji nawet nieznaczna ilość aminokwasów (1). Zatem należałoby przypuszczać, że w danym przypadku wolny azot aminowy moczu wypada raczej odnieść do ciał złożonych, owych kwaśnych „niedopałków” białka, stale wydalanych przez nerki, jako wyraz jego śródtkankowej przemiany¹⁾.

2. Azot aminowy wolny i polipeptydowo związany.

Już A b d e r h a l d e n i P r e g l (5, str. 349) znaleźli w moczu w jego części niedializującej mieszaninę aminokwasów (glikokol, fenilalanina, leucyna, kwas glutaminowy, alanina), lecz tylko po uprzedniej hydrolyzie kwaśnej nieznanych związków, które uważali za polipeptydy. Na 1.5 do 2% azotu aminowego w stosunku do całkowitego, połowa tylko znajduje się w stanie wolnym, druga część pojawia się dopiero po dokonaniu kwaśnej hydrolyzy w autoklawie (v. S l y k e 7). Że w moczu prawidłowym znajdują się ciała złożone o naturze kwasów, zawierające równocześnie obok wolnych, także związane peptydowo grupy aminowe, dowodzi tego wykrycie kwasów oksyproteinowych, które, powstając w toku prawidłowego

¹⁾ Już u zwierząt, u których za pomocą odpowiednio dostosowanej, długotrwałej diety ograniczono przemianę azotową do minimum, z chwilą podania jakichkolwiek kwasów amin. (choćby nie należących do grupy bezwzględnie dla ustroju potrzebnych), zostają one w gospodarce ustroju użyte dla zaoszczędzenia strat azotu endogennego (26—30%). E. T e r r o i n e (21).

rozkładu ciał białkowych w ustroju, stanowią złożone, zawierające azot i siarkę, stosunkowo silne kwasy, stale wydalane (Bądzyski, Dąbrowski i Panek 8). Tworzą one bowiem sole srebrze i barowe o dobrze określonym składzie, wykazując przez te właściwości wyraźną reakcję kwasową, co właśnie odróżnia je od polipeptydów, związków o charakterze obojnaczym lub słabo-kwaśnym (Bądzyski 9).

Ponadto w tych kwasach złożonych wykazano wolny azot aminowy, a po hydrolizie za pomocą kwasu solnego, a jeszcze lepiej, fluorowodorowego, stwierdzono obecność azotu aminowego w wiązaniu peptydowym. Szczególnie grupa tych kwasów oksyproteinowych, którą strącamy zasadowym octanem ołowiu, zawiera przede wszystkim grupę aminową w wiązaniu peptydowym, gdy natomiast kwasy oksyproteinowe, pozostałe w przęszczy od osadu ołowiowego i ulegające wytrąceniu za pomocą octanu rtęci kolejno z kwaśnego, a następnie zasadowego odczynu, zawiera wolną grupę α -aminową ($-\text{NH}_2$), której ilościowe określenie dokonano metodą formolową (Dąbrowski i Browiński 6, Głagolew 10).

3. Zamierzenia pracy niniejszej.

W tym stanie badań nad azotem α -aminowym w prawidłowym moczu ludzkim, bądź w stanie ostrego głodu, bądź przy różnorodnym odżywianiu, wydało się koniecznym podjęcie niniejszej pracy, by wyjaśnić sprawę tyle wykazującą spornych poglądów, a zarazem dociec, która z zarysowanych możliwości jest słuszna?

1) Czy mianowicie całość wolnego azotu aminowego, wykazanego metodą formolową, znaduje się w kwasach aminowych ciał złożonych, zawierających siarkę (kw. oksyproteinowy), jako ostatecznych produktów przemiany białkowej, a wydalanych przez nerki;

2) czy też azot α -aminowy wolny odnosić do prostych kwasów aminowych, które przechodzą do moczu, jako wyraz niewydolności procesów dezamidacyjnych?

II. Część doświadczalna.

1. Sposób oznaczania wolnego azotu α -aminowego w moczu.

Wolny azot aminowy w moczu prawidłowym oznaczaliśmy metodą formolową Sørensen'a, w modyfikacji Cole'go (11) w następującym układzie:

Do próbówki 1 i 3 komparatora dajemy po 20 kropeł roztw. 0.5% fenoltaleiny.

a) D o p r o w a d z e n i e m o c z u d o $P_H = 8.5$.

Wpierw oznaczamy kwasotę całkowitą moczu w obecności fenolfitaleiny (zabarwienie lekko różowe); tę samą ilość mianowanego ługu sodowego dajemy do próbówki (2); by zachować stałe stężenie wskaźnika, dajemy do próbówki (3) jedną kroplę fenolfitaleiny na każdy cm^3 zużytego ługu. W końcu zadajemy ługiem sodowym zawartość próbówki (3), by zachować ściśle równowagę barwy.



b) W ł a ś c i w e o z n a c z e n i e ($-\text{NH}_2$) metodą formolową:

W drugiej fazie daje się do próbówki trzeciej 5 cm^3 obojętnego roztworu formaliny, zadanego 5-ciu kroplami wskaźnika; by wyrównać intensywność zabarwienia dajemy do próbówki (2) tyleż, t. j. 5 cm^3 wody. Zawartość prob. 3-ej stała się kwaśna z powodu zablokowania grupy α -aminowej (powstanie połączenia metylenowego $\text{C} = \text{NH}_2$), oraz równoczesnego ujawnienia funkcji kwasowej, którą miareczkujemy (x) - cm^3 - ami roztworu ługu, aż do wystąpienia zabarwienia lekko-różowego; tą samą ilością (x) cm^3 -ów wody uzupełniamy zawartość próbówki (2) i (x) kroplami wskaźnika zawartość próbówki (3); wreszcie, dodanie niewielkich ilości ługu do próbówki (3) sprowadza zabarwienie równe wzorcowemu, przy zachowaniu stałe równego stężenia wskaźnika (na każdy dodany cm^3 ługu daje się 1 kroplę wskaźnika). Ilość cm^3 -ów ługu sodowego (x) (po dodaniu formaliny), mnożona przez 14 i dzielona przez miano ługu (n)

$$\frac{x \times 14}{n}$$

daje nam w mg sumę azotu amoniakalnego i aminowego. Amoniak oznaczano wprost (metodą przewietrzania w obecności węglanu potasu), a obliczoną z niego ilość azotu odejmowano od ilości azotu całkowitego, oznaczonego metodą formolową.

Wyniki oznaczeń, wykonanych na 6-ciu moczach prawidłowych przy dowolnym sposobie odżywiania są, biorąc ogólnie, bliższe dolnej granicy określeń dawniej podanych, (Y o s h i d a 0.5—2% azotu całk. l. str. 589) i można je porównać raczej z wynikami, otrzymanymi w czasie ścisłego głodu.

Tabela I.

Azot aminowy ($-\text{NH}_2$) w moczu prawidłowym (met. formolowa Sørensen a).

Nr.	Dobowa ilość mocz g	Azot całkowity w 100 cm ³ moczu g	Azot aminowy ($-\text{NH}_2$) w 100 cm ³ mocz g	Azot amoniakalny w 100 cm ³ moczu g	Azot ($-\text{NH}_2$) całkowity g	$\frac{\text{Azot } (-\text{NH}_2)}{\text{Azot całk.}} \times 100$
I	1330	1.513	0.0059	0.0590	0.078	0.38
II	1520	0.9464	0.0070	0.0376	0.106	0.74
III	1560	0.7809	0.0040	0.0389	0.068	0.55
IV	1180	1.254	0.0157	0.0377	0.185	1.25
V	860	1.098	0.0174	0.0237	0.153	1.62
VI	820	1.474	0.0169	0.0872	0.139	1.14

2. Azot aminowy w solach barowych surowych kwasów oksyproteinowych.

W celu oznaczenia wolnego azotu aminowego w złożonych związkach, zawierających azot i siarkę (kwasach oksyproteinowych) przygotowano ich sole barowe w stanie surowym pod postacią nierozpuszczalnego w alkoholu syropu („syr o p b a r o - w y”). Posługiwaliśmy się następującą metodą opracowaną w Lwowskiej Pracowni P r o f. S. B ą d z y ń s k i e g o (12):

Mocz, zagęszczony pod zmniejszonym ciśnieniem, odsączamy od obfitego osadu krystalicznego soli i mocznika na sączku Buchnerowskim pod zmniejszonym ciśnieniem. Przesączony syrop zakwaszamy rozcieńczonym kw. siarkowym dla wyzwolenia kwasów organicznych, aż do śladów nadmiaru kw. mineralnego, stwierdzonych niebieską barwą papierka kongo, po czym zadajemy podwójną lub potrójną ilością 95° alkoholu. Zakwaszony płyn alkoholowy, oddzielamy na sączku przy użyciu względnej próżni od obfitego osadu siarczanów potasowców, rozcieńczamy 2 lub 3 objętościami wody i alkalizujemy barytą, której nadmiar usuwa się przez wysycanie roztworu dwutlenkiem węgla i wytrącanie wodorotlenku baru w postaci węglanu. Wówczas przesącz alkoholowy zagęszczamy pod zmniejszonym ciśnieniem do stanu gęstego syropu, z którego po zadaniu alkoholo-

lem absolutnym wytrąca się osad t. zw. „syrup barowy”, silnie zabarwiony, zawierający ogół soli barowych kw. oksyproteinowych w stanie surowym. Zawiera on w różnych ilościach domieszki mocznika, kreatyniny, etero-siarczanów, ślady amoniaku, które zresztą można usunąć przez długotrwałe wyciąganie alkoholem zmieszanego z piaskiem morskim syropu w aparacie Soxhleta (Gawiniński 13, Giedroyć 14).

Ponieważ jednak do oznaczeń zbędne były czyste sole barowe kw. oksyproteinowych, można było ograniczyć się do oznaczenia wolnego azotu aminowego w solach barowych w stanie surowym, wszakże pod warunkiem usunięcia z nich śladów amoniaku. W ten sposób, postępując się powyższą metodą w 10-ciu przypadkach różnych diet, przygotowano sole barowe kw. oksyproteinowych. Ślady amoniaku zostały usunięte drogą adsorpcji za pomocą permutitu (15), a azot aminowy oznaczono mikrometodą gazometryczną według v. Slyke'a (16) w celu uniknięcia błędu, wynikającego z oceny zmiany zabarwienia w roztworach silnie zabarwionych¹⁾.

Wyniki oznaczeń azotu aminowego metodą gazometryczną zebrano w tabeli II.

Z całości oznaczeń tak metodą miareczkową, jak i gazometryczną wynika, że całkowita ilość azotu aminowego, obliczona na 100 cm³ moczu, wynosi przeciętnie 11 mg (tab. I), podczas gdy ilość azotu aminowego w odniesieniu do soli barowych, złożonych kwasów organicznych w moczu (kw. oksyproteinowych) nie przekracza 10 mg. Ten wynik skłonił nas do wykonania oznaczeń porównawczych na próbkach tego samego moczu, z jednej strony całego wolnego azotu aminowego, z drugiej zaś azotu

¹⁾ Błąd popełniany tą metodą określono uprzednio na roztworach wzorcowych: a) glikokolu (0.2219 g w 100 cm³), b) leucyny (0.4132 g w 100 cm³) moczu.

W 1 cm³ roztworu znaleziono azotu w mg:

1) mikrometodą gazometryczną v. Slyke'a

	a.	b.
	0.438	0.1475
	0.441	0.1496
	0.437	0.1510
	0.438	0.1580
	0.436	0.1434
średnio	0.438	0.1499
2) Mikrokjeldahl	0.417	0.1432
3) Z oblicz.	0.415	0.145

Odchylenia od rzeczywistej ilości azotu w %:

5%

3%

(Granica błędu dopuszczalna dla metody gazometrycz. odnośnie do poszczególnych oznaczeń wynosi ± 0.1 cm³ gazu, czyli 0.05 mg azotu aminowego).

aminowego kw. oksyproteinowych, wydobytych z moczu w postaci soli barowych w stanie surowym. Oznaczenie kolorymetryczne metodą formolową wykonano za pomocą komparatora Cole'go.

Tabela II.

Azot aminowy ($-\text{NH}_2$) w złożonych kwasach, zawierających azot i siarkę (sole barowe).
(Metoda gazometryczna v. Slyk'e'a).

Nr.	Azot całkowity moczu (N_1)	Azot ($-\text{NH}_2$) kw. oksyprot. (N_2)	$\frac{\text{N}_2}{\text{N}_1} \times 100$
	w 100 cm^3 moczu		
	g	g	
I a	0.709	0.0094 *)	1.33
III a	1.041	0.0100	0.96
X a	1.509	0.0106	0.70
II b	1.644	0.0231	0.41
V b	1.354	0.0117	0.87
VII b	1.293	0.0064	0.50
II c	1.487	0.0092	0.62
V c	0.846	0.0728	0.86
X c	1.122	0.0053	0.48
	średnio: 0.0103 g		

a = dieta mieszana
b = " mięsna
c = " mleczna

*) Każda liczba jest średnią parokrotnych oznaczeń (w mg).

I a	9.323	X a	10.48	II b	23.12	V b	11.72	VII b	6.48	X c	5.313
	9.425		10.58		23.12		11.72		6.48		5.295
	9.500		10.61		23.12		11.72		6.40		5.328
średnia	9.412		10.56		23.12		11.72		6.44		5.312

Tabela III.

Badania porównawcze całkowitego azotu aminowego ($-\text{NH}_2$) w moczu i częściowo, zawartego w złożonych kwasach, zawierających azot i siarkę (kw. oksyproteinowych) (met. formolowa).

Nr.	Azot całk. (N)	Azot ($-\text{NH}_2$) całk. (N_1)	$\frac{(\text{N}_1)}{(\text{N})} \times 100$	Azot ($-\text{NH}_2$) kw. oksyprot. (N_2) na 100 cm^3 moczu	$\frac{(\text{N}_2)}{\text{N}} \times 100$	$\frac{(\text{N}_2)}{\text{N}_1} \times 100$
	w 100 cm^3 moczu					
	g	g		g		
I	1.513	0.0059	0.39	0.00543	0.36	92.10
II	0.613	0.0004	0.06	0.00034	0.06	85.96
III	0.946	0.0070	0.74	0.00587	0.62	83.70
IV	0.781	0.0044	0.56	0.00432	0.55	99.23
V	1.254	0.0157	1.25	0.01502	1.20	95.80
VI	1.098	0.0174	1.62	0.01350	1.26	77.70
VII	1.474	0.0169	1.14	0.01300	0.88	77.00

Z powyższych oznaczeń porównawczych wynikają następujące wnioski:

- 1) całość nieomal (91%) lub co najmniej większą część azotu aminowego (77%) należy odnieść nie do prostych kwasów aminowych, lecz do złożonych kompleksów kwasowych,
- 2) ciała te złożone, kwaśne niedopałki prawidłowej endogennej przemiany białkowej, są mianowicie kwasami oksyproteinowymi,
- 3) w solach bowiem tych złożonych kwasów, zawierających azot i siarkę, znajdujemy całość lub znaczną część ilości wolnego azotu α -aminowego prawidłowego moczu.

3. Stosunek azotu aminowego w moczu do siarki obojętnej w okresie przyjmowania pokarmu i w głodzie.

Prace poprzednie wykazały, że siarka obojętna kw. oksyproteinowych stanowi większą część całkowitej siarki obojętnej w moczu (Gawinśki 13, str. 415). Wykonaliśmy oznaczenia siarki obojętnej w solach barowych tych kwasów, po uprzednim ich przekształceniu w sole sodowe za pomocą węglanu sodu, aby uniknąć strat siarki w czasie spalania w postaci siarkanu barowego. Odsączywszy węglan baru, przystąpiono do oznaczeń w przesączu siarki całkowitej drogą stopienia suchej pozostałości przesączu z azotanem miedzi (metoda Benedicta). Następnie, oznaczono siarczan metodą benzydynamową; siarkę zaś utlenioną w postaci etero-siarczanów, rozszczepionych drogą kwaśnej hydrolizy oznaczono podobnie metodą benzydynamową (17).

Zestawienie zawarte w tab. IV wykazuje, że surowe sole barowe kw. oksyproteinowych zawierają znaczną część siarki w postaci siarki obojętnej i że reszta (siarczanów mineralnych nie ma tu wcale) znajduje się pod postacią etero-siarczanów, jako przypadkowej domieszki, którą zresztą można oddzielić od kwasów tych w czasie ich oczyszczania (Gawinśki 13).

Tabela IV.

Siarka obojętna soli surowych kwasów oksyproteinowych.
(Metoda benzydynowa).

Nr.	Siarka całk.	Siarka utlen.	Siarka oboj.	$\frac{S \text{ oboj.}}{S \text{ całk.}} \times 100$
	Obliczone na 100 cm ³ moczu			
	mg	mg	mg	
VI a	11.31	5.81	5.50	48.60
X a	9.47	1.47	8.00	84.50
V b	11.74	2.79	8.95	70.25
VI b	13.12	2.13	10.99	83.77
VII b	10.88	2.29	8.59	78.93
V c	11.31	5.81	3.76	33.24
X c	4.48	1.57	2.91	64,88

Porównywanie zawartości azotu aminowego (tab. II) i siarki oboj. kw. oksyproteinowych (tab. IV) pozwala ustalić stosunek azotu aminowego do siarki oboj. tych złożonych kw. aminowych. Stosunek ten (N. a m i n. : S. o b o j.) w solach barowych kw. oksyproteinowych (w stanie surowego produktu) przy dowolnej diecie równy jest 1.53 (błąd średni poszczególnego wyniku wynosi ∓ 0.47), co pozwala w pierwszym bodaj przybliżeniu określić pośrednio ilość siarki obojętnej kwaśnych niedopałków białka na podstawie znalezionej ilości azotu α -aminowego moczu.

Tabela V.

Stosunek azotu ($-\text{NH}_2$) do siarki obojętnej złożonych kwasów organicznych, zawierających azot i siarkę (kw. oksyproteinowych).

Nr.	Azot ($-\text{NH}_2$)	Siarka obojętna	$\frac{\Delta}{\text{Odchylenie od średniej}}$	Δ^2	
	Obliczone na 100 cm ³ moczu				$\frac{\text{Azot } (-\text{NH}_2)}{S \text{ obojętna}}$
	g	g			
VIa	0.0100	0.0055	1.819	+ 0.29	0.0841
Xa	0.0106	0.0080	1.320	- 0.21	0.0441
Vb	0.0117	0.0089	1.310	- 0.22	0.0484
VIIb	0.0064	0.0086	0.822	- 0.71	0.5041
Vc	0.0073	0.0038	2.102	+ 0.57	0.3249
Xc	0.0053	0.0029	1.827	+ 0.30	0.0900
	średnia		1.533	$\Sigma \Delta^2 = 1.0956$	

Średni błąd poszczególnego wyniku $\pm \sqrt{\frac{\Sigma \Delta^2}{n-1}} = \pm 0.47$

Stosunek ten odpowiada, ogólnie biorąc, stosunkowi tychże wielkości, oznaczonych wprost w moczu, ponieważ część, jeśli nie całość, siarki obojętnej wchodzi w skład kwasów oksyproteinowych (13). Jednakże w głodzie bezwzględny, gdy złożone kwasy aminowe, zawierające siarkę, pochodzą wyłącznie z endogennej przemiany białkowej¹⁾, stosunek powyższy maleje i wartość jego zbliża się wyraźnie do jedności; co wynika jasno z niżej podanych określeń²⁾.

Tabela Va.

Czas trwania głodu	Azot aminowy	Siarka obojętna całk. w moczu	S obojętna
	Przeliczone na 24 godz. w g		N aminowy
2. dzień	0.1405	0.0984	1.43
4. „	0.1897	0.2021	0.94
5. „	0.1960	0.1945	1.00
6. „	0.1510	0.1398	1.08
6. dzień po głodzie	0.1379	0.0863	1.007

Z powyższego dostatecznie jasno wynika, że stosunek (N. a m i n. : S. o b o j.), obliczony średnio z trzech dni głodu (4, 5 i 6) równy jest jedności, a z chwilą przyjmowania pokarmów wartość jego wzrasta do wartości prawidłowej.

4. W skład jakich związków wchodzi azot aminowy?

Prace poprzednie (Dąbrowski 18 i Gwóźdź 20) wykazały, że większa część siarki obojętnej, tego podstawowego składnika kw. oksyproteinowych, wchodzi w skład ciała silnie zabarwionego, o ciemno-brunatnym odcieniu, które z roztworu strąca się wprost roztworem octanu miedzi na zimno (urochrom S. Dąbrowskiego 19). Oznaczenia bezpośrednie metodą formolową lub gazometryczną v. Slyke'a (tab. IX) azotu aminowego w urochromie, uwolnionym od związków,

¹⁾ To rozstrzygnęły późniejsze prace, częściowo dotąd ogłoszone S. Dąbrowskiego i S. Kozłowskiego (18) nad głodem, z których dowodnie wynika, że kw. oksyproteinowe podobnie, jak podstawowy żółty barwik moczu (urochrom) są wynikiem endogennego metabolizmu białkowego; wydalone są one z ustroju tak w czasie głodu, jak i w czasie przyjmowania pokarmów.

²⁾ Dane nieogłoszone, łaskawie użyte mi przez prof. S. Dąbrowskiego.

kóre równocześnie porywa z nim octan miedziowy, wykazały nieznaczną ilość tego azotu w stosunku do azotu całkowitego (2.5%). Ten wynik potwierdzają również oznaczenia pośrednie. Jeśli zadamy octanem miedzi silnie zabarwiony roztwór soli kw. oksyproteinowych przesącz, uwolniony od miedzi za pomocą pyłku cynkowego, staje się bezbarwny i szczególnie zdalny do kolorymetrycznego oznaczenia metodą formolową. Można stwierdzić, że ilość azotu aminowego po odbarwieniu w powyższy sposób roztworu soli barowych kw. oksyproteinowych pozostaje w nim, biorąc praktycznie, bez szczególnej zmiany ilościowej, co też wykazuje tab. VI.

Tabela VI.

Badanie porównawcze zawartości azotu ($-\text{NH}_2$) w roztworze kwasów oksyproteinowych (po odbarwieniu octanem miedzi).

Nr.	Azot całk.	Azot ($-\text{NH}_2$)	Azot ($-\text{NH}_2$) w przesączu od octanu miedzi
	Przeliczone na 100 cm^3 moczu		
	g	g	g
Va	—	0.0189	0.0183
VIa	1.041	0.0100	0.0062
Xa	1.509	0.0106	0.0102
IIb	1.644	0.0231	0.0141
Vb	1.354	0.0117	0.0113
VIIb	1.293	0.0063	0.0067
IIc	1.487	0.0092	0.0091
Vc	0.846	0.0073	0.0073
Xc	1.122	0.0053	0.0053

5. Nowe postępowanie w oznaczaniu azotu aminowego w moczu za pomocą metody formolowej.

Jest rzeczą szczególnie korzystną dla oznaczenia azotu aminowego w moczu wyzyskanie właściwości octanu miedzi dla odbarwienia moczu. Odczynnik ten porywa bowiem nieznaczną jedynie ilość azotu aminowego, a odbarwiając mocz badany, umożliwia oznaczenie większej części azotu aminowego metodą formolową w środowisku zupełnie przezroczystym i bezbarwnym. Jest to podstawa do nowego postępowania przy oznaczaniu azotu aminowego w moczu wprost. Mianowicie, mocz uwolniony od siarczanu i fosforanu za pomocą chlorku baru i wapnia w substancji, których dodaje się w lekkim nadmiarze, zadaje się z kolei

roztworem octanu miedzi, nasyconym na zimno (3 cm³ na 10 cm³ moczu), poczym zobojętnia się roztwór rozcieńczonym ługiem; następnie przesącz uwolniony od miedzi za pomocą pyłku cynkowego, zupełnie bezbarwny, jest gotowy do miareczkowania metodą formolową. Wykonano tym sposobem, tytułem próby, oznaczenia azotu aminowego w trzech moczach. Około 90% wolnego azotu aminowego przechodzi do przesącza miedziowego.

Tabela VII.

Oznaczenie azotu (—NH₂) w moczu prawidłowym po odbarwieniu go octanem miedzi.

Nr.	Azot (—NH ₂) w 100 cm ³ moczu (N) g	Azot (—NH ₂) odbarwienie octan. miedzi (N ₁) g	$\frac{N_1}{N} \times 100$ %
I	0.0052	0.0045	88.0
IV	0.0044	0.0039	89.7
VII	0.0169	0.0154	91.4

6. Porywanie siarki obojętnej z moczu przez octan miedziowy.

Jeśli octan miedzi w roztworze obojętnym odbarwia mocz i porywa tylko $\frac{1}{10}$ część całkowitego azotu aminowego, to przeciwnie, szaro-zielonawy strął miedziawy zawiera znaczną część całkowitej siarki obojętnej w przesącza od osadu miedziowego (oddzieliwszy poprzednio miedź za pomocą pyłku cynkowego) przez określenie w przesącza siarki całkowitej, od której odejmuje się ilość etero-siarczanów, które przypadkowo mogą się znajdować w surowych solach barowych kw. oksyproteinowych¹⁾.

Tabela VIII.

Zawartość siarki obojętnej w roztworach kwasów oksyproteinowych po strąceniu octanem miedzi.

Nr.	Siarka oboj. całkowita S mg	Siarka oboj. w przesącza po octanie miedzi Sp mg	Siarka oboj. w osadzie miedzi. So mg	$\frac{Sp}{S} \times 100$ %
VIa	5.49	3.134	2.365	43.0
Xa	8.00	3.134	4.868	60.8
Vb	8.95	6.734	2.214	24.2
VIb	10.99	2.667	8.316	77.4
VIIb	8.59	6.270	2.320	27.0
Vc	3.76	1.269	2.490	66.2

¹⁾ Anion SO₄ ciał sprzężonych nie wytrąca się za pomocą jonów miedziowych (17).

Z powyższego zestawienia wynika, że biorąc ogólnie 50% siarki obojętnej zostaje w osadzie miedziawym, stanowiąc, jak wiadomo, zasadniczy składnik podstawowego barwika moczu (12).

7. O kwasach oksyproteinowych najbogatszych w grupę α -aminową.

Roztwór kw. oksyproteinowych, odbarwiony za pomocą odczynnika miedziowego zawiera jeszcze siarkę obojętną i wykazuje obecność wolnej grupy α -aminowej. Nasuwa się pytanie, który z tych złożonych kwasów zawiera najwięcej azotu aminowego w stanie wolnym? W pracach poprzednich badaczy wykazano (6), że grupa kwasów, nie strącająca się zasadowym octanem ołowiu, jest bogatsza w wolne grupy aminowe. Przesącz, uwolniony od ołowiu, zawiera 2 kwasy: jeden, dający się strącić octanem rtęci w środowisku kwaśnym (kwas antoksyproteinowy, zawierający grupę imidoazolową, która daje reakcję dwuazową), drugi, wypadający z roztworu po zobojętnieniu przesącza rtęciowego (kwas oksyproteinowy). Kwas ten, ubogi w siarkę obojętną (0.6% w czystej soli srebrowej), zawiera najwięcej wolnego azotu aminowego. W próbkach urochromu uzyskanego z osadu miedziawego, jak również w kwasie oksyproteinowym, który uzyskaliśmy w postaci gotowej w pracowni Chemii Fizjologicznej, oznaczono zawartość azotu aminowego metodą gazometryczną v. Slyke'a, przed i po hydrolizie kwaśnej.

Tabela IX.

Azot (NH_2) w solach barowych kwasów, oksyproteinowych w stanie czystym, przed i po hydrolizie.
(Metoda gazometryczna).

Substancje	Azot całk. N g	Azot ($-\text{NH}_2$) przed hydroliz. g	$\frac{\text{N}_1}{\text{N}} \times 100$	Azot ($-\text{NH}_2$) po hydrolizie			$\frac{\text{N}_2}{\text{N}} \times 100$
				g na zimno	g na gorąco	po usu- nięciu *) NH_3 N_2 g	
Kwas oksyproteinowy	0.0171	0.0043	25.36	0.0059	0.0072	0.0067	39.2
Urochrom	0.0789	0.0020	2.547	0.0076	0.0076	0.0071	8.878

*) Za pomocą kłócenia z „permutitem“.

Wyniki te, porównane z oznaczeniami miareczkowymi (met. formolową) poprzednio już wykonanymi, wykazują różnicę w za-

wartości azotu aminowego wolnego (6 i 10), którego szczególnie duże ilości znajdują się we frakcji, której nie wytrąca ani zasady octan ołowiu, ani octan rtęci w środowisku kwaśnym (kw. oksyproteinowy).

Wnioski.

1°. Miareczkowaniem metodą Sørensen'a określono w moczu prawidłowym wolny azot α -aminowy, którego ilość waha się w granicach 1.5—2% w stosunku do azotu całkowitego poza wszelką podażą z zewnątrz ciał białkowych, mianowicie w czasie bezwzględnego głodu.

2°. Wbrew ogólnie przyjętemu mniemaniu stwierdzono, że przeciętnie powyżej 90% azotu α -aminowego wolnego w moczu prawidłowym nie odnosi się do prostych kwasów aminowych, których zresztą obecności dotychczas nie zdołano stwierdzić i wyosobnić w stanie wolnym, lecz wchodzi w skład wielkich kompleksów, zawierających azot i siarkę obojętną, pochodnych prawidłowego metabolizmu endogennego ciał białkowych. Większa część azotu aminowego w moczu prawidłowym (75—99%) stanowi część składową tych właśnie złożonych aminokwasów, zawierających siarkę, a mianowicie kwasów oksyproteinowych, których sole barowe w stanie surowym, uwolnione od amoniaku, poddano systematycznemu badaniu.

3°. Octan miedzi, odbarwiając mocz, porywa tylko nieznaczną część azotu aminowego (ok. 10% jego całkowitej ilości). Przesącz zaś, pozbawiony miedzi za pomocą pyłku cynkowego, jest bezbarwny i zupełnie przezroczysty. Stąd służyć może do pewniejszego kolometrycznego określenia wolnego azotu aminowego w moczu.

4°. Stosunek (N. a m i n o w y : S. o b o j ę t n a), obliczony dla kwasów oksyproteinowych w stanie surowym, przy różnych sposobach odżywiania się wynosi ok. 1.53 (z błędem \mp 0.47 dla poszczególnego oznaczenia). Stosunek ten obliczony dla moczu w przemianie białkowej endogennej, w czasie bezwzględnego głodu, zbliża się do jedności, a w kilka dni po przywróceniu pokarmów wraca do zwykłej wartości (1.59). Stąd z ilości azotu aminowego w moczu, określonego metodą formolową, można obliczyć w pierwszym przybliżeniu ilość siarki obojętnej, której

większa część, jeśli nie całość, wchodzi w skład kwaśnych niedopałków prawidłowej śródtkankowej przemiany białkowej.

5°. Złożony kwas (kwas oksyproteinowy), nie wytrącający się zasadowym octanem ołowiu, ani też octanem rtęci w środowisku kwaśnym, zawiera najwięcej wolnego azotu aminowego, (jedną czwartą azotu całkowitego), rozszczepienie zaś wiązań peptydowych drogą kwaśnej hydrolizy wyzwala około 15 proc. nowych ilości azotu aminowego, uwolnionego z rozbitych wiązań polipeptydowych.

Uważam sobie za miły obowiązek podziękować JWP. Profesorowi Stefanowi Dąbrowskiemu za inicjatywę tych badań i pomoc w trudnościach, z którymi spotykałem się w czasie wykonywania tej pracy.

P i ś m i e n n i c t w o .

1. Neubauer - Huppert. 1910. Analyse des Harnes. 1 (585, 645).
2. Henriques V. 1909. Z. physiol. Chemie. 60 (2).
3. Rzętkowski K. 1916. Badania nad zachowaniem się kw. aminowych w ustroju ludzkim. Kasa im. J. Mianowskiego w Warszawie.
4. Peters and v. Slyke. 1936. Quant. clinic. Chemistry. 1 (39).
5. Lambing. 1921. Précis de biochemie. (340, 327, 304, 319).
6. J. Browiński i S. Dąbrowski. 1911. Bull. Acad. des Sciences. Cracovie (589).
7. v. Slyke D. 1923. Abderhaldens Handb. der biol. Arbeitsmeth. Abt. I. Bd. 7. Eiweiss, Abbauprod. (296).
8. Bądzynski, Dąbrowski i Panek. 1906. Rozpr. Wydz. Matem. Przyrodn. Akad. Um. 45 (429).
9. Bądzynski S. 1925. Bull. Soc. Chim. Biol. 7 (79).
10. Głagolew P. 1914. Z. physiol. Chem. 89 (432).
11. Cole S. W. 1933. Practica physiol. Chemistry (338).
12. Dąbrowski S. 1907. Rozpr. Mat. Przyr. Akad. Umiej. 47 (455).
Idem. 1907. Z. phys. Chemie. 54 (205).
13. Gawiński W. 1908. Rozpr. Wydz. Mat. Przyr. Akad. Umiej. 48 (405, 415).

14. Giedroyć W. 1926. Bull. Soc. Chim. Biol. 8 (222). 1924. Kosmos (49).
15. Pohorecka — Lelesz B. 1924. Kosmos (1154).
oraz 1926. Bull. Soc. Chim. Biol. 8 (18).
16. Abderhalden. 1923. Handb. Biol. Arbeitmeth. Abt. I. Bd. VII.
Chem. Met.
17. Pohorecka - Lelesz B. 1927. Bull. Soc. Chim. 9 (263).
18. Dąbrowski S. i Kozłowski S. 1922. Bull. Soc. Chim. Biol. 4
(71 — 79).
19. Dąbrowski S. 1914. Bull. Acad. d. Scienc. Cracovie. Ser. A. (309).
20. Gwóźdź B. 1934. Bull. Soc. Chim. Biol. 16 (215).
21. Terroine E. 1933. Le métabolisme de l'azote (391).

[Institut für medizinische Chemie der Universität Lwów].

P. Ostern und J. Guthke.

Vergleichende Untersuchungen über die Glykogenolyse ¹⁾.

In vergleichenden Untersuchungen über die Muskelglykogenolyse bei verschiedenen Tieren ergaben sich einige interessante Befunde. Speziell berücksichtigt wurde die Reaktion zwischen Glykogen und anorganischen Phosphaten, welche im glykogenolytischen Abbauschema von P a r n a s und O s t e r n als eine der ersten Reaktionen aufgefasst wird. Die Versuche wurden an autolysierten Muskelextrakten und zum Teil an frischem Muskelbrei durchgeführt.

Das pH-Optimum für die Phosphorolyse von Glykogen in autolysierten (Adenosintriphosphorsäure- und Adenylsäure-freien) Kaninchenmuskelextrakten liegt ziemlich scharf bei pH 7.2. Die Geschwindigkeit der Phosphorylierung ist erheblich, so wird zum Beispiel bei Zusatz von äquimolekularen Mengen von Glykogen und anorganischem Phosphat (je ein ml ¹/₁₀ m Lösung) zu 6 ml Extrakt binnen einer Stunde das gesamte zugesetzte Phosphat gebunden. Ganz ähnlich liegen die Verhältnisse bei der Taubenmuskulatur, etwas langsamer dagegen erfolgt die Phosphorolyse des Glykogens in Pferdemuskelextrakten. Negativ verliefen die Phosphorylierungsversuche an der Hunde- und Fischmuskulatur und nach Bestimmungen von Frl. M o c h n a c k a auch an menschlichen Muskeln. Zum Vergleich sei folgender Versuch zitiert:

Von zugesetzten 3.1 mg P gebunden nach:	15	30	60 Minuten
Taubenmuskelextrakt :	1.82 mg	2.55 mg	3.7 mg
Karpfenmuskelextrakt :	—	—	—

¹⁾ Zusammenfassung des Vortrages, der während der Sitzung der Polnischen Physiologischen Gesellschaft am 9.VI.1937 abgehalten wurde.

Die negativen Phosphorylierungsversuche sprechen nicht dagegen, dass in der Muskulatur dieser Tiere die Phosphorolyse von Glykogen in der gleichen Weise vor sich geht, wie etwa im Kaninchenmuskel, zeigen jedoch, dass trotz derselben Bereitung der Extrakte das phosphorylierende Enzym — falls es vorhanden ist — nicht in Lösung geht. (Desmoenzym?).

Autolytierte Fischmuskelextrakte bilden nach Zusatz von Adenosintriphosphorsäure aus Glykogen nur Spuren von Milchsäure. Auch die in Frosch- und Kaninchenmuskelextrakten rasch verlaufende Phosphorylierung von Glykogen durch Adenosintriphosphorsäure wird vermisst. Ebensovienig vermögen die Extrakte Phosphoglycerinsäure in Gegenwart von Adenylsäure aufzuspalten. Auch im frischen Muskelbrei erfolgt die Milchsäurebildung und Phosphorylierung von Glykogen nur in sehr geringem Ausmasse. Dies ist umso erstaunlicher als der Fischmuskel (wir untersuchten sowohl fette als magere Süßwasserfische) sehr beträchtliche Mengen von Adenosintriphosphorsäure und Phosphokreatin enthält. Wir fanden im frischen Fischmuskel folgende Verteilung der Phosphatfraktionen:

Anorganischer - P	:	66.4 mg%
Phosphokreatin - P	:	33.6 „
Adenosintriphosphorsäure - P	:	32.0 „
Gesamt - P	:	163.6 „

Die gesamte Adenylsäure liegt in Form von Adenosintriphosphorsäure vor; die traumatische Ammoniakbildung deckt sich mit der Menge des Ammoniakstickstoffs, welcher aus der bei pH 7 vorgenommenen Bariumfällung (Adenosintriphosphorsäure - Fraktion) abgespalten werden kann. Das Molekularverhältnis von abgespaltenem NH_3 zu abspaltbarem Phosphor ist wie 1 : 2. Der Abbau der Adenosintriphosphorsäure erfolgt sowohl im Muskelbrei als auch im Extrakt durch Abspaltung der labilen P-Reste in Form von anorganischer Phosphorsäure und nachfolgende Desaminierung der Adenylsäure.

Zieht man die quantitativen Verhältnisse in der Fischmuskulatur in Betracht, so ergibt sich der überraschende Schluss, dass das gesamte Glykogen beim anaëroben — über die gewöhnlichen Phosphorylierungsstufen verlaufenden — Zerfall zu Milchsäure nicht imstande wäre die Adenosintriphosphorsäure und

das Phosphokreatin zu restituieren. Die Menge des Glykogens wird in der Fischmuskulatur zu etwa 100 mg % angesetzt; eine Glukoseeinheit des Glykogens (180 mg) kann unter anaëroben Bedingungen maximal zwei Phosphorsäuremoleküle (62 mg) übertragen (Fruktosediphosphorsäure). Durch 100 mg Glykogen können also 35 mg P für Phosphorylierungen bereitgestellt werden, während die Menge von abspaltbarem Adenosintri-phosphorsäure - P und Phosphokreatin - P beinahe das Doppelte beträgt. In der Froschmuskulatur liegen die Verhältnisse ganz anders — die beim Zerfall von Adenosintri-phosphorsäure und Phosphokreatin freiwerdende Energie (z. B. Jodessigsäurevergiftung) beträgt nur $\frac{1}{4}$ derjenigen, welche beim anaëroben Zerfall von Glykogen zu Milchsäure zur Verfügung gestellt werden kann. Die Glykogenvorräte sind hinreichend, um die gespaltene Adenosintri-phosphorsäure und das Phosphokreatin mehrfach zu rephosphorylieren.

Für die Fischmuskulatur müssen demnach andere Restitu-tionsvorgänge als die anaërobe Glykogenolyse in Erwägung ge-zogen werden. Der Wiederaufbau von Adenosintri-phosphor-säure und Phosphokreatin kann zum grossen Teil nur in der Aërobiose erfolgen. In Anbetracht der geringen Kohlehydrat-vorräte ist bei mageren Fischen vor allem an eine Energieliefe-rung durch Zerfall von Muskeleiweiss zu denken, welches bekanntlich bei Fischen ein ziemlich labiler Baustein ist. Ob dies im Muskel selber geschieht, oder nach Umbau durch andere Organe muss dahingestellt werden. Es ergibt sich jedoch der Schluss, dass für die Tätigkeit der Fischmuskeln die Kohlehy-dratreserven eine geringfügige Energiequelle darstellen, und dass diese Muskeln im grösseren Masse von den Fetten bei fetten Fischen, von den Eiweissstoffen der Muskeln bei mageren Fischen abhängen, als beim Frosch und dem Warmblüter; wenn auch der unmittelbare Mechanismus der Kontraktion der glei-che sein mag.

[Institute of Physiology of the Józef Piłsudski University, Warsaw].

Br. Zawadzki.

The nervous impulse and the neuro-humoral transmission.

Brown and Feldberg (36) suggested that the wave of mobilized K ions accompanying the nerve impulse liberates acetylcholine (A. Ch.) at the nerve terminals. As the threshold for the stimulating effect of KCl on the ganglion is very near to, if not identical with, the threshold for the appearance of A. Ch. in the venous outflow, Eccles has suggested that the A. Ch. liberated in a ganglion by preganglionic stimulation plays only a subsidiary role, and that the actual transmission is by the K ions conveying „eddy currents” set up by the preganglionic impulses. This possibility was ruled out by Brown and Feldberg's experiments, in which they studied the action of curarine on the ganglion. In appropriate doses, curarine inhibits the activity of ganglion cells with reference to preganglionic impulses, and to A. Ch., but does not influence the reactivity of the cells to KCl. During curarine paralysis the liberation of A. Ch. from preganglionic nerve terminals remains unchanged. The authors hence draw the conclusion that K ions are not directly responsible for transmission. These authors did not, however, appear to have considered the circumstance that the action of curarine is not in agreement with their hypothesis that A. Ch. is liberated in the ganglion by K ions, since, if the thresholds for stimulation of the cells, and for liberation of A. Ch. are identical, then, in view of the fact that A. Ch. is liberated in spite of the action of curarine, the concentration of K ions would have to be high enough to liberate A. Ch., and hence to

¹⁾ Presented before the Warsaw branch of the Polish Physiological Society, 29.IV.1937.

cause excitation of the ganglion. If, however, curarine abolishes reactivity of ganglion cells with respect to preganglionic stimuli, but not to K ions, would follow that the K ions concentration is too low, in these circumstances, to stimulate the ganglion cells, and hence also too low to liberate A. Ch. It follows that A. Ch. is liberated in the ganglion at a sub-threshold concentration of K ions, so that the factor responsible for this is not the K ion concentration or, at least, not only these ions. It appears to us that the connexion between the transmission of the wave of excitation in nerves, and the liberation of chemical transmitters might be conceived as follows.

As is known from numerous researches, both artificial and natural stimulation of cells is associated by an increase in permeability of the cell membrane at the point of action of the stimulus. On the other hand, it follows from Bernstein and Höber theory that increase in the permeability of cell membranes leads to a potential difference between the affected part of the cell surface and the unaffected part, and this in turn gives rise to action currents. The permeability of the membrane surrounding the original area of increased permeability then rises, so that the area of increased permeability shifts from one region of the cell surface to other ones; coincidentally, the permeability reverts to normal at points at which it was formerly augmented. In the case of nerve fibres the state of increased permeability shifts from the point of stimulation to the termination of the fibre. It has been shown by a number of workers that cholinergic nerves (both motor and belonging to the parasympathetic system) contain A. Ch. Since this substance does not diffuse out of resting nerves, but only out of stimulated ones, the supposition might be made that the membrane of nerve fibres is normally impermeable to A. Ch. As a result of increased permeability following stimulation, the A. Ch. may diffuse out of nerve fibre and act on the tissues supplied by the given nerve. This hypothesis may be extended to all types of neuro-humoral transmission, with the difference that in the case of adrenergic nerves sympathin would be liberated during the state of increased permeability, instead of A. Ch. According to this conception, the most important factor in transmission of nervous impulses

would be the shift in the location of the zone of increased permeability from the point of stimulation to the point at which the chemical intermediary is liberated into receptive tissue. The action current would be the result of increased permeability of nerve fibers as well the cause of the shifting of this increased permeability along the fibres.

The liberation of A. Ch. under the influence of K ions, established by Brown, Feldberg and others may readily be explained on the basis of generally known action of K ions in increasing cell membrane permeability.

References.

- Brown G. L. and W. Feldberg. 1936. The action of potassium on the superior cervical ganglion of the cat. *Journ. Physiol.* 86 (290).—
Eccles J. C. 1935. After-discharge from the superior cervical ganglion. *Journ. Physiol.* 84 (50, P).

[Zakład Fizjologii Akademii Medycyny Weterynaryjnej we Lwowie].

A. Klisiecki i C. Wojciechowski.

Wpływ histaminy na ciśnienie w komorze lewej serca¹⁾.

The action of histamine upon the ventricular pressure.

Zbadanie zachowania się ruchu krwi w różnych obszarach krwionośnych (ż. bramna, tętnica kręzkowa, udowa i główna) łącznie z ciśnieniem w t. głównej, doprowadziło do wniosku, że przyczyną histaminowego wstrząsu krążeniowego jest osłabienie sprawności lewej komory serca¹⁾. Dowodem ostatecznym na to jest fakt, że ruch krwi w t. głównej po wlewniu histaminy do przedsionka lewego słabnie gwałtownie już w drugiej sek. i nie wykazuje przyśpieszenia, któreby zjawiać się musiało, gdyby przyczyną wstrząsu było rozszerzenie obwodowych naczyń, skrwawienie się do obwodu, jak twierdzi obecnie panująca teoria wstrząsu. Aczkolwiek wynik tych badań nie pozostawia wątpliwości co do serca jako przyczyny wstrząsu, należało jeszcze zbadać zachowanie się ciśnienia w lewej komorze i w tętnicach.

Ciśnienie w komorze mierzone było manometrem powietrznym (rurą szklaną o świetle 1 mm, wypełnioną do połowy płynem fizjologicznym i zamkniętą u góry), ciśnienie w tętnicach manometrami powietrznymi albo rtęciowymi. Po małych dawkach histaminy, wlewanych do przedsionka lewego lub żyły czezej, ciśnienie skurczowe w komorze wyraźnie maleje, a równocześnie opada ciśnienie w łuku tętnicy głównej i tętnicy palcowej. W opadłym ciśnieniu zjawia się zwolnienie rzutów serca

¹⁾ Rzecz przedstawiona na posiedzeniu Oddziału Polskiego Towarzystwa Fizjologicznego we Lwowie w dniu 9.VI.1937.

²⁾ A. Klisiecki i W. Hołobut. Acta Biol. Exp. Vol. XI. Nr. 2, 1937.

i czasem niemiarowość. Spadek ciśnienia obwodowego nigdy nie wyprzedza spadku ciśnienia komorowego, gdy się histaminę poda dożylnie lub do przedsionka. Inaczej jest, gdy histaminę wleje się do tętnicy np. udowej. Ciśnienie w t. palcowej opadać wówczas zaczyna po kilku sekundach, w komorze natomiast zmian w ciśnieniu nie ma przez czas 30—40 sekund. Po tym czasie dopiero, gdy histamina dotrze do komory lewej opada ciśnienie komorowe i tętnicze w całym układzie tętniczym. Po tych ilościach histaminy powraca ciśnienie do stanu wyjściowego w czasie ok. 1.5 min.

Doświadczenia te popierają nasz pogląd, że histamina działa bezpośrednio ujemnie na sprawność komory lewej, i że zmiany w ciśnieniu skurczowym komory lewej wywołują spadek ciśnienia tętniczego, t. j. wstrząs.

Praca została wykonana dzięki zasiłkowi z Funduszu Kultury Narodowej.

[Zakład Chemii Lekarskiej i Patologii Ogólnej Akademii Medycyny
Weterynaryjnej we Lwowie].

Stefan Grzycki i Witold Guca.

**Zmiany chemiczne w mięśniach podczas myoglobinemii
porażennej u konia ¹⁾.**

*Les processus chimiques des muscles au cours de la myoglobi-
némie paralytique chez le cheval.*

En 1930 et 1934 j'ai publié deux communications concernant la maladie dite myoglobinémie paralytique des chevaux, où j'exprimais l'opinion qu'il s'agit dans cette maladie d'une glycolyse incomplète ou bien d'une absence de glycolyse qui aboutit à une hyperglycémie, à une augmentation du phosphore creatinique dans le sang.

L'injection d'insuline menait à rétablissement de l'état normal. J'ai entrepris donc l'étude de cette maladie et je m'efforçais de la provoquer en créant des conditions semblables, à savoir une nourriture abondante comprenant 1 kilo de sucre de canne par jour, un repos complet et une fatigue qui suivait les jours de repos. Je n'ai pas réussi de provoquer la myoglobinémie. J'ai entrepris néanmoins l'analyse du sang et des muscles.

Muscles	Avant		Huit jours sucre	20 min. travail		1 heure trav.	
	1.	2.		1.	2.	1.	2.
Ammoniac mgr %	3.0	(2.5)	5.7	3.3	(3.0)	2.6	(3.6) (adrenal.)
Acide lact.	64.5	(61.4)	121.9	113.0	(61.0)	123.0	(100.0)
P o.	100.0	(74.2)	58.0	46.0	(47.0)	62.2	(27.0)
P minér.	25.5	(21.8)	36.0	—	(26.0)	27.8	(20.0)
P créat.	74.5	(52.4)	21.5	—	(21.0)	34.4	(7.0)
P. hydrol. 7'	105.4	(95.0)	76.0	65.0	(71.0)	93.0	(43.0)
P hydrol. 30'	115.4	(102.0)	89.0	68.3	(74.0)	93.0	(48.0)
P total	139.4	(134.0)	125.0	99.2	(101.0)	122.0	(77.5)
Glycogène	1425.0	(1320)	1875.0	1330.0	(1345)	1470.0	(748)

¹⁾ Rzecz przedstawiona na posiedzeniu Oddziału Polskiego Towarzystwa Fizjologicznego we Lwowie w dniu 9.VI.1937. <http://roim.org.pl>

L'effet de travail est le même dans les deux cas: une diminution des phosphates surtout des phosphates organiques liés à la créatine, une augmentation d'ammoniac et de l'acide lactique.

Chez l'individu normal on voit la tendance de rétablir l'état normal et même le travail prolongé tend à une compensation (cheval 1.). Ainsi pour faire ressortir l'effet du travail nous avons injecté 10 cct d'une solution d'adrénaline à 1% au cheval 2.

L'analyse du muscle d'un cheval malade montre les mêmes changements que l'on observe dans un muscle fatigué, et une injection d'insuline produit le même effet qu'un repos d'un muscle normal, à savoir une augmentation de la teneur en phosphates combinés à la créatine etc.

Muscle	Avant insul.	Après insul.	S a n g		
			avant insul.	après insul.	
Ammoniac mg %	10.6	10.2	Sucre mgr %	220.0	97.0
Acide lact.	53.5	40.0	Acide lact.	45.0	16.9
P o.	49.2	69.0	NH ₃	0.07	0.05
P minéral	16.7	24.2	Créat. + Créatinine	5.0	3.1
P créatine	32.5	44.8	P min.	3.3	2.7
P hydrol. 7'	70.0	98.0	P total	21.2	17.9
P hydrol. 30'	71.7	105.0			
P total	87.7	129.0			
Glycogène	1070	1315			

L'analyse du sang illustre l'effet de l'insuline qui y fait décroître le sucre, les phosphates et la créatine avec la créatinine correspondant à des changements du chimisme musculaire. Il est à noter que le cheval malade après le rétablissement complet avait dans le muscle des quantités énormes du glycogène 3340, 4240, 4820, ce que nous fait supposer que peut être les chevaux enclins à la maladie myoglobulinémique ont une facilité exceptionnelle d'accumuler le glycogène dans les muscles.

Conclusions. La maladie de myoglobulinémie fait l'effet d'une glycolyse incomplète et d'une impuissance de rétablir l'état normal après les changements qui suivent un effort musculaire.

Une décomposition irréversible de l'acide adénylphosphorique semble traduire l'absence de régénération de la phospho-roctéatine et traduit les quantités anormales de l'ammoniac.

W poprzednich pracach ogłoszonych w 1930 i 34 roku, przedstawiono wyniki badań, dotyczące etiologii myoglobinemii porażennej u koni, i wyrażono pogląd, że za przyczynę schorzenia należy uważać niewłaściwą glikogenolizę i brak syntezy powrotnej glikogenu i innych związków chemicznych, ulegających wraz z glikogenem rozpadowi. Pogląd ten opierał się na tym, że we krwi koni chorych znajdowano zawsze znaczne przecukrzenie, zwiększony poziom kreatyny i kreatyniny, zwiększony poziom fosforu nieorganicznego, zwiększone wydzielenie kreatyniny w moczu, a w mięśniu duży rozpad fosforokreatyny, utrzymujący się dłuższy czas mimo spoczynku. Jako jeden z ważnych czynników nasze zapytanie potwierdzających, uważano wpływ insuliny, za pomocą której można było nieprawidłowy obraz krwi zmienić w krótkim czasie na prawidłowy.

Celem obecnych doświadczeń było dalsze badanie tej sprawy, przy czym próbowaliśmy schorzenie wywołać sztucznie, stwarzając koniom takie warunki, w jakich najczęściej choroba się zdarza (intensywne żywienie bogate w węglowodany i kilkudniowy spoczynek, poprzedzający większy wysiłek), co jednak nie dało oczekiwanego skutku. Konie nie chorowały. Mimo to badano u tych koni krew i mięsień w spoczynku i po pracy.

		Początek doświadczenia	Osiem dni dodatku cukru	20 minut pracy w wozie	1 godzina pracy w wozie
Amoniak	mg%	3.0	5.7	3.3	2.6
Kw. mlek.	„	64.5	121.9	113.0	123.0
P o.	„	100.0	58.0	46.0	62.2
P nieorg.	„	25.5	36.5	—	27.8
P f-kreat.	„	74.5	21.5	—	34.4
P hydrol. 7'	„	105.6	76.0	65.0	93.0
P hydrol. 30'	„	115.4	89.0	68.3	93.0
P całkow.	„	139.4	125.0	99.2	122.0
Glikogen	„	1425	1875	1330	1470

Pierwsza kolumna cyfr oddaje warunki spoczynkowe i zwykłe żywienie, mięsień pobrano na koniu stojącym. Druga

kolumna przedstawia dodatek cukru do pożywienia, do pobrania mięśnia konia musiano położyć na stół operacyjny.

Sądząc z ilości amoniaku, widzimy największy rozkład kwasu adenilowego w samym początku wysiłku, za jaki uważać musimy ruchy obronne konia przy kładzeniu na stół. Dłużej trwająca praca powoduje zmniejszenie ilości NH_3 , wahania kwasu mlekowego są nieznaczne, natomiast bardzo wyraźnie zaznacza się spadek wszystkich związków fosforanowych z wyjątkiem fosforu nieorganicznego, który jako produkt rozkładu fosforokreatyny wzrasta. Najlepiej widoczny jest ten spadek w kolumnie trzeciej, w drugiej jest jakgdyby w stadium początkowym, w czwartej zaznacza się powrót do stanu początkowego.

To samo powtórzono na koniu drugim, a dla zwiększenia rozkładu glikogenu podano przed wykonaniem pracy adrenalinę.

		Spoczynek	40-min. praca	Praca po adrenalinie
Amoniak	mg%	2.5	3.0	3.6
Kw. mlek.	„	61.4	61.0	100.0
P o.	„	74.2	47.0	27.0
P nieorg.	„	21.8	26.0	20.0
P f-kreat.	„	52.4	21.0	7.0
P 7'	„	95.0	71.0	43.0
P 30'	„	102.0	74.0	48.0
P całk.	„	134.0	101.0	77.5
Glikogen	„	1320	1345	748

Wyniki powyższe są z poprzednimi zupełnie zgodne, w doświadczeniu z adrenaliną występuje jeszcze jaskrawiej spadek wszystkich związków fosforowych łącznie z całkowitą ilością fosforanów, rozpuszczalnych w kwasach i prawie zupełny rozkład fosforokreatyny.

Wreszcie przedstawimy wyniki uzyskane na koniu klinicznym, dotkniętym myoglobinemią porażenną. Pierwszą analizę wykonano w godzinę po przyprowadzeniu, drugą po podaniu 400 jedn. insuliny i po upływie około 5 godzin.

		Przed insuliną	Po insulinie
Amoniak	mg%	10.6	10.2
Kw. mlek.	„	53.5	40.0
P o.	„	49.2	69.0
P nieorg.	„	16.7	24.2
P f-kreat.	„	32.5	44.8
P 7'	„	70.0	98.5
P 30'	„	71.7	105.0
P całkow.	„	87.0	129.0
Glikogen	„	1070	1315

W pierwszej analizie zaznacza się rozkład glikogenu i spadek ilości fosforanów, zmiany podobne jak podczas wysiłku, są jednak różnice zasadnicze pomiędzy zmianami, towarzyszącymi normalnej glikogenolizie podczas wysiłku, a tymi, które widzimy w mięśniu patologicznym. Ilość amoniaku przekracza najwyższe ilości fizjologiczne, ilość kwasu mlekowego jest raczej za małą, rozkład fosforokreatyny także stosunkowo nie duży. Po insulinie widzimy przywrócenie prawie normalnego składu, tylko amoniak, jako ciało nie wchodzące w powrotną syntezę, pozostaje wysoki.

Po wyzdrowieniu konia i zostawieniu go w zupełnym spoczynku przez trzy tygodnie, badano znowu mięśnie na zawartość glikogenu i fosforu, przyczym oznaczano fosfor w przesączu i w miazdze pozostałej na sączku.

	I	II	III
P przesączu . . .	89.0	105.0	107.0
P miazgi . . .	75.0	53.0	44.5
Suma . . .	164.0	158.0	151.5
Glikogen . . .	3340	4240	4820

Mniej więcej zgodna suma fosforu wskazuje na to, że nie mamy tu do czynienia ze znikaniem fosforu z mięśnia, tylko że przechodzi on w inne połączenia w kwasach nierozpuszczalne. Niespotykany dotychczas wysoki poziom glikogenu pozwala przypuszczać, że jest to konstytucyjna, wyjątkowa skłonność gromadzenia dużych ilości glikogenu, która może równocześnie usposabia do tej choroby. Sprawę obniżenia ilości fosforanów w kwasach rozpuszczalnych podczas pracy należy uważać za fizjologiczną i stale związaną z glikogenolizą, a będącą prawdopodobnie w związku przyczynowym ze skurczem mięśnia.

Pogląd P a r n a s a i jego współpracowników na glikogenolizę mięśniową, jako na cykl procesów zazębiających o siebie, daje się potwierdzić w naszych doświadczeniach. Zaburzenie jednego procesu pociąga za sobą zaburzenia innych. Jako jeden z przykładów podajemy kreatynurię, zawsze spotykaną u koni myoglobinemią dotkniętych. Uważamy to jako następstwo dezamidacji kwasu adenilowego, który się nie regeneruje na A. T. F., a tym samym powstaje brak ciała przerzucającego grupy fosforanowe na kreatynę.

[Service Scientifique des Etablissements Ludwik Spiess i Syn, S. A.,
Varsovie].

M. Gedroyé.

De la non-spécificité de l'hormone du corps jaune.

*L'influence morphogénétique de la testostérone, de l'androsté-
rone, des extraits de placenta animal et de la vitamine E sur
l'utérus¹⁾.*

On a présenté dans ce travail une suite d'expériences démontrant l'influence de la testostérone, de l'androstérone, des extraits de placenta animal et de la vitamine E sur les variations morphogénétiques du développement de l'utérus. Récemment, entre autres, Ruzicka²⁾ a de même attiré l'attention sur une action non-typique de l'hormone masculine et semblable à l'action de la folliculine, c'est-à-dire une forte action du rut. Le plus curieux c'est que obtenu par Ruzicka alkylé dans 17 — androstérone et ses dérivés, selon la communication verbale de Parkes qui fit l'examen biologique des préparations de Ruzicka, démontrent de façon nette et caractéristique l'action de l'hormone du corps jaune „nämlich Proliferation des Endometriums...”.

La plus active se montre la 17-méthyl-testostérone (7 mg = 1 mg progésteron).

Alors l'hormone du corps jaune n'est pas une hormone spécifique déterminant la prolifération et les transformations de l'utérus.

¹⁾ Présenté dans la séance de la Société Physiologique de Pologne du 13.I.1937.

²⁾ Ruzicka: Helv. Chim. Acta XIX, 103, 1936, ibidem 1, XIX, 1936, 89, XIX, 1936. Zusammenhänge in der Reihe der Sexualhormone.

Il a été d'autant plus intéressant de constater l'influence de l'hormone masculine sur les variations de l'utérus que, contrairement à l'hormone féminine, on n'a jamais constaté ni expérimentalement, ni cliniquement une action abortive de l'hormone masculine.

En partant du même principe, il a été intéressant de constater si la vitamine E, douée d'une grande influence sur la sphère génitale animale et humaine, exerce également une influence morphogénétique sur le développement de l'endomètre de l'utérus. Ce problème paraissait d'autant plus urgent que jusqu'à présent les méthodes de standardisation de vitamine antistérilisante exigent une longue période d'essais sur plusieurs générations des animaux de laboratoire.

Les présentes recherches ont été faites sur les lapines de 600 à 700 g. Pour le contrôle on utilisait la méthode de C l a u b e r g et H o h l w e g, appliquée par ces observateurs à la standardisation de l'hormone du corps jaune (c o r p u s l u t e u m).

1. — L'hormone masculine d'origine testiculaire du type testostérone administrée aux lapines impubères après le traitement préparatoire par l'oestrone, provoque le passage de l'endomètre au stade de prolifération à la phase sécrétoire (transformation). L'hormone d'origine testiculaire a souvent une action plus marquée que l'hormone obtenue à partir des urines.

L'hormone masculine d'origine testiculaire, du types testostérone, administrée aux lapines impubères après la préparation par l'hormone masculine des urines, cause la tranformation de l'endomètre du stade de prolifération à la phase sécrétoire, et dans deux derniers cas, l'utérus est plus considérablement développé qu'après la préparation de la phase de prolifération par l'hormone féminine. Les extraits de testicules préparés par l'hydrolyse acide ou alcaline se sont montrés actifs.

L'hormone masculine des testicules administrée pendant 13 jours aux lapines impubères conduit à l'apparition du stade sécrétoire de l'utérus. Par conséquent l'hormone masculine des testicules posséderait les propriétés de provoquer aussi bien le stade de prolifération que le stade sécrétoire de l'utérus. Il serait difficile de savoir si le stade de prolifération de l'utérus est dans ce cas provoqué par la coexistence dans les extraits

des testicules des corps oestrogènes puisque Ruzicka (1. c.) admet une action nette de la testostérone sur la prolifération utérine.

2. — L'hormone masculine des urines, type androstérone, administrée aux lapines impubères avec de l'oestrone, provoque un développement très accentué de l'utérus, aussi bien celui de la couche musculaire que celui de la muqueuse. L'endomètre s'arrête toutefois au stade de prolifération et ce n'est que l'application d'assez grandes doses, 25 à 30 unités de coq, qui donne une transformation partielle d'endomètre.

L'action de l'hormone masculine renforce celle de l'hormone féminine en même temps qu'au moyen des injections de folliculine on n'a pas obtenu, dans les conditions expérimentales données, une hyperplasie aussi notable de l'utérus, comme au moyen de l'hormone masculine des urines.

Le développement de l'utérus sous l'influence de l'hormone masculine des urines après la préparation préalable du stade de prolifération avec la même hormone, reste à ce stade, il apparaît seulement une hypertrophie notable et une hyperémie de l'utérus. Après de fortes doses de l'hormone (25 à 30 unités de coq) il se manifeste un commencement de la phase de transformation.

3. — L'extrait de placenta animal occasionne chez les lapines impubères, après une préparation préalable de la phase de prolifération par la folliculine, une transformation totale de l'endomètre à la phase sécrétoire.

L'administration de l'hormone masculine des testicules et de l'extrait de placenta aux lapines impubères provoque un passage total de l'endomètre à la phase sécrétoire. L'action est plus nette et plus accentuée qu'après l'administration de chacune de ces préparations séparément, même à des doses plus élevées.

La phase de prolifération de l'utérus préparée par l'hormone masculine des urines après l'administration de l'hormone du corps jaune se transforme en phase sécrétoire. L'utérus est plus développé que sous l'influence de la phase de prolifération préparée par l'oestrone.

4. — La conclusion générale que l'on puisse tirer de nos recherches est celle-ci: l'action formatrice de l'hormone du

corps jaune (c o r p u s l u t e u m) sur l'utérus animal n'est pas spécifique; l'hormone masculine des testicules donne la même réaction, que selon la réaction de Cl a u b e r g et l'action de l'hormone féminine pendant la préparation de la phase de prolifération de l'utérus n'est également pas spécifique, car les modifications semblables de l'utérus peuvent être provoquées au moyen de l'hormone masculine des urines. En tout cas, il existe entre l'hormone masculine des urines et l'hormone des testicules une grande différence plutôt quantitative que qualitative dans leur action sur l'utérus.

On pourrait s'attendre que l'hormone mâle du type androstérone et surtout du type de testostérone ait des propriétés antiabortives et une action favorable dans de différents troubles hormonaux.

5. — La vitamine E provoque la transformation de l'endomètre de l'utérus du stade de prolifération au stade de sécrétion (utérus dentellé) à condition qu'on prépare auparavant la phase de prolifération par l'androstérone ou qu'elle soit administrée simultanément avec l'hormone masculine. On ne peut pas obtenir ces résultats quand on prépare le stade de prolifération à l'aide de l'oestrone. Cette méthode pourrait servir pour la standardisation de la vitamine E.

Les quantités de vitamine E indispensables pour provoquer la transformation d'endomètre chez la lapine ne sont pas beaucoup plus grandes que les quantités nécessaires pour maintenir la grossesse normale chez les rats au régime dépourvu de la vitamine E.

Acta Biologiae Experimentalis.

Wskazówki dla autorów:

Do druku są przyjmowane nieogłoszone dotychczas w obcych czasopismach naukowych prace, wykonane w polskich lub zagranicznych zakładach badawczych. Rękopisy (pisane po polsku, ze streszczeniem w jednym z czterech języków kongresowych, nie przekraczającym 10% tekstu polskiego, lub też pisane w języku obcym, z odpowiednim streszczeniem polskim) nie powinny w zasadzie przekraczać objętości jednego arkusza druku. Rękopisy winny być pisane możliwie zwięźle, zupełnie czytelnie (lepiej — maszynowo na interlinii, zaś tekst obcojęzyczny obowiązkowo na maszynie), z marginesem, na jednej stronie kartek (jednakowej wielkości), z określeniem ustępów mniej ważnych (historia zagadnienia, kwestie metodyczne i techniczne, protokoły doświadczeń, spis piśmiennictwa), które będą drukowane *petitem*.

Autorowie są proszeni o nadsyłanie rękopisów w redakcji ostatecznej, wyliczającej zmiany lub uzupełnienia tekstu w czasie korekty.

Uprasza się o przestrzeganie w układzie rękopisu następującej kolejności: 1^o nazwa zakładu, w którym praca została wykonana; 2^o, imię (lub lepiej — tylko inicjały) i nazwisko autora; 3^o tytuł pracy możliwie krótki i ściśle odpowiadający treści w języku polskim i poniżej — w języku obcym; 4^o, streszczenie w jednym z języków kongresowych (jako wzór — komunikaty w C. R. Soc. de Biol.); 5^o, tekst polski; 6^o, polskie streszczenie głównych wyników, o charakterze obiektywnym i w formie, dającej się bezpośrednio użytkować w czasopismach bibliograficznych, 7^o, piśmiennictwo; 8^o, objaśnienie rysunków w tablicach pozatekstowych (w dwu językach).

Podkreślenia: 1^o, rozdziały pracy — trzema liniami ciągłymi; 2^o, nazwiska autorów w tekście — linią przerywaną; 3^o, ustępy tekstu o charakterze wniosków — linią przerywaną; 4^o, nazwy łacińskie w tekście (rodzaje i gatunki zwierząt i roślin, nazwy anatomiczne) oraz tekst obcojęzyczny w tabelach liczbowych, w objaśnieniach rysunków w tekście i do tablic pozatekstowych — jedną linią falistą.

Cytaty: po nazwisku autora, cytowanego w tekście, należy umieścić w nawiasach dwie ostatnie cyfry roku wydania pracy, poprzedzone przecinkiem u góry; np.: Godlewski ('91).

Tabele liczbowe: na oddzielnych kartkach (tego samego formatu, co rękopis), z nagłówkami ogólnymi i kolumnowymi w dwu językach, ułożone oszczędnie (należy unikać kolumn mało wypełnionych), numeracja rzymska.

Rysunki: reprodukcja wyłącznie cynkofotograficzna (kreskowa lub siatkowa), jednobarwna; liczba rysunków możliwie ograniczona; wielkość nieprzekraczająca — po zmniejszeniu (najlepiej do $\frac{2}{3}$) — 50 cm². Objaśnienia do rysunków w tekście (dwujęzyczne) na oddzielnych kartkach — wklejonych w odpowiednie miejsca rękopisu.

Piśmiennictwo, ułożone w porządku alfabetycznym, nazwisk autorów, w formie, przyjętej w bibliografii; 1^o, nazwisko i inicjały imion autora (linia przerywana); 2^o, rok wydania pracy lub książki (cyfra pełna); 3^o, pełny tytuł publikacji; 4^o, skrócony tytuł czasopisma; 5^o, tom (cyfry arabskie, linia falista); 6^o, pierwsza strona pracy (w nawiasie). Np.: Nencki M. und J. Zaleski. 1901. Über die Bestimmung des Ammoniaks in tierischen Flüssigkeiten und Geweben. Zeitschr. physiol. Chem. 33 (193), Opera Omnia. 2 (806).

Autorowie otrzymują 60 odbitek pracy gratis. Odbitki nadliczbowe można nabyć w cenie kosztu (arkusz druku — ok. 45 gr., okładka — 10 gr.) za uprzednim zamówieniem, które należy nadesłać wraz z pierwszym arkuszem korekty.

Treść tomu XI (1937), zes. Nr. 1 i 2.

Nr.Nr.	pp.
1. J. K. Parnas i J. Mochnacka (Lwów). O funkcji kwasu inozynowego w przemianie mięśniowej	1
2. A. Klisiecki i W. Hołobut (Lwów). Historia wstrząsu histaminowego	3
3. B. Umschweif i K. Gibayło (Lwów). Zagadnienie występowania pyrofosforanu w tkankach zwierzęcych	6
4. M. Wierzuchowski i Z. Borkowski (Lwów). Czynniki, wpływające na odzyskanie glikozy w cukrzycy z nadmiaru	8
5. A. Dmochowski und M. Pracowity (Warszawa). <i>Die Amonsulfatmethode für Reinigung der Ejakulat- und Prostataphosphatase</i>	11
6. S. Schilling-Siengalewicz i B. Puchowski (Wilno). Wykrywanie tlenku węgla we krwi przy pomocy fotografii w podczerwieni	13
7. R. Truszkowski and R. L. Zwemer (Warszawa). <i>Experimental hyperpotassaemia in relation to corticoadrenal function</i>	15
8. E. M. Mystkowski (Warszawa). Rola amylazy w glikolizie mięśniowej	16
9. K. Białaszewicz (Warszawa). Zmiany składu chemicznego jedwabników w ostatnim okresie ich życia larwalnego	20
10. N. Balzam (Warszawa). Aseptyczna hodowla zwierząt	43
11. S. Wawrzyńczyk (Wilno). Badania nad pamięcią <i>Spirostomum ambiguum</i> major	57
12. A. Sławiński (Poznań). Erytrocyty jako osmometry	78
13. St. Raszeja (Poznań). O rozmieszczeniu sodu pomiędzy czerwone ciała a osocze	95
14. E. A. Sym (Warszawa). <i>Stickstoffumsatz der Tuberkulosebakterien</i>	104
15. R. Truszkowski and R. L. Zwemer. <i>Effect of cortin injections on blood potassium</i>	106
16. J. K. Parnas (Lwów). Uwagi o destylacji amoniaku przy wykonywaniu oznaczeń kjeldahlowskich w przyrządzie Parnasa i Wagnera	107
17. A. Klisiecki i M. Szabuniewicz (Lwów). Pojemność naczyniowych obszarów psa	111
18. R. Leśkow (Lwów). Pojemność układu tętniczego psa	114
19. M. Moraczewski, St. Grzycki i W. Gućfa (Lwów). Wpływ pożywienia i ilości płynów na wydzielanie kłębuszków, mierzone liczbą Rehberga	115
20. P. Ostern, J. Guthke und B. Umschweif (Lwów). <i>Phosphorylierung von Stärke durch Muskelextrakt</i>	118
21. P. Ostern, J. Guthke, W. Słobodzian und J. Tereszakowć (Lwów). <i>Wird Phosphoglukuronsäure im Muskel umgesetzt?</i>	121
22. J. Reis (Lwów). O 5-nukleotydazie	122
23. B. Umschweif i K. Gibayło (Lwów). Dalsze badania nad związkami wielofosforowymi w komórkach drożdżowych i w mięśniu szkieletowym	124
24. R. Truszkowski and R. L. Zwemer (Warszawa). <i>Variations in plasma and erythrocyte potassium following oral administration of potassium salts</i>	127
25. M. Chejfec (Wilno). Zachowanie się <i>Paramecium</i> w roztworach barwików przyżyłowych	128
26. T. Vieweger i M. Szulzingerówna (Warszawa). Działanie surowicy zwierząt kręgowych na pierwotniaki	150
27. M. Górski (Poznań). O wolnym azocie α -aminowym moczu	157
28. P. Ostern und J. Guthke (Lwów). <i>Vergleichende Untersuchungen über die Glykogenolyse</i>	175
29. Br. Zawadzki (Warszawa). <i>The nervous impulse and the neurohumoral transmission</i>	178
30. A. Klisiecki i C. Wojciechowski (Lwów). Wpływ histaminy na ciśnienie w komorze lewej serca	181
31. S. Grzycki i W. Gućfa (Lwów). Zmiany chemiczne w mięśniach podczas myoglobinemii porażennej konia	183
32. M. Gedroyć (Warszawa). <i>De la non-spécificité de l'hormone du corps jaune</i>	189