

K. BIAŁASZEWICZ.

O roli katalazy w oddychaniu zarodków¹⁾.
(Sur le rôle de la catalase dans la respiration
des embryons).

Według wypowiedzianego poraz pierwszy przez Loewa ('01, '08) i przyjętego przez autorów późniejszych (Chodat i Bach '02, Battelli i Stern '05, Bach '13 i inni) poglądu, rola katalazy polega na usuwaniu z ustroju szkodliwie działającej na plazmę wody utlenionej, która powstaje w skojarzonym szeregu enzymatycznych reakcyj oksydacyjnych.

Przyjmując powyższy pogląd za podstawę rozważań, oczekiwać należy, że każdemu wzmoczeniu procesów utleniania w ustroju winna towarzyszyć wzmoczona produkcja i zwiększony rozkład wody utlenionej pod wpływem katalazy.

W tem ujęciu teoria ochronnego działania katalazy może być poddana próbie w sposób dwojaki: bądź na drodze doświadczalnej — przez taką zmianę natężenia procesów oddechowych, która w myśl teorii powinna pociągnąć za sobą zwiększenie ilości enzymu, rozkładającego wodę utlenioną, bądź też — przez ustalenie zależności między intensywnością oksydacji a zawartością katalazy w tym przypadku, gdy oddychanie samorzutnie ulega bardzo wybitnemu przyśpieszeniu.

¹⁾ Rzecz przedstawiona na posiedzeniu III Wydziału Tow. Nauk. Warsz. w dniu 22 maja 1919 r.

W pierwszym kierunku były prowadzone badania Burge'go ('19), Stehle'go ('19) i Stehle'go i Carty'ego ('20). Autorowie ci wywoływali doświadczalnie zmianę natężenia procesów oddechowych przez umieszczanie zwierząt, posiadających regulację cieplną (kot, królik), w różnych temperaturach, mierząc w czasie doświadczenia produkcję CO_2 i zawartość we krwi katalazy i hemoglobiny. Ostatnie badania Stehle'go i Carty'ego ('20) wykazały brak jakiegokolwiek bądź paralelizmu między intensywnością przemian metabolicznych a zawartością we krwi katalazy i hemoglobiny.

W poszukiwaniach własnych obrałem inną drogę, dążąc do ustalenia współzależności między natężeniem procesów oddechowych a zawartością w ustroju katalazy i jego wrażliwością na trujące działanie wody utlenionej w rozwoju embrjonalnym, w którego czasie szybkość zużywania tlenu znacznie wzrasta (Godlewski '00, Hasselbalch '00, Warburg '08 — '09, Meyerhoff '11, Loeb i Wasteneys '13, Białaszewicz i Błędowski '15, Parnas i Krasińska '21). Przedmiotem moich badań były wyłącznie zarodki żaby płowej (*Rana fusca* L.), u których procesy oddechowe w rozwoju początkowym zostały zbadane przez Godlewskiego ('01), Białaszewicza i Błędowskiego ('15), Parnasa i Krasińską ('21) i w których przez W. Ostwalda ('07) została wykryta obecność katalazy.

Istotnie, uwzględniając jedynie okres rozwoju początkowego, zamknięty w ramach pierwszych 65 — 75 g. rozwoju w temperaturze 20°C , a więc — od momentu zapłodnienia do chwili wyklucia, stwierdzamy (tabl. I), że ilość pobieranego przez sto osobników tlenu zwiększa się z 5·3 do 231·3 mm^3 na godzinę, czyli — wzrasta więcej niż 44-krotnie (por. rys. krzywa O), przy czym szybkość oksydacji zwiększa się zgodnie z przebiegiem krzywej parabolicznej (Białaszewicz i Błędowski '15). Tak wybitnemu przyśpieszeniu utleniania winna towarzyszyć wzmóżona produkcja wody utlenionej.

Gdyby odporność plazmy zarodków na szkodliwe działanie tego ubocznego produktu oksydacji enzymatycznej wzrastała wraz z natężeniem oddychania, to wzmóżona produkcja wody utlenionej nawet przy nieziennej zawartości katalazy mogłaby nie pociągać za sobą zjawisk samozatrucia.

W rzeczywistości — wrażliwość zarodków na wodę utlenioną zmienia się w kierunku wręcz odwrotnym.

TABELA I.

Z pracy K. Białaszewicza i R. Błądowskiego ('15, str. 460, tab. X).
(Emprunté à K. Białaszewicz et R. Błądowski '15, p. 460, tab. X).

№ kolejny pomiaru (№ d'ordre du dosage)	Czas ubiegły od zapłod. (Temps écoulé depuis la fécondation)	Ilość pobranego O ₂ przez 100 zarodków na godzinę (Quantité d'oxygène absorbé pen- dant une heure par 100 em- bryons)	Względna szybkość pobierania tlenu (Vitesse re- lative de l'oxydation)	Stadium rozwojowe zarodków (Stade du développement des embryons)
	h	mm ³		
1	0	5·2	1·0	Jaja niezapłodnione
2	25	16·4	3·1	Początek gastrulacji
3	52	33·1	6·4	Neurula
4	78	77·3	14·8	Przed wykluciem
5	120	231·3	44·5	Wykształcanie się skrzel
6	150	324·3	62·4	Skrzela dobrze rozwinięte
7	170	392·2	75·4	Początek zanikania skrzel

Wrażliwość zarodków na wodę utlenioną badałem, ustalając najniższy wodny roztwór tego związku, w którym po upływie określonego czasu przebywania w t. 20° C następuje śmierć większości osobników, poddanych próbie. Roztwory o różnych, możliwie bliskich sobie stężeniach, w jednakowej w każdej próbie ilości (20 cm³), sporządzano każdorazowo, rozcieńczając wodą destylowaną płyn zasadowy o wiadomej zawartości wody utlenionej, która była sprawdzana mianowanym roztworem KMnO₄. Liczba stosowanych w każdym stadium rozwojowym rozcieńczeń wynosiła od 15 do 20. Zarodki ze wspólnej kultury, pochodzące z jednocześnie zapłodnionych jaj jednej samicy i rozwijające się w termostacie o stałej t. 20° C, były — po usunięciu błony galaretowej — przenoszone w liczbie 20—30 egzemplarzy do naczynek, przy czem resztki wody, przylegającej do błony żółtkowej, usuwano, przepłukując je odpowiednim roztworem wody utlenionej. Sprawdzanie wyników odbywało się po upływie 12-tu godzin.

Zestawione na tabeli II wyniki dwu takich doświadczeń (VII i VIII), przeprowadzonych w różnym czasie na zarodkach z dwu różnych samic, wykazują w kolumnie czwartej najniższe koncentracje, w których następowała śmierć, wyrażone w miligramach wody utlenionej w 100 cm³ wody, zaś w kolumnie następnej — kierunek zmiany i stopień wytrzymałości na działanie trujące tego związku.

TABELA II.

Wrażliwość zarodków żaby na wodę utlenioną.
 Wyniki dwu seryj (VII i VIII) doświadczeń. Roztwór krytyczny wody utlenionej — stężenie najniższe, w którym po upływie 12-tu godzin następuje śmierć.
 Rozwój i próby — w t. 20° C.

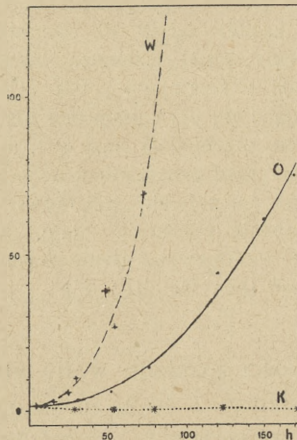
№ porządkowy (№ d'ordre)	№ doświadczenia (№ de l'expérience)	Czas ubiegły od zapłodnienia (Temps écoulé depuis la fécondation)	Najniższy roztwór śmiertelny wody utlenionej (La plus faible concentration mortelle)	Wrażliwość zarodków na H ₂ O ₂ : stosunek koncentracji śmiertelnej początkowej do obecnej koncentracji śmiertelnej (Sensibilité des embryons à l'action de H ₂ O ₂ : unités relatives)	Stadium rozwojowe zarodków (Stade du développement des embryons)
1	VII	1	ca. 30·00	1·0	Początek tworzenia się periwitelinu
2	VII	4	19·02	1·6	8 blastomerów
3	VIII	9	15·85	1·9	Kilkadziesiąt blastomerów
4	VIII	15	9·51	3·1	Blastula drobnokomórkowa
5	VII	24	4·76	6·3	Początek gastrulacji
6	VIII	29	2·85	10·5	Koniec gastrulacji
7	VII	48	0·79	38·0	Neurula
8	VIII	53	1·11	27·0	Zarodki z pączkiem ogonowym
9	VII	72	0·43	69·8	Moment wykluwania się
10	VIII	84	0·16	187·5	Wykształcanie się skrzel zewn.

Sensibilité des embryons de la grenouille à l'action nuisible de l'eau oxygénée.

Les résultats de 2 séries (VII et VIII) d'expériences. La solution mortelle de l'eau oxygénée correspond à la concentration dans laquelle les embryons meurent dans le délai de 12 heures. Temp. de 20° C.

Gdy zarodki żaby w chwili powstawania periwitelinu, t. j. w godzinę po zetknięciu się z nasieniem, znoszą (por. tab. II)

0·03% roztwór wody utlenionej, który nie wywołuje żadnych zmian anormalnych po upływie 12-tu godzin, to w stadium uwalniania się z błon jajowych, t. j. po upływie 72 godzin rozwoju, giną one już w roztworze 0·0004%, czyli — w okresie rozwoju embrjonalnego wrażliwość plazmy zarodków na wodę utlenioną zwiększa się 75 razy, wykazując przebieg charakterystyczny w zależności od stopnia zaawansowania procesów kształtowania (por. rysunek, krzywa W).



Objaśnienie rysunku. Krzywe natężenia oksydacji (O), wrażliwości na wodę utlenioną (W) i zawartości katalazy (K) w zarodkach żaby (*Rana fusca*) w zależności od postępu rozwoju. Odcięta — czas ubiegły od zapłodnienia (w godzinach), rzędna — wielokrotność zmiany w odniesieniu do wartości początkowych (por. tab. I, II i IV).

Fakty powyższe — znaczny przyrost procesów oksydacyjnych wobec jeszcze bardziej wybitnego wzmoczenia wrażliwości na trujące działanie produktu w tych procesach powstającego, tembardziej uzasadniałyby konieczność szybkiego usuwania śladów wody utlenionej. Należało więc przypuszczać, że ilość katalazy w zarodkach wzrasta w miarę rozwoju.

Ilość katalazy była mierzona wielkością stałej (K) szybkości rozkładu jednocząsteczkowego wody utlenionej, obliczoną według wzoru $0·4343 K = \frac{1}{t_2 - t_1} \log \frac{c_1}{c_2}$, gdzie c_1 i c_2 oznaczają koncentracje wody utlenionej, wyrażone w cm^3 mianowanego roztworu nadmanganianu potasu, w czasie t_1 i t_2 od początku reakcji.

Wyciąg enzymu przygotowywano w ten sposób, że określoną liczbę zarodków ścierano starannie z krzemionką w moździerzu, poczem do miazgi dodawano taką ilość wody destylowanej, że jeden cm^3 cieczy zawierał wyciąg z dwu zarodków; części miazgi nierozpuszczalne w wodzie — po uprzednim stwierdzeniu, że nie mają one wpływu na szybkość reakcji katalitycznej — odwirowywano, a 20 cm^3 wyciągu klarownego (z 40-tu zarodków) odpipetowywano do kolby miarowej o pojemności 200 cm^3 .

Po dopełnieniu kolby rozcieńczoną, poprzednio zubożoną, wodą utlenioną (odpowiadającą w przybliżeniu $n/100 \text{ K Mn O}_4$) i po dokładnem przemieszaniu odpipetowywano natychmiast ($t=0$), a następnie — w odstępach dziesięciominutowych ($t_2 - t_1$) w ciągu godziny, stale po 20 cm^3 mieszaniny, którą — po dodaniu do każdej porcji 10 cm^3 stężonego H_2SO_4 , odmiareczkowywano do zabarwienia $n/100$ roztworem K Mn O_4 (por. metodykę, stosowaną przez Sentera '03 i Issajewa '04). Części organiczne wyciągu wiązały minimalne, znajdujące się poza granicami błędu miareczkowania, ilości nadmanganianu. Reakcja przebiegała stale w $t. 0^\circ$ i dlatego ciecze, używane w oznaczeniach, były przed zmieszaniami ochładzane do tej temperatury. W tych warunkach dopiero po upływie godziny stała szybkości reakcji (K) wykazywała wyraźną tendencję zniżkową. Stale, dla każdego stadjum rozwojowego zarodków, były wykonywane dwie równoległe, w dwu próbkach wyciągu, serje miareczkowań (por. tab. III i IV).

Obliczenie szybkości rozkładu wody utlenionej, jaką wywołuje wyciąg wodny katalazy z 40-tu zarodków w dwu momentach ich rozwoju (tab. III), mianowicie — w pierwszych stadjach bródkowania i w chwili wykluwania się, wykazuje, że ilość katalazy w zarodku nie ulega w tym czasie wybitniejszej zmianie ¹⁾.

Wynik ten jeszcze dokładniej uzasadnia następujące doświadczenie (tab. IV), w którym od 5-ej do 172-ej godziny rozwoju zarodków w temp. 20° była wyznaczana w identycznych warunkach pomiaru szybkość rozpadu wody utlenionej: w ciągu całego tego okresu, zakończonego stadjum pełnego rozwoju skrzeli zewnętrznych, względna szybkość reakcji, wywołanej przez katalazę, ujawnia wprawdzie pewne zmiany, lecz zmiany te nie pozostają w żadnym bliżej określonym stosunku do postępu procesów rozwojowych (por. rys. krzywa K).

¹⁾ Według badań Lyona ('09) jaja jeżowców i rozgwiazd zawierają po zapłodnieniu prawie dwukrotną ilość katalazy w porównaniu z jajami niezapłodnionymi.

TABELA III.

№ serii doświadcz. (№ de la série des expériences)	W stadium 4—32 blastomerów (Au stade de 4—32 blastomères)		W chwili wyklucia (Au moment de l'éclosion)		Różnica w porównaniu ze stadium początkowym (Différence entre les deux stades)	
	h ₁ Czas ubiegły od zapłodnienia (Temps écoulé depuis la fécondation)	$0.4343 K = \frac{1}{t_1 - t_2} \lg \frac{C_1}{C_2}$ średnia (moyenne) w dwu równoległych oznaczeniach szybkości rozkładu H ₂ O ₂ (d'après les deux dosages)	h ₂ Czas ubiegły od zapłodnienia (Temps écoulé depuis la fécondation)	$0.4343 K = \frac{1}{t_2 - t_1} \lg \frac{C_1}{C_2}$ średnia (moyenne) w dwu równoległych oznaczeniach szybkości rozkładu H ₂ O ₂ (d'après les deux dosages)		
1	5	0.00155 0.00151	20°	77	0.00083 0.00091	—39%
2	6	0.00159 0.00161	20°	80	0.00160 0.00197	+10%
3	5	0.00076 0.00051	14°	168	0.00082 0.00092	+38%

TABELA IV.

№ porządk. równoległ. oznaczeń (№ d'ordre des dosag. parallèles)	Dzień i godzina (Jour et l'heure)	Czas ubiegły od zapłodnienia (Temps écoulé depuis la fécondation) h	0.4343 K = $\frac{1}{t_2 - t_1} \lg \frac{C_1}{C_2}$		Względna szybkość rozkładu H ₂ O ₂ przez wyciąg z 40-tu zarodków (Vitesses relative de la décomposition de H ₂ O ₂ par l'extrait de 40 embryons)	Stadium rozwojowe zarodków (Stade du développement des embryons)
			w dwu równoległych oznaczeniach szybkości rozkładu H ₂ O ₂ (d'après les deux dosages simultanés parallèles)	średnia (moyenne)		
1	9.IV 14 h.	5	0.00155 0.00151	0.00153	1.0	Ośm blastomerów
2	10.IV 13 h.	28	0.00072 0.00079	0.00076	0.5	Środkowe stadia gastrulacji
3	11.IV 14 h.	53	0.00126 0.00134	0.00130	0.8	Neurula
4	12.IV 13 h.	77	0.00083 0.00091	0.00087	0.6	Przed samem wykluciem
5	14.IV 13 h.	124	0.00117 0.00115	0.00116	0.8	Po wykluciu: wykształcanie się skrzeli zewnętrznych
6	16.IV 13 h.	172	0.00072 0.00100	0.00086	0.6	Skrzela zewnętrzne w pełni rozwoju.

Rezultat ten zgadza się naogół z wynikami badań Zieglera ('15), który stwierdził, że zawartość katalazy w rozwoju embrjonalnym mięczaków (*Limax*) i owadów (*Dixippus*, *Smerinthus*) nie ulega prawie żadnej zmianie.

W wyniku ogólnym niniejszych poszukiwań dochodzimy więc do wniosku, że zawartość katalazy w zarodkach nie znajduje się w związku ilościowym ani z natężeniem procesów oksydacyjnych, ani z wrażliwością ustroju na działanie wody utlenionej.

Rezultat powyższy stanowi dowód pośredni przeciwko hipotezie powstawania wody utlenionej jako produktu oksydacji enzymatycznej.

Przypuszczenie, że jajko zapłodnione zawiera takie zapasy katalazy, które umożliwiają szybki rozkład wody utlenionej nawet w warunkach wielokrotnie wzmożonej oksydacji i wrażliwości na wodę utlenioną, nie wydaje się prawdopodobne, gdyż, jak wykazał Lesser ('06), w porównaniu z innymi narządami żaby, jajniki są najuboższe w katalazę; powstawanie wzgl. aktywowanie enzymów (oksydaz) jest zjawiskiem w rozwoju zwierząt stwierdzonym (Hasebroek '21).

Występowanie zmian głębokich, jakie mogą zachodzić w działaniu katalazy po zniszczeniu struktury plazmatycznej, nie jest wykluczone: zarzut ten dotyczy wyników ogółu badań nad kinetyką enzymów wewnątrzkomórkowych.

PIŚMIENICTWO.

- Bach A. 1913. Oxydationprocesse in der lebenden Substanz. Oppenheimer: Handbuch der Biochemie. Ergänzungsband.
- Battelli F. et Stern L. 1905. Recherches sur la catalase dans l'organisme animal. Arch. di Fisiologia. **2**. (Cyt. według tychże autorów '10).
- Battelli F. et Stern L. 1910. Die Katalase. Erg. d. Physiol. **10**.
- Białaszewicz K. i Błędowski R. 1915. Wpływ zapłodnienia na oddychanie jaj. Spraw. z posiedz. Tow. Nauk. Warsz. **8**.
- Burge W. E. 1919. Journ. of biol. Chem. **37**. (Cytowane wedł. Stehle and Carty '20).
- Chodat R. und Bach A. 1902. Untersuchungen über die Rolle der Peroxyde in der Chemie der lebenden Zelle. Ber. d. deut. chem Ges. **35**. (1275).
- Euler H. 1905. Zur Kenntnis der Katalase. Beitr. z. chem. Physiol. und Pathol. **7**.
- Godlewski E. 1900. Die Einwirkung des Sauerstoffs auf die Entwicklung von *Rana temporaria*. Bull. intern. de l'Acad. des Sc. Cracovie. Również: Arch. f Entw. Mech. **11**. (1901).
- Haserbroek K. 1921. Untersuchungen zum Problem des neuzeitlichen Melanismus der Schmetterlingen. Fermentforschung. **5**.
- Hasselbalch K. 1900. Über den respiratorischen Stoffwechsel des Hühnerembryos. Skand. Arch. f. Physiol. **10**.
- Issajew W. 1904. Über die Hefekatalase. Zeitschr. f. physiol. Chem. **42**.
- Lesser E. J. 1906. Zur Kenntnis der Katalase. Zeitschr. f. Biol. **48**.
- Loeb J. and Wasteneys H. 1913. Die Oxydationsvorgänge im befruchteten und unfertilisierten Seesternei. Arch. f. Entw. Mech. **35**.
- Loew O. 1901. Catalase, a new enzyme of general occurrence, with special reference to the tobacco plant. U. S. Depart. of Agric. Report. № 68. (Cytow. wedł.: Loew '08).
- Loew O. 1908. Zur physiologische Bedeutung der Katalase. Zentralbl. f. Bakter. II. **21**.
- Loew O. 1909. Zur Theorie der Katalasefunktion. Arch. f. ges. Physiol. **128**.
- Lyon E. P. 1909. The catalase of echinoderm eggs before and after fertilization. Amer. Journ. of Physiol. **25**.
- Meyerhoff O. 1911. Untersuchungen über die Wärmetönung der vitalen Oxydationsvorgänge in Eiern. I—III. Biochem. Zeitschr. **35**.
- Ostwald W. 1907. Über das Vorkommen von oxydativen Fermenten in den reifen Geschlechtszellen der Amphibien und über die Rolle dieser Fermenten bei Vorgängen der Entwicklungserregung. Bioch. Zeitschr. **6**.

- Parnas J. K. und Krasieńska Z. 1921. Über den Stoffwechsel der Amphibienlarven. Bioch. Zeitschr. **116**.
- Senter G. 1903. Das Wasserstoffsperoxydzeretzende Enzym des Blutes. Zeitschr. f. physiol. Chem. **44**.
- Stehle R. L. 1919. Journ. of biol. Chem. **39**. (Cyt. według: Stehle and Carty '20).
- Stehle R. L. and Carty A. C. 1920. Further date concerning the alleged relation of catalase to animal oxidations. Journ. of Biol. Chem. **42**.
- Warburg O. 1908. Beobachtungen über die Oxydationsvorgänge im Seeigellei. Zeitschr. f. physiol. Chem. **57**.
- Warburg O. 1909. Über die Oxydationen im Ei. II. Mitteilung. Zeitschr. f. physiol. Chem. **60**.
- Zieger R. 1915. Zur Kenntniss der Katalase niederer Tiere. Bioch. Zeitschr. **69**.
-

R é s u m é.

D'après l'hypothèse de Loew et d'autres auteurs la catalase est un ferment qui décompose le peroxyde d'hydrogène nuisible à l'organisme, formé au cours des oxydations enzymatiques. Prenant comme point de départ cette hypothèse, l'auteur a étudié (aux différents stades du développement des embryons de la grenouille, *Rana fusca*) le rapport entre la quantité d'oxygène absorbé et la sensibilité à l'action de l'eau oxygénée d'une part, et d'autre part — la quantité de catalase contenue dans l'organisme. Les résultats obtenus sont les suivants:

1°. L'intensité respiratoire des embryons de la grenouille augmente au cours de leur développement plus de 44 fois (v. Białaszewicz et Błędowski '15, tableau I du texte polonais et la courbe O — fig. 1), et en même temps leur sensibilité à l'action nuisible de l'eau oxygénée augmente encore plus; ainsi, par exemple: dans les premiers stades de la segmentation les embryons supportent encore une concentration de l'eau oxygénée de 0.03%, tandis qu'au moment de leur sortie de la membrane ovulaire la concentration de 0.0004% leur est déjà mortelle (tab. II et fig. courbe W).

2°. Au cours du développement embryonnaire la quantité de la catalase (mesurée par la vitesse de la décomposition de l'eau oxygénée par un extrait aqueux d'un nombre déterminé d'embryons) ne change presque pas (tableaux III et IV, fig. la courbe K).

3°. Il s'ensuit, qu'il n'y a pas de relation directe entre l'intensité de la respiration des embryons et la quantité de catalase, bien que la sensibilité du cytoplasme à l'action nuisible de l'eau oxygénée augmente avec l'accélération de la respiration.