

23

ACTA
BIOLOGIAE
EXPERIMENTALIS
VOL. VII, 1932.
(pp. 135 — 152)

K. BIAŁASZEWICZ.

SUR LA DÉTERMINATION DU VOLUME DE LA PHASE
DISPERSÉE DANS LES CELLULES VITANTES.

[LABORATOIRE DE PHYSIOLOGIE DE L'INSTITUT NENCKI À VARSOVIE]

VARSOVIE
RÉDACTION ET ADMINISTRATION:
INSTITUT NENCKI (SOC. SCI. VARS.)
8 RUE SNIADÉCKI

Acta Biologiae Experimentalis

Czasopismo, ogłaszające rozprawy naukowe z zakresu fizjologii i chemii fizjologicznej roślin i zwierząt, morfologii doświadczalnej, zoopsychologii oraz dziedzin pokrewnych. Ponadto — dział p. t.: „Bibliographia Polonica“.

Wydawnictwo to ukazuje się w liczbie około dwu tomów rocznie

Tom VI, 1931, (pod redakcją K. BIAŁASZEWICZA) zawiera następujące rozprawy:

E. A. SYM (Warszawa): Badania nad syntetycznym działaniem lipazy w układzie: kwas oleinowy, gliceryna, woda i lipaza w stanie rozpuszczonym. — H. KOWARZYK (Kraków): Promienowanie mitogenetyczne a wpływ ciał lotnych ze zmiądzzonych tkanek cebuli na zjawiska koloidalne — A. ROWIŃSKA (Warszawa): Badania nad zachowaniem się kwasu moczowego we krwi. — T. MANN (Lwów): O domniemanym udziale azotu amidowego białek krwi i mięśni w przemianach chemicznych mięśnia pracującego. — H. P. KRYŃSKA i W. R. WITANOWSKI (Kraków): O przepuszczalności mięśnia względem jonów sodu i potasu. — J. DEMBOWSKI (Warszawa): Dalsze studia nad geotropizmem *Paramecium*. — W. GEDROYĆ i ST. J. PRZYŁĘCKI (Warszawa): Wpływ soli na stężenie jonów wodorowych w roztworach amfolitów. — K. IWASZKIEWICZ and J. NEYMAN (Warsaw): Counting Virulent Bacteria and Particles of Virus. — S. FRAJBERGERÓWNA (Warszawa): Struktura i reakcje enzymatyczne. Część X. Wpływ lepkości i stanu agregacji fazy rozdrobnionej. — A. WOLAŃSKI (Wilno): Studja nad reakcją Manojłowa i niektórymi innymi reakcjami kolorymetrycznymi na pięć u ludzi, zwierząt i roślin. — M. Z. GRYNBERG (Warszawa): Kinetyka działania urikazy. — M. WIERZUCHOWSKI (Warszawa): Przetwarzanie cukrów, wprowadzonych dożylnie ze stałą prędkością. VI. Wpływ hormonów, głodu i czynników pokarmowych na przyswajanie galaktozy i glikozy.

Cena pojedynczego tomu (około 20 arkuszy): w prenumeracie—20 zł. oddzielnie—25 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 Fizjologii Instytutu im. Nenckiego T. N. W. i Stacja Zoologiczna w Neapolu].

K. Białaszewicz.

O oznaczaniu objętości fazy rozdrobnionej w komórkach żyjących.

Sur la détermination du volume de la phase dispersée dans les cellules vivantes.

Rękopis nadesłany w dniu 25.III.1932 r.

Le problème de la relation existant entre le volume de la cellule vivante et la pression osmotique du milieu était l'objet de nombreuses recherches. D'après les recherches d'Hamburger ('98, '01), il existe une proportionnalité inverse entre le volume de la phase aqueuse de la cellule et la pression osmotique du milieu ambiant. Sur ce fait était basée la méthode de la détermination, du volume des substances dispersées dans les érythrocytes. Les recherches ultérieurs (Koepppe '00, Ege '22, '27, Fauré-Fremiet '24, Gough '24, Mc. Cutcheon, Lucké et Hariline '31) ayant aussi principalement trait aux globules rouges, en confirmant en principe les constatations d'Hamburger, n'ont pas donné de résultats concordants en ce qui concerne l'application de sa méthode pour la détermination quantitative de la phase dispersée.

Les recherches présentées dans ce travail avaient pour but d'établir l'exactitude de cette méthode, basée sur les variations du volume des oeufs dans les solutions anisotoniques, ainsi que de déterminer les limites de la pression osmotique dans lesquelles le principe d'Hamburger peut être appliqué par rapport aux cellules-oeufs.

Comme objet des expériences on a pris des oeufs non fécondés des Invertébrés marins suivants: *Phallusia mamillata*, *Para-*

centrotus lividus, *Arbacia pustulosa*, *Echinus microtuberculatus*, *Parechinus milliaris*. Les expériences étaient exécutées comme suit: on immergeait les oeufs pour 20 à 60 minutes dans de l'eau de mer artificielle (préparée d'après Herbst '04) à concentration choisie et on en mesurait les diamètres au moyen d'un oculaire micrométrique. La pression osmotique de l'eau de mer était mesurée par la méthode cryoscopique, au moyen de l'appareil de Deckhuyzen. Les données numériques des tableaux I—VI présentent les volumes des oeufs et la pression osmotique des solutions employées, les deux valeurs étant exprimées en pourcentages de celles trouvées dans l'eau mer à concentration normale.

Nos expériences ont établi en premier lieu que le produit du volume de la phase aqueuse de la cellule et de la pression osmotique du milieu ambiant présente — dans les solutions hypertoniques ne dépassant pas le double de la concentration de l'eau de mer normale — une valeur constante et caractéristique pour chaque espèce d'oeufs. La conformité des valeurs exprimant les volumes cellulaires mesurés et calculés d'après la formule respective (v. p. 138) est tout à fait satisfaisante (fig. 1 et 2).

Le fait établi ci-dessus démontre que la résistance mécanique des couches superficielles des oeufs examinés est insignifiante par rapport aux forces osmotiques des solutions hypertoniques. Il prouve aussi que l'action de l'eau de mer concentrée jusqu'au double ne modifie pas la sémiperméabilité de la membrane plasmatique de l'oeuf à condition que cette action soit de courte durée; elle ne modifie non plus l'absorption de l'eau par les colloïdes cellulaires.

Les variations du volume des oeufs dans l'eau de mer hypertonique ont permis de calculer le volume de la phase dispersée du plasma ovulaire. Les résultats de ce calcul ont donné des valeurs suffisamment concordantes: pour les oeufs de *Paracentrotus lividus* elles comportent 25.1—27.0 vol. p. cent. (v. tabl. II, III), pour ceux d'*Arbacia pustulosa* (tabl. IV) — 36.4, de *Phallusia mammillata* (tabl. V) — 19.3 et d'*Echinus microtuberculatus* — 22.6 (tabl. VI).

Dans l'eau de mer hypotonique les oeufs absorbent de l'eau en quantité plus grande que celle calculée d'après l'équation indiquée plus haut. On peut supposer que dans ces conditions les colloïdes plasmatiques se gonflent par suite de la dilution des

électrolytes dans le liquide intermicellaire de la cellule. Ainsi donc les solutions hipotoniques ne se prêtent pas à la détermination du volume de la phase colloïdale d'après le principe d'Hamburger.

W dziedzinie fizjologii zwierząt autorem, który poraz pierwszy zajął się sprawą zależności między objętością komórki żyjącej a ciśnieniem osmotycznym jej środowiska, był Hamburger ('98). Autor ten stwierdził brak odwrotnej proporcjonalności między objętością czerwonych ciałek krwi, mierzoną za pomocą hematokrytu, a ciśnieniem osmotycznym roztworów soli i glikozy, w których te ciała były zawieszone. Fakt ten nasunął autorowi przypuszczenie, że w krwinkach znajdują się substancje, tworzące przestrzeń martwą („sztywny zrab protoplazmatyczny”, białka i t. p.), których objętość w płynach anizotonicznych zupełnie nie ulega zmianie, powodując w zachowaniu się objętości całej komórki rzekome odchylenie od prawa van't Hoffa — Boyle'a — Mariotte'a. Obliczenia objętości zajętej przez te substancje, wynoszącej według rachunku 53,6—55% objętości krwinek, dały zgodność wystarczającą między teoretycznymi i znalezionymi w pomiarach objętościami całych krwinek, znajdujących się w roztworach o różnym ciśnieniu osmotycznym.

Wyniki, otrzymane przez Hamburgera, spotkały się z krytyką Koeppe'go ('00), który zgodność powyższego założenia z rezultatami pomiarów uważał za przypadkową, twierdząc, iż — pomijając nieściśłość samych pomiarów hematokrytowych — niepodobna ocenić stopnia działania szeregu czynników, wpływających na ostateczną objętość komórki w płynach anizotonicznych. Z pośród tych czynników Koeppe wysuwa znaczenie dysocjacji elektrolitów wewnątrz komórki, wpływ sprężystości błony komórkowej oraz zmian, jakim ulega pod wpływem zabiegów eksperymentalnych jej przepuszczalność względem elektrolitów.

Znacznym posunięciem naprzód interesującej nas tutaj sprawy były badania Egge'go ('22), przeprowadzone również na krwinkach. Wychodząc z założenia Hamburgera, że nie objętość całej komórki, lecz objętość fazy wodnej w komórce (t. j. różnica między znaną objętością komórki a nieznaną objętością jej fazy koloidalnej) jest odwrotnie proporcjonalna do ciśnienia osmotycznego środowiska, autor ten stwierdził zgodność między objętością fazy koloidalnej w czerwonych ciałkach krwi, obliczoną ze wzoru Hamburgera, a objętością tej fazy, znalezioną na podstawie pomiarów krjoskopowych w miazdze z krwinek, wykonanych przed i po

dodaniu określonej ilości nieadsorbującego się przez białka komórkowe cukru gronowego.

Następnie sprawą tą zajmował się Gough (24), który również posługując się zasadą Hamburgera ocenia objętość fazy rozdrobnionej w krwinkach na 65—75%, t. j. wartość, zbliżoną do znalezionej przez Hamburgera (54—55%), znacznie jednak odbiegającą od wyników, otrzymanych poprzednio przez Ege'go (ca. 33% objętości krwinki). Niezgodność tych wyników w porównaniu ze swojami Ege (27) w późniejszej publikacji objaśnia błędem pomiaru objętości krwinek w płynach hipertonicznych, wynikającym z niezupełnej ich sedymentacji w czasie wirowania.

Wreszcie — należy tutaj wymienić publikację Mc. Cutcheona, Lucké'ego i Hartline'a (31) nad właściwościami osmotycznymi jaj *Arbacia pustulosa*, w której autorowie ci, mierząc objętość jaj w wodzie morskiej o różnym rozcieńczeniu i posługując się również wzorem Hamburgera, stwierdzili, że jeśli się uwzględni ilość osmotycznie nieczynnych substancyj, które zajmują od 7 do 14% objętości komórki — to łoż z objętości fazy wodnej i ciśnienia osmotycznego jest wielkością w przybliżeniu stałą.

Zadanie niniejszych poszukiwań polegało na stwierdzeniu stosowalności zasady Hamburgera do komórek jajowych oraz na ustaleniu stopnia dokładności metody oznaczania ilości substancyj rozdrobnionych, opartej na zachowaniu się objętości tych komórek w roztworach anizotonicznych. Nie potrzeba podkreślać, iż możność mierzenia przestrzeni, jaką zajmują w żywej komórce te substancje, ułatwiłaby wyjaśnienie wielu zagadnień, związanych ze zmianami w rozmieszczeniu składników protoplazmatycznych, zachodzącymi pod wpływem zmian funkcjonalnych komórki.

M e t o d a.

Badania niniejsze przeprowadzono na niezaplodnionych jajach następujących gatunków morskich zwierząt bezkręgowych: *Phallusia mamillata*, *Paracentrotus lividus*, *Arbacia pustulosa*, *Echinus microtuberculatus* i *Parechinus milliaris*.

Zasada postępowania polegała na mierzeniu objętości, jaką przybierają ostatecznie komórki jajowe, przeniesione do roztworów wody morskiej o różnym ciśnieniu osmotycznym. Objętość fazy rozdrobnionej obliczano ze wzoru Hamburgera:

$$r = \frac{p_0 v_0 - p_1 v_1}{p_0 - p_1}, \quad (1)$$

z którego, znając objętość jaja w wodzie morskiej o normalnym stężeniu soli (v_0), ciśnienie osmotyczne tego roztworu (p_0), zmienioną objętość jaja w anizotonicznych stężeniach wody morskiej (v_1) oraz wartość ciśnienia osmotycznego tych roztworów (p_1), można obliczyć z szeregu pomiarów średnią bezwzględną objętość, jaką zajmują w komórkach jajowych substancje rozdrobnione (x). Wyrażając za p_1 i v_1 w odsetkach p_0 i v_0 , możemy obliczyć x wprost w procentach objętości komórki.

Szczegóły postępowania były następujące:

Do każdej serii pomiarów używano jaj dojrzałych, dających się zaopłodnić, i pochodzących od jednej samicy. Po wyjęciu z jajnika przemywano je kilkakrotnie zwykłą wodą morską, biorąc do doświadczenia tylko tę porcję jaj, która po skłóceniu opadała na dno naczynia ze średnią prędkością: w ten sposób zyskiwano do pomiarów materiał możliwie jednolity pod względem wielkości jaj. Ostatnie przemywanie uskuteczniano sztuczną wodą morską o normalnym stężeniu i pozostawiano na przeciąg 1—2 godz. w tym celu, aby jaja przybrały postać najbardziej zbliżoną do kulistej. Po upływie tego czasu część jaj przenoszono wraz z kilkoma kroplami na szkiełko przedmiotowe, posiadające wgłębienie, pokrywano szkiełkiem pokrywkowym, brzegi jego oblewano parafiną płynną, i na pewnej liczbie jaj, leżących bliżej środka wgłębienia, wykonywano pod mikroskopem pomiary wielkości osi. Pozostałe jaja wraz z możliwie małą ilością wody przenoszono następnie do szeregu krystalizatorów, napełnionych poprzednio jednakową objętością (ca. 20 cm³) roztworów sztucznej wody morskiej o różnym stężeniu (od 50 do 300% normalnego stężenia). Zawartość krystalizatorów dokładnie mieszano przez pewien czas pałeczką szklaną, biorąc jaja do pomiarów mikrometrycznych, uskutecznianych w wyżej podany sposób, dopiero po upływie przynajmniej 20 min.: jak stwierdziliśmy, jest to czas minimalny, niezbędny do osiągnięcia zupełnej równowagi osmotycznej między komórką jajową a jej zmienionym środowiskiem.

W celu zachowania stałego składu mineralnego i stężenia jonów wodorowych (pH = ca. 8) w roztworach doświadczalnych, przygotowano je przez odpowiednie rozcieńczenie stężonego roztworu zasadniczego, zawierającego sole w stosunku, w jakim znajdują się one w normalnej wodzie morskiej.

Roztwór ten przygotowano według przepisu Herbsta (04) dla sztucznej wody morskiej, biorąc odpowiednią wielokrotność wszystkich wchodzących w jej skład soli, z wyjątkiem jedynie NaHCO₃, który brano w ilości, podanej dla stężenia normalnego. Jako roztworem rozcieńczającym posługiwano się 0.05 lub 0.1% dwuwęglanu sodowego, w zależności od tego czy roztwór zasadniczy był roztworem podwójnie, czy potrójnie stężonym: w większości doświadczeń używano roztworu zasadniczego podwójnie stężonego.

Wartość ciśnienia osmotycznego (p) roztworów doświadczalnych oznaczano krjoskopowo, wyrażając ją w stopniu obniżenia punktu zamarzania.

Pomiary jaj wykonywano pod możliwie dużym powiększeniem (objektywy Leitz a Nr. Nr. 3, 4, 5) z pomocą śrubowego okularu mikro-

metrycznego (Leitza), mierząc dwie najbardziej różniące się wielkością prostopadłe do siebie osie równikowe jaja. Objętość poszczególnych jaj obliczano według wzoru dla elipsoidu obrotowego i wyrażano ją bądź w mm^3 , bądź też w procentach objętości jaj, znajdujących się w wodzie morskiej o normalnem stężeniu soli. W doświadczeniach, w których wykonywano pomiary nie na jednej komórce jajowej, przenoszanej kolejno do różnych roztworów, lecz na większej ilości jaj z każdego roztworu, średnią objętość jaja wyprowadzono z obliczonych objętości wszystkich jaj mierzonych z każdej serji, charakteryzując tę wartość przeciętną wielkością błędu średniego.

Wyniki doświadczeń.

Wyniki naszych doświadczeń zostały przedstawione w tab. I—VI, w których zarówno punkty obniżenia zamarzania roztworów (p), jak i objętości jaj (v) wyrażono w procentach wartości, jakie one posiadają w wodzie morskiej o normalnem stężeniu ($\Delta = 1.26^\circ$), z podaniem ponadto normalnej objętości badanych jaj w jednostkach bezwzględnych (mm^3). W doświadczeniach, w których wykonywano pomiary na większej liczbie jaj w każdym roztworze, przeciętną objętość jaj charakteryzowano wielkością błędu średniego.

Celem stwierdzenia stopnia zgodności wyników pomiarów z teoretycznymi założeniami równania (1) w następnej kolumnie tabel podano objętości jaj obliczone ze wzoru:

$$v = \frac{K}{p} + x$$

Procentową objętość fazy rozdrobnionej w komórce (x) wyprowadzano jako średnią ze wszystkich kombinacyj rachunkowych pomiarów, dokonanych w roztworach jedynie izo- i hipertonicznych; również i w obliczeniu stałej równania (K) nie brano zupełnie pod uwagę pomiarów, wykonanych w roztworach hipotonicznych.

Powyższy sposób obliczania objętości teoretycznej jaj oraz średniej zawartości fazy rozdrobnionej usprawiedliwiają podane poniżej wyniki naszych poszukiwań.

Już pierwsze doświadczenia ujawniły fakt swoistego i zgoła odmiennego zachowania się jaj w roztworach, posiadających mniejsze od normalnego ciśnienie osmotyczne. Okazało się, że gdy

w roztworach hipertonicznych — zgodnie z badaniami poprzednich autorów nad czerwonymi ciałkami krwi — objętość komórek jajowych zachowuje się w ten sposób, jakgdyby istniała w nich przestrzeń, nie ulegająca zmianom pod wpływem zwiększonego ciśnienia osmotycznego, to w płynach hipotonicznych komórki te zwiększają swą objętość tak, jak gdyby ta przestrzeń ulegała, w miarę rozcieńczenia roztworu, stopniowej redukcji. W roztworach o znacznym rozcieńczeniu (przekraczającym 50% zawartości soli) objętość jaj może wzrastać w stopniu nawet znacznie większym od tego, jakiego należałoby oczekiwać w przypadku, gdyby posiadały właściwości komórek *Trubego* i nie zawierały substancyj koloidalnych.

Tabela I.

Objętość jaj *Parechinus milliaris* w trzech stężeniach wody morskiej.
Doświadczenie VIII (4.VIII 1925).

Volume des oeufs de Parechinus milliaris dans trois concentrations d'eau de mer.

Nr. pomiaru <i>Nr. d'observation</i>	Ciśnienie osmotyczne roztworu <i>Pression osmotique de la solution</i> ($1.96^{\circ}\Delta = 100$) <i>p</i>	Objętość jaja <i>Volume de l'oeuf</i> ($149.4 \times 10^{-3} \text{ mm}^3 = 100$) <i>n = 10</i> <i>v</i>	<i>pv</i>
1	50	202.8 + 4.0	10281
2	100	100.0 ± 1.2	10000
3	200	67.4 ± 1.2	13480

Tak np. w jednym z doświadczeń orientacyjnych, przeprowadzonych na jajach *Parechinus milliaris* (tab. I), stwierdzono, że gdy po przeniesieniu do dwukrotnie stężonej wody morskiej ($p = 200$) objętość ich uległa zmniejszeniu zaledwie do 67.4% (zamiast do 50% w razie nieobecności fazy rozdrobnionej), to jaja umieszczone w wodzie morskiej rozcieńczonej do połowy ($p = 50$) zwiększyły swą objętość do 202.8%, t. j. więcej niż dwukrotnie.

Zjawisko to, mające swe źródło w nadmiernym, pobieraniu wody z roztworów hipotonicznych, występuje — jak to wykazały dokładnie i szczegółowo przeprowadzone doświadczenia — u wszystkich badanych przez nas jaj (tab. II, IV, V i VI). Polega ono prawdopodobnie na tem, że wskutek zmniejszenia się stężenia elektrolitów w komórce następuje wiązanie wody przez koloi-

dy, stanowiące fazę rozdrobnioną protoplazmy. W zjawisku zatem pobierania wody przez całą komórkę biorą udział nietylko procesy osmotyczne, zależne od stężenia krystaloidów w cieczy międzycząstkowej protoplazmy, ale również umiejscowione w fazie dyspersyjnej zjawiska pęcznienia składników koloidalnych protoplazmy. Zależnie od intensywności wiązania wody przez koloidy, objętość komórki w roztworach rozcieńczonych może wzrastać, jak już wspomnieliśmy, ponad wartość, przewidzianą przez prawo *van't Hoffa* — *Boile'a* — *Mariotte'a* dla układów osmotycznych, wypełnionych roztworem jednorodnym.

Ilość wody, przedostającej się do komórki w roztworach hipotonicznych, zależy bezwątpienia nietylko od stopnia rozcieńczenia cieczy międzycząstkowej protoplazmy, ale również od swoistych zdolności wiązania wody przez substancje koloidalne. W tabelach naszych wyrazem stopnia wiązania wody przez fazę rozdrobnioną jest wielkość dodatnich odchyień objętości, stwierdzonych w pomiarach, od objętości obliczonych na podstawie zachowania się jaj w roztworach hipertonicznych. Z odnośnych tabel i rys. 1 w samej rzeczy wynika, że stopień odchylenia punktów eksperymentalnych od krzywej teoretycznej wzrasta wraz z rozcieńczeniem wody morskiej (tab. IV, *Arbacia pustulosa*) i że następnie (tab. II i VI)—ilości wody tą drogą pobierane przez różne komórki jajowe (*Paracentrotus lividus*, *Echinus microtuberculatus*), zawierające zbliżoną ilość substancyj rozdrobnionych (25.1 i 22.6%) i znajdujące się w jednakowym rozcieńczeniu ($p = 80.6\%$), mogą znacznie różnić się od siebie.

Opisane zachowanie się jaj w roztworach hipotonicznych rzuca ciekawe bez wątpienia światło na właściwości składników koloidalnych komórki jajowej, które prawdopodobnie są specjalnie wrażliwe na rozcieńczenie elektrolitów w cieczy międzycząstkowej jej protoplazmy. Ostatnio przeprowadzone badania przez *Kamadę* i *Jamamoto* (31) nad wpływem roztworów anizotonicznych na wielkość jaj pierścienicy *Ceratocephale osawai* dowodzą, że opisane przez nas zjawisko nie jest odosobnione: autorowie ci na zasadzie licznych pomiarów i obliczeń stwierdzili również, że im bardziej środowisko otaczające jest rozcieńczone, tem więcej wzrasta wskutek wiązania wody przestrzeń, zajęta w komórce jajowej przez substancje rozdrobnione.

Powyższe właściwość substancyj rozdrobnionych ooplazmy,

silnie adsorbujących wodę w roztworach rozcieńczonych, wyłącza stosowanie roztworów hipotonicznych w oznaczeniach objętości fazy rozdrobnionej według zasady Hamburgera. Zasada ta bowiem przyjmuje stałość wartości x i jej niezależność od stężenia ciał osmotycznie czynnych w środowisku.

Zachodzi pytanie, czy i w jakim stopniu warunek ten zostaje spełniony w roztworach hipertonicznych, czyli — idzie o stwierdzenie, czy zwiększenie stężenia ciał osmotycznie czynnych w komórce wywołuje zmiany wtórne w objętości substancyj rozdrobnionych. Odpowiedź na to pytanie daje porównanie objętości jaj, zmierzonych w tych roztworach, z objętościami obliczonymi ze wzoru (1).

Najbardziej przekonujące w tym kierunku jest jedno z doświadczeń, przeprowadzonych na *Paracentrotus lividus* (tab. II), w którym wszystkie pomiary wykonano na jednym i tem samym jajku, przenoszonym kolejno do roztworów o wzrastającym ciśnieniu osmotycznym.

Tabela II.

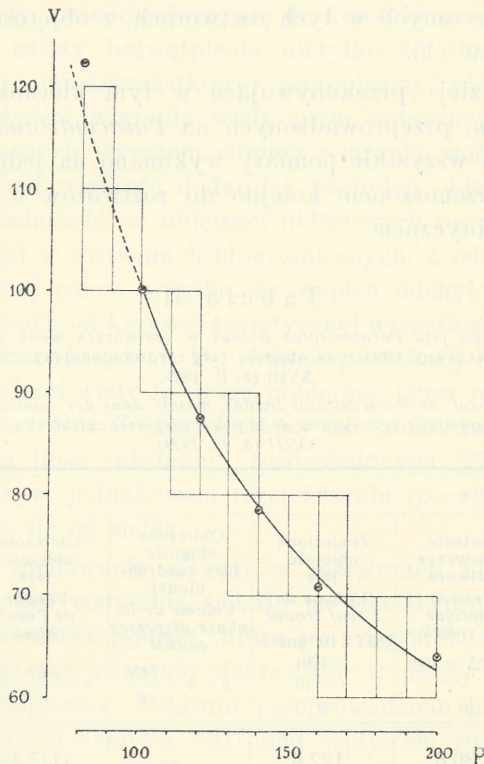
Objętość (v) jednego jaja *Paracentrotus lividus* w roztworach wody morskiej o różnym ciśnieniu osmotycznym (p). Obliczona objętość fazy rozdrobnionej (x) = 25.1%. Doświadczenie XVIII (8. II. 1929).

Volume (v) d'un oeuf de *Paracentrotus lividus*, mesuré dans des solutions d'eau de mer de diverse pression osmotique (p). Volume de la phase dispersée calculée (x) = 25.1%. Espérience XVIII (8. II. 1929).

Nr. obserwacji	a	b	c	d	e
Nr. d'observation	Ciśnienie osmotyczne roztworu Pression osmotique de la solution ($1.96^\circ\Delta = 100$) p	Znaleziona objętość jaja Volume de l'oeuf trouvé ($85.7 \times 10^{-11} \text{mm}^3 = 100$) $n = 10$ v	Obliczona objętość fazy rozdrobnionej Volume de la phase dispersée calculée $x = v - \frac{7478}{p}$	Obliczona objętość jaja Volume de l'oeuf calculé $v = \frac{7478}{x} + 25.1$	b — d
1	80.6	122.6	—	(117.4)	(+4.9)
2	100.0	100.0	25.2	99.9	+0.1
3	120.4	87.5	25.4	87.2	+0.3
4	140.3	78.3	25.0	78.4	-0.1
5	159.7	70.9	24.0	71.9	-1.0
6	199.0	63.9	26.3	62.7	+1.2

Widzimy tutaj, że objętość jaja w roztworach o zwiększającym się stężeniu soli ($p = 100 - 199$) zmniejsza się prawidłowo,

dochodząc w podwójnie stężonej wodzie morskiej do 63.9% wielkości normalnej, czyli do wartości znacznie większej od tej, jaka przybrałaby w tych warunkach komórka Traubego, wypełniona roztworem krystaloidów. Fakt ten wyklucza istnienie odwrotnie proporcjonalnej zależności między objętością całej komórki a ciśnieniem osmotycznym roztworu hipertonicznego, natomiast analiza odnośnych wartości doprowadza do stwierdzenia istnienia takiej zależności między ciśnieniem osmotycznym a objętością fazy wodnej, która jest mniejsza od objętości całej komórki o przestrzeń, wypełnioną przez fazę rozdrobnioną.



Rys. 1. Zmiany objętości (v) jednego jaja *Paracentrotus lividus* w roztworach wody morskiej o różnym ciśnieniu osmotycznym (p). Według danych tab. II.

Fig. 1. Variations du volume (v) d'un seul oeuf de *Paracentrotus lividus* plongé dans des solutions d'eau de mer de diverse pression osmotique (p). D'après les données du tabl. II.

Obliczanie objętości tej fazy w jajach, traktowanych różnymi roztworami hipertonicznymi, dowodzi, że nie ulega ona zmianom jednokierunkowym w zależności od ilości odciągniętej z komórki

wody (tab. II, kol. c) i nie zmienia się, jak to wynika z doświadczenia, podanego w tab. I — nawet w trzykrotnie stężonej wodzie morskiej. Odchylenia od średniej wartości x , równej 25.1% (kol. c), są w rozpatrywanym doświadczeniu wyjątkowo małe i prawdopodobnie znajdują się w granicach błędu pomiaru objętości całego jaja. Dzięki temu też stwierdzamy wystarczającą zgodność między punktami, odpowiadającymi znalezionym objętościom komórki w roztworach hipertonicznych, a przebiegiem krzywej teoretycznej, obliczonej dla $x = 25.1\%$ (por. rys. 1).

Tabela III.

Objętość jaj *Paracentrotus lividus* w roztworach hipertonicznych wody morskiej. Obliczona objętość fazy rozdrobionej (x) = 27.0%. Doświadczenie XII (10. VIII. 1925).

Volume des oeufs de Paracentrotus lividus dans des solutions hypertoniques d'eau de mer. Volume de la phase dispersée calculé (x) = 27.0%. *Expérience XII (10. VIII 1925).*

Nr. obserwacji Nr. d'observation	Ciśnienie osmotyczne roztworu <i>Pression osmotique de la solution</i> (1.96° Δ = 100) p	Objętość jaja <i>Volume de l'oeuf</i>		a - b
		znaleziona <i>trouvé</i> (107.3 × 10 ⁻³ mm ³ = 100) $n = 10$ v	obliczona <i>calculé</i> $v = \frac{7414}{p} + 27.0$	
1	100	100.0 ± 1.5	99.1	+0.9
2	150	73.9 ± 1.6	76.4	-1.5
3	200	64.7 ± 2.1	64.1	+0.6
4	225	59.2 ± 0.6	60.2	-1.0
5	300	53.5 ± 1.4	52.4	+1.1

Tabela IV.

Objętość jaj (v) *Arbacia pustulosa* w roztworach wody morskiej o różnym ciśnieniu osmotycznym (p). Obliczona objętość fazy rozdrobionej (x) = 36.4%. Doświadczenie XXa (16. II. 1929).

Volume des oeufs d'Arbacia pustulosa dans des solutions anisotoniques d'eau de mer. Volume de la phase dispersée calculé (x) = 36.4%. *Expérience XXa (16. II. 29).*

Nr. obserwacji Nr. d'observation	Ciśnienie osmotyczne roztworu <i>Pression osmotique de la solution</i> (1.96° Δ = 100) p	Objętość jaja <i>Volume de l'oeuf</i>		a - b
		znaleziona <i>trouvé</i> (121.6 × 10 ⁻³ mm ³ = 100) $n = 10$ v	obliczona <i>calculé</i> $v = \frac{6379}{p} + 36.4$	
1	60.7	158.9 ± 3.3	(141.5)	(+17.4)
2	80.6	125.3 ± 3.7	(115.5)	(+ 9.8)
3	100.0	100.0 ± 2.6	102.2	- 0.2
4	120.4	89.5 ± 3.9	89.4	+ 0.1
5	159.7	76.7 ± 2.4	76.4	+ 0.3
6	199.0	68.2 ± 1.1	68.5	+ 0.3

Tabela V.

Objętość jaj (v) *Phallusia mamillata* w roztworach wody morskiej o różnym ciśnieniu osmotycznym (p). Obliczona objętość fazy rozdrobnionej (x)=19.3%. Doświadczenie XXVI (21.II.1929)
Volume des oeufs de Phallusia mamillata dans des solutions anisotoniques d'eau de mer.
Volume de la phase dispersée calculé (x)=19.3% Expérience XXVI (21.II.1929).

Nr. obserwacji Nr. d'observation	Ciśnienie osmotyczne roztworu <i>Pression osmotique de la solution</i> (1.95° Δ = 100) p	Objętość jaja <i>Volume de l'oeuf</i>		a - b
		znaleziona <i>trouvé</i> (938.1 × 10 ⁻⁴ mm ³ = 100) $\frac{n}{v} = 10$	obliczona <i>calculé</i> $v = \frac{8100}{p} + 19.3$	
1	80.6	126.3 ± 2.9	(119.5)	(+6.5)
2	100.0	100.0 ± 0.8	100.3	-0.3
3	140.3	77.6 ± 0.5	77.0	+0.6
4	159.7	69.9 ± 0.6	70.0	-0.1
5	179.6	63.9 ± 0.3	64.4	-0.5
6	199.0	60.3 ± 0.9	60.0	+0.3

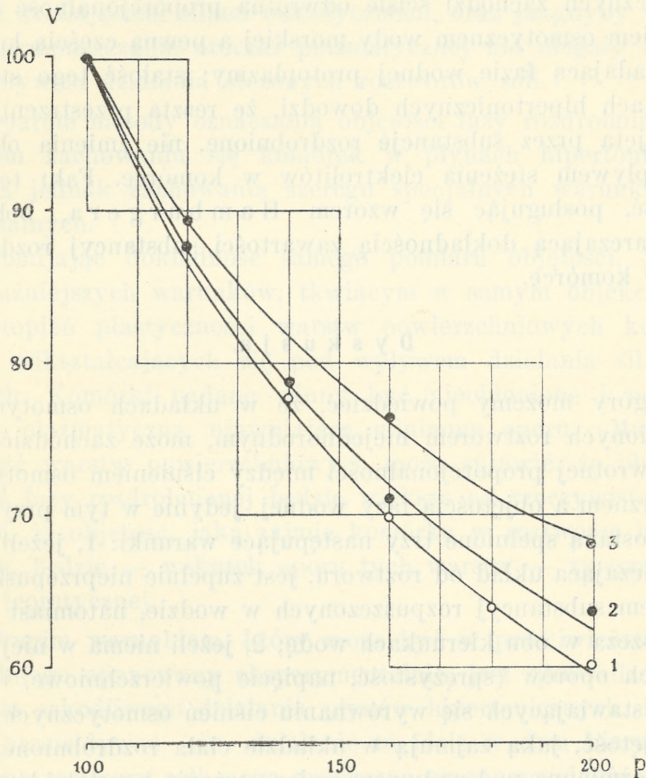
Tabela VI.

Objętość jaj (v) *Echinus microtuberculatus* w roztworach wody morskiej o różnym ciśnieniu osmotycznym (p). Obliczona objętość fazy rozdrobnionej (x) = 22.6%. Doświadczenie XX b (16. II. 1929).
Volume des oeufs d'Echinus microtuberculatus dans des solutions anisotoniques d'eau de mer.
Volume de la phase dispersée calculé (x) = 22.6%. Expérience XX b (16. II. 1929).

Nr. obserwacji Nr. d'observation	Ciśnienie osmotyczne roztworu <i>Pression osmotique de la solution</i> (1.96° Δ = 100) p	Objętość jaja <i>Volume de l'oeuf</i>		a - b
		znaleziona <i>trouvé</i> (124.5 × 10 ⁻⁴ mm ³ = 100) $\frac{n}{v} = 10$	obliczona <i>calculé</i> $v = \frac{7627}{p} + 22.6$	
1	80.6	124.5 ± 1.1	(117.2)	(+7.3)
2	100.0	100.0 ± 1.7	98.9	+1.1
3	140.3	76.1 ± 1.0	76.9	-0.8
4	159.7	70.2 ± 2.2	70.4	-0.2
5	199.0	61.1 ± 0.8	60.9	+0.2

Takiej samej analizy wyników dokonaliśmy w stosunku do doświadczeń, przeprowadzonych na jajach innych gatunków zwierząt morskich (*Arbacia pustulosa*, *Phallusia mamillata*, *Echinus microtuberculatus*, tab. III—VI). W tych jednak doświadczeniach jaja mierzono masowo, wyprowadzając średnią objętość jednego jaja z 10-ciu pomiarów w każdym roztworze. Pomimo większego

popelnianego w tym przypadku błędu, należy uznać we wszystkich doświadczeniach zgodność między wynikami pomiarów a założeniem równania (1) za wystarczające (rys. 2). Za szczególnie zadawalający można uznać wynik doświadczenia, przeprowadzonego nad jajami *Phallusia mamillata* (tab. V), które ze względu na stosunkowo małe różnice w wielkości poszczególnych jaj bardziej od innych nadają się do tego rodzaju pomiarów.



Rys. 2. Zmiany objętości jaj (v) *Phallusia mamillata* (krzywa № 1), *Paracentrotus lividus* (№ 2) i *Arbacia pustulosa* (№ 3) w roztworach hipertonicznych wody morskiej ($\Delta = 1.96^\circ$, $p = 100$).

Fig. 2. Variations du volume des oeufs (v) de *Phallusia mamillata* (№ 1), de *Paracentrotus lividus* (№ 2) et d'*Arbacia pustulosa* (№ 3) dans des solutions hypertoniques d'eau de mer ($\Delta = 1.96^\circ$, $p = 100$).

Ogólne wyniki dokonanych przez nas obliczeń objętości fazy rozdrobnionej w jajach przedstawiają się zatem w sposób następujący:

№ tabeli		%
V.	<i>Phallusia mamillata</i>	19.3%
VI.	<i>Echinus microtuberculatus</i>	22.6%
II.	<i>Paracentrotus lividus</i>	25.1%
III.	<i>Paracentrotus lividus</i>	27.0%
IV.	<i>Arbacia pustulosa</i>	36.4%

Reasumując, możemy zatem twierdzić, że w roztworach hipertonicznych zachodzi ściśle odwrotna proporcjonalność między ciśnieniem osmotycznym wody morskiej a pewną częścią komórki. odpowiadającą fazie wodnej protoplazmy; stałość tego stosunku w płynach hipertonicznych dowodzi, że reszta przestrzeni, która jest zajęta przez substancje rozdrobnione, nie zmienia objętości pod wpływem stężenia elektrolitów w komórce. Fakt ten daje możliwość, posługując się wzorem Hamburgera, obliczenia z wystarczającą dokładnością zawartości substancyj rozdrobnionych w komórce.

D y s k u s j a.

Zgóry możemy powiedzieć, że w układach osmotycznych, wypełnionych roztworem niejednorodnym, może zachodzić stosunek odwrotnej proporcjonalności między ciśnieniem osmotycznym zewnętrznym a objętością fazy wodnej, jedynie w tym przypadku, jeżeli zostaną spełnione trzy następujące warunki: 1, jeżeli błona, odgraniczająca układ od roztworu, jest zupełnie nieprzepuszczalna względem substancyj rozpuszczonych w wodzie, natomiast dobrze przepuszcza w obu kierunkach wodę; 2, jeżeli niema w niej znaczniejszych oporów (sprężystość, napięcie powierzchniowe, i t. p.), przeciwstawiających się wyrównaniu ciśnień osmotycznych; 3, jeżeli objętość, jaką zajmują w układzie ciała rozdrobnione, pozostaje niezmienna pod wpływem zmian stężenia krystaloidów w cieczy międzycząstkowej.

Jak stwierdziliśmy, komórki jajowe czynią zadość powyższym warunkom jedynie w roztworach hipertonicznych. Gdy mianowicie w wodzie morskiej rozcieńczonej zmniejszenie koncentracji elektrolitów powoduje nadmierne pobieranie wody wskutek jej wiązanie przez koloidy komórkowe, to w hipertonicznych roztworach komórka traci wodę w ten sposób, jakgdyby ogólna objętość substancyj rozdrobnionych była wielkością niezmienną, nie-

zależną od zwiększonego stężenia elektrolitów wewnątrz komórki. Zgodność pomiarów objętości jaj z założeniami równania, określającego stosunek objętości fazy wodnej komórki do ciśnienia osmotycznego roztworu, dowodzi ponadto, że komórki jajowe w roztworach hipertonicznych czynią również zadość dwu pozostałym warunkom układu osmotycznego: mianowicie, zachowują się one w ten sposób, jakgdyby wielkość oporów, stawianych przez warstwy powierzchniowe cytoplazmy, była znikomo mała w porównaniu z działającymi siłami osmotycznymi, oraz jakgdyby własności półprzepuszczalne otoczki plazmatycznej nie ulegały zmianie pod wpływem działania stężonych roztworów soli.

Oparcie metody oznaczania objętości fazy rozdrobnionej na opisanem zachowaniu się komórek w płynach hipertonicznych wymaga jednak zachowania szeregu specjalnych warunków doświadczalnych.

Pomijając dokładność samego pomiaru objętości, jednym z najważniejszych warunków, tkwiącym w samym obiekcie, jest duży stopień plastyczności warstw powierzchniowych komórki, biernie odkształcających się pod wpływem działania sił osmotycznych. Komórki badane winny być nieoblężone i posiadać otoczkę plazmatyczną, ujawniającą minimum oporu. Mała plastyczność warstw powierzchniowych może sprawić, że obliczona objętość fazy rozdrobnionej będzie większa od rzeczywistej dzięki temu, że objętość, jaką zajmie komórka w roztworze hipertonicznym, będzie — wskutek oporu tych warstw — zawsze większa od teoretycznej.

Drugim warunkiem, który może być w przeciwieństwie do poprzedniego opanowany eksperymentalnie, jest sprowadzenie do minimum szkodliwego działania płynów hipertonicznych. Z góry można przewidywać, że działanie to idzie w dwu kierunkach: 1, stężone roztwory soli mogą zwiększać przepuszczalność otoczki plazmatycznej względem ciał rozpuszczalnych, powodując endosmozę elektrolitów i związaną z nią deplazmolizę; 2, mogą one ponadto wtórnie zmniejszać objętość fazy rozdrobnionej, a to wskutek zagęszczenia elektrolitów wewnątrzkomórkowych, wywołując odwodnienie i wytrącanie się ciał koloidalnych. W pierwszym przypadku objętość komórki, jaką zajmie w roztworze hipertonicznym, będzie większa, w drugim zaś mniejsza od teoretycznej, obliczona zaś objętość fazy rozdrobnionej będzie odpo-

wiednio odbiegać od wartości rzeczywistych. Nie wiemy, w jakim stopniu to odwrotne działanie płynów hipertonicznych na ostateczną objętość komórki znosi się nawzajem, w każdym bądź razie może ono stanowić poważne źródło błędu metody.

Zmniejszenia błędu, wypływającego z tego źródła, można dokonać eksperymentalnie albo redukując do minimum czas działania roztworów hipertonicznych, bądź też używając roztworów mało stężonych, lub wreszcie uwzględniając oba te czynniki w stosunku wzajemnym, zapewniającym najlepsze warunki eksperymentu fizjologicznego oraz odpowiednią dokładność samego oznaczenia.

W pierwszym przypadku czynnikiem ograniczającym jest czas, niezbędny do wyrównania ciśnień osmotycznych. W naszych doświadczeniach czas, w którym komórki jajowe osiągały najmniejszą objętość, nie przekraczał, nawet w roztworach najbardziej stężonych, dwudziestu minut.

Druga ewentualność, polegająca na stosowaniu roztworów możliwie mało stężonych, pozostaje w sprzeczności z zasadą dokładnego oznaczenia zawartości substancyj rozdrobnionych w komórce. Gdy bowiem w interesie zachowania fizjologicznych warunków leży utrzymanie stężenia, możliwie mało odbiegającego od stężenia ciał osmotycznych w normalnem środowisku komórki, to warunkiem dokładnego oznaczenia substancyj rozdrobnionych jest osiągnięcie możliwie największej redukcji wielkości komórki, ponieważ błąd, jaki popełniamy w ustaleniu ostatecznej objętości komórki w hipertonji, ma wtedy wpływ stosunkowo najmniejszy na ścisłość oznaczenia objętości fazy rozdrobnionej. Jak to wynika z obliczenia orientacyjnego, w przypadku np. 20% zawartości substancyj rozdrobnionych, błąd jednoprocetowy w pomiarze objętości komórki, znajdującej się w roztworze o $p = 200$, powoduje nieścisłość w oznaczeniu fazy rozdrobnionej, wynoszącą tylko 6%, w roztworze o $p = 150\%$ już 11.4%, zaś przy $p = 110\%$ dochodzi do błędu, równemu 52.6% mierzonej wielkości. W jednakowych pozostałych warunkach błąd ten jest tem mniejszy, im komórka zawiera większą ilość substancyj rozdrobnionych.

Ponieważ zaś dokładność oznaczenia fazy rozdrobnionej zależy od stopnia odciągnięcia wody z komórki, pożądane jest użycie takiego najbardziej stężonego roztworu soli, w którym przy

najkrótszym czasie działania, zależnym od osiągnięcia równowagi osmotycznej, nie następowałyby zmiany wtórne ani w przepuszczalności otoczki plazmatycznej, ani też w stopniu wiązania wody przez koloidy komórkowe. Stosunek wzajemny tych dwu czynników eksperymentalnych, t. j. stopnia hipertoniczności roztworu i czasu jego działania, zależy niezawodnie od właściwości badanego obiektu. W naszych doświadczeniach, przeprowadzonych na niezaplodnionych, dojrzałych komórkach jajowych kilku zwierząt morskich, osiągnęliśmy warunki optymalne, działając w ciągu pół godziny dwukrotnie stężonym roztworem wody morskiej.

Streszczenie wyników.

1°. Metoda oznaczania objętości fazy rozdrobnionej w komórce żyjącej, oparta na zasadzie Hamburgera, przyjmującej odwrotną proporcjonalność między objętością cieczy międzycząstkowej w cytoplazmie a ciśnieniem osmotycznym środowiska, może być stosowana do niezaplodnionych komórek jajowych jedynie w przypadku użycia roztworów hipertonicznych.

2°. Zgodność między objętościami jaj znalezionymi i obliczonymi według wzoru dowodzi, że w warunkach zachowania odpowiedniego stężenia roztworów hipertonicznych oraz czasu ich działania — na ostateczną objętość komórki nie wywiera wpływu ani sprężystość warstw powierzchniowych protoplazmy, ani też ewentualne zmiany w przepuszczalności otoczki plazmatycznej lub w stopniu adsorpcji wody przez koloidy komórkowe.

3°. Odmienne zachowanie się jaj w roztworach hipotonicznych, polegające na nadmiernym pobieraniu wody, autor tłumaczy pęcznieniem koloidów plazmatycznych, następującym wskutek rozcieńczenia elektrolitów w cieczy międzycząstkowej.

Piśmiennictwo.

Białaszewicz K. 1928. Studja porównawcze nad składem cieczy międzycząstkowej komórek jajowych. *Acta Biol. Exper.* 1, Nr. 11. Białaszewicz K. 1929. Recherches sur la répartition des électrolytes dans le protoplasme des cellules ovulaires. *Protoplasma.* 6 (1). Mc. Cutcheon M., B. Lucké and H. K. Hartline. 1931. The osmotic properties of living cells (eggs of *Arbacia punctulata*). *Journ. of gen. Physiol.* 14

(393). Ege R. 1922. Untersuchungen über die Volumveränderungen der Blutkörperchen in Lösungen verschiedenen osmotischen Druck. III Mit.: Studien über das osmotische Verhalten der Blutkörperchen. Bioch. Zeitschr. 130 (99). Ege R. 1927. The dispersed phase of the blood corpuscles. Bioch. Journ. 21 (967). Fauré - Fremiet E. 1924. L'oeuf de *Sabellaria alveolata*. Thèse (Sér. A, Nr. 960). Paris. Gough A. 1924. The nature of the red blood corpuscle. Bioch. Journ. 18 (202). Hamburger H. J. 1898. Ueber den Einfluss von Salzlösungen auf das Valumen tierischer Zellen. Arch. f. (Anat. u.) Physiol. Hamburger H. J. 1901. Osmotischer Druck und Ionenlehre. Bd. I. Wiesbaden. Herbst K. 1904. Ueber die zu Entwicklung der Seeigellarven nothwendigen anorganischen Stoffe, ihre Rolle und ihre Vertretbarkeit. III Teil. Die Rolle der nothwendigen anorganischen Stoffe. Arch. f. Entw.-Mech. 17 (306). Kamada T. and Yamamoto T. 1931. Elastic constant of membrane, non-aqueous space of protoplasm and amount of free solutes in the egg of an Annelid, *Ceratocephale osawai*. Journ. of the Fac. of Sc., Imper. Univ. of Tokyo. Sec. IV. Vol. 2, Part 4 (357). Koeppe H. 1900. Physikalische Chemie in der Medizin. Einführung in die physikalische Chemie und ihre Verwertung in der Medizin. Wien (Hölder). Netter H. 1927. Ueber den nichtlösenden Raum (sog. disperse Phase) und seine Bedeutung für zellphysiologische Probleme. Sammelreferat. Protoplasma. 2 (554).



Drukarnia i Litografia
JAN COTTY
w Warszawie, Kapucyńska 7.