

9

K. Białaszewicz i R. Błędowski.

Wpływ zapłodnienia na oddychanie jaj.

ODBITKA ZE SPRAWOZDAŃ Z POSIEDZEŃ TOWARZYSTWA NAUKOWEGO WARSZAWSKIEGO,
WYDZIAŁ NAUK MATEMATYCZNYCH I PRZYRODNICZYCH,
POSIEDZENIE Z DNIA 10 CZERWCA 1915 ROKU. ROK VIII. ZESZYT 6.

The influence of fertilization on the respiration of eggs.

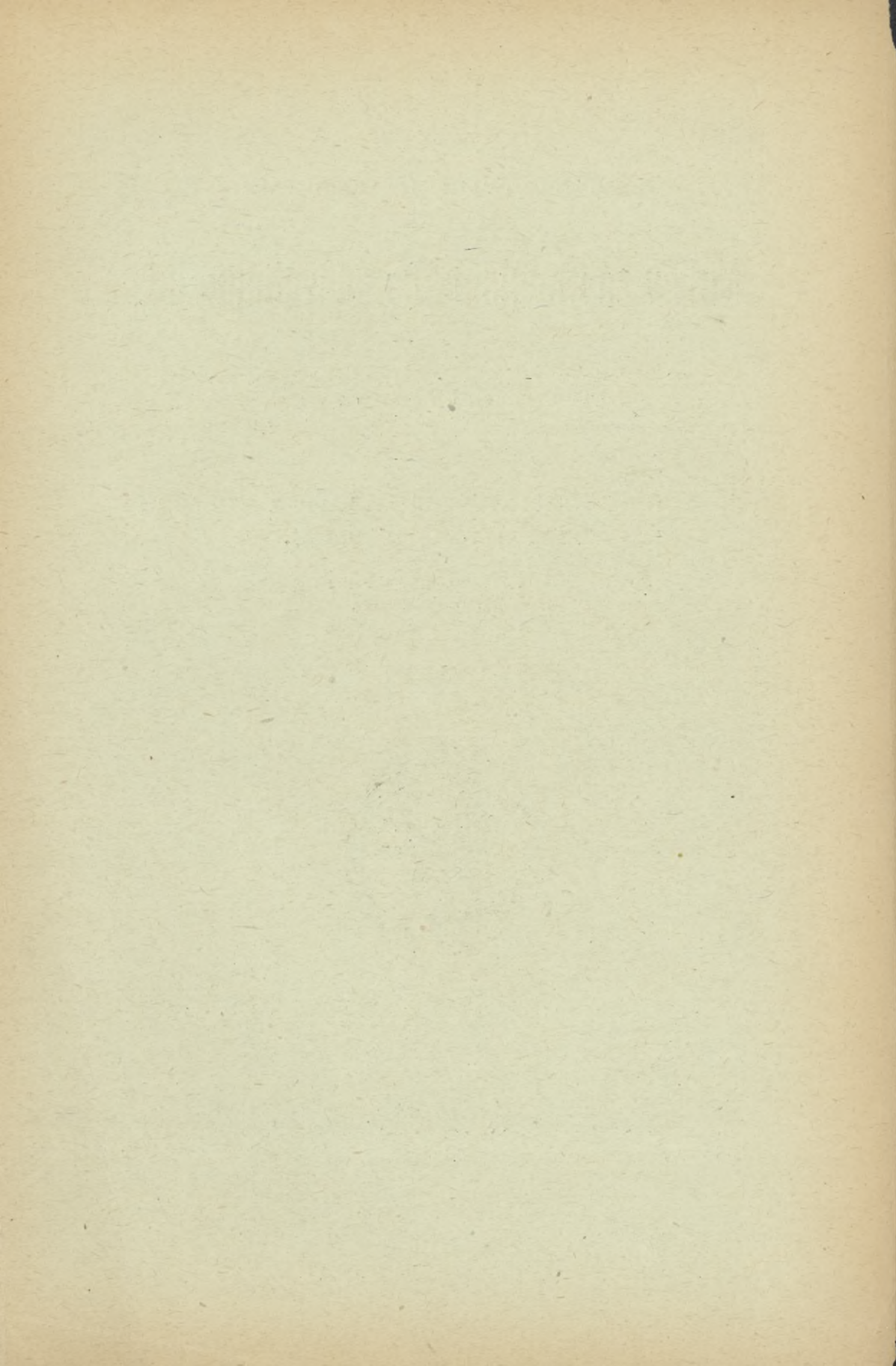
Reprinted from the Proceedings of the Scientific Society
of Warsaw. June 1915.



WARSZAWA.

DRUKARNIA i LITOGRAFIA JANA COTTY, KAPUCYŃSKA 7.

1915.



K. Białaszewicz i R. Błędowski.

Wpływ zapłodnienia na oddychanie jaj.

ODBITKA ZE SPRAWOZDAŃ Z POSIEDZEŃ TOWARZYSTWA NAUKOWEGO WARSZAWSKIEGO,
WYDZIAŁ NAUK MATEMATYCZNYCH I PRZYRODNICZYCH,
POSIEDZENIE Z DNIA 10 CZERWCA 1915 ROKU. ROK VIII. ZESZYT 6.

The influence of fertilization on the respiration of eggs.

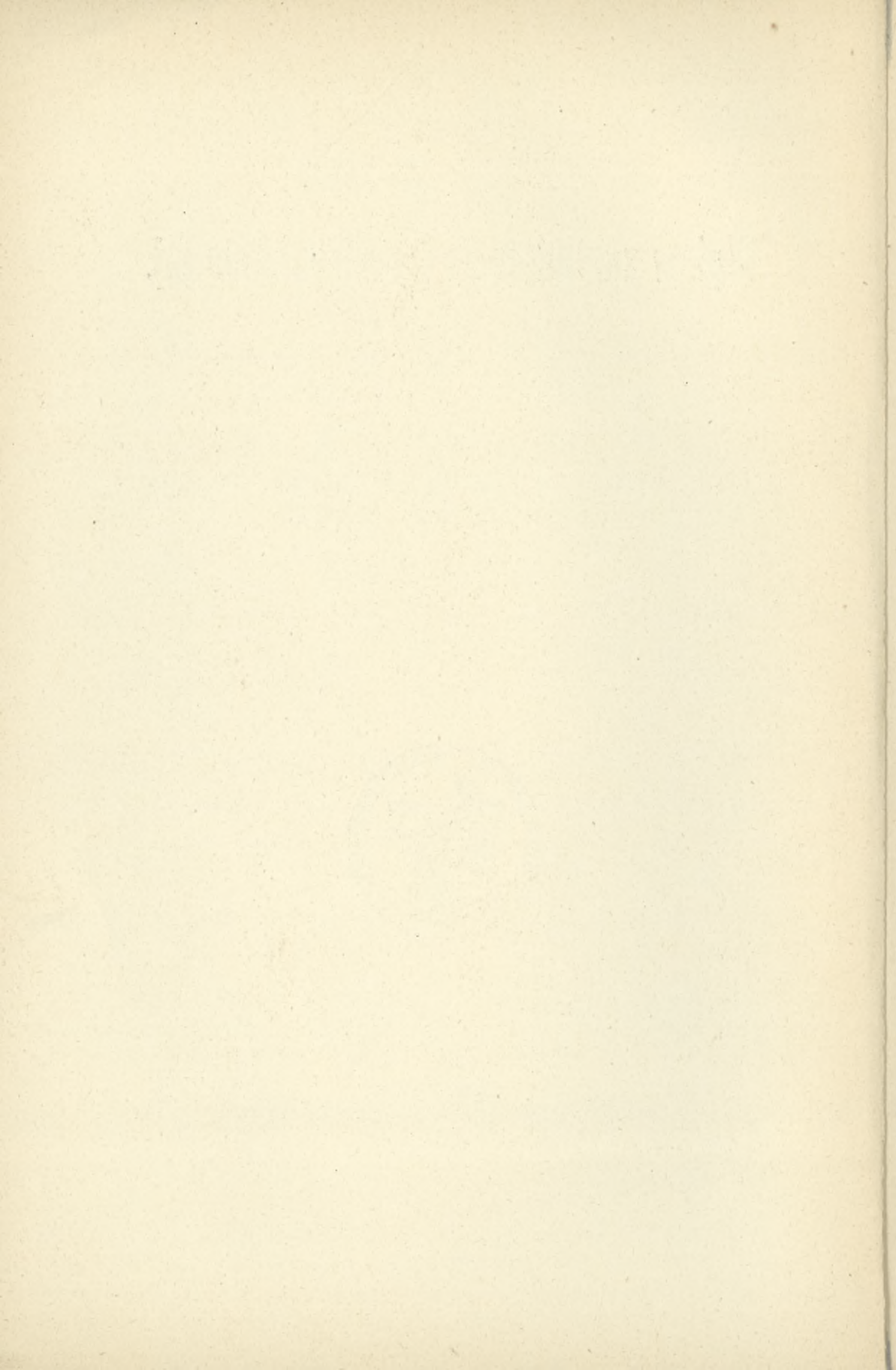
Reprinted from the Proceedings of the Scientific Society
of Warsaw. June. 1915.



WARSZAWA.

DRUKARNIA i LITOGRAFIA JANA COTTY, KAPUCYŃSKA 7.

1915.



Kazimierz Białaszewicz i Ryszard Błędowski:

Wpływ zapłodnienia na oddychanie jaj.

(Z Pracowni Fیزیologicznej Tow. Nauk. Warsz.).

Komunikat zgłoszony dnia 15 Maja 1915 r.

Praca niniejsza stanowi próbę przeprowadzenia systematycznych badań ilościowych nad wpływem zapłodnienia na oddychanie jaj.

Prace Loeb'a¹⁻³⁾ nad fizjologią zapłodnienia nie tylko dowiodły, że badania w tym kierunku są metodycznie możliwe, ale wykazały ponadto, w jakim stopniu są one ważne i mogą być — płodne. Istotnie, usiłowania tego autora doprowadziły do wykrycia niezmiernie doniosłych faktów, rzucających nowe światło na istotę chemizmu zapłodnienia.

Kierunek badań jest stosunkowo młody, i tem tłumaczy się, że w kwestyi specjalnie nas obchodzącej istnieją tylko fakty luźne i obserwacje dorywcze. Do tej kategorii należą badania Warburg'a⁴⁻⁵⁾, Loeb'a i Wasteneys'a⁶⁻⁷⁾, którzy u szkarłupni stwierdzili przyśpieszenie oksydacji po zapłodnieniu, i obserwacje Meyerhoff'a⁸⁾ nad wpływem zapłodnienia na współczynnik kaloryczny tlenu. Praca Godlewskiego⁹⁾ dotyczy wymiany gazowej zarodków żaby płowej.

¹⁾ Loeb J. Vorlesungen über die Dynamik der Lebenserscheinungen. Lipsk, 1906.

²⁾ Loeb J. Die chemische Entwicklungserregung des tierischen Eies (Künstliche Parthenogenese). Berlin, 1909.

³⁾ Loeb J. Artificial parthenogenesis and fertilization. Chicago, 1913.

⁴⁾ Warburg O. Beobachtungen über die Oxydationsvorgänge im Seeigellei. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Tom 57, 1908.

⁵⁾ Warburg O. Über die Oxydationen im Ei. II. Mitteilung. Zeitschr. f. physiol. Chemie. Tom 60, 1909.

⁶⁾ Loeb J. und Wasteneys H. Bioch. Zeitschr. Tom 36, 1911.

⁷⁾ Loeb J. und Wasteneys H. Die Oxydationsvorgänge im befruchteten und unbefruchteten Seesternei. Archiv f. Entw. Mech. Tom 35, 1913.

⁸⁾ Meyerhoff O. Untersuchungen über die Wärmetönung der vitalen Oxydationsvorgänge in Eiern. I—III. Biochem. Zeitschr. Tom 35, 1911.

⁹⁾ Godlewski E. (jun.). Die Einwirkung des Sauerstoffes auf die Entwicklung von Rana temporaria. Bull. intern. de l'Acad. des sc. de Cracovie, 1900. Również: Arch. f. Entw. Mech. T. 11, 1901.

Celem naszych doświadczeń było zbadanie nie tylko wpływu bezpośredniego, jaki wniknięcie plemnika wywiera na szybkość oksydacji i charakter spaleń fizyologicznych, lecz również — ustalenie zmian w szybkości procesów oksydacyjnych w czasie początkowych stadiów rozwoju. Poszukiwania nasze rozciągają się prócz tego na okresy poprzedzające moment zapłodnienia i dotyczą wymiany gazowej jaj niezapłodnionych i warunków ich życia w jajowodzie.

Wszystkie nasze badania zostały przeprowadzone na jajach i zarodkach żaby płowej (*Rana temporaria*).

I. Metodyka.

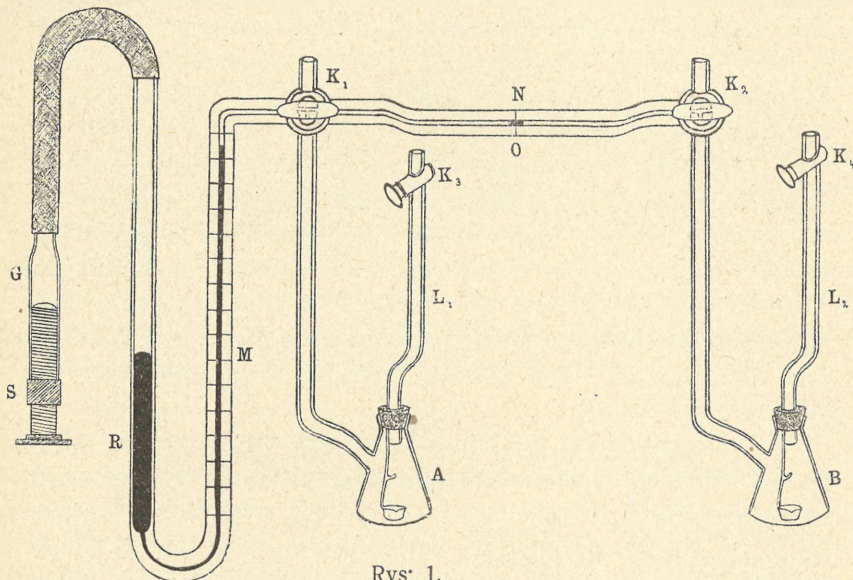
Metodykę naszych doświadczeń zaczerpnęliśmy z dotychczasowych badań nad respiracją. Najdogodniejszym dla naszych celów okazał się aparat pomysłu Thunberg'a, który po wprowadzeniu odpowiednich modyfikacji przez Winterstein'a¹⁾ stał się niezmiernie dogodnym przyrządem mikrorespiracyjnym.

Ponieważ na odpowiedniemu wyzyskaniu tego przyrządu jest oparta większość naszych doświadczeń, uważamy więc za właściwe wyjaśnić w kilku słowach jego budowę, do której zrozumienia przyczynić się też może poniżej podany rysunek.

Przyrząd ten składa się z dwu małych kolb (*A*, *B*), pojemności około 10 cm³; szczelnie przyszlifowane korki tych naczyń są zaopatrzone w rurki (*L*₁, *L*₂), zamykane u góry kranami (*K*₃, *K*₄); rurki te w obrębie kolb rozszerzają się w postaci małych łyżeczek, przeznaczonych do umieszczenia roztworu łągu. Obie kolbki łączą się, jak to widać na rysunku, z poziomą rurką włoskową, w której znajduje się kreska — „punkt zerowy“, — dowolnie zresztą wybrany. Na drodze połączenia kolbek z rurką poziomą znajdują się dwa krany (*K*₁, *K*₂), umożliwiające bądź zupełne zamknięcie kolbek, bądź też połączenie obydwuch za pośrednictwem rurki poziomej. Lewy kran pozwala nadto na połączenie lewej kolbki z rurką manometryczną (*RM*). Rurka manometryczna jest napełniona rtęcią; poziom rtęci w prawym ramieniu rurki manometrycznej można ustawić dowolnie i bar-

¹⁾ Winterstein H. Ein Mikrorespirationsapparat. Zeitschr. f. biolog. Technik und Methodik. Tom 3, 1913.

dzo dokładnie z pomocą specjalnego regulatora (*GS*), połączonego z lewym ramieniem manometru; regulator zawiera małą objętość powietrza, którego ciśnienie można dowolnie zwiększać lub zmniejszać, obracając odpowiednio śrubę mikrometryczną, nad którą znajduje się słup gliceryny. Prawe ramię rurki manometrycznej jest podzielone na 75 części: objętość rurki między dwiema podziałkami wynosiła w naszym aparacie 0.923 mm^3 .



Rys. 1.

W rurce poziomej (*N*) znajduje się mała kropla nafty; w szczelnie zamkniętym aparacie kropla ta tylko wówczas może odchylić się od swego pierwotnego położenia, jeżeli w jednej z kolbek nastąpi zmiana ciśnienia gazu. Zależnie od uprzedniego ustawienia rtęci w manometrze (u góry lub u dołu) można tę kroplę nafty powrócić do kreski zerowej i oznaczyć dodatnią lub odjemną zmianę objętości gazu w kolbce. Takie użycie aparatu pozwala stwierdzić, w której kolbce następuje zmiana objętości gazu, jako też określić wielkość tej zmiany.

Niezbędnym warunkiem prawidłowego funkcjonowania aparatu jest stała temperatura otoczenia; warunek ten najłatwiej było osiągnąć przez zanurzenie aparatu w basenie szklanym z wodą, której temperatura wahała się w bardzo nieznacznych granicach

(maksymalne wahania od 19.86° — 20.12° C.), dzięki zastosowaniu dokładnej termoregulacji, oraz stale poruszanego mieszadła. Oczywiście, że w ciągu kilkugodzinnego trwania doświadczenia wahania temperatury dawały się jeszcze bardziej ograniczyć.

Ścisłość pomiarów, wykonywanych z pomocą aparatu Thunberg'a-Winterstein'a określamy na 1 mm³ gazu.

Aparat opisany służyć może do rozmaitych kategorii doświadczeń oddechowych. Każdy typ doświadczenia wymaga jednak właściwego sobie wykorzystania jego konstrukcji. Dlatego też, rozbijając nasz materiał doświadczalny na kilka grup, pragniemy objaśnić metodykę, ściśle dostosowaną do każdego typu doświadczeń.

Jajka żaby umieszczane były na krążku papierowym, który wkładano na dno kolbki aparatu. Tym sposobem udawało się nam uniknąć łatwego uszkodzenia, zawsze możliwego przy przenoszeniu każdego jajka bezpośrednio do aparatu; pozwalało to, prócz tego, wyzyskać całe dno kolbki i zwrócić specjalną uwagę na zużytkowanie możliwie największej powierzchni oddechowej, układając jaja w ten sposób, ażeby, o ile możności, nie dotykały się wzajemnie.

Oznaczając ilości pochłanianego tlenu, do jednej z kolbek aparatu wkładano jaja badane, do drugiej zaś, kompensacyjnej, wlewano około 1 cm³ wody; w miseczkach obu kolbek umieszczano, w celu usunięcia CO₂, ług potasowy. Nie zawsze jednak możliwe było tak proste ustawienie doświadczenia. Zaraz pierwsze doświadczenia próbne (w połowie marca) wprowadziły do metodyki naszej dość poważny szkopuł. Spostreśliśmy, że jaja niezapłodnione, przeniesione bezpośrednio z jajowodu do aparatu, wydzielają jakiś gaz, którego natury chemicznej nie udało się nam ustalić. Z przytoczonej poniżej tablicy I wynika, że gaz ten stanowi nie dający się pominąć metodologicznie czynnik, wydzielany jest bowiem w dużych ilościach bezustannie w pierwszym kilkugodzinnym okresie doświadczenia (Tabl. I).

Fakt powyższy tem większą na siebie zwracał uwagę, że nie stanowi on zjawiska zupełnie odosobnionego w literaturze fizjologii rozwoju. Już Liebermann¹⁾ stwierdził, że poza dwu-

¹⁾ Liebermann L. Embryochemische Untersuchungen. Arch. f. ges. Physiol. Tom 43. 1888.

tlenkiem węglowym jajko kurze wydziela w czasie rozwoju jakiś gaz, prawdopodobnie azot. Gaz ów był przedmiotem bacznej obserwacji Hasselbalch'a¹⁾ w jego pracy o wymianie gazowej w jajku kury. Nazywa on go azotem, zaznaczając, że w jajach „martwych“ (todte Eier), t. j. niezaplodnionych jest on wydzielany w nic nie znaczących ilościach, odgrywa zaś nader ważną rolę w wymianie gazowej rozwijających się jaj (lebende Eier). Stwierdzając, że po śmierci zarodka wydzielanie owego „azotu“ szybko zmniejsza się i wkrótce ustaje, Hasselbalch skłania się do przypuszczenia, że jest to wynik zjawisk rozwojowych. Podobnie tłumaczyć sobie, zapewne, należy wydzielanie przez jaja zapłodnione małych ilości tlenu. Dwa te fakty, wyciągnięte z pracy Hasselbalch'a pozwalają wnioskować, że gaz wydzielany przez rozwijające się jajko kurze składa się z mieszaniny azotu i tlenu. Doniosła ta kwestya nie jest nawet prowizorycznie wyświetlona: terminu „azot“, używanego przez tego autora dla określenia owego gazu, nie należy pojmować dosłownie, gdyż w dalszym toku swych roztrząsań (str. 394) sam wyraźnie zaznacza, że chodzi tu

Tablica I.

Wydzielanie gazu obojętnego w atmosferze powietrza.

№ kolejny pomiaru.	Czas przeciętny od początku doświadczenia. Minuty.	Czas trwania pomiaru. Minuty.	Ilość wydzielonego (+), względnie pobranego (—) gazu przez 138 jaj. mm ³	Ilość wydzielonego (+), względnie pobranego (—) gazu przez 1000 jaj w ciągu minuty. mm ³
1	16,0	18	+ 30,08	+ 12,10
2	47,5	35	+ 5,57	+ 1,15
3	95,0	60	— 0,17	— 0,02
4	167,5	85	— 8,82	— 0,75
5	242,0	56	— 5,73	— 0,74
6	300,0	60	— 6,98	— 0,84
7	440,0	100	— 9,06	— 0,66

¹⁾ Hasselbalch K. A. Über den respiratorischen Stoffwechsel des Hühnerembryos. Skand. Arch. f. Physiol. T. 10. 1900.

zapewne o mieszaninę różnych gazów i słusznie nazywa go trzecim czynnikiem gazowym („ein dritter gasförmiger Faktor“).

Ponieważ mierzenie wymiany gazowej w naszym aparacie jest oparte tylko na zmianach objętości gazu w kolbkach, względny więc powyżej wyłuszczone skłoniły nas do zwrócenia bacznej uwagi na ten nowy czynnik, który mógłby wpłynąć bardzo ujemnie na ścisłość naszej metodyki. Usunięcie go możliwem było tylko przy zastosowaniu odpowiedniej kompensacji. Wychodząc mianowicie z założenia, że jednakowa ilość jaj wziętych z jednej samicy z jednakową szybkością wydziela ów gaz obojętny, eliminowaliśmy ten czynnik w ten sposób, że umieszczaliśmy w obu kolbkach aparatu jednakową ilość jaj.

W celu oznaczenia ilości pobieranego tlenu, z jednej kolbki usuwano całkowicie powietrze, zastępując go atmosferą czystego azotu¹⁾ lub wodoru i pochłaniając przytem CO_2 w obu dwóch naczyniach. Ilości wykazywane wówczas przez manometr dotyczyły wyłącznie tlenu, pobieranego przez te jaja, które znajdowały się w atmosferze powietrza. Postępowanie to jest usprawiedliwione tylko w tym razie, jeżeli warunki anoksybityczne nie zmieniają szybkości wydzielania gazu obojętnego: przekonaliśmy się o tem niejednokrotnie w toku naszych doświadczeń.

Przy badaniu produkcji dwutlenku węglowego w atmosferze powietrza, umieszczano również w obydwu kolbkach jednakową ilość jaj; zaś dwutlenek węglowy, produkowany przez jaja, zawarte w lewej kolbce, pochłaniano ługiem potasowym. Wobec tego, że tlen był pobierany przez jaja i w jednej i w drugiej kolbce, zaś CO_2 w kolbce lewej był pochłonięty natychmiast po wytworzeniu się, kropla nafty więc przesuwiała się w rurce poziomej na lewo, t. j. w kierunku mniejszego ciśnienia i dawała wyraz ilości CO_2 , wytworzonej przez jaja, zawarte w prawym naczyniu. Różnica poziomu rtęci w manometrze na początku i na końcu pomiaru wyrażała objętość produkowanego CO_2 w mm^3 .

Wydzielanie CO_2 przez jaja, znajdujące się w atmosferze azotu i wodoru, badano w sposób analogiczny, przepuszczając

¹⁾ Czysty azot otrzymywano z azotu handlowego, przepuszczając go przez dwie płuczki z $Na_2S_2O_4$ i następnie — nad rozżarzoną miedzią.

uprzednio przez cały aparat odpowiedni gaz, którego prąd wzięty był w ciągu $1/2$ — $3/4$ godziny usunąć zawarte w obu kolbkach powietrze.

Ten sposób postępowania stosowaliśmy również przy określaniu współczynnika oddechowego. W celu uniknięcia błędu jednostronnego, jaki mógłby powstać przy mierzeniu zawsze tylko gazów wytworzonych lub pochłoniętych w jajach, zawartych w jednym z naczyń aparatu, doświadczenia wykonywano naprzemiennie na jajach, zawartych to w prawej i lewej kolbce. Mierzono przytem najpierw CO_2 , potem O_2 , wreszcie znów CO_2 . W następnych zaś doświadczeniach odwracano kolejność pomiarów, mierząc najpierw O_2 . W taki sposób można było na jednych i tych samych jajach określić zarówno CO_2 jako też O_2 , i oznaczyć współczynnik oddechowy.

W celu zwiększenia dokładności pomiarów wprowadzono jeszcze kontrolę tych doświadczeń, które zmierzały do ustalenia współczynnika oddechowego. Uskutecziano to drogą określenia różnicy między ilością pochłanianego O_2 a ilością wydzielanego w tym samym czasie CO_2 . Osiągano to przez usunięcie jaj z jednej kolbki i przez wyłączenie ługu z obu kolbek. Pozostałe jaja pochłaniały tedy tlen i wydzielały dwutlenek węgla, a ponieważ współczynnik oddechowy był mniejszy od jednostki, więc manometr wykazywał już tylko różnicę ($O_2 - CO_2$), która po odjęciu jej od poprzednio zmierzonej ilości pobieranego tlenu, winna była równać się ilości wydzielonego CO_2 . Wyłączenie kompensacji usprawiedliwiała ta okoliczność, że po kilku godzinach trwania doświadczenia, ów gaz obojętny, który przedewszystkiem potrzebę kompensacji wywoływał, nie był już wydzielany. Kontrola taka pozwalała na krytyczną ocenę pomiarów dwutlenku węglowego.

Oznaczanie współczynnika oddechowego jaj zapłodnionych różniło się tylko tem, że po dokonaniu sztucznego zapłodnienia jaja pogrążane były w wodzie destylowanej, gdzie w ciągu 1 — $1\frac{1}{2}$ godziny błona galaretowa tak silnie pęczniała, iż można z niej było jaja z łatwością wyłuskać i postąpić z nimi w taki sam sposób, jak z jajami niezapłodnionymi. Pomiar właściwy rozpoczynano jeszcze przed wystąpieniem pierwszej bruzdy. Kontrola po ukończeniu doświadczenia przekonywała nas o ilości rozwijających się jaj i pozwalała nam uwzględnić tylko te eks-

perymenty, w których sztuczne zapłodnienie dało wynik zadowalający.

Metoda, zmierzająca do określenia wpływu zapłodnienia na szybkość oksydacji opierała się na opisanych tu dotychczas sposobach. Badano najpierw jaja niezapłodnione i jednocześnie zapładniano pozostałe jaja tej samej samicy. W kilka godzin po zapłodnieniu i po usunięciu otoczki galaretowej, wkładano do aparatu określoną ilość jaj i mierzono szybkość oksydacji.

Podobnie postępowano dla wykazania przyspieszenia oksydacji w rozwijających się jajach. Materiał, pochodzący z masowego zapłodnienia jaj jednej samicy trzymano w basenie doświadczalnym w temperaturze 20° C. i badano szybkość oksydacji w oznaczonych odstępach czasu.

Wszystkie podane w naszej pracy objętości gazów są zredukowane do 0° C. i 760 mm. ciśnienia barometrycznego.

Ponieważ niektóre zagadnienia nasze wymagały znajomości wagi żywej jaj, więc i tutaj okazała się konieczną jakaś jednolita metodyka.

Z powodu obecności otoczki galaretowej, wagę jaj oznaczaliśmy nie bezpośrednio, lecz obliczaliśmy ją z iloczynu objętości jaj i ich ciężaru właściwego.

W celu mierzenia objętości — część jaj, używanych do poszczególnych doświadczeń, umieszczano na szkiełku przedmiotowym i pogrążając je całkowicie w wodzie, przerysowywano przy pomocy aparatu rysunkowego ich kontury. Mikroskop używany do tego celu posiadał zawsze jednakowe szkła. Zmierzywszy powiększenie mikroskopu, obliczaliśmy w jednostkach bezwzględnych średnicę jaj, przyjmując ją za średnią arytmetyczną, otrzymaną przez zmierzenie średnicy rysunku w dwu prostopadłych względem siebie kierunkach. Objętość jaj ($\frac{4}{3} \pi r^3$) obliczaliśmy z przeciętnej wielkości średnicy.

Ciężar właściwy jaj określaliśmy według metody, opisanej przez Lyon'a¹⁾, a wypróbowanej przez jednego z nas²⁾ przy badaniu zarodków płazów, a polegającej na zanurzeniu i odwirowywaniu jaj w roztworach gumy arabskiej o różnym, ściśle

¹⁾ Lyon E. P. Arch. f. Entw.-Mech. Tom 23. 1907.

²⁾ Białaszewicz K. Beiträge zur Kenntniss der Wachstumsvorgänge bei Amphibienembryonen. Bull. de l'Acad. de sc. de Cracovie, 1908.

uprzednio określonym ciężarze właściwym. Za ciężar właściwy jaj badanych przyjęto ciężar właściwy takiego roztworu gumy, w którym jaja po wirowaniu znajdowały się w środku próbowki.

II. Stosunki gazowe w jajowodzie.

Wyrosłe jaja zabie po oderwaniu się od jajnika i przerwaniu łączności z naczyniami krwionośnymi ustroju macierzystego przechodzą do górnych części jajowodów, skąd, otaczając się grubą błoną galaretową, przesuwiają się stopniowo ku dołowi. Ostatecznym miejscem ich skupiania się są dolne części jajowodów, w których jaja przechowują się dłuższy przeciąg czasu, aż do chwili wyrzucenia ich nazewnątrz i złożenia w postaci skrzeku.

Wobec dosyć skąpego unaczynienia jajowodów i nagromadzenia się w jednym miejscu dużej ilości jaj, tworzących wielokrotne warstwy współrodkowe, które niezawodnie utrudniają dyfuzję gazów, należało przypuszczać, że warunki gazowe w częściach jajowodów wypełnionych jajami, różnią się wybitnie od stosunków panujących w normalnie unaczynionych tkankach.

Przypuszczenia te uzasadniają w znacznej mierze stwierdzone powyżej fakty¹⁾, które dowodzą, że jaja w pierwszej chwili po wyjęciu ich z jajowodów wydzielają z siebie jakiś gaz, którego natury chemicznej nie zdołaliśmy jednak dotychczas stwierdzić; dyfuzja tego gazu do powietrza odbywa się tylko w ciągu kilku godzin po wyjęciu jaj z samicy.

Wyraźniejsze wskazówki w tym kierunku dają obserwacje nad dwutlenkiem węglowym, którego wydzielanie badaliśmy w całym szeregu doświadczeń. Do pomiarów używaliśmy jaj świeżo wyjętych z jajowodu, które możliwie prędko były przenoszone do aparatu Winterstein'a. Dwutlenek węglowy oznaczaliśmy metodą kompensacyjną, umieszczając w każdej kolbce aparatu jednakową ilość jaj i pochłaniając w jednej z kolbek dwultenek węglowy.

Wyniki jednego z tych doświadczeń (№ 13) podane są na Tabl. II.

¹⁾ Patrz część metodyczną pracy niniejszej.

Tablica II.

Wydzielanie CO_2 w atmosferze powietrza.
Jaja niezapłodnione.

№ kolejny pomiaru.	Czas średni od początku doświadczenia.	Czas trwania pomiaru.	Ilość CO_2 wydzielona przez 80 jaj.	Ilość CO_2 wy- dzielona przez 1000 jaj w ciągu 1 minuty.
	Minuty.	Minuty.	mm ³	mm ³
1	52,5	5	7,26	18,15
2	57,5	15	12,76	10,63
3	75,0	10	7,84	9,80
4	96,5	33	18,67	7,07
5	119,0	12	1,81	1,87
6	132,5	15	1,39	1,16
7	170,0	60	3,63	0,75
8	215,0	30	1,23	0,51
9	245,0	30	1,48	0,61
10	275,0	30	1,23	0,51

Pierwszy pomiar był wykonany po upływie 52.5 minut od chwili zetknięcia się jaj z powietrzem, następne zaś pomiary były robione kolejno w krótkich, jakkolwiek nie jednakowych odstępach czasu. Dla ułatwienia porównania z sobą szybkości wydzielania gazu w poszczególnych okresach obliczone zostały ilości CO_2 , wydzielane przez 1000 jaj w ciągu minuty.

Z zestawienia liczb w ostatniej kolumnie wynika, że szybkość przenikania CO_2 z jaj do powietrza początkowo jest największa i zmniejsza się ona prawidłowo z biegiem czasu, dążąc stopniowo do wielkości niezmiennej. Ów stan równowagi, w którym ustala się szybkość wydzielania CO_2 , a który jest wyrazem fizjologicznej produkcji tego gazu, nastąpił w naszym doświadczeniu między 170-tą a 215-tą minutą po wyjęciu jaj z samicy.

W celu przekonania się, czy i o ile zjawisko powyższe wy-

stępuje również w środowisku innych gazów, badaliśmy wydzielanie CO_2 w atmosferze azotu i wodoru.

Pomiary wydzielania CO_2 zarówno w czystym azocie (tab. III) (dośw. № 11), jak i w czystym wodrze (tab. IV) (dośw. № 6) dały wyniki identyczne i zupełnie zgodne z rezultatami poprzedniego doświadczenia.

Tablica III.

Wydzielanie CO_2 w atmosferze azotu.
Jaja niezapłodnione.

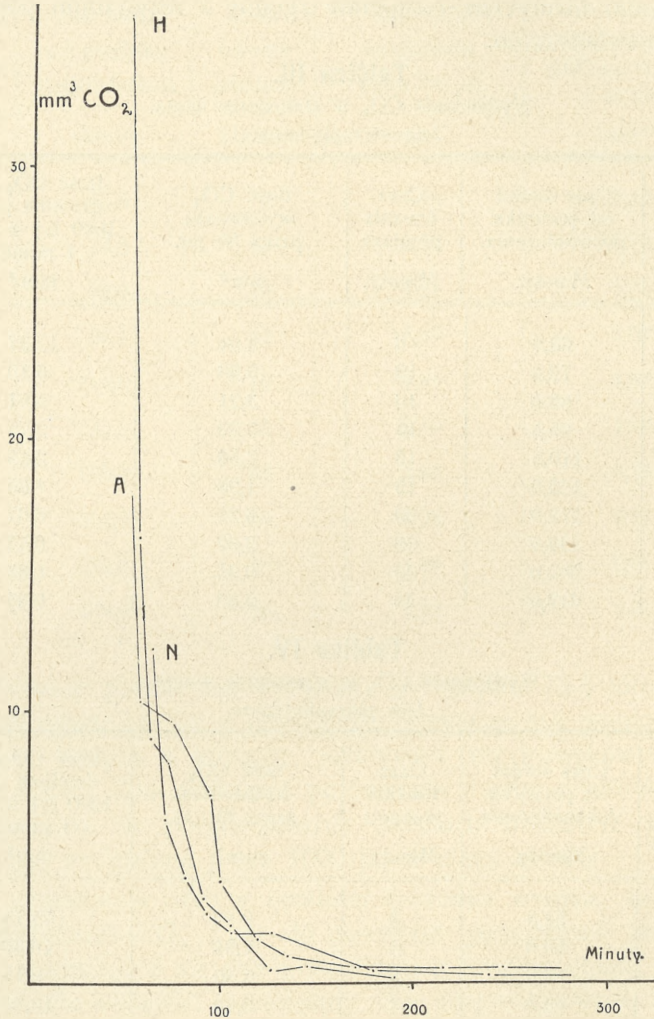
№ kolejny pomiaru.	Czas średni od początku doświadczenia. Minuty.	Czas trwania pomiaru. Minuty.	Ilość CO_2 wydzielona przez 80 jaj. mm^3	Ilość CO_2 wydzielona przez 1000 jaj w ciągu 1 minuty. mm^3
1	63,0	6	5,94	12,37
2	72,0	12	5,86	6,10
3	83,0	10	3,21	4,01
4	95,5	15	3,30	2,75
5	110,5	15	2,56	2,13
6	125,5	15	1,98	1,65
7	178,0	60	3,21	0,67
8	238,0	60	2,07	0,43
9	283,0	30	0,95	0,39
10	313,0	30	0,82	0,34

Tablica IV.

Wydzielanie CO_2 w atmosferze wodoru.
Jaja niezapłodnione.

№ kolejny pomiaru.	Czas średni od początku doświadczenia. Minuty.	Czas trwania pomiaru. Minuty.	Ilość CO_2 wydzielona przez 80 jaj. mm^3	Ilość CO_2 wydzielona przez 1000 jaj w ciągu 1 minuty. mm^3
1	51,5	3	9,49	35,78
2	56,0	6	7,84	16,33
3	63,0	8	5,86	9,15
4	68,5	3	2,45	10,20
5	75,5	15	9,75	8,12
6	92,5	15	3,79	3,16
7	107,5	15	2,31	2,17
8	124,0	12	0,58	0,60
9	145,0	30	1,90	0,79
10	190,0	60	0,66	0,14

Wyniki wszystkich trzech doświadczeń zostały wykreślone w postaci krzywych na rys. 2, w którym odcięta oznacza czas, jaki upłynął od chwili wyjęcia jaj z samicy, rzędna zaś ilość CO_2 w mm^3 , wydzielanego przez 1000 jaj na minutę.



Rys. 2. Krzywe szybkości wydzielania dwutlenku węgłowego przez jaja niezapłodnione: A — w powietrzu; N — w azocie; H — w wodrze.

Z przebiegu tych krzywych wynika, że jaja przeniesione z jajowodów do różnych środowisk gazowych wydzielają w pierw-

szej chwili dużą ilość dwutlenku węgłowego. Przebieg szybkości wydzielania tego gazu dowodzi, że mamy tutaj do czynienia ze zjawiskiem przenikania dwutlenku węgłowego drogą dyfuzji dzięki temu, że w jajach niezapłodnionych nagromadzone są znaczne ilości dwutlenku węgłowego, który tracą one w chwili przeniesienia jaj z ich naturalnego środowiska, t. j. z jajowodów, do środowiska o mniejszej koncentracji dwutlenku węgłowego.

Dla przekonania się, że gazy, rozpuszczone w jajach posiadają inną prężność, niż składniki powietrza i że jaja niezapłodnione istotnie zawierają dość znaczne ilości CO_2 , wykonaliśmy kilka analiz gazu, wypompowanego z jaj. W tym celu duże ilości jaj, otrzymane natychmiast po zabiciu samicy, trzymaliśmy przez kilkanaście minut w próżni nad rtęcią; zebrane w ten sposób gaz badaliśmy z pomocą mikroanalizycznej metody Brodie i Cullisa¹⁾. Z kilku takich oznaczeń przekonaliśmy się, że w gazach wypompowanych ilość CO_2 , jest w istocie dosyć znaczna: wynosi ona od 35 do 52%.

Fakty powyższe dowodzą niewątpliwie, że środowisko gazowe w jajowodach, w których jaja pozostają od chwili oderwania się od jajnika aż do momentu zapłodnienia posiada swoisty skład chemiczny. Ustosunkowanie składników gazowych jest niezawodnie wynikiem utrudnionych warunków dyfuzji, redukujących do minimum zarówno dostęp tlenu wolnego, jak i przenikanie dwutlenku węgłowego nazewnątrz. Obecność znacznej ilości CO_2 w jajowodach jest zatem spowodowana brakiem odpowiednich mechanizmów, usuwających ten gaz w miarę produkowania go przez jaja niezapłodnione. Wskutek tego, w miarę pozostawiania jaj w jajowodzie gromadzą się wciąż nowe ilości dwutlenku węgłowego, który zwłaszcza w większych koncentracjach wywiera na jaja wpływ wysoce szkodliwy²⁾, wyrażający się w stopnio-

¹⁾ Brodie T. G. and Cullis W. C. The analysis of oxygen and carbonic acid contained in small volumes of saline solutions. Journ. of Physiol. Tom 36. 1908.

²⁾ Według naszych obserwacji jaja poddane działaniu czystego CO_2 , już w ciągu dwu godzin tracą w zupełności zdolność do zapłodnienia.

wem traceniu zdolności do zapłodnienia i w nienormalnym przebiegu procesów rozwojowych po zapłodnieniu. Zdaje się być wysoce prawdopodobnym, że zwiększanie się ciśnienia cząstkowego CO_2 pozostaje w ścisłym związku ze znanym zjawiskiem przejrzenia jaj.

Obserwacje nasze posiadają znaczenie ogólniejsze i dotyczą prawdopodobnie i innych grup zwierzęcych w tym okresie egzystencji jaj, w którym tracą one związek z gruczołami płciowymi i przechodzą do przewodów wyprowadzających. W tem też znaczeniu skłonni jesteśmy interpretować dawniejsze obserwacje Bohr'a i Hasselbalch'a¹⁾, którzy stwierdzili, że jaja kurze po złożeniu wydzielają znaczne ilości CO_2 , gromadzące się przeważnie w wapiennej skorupie jaj. Ilość CO_2 , jaką pojedyncze jajko kurze wydzieli z siebie w temperaturze pokojowej, jest niezmiernie duża, wynosi bowiem od 29 do 66 mg. (por. doświadczenia VI, VIII i IX autorów). Tak duże ilości CO_2 pochodzą niezawodnie z tego okresu, w którym jaja znajdowały się w jajowodzie.

III. Wpływ zapłodnienia na charakter wymiany gazowej.

W kwestyi zmian chemicznych, jakim ulegają rozwijające się jaja zwierzęce istnieje dość obszerny, aczkolwiek dorywczo zdobyty materiał faktyczny. Z całego szeregu prac, w których była badana zawartość substancji zapasowych jaj w różnych okresach rozwojowych, wpływa, że tłuszcze są głównie tą substancją zapasową jajka, która w pierwszym rzędzie ulega rozpadowi i której kosztem są zaspakajane potrzeby energetyczne zarodka. Fakt ten został bezsprzecznie stwierdzony dla jaj jedwabnika przez Tichomiroff'a²⁾, dla płazów — przez Baudrimont'a i Martin-St.-Ange'a³⁾, dla jaj kurzych — przez Liebermann'a⁴⁾ i Tangl'a⁵⁾; jedyny pod tym względem

¹⁾ Bohr Ch. i Hasselbalch K. Über die Kohlensäureproduktion des Hühnerembryos. Skand. Arch. f. Physiol. Tom 10. 1900.

²⁾ Tichomiroff. Chemische Studien über die Entwicklung der Insekteneiern. Zeitschr. f. physiol. Chemie. T. 9. 1885.

³⁾ Baudrimont A. et Martin-St.-Ange. Recherches sur les phénomènes chimiques de l'évolution embryonnaire des oiseaux et batraciens. Annales de chimie et de physique. Sér. III. T. 21. 1847.

⁴⁾ Liebermann, l. c., str. 432.

⁵⁾ Tangl F. Beiträge zur Energetik der Ontogenese. I. Arch. f. ges. Physiol.

wyjątek stanowią jaja rybie, w których według badań T a n g l'a i F a r k a š'a ¹⁾ ilość tłuszczów w czasie rozwoju embryonalnego nie zmniejsza się, lecz przeciwnie, znacznie się zwiększa.

Niema natomiast w literaturze żadnych faktów i przyczynków, któreby wyświeślały rolę plemnika w aktywacji i przyspieszaniu rozpadu substancji tłuszczowych. A jednak kwestya wpływu zapłodnienia na charakter przemiany materii posiada, bezwątpienia, znaczenie ogólniejsze, jak ze względu na wyświeślenie samego aktu zapłodnienia, tak też ze względu na znaczenie energetyczne oksydacji tłuszczów dla procesów rozwojowych.

Poszukiwania nasze w tym kierunku ograniczyliśmy wyłącznie do ustalenia wpływu zapłodnienia na stosunek $\frac{CO_2}{O_2}$. Wielkość tego stosunku zależy najzupełniej od jakości substancji, która ulega utlenieniu w organizmie. Dlatego też, drogą określenia współczynnika oddechowego dla jaj niezapłodnionych i dla jaj, znajdujących się w pierwszych okresach po wnikięciu plemnika, dążyliśmy do wyświeślenia, czy i o ile zapłodnienie wpływa zasadniczo na przemianę materii jajka przenosząc punkt ciężkości na oksydację substancji tłuszczowych.

Pierwsza serya doświadczeń była przeprowadzona na jajach niezapłodnionych, wyjętych z jajowodu natychmiast po zabiciu samicy. W doświadczeniach tych, z których każde było wykonane na jajach pochodzących od jednej samicy, mierzyliśmy ilości pobieranego tlenu i wydzielanego dwutlenku węglowego. Poniżej, na Tab. V, są podane wyniki trzech seryj takich pomiarów.

Tablica V.
Jaja niezapłodnione.

№ doświadczenia	CO ₂			O ₂			RQ
	Czas trwania pomiaru.	Ilość wydzielonego CO ₂ przez 130 jaj.	Ilość wydzielonego przez 100 jaj w ciągu godziny.	Czas trwania pomiaru.	Ilość pobranego O ₂ przez 130 jaj.	Ilość O ₂ pobieranego przez 100 jaj w ciągu godziny.	
	minuty.	mm ³	mm ³	minuty	mm ³	mm ³	
16	148	18,5	5,77	339	66,3	9,03	0,639
17	150	13,6	4,18	120	20,0	7,69	0,543
18	332	20,9	2,90	120	12,7	4,88	0,590
Przeciętnie							0,591

¹⁾ T a n g l F. und F a r k a š. Beiträge zur Energetik der Ontogenese. IV. Über den Stoff- und Energieumsatz im bebrüteten Forellenei. Arch. f. ges. Physiol. Tom 104. 1904.

Celem stwierdzenia zdolności rozwojowej jaj poddanych obserwacji, jednocześnie z rozpoczęciem pomiarów wykonywaliśmy zapłodnienie kontrolne. We wszystkich trzech doświadczeniach zapłodnienie sztuczne dało wynik zupełnie zadawalający: ilość jaj rozwijających się w stosunku do ogólnej ilości jaj zapłodnionych wynosiła w doświadczeniu 16-ym 82%, w 17-ym—75%, w 18-ym — 86%.

Mierząc ilości pobieranego tlenu posługiwaliśmy się w tych doświadczeniach wyłącznie metodą kompensacyjną, umieszczając w kolbce kompensacyjnej aparatu takąż ilość jaj, znajdujących się w atmosferze czystego (pozbawionego tlenu) azotu; zaś w czasie oznaczania CO_2 umieszczano jaja kompensujące w atmosferze powietrza i w obecności ługu potasowego. W pierwszych dwóch doświadczeniach oznaczano naprzód CO_2 , a następnie O_2 , w ostatnim zaś doświadczeniu kolejność pomiarów była wręcz odwrotna.

Z otrzymanych w każdym doświadczeniu liczb, które oznaczają czas trwania pomiaru i objętość zmierzonego gazu w mm^3 , obliczano następnie ilości CO_2 i O_2 , produkowane, wzgl. pobierane przez 100 jaj w ciągu godziny; z ostatnich liczb wyliczano następnie współczynniki oddechowe.

Z zestawienia liczb na Tab. V wynika, że współczynnik oddechowy (RQ) jaj wyrosłych, zdolnych do zapłodnienia, waha się w granicach od 0.543 do 0.639, przeciętnie zaś wynosi 0.60.

Wielkość powyżej stwierdzonego współczynnika oddechowego jest dosyć niska, jednak nie wykracza po za skalę współczynników fizyologicznych, które były obserwowane u zwierząt w różnych stanach, zwłaszcza w stanie głodu. Stwierdzona przez nas wielkość zbliża się najbardziej do stosunków wymiany gazowej w czasie spalania się tłuszczów, dla której liczba teoretyczna w przypadku całkowitej oksydacji, doprowadzonej do ostatecznych produktów spalania, wynosi 0.72.

Różnica in minus między naszym współczynnikiem a współczynnikiem teoretycznym może być spowodowana przez to, że obok oksydacji tłuszczów w jajku niezapłodnionem zachodzą inne rozpady, być może, natury hydrolitycznej. Bądź co bądź jednak współczynnik stwierdzony przez nas najbardziej zbliża się do współczynnika tłuszczowego; na podstawie więc naszych

wyników twierdzić możemy, że częścią składową jajka niezapłodnionego, której kosztem odbywa się przeważna część rozpadów chemicznych, jest zapasowa substancja tłuszczowa, obficie występująca w jajach żabich¹⁾ i wogóle w większości jaj zwierzęcych.

Co się tyczy wymiany gazowej jaj zapłodnionych, to aczkolwiek wiadomości nasze w kwestyi zużytkowania tłuszczów dla spraw rozwojowych są dosyć obszerne, to jednak dla stadyów bardzo wczesnych, następujących bezpośrednio po wnikięciu plemnika, żadnych wskazówek nie posiadamy. Objaśnia się to poniekąd poważnymi trudnościami, jakie dotąd napotykała metodyka pomiarów respiracyjnych wobec niezmiernie powolnej wymiany gazowej, jaka zachodzi w pierwszych momentach po zapłodnieniu. Tem się tłumaczy, że Godlewski²⁾ mógł badać oddychanie jaj żabich dopiero w drugim dniu po zapłodnieniu (por. № 13 i 14 jego doświadczeń), zaś pomiary Hasselbalch'a³⁾ były robione w pierwszym dniu wylęgania jaj kurzych, t. j. w okresie powstawania listków zarodkowych i narządów pierwotnych; w badaniach zaś Warburg'a⁴⁾ i Meyerhoff'a⁵⁾ nad jajami jeżowców było uwzględniane wyłącznie pobieranie tlenu.

Mikrorespirometr Thunberg'a-Winterstein'a umożliwił zbadanie pod tym względem wymiany gazowej jaj żabich w stadyach najwcześniejszych (następujących bezpośrednio po zapłodnieniu). Druga serya naszych doświadczeń była więc przedsięwzięta w celu ustalenia wielkości współczynnika oddechowego jaj zapłodnionych. Do doświadczeń braliśmy jaja sztucznie zapłodnione, które były przenoszone do aparatu możliwie szybko po uwolnieniu ich z napęczniałej w wodzie galarety. Pomimo to jednak pierwsze pomiary mogły być wykonane dopiero po upływie 3 — 7 godzin od zapłodnienia, ponieważ znacznej ilości czasu wymagały zabiegi przy wyjmowaniu jaj z otoczki galaretowej, po przeniesieniu zaś jaj do aparatu musieliśmy przez

¹⁾ Por. wyniki analiz Kolb'a. *Chemische Untersuchung der Eiern von Rana temporaria und ihrer Entwicklung.* Inaug. Diss. Zürich, 1901.

²⁾ Godlewski E., l. c., str. 429.

³⁾ Hasselbalch K., l. c., str. 433.

⁴⁾ Warburg O., l. c., str. 429 — nr. 4.

⁵⁾ Meyerhoff O., l. c., str. 429 — nr. 8.

pewien czas czekać aż do wyrównania się temperatur w obu kolbkach.

Kompensacja gazu obojętnego odbywała się w sposób podany w części metodycznej. Z trzech doświadczeń, których wyniki zostały zestawione na Tab. VI, w pierwszych dwóch początkowo oznaczono CO_2 , potem dopiero O_2 , zaś w ostatnim doświadczeniu była przedewszystkiem mierzona szybkość pobierania tlenu.

Tablica VI.
Jaja zapłodnione.

№ doświadczenia	CO_2				O_2				RQ
	Ilość jaj.	Czas trwania pomiaru.	Ilość wydzielonego CO_2 .	Ilość CO_2 wydzielanego przez 100 jaj w ciągu godziny.	Ilość jaj.	Czas trwania pomiaru.	Ilość pobranego O_2 .	Ilość O_2 pobieranego przez 100 jaj w ciągu godziny.	
23	100	210	22,0	6,28	100	60	10,0	10,00	0,628
25	75	202	16,6	6,57	75	285	46,0	12,86	0,511
26	75	120	9,1	6,07	75	176	19,6	8,90	0,682
Przeciętnie									0,607

W czasie pomiarów jaja rozwijały się normalnie, przyczem zapłodnienie było naogół bardzo udane, bowiem w doświadczeniu np. 25-em wszystkie jaja, z wyjątkiem dwóch bruzdowały zupełnie prawidłowo. Pomiar rozpoczął w doświadczeniu 23-em po upływie 6 godz. 30 min. od zapłodnienia, w 25-em — po 5 godzinach, natomiast w dośw. 26-em najwcześniej, gdyż w stadium pierwszej bruzdy, która w temperaturze pokojowej zjawia się po upływie 3 godzin 15 minut. Pomiar skończyliśmy w doświadczeniu 26-em w okresie powstania 16 — 25 blastomerów, w doświadczeniu zaś 23-em i 25-em w stadium blastuli wielokomórkowej.

Ze stosunku $\frac{CO_2}{O_2}$, obliczonego w sposób identyczny, jak w poprzedniej seryi doświadczeń, wynika, że wielkość współczynnika oddechowego (RQ) jaj bruzdkujących waha się w obrębie 0.511—0.682, zaś przeciętnie wynosi 0.61.

Wynik ten pozwala uogólnić rezultaty powyżej omawianych

badań nad przemianą tłuszczową zarodków i rozszerzyć je na najwcześniejsze stadya rozwojowe. Z doświadczeń naszych wypływa zatem, że w początkowych stadyach bruzdkowania wymiana gazowa posiada charakter tłuszczowy, nie różniąc się pod tym względem od spaleń, odbywających się w obrębie jajka niezapłodnionego.

Uogólniając i reasumując nasze wyniki możemy zatem twierdzić, że oddychanie jaj wyrosłych i zdolnych do zapłodnienia w zetknięciu się z tlenem powietrza odbywa się przeważnie kosztem spalających się substancyj tłuszczowych. Wniknięcie plemnika, które podnieca prawdopodobnie cały kompleks nowych procesów chemicznych i budzi do życia obok rozpadowych procesów oksydacyjnych procesy syntetyczne, nie wpływa na charakter spaleń. Zapłodnienie nie wprowadza zatem żadnej przerwy w ciągłości ogólnej przemiany materii jajka i nie wywołuje żadnych zmian zasadniczych, ani w zużytkowaniu jakości substancyj zapasowych, ani też w sposobie zaspokojenia potrzeb energetycznych, które w olbrzymiej swej części są pokrywane drogą oksydacji tłuszczowych składników zapasowych komórki jajowej.

IV. Wpływ zapłodnienia na szybkość pobierania tlenu.

Sprawa współczynników oddechowych nie wyczerpuje, oczywiście, kwestyi wpływu, wywieranego przez zapłodnienie na procesy oddechowe. Pozostaje jeszcze strona ilościowa interesującej nas kwestyi, związana z rolą plemnika, jako czynnika podniecającego pewne procesy chemiczne. To też dla poznania pewnych fragmentów procesu zapłodnienia rzeczą ze wszech miar ważną było zbadanie wpływu, jaki wniknięcie plemnika wywiera na szybkość wymiany gazowej, zwłaszcza zaś na szybkość oksydacji.

Wyniki nasze osiągnięte w tym kierunku dotyczą nie tylko samego momentu zapłodnienia, lecz rozciągają się również na okresy poprzedzające i następcze. Obejmują one zatem kwestyę intensywności procesów oksydacyjnych w jajach niezapłodnionych, wpływ zapłodnienia na te procesy i wreszcie kwestyę szyb-

kości pobierania tlenu przez zarodki w początkowych okresach ich rozwoju.

Rezultaty nasze w zakresie tych trzech kwestyj podajemy poniżej oddzielnie.

1. Szybkość procesów oksydacyjnych w jajach niezapłodnionych.

Pierwszem naszym zadaniem było zbadanie szybkości zachowawczej wymiany gazowej w jajku, znajdującem się w stanie względnego spoczynku fizyologicznego, t. j. w jajku niezapłodnionem.

W doświadczeniach odnośnych chodziło nam przedewszystkiem o określenie szybkości pobierania tlenu przez jaja niezapłodnione, o zestawienie i porównanie tej wielkości z szybkością oksydacji u zwierząt wyrosłych.

Jak wogóle w badaniach porównawczo-fizyologicznych, tak również i w danym przypadku należało w pierwszym rzędzie ustalić jednostkę porównawczą i określić w tym celu granice wahań szybkości oksydacji w jajkach, pochodzących od różnych samic. Następnie wypadało ustalić zależność tych wahań od wielkości jaj badanych, przypuszczając, że intensywność pobierania tlenu może zależeć od jednego z dwóch czynników: od masy jajka lub od jego powierzchni. Jak już zaznaczono w części metodycznej, bezpośrednie oznaczenie wagi jaj napotyka znaczne trudności z powodu obecności błony galaretowej, niełatwo dającej się usunąć. Z tego względu masę jaj obliczaliśmy z ich objętości (mierzonej projekcyjnie) i z ich ciężaru właściwego (p. Metodyka).

Dwa oznaczenia ciężaru właściwego jaj jajnikowych (nie otoczonych galaretą) dały liczby następujące: 1.097 i 1.106, przeciętnie—1.102. Tę ostatnią liczbę uważaliśmy za przeciętny ciężar właściwy wszystkich jaj badanych.

Powierzchnię obliczaliśmy z wielkości promienia jaj (p. część metodyczna).

Szybkość pobierania tlenu była mierzona na ośmiu seryach jaj, posiadających różną wielkość. Wyniki tych pomiarów są zestawione na Tabl. VII, w której uwzględniliśmy następujące wartości: wagę i powierzchnię jaj badanych, ilość jaj wziętych

do pomiaru i ilość pobranego w tym czasie tlenu (wyrażona w mm³). Na podstawie tych liczb obliczono następnie dla każdego doświadczenia szybkość pobierania tlenu przez tysiąc jaj (w mm³), przez metr kwadratowy powierzchni (w cm³) i przez kilogram wagi żywej (w cm³). Za jednostkę czasu przyjęto godzinę.

Tablica VII.

№ doświadczenia	Waga jednego jaja (=Vol. × 1.102)	Po- wierzchnia jaja.	Ilość jaj wziętych do doświadczenia	Czas trwania do- świadczenia.	Ilość O ₂ pobranego w czasie doświadczenia.	Ilość O ₂ pobieranego przez		
						1000 jaj.	1 m ² po- wierzchni jaj	1 kg. wagi jaj
	mg.	mm ²	ml- nuty	mm ³	n a g o d z i n ę			
					mm ³	cm ³	cm ³	
18	2,31	7,93	130	120	12,7	48,8	6,15	21,2
35	2,67	8,71	150	362	47,3	52,4	6,01	19,6
4	2,85	9,12	138	301	30,6	46,9	5,14	15,5
17	3,00	9,42	130	120	20,0	76,9	8,16	25,6
33	3,00	9,42	100	200	27,2	81,6	8,66	27,2
16	3,92	11,26	130	339	66,3	90,2	8,01	23,0
28	4,51	12,36	130	250	43,6	80,5	6,43	17,9
27	5,20	13,61	80	230	36,6	119,3	8,76	22,9
Przeciętnie						74,5	7,16	21,6
Średnie odchylenie obserwacji						+ 33,0%	+ 19,2%	+ 18,0%

Jak widać z tablicy powyższej, szybkość pobierania tlenu przez jaja różnego pochodzenia waha się w bardzo szerokich granicach: od 46.9 do 119.3 mm³ tlenu przez 1000 jaj na godzinę.

W celu stwierdzenia, czy szybkość oksydacji zależy od wielkości jaj, uszeregowaliśmy doświadczenia na Tabl. VII według wielkości jaj badanych; porównywując zaabsorbowane ilości tlenu z wielkością jaj, widzimy istotnie, że w miarę wzrastania wielkości jaj, zwiększają się również ich potrzeby oksydacyjne. Że wielkość jaj jest czynnikiem, od którego zależy szybkość pobierania tlenu, dowodzą tego obli-

czenia w odniesieniu do powierzchni i do wagi jaj. Ten sposób obliczania ujawnia wybitnie lepszą zgodność poszczególnych obserwacji.

Dla ściślejszego jednak ustalenia tej zależności wyprowadziliśmy przeciętną szybkość i obliczyliśmy średnie odchylenia poszczególnych obserwacji od przeciętnych. Wyliczenia te wykazują jaki sposób obliczania daje najmniejsze odchylenie od przeciętnej i przez to umożliwiają one rozstrzygnięcie pytania, czy warunkiem normującym szybkość spalań jest powierzchnia, czy też masa komórki jajowej.

Rzeczywiście, największe odchylenie, wynoszące 33% stwierdzamy w obliczeniu szybkości oksydacji w stosunku do ilości jaj; w odniesieniu zaś do wielkości — odchylenia są stosunkowo znacznie mniejsze. Mianowicie, sprowadzając zużycie tlenu do powierzchni, wzgl. do wagi, otrzymujemy następujące liczby: średnie odchylenie obserwacji od przeciętnej wynosi 19.2% w razie obliczenia na jednostkę powierzchni i tylko 18.0% — w odniesieniu do jednostki wagi.

Różnica między temi liczbami nie jest duża. Jednak wynik tych obliczeń nie upoważnia do tego, aby uważać powierzchnię jaj za czynnik, normujący potrzeby tlenowe jajka niezapłodnionego. Bliższem prawdy, zatem, jest sprowadzenie szybkości oksydacji do wagi jaj na tej zasadzie, że jak wykazują nasze pomiary i wyliczenia, szybkość pobierania tlenu w odniesieniu do jednostki wagi jajka niezapłodnionego, jest — w granicach wahań biologicznych — wielkością stałą.

Z ostatniej kolumny Tabl. VII wynika następnie, że kilogram wagi żywej jaj niezapłodnionych w temp. 20°C. pobiera w ciągu jednej godziny przeciętnie 21.6 cm³ tlenu.

Ciekawe jest zestawienie tego wyniku z tem, co wiemy o wymianie gazowej zwierząt dorosłych. Nad respiracją zab istnieją dosyć liczne badania, do najściślejszych jednak, uwzględniających normalne warunki egzystencji, należą niewątpliwie doświadczenia Bohr'a ¹⁾ nad oddychaniem skórnyem i płucnym

¹⁾ Bohr Ch. Über die Haut- und Lungenathmung der Frösche. — Skand. Arch. f. Physiol. Tom 10, 1900.

plazów. Z czterech obserwacji tego autora nad żabą płową (*R. temporaria*), wykonanych w temperaturze zbliżonej (19.3°C) do tej, w której prowadzone były nasze doświadczenia, wynika, że kilogram wagi żywej żab zużywa przeciętnie 261.8 cm³ tlenu na godzinę.

Z porównania tej liczby z poprzednią wypływa, że szybkość pobierania tlenu przez jaja niezapłodnione stanowi zaledwie 8.2% tej szybkości, z jaką zwierzę wyrosłe zaspakaja swoje potrzeby tlenowe. Innymi słowy, intensywność spaleń w komórce jajowej, zdolnej do zapłodnienia, wynosi mniej niż dziesiątą część tej szybkości, z jaką pobierają tlen komórki somatyczne.

Z dalszego toku naszych badań, o których będzie mowa poniżej, przekonamy się, że jajko niezapłodnione stanowi to stadyum peryodycznie powtarzającego się cyklu rozwojowego, w którym zwierzę ujawnia minimum oddechowe: jest to stadyum, w którym, jak w nasionach roślinnych, następuje zredukowanie szybkości przemiany materii do bezwzględnego minimum fizyologicznego.

2. Zapłodnienie jako czynnik podniecający oksydację.

Wychodząc z założeń teoretycznych z góry można przypuszczać, że między jajkiem zapłodnionem a niezapłodnionem istnieje ta zasadnicza różnica, że o ile komórka jajowa niezapłodniona zadawala wyłącznie swoje potrzeby zachowawcze, o tyle jajko zapłodnione prócz pewnej sumy przemian chemicznych natury zachowawczej, posiada i potrzeby energetyczne, związane z asymilacją, wzrostem i wogóle — z procesami natury syntetycznej. W rozwijającym się jajku procesy zachowawcze i przyrostowe sumują się, co powinno się, bezwarunkowo, odbić na szybkości przemian chemicznych, zaś w szczególności — na szybkości spaleń fizyologicznych.

Istotnie, uogólnienia, wypowiedziane przez Loeb'a ¹⁾ w zakresie fizjologii zapłodnienia, opierały się na przeświadczeniu, że istota zapłodnienia polega na pobudzeniu lub przyspieszeniu

¹⁾ Loeb J. l. c. str. 429.

procesów oksydacyjnych. Z dowodów pośrednich, jakie Loeb w tej kwestyi przytacza, najważniejszy jest fakt zupełnego zahamowania rozwoju w nieobecności tlenu (por. również badania Samassy ¹⁾ i Godlewskiego ²⁾) i zachowanie się jaj w roztworach cyanku potasowego. Dopiero Warburg ³⁾ na podstawie bezpośrednich pomiarów zużycia tlenu przez jaja jeźowców (*Arbacia pustulosa*) stwierdził, że pod wpływem zapłodnienia szybkość oksydacji wzrasta 6—7 razy. Zostało to następnie potwierdzone przez Loeb'a i Wasteneys'a ⁴⁾ i przez Meyerhoff'a ⁵⁾, który ponadto wykazał, że zapłodnienie podnieca w jednakowym stopniu zarówno oksydację jak i produkcję ciepłą. Natomiast jaja rozgwiazd ujawniają, według badań Loeb'a i Wasteneys'a ⁶⁾, zaledwie nieznaczny przyrost oksydacji pod wpływem zapłodnienia.

Zadanie nasze ograniczyliśmy do zbadania wpływu zapłodnienia na oksydację, przypuszczając, że wniknięcie plemnika, podobnie jak w powyższych przypadkach, podnieca szybkość spalań. W drugim zaś rzędzie chodziło nam o ustalenie wielkości tego wpływu przez określenie przyspieszenia, jakiemu ulega oksydacja w jajach, pobudzonych do rozwoju.

W tym celu w poszczególnych doświadczeniach mierzyliśmy szybkość pobierania tlenu przez jaja niezapłodnione i przez jaja, znajdujące się w możliwie najwcześniejszych okresach po wniknięciu plemnika. W każdym doświadczeniu wykonywano zatem po dwa pomiary: przedewszystkiem mierzono szybkość oksydacji w porcyi jaj, świeżo wyjętych z jajowodu, drugą zaś porcyę jaj, celem wykonania takich samych pomiarów, zapładniano sztucznie i, po zdjęciu z nich galarety, możliwie pośpiesznie przenoszono do aparatu. Na Tabl. VIII zestawiono wyniki trzech takich doświadczeń.

¹⁾ Samassa, H. Über die äusseren Entwicklungsbedingungen von *Rana temporaria*. Verh. d. deutsch. Zool. Ges. 1896.

²⁾ Godlewski E. jun. l. c. str. 429.

³⁾ Warburg O. l. c. str. 429.

⁴⁾ Loeb i Wasteneys l. c. str. 429 — nr. 6.

⁵⁾ Meyerhoff, O. l. c. str. 429.

⁶⁾ Loeb i Wasteneys. l. c. str. 429 — nr. 7.

Tablica VIII.

№ doświadczenia	Jaja niezapłodnione				Jaja zapłodnione					
	Ilość jaj.	Czas trwania pomiaru.	Ilość pobranego O ₂ .	Ilość pobieranego O ₂ przez 1000 jaj na godz.	Ilość jaj zapłodnionych.	Czas trwania pomiaru.	Ilość pobranego O ₂ .	Ilość pobieranego O ₂ przez 1000 jaj na godz.	Czas od zapłodnienia.	Przyrost szybkości pobierania O ₂ po zapłodnieniu. %
		min.	mm ³	mm ³		min.	mm ³	mm ³		
29	130	250	43,6	80,5	95	162	36,6	142,1	6,2	76,5
33	100	200	27,2	81,6	70	160	17,2	90,7	8,5	11,2
35	150	362	47,3	52,3	75	225	46,3	164,5	25,0	214,5

W doświadczeniach 29-ym i 33-im oksydacja mogła być mierzona po upływie 6.2 i 8.5 godzin od momentu zapłodnienia, w stadyum 40 — 60 blastomerów, zaś w doświadczeniu 35-tym zrobiono pomiar dopiero na drugi dzień, po 25 godzinach od zapłodnienia, w początkowych stadyach gastrulacyi.

Szybkość oksydacyi obliczono w stosunku do tysiąca jaj na godzinę. Porównyując odnośne liczby, otrzymane dla jaj zapłodnionych i niezapłodnionych, stwierdzamy we wszystkich doświadczeniach, że zapłodnienie wywiera wpływ przyspieszający na procesy oksydacyjne jajka.

Dla określenia wielkości tego wpływu, obliczono w procentach przyrost szybkości pobierania tlenu po zapłodnieniu w porównaniu z napięciem oksydacyi w jajkach niezapłodnionych, zaś dla porównania z sobą wyników poszczególnych doświadczeń, podajemy poniżej przyspieszenie, jakiemu ulega oksydacja w ciągu jednej godziny; obliczenie to robiliśmy w tym założeniu, że w pierwszych godzinach po wnikięciu plemnika, szybkość oksydacyi wzrasta proporcjonalnie do czasu ¹⁾.

№ doświadczenia.	Przyspieszenie oksydacyi w ciągu jednej godziny.
29	12.3%
33	1.3%
35	8.5%

¹⁾ Jak się dalej przekonamy, założenie to jest słuszne do pewnego stopnia jedynie.

W doświadczeniu 33-im przyśpieszenie jest wybitnie mniejsze niż w pozostałych dwóch; objaśnia się to tym, że jaja wzięte do doświadczenia były, naogół biorąc, przejrzałe, ponieważ w masowym zapłodnieniu zaledwie nieznaczny procent bruzdkował normalnie. Dwa inne doświadczenia dały wyniki dość zgodne (12.3 i 8.5%). Uwzględniając tylko te dwie liczby, stwierdzamy, że pod wpływem zapłodnienia szybkość pobierania tlenu początkowo wzrasta o 10% w ciągu jednej godziny.

Przyśpieszenie, jakiemu ulega oksydacja w zapłodnionych jajach żaby jest zatem bardzo nieznaczne, zwłaszcza gdy porównamy je z zachowaniem się pod tym względem jaj jeżowców, które, jakśmy już wzmiankowali, ujawniają więcej niż sześciokrotne przyśpieszenie oksydacji (Warburg ¹⁾) w czasie podziału jajka na dwa blastomery, t. j. w stadium które występuje po upływie 1—2 godzin (zależnie od temperatury) po wnikięciu plemnika. Jaja żabie są natomiast bardziej zbliżone do jaj rozgwiazd, które również wykazują nieznaczne przyśpieszenie oksydacji po zapłodnieniu.

Nie wchodząc narazie w bliższą analizę tych różnic, które mogą zależeć od stopnia dojrzałości jaj w momencie zapłodnienia, możemy ograniczyć się do stwierdzenia faktu, że zapłodnienie jaj żabich nie sprowadza ani znacznych zmian, ani nagłych odchyżeń w szybkości pobierania tlenu. Przeciwnie, wnikięcie plemnika stanowi bodziec, zlekka tylko podniecający w jajku procesy oksydacyjne, których szybkość w ciągu początkowych stadyów bruzdkowania wzrasta stopniowo i bez przerwy.

Określenie przyśpieszenia oksydacji po zapłodnieniu rzuca pośrednio światło na kwestyę zależności pobierania tlenu od syntezy substancyj jądrowych. Jeżeli porównamy szybkość oksydacji z szybkością wzrostu jąder w pierwszych okresach bruzdkowania, to przekonamy się, że po upływie np. ośmiu godzin od zapłodnienia, t. j. w stadium około 100 blastomerów, w którym masa jądrowa wzrasta prawie stokrotnie, szybkość pobierania tlenu w tym samym czasie zwiększa się zaledwie 1—8 razy. Ten sam fakt został zauważony u jeżowców przez War-

¹⁾ Warburg O, l. c. str. 429.

burg'a¹⁾. Szybkość oksydacji jaj *Arbacia pustulosa* w stadium 32 blastomerów ma się względem szybkości oddychania w stadium 8 blastomerów jak 6 do 1, nie zaś jak 3 do 1, czego należałoby się spodziewać, gdyby tlen był zużywany bezpośrednio dla spraw wzrostu masy jądrowej.

Z całą pewnością możemy zatem twierdzić, że w okresie bruzdkowania szybkość oksydacji nie jest wprost proporcjonalna do wzrostu ogólnej masy substancji jądrowych.

3. Szybkość oksydacji w czasie rozwoju.

Przyśpieszenie oksydacji pod wpływem zapłodnienia jest w początkowych stadiach jednym z nielicznych efektów przemiany materii, który możemy mierzyć z dużym stopniem dokładności. Dlatego przystąpiliśmy do bliższego zbadania zachowania się oksydacji w okresach początkowych rozwoju żaby, a to w celu ustalenia zależności ilościowej, jaka ewentualnie może istnieć między szybkością oksydacji, a stopniem rozwoju morfologicznego.

Fakt wzrastania energii oddechowej w miarę rozwoju embryonalnego został stwierdzony w różnych, filogenetycznie bardzo nawet oddalonych grupach zwierzęcych. Klasyczne badania Bohr'a i Hasselbalcha²⁾ wykryły to zjawisko dla rozwoju ssaków i ptaków. Dla ryb i płazów fakt ten stwierdził Godlewski³⁾ i Bataillon⁴⁾, dla mięczaków — Buglia⁵⁾, dla owadów Farkaš⁶⁾, dla szkarłupni Warburg⁷⁾, Loeb i Waste-neys⁸⁾ i Meyerhoff⁹⁾.

Bezpośrednio dotyczące naszych poszukiwań badania Godlewskiego¹⁰⁾, wykonane na zarodkach żaby płowej, stwier-

¹⁾ Warburg, O. l. c. str. 429.

²⁾ Bohr i Hasselbalch l. c. str. 442.

³⁾ Godlewski E. jun. l. c. str. 429.

⁴⁾ Bataillon E. Evolution de la fonction respiratoire chez embryons d'Amphibiens et de Téléostéens. Compt. rend. de la Soc. de Biol. 1896 (praca znana nam z referatu).

⁵⁾ Buglia. Archivio di Fisiologia. T. 5. 1908. Cytowane według Meyerhoffa, l. c. str. 429.

⁶⁾ Farkaš. Beiträge zur Energetik der Ontogenese. III. Über den

dzają przede wszystkim pobieranie tlenu w najwcześniejszych stadiach rozwojowych, a następnie ustalają fakt wzrastania energii oddechowej w miarę postępu rozwoju.

Nam zaś chodziło o bliższe i dokładniejsze ustalenie tej zależności.

W dwóch seryach pomiarów specjalnie w tym celu przedsięwziętych i wykonanych na zarodkach żabich, które pochodziły od dwu samic i były otrzymane ze sztucznego masowego zapłodnienia, mierzyliśmy wyłącznie absorbcję tlenu. Pomiarы były robione w różnych odstępach czasu po zapłodnieniu. Zarodki w czasie rozwoju embryonalnego umieszczane były w aparacie w błonach żółtkowych po usunięciu otoczki galaretowej, zaś po wykluciu znajdowały się one w czasie pomiaru w wodzie, w której mogły się swobodnie poruszać. Kompensację gazu obojętnego stosowano tylko przy badaniu jaj niepłodzonych i w ciągu pierwszego dnia po zapłodnieniu. Od chwili wyklucia zarodki znajdowały się w czystej, codziennie zmienianej wodzie wodociągowej i nie pobierały pokarmu. Przez cały czas doświadczenia kultura znajdowała się w stałej temperaturze 20°C. (krańcowe wahania temperatury podane są w części metodycznej).

Z ilości pochłanianego w czasie pomiaru tlenu obliczono dla poszczególnych stadyów szybkość jego pobierania przez sto zarodków w ciągu godziny.

Tabl. IX przedstawia wyniki pierwszej seryi pomiarów (№ 29 naszych doświadczeń), która obejmowała 262.7 godzin rozwoju. Dla porównania przytoczyliśmy również szybkość oksydacji w jajach niepłodzonych, które stanowiły punkt wyjścia dalszego rozwoju. Waga jednego jajka niepłodzonego wynosiła 4.52 mg.

Energieumsatz des Seidenspinners während der Entwicklung und während der Metamorphose. Arch. f. ges. Physiol. Bd. 98, 1903.

⁷⁾ Warburg O. l. c. str. 429.

⁸⁾ Loeb i Wasteneys l. c. str. 429.

⁹⁾ Meyerhoff. O. l. c. str. 429.

¹⁰⁾ Godlewski E. jun. l. c. str. 429.

Tablica IX.

№ kolejny pomiaru	DATA	Czas od za- płodnienia	Ilość jaj lub za- rodków	Czas trwania pomiaru	Ilość pobra- nego O ₂	Ilość pobiera- nego O ₂ przez sto jaj na go- dzinę	STADYUM
		godz.		min.			
1	22.IV g. 3 ³⁰ pp.	—	130	250	43,6	8,0	Jaja niezapłodnione
2	22.IV g. 7 ²⁰ w.	6,2	100	162	36,6	13,5	20—40 blastomerów
3	23.IV g. 4 ⁰⁰ pp.	26,7	75	217	88,7	32,7	Początek gastrulacji
4	24.IV g. 1 ³⁰ pp.	48,2	78	110	52,1	36,4	Neurula
5	25.IV g. 5 ³⁰ pp.	76,2	50	75	44,9	71,8	Wyklucie
6	26.VI g. 6 ³⁰ w.	101,2	30	83	63,9	153,8	Skrzela zewnętrzne
7	28.IV g. 12 ⁰⁰ poł.	142,7	25	94	119,6	305,2	Najwyż. ich rozwój
8	30.IV g. 6 ³⁰ w.	197,2	10	91	46,2	304,3	Zanik skrzeli zew- nętrzných.
9	3.V g. 12 ⁰⁰ poł.	262,7	10	107	51,7	289,8	
10	3 V g. 6 ⁰⁰ w.	268,7	10	90	80,8	538,2	Kijanki karmione

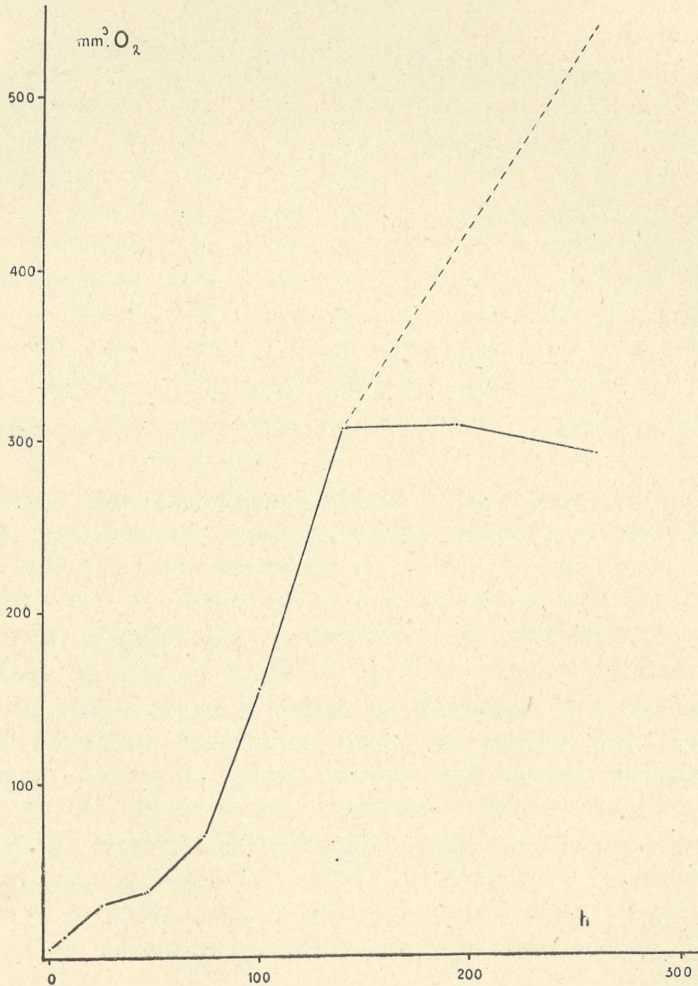
Z liczb, oznaczających szybkość pobierania tlenu przez sto jaj na godzinę, wypływa przede wszystkim potwierdzenie obserwacji Godlewskiego ¹⁾, że energia oddechowa zarodków żaby wzrasta w miarę rozwoju. Dla łatwiejszego zorientowania się w zachowaniu się szybkości oksydacji w zależności od stopnia rozwoju podajemy wynik tego doświadczenia w postaci krzywej (linja ciągła), w której odcięta oznacza czas od zapłodnienia, zaś rzędna — szybkość pobierania tlenu.

Krzywa ujawnia dwa wyraźne okresy: w okresie początkowym podnosi się stale i stopniowo, zaś w drugim okresie, rozpoczynającym się w czasie najbujniejszego rozwoju skrzeli wewnętrznych, a przypadającym między 142 a 197 godziną rozwoju, następuje nagle zmiana kierunku krzywej, która od tej chwili biegnie prawie równolegle względem osi *x*, zlekka się ku niej zbliżając.

Z przebiegu krzywej w pierwszym okresie wynika, że szybkość oksydacji jest zależna od czasu, jaki upłynął od zapłodnienia; zależność polega na tem, że o ile zarodek w póź-

¹⁾ Godlewski E. jun. l. c. str. 429.

niejszem znajduje się stadyum, to szybkość oksydacyi jest większa i wzrasta wybitnie prędzej od czasu; po upływie 142.7 godzin jest 38 razy większa niż w jajach niepłodzonych.



Rys. 3.

Przebieg krzywej w okresie drugim wskazuje na to, że w pewnej chwili rozwoju następuje w zarodku nagła zmiana w ustosunkowaniu czynników, warunkujących przyśpieszenie oksydacyi. Ponieważ od chwili wyklucia zarodki znajdowały się

w czystej wodzie i nie pobierały pokarmu, zjawilo się tedy przypuszczenie, że brak pokarmu jest przyczyną zatrzymania się na jednym poziomie, a nawet stopniowego zmniejszania się energii oddechowej.

W celu przekonania się o słuszności tego przypuszczenia przenieśliśmy w dniu 28. IV. część zarodków z ogólnej kultury do oddzielnego naczynia i karmiliśmy je galaretą z jaj żabich. W dniu 3. V. zmierzono szybkość ich oksydacji: wynosiła ona 538.2 mm³ na sto zarodków i na godzinę. Linia przerywana na rys. 3 jest interpolacją przebiegu oksydacji w kijankach karmionych. Z porównania przebiegu krzywych od miejsca ich rozdwojenia wypływa, że wtedy gdy w zarodkach głodzonych szybkość oksydacji przestaje w pewnej chwili wykazywać przyrost, w zarodkach karmionych szybkość oksydacji w dalszym ciągu wzrasta. Przyczyną tej różnicy jest niezawodnie zmniejszenie się w zarodkach głodzonych zawartości pewnych składników, których obecność jest niezbędnym warunkiem stałego wzrastania szybkości oksydacji. Dopływ pokarmu z zewnątrz w czasie wyczerpywania substancyj zapasowych, warunkuje dalsze wzrastanie szybkości oksydacyjnej. Jest rzeczą w wysokim stopniu prawdopodobną, że składnikiem zapasowym lub pokarmowym, którego obecność w nadmiarze jest niezbędnym warunkiem przyśpieszenia oksydacji, jest białko.

Druga serya pomiarów (doświadczeń naszych № 35) była prowadzona ze szczególną starannością i ścisłością. Jaja niezapłodnione, wzięte do doświadczenia, ważyły przeciętnie 2.67 mg. Wyniki tego doświadczenia ilustruje Tabl. X.

Przebieg szybkości oksydacji jest zupełnie taki sam, jak w doświadczeniu poprzednim. I tutaj napięcie oksydacji wzrasta do pewnego momentu (170 godzin rozwoju) następnie zaś zmniejsza się stopniowo, znacznie jednak prędzej, niż to widać na rys. 3.

W obu doświadczeniach uderza prawidłowość przebiegu krzywej w pierwszym okresie, w którym oksydacja stale i nieprzerwanie wzrasta. Prawidłowość ta zachęciła nas do poczynienia prób w kierunku analizy matematycznej zależności oksydacji od stopnia rozwoju.

Tablica X.

№ kolejny pomiaru	DATA	Czas od za- płodnienia.	Ilość jaj lub za- rodków.	Czas trwania pomiaru.	Ilość pobra- nego O ₂ .	Ilość pobiera- nego O ₂ przez 100 jaj na go- dzinę.	STADYUM
		godz.		min.		mm ³	
1	29.IV g. 5 ⁰⁰ pp.	—	150	362	47,3	5,2	Jaja niezapłodnione
2	30.IV g. 2 ⁰⁰ pp.	25,0	75	225	46,3	16,4	Początek gastrulacyi
3	1.V g. 5 ⁰⁰ pp.	52,0	50	339	93,4	33,1	Neurula
4	2.V g. 7 ³⁰ w.	78,5	30	75	29,0	77,3	Przed wykluciem
5	4.V g. 1 ⁰⁰ pp.	120,0	10	130	50,1	231,3	Skrzela zewnętrzne
6	5.V g. 6 ⁴⁵ w.	149,7	10	93	50,3	324,3	Skrzela dobrane roz- winięte
7	6.V g. 3 ⁰⁰ pp.	170,0	6	258	101,1	392,2	Zanik skrzel zew- nętrznych
8	7.V g. 1 ³⁰ pp.	193,5	5	137	33,7	295,5	} Bez skrzel zew- nętrznych
9	9.V g. 4 ⁴⁰ pp.	245,5	4	103	17,6	255,9	
10	11.V g. 1 ⁴⁵ pp	288,7	5	129	22,9	213,6	

Z pośród najprostszych zależności matematycznych stwierdzone powyżej zachowanie się oksydacyi w czasie rozwoju najlepiej odpowiada warunkom równania krzywej parabolicznej:

$$x = kt^2 + a,$$

w którym x jest szybkością oksydacyi w czasie t , jaki upłynął od momentu zapłodnienia, a oznacza szybkość pobierania tlenu przez jaja niezapłodnione, k zaś jest stałą zjawiska, czyli stałą przebiegu oksydacyi w czasie rozwoju.

Rozwiązując to równanie dla danych doświadczenia 35-go, otrzymujemy następujące wartości dla k i dla x .

t godziny	x znal. mm ³ O ₂	x obl. mm ³ O ₂	$k = \frac{x-a}{t^2}$
0	5.2	5.2	—
25.0	16.4	13.9	0.0179
52.0	33.1	40.8	0.0103
78.5	77.3	66.8	0.0117
120.0	231.3	191.5	0.0157
149.7	324.3	316.7	0.0142
170.0	392.2	406.9	0.0134
			<hr/> 0.0139

Stała równania parabolicznego, obliczona według przytoczonego wzoru, wykazuje dla obserwacji poszczególnych wartości, które nie ujawniają zmian prawidłowych w określonym kierunku, wahając się nieprawidłowo wokół pewnej wielkości przeciętnej, równej 0.0139 ¹⁾.

Na rys. 4 podajemy wykres równania parabolicznego, którego przeciętna wartość $k = 0.0139$.

Zgodność między wartościami stwierdzonymi w doświadczeniu, a wartościami obliczonymi, możemy uważać za zupełnie zadowalającą, ponieważ odchylenie punktów eksperymentalnych od krzywej teoretycznej jest w samej rzeczy bardzo nieznaczne.

Według tegoż wzoru zostały również obliczone wyniki doświadczenia 29-go, w którym opuszczamy pomiary 2-gi i 3-ci, jako błędne.

t godziny	x znal. mm ³ O ₂	x obl. mm ³ O ₂	$k = \frac{x-a}{t^2}$
0	8.0	8.0	—
48.2	36.4	38.2	0.0122
76.2	71.8	83.5	0.0110
101.2	153.8	141.1	0.0142
142.7	305.2	272.7	0.0146
			0.0130

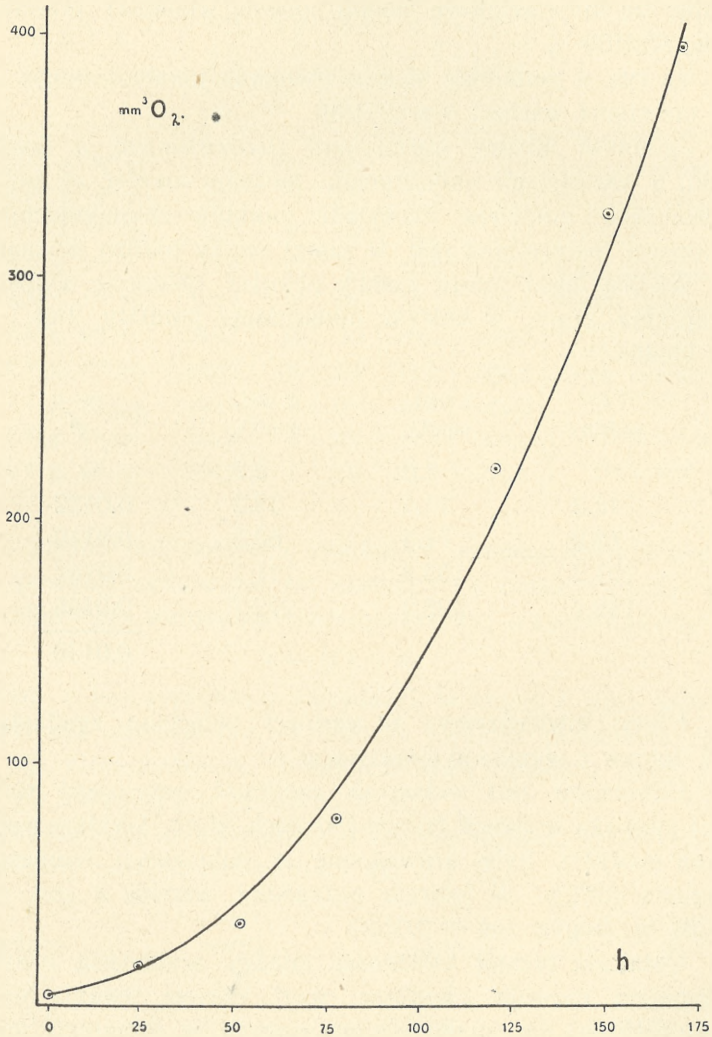
I tutaj stwierdzamy, że wartości obliczone zgadzają się dość dobrze z wynikami obserwacji.

Uderzająca jest zwłaszcza zgodność przeciętnej wartości stałej zjawiska w dwóch doświadczeniach, które, jakśmy wzmiankowali powyżej, były prowadzone w jednakowej temperaturze otoczenia (20°C). W jednym przypadku wartość k jest równa 0.0139, w drugim zaś — 0.0130.

Ustalenie prostej zależności między szybkością oksydacji a stopniem rozwoju zarodków, wzgl. czasem trwania rozwoju, skierowało nas do przejrzania istniejących w literaturze danych, dotyczących oddychania zarodków przedstawicieli innych grup zwierzęcych.

¹⁾ Wobec tego, że chodziło nam nie o dokładną wartość stałych, tylko o ogólny charakter krzywych, przeto nie obliczaliśmy stałych na zasadzie metody najmniejszych kwadratów.

W tym kierunku zużytkowaliśmy w pierwszym rzędzie wyniki badań Bohr'a i Hasselbalch'a ¹⁾ nad oddychaniem za-



Rys. 4.

rodków kury. Wyniki tych obliczeń podajemy poniżej.

¹⁾ Bohr i Hasselbalch. l. c. str. 442..

Bohr i Hasselbalch. Dośw. № 21.

t dni	x znal. cm ³ CO ₂	x obl. cm ³ CO ₂	$k = \frac{x}{t^2}$
5.	10.6	11.5	0.424
6.	17.9	16.6	0.497
7.	20.2	22.6	0.412
8.	29.6	29.6	0.462
9.	37.1	37.4	0.458
10.	47.3	46.2	0.473
11.	61.1	55.9	0.505
			0.462

Okazuje się, że w początkowych stadiach rozwoju embryonalnego, odpowiadających okresowi od 5-go do 11-go dnia wylęgania włącznie, szybkość oddychania zarodków kurczęcia biegnie według krzywej parabolicznej. W okresach późniejszych następuje jednak wybitne odchylenie krzywej eksperymentalnej od krzywej teoretycznej, świadczące o bardziej skomplikowanej zależności w okresach końcowych.

Inna grupa zwierzęca — szkarłupnie była przedmiotem dosyć licznych badań nad zachowaniem się oddychania w czasie rozwoju. Pomimo to jednak, wyniki tych badań nie nadają się do bliższej analizy matematycznej z powodu braku seryi pomiarów, które zostałyby przeprowadzone w sposób dostatecznie ścisły. Według Meyerhoff'a przebieg oksydacji i produkcji ciepłej w czasie początkowego rozwoju jeźowców ma się zachowywać również według krzywej parabolicznej ¹⁾.

Na podstawie powyższych faktów można przypuszczać, że szybkość oksydacji zachowuje się w podobny sposób w czasie rozwoju przedstawicieli innych grup zwierzęcych.

Na razie z rozważań powyższych wysnuć możemy wniosek następujący: w stałych warunkach otoczenia szybkość

¹⁾ Odmierna jest szybkość oksydacji w jajach mięczaka *Aplysia*; według zgodnych obserwacji Buglii i Meyerhoff'a (l. c. str. 429 i 455) w czasie pierwszych podziałów następuje zmniejszenie się energii oddechowej, która następnie nagle wzrasta, pozostając na jednym poziomie w stadium larwy; krzywa szybkości oksydacji posiada zatem kształt litery S.

oksydacji w początkowych okresach rozwoju żaby, kurczenia i jeżowca jest wprost proporcjonalna do kwadratu z czasu trwania rozwoju.

V. Wnioski ogólne.

Wyniki w pracy niniejszej osiągnięte pragniemy rozważyć w świetle istniejących poglądów na mechanizm pobierania tlenu.

Wygłoszona ostatniemi czasy przez Warburg'a¹⁾ teoria oksydacji zasługuje na szczególne uwzględnienie. Według tego autora pobieranie tlenu przez komórki żyjące jest wypadkową dwóch procesów katalitycznych. Pewna część ogólnej ilości tlenu jest pochłaniana na drodze wyłącznie chemicznej, dzięki obecności substancyj przyspieszających oksydację; pobieranie zaś pozostałych ilości tlenu jest uwarunkowane i ściśle związane ze szczególnem ułożeniem substancyj, które autor nazywa „strukturą katalityczną“ komórki.

W komórkach wykształconych morfologicznie przeważa kataliza drugiego rodzaju, przyczem szybkość pobierania tlenu jest tem większa im komórka więcej zawiera struktury. Odwrotnie rzecz się ma w komórkach jajowych, w których oksydacja prawie wyłącznie odbywa się na drodze chemicznej. Zapłodnienie wywołuje zjawisko pomnażania się struktury i wpływa pośrednio na szybkość oksydacji. W miarę rozwoju kataliza strukturalna wzrasta niepomniernie, zaś oksydacja chemiczna zmniejsza się odpowiednio.

Wnioski i poglądy Warburg'a są poparte całym szeregiem analitycznie pomyślanych doświadczeń, z których najważniejszymi są te, które dotyczą jaj jeżowców. Poszukiwania w tym kierunku dowiodły, że zniszczenie struktury w jajach niezapłodnionych nie zmienia pierwotnej szybkości oksydacji, ponieważ pobieranie tlenu jest tutaj uzależnione prawie całkowicie od katalizy chemicznej. Natomiast częściowe tylko zniszczenie struktury jaj zapłodnionych powoduje zmniejszenie się szybkości oksydacji o 90%. Warburg wnioskuje, że zapłodnienie wywołuje znaczne zmiany strukturalne w warstwie powierzchni-

¹⁾ Warburg O. Beiträge zur Physiologie der Zelle, insbesondere über die Oxydationsgeschwindigkeit in Zellen. Erg. d. Physiol. 1914.

wej jajka, zaś komplikacja strukturalna pociąga za sobą przyspieszenie oksydacji. Zgodnie z tą teorią, istota zapłodnienia polegałaby zatem na uruchomieniu takich procesów, które prowadzą do zwiększania się ilości struktury w jajku.

Wprowadzenie pojęcia struktury, jako kompleksu niewidzialnych form materii żyjącej, z którymi nierozzerwalnie związana jest praca mechaniczna komórki i jej procesy oksydacyjne, stanowi duży krok naprzód w kierunku interpretacji mechanizmu spalań w organizmie; szczególnie zaś w zastosowaniu do procesów rozwojowych pojęcie to może okazać się pożytecznym, ponieważ pozwala ono ująć w całość te zjawiska, które warunkują zmiany w szybkości oksydacji.

Istotnie, stwierdzona przez nas zgodność przebiegu procesów oddechowych w różnych grupach zwierzęcych wskazuje na to, że u podstawy zjawisk rozwojowych znajduje się jeden i ten sam proces, którego wyrazem zewnętrznym jest szybkość oksydacji. Tym procesem byłyby — zgodnie z teorią Warburg'a — przyrost składników strukturalnych, związany z komplikacją morfologiczną zarodka.

Teoria struktury oksydacyjnej jest poniekąd rozwinięciem dawniejszych poglądów Voit'a ¹⁾ na organizację materii żyjącej, które zostały następnie uzupełnione przez badania Pflüger'a i Rubner'a. Badania Voit'a nad przemianą azotową zwierząt doprowadziły do rozróżniania dwóch rodzajów białka w zależności od udziału, jaki one biorą w procesach rozpadowych natury oksydacyjnej: białko organizowane, nieodzowna część składowa komórek i tkanek żyjących, z trudnością ulegająca rozpadowi, i białko zapasowe, wzgl. pokarmowe, służące do restytucji i syntezy białka organizowanego i ulegające łatwo rozpadowi.

Między teorią struktury, a teorią organizacji białka istnieje niezawodnie różnica zasadnicza: pierwsza bowiem uważa strukturę za masę czynną, wyzwalającą procesy oksydacyjne, gdy druga traktuje białko organizowane, jako masę bierną, posilkując się terminem „organizacja“ jako synonimem odporności względem procesów oksydacyjnych. Sądzymy jednak, że prędzej

¹⁾ Voit: Physiologie des allgemeinen Stoffwechsels und der Ernährung. (Hermann'a: Handbuch der Physiologie. T. 6. Lipsk 1881).

znajdziemy się na drodze dokładnego zrozumienia stwierdzonych przez nas faktów, jeżeli dwie te teorie zespolimy w jedną całość i uważać będziemy białko organizowane za podłoże struktury oksydacyjnej.

Niezmiernie ważnym w tym kierunku jest jeden z wyników badań Hasselbalch'a ¹⁾ nad zależnością energii oddechowej od wielkości zarodków. Rezultat tych poszukiwań polega na stwierdzeniu faktu, że szybkość oksydacji u zarodków ptaków i ssaków w odniesieniu do wagi żywej zarodka jest wielkością stałą dla gatunku i jest niezależna od stadium rozwojowego, w jakim zwierzę się znajduje. Ponieważ głównym składnikiem ciała zarodków jest białko i związki pokrewne, dlatego też w badaniach Hasselbalch'a znajdujemy dowód, że szybkość oksydacji zależy pośrednio od ilości białka, wchodzącego w skład zorganizowanych części ustroju embryonalnego. Oczywiście, gdyby fakt powyższy można było przenieść i na inne grupy zwierzęce, posiadające, jak płazy, holoblastyczny typ bruzdkowania, to obserwowana w danym momencie rozwojowym szybkość oksydacji byłaby miarą ilości zsyntezowanego do danej chwili białka organizowanego.

W świetle tych rozważań skłonni jesteśmy główne wyniki naszej pracy tłumaczyć w sposób następujący:

Minimum oddechowe jaj niezaplodnionych jest uwarunkowane obecnością niezmiernie małych ilości białka organizowanego. Zredukowanie energii oddechowej jest wynikiem procesów owogenetycznych, w czasie których zachodzi zmniejszanie się procentowej zawartości białka organizowanego. Proces ten może odbywać się biernie w okresie wzrostu jajka, wskutek gromadzenia się substancji zapasowych, lub też czynnie — w okresie dojrzewania, jako wynik redukcji chromatynowo-plazmatycznej.

Zaplodnienie stanowi bodziec, wyzwalający procesy powstawania białka organizowanego kosztem białka zapasowego; procesy te wpływają pośrednio na szybkość oksydacji. Wniknięcie

¹⁾ Hasselbalch, l. c. str. 433.

plemnik zlekką tylko podnieca procesy syntetyczne, których napięcie wzrasta stopniowo i bez przerwy aż do chwili wyczerpania się białka zapasowego; dopływ białka pokarmowego umożliwia w dalszym ciągu procesy organizacyi.

W czasie rozwoju początkowego szybkość syntezy białka organizowanego jest proporcjonalna do kwadratu z czasu, jaki upłynął od chwili zapłodnienia.

Źródłem energetycznym tych procesów są głównie tłuszczowe substancje zapasowe jajka. Zapłodnienie nie wprowadza w tym kierunku żadnych zmian, przyspiesza tylko rozpad oksydacyjny składników tłuszczowych.

SUMMARY.

K. Białaszewicz and R. Błędowski:

The influence of fertilization on the respiration of eggs.

Communication announced on the 15-th of Mai 1915.

(From the Physiological Laboratory of the Scientific Society of Warsaw, Poland).

The experiments were made on eggs of the Common frog (*Rana temporaria*), but in the theoretical part are also considered experiments of other authors (Bohr, Hasselbalch, Loeb, Warburg and Meyerhoff), concerning development of hen and sea-urchin eggs.

The apparatus of Thunberg-Winterstein (Fig. 1), based on the principle of communicating vessels, was used as method of investigation. It did not only allow to equalize the barometric pressure, but was also very useful in some other phenomena, which occur in frog eggs, during respiration. We mean the question of „neutral gas“, which is produced by unfertilized eggs, during first several hours of experiment (Tab. I). We did not prove its chemical composition, but following the results of Hasselbalch in hen eggs, we can suggest in it at least a mixture of nitrogen and oxygen.

In order to avoid some methodical mistakes, which could rise from that fact, we have had to compensate the gaseous exchange of experimented eggs in one vessel by an identic quantity of eggs (from the same female) in the other. In experiments carried in that way we could measure the eliminated carbon dioxide by putting in vessel *A* some 30% potassium hydroxide (KOH) on little spoon, near its bottom; then, the carbon dioxide, produced by eggs in vessel *B*, could be measured. The drop of petroleum in horizontal tube (*N*) and gauge of apparatus (*R*, *M*) allowed to measure eliminated and absorbed gas in cubic millimeters.

We made several experiments for studying elimination of CO_2 in atmosphere of other gaseous media, nitrogen and hydrogen, filling the apparatus with mentioned gases instead of air. Results of this investigation are represented in Tab. II, III and IV and on the diagram, Fig. 2.

When consumption of oxygen was to be measured, eggs—like above—were put in equal quantities in both vessels, but through one of them (e. g. the right one) a current of pure nitrogen was passed during 30—60 minutes, in order to remove all the air. So, we measured oxygen, which was absorbed in left vessel.

These two fundamental methods for measuring eliminated carbon dioxide and absorbed oxygen were sufficient for the determination of respiratory quotient (*RQ*). It was on the same eggs that this determination of CO_2 and O_2 were carried forth.

In experiments on fertilized and developing eggs similar methods were used, except, that eggs were put in the apparatus only after the jellious membrane, which swelled easily in destiled water, was taken away.

Developmental stages and tadpoles, which were hatched from artificial fertilized eggs of the same female, were held in a large vessel in a constant temperature (25° C.), to be used afterwards in investigations concerning increase of oxydations rate during development. For each experiment part of them were used.

Determination of specific weight was carried after method of Lyon with gum arabic.

The eggs separated from ovary and collected in lower parts of oviduct seem to differ in their gas output from other tissues. As shown in Tab. II, eggs, taken from that part of the oviduct, eliminate large quantities of carbon dioxide; the rate of this elimination is at first greater than after 170 minutes (calculated from beginning of experiment) and is further limited by the normal production in equal rates. In order to show how eggs behave in different gas atmospheres, we measured the elimination of CO_2 in atmosphere of pure hydrogen and nitrogen (Tab. III and IV). The result of this research is very similar to the behaviour in air atmosphere. Diagram (Fig. 2) is showing the rate of CO_2 elimination in mentioned, different atmospheres of air, nitrogen and hydrogen.

The tables and diagram seem to show clearly, that the carbon dioxide diffuses from eggs to surrounding gas medium very quickly at first and after some time that CO_2 is eliminated in equal quantities: i. e. normal respiratory production.

The conclusion is, that during life in compact masses in the oviduct the eggs accumulate large quantities of CO_2 , which must be eliminated, when eggs are brought into an atmosphere of diminished concentration of CO_2 . The analysis of gas, extracted from eggs (in vacuum, under mercury) showed 35 — 52% of CO_2 .

The acces of free atmospheric oxygen to eggs in oviduct being difficult, there is no definite arrangement for removing the produced dioxide. The final effect of accumulation of CO_2 is, that eggs become injured by constant influence of the medium ¹⁾.

¹⁾ We could show in a series of special experiments, that eggs submitted to influence of pure CO_2 , become unable for fertilization after two hours.

The phenomenon known as prematurity of eggs seems to be based upon the injurious influence of carbon dioxide.

We suggest also, that the immense quantities of CO_2 eliminated by the hen egg, shown in experiments of Bohr and Hasselbalch (see authors experiments VI, VIII and IX) and accumulated in calcareous shell derive probably from the period, when eggs were still in oviduct.

The further aim of our investigation was to throw light on question of gas exchange in eggs before and after fertilization. The literature of physiology of development is lacking researches, concerning the fate of substances deposited in eggs. Baudrimont, Tichomiroff and Liebermann pointed out, that eggs, when developing, consume fats in their energetic processes. The only exception is in fish eggs, which, as it was indicated by Tangl and Farkaš, show the increase of fats during development. The role of the spermatozoid as activator in desintegration of fats in eggs is unknown.

We intended to determine the respiratory quotient $\left(\frac{CO_2}{O_2}\right)$ in frog eggs, unfertilized and fertilized, because that relation should indicate, which substances in eggs underlie oxydation. This should explain whether metabolism is changed by penetrating sperm-cell, or not. Tab. V shows the quantities of CO_2 eliminated and O_2 consumed by 100 unfertilized eggs, during 60 minutes. The data in the table permit to calculate the respiratory quotient (RQ) of matured eggs. This quotient oscilates in limits from 0.543 to 0.639, average 0.60.

There is a difference between this and normal quotient of fat substances, brought to complete oxydation (0.72); but that difference can be explained, as we wish to suggest, by some other processes of desintegration, perhaps of hydrolitic nature.

Nevertheless, the mentioned respiratory quotient is so near to the datum pointed out for fats, that our suggestion, that un-

fertilized eggs consume, when living, fat substances ought not to be far from truth.

The next step was to determine the respiratory quotient in fertilized eggs. We took care, that all eggs should develop normally in conditions of experiment. The duration of one experiment was 120—210 minutes (as shown in Tab. VI). The relation of $\frac{CO_2}{O_2}$ computed like in foregoing experiments was quite near to the coefficient of unfertilized eggs. It oscilated from 0.511 to 0.682; average 0.61.

That result suggests that during first hours of development eggs consume — like unfertilized eggs — their stored fat substances.

Hence we must emphazise, that unfertilized, matured eggs, when in contact with oxygen, respire, while consuming their fat substances, and that the penetration of the sperm-cell stimulates, probably, a complex of new chemical processes and awakes, beside the process of desintegration, also many synthetic ones, without influencing the character of oxydation.

The fertilization does not interrupt the continuity of general metabolism of the frog egg, which is enabled to fulfill all its energetic needs by decomposing and oxydizing the fat substances, accumulated in the egg-cell.

The respiratory quotient does not explain sufficiently the influence of fertilization on the process of oxydation. We attempted to determine the oxydation rate in eggs in various life conditions.

It seemed desirable to obtain some notes, concerning the fact, whether the oxydation rate of unfertilized eggs depends on the surface dimensions of egg or on its mass. The direct determination of weight of egg caused great difficulties and we were obliged to measure only the diameter (by microscopical projection) and so to calculate its surface (πr^2). By multiplying the volume ($\frac{4}{3} \pi r^3$) by specific weight we obtained the mass of the egg.

The examination of figures, included in Tab. VII. shows, that the smallest deviation from the average value results, when the absorbed quantity of oxygen is reported to the mass of egg (indicated in kilogramms and cubic centimeters). It is confined to 18%, while it amounts to 33% and 19.2%, when reported to the quantity of individuals measured or to their surface.

It is evident from the last column in Tab. VIII, that a kilogramme of unfertilized eggs absorbed 21.6 cubic centimeters of oxygen per hour. This result appears of peculiar interest, when compared with the fact, that a kilogramme of body-weight of frogs (according to the experiments of Bohr) consumes 261.8 cubic centimeters of O_2 during the same time.

That means, that the intensity of combustion in matured egg-cell can be estimated on average as the tenth part of rate of oxygen consumption in somatic cells.

The examination of figures in our experiments (№ 29, 33, 35), as in Tab. VIII, shows, that fertilization exerts an influence on increase of oxydations rate in frog eggs. That influence is however not so great, as it could be suggested from investigation of Warburg in eggs of sea-urchin. In frog eggs the increase of oxydation is only 10% per hour, similar to star-fish eggs, where the penetration of spermatozoid stimulates but slightly the process of oxydation, which mounts in first stages of cleavage gradually and without interruption.

As concerns relation between nuclei mass in embryo and absorption of oxygen, we can state, that the rate of oxydation is not proportional to general mass of nuclear substance (see also Warburg).

Tables IX and X and diagram (Fig. 3) show clearly, that our results agree with the suggestion of Godlewski and confirm, that the energy of respiration in frog embryos increases during development. As indicated in curve the rate of increase

of oxydation is greater than the increase of time; after 142.7 hours of development it is 38 times greater than in unfertilized eggs. The second part of curve seems to show, that at a certain moment the ammount of substance, which stimulates oxydation is diminished; it appears, that those substances are brought to embryo in form of food-stuff, e. g. in form of jelly of eggs (see interpolation in curve, Fig. 3). After feeding the increase of the oxydation rate continues again.

The normal oxydation can be expressed in form of parabolic curve (Fig. 4), corresponding with the equation: $x=kt^2+a$, where x means velocity of oxidation during time t ; a —velocity of combustion in unfertilized eggs; k —constans.

The results of experiments of Bohr and Hasselbalch in hen eggs (№ 21), when calculated like our own, show very similar data and correspond also with parabolic curve (see: table, pag. 462). The same conclusion can be drawn from experimental figures of Meyerhoff in sea-urchin.

The facts outlined above to be summarized as follows:

In constant conditions of surrounding medium the rate of oxydation in early developmental stages of frog, hen and sea-urchin is directly proportional to square of time of development.

