

K. BIAŁASZEWICZ.

**O zastosowaniu ultrafiltracji w badaniach
n. z rozmieszczeniem elektrolitów w cy-
toplazmie**

*Sur l'emploi de l'ultrafiltration pour l'étude de
la répartition des électrolytes dans le cytoplasme*



WARSZAWA

DRUK. I LIT. p. f. „JAN COTTY” W WARSZAWIE, KAPUCYŃSKA 7.

1927.

Wydawnictwa Instytutu im. Nenckiego są do nabycia w tomach i oddziałkach. Adres: „**Ekspedycja Kasy im. Mianowskiego**”. Ul. Nowy-Świat 72. Warszawa.

Les publications de l'Institut Nencki se vendent en volumes ou séparément — en tirages. Adressez les demandes: „**Ekspedycja Kasy im. Mianowskiego**”. 72, rue Nowy-Świat. Varsovie.

PRACE INSTYTUTU im. NENCKIEGO
TRAVAUX DE L'INSTITUT NENCKI

Tom IV, zesz. 2.

*Z Zakładu Fizjologii Instytutu
i Stacji Zoologicznej w Neapolu.*

K. BIAŁASZEWICZ.

O zastosowaniu ultrafiltracji w badaniach nad rozmieszczeniem elektrolitów w cytoplazmie¹⁾.

Sur l'emploi de l'ultrafiltration pour l'étude de la répartition des électrolytes dans le cytoplasme.

Rzecz zgłoszona dn. 15. I. 1927.

En étudiant la répartition des électrolytes dans le cytoplasme, au moyen de la méthode de l'ultrafiltration, on a à surmonter de grandes difficultés pour séparer les colloïdes de la phase aqueuse. A cause de la grande quantité de colloïdes dans le cytoplasme, on n'obtient des résultats satisfaisants avec cette méthode que lorsqu'on travaille avec du cytoplasme dilué. Il en est de même pour la méthode de dialyse avec compensation.

En conséquence, la nécessité s'est imposée d'éclaircir en premier lieu le comportement des électrolytes anorganiques dans le cytoplasme dilué à divers degrés. Nous nous sommes servi, comme matériel d'expérience, du cytoplasme d'oeufs de divers animaux (surtout *Gallus domesticus* L., *Salmo fontinalis* L., *Labrax lupus* Cuv. et *Torpedo ocellata* Raf.). Pour la dilution de l'ooplasmе, des solutions isosmotiques des sels neutres (Li_2SO_4 , $LiNO_3$, $NaNO_3$) ont été employées, ou bien, dans des cas exceptionnels (*Torpedo Labrax*), de l'eau distillée.

¹⁾ Komunikat przedstawiony na posiedzeniu III Wydz. Tow. Nauk. Warsz. w dniu 3 marca 1927 r.

Après avoir préparé une série de mélanges de l'ooplasme avec le liquide diluant, on filtrait ces mélanges par les ultrafiltres et on dosait dans les ultrafiltrats d'une part, et dans les cendres des mélanges de l'autre, les constituants suivants: le potassium, le sodium, le calcium, le magnésium, le phosphore et le chlore. Sur les tableaux, le contenu de ces composés est évalué en milligrammes par 1 cm^3 de liquide. Dans les expériences exécutées avec les oeufs de *Torpedo*, on déterminait le point de congélation de l'ooplasme et des mélanges de l'ooplasme avec de l'eau distillée.

Nos expériences ont tous d'abord démontré (tabl. I) que le pourcent du chlore, lié à la phase dispersée, est presque indépendant du degré de dilution de l'ooplasme (n). Ce comportement du chlore permet de déterminer (tab. I) le volume du liquide intermicellaire dans 1 cm^3 de l'ooplasme (d_0), en s'appuyant sur les déterminations de la concentration du chlore dans les ultrafiltrats ($u_1 \dots u_x$) de l'ooplasme dilué (v. équation 5). Nous nous sommes basés sur le même principe pour calculer la valeur de d_0 dans le jaune des oeufs de *Torpedo* (tab. II), où la concentration de la phase aqueuse de l'ooplasme et de ses mélanges a été déterminée par la méthode cryoscopique (v. éq. 4).

La valeur de d_0 une fois établie permet de définir plus exactement la répartition des électrolytes dans les divers mélanges du cytoplasme. Cette répartition est caractérisée par le quotient δ , qui exprime le rapport entre la quantité d'un composé dans le liquide intermicellaire (ud) et sa quantité totale (c) dans le mélange respectif (v. éq. 4).

Les valeurs de δ (calculées pour les différents composés et pour des mélanges d'ooplasme de différente dilution) démontrent (tab. III, IV et V) que les ions du potassium se comportent, dans les mélanges dilués, à peu près comme ceux du chlore, en ce que leur quantité relative dans le liquide intermicellaire change fort peu avec la dilution. Par contre, les cations des métaux bivalents (*Ca*, *Mg*) et les anions des phosphates (v. le diagramme sur la p. 19) se comportent tout

¹⁾ D'après les méthodes microanalytiques, décrites dans notre précédent travail ('26).

différemment. Ils forment avec la phase disperse de la cellule des liaisons moins stables et, en conséquence, dans les mélanges plus dilués, ils passent en grandes quantités dans le liquide intermicélaire.

L'analyse quantitative de ces phénomènes a démontré en plus, que la valeur du quotient δ est sensiblement une fonction rectiligne du degré de dilution de l'ooplasme (n). Cette relation permet de calculer par extrapolation les valeurs initiales de δ pour l'ooplasme non dilué (v. éq. 7).

Nous avons donc évalué la concentration des électrolytes dans le liquide intermicélaire du cytoplasme non dilué (u_0), en nous basant sur les données suivantes: la valeur moyenne de la concentration globale des composés minéraux dans le cytoplasme, qui ont été dosés dans les cendres (c_0); la valeur des quotients δ_0 , calculés d'après la répartition de ces composés dans les mélanges du cytoplasme dilué; le volume de la phase aqueuse du cytoplasme (d_0), déterminé d'après le degré de dilution des mélanges (n) et d'après la concentration, dans les ultrafiltrats, du composé non adsorbable.

* * *

Treść: 1) Uwagi wstępne. 2) Materiał, technika doświadczeń i metody mikroanalityczne. 3) „Przestrzeń rozpuszczająca” cytoplazmy. 4) Rozmieszczenie elektrolitów w cytoplazmie. 5) Stężenie elektrolitów w obu fazach cytoplazmy. 6) Streszczenie wyników.

1. Uwagi wstępne.

Badanie lat ostatnich, przeprowadzone z pomocą ultrafiltracji i dializy kompensacyjnej, w znacznym stopniu przyczyniły się do wyświetlenia stosunku elektrolitów do substancji koloidalnych w cieczach ciała. Prace odnośnie ¹⁾ stwierdziły, że

¹⁾ Literatura zagadnienia jest podana w sposób wyczerpujący w referacie Ausbergera ('25).

dzięki wiązaniu się soli nieorganicznych z koloidami tylko część ich znajduje się we krwi w roztworze wodnym. Fakt ten posiada doniosłe znaczenie dla interpretacji zjawisk wymiany materji, które zachodzą między osoczem a elementami komórkowymi, z jednej strony, a środowiskiem zewnętrznym organizmu — z drugiej.

O ile stan obecny wiadomości o rozmieszczeniu elektrolitów w cieczach ciała można uważać za zadawalający, to o stosunku składników nieorganicznych do fazy koloidalnej w komórkach i w tkankach zwierzęcych jesteśmy poinformowani w sposób zgoła niedostateczny. Wszystko, co wiemy o składnikach mineralnych cytoplazmy, sprowadza się niemal wyłącznie do analiz popiołu¹⁾, które dają pojęcie jedynie o ryczałtowej zawartości tych substancyj, będących produktem doszczętej destrukcji fazy rozdrobionej komórki.

Tymczasem sprawa podziału składników popiołu pomiędzy fazą wodną i rozdrobioną komórki posiada niemałą doniosłość dla szeregu zagadnień fizjologicznych, z pośród których na pierwsze, bez wątpienia, miejsce wysuwają się procesy wymiany elektrolitów ze środowiskiem otaczającym. Wyświetlenie mechanizmu tego zjawiska jest nieosiągalne bez dokładnej znajomości składu chemicznego cieczy międzycielarnej w obu układach koloidalnych, t. j. nie tylko w osoczu, lecz również w cytoplazmie.

Jedną z głównych przyczyn obecnego stanu wiadomości o komórce są niezawodnie trudności, jakie nastęrczają się w oddzielaniu fazy wodnej od fazy rozdrobionej. W pracy niniejszej trudności te usiłowaliśmy usunąć pośrednio, badając zachowanie się elektrolitów w mieszaninach cytoplazmy rozcieńczonej, z łatwością dającej się cedić przez błony ultrafiltracyjne. Analizy tych mieszanin oraz ich ultraprzesączów pozwalają wnioskować o rozmieszczeniu elektrolitów w materiale wyjściowym, t. j. w samej cytoplazmie.

Poniżej podajemy opis doświadczeń, mających na celu ustalenie wartości t. zw. „przestrzeni rozpuszczającej“ oraz — rozmieszczenia i stężenia niektórych elektrolitów w obu fazach cytoplazmy.

¹⁾ Por. artykuł Arona i Gralki ('24).

2. Materiał, technika doświadczeń i metody mikroanalizy.

W badaniach nad rozmieszczeniem elektrolitów w komórce nie mniejsze znaczenie od metody posiada wybór odpowiedniego obiektu. Powinien on, przede wszystkim, zapewniać możliwość rozporządzania dostatecznymi ilościami materiału wyjściowego, niezbędnymi dla przeprowadzenia szeregu analiz chemicznych, a następnie — winien ujawniać pewne właściwości, umożliwiające otrzymanie cytoplazmy w stanie zupełnie czystym, pozbawionym domieszek obcych. Ostatni wzgląd ogranicza w znacznym stopniu wybór obiektu wśród tkanek ustroju zwierzęcego, które przeważnie są obficie unaczynione: zupełne usunięcie krwi z naczyń włosowatych oraz limfy z przestrzeni międzykomórkowych nastęca, jak wiemy z badań Fahra ('08), Urano ('08) i innych autorów, bardzo poważne trudności.

Wzgląd powyższy skierował uwagę na komórki jajowe, jako na materiał najodpowiedniejszy. Ten typ komórek daje się bowiem z łatwością uwolnić od zanieczyszczeń (głównie — resztek cieczy ciała, „białka“ lub wody morskiej, przylegających do powierzchni jaj) oraz można go mieć w dużych ilościach do dyspozycji. W doświadczeniach, opisanych poniżej, posługiwaliśmy się, jako materiałem wyjściowym, jajami następujących zwierząt: *Gallus domesticus* L., *Salmo fontinalis* L., *Labrax lupus* Cuv. i *Torpedo ocellata* Raf.

W tej części pracy podajemy wskazówki, którymi kierowaliśmy się w doświadczeniach: dotyczą one przygotowywania materiału, mierzenia objętości cytoplazmy, postępowania przy rozcieńczaniu cytoplazmy i sporządzaniu ultraprzesączów oraz — metod spiekania i oznaczania niektórych składników w popiele i w ultraprzesączach.

Oczyszczanie materiału uskutecziano w ten sposób, że jaja oplukiwano kilkakrotnie małymi porcjami izosmotycznych roztworów azotanu litu, odcinając naprzód cienką pipetą, a potem — bibułą, resztki cieczy, przylegającej do powierzchni jaj.

Pozbawione domieszek obcych jaja ścierano następnie w moździerzu, uwalniano od błon, cedząc miążgę przez muslin, dzielono na porcje i ważono.

Jedna z porcji cytoplazmy służyła do pomiarów objętości właściwej, które wykonywano przy pomocy piknometru.

Z masy i objętości właściwej obliczano objętości pozostałych porcji ooplazmy, przeznaczonych do przygotowania mieszanin.

Do rozcieńczania miazgi używano bądź wody destylowanej (w doświadczeniach nad jajami *Torpedo* i *Labrax*), bądź też — co miało miejsce w większości przypadków — roztworów wodnych (obojętnych na lakmus) Li_2SO_4 , $LiNO_3$ i $NaNO_3$ o stężeniu, izosmotycznym w stosunku do jaj badanych. Najodpowiedniejszą cieczą okazał się, jak wynika z odnośnych doświadczeń, roztwór azotanu litu. Mieszaniny o znanym stopniu rozcieńczenia sporządzano przez dodanie do określonej ilości ooplazmy ściśle odmierzonych objętości odpowiednich roztworów. Po dokładnem wymieszaniu przystępowano niezwłocznie do sączenia.

Do sporządzenia ultraprzesączów posługiwano się wyłącznie aparaturą Zsigmondy'ego ('18), używając lejków brązowych (*WB*) lub porcelanowych (*PA*) o średnicy 9 cm oraz błon ultrafiltracyjnych de Häena o tychże wymiarach¹⁾. Stopień przepuszczalności błon sprawdzano, przepuszczając przez nie, naprzód—roztwór czerwieni kongo, a następnie — rozcieńczony roztwór białka kurzego i emulsję z żółtka. Przesącz badano na obecność białka i do doświadczeń używano tylko te sączki, które dawały przesącz, nie wykazujące reakcji biuretowej i nie dające strątu z odczynnikiem Johannisiana.

Sączenie odbywało się pod zwiększonym ciśnieniem, nie przekraczającym jednej atmosfery (Burian '09, '10). W celu przyspieszenia tego procesu, odbywającego się w razie sączenia cytoplazmy mało rozcieńczonej bardzo powoli (3—5 cm³ na godzinę), ciecz znajdującą się w lejku mieszano bez przerwy, uzyskując dzięki temu przyspieszenie kilkakrotne. Dla zmniejszenia do minimum t. zw. „błędu sączka“, wynikającego z obecności wody w błonie i jej własności adsorbcyjnych, tę ostatnią przed użyciem osuszano bibułą oraz usuwano pierwszą porcję (3—6 cm³) przesączu. Otrzymywano w ten sposób szereg przesączów zupełnie klarownych i pozbawionych białka, przeważnie zlekka zabarwionych na kolor szmaragdowy. Przed użyciem przesącze te rozcieńczano wodą destylowaną do jednakowego mniej więcej

¹⁾ „Vereinigung Göttinger Werke“.

stężenia składników, które oznaczano metodami mikroanalitycznymi.

Spopielenie pozostałości stałej mieszanin przeprowadzałem ściśle według metody, którą opisałem w pracy poprzedniej ('26) nad składnikami mineralnymi komórek jajowych.

W popiele mieszanin i w ultraprzesączach były oznaczane następujące składniki: *K*, *Na*, *Ca*, *Mg*, *P* i *Cl*. Posługiwałem się w tym celu metodami mikroanalitycznymi według wskazówek, podanych we wspomnianej pracy. Były to metody: Kramera i Tisdalla ('21 b)—na potas, Bálinta ('24), i Kramera-Tisdalla ('21 a, c, d) — na sód, de Waarda ('19) — na wapń, Kramera i Tisdalla ('21 d), Bella i Doisy'ego ('20) oraz Briggsa ('22) — na magnez, Briggsa ('22) — na fosfor i Whitehorna ('20) — na chlor.

3. „Przestrzeń rozpuszczająca“ cytoplazmy.

Wpływ, wywierany przez fazę rozdrobnioną na stężenie elektrolitów w roztworach niejednorodnych, został na materiale biologicznym poraz pierwszy zauważony przez Fredericę ('01, '02). Autor ten stwierdził, że u niektórych morskich zwierząt pojkilomotycznych stężenie soli nieorganicznych we krwi jest wyraźnie mniejsze, niż w wodzie morskiej, względem której zwierzęta te są izosmotyczne. Na podstawie specjalnie w tym kierunku przeprowadzonych poszukiwań Fredericę wykazał, że różnica ta ma swe uzasadnienie w fakcie, iż przestrzeń, w której są rozpuszczone sole, jest w rzeczywistości mniejsza od objętości krwi o objętość, jaką zajmują w niej substancje koloidalne.

Znaczenie tego faktu dla zjawisk, związanych z rozmieszczeniem i wymianą elektrolitów w cieczach ciała, było brane w rachubę w pracach późniejszych autorów, którzy zajmowali się sprawą stosunku składników nieorganicznych do substancji koloidalnych (Hamburger '02, Rona '10, Rona i György '13, Sörensen '15, Fridericia '20, Collip '20, Polányi '20, Ege '20, '21, Warburg '22, Ausberger '25, van Slyke '22, '23, Władimiroff '26, Lundsgard i Holböll '26). Na szczególną pod tym względem uwagę zasługują prace Polányi'ego ('20) i Ausbergera ('25), w których znajdu-

jemy teoretyczne ugruntowanie zasad mierzenia t. zw. „prze-
strzeni nierozpuszczającej“ w roztworach białka.

Z pośród dwu sposobów jej mierzenia, mianowicie — me-
tody stężania (Fredericq '02) i rozcieńczenia (Polányi
'20) krystaloidów w ośrodku dyspersyjnym, w poszukiwaniach
niniejszych oparliśmy się na tej ostatniej: pozwala ona bo-
wiem wnioskować nie tylko o stosunku wzajemnym obu faz,
ale również — o zmianach, jakie zachodzą w rozmieszczeniu
elektrolitów pod wpływem rozcieńczenia.

Stężenie ośrodka dyspersyjnego w mieszaninach cytoplazmy mie-
rzyliśmy w dwojaki sposób: albo oznaczając obniżenie punktu ich za-
marzania, lub też analizując ultraprzesącze, sporządzone z tych mie-
szanin. Na podstawie tych pomiarów obliczaliśmy objętość ośrodka
dyspersyjnego w materiale wyjściowym, t. j. w cytoplazmie.

W wyliczeniach tych wyszliśmy z dowolnego narazie za-
łożenia, że bezwzględna ilość ciał badanych, rozpuszczona w ośrodku
dyspersyjnym cytoplazmy, nie ulega zmianie pod wpływem roz-
cieńczenia. Założenie to możemy przedstawić w postaci szeregu
równań

$$u_0 d_0 = u_1 d_1 n_1 \dots = u_x d_x n_x, \quad (1)$$

w których symbole $d_0, d_1 \dots d_x$ oznaczają objętość ośrodka dys-
persyjnego („przestrzeni rozpuszczającej“, fazy wodnej) w 1 cm³
cytoplazmy, wzgl. szeregu mieszanin o wzrastającym stopniu
rozcieńczenia, $u_0, u_1 \dots u_x$ — zawartość jakiegoś ciała w 1 cm³
ośrodka dyspersyjnego cytoplazmy i mieszanin, zaś $n_1 \dots n_x$ —
stopień rozcieńczenia cytoplazmy w danej mieszaninie, t. j. sto-
sunek objętości mieszaniny ($v_1 \dots v_x$) do objętości zawartej w niej
cytoplazmy ($p_1 \dots p_x$), czyli

$$n_1 = v_1/p_1; \quad n_x = v_x/p_x$$

Z równań tych wynika, że obchodzącą nas tutaj wartość
 d_0 można obliczyć, znając stężenie ośrodka dyspersyjnego przy-
najmniej w dwu mieszaninach, oraz stopień ich rozcieńczenia i war-
tości liczbowe przestrzeni rozpuszczającej w 1 cm³ mieszanin ($d_1 \dots$
 d_x). Zależność tych ostatnich wartości od wielkości przestrzeni
rozpuszczającej w cytoplazmie (d_0) i od stopnia jej rozcieńczenia
($n_1 \dots n_x$) możemy wyrazić za pomocą równań:

$$d_1 = \frac{d_0 + n_1 - 1}{n_1} \quad (2)$$

$$d_x = \frac{d_0 + n_x - 1}{n_x} \quad (3)$$

Podstawiając znaczenia d_1 i d_x do odpowiedniej pary iloczynów w szeregu równań (1), rozwiązujemy je w stosunku do d_0 .

W przypadku, jeżeli wykonanie pomiaru u_0 nie przedstawia specjalnych trudności, wtedy objętość ośrodka dyspersyjnego w 1 cm³ cytoplazmy (d_0) obliczamy ze wzoru

$$d_0 = \frac{(n_1 - 1) u_1}{u_0 - u_1}, \quad (4)$$

w którym u_0 i u_1 oznaczają stężenie ciał w ośrodku dyspersyjnym cytoplazmy i w jakimkolwiek bądź jej rozcieńczeniu, zaś n_1 — stopień tego rozcieńczenia.

W większości jednak doświadczeń, z powodu trudności nastreżających się przy sączeniu, mierzono stężenie ośrodka dyspersyjnego tylko w mieszaninach (u_1 , u_x); w tym przypadku, wychodząc z równania

$$u_1 d_1 n_1 = u_x d_x n_x$$

otrzymujemy wzór

$$d_0 = \frac{(n_x - 1) u_x - (n_1 - 1) u_1}{u_1 - u_x}, \quad (5)$$

przeważnie stosowany w pracy niniejszej. Ze wzoru tego możemy obliczyć objętość ośrodka dyspersyjnego w 1 cm³ cytoplazmy, jeżeli wiadoma jest zawartość ciała badanego w ultraprzesączach z dwu mieszanin (u_1 , u_x) oraz stopień rozcieńczenia tych ostatnich (n_1 , n_x).

Jak wynika z powyższych rozważań, wzory (4) i (5) mogą być stosowane jedynie wtedy, jeżeli równania (1), (2) i (3) są słuszne, t. j. jeżeli ilość bezwzględna ciał, rozpuszczonych w ośrodku dyspersyjnym cytoplazmy, i objętość fazy rozdrobnionej nie zmieniają się pod wpływem rozcieńczania. Tymczasem nie jest zgóry wyłączone, że zmiana własności ośrodka

dyspersyjnego, wywołana wprowadzeniem cieczy rozcieńczającej, nie powoduje zmiany zarówno objętości fazy rozdrobnionej, jak i jej własności adsorbcyjnych. Jest rzeczą jasną, że zmiany te mogą zależeć zarówno od własności cieczy rozcieńczającej, jak i własności ciał, których stężenie mierzymy.

Co się tyczy wody destylowanej, jako cieczy rozcieńczającej, to, jak przekonaliśmy nas o tem specjalnie w tym celu przeprowadzone doświadczenia, może być ona stosowana jedynie w tych razach, jeżeli jaja nie zawierają większych ilości białek, wytrącających się po dodaniu wody. Należy tutaj zaliczyć jaja ryb spodoustych (*Scyllium*, *Torpedo*), głowonogów (*Sepia*, *Loligo*) i jeżowców (*Arbacia*, *Paracentrotus*), których ooplazma, po znacznem nawet rozcieńczeniu, nie wykazuje widocznych śladów koagulacji.

W doświadczeniach mieliśmy jednak przeważnie do czynienia z materiałem, zawierającym znaczne ilości białek, bardzo wrażliwych na skład chemiczny ośrodka dyspersyjnego i na stężenie w nim soli (*Salmo*, *Gallus*). W celu uniknięcia zmian, zachodzących wskutek wytrącania się globulin, stosowaliśmy w tych razach roztwory soli obojętnych.

Szereg prób, przeprowadzonych w tym kierunku, wykazał, że najlepiej odpowiadają celowi izosmotyczne z ooplazmą roztwory soli litowych, w pierwszym zaś rzędzie — siarczan i azotan litu. Używając roztworów tych soli, jako płynów rozcieńczających, i oznaczając w przesączach chlor, który okazał się jednym z najmniej zmiennych składników ośrodka dyspersyjnego, możemy z dużym stopniem dokładności ustalić wielkość przestrzeni rozpuszczającej ooplazmy.

Tak np. w jednym z doświadczeń, szczegółowo omawianych poniżej (tab. III), użyto, jako materiału wyjściowego, żółtka jaja kurzego (obj. właściwa = 0.9), rozcieńczając go 0.7% roztworem Li_2SO_4 . Z pięciu mieszanin żółtka o różnem stopniu rozcieńczenia (od $n = 2.08$ do $n = 10.4$) sporządzono takąż ilość ultrapresączów, w których oznaczono stężenie chloru miareczkową metodą Whitehorna ('21). Z analiz chloru (tab. I) wynika, że stężenie tego anjonu w przesączach zmniejsza się w stopniu większym, niż należałoby się tego spodziewać ze stopnia rozcieńczenia ooplazmy.

Różnica ta daje możność, jak już wiemy, obliczenia objętości ośrodka dyspersyjnego cytoplazmy: znajdując jej wartość ze wzoru

(5), otrzymujemy (tabl. I, kolumna ostatnia) liczby, które nie ujawniają wyraźnej zależności od n , t. j. od stopnia rozcieńczenia, i które są — z wyjątkiem ostatniej — dosyć z sobą zgodne. Z tabeli tej wynika, że średnia wielkość przestrzeni rozpuszczającej w 1 cm³ żółtka jaja kurzego wynosi w danym przypadku zaledwie 0·549 cm³, czyli prawie 45% objętości ooplazmy wypełniają substancje koloidalne oraz zawiesiny grubo-ziarniste o charakterze deutoplazmatycznym.

T a b e l a I.

Pomiary przestrzeni rozpuszczającej w żółtku jaj *Gallus domesticus* L. Objętość właściwa żółtka = 0·9.

Détermination du volume du liquide intermicéllaire dans le jaune d'oeuf de *Gallus domesticus* L. Volume spécifique du jaune d'oeuf = 0·9.

№ mieszaniny № du mélange	O b j ę t o ś ć V o l u m e			Stopień roz- cieńczenia żółtka <i>Degré de di- lution du jaune d'oeuf</i> $n = \frac{v}{p}$	Stężenie chloru w 1 cm ³ ultra- przeszaczu <i>Concentra- tion du chlo- re dans 1 cm³ de l'ultrafil- trat</i> u	Obliczona objętość przestrzeni rozpusz- czającej w 1 cm ³ żółtka <i>Volume calculé du liqui- de intermicéllaire dans 1 cm³ du jaune d'oeuf</i> $d_0 =$ $(n \cdot x - 1) u_x - (n - 1) u_1$ $u_1 - u_x$ cm ³
	żółtka <i>du jaune d'oeuf</i>	0·7% roz- tworu Li ₂ SO ₄ <i>de la solu- tion 0·7% de Li₂SO₄</i>	mieszaniny po rozcień- czeniu <i>du liquide après la dilution</i>			
	p cm ³	$v \cdot p$ cm ³	v cm ³			
1	4·8	5·2	10	2·08	1·080	—
2	4·8	15·2	20	4·17	0·472	0·541
3	4·8	25·2	30	6·25	0·306	0·569
4	4·8	35·2	40	8·33	0·222	0·537
5	4·8	45·2	50	10·4	0·195	(0·754)
						0·549

Doświadczenie to, jedno z wielu w tym kierunku przeprowadzonych, dowodzi, że rozcieńczenie ooplazmy wodnym roztworem soli obojętnej (siarczanu litu) nie spowoduje zmian ani w objętości fazy rozdrobnionej, ani w rozmieszczeniu chloru; w przeciwnym bowiem razie obliczone wartości d_0 zmieniałyby się wraz i z ilością wprowadzonego roztworu. Zmiany te występują dopiero w większych rozcieńczeniach ooplazmy, lub też — przy użyciu słabszych wzgl. mocniejszych roztworów soli litowych.

Dalsze próby wykazały ponadto, że poszczególne jony wspomnianych soli litu (Li⁺, SO₄²⁻, NO₃⁻) nie są pod tym względem specyficzne i nie wywierają widocznego wpływu na obliczoną wielkość przestrzeni rozpuszczającej. Dowodzą tego doświadczenia, w których do rozcieńczenia używano jednakowo

stężonych roztworów różnych soli obojętnych. W jednym z takich doświadczeń, przeprowadzonych na dojrzałych jajach pstrąga (*Salmo fontinalis*, tab. V), ooplazmę, uwolnioną z błon jajowych, czterokrotnie rozcieńczono 0·7% roztworami Li_2SO_4 , $LiNO_3$ i $NaNO_3$; analizy ultraprzesączów wykazały prawie jednakowe stężenia chloru, które odpowiednio wynosiły 0·619, 0·608 i 0·619 mg w 1 cm³ cieczy.

W przypadkach, w których do rozcieńczania można było użyć wody destylowanej, objętość przestrzeni rozpuszczającej obliczano z pomiarów obniżenia punktu zamarzania ooplazmy i szeregu jej rozcieńczeń. Wyniki jednej takiej serii pomiarów, wykonanych na jajach *Torpedo ocellata*, przytaczamy w tabeli II.

T a b e l a II.

Pomiary przestrzeni rozpuszczającej w żółtku jaj *Torpedo ocellata* Raf. Objętość właściwa żółtka = 0·897.

Détermination du volume du liquide intermicéllaire dans le jaune d'oeuf de *Torpedo ocellata* Raf.
Volume spécifique du jaune d'oeuf = 0·898.

№ mieszaniny № du mélange	O b j ę t o ś ć V o l u m e		Stopień rozcieńczenia żółtka	Obniżenie punktu zamar- zania mieszanin	Obliczona objętość przestrzeni rozpu- szczającej w 1 cm ³ żółtka
	żółtka	dodanej wody destylowanej	Degré de dilu- tion du jaune d'oeuf	Abaissement du point de congé- lation des mé- langes	Volume calculé du liquide intermicéll- aire dans 1 cm ³ du jaune d'oeuf
	du jaune d'oeuf	de l'eau distillée additionnée	$n = \frac{v}{p}$	u	$d_3 = \frac{(n_1 - 1) u_1}{u_0 - u_1}$
	p cm ³	v-p cm ³		C°	cm ³
1	8 00	0	1·00	2·204 ⁰	—
2	8·23	4·58	1·56	0·987 ⁰	0·453
3	8 22	9·16	2·11	0·657 ⁰	0 471
4	7 92	13·24	2·67	0·473 ⁰	0·456
5	7 90	22·02	3·79	0·346 ⁰	0·519
6	5 97	33·25	6·57	0·185 ⁰	0·510

Podobnie jak w doświadczeniach poprzednio omawianych, w których stężenie wolnego ośrodka dyspersyjnego mierzono zawartością chloru, również i tutaj notujemy niewspółmierne z rozcieńczeniem żółtka zmniejszanie się Δ , świadczące o dużej zawartości substancyj koloidalnych. W samej rzeczy, obliczona według wzoru (4) objętość ośrodka dyspersyjnego wynosi średnio zaledwie 0·482 cm³ w 1 cm³ żółtka, wahając się w poszczególnych obliczeniach w granicach od 0·453 do 0·519 cm³. Znaczn-

niejsze odchylenia występują dopiero w większych rozcieńczeniach (począwszy od 3-krotnych), w których zaczyna zapewne uwidaczniać się wpływ dysocjacji elektrolitów, zawartych w ooplazmie.

4. Rozmieszczenie elektrolitów w cytoplazmie.

Jak wynika z prac Ausbergera (25) i innych autorów, przestrzeń rozpuszczająca posiada znaczenie zasadnicze w analizie rozmieszczenia ciał w roztworach niejednorodnych. Pomiarzy tej przestrzeni dają bowiem możliwość ustalenia wartości liczbowej podziału tych ciał pomiędzy dwie fazy, jeżeli znane są ich stężenia w mieszaninie i ultraprzesączu.

Jeżeli za wskaźnik rozmieszczenia ciała badanego (związku chemicznego, pierwiastka) w układzie, przyjmujemy stosunek między ilością tego ciała, znajdującą się w ośrodku dyspersyjnym, t. j. w stanie właściwego roztworu (ud), a całkowitą jego ilością w mieszaninie, to stosunek ten możemy wyrazić równaniem

$$\delta = \frac{ud}{c}, \quad (6)$$

w którym c przedstawia średnie stężenie ciała badanego w pełnej mieszaninie (w mg na 1 cm^3), u — stężenie jego w wolnym ośrodku dyspersyjnym, t. j. w ultraprzesączu (również w mg na 1 cm^3 cieczy), d — wielkość przestrzeni rozpuszczającej (w cm^3) w 1 cm^3 mieszaniny, zaś δ będziemy nazywali ilorazem rozmieszczenia.

Równanie (6) w zupełności charakteryzuje rozmieszczenie ciała badanego w danej mieszaninie, ponieważ pozwala wyznaczyć zarówno podział jego pomiędzy ośrodkiem dyspersyjnym [ud/c] a fazę rozdrobnioną [$(c - ud)/c$], jak i właściwe stężenie tego ciała w obu fazach mieszaniny [odpowiednio — $c\delta/d$ i $c(1 - \delta)/(1 - d)$].

Jak łatwo zrozumieć, zakres zastosowania wzoru (6) ogranicza się w naszych doświadczeniach tylko do ooplazmy rozcieńczonej, łatwo dającej się sączyć. Okoliczność ta wysunęła potrzebę wyjaśnienia kwestji wpływu rozcieńczenia na rozmieszczenie elektrolitów w cytoplazmie. Stwierdzone bowiem w rozdziale poprzednim zachowanie się chloru, którego ilość bezwzględna w ośrodku dyspersyjnym nie ulega wskutek rozcieńczenia zmianie, nie wyklucza zgóry możliwości przemieszczeń innych jonów, które mogą przechodzić zarówno z wiązania ko-

loidального do ośrodka dyspersyjnego, jak i — w kierunku odwrotnym. W rezultacie tych zmian—stosunek, w jakim poszczególne jony występują w ośrodku dyspersyjnym cytoplazmy, może przy jej rozcieńczaniu ulec znacznym przesunięciom.

W poszukiwaniach, podanych w rozdziale niniejszym, wyszliśmy, jak już wspomniano, z założenia, że badanie kierunku i wielkości tych zmian da możliwość poznania składu mineralnego obu faz cytoplazmy. Dlatego postawiliśmy sobie jako najbliższe zadanie ustalenie zależności liczbowej między stopniem rozcieńczenia cytoplazmy (n) a znalezionej dla poszczególnych jonów wartością ilorazu δ .

Doświadczenia odnośnie przeprowadzono na jajach szeregu gatunków zwierzęcych, główne jednak wyniki, omawiane poniżej, dotyczą tylko trzech gatunków: *Gallus domesticus* (tab. III i IV) *Salmo fontinalis* (tab. V) i *Labrax lupus* (p. odnośnik na str. 20). W doświadczeniach tych badaliśmy zachowanie się sześciu składników mineralnych cytoplazmy, a mianowicie: potasu, sodu, wapnia, magnezu, fosforu i chloru, stosując podane powyżej metody mikroanalizy.

Doświadczenia prowadzono w ten sposób, że przedewszystkiem przygotowywano z ooplazmy szereg mieszanin o różnym stopniu rozcieńczenia, dodając do niej, podobnie jak w pomiarach przestrzeni rozpuszczającej, roztworów następujących trzech soli obojętnych: Li_2SO_4 (dośw. XII, tab. III i dośw. XIV, tab. V), $LiNO_3$ (dośw. XIII, tab. IV i dośw. XIV, tab. V) i $NaNO_3$ (dośw. XIV, tab. V). Następnie—z mieszaniny najmniej (zwykle dwukrotnie) rozcieńczonej odmierzano dwie próbki, z których jedna była przeznaczona do oznaczenia chloru całkowitego, drugą zaś spopieliano (w celu oznaczenia reszty składników mineralnych) na drodze mokrej w obecności stężonego HNO_3 . Wyniki tych analiz służyły do wyznaczenia średnich stężeń składników w mieszaninie badanej (c_1) i w mieszaninach bardziej rozcieńczonych ($c_2, c_3 \dots c_x$)¹⁾. Natychmiast po wzięciu próbek, przystępowano do sporządzenia odpowiedniej liczby i ilości ultraprzesączów, w których oznaczano zawartość tych samych co w popiele składników. W ten sposób otrzymywano wartości stężeń ($u_1, u_2 \dots u_x$) tych składników w wolnym ośrodku dyspersyjnym dla szeregu mieszanin o wzrastającym stopniu rozcieńczenia. Wreszcie z analiz chloru w przesączach obliczano

¹⁾ W tablicach te ostatnio wymienione wartości znajdują się w nawiasach.

według równania (5) objętość przestrzeni rozpuszczającej w cytoplazmie (d_0), względnie w szeregu badanych mieszanin ($d_1, d_2 \dots d_x$)¹⁾.

Wyniki trzech doświadczeń tego typu, zostały zestawione w tabelach III-ciej, IV-tej i V-ej w ten sposób, że kolumny

T a b e l a III.

Wpływ rozcieńczenia na rozmieszczenie elektrolitów w żółtku jaj *Gallus domesticus* L. Doświadczenie XII. Ciecz rozcieńczająca — 0,7% Li_2SO_4 . Objętość właściwa cytoplazmy = 0,9. Znaczenie symbolów: p — objętość cytoplazmy (cm^3); v — objętość cytoplazmy rozcieńczonej (cm^3); n — stopień rozcieńczenia cytoplazmy; d — objętość przestrzeni rozpuszczającej w 1 cm^3 mieszaniny (cm^3); c — średnie stężenie składników analizowanych w mieszaninach ($mg/l\ cm^3$); u — stężenie ich w ultrafiltratach ($mg/l\ cm^3$); $\delta = ud/c$ — iloraz rozmieszczenia.

№ mieszaniny № du mélange		1	2	3	4	5
p		61·8	4·8	4·8	4·8	4·8
v		128·8	20·0	30·0	40·0	50·0
$n = \frac{v}{p}$		2·08	4·17	6·25	8·33	10·41
$d = 1 - \frac{1 - d_0}{n}$		0·783	0·892	0·928	0·946	0·957
K	c	1·080	(0·540)	(0·360)	(0·270)	(0·216)
	u	0·869	0·356	0·235	0·180	0·134
	δ	0·629	0·588	0·606	0·631	0·593
Na	c	0·120	—	—	—	—
	u	0·146	—	—	—	—
	δ	0·953	—	—	—	—
Ca	c	0·645	(0·322)	(0·215)	(0·161)	(0·129)
	u	0·144	0·088	0·088	0·069	0·068
	δ	0·174	0·244	0·379	0·405	0·504
Mg	c	0·102	(0·051)	(0·034)	(0·025)	—
	u	0·070	0·028	0·026	0·019	—
	δ	0·537	0·493	0·709	0·719	—
P	c	2·058	(1·029)	(0·686)	—	(0·413)
	u	0·079	0·044	0·032	—	0·017
	δ	0·030	0·038	0·013	—	0·039
Cl	c	—	—	—	—	—
	u	1·080	0·472	0·306	0·222	—
	δ	—	—	—	—	—

Influence de la dilution sur la répartition des électrolytes dans le jaune d'oeuf de *Gallus domesticus* L. Expérience № XII. Liquide diluant — 0,7% Li_2SO_4 . Volume spécifique = 0,9. Symboles: p — volume du cytoplasme (cm^3); v — volume du cytoplasme dilué (cm^3); n — degré de dilution du cytoplasme; d — volume du liquide intermicellaire dans 1 cm^3 de mélange (cm^3); c — concentration moyenne des composés analysés dans les mélanges ($mgr./l\ cm^3$); u — leur concentration dans les ultrafiltrats ($mgr./l\ cm^3$); $\delta = ud/c$ — quotient de la répartition.

1) Z równania

$$d = 1 - \frac{1 - d_0}{n},$$

w którym d oznacza objętość przestrzeni rozpuszczającej w 1 cm^3 , zaś n — stopień rozcieńczenia danej mieszaniny (por. równ. 2 i 3).

panionowe zawierają wyniki, dotyczące oddzielnych mieszanin. W kolumnach tych znajdują się przede wszystkim rezultaty pomiarów objętości ooplazmy (p), którą wzięto do rozcieńczenia, oraz jej objętości po dodaniu cieczy rozcieńczającej (v); następnie — obliczony stopień rozcieńczenia mieszaniny (n) i objętość przestrzeni rozpuszczającej (d); wreszcie — w szeregach dolnych odnośnych kolumn — zestawiono dla każdego z sześciu składników analizowanych wyniki oznaczeń ich stężenia w mieszaninie (c) i w przesączu (u), oraz podano obliczone według wzoru (6) wartości ilorazu δ .

Porównywując wartości tego ilorazu w szeregach poziomych naszych tabel, możemy w ogólnym wyniku poszukiwań stwierdzić, że rozcieńczenie nie pozostaje bez wpływu na skład chemiczny obu faz. Istotnie, doświadczenia nasze dowodzą ponad wszelką wątpliwość, że rozcieńczanie ośrodka dyspersyjnego pociąga za sobą przesunięcie w rozmieszczeniu niektórych elektrolitów, wyrażające się bądź w zmniejszaniu się, bądź też w powiększaniu się ilorazu δ .

Do pierwszej kategorii składników należy zaliczyć jedynie potas, który w ooplazmie rozcieńczonej ujawnia w pewnych razach (tab. III i IV, odnoszące się do żółtka kurzego) nieznaczną lecz wyraźną tendencję do wiązania się z koloidami. Wszystkie natomiast inne katjony przechodzą pod wpływem rozcieńczenia ooplazmy z wiązania koloidalnego do fazy wodnej, przyczem wpływ rozcieńczenia na poszczególne jony nie jest jednakowy.

Widzimy prócz tego, że p o t a s w r a z z c h l o r e m (którego analizy w przesączach służyły do obliczania przestrzeni rozpuszczającej) należą do rzędu składników, ujawniających najmniejsze pod tym względem zmiany. Wynika to zgodnie ze wszystkich trzech doświadczeń, w których wartości δ dla potasu zmieniają się w granicach 0·629—0·593 (tab. III), 0·710—0·674 (tab. IV) i 0·896 — 0·911 (tab. V). Liczby te prócz tego dowodzą, że przeważną część potasu znajduje się w ooplazmie tych zwierząt w stanie wolnym, nie związanym w fazę koloidalną.

Inaczej natomiast zachowują się inne dwa katjony, t. j. wapń i magnez, oraz fosfor. Różnią się one od potasu (i ewentualnie — od sodu) nie tylko co do stopnia wiązania się z fazą rozdrobnioną,

z którą tworzą połączenia koloidalne w znacznie większej ilości, ale również co do kierunku i wielkości zmian ilorazu δ , zachodzących pod wpływem rozcieńczania.

Tabela IV.

Wpływ rozcieńczenia na rozmieszczenie elektrolitów w żółtku jaj *Gallus domesticus* L. Doświadczenie XIII. Ciecz rozcieńczająca—0,7% LiNO_3 . Objętość właściwa cytoplazmy=0,9. Znaczenie symbolów jak w tab. III.

Influence de la dilution sur la répartition des électrolytes dans le jaune d'oeuf de Gallus domesticus L. Expérience № XIII. Liquide diluant -- 0,7% LiNO_3 . Volume spécifique du cytoplasme = 0,9. Symboles comme dans le tableau III.

№ mieszaniny № du mélange		1	2	3	4
<i>p</i>		5	5	5	5
<i>v</i>		10	20	30	50
$n = \frac{v}{p}$		2	4	6	10
$d = l - \frac{l - d_0}{n}$		0,645	0,822	0,882	0,929
<i>K</i>	<i>c</i>	0,790	(0,395)	(0,263)	—
	<i>u</i>	0,870	0,327	0,201	—
	δ	0,710	0,680	0,674	—
<i>Na</i>	<i>c</i>	0,100	—	—	—
	<i>u</i>	0,146	—	—	—
	δ	0,942	—	—	—
<i>Ca</i>	<i>c</i>	0,861	(0,430)	(0,287)	(0,172)
	<i>u</i>	0,152	0,088	0,061	0,048
	δ	0,114	0,168	0,187	0,259
<i>Mg</i>	<i>c</i>	0,108	(0,054)	(0,036)	—
	<i>u</i>	0,058	0,029	0,023	—
	δ	0,346	0,442	0,563	—
<i>P</i>	<i>c</i>	1,885	(0,942)	(0,628)	(0,377)
	<i>u</i>	0,078	0,034	0,023	0,013
	δ	0,027	0,030	0,032	0,032
<i>Cl</i>	<i>c</i>	1,422	(0,711)	(0,477)	(0,284)
	<i>u</i>	1,225	0,493	0,296	0,165
	δ	0,556	0,570	0,543	0,539

Istotnie, w miarę dodawania płynu rozcieńczającego coraz to większe ilości katjonów dwuwartościowych i fosforu przechodzą z fazy rozdrobnionej do ośrodka dyspersyjnego, przyczem stopień dysocjacji połączeń koloidalnych wapnia i magnezu w rozcieńczeniach większych jest bardzo znaczny. Duży przyrost tych metali w ośrodku dyspersyjnym mogliśmy stwierdzić we wszystkich doświadczeniach, również i w tych, które były przeprowadzone na ooplazmie innych zwierząt. Z odnośnych tabel pracy

panionowe zawierają wyniki, dotyczące oddzielnych mieszanin. W kolumnach tych znajdują się przede wszystkim rezultaty pomiarów objętości ooplazmy (p), którą wzięto do rozcieńczenia, oraz jej objętości po dodaniu cieczy rozcieńczającej (v); następnie — obliczony stopień rozcieńczenia mieszaniny (n) i objętość przestrzeni rozpuszczającej (d); wreszcie — w szeregach dolnych odnośnych kolumn — zestawiono dla każdego z sześciu składników analizowanych wyniki oznaczeń ich stężenia w mieszaninie (c) i w przesączu (u), oraz podano obliczone według wzoru (6) wartości ilorazu δ .

Porównyując wartości tego ilorazu w szeregach poziomych naszych tabel, możemy w ogólnym wyniku poszukiwać stwierdzić, że rozcieńczenie nie pozostaje bez wpływu na skład chemiczny obu faz. Istotnie, doświadczenia nasze dowodzą ponad wszelką wątpliwość, że rozcieńczanie ośrodka dyspersyjnego pociąga za sobą przesunięcie w rozmieszczeniu niektórych elektrolitów, wyrażające się bądź w zmniejszaniu się, bądź też w powiększaniu się ilorazu δ .

Do pierwszej kategorii składników należy zaliczyć jedynie potas, który w ooplazmie rozcieńczonej ujawnia w pewnych razach (tab. III i IV, odnoszące się do żółtka kurzego) nieznaczną lecz wyraźną tendencję do wiązania się z koloidami. Wszystkie natomiast inne katjony przechodzą pod wpływem rozcieńczenia ooplazmy z wiązania koloidalnego do fazy wodnej, przyczem wpływ rozcieńczenia na poszczególne jony nie jest jednakowy.

Widzimy prócz tego, że potas wraz z chlorem (którego analizy w przesączach służyły do obliczania przestrzeni rozpuszczającej) należą do rzędu składników, ujawniających najmniejsze pod tym względem zmiany. Wynika to zgodnie ze wszystkich trzech doświadczeń, w których wartości δ dla potasu zmieniają się w granicach 0·629—0·593 (tab. III), 0·710—0·674 (tab. IV) i 0·896 — 0·911 (tab. V). Liczby te prócz tego dowodzą, że przeważna część potasu znajduje się w ooplazmie tych zwierząt w stanie wolnym, nie związanym w fazę koloidalną.

Inaczej natomiast zachowują się inne dwa katjony, t. j. wapń i magnez, oraz fosfor. Różnią się one od potasu (i ewentualnie — od sodu) nie tylko co do stopnia wiązania się z fazą rozdrobnioną,

z którą tworzą połączenia koloidalne w znacznie większej ilości, ale również co do kierunku i wielkości zmian ilorazu δ , zachodzących pod wpływem rozcieńczania.

Tabela IV.

Wpływ rozcieńczenia na rozmieszczenie elektrolitów w żółtku jaj *Gallus domesticus* L. Doświadczenie XIII. Ciecz rozcieńczająca—0,7% LiNO_3 . Objętość właściwa cytoplazmy=0,9. Znaczenie symbolów jak w tab. III.

Influence de la dilution sur la répartition des électrolytes dans le jaune d'oeuf de Gallus domesticus L. Expérience № XIII. Liquide diluant — 0,7% LiNO_3 . Volume spécifique du cytoplasme = 0,9. Symboles comme dans le tableau III.

№ mieszanki № du mélange		1	2	3	4
<i>p</i>		5	5	5	5
<i>v</i>		10	20	30	50
$n = \frac{v}{p}$		2	4	6	10
$d = 1 - \frac{l - d_0}{n}$		0,645	0,822	0,882	0,929
<i>K</i>	<i>c</i>	0,790	(0,395)	(0,263)	—
	<i>u</i>	0,870	0,327	0,201	—
	δ	0,710	0,680	0,674	—
<i>Na</i>	<i>c</i>	0,100	—	—	—
	<i>u</i>	0,146	—	—	—
	δ	0,942	—	—	—
<i>Ca</i>	<i>c</i>	0,861	(0,430)	(0,287)	(0,172)
	<i>u</i>	0,152	0,088	0,061	0,048
	δ	0,114	0,168	0,187	0,259
<i>Mg</i>	<i>c</i>	0,108	(0,054)	(0,036)	—
	<i>u</i>	0,058	0,029	0,023	—
	δ	0,346	0,442	0,563	—
<i>P</i>	<i>c</i>	1,885	(0,942)	(0,628)	(0,377)
	<i>u</i>	0,078	0,034	0,023	0,013
	δ	0,027	0,030	0,032	0,032
<i>Cl</i>	<i>c</i>	1,422	(0,711)	(0,477)	(0,284)
	<i>u</i>	1,225	0,493	0,296	0,165
	δ	0,556	0,570	0,543	0,539

Istotnie, w miarę dodawania płynu rozcieńczającego coraz to większe ilości katjonów dwuwartościowych i fosforu przechodzą z fazy rozdrobnionej do ośrodka dyspersyjnego, przyczem stopień dysocjacji połączeń koloidalnych wapnia i magnezu w rozcieńczeniach większych jest bardzo znaczny. Duży przyrost tych metali w ośrodku dyspersyjnym mogliśmy stwierdzić we wszystkich doświadczeniach, również i w tych, które były przeprowadzone na ooplazmie innych zwierząt. Z odnośnych tabel pracy

niniejszej widzimy, że w granicach rozcieńczenia od $n = 2$ do $n = 8$ stosunek wapnia wolnego do wapnia całkowitego wzrasta; δ obliczona z analiz żółtka kurzego zwiększa się z 0.174 do 0.405 (tab. III), t. j. 2.3 razy, i z 0.114 do 0.223 (tab. IV, ostatnia wartość — interpolowana), czyli 1.9 razy; w jajach

Tabela V.

Wpływ rozcieńczenia roztworami Li_2SO_4 , $LiNO_3$ i $NaNO_3$ na rozmieszczenie elektrolitów w cytoplazmie jaj *Salmo fontinalis* L. Doświadczenie XIV. Objętość właściwa cytoplazmy = 0.921. Znaczenie symbolów, jak w tab. III.

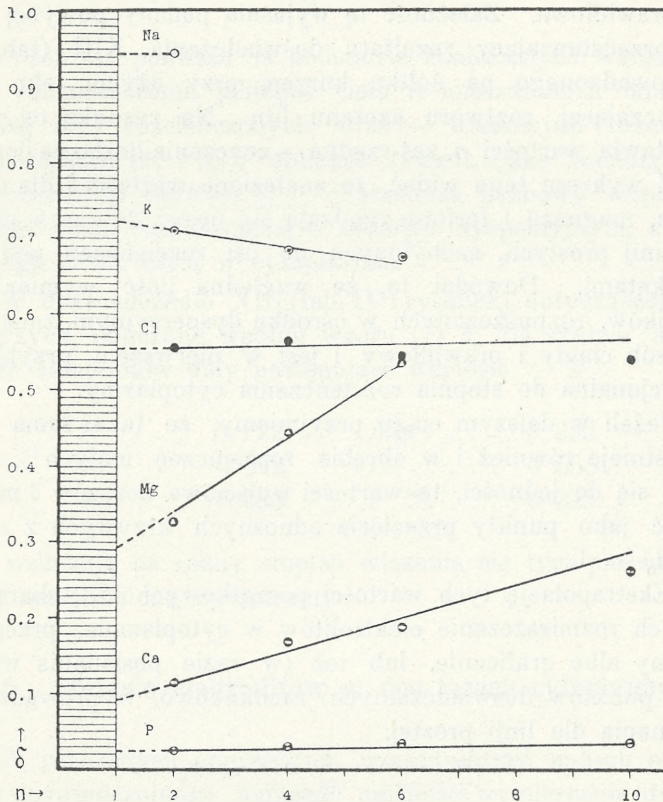
*Influence de la dilution avec les solutions de Li_2SO_4 , $LiNO_3$ et $NaNO_3$ sur la répartition des électrolytes dans le jaune d'oeuf de *Salmo fontinalis* L. Expérience № XIII. Volume spécifique du cytoplasme = 0.921. Symboles comme dans le tableau III.*

№ mieszaniny № du mélange		1	2	3	4	5
Roztwór rozcieńczający Solution diluante (0.7%)		$LiNO_3$	Li_2SO_4	$LiNO_3$	$NaNO_3$	$LiNO_3$
$n = \frac{v}{p}$		2	4	4	4	8
$d = 1 - \frac{1-d_0}{n}$		0.896	(0.948)	0.948	(0.948)	0.974
K	c	1.424	(0.712)	(0.712)	(0.712)	(0.356)
	u	1.436	0.692	0.686	0.680	0.333
	δ	0.896	0.921	0.913	0.905	0.911
Na	c	0.345	—	—	—	—
	u	0.196	—	—	—	—
	δ	0.509	—	—	—	—
Ca	c	0.275	(0.137)	(0.137)	(0.137)	(0.068)
	u	0.095	0.070	0.055	0.053	0.036
	δ	0.309	0.484	0.381	0.367	0.515
Mg	c	0.390	(0.195)	—	(0.195)	(0.097)
	u	0.142	0.089	—	0.079	0.042
	δ	0.326	0.433	—	0.384	0.422
P	c	1.674	(0.837)	(0.837)	(0.837)	(0.418)
	u	0.194	0.111	0.098	0.107	0.052
	δ	0.104	0.125	0.111	0.121	0.121
Cl	c	1.136	(0.568)	(0.568)	(0.568)	(0.284)
	u	1.290	0.619	0.608	0.619	0.298
	δ	1.02	1.03	1.01	1.03	1.02

prastrą wartość ta zmienia się od 0.309 do 0.515 (tab. V), t. z. wzrasta 1.7 razy. W podobny sposób zachowuje się również magnez, którego δ w tych samych rozcieńczeniach zwiększa się odpowiednio 1.3, 1.9 i 1.3 razy. Dla fosforu odnośne liczby wynoszą 1.4, 1.2 i 1.2.

Co do wpływu poszczególnych soli, znajdujących się w cieczach rozcieńczających, na stopień rozszczepiania połączeń koi-

dalnych obu metali ziem alkalicznych, to należy stwierdzić, że najsilniej działa w tym kierunku siarczan litu. Wpływ ten szczególnie wybitnie zaznacza się na wapniu, jak to wynika z po-



Wykres, przedstawiający zależność między stopniem rozcieńczenia (n) żółtka jaj *Gallus domesticus* L. a iloczynem rozmieszczenia δ sodu, potasu, wapnia, magnezu, fosforu, i chloru w mieszaninach. Według danych doświadczenia XIII.

Diagramme représentant le rapport entre le degré de dilution (n) du jaune d'oeuf de *Gallus domesticus* (l'expérience XIII) et le quotient de répartition (δ) du sodium, potassium, calcium, magnesium, phosphore et chlore dans les mélanges de l'ooplasmé.

równania doświadczeń XII i XIII, przeprowadzonych na żółtku kurczem: w pierwszym był użyty do rozcieńczenia roztwór Li_2SO_4 , w drugim zaś — roztwór $LiNO_3$. Natomiast, jak to widać w doświadczeniach nad pstrągiem (tab. V), w działaniu $LiNO_3$ i $NaNO_3$ nie zdołaliśmy wykryć żadnej wyraźniejszej różnicy.

Dalsza analiza wyników, mająca na celu wyświetlenie zależności omawianych zmian od ilości wprowadzonych do cytoplazmy roztworów, wykazuje, że między stopniem rozcieńczania (n) a wartością ilorazu rozmieszczania (δ) zachodzi naogół zależność prawidłowa. Zależność tę wyjaśnia podany powyżej rysunek, przedstawiający rezultaty doświadczenia XIII (tab. IV), przeprowadzonego na żółtku kurczem przy użyciu, jako cieczy rozcieńczającej, roztworu azotanu litu. Na rysunku oś odcięta przedstawia wartości n , zaś rzędna — znaczenia liczbowe ilorazu δ .

Z wykresu tego widać, że znalezione wartości δ dla potasu, wapnia, magnezu i fosforu zgadzają się dosyć dobrze z przebiegiem linii prostych, nachylonych do osi rozcieńczeń pod pewnymi kątami. Dowodzi to, że względna ilość wymienionych składników, rozpuszczonych w ośrodku dyspersyjnym, zmienia się w sposób ciągły i prawidłowy i jest w pierwszym przybliżeniu proporcjonalna do stopnia rozcieńczenia cytoplazmy.

Jeżeli w dalszym ciągu przyjmiemy, że taka sama zależność istnieje również i w obrębie rozcieńczeń małych¹⁾, zbliżających się do jedności, to wartości wyjściowe ilorazów δ możemy uważać jako punkty przecięcia odnośnych krzywych z rzędną, przy $n_0 = 1$.

Ekstrapolację tych wartości początkowych (δ_0), charakteryzujących rozmieszczenie elektrolitów w cytoplazmie, przeprowadziliśmy albo graficznie, lub też (w razie posiadania większej liczby punktów doświadczalnych) rachunkowo, wyprowadzając δ_0 z równania dla linii prostej:

$$\frac{n_1 - 1}{\delta_1 - \delta_0} = \frac{n_x - n_1}{\delta_x - \delta_1}$$

¹⁾ W jednym tylko przypadku mieliśmy możność sporządzenia ultraprzesączów z nierozcieńczonej miazgi jaj. Doświadczenie to zostało przeprowadzone na znajdujących się w początkowych stadjach brózdowania jajach morskiej ryby kostnoszkieletowej — *Labrax lupus* Cuv. Przytoczone wartości δ dla wapnia i magnezu w ooplazmie ($n_0 = 1$) i w mieszaninie podwójnie rozcieńczonej ooplazmy ($n_1 = 2$):

	$n_0 = 1$	$n_1 = 2$
	δ_0	δ_1
Ca	0.169	0.216
Mg	0.380	0.422

dowodzą, że i w obrębie małych rozcieńczeń ooplazmy występuje ten sam charakter zmian w rozmieszczeniu elektrolitów.

skąd, przekształcając odpowiednio to równanie, otrzymujemy

$$\delta_0 = \frac{(n_x - 1) \delta_1 - (n_1 - 1) \delta_x}{n_x - n_1} \quad (7)$$

Wzór ten pozwala na podstawie znalezionych wartości ilorazów rozmieszczenia jakiegoś ciała w mieszaninach mniej (δ_1) i więcej (δ_x) rozcieńczonych, oraz — wiadomych rozcieńczeń tych mieszanin (n_1 i n_x), obliczyć (ewent. jako średnią z szeregu mieszanin) wartości δ_0 , t. j. stosunek liczbowy między ilością tego ciała, rozpuszczoną w ośrodku dyspersyjnym, a całkowitą jego zawartością w cytoplazmie.

W doświadczeniu XIII (tab. IV i rysunek), dotyczącem żółtka jaj kurzych, obliczone według wzoru (7) δ_0 dla sześciu analizowanych składników dały następujące wartości

<i>K</i>	0.722	<i>Mg</i>	0.295
<i>Na</i>	0.942	<i>Cl</i>	0.555
<i>Ca</i>	0.093	<i>P</i>	0.025

które wskazują na różny stopień wiązania się tych pierwiastków z fazą rozdrobnioną cytoplazmy.

5. Stężenie elektrolitów w obu fazach cytoplazmy.

W rozdziałach poprzednich uzasadniliśmy sposób postępowania doświadczalnego, dającego możliwość wymierzenia dwu ważnych wielkości, charakteryzujących stan rozmieszczenia elektrolitów w cytoplazmie, a mianowicie: objętości przestrzeni rozpuszczającej (d_0) i wartości ilorazu rozmieszczenia (δ_0). Znajomość tych dwu parametrów pozwala obliczyć stężenie ciał badanych w obu fazach, jeżeli ponadto jest wiadome średnie stężenie tych ciał w cytoplazmie, ustalone na podstawie analiz popiołu ($c_0 = c_x n_x$).

Wtedy — stężenie w fazie wodnej cytoplazmy (u_0) wyprowadzamy ze wzoru

$$u_0 = \frac{c_0 \delta_0}{d_0}, \quad (8)$$

zaś stężenie w fazie rozdrobnionej (k_0) możemy obliczyć z równania

$$k_0 = \frac{c_0 (1 - \delta_0)}{1 - d_0}, \quad (9)$$

wyrażając u_0 , k_0 i c_0 w miligramach w 1 cm³ fazy lub cieczy, oraz d_0 — w ułamkach centymetra sześciennego.

Tabela VI.

Stężenie elektrolitów w ośrodku dyspersyjnym żółtka jaj *Gallus domesticus* L. Znaczenie symbolów: c_0 — średnie stężenie składników w ooplazmie (mg/l cm³); δ_0 — iloraz ich rozmieszczenia; u_0 — stężenie w ośrodku dyspersyjnym ooplazmy (mgr/l cm³).

Concentration des électrolytes dans le liquide intermicellaire (u_0) du jaune d'oeuf de Gallus domesticus L. Symboles: c_0 — concentration moyenne des composés dans l'ooplasm (mgr/l cm³); δ_0 — quotient de la répartition des électrolytes dans l'ooplasm (mgr/l cm³).

<i>G a l l u s d o m e s t i c u s L.</i>						
№ doświadczenia	XII			XIII		
	0.549 cm ³			0.289 cm ³		
d_0	c_0	δ_0	u_0	c_0	δ_0	u_0
	mg		mg	mg		mg
<i>K</i>	2.246	0.637	2.606	1.580	0.722	3.947
<i>Na</i>	0.249	0.953	0.432	0.200	0.942	0.655
<i>Ca</i>	1.342	0.131	0.320	1.722	0.093	0.554
<i>Mg</i>	0.212	0.519	0.201	0.216	0.295	0.220
<i>Cl</i>	—	—	—	2.844	0.555	5.461
<i>P</i>	4.281	0.027	0.212	3.770	0.025	0.331

Stopień zgodności pomiarów u_0 , osiągnięty tą drogą, ilustruje tabela VI: zestawiono w niej wyniki dwu omawianych powyżej seryj (dośw. XII i XIII), przeprowadzonych w różnym czasie na żółtku jaja kurzego.

W tabeli tej zostały podane stężenia potasu, sodu, wapnia, magnezu, chloru i fosforu w ośrodku dyspersyjnym jaj (u_0), obliczone ze wzoru (8) na podstawie wartości d_0 , c_0 i δ_0 .

Oдноsne szeregi liczb dowodzą, że wyniki obu seryj różnią się jedynie pod względem ogólnego stężenia elektrolitów, które jest w ośrodku dyspersyjnym jaj z doświadczenia XIII o jakieś 50% większe: pozostaje to zapewne w związku z odpowiednio mniejszą wartością d_0 , wynoszącą w danym przypadku zaledwie 0.289 cm³. Natomiast, aczkolwiek analizy chemiczne wykazują w obu serjach bardzo znaczne różnice zarówno pod względem składu popiołu ooplazmy (c_0), jak i — stopnia łączenia się posz-

czególnych elektrolitów z fazą rozdrobnioną (σ_0), to jednak skład mineralny ośrodka dyspersyjnego w obu przypadkach jest bardzo do siebie zbliżony.

Wypływa to z dwu następujących szeregów liczb

	<i>K</i>	<i>Na</i>	<i>Ca</i>	<i>Mg</i>	<i>P</i>	<i>Cl</i>
XII	100	16	12	8	8	—
XIII	100	17	14	6	8	138

które wyrażają obliczone w stosunku do potasu ilości względne sześciu składników, rozpuszczonych w fazie wodnej żółtka kurzego.

Jak widzimy, zgodność tych liczb jest wystarczająca.

6. Streszczenie wyników.

Punktem wyjścia powyższych poszukiwań były trudności, jakie następują przy oddzielaniu ośrodka dyspersyjnego cytoplazmy od jej fazy rozdrobnionej. Znaczna zawartość substancji koloidalnych sprawia, że metoda sączenia przez błony ultrafiltracyjne nie zawsze prowadzi do celu: wyniki zadawające daje ona dopiero po rozcieńczeniu cytoplazmy wodnymi roztworami soli obojętnych. Również i metoda dializy kompensacyjnej prowadzi do rezultatów, słusznych tylko dla cytoplazmy rozcieńczonej.

Okoliczność ta, w związku z zamiarem wyświetlenia sprawy rozmieszczenia elektrolitów w cytoplazmie, spowodowała konieczność zbadania wpływu rozcieńczenia na stosunek elektrolitów do obu faz komórki. W poszukiwaniach tych kierowaliśmy się przypuszczeniem, że stwierdzenie zależności między rozcieńczeniem a stopniem adsorpcji elektrolitów przez fazę rozdrobnioną umożliwi ustalenie składu mineralnego fazy wodnej i rozdrobnionej w materiale wyjściowym, t. j. w cytoplazmie.

W tym celu przeprowadziliśmy szereg doświadczeń, w których oznaczaliśmy stężenie niektórych katjonów i anjonów (*K*, *Na*, *Ca*, *Mg*, *Cl*, *P*) w ultraprzesączach i w popiele mieszanin, sporządzonych przez rozcieńczanie ooplazmy kilku gatunków zwierząt izosmotycznymi roztworami soli obojętnych ($LiNO_3$, Li_2SO_4 , $NaNO_3$).

Już pierwsze próby wykazały, że chlor jest tym składnikiem ooplazmy, którego ilość względna w cieczy międzycząstko-

wej, obliczona w stosunku do całkowitej jego zawartości w mieszaninie, jest prawie niezależna od rozcieńczenia. Na tym fakcie oparliśmy wyliczanie objętości przestrzeni rozpuszczającej w cytoplazmie (równ. 5), wychodząc z założenia, że stężenie chloru w ultraprzesączkach jest odwrotnie proporcjonalne do objętości fazy wodnej mieszanin. Z tego samego założenia wyszliśmy w obliczeniach przestrzeni rozpuszczającej jaj *Torpedo*, opartych na pomiarach krjoskopowych (równ. 4).

W sposób podobny do chloru zachowują się jony potasu, którego stosunek do obu faz mieszanin zmienia się bardzo nieznacznie. Inaczej natomiast zachowują się katjony dwuwartościowe (wapń i magnez) i anjony fosforanów: tworząc z kolidami komórki połączenia mniej stałe i łatwo ulegające rozczepieniu, przechodzą one w znacznych ilościach z fazy rozdrobionej do ośrodka dyspersyjnego mieszanin. Bliższa analiza ilościowa tych zjawisk ujawniła zależność proporcjonalną między stopniem rozcieńczenia ooplazmy a zmianami w rozmieszczeniu ciał badanych: daje to możliwość znalezienia, drogą ekstrapolacji, wartości początkowych, charakterystycznych dla rozmieszczenia elektrolitów w cytoplazmie (równ. 7), oraz ustalenia stężeń, w jakich znajdują się one w fazie wodnej (równ. 8) i koloidalnej (równ. 9) komórki.

PIŚMIENNICTWO.

- Aron H. und R. Gralka. 1924. Die anorganische Bestandteile des Tierkörpers. Handbuch der Biochemie des Menschen und der Tiere. II Aufl. 1 (1).
- Ausberger A. 1925. Ultrafiltration und Kompensationsdialyse. Ein Beitrag zur Frage der Ionenbindung in Blutserum. Erg. d. Physiol. 24 (618).
- Bálint M. 1924. Jodometrische Mikrobestimmung des Natriums. Bioch Zeitschr. 150 (424).
- Białaszewicz K. 1926. O składzie mineralnym komórek jajowych (Sur la composition minérale des oeufs). Travaux de l'Institut Nencki. 3 (№ 52).

- Bell R. D. and E. A. Doisy. 1920. Rapid colorimetric methods for the determination of phosphorus in urine and blood. *Journ. biol. Chem.* **44** (55).
- Briggs A. P. 1922. A modification of the Bell-Doisy phosphate method. *Journ. biol. Chem.* **53** (13).
- Burian R. 1909. Über Ultrafiltration von Eiweissalz-Gemischen. *Arch. di Fisiol.* **7** (421).
- 1910. Function der Nierenglomeruli und Ultrafiltration. *Arch. f. ges. Physiol.* **136** (741).
- Collip J. B. 1920. Effect of dilution on the osmotic pressure and the electrical conductivity of whole blood, blood serum and corpuscles. *Journ. biol. Chem.* **42** (213).
- Ege R. 1920. Die Verteilung der Glucose zwischen Plasma und roten Blutkörperchen. *Bioch Zeitschr.* **111** (189).
- 1921. Wie ist die Verteilung der Glucose zwischen den vollen Blutkörperchen und der äusseren Flüssigkeit zu erklären? *Bioch. Zeitschr.* **114** (88).
- 1921. Untersuchungen über das Volumen der Blutkörperchen in gegenseitig osmotischen Lösungen. *Bioch Zeitschr.* **115** (109).
- 1921. Der osmotische Druck in Blutkörperchen und Plasma. *Bioch. Zeitschr.* **115** (175).
- Fahr G. 1908. Über den Natriumgehalt der Skelettmuskeln des Frosches. *Zeitschr. f. Biol.* **52** (72).
- Fredericq L. 1901. Sur la concentration moléculaire du sang et des tissus chez les animaux aquatiques. *Acad. Roy. de Belgique. Bull. de la Classe des Sc.* (428).
- 1902. Sur la concentration moléculaire des solutions d'albumine et des sels. *Acad. Roy. de Belgique. Bull. de la Classe des Sc.* (437).
- Fridericia L. S. 1920. Exchange of chloride ions and carbon dioxide between blood corpuscles and blood plasma. *Journ. biol. Chem.* **42** (245).
- Hamburger H. J. 1902. Osmotischer Druck und Jonenlehre. Bd. 1. Wiesbaden.
- Hecht G. 1923. Bestimmung des Organkalkes nach de Waard. *Bioch. Zeitschr.* **143** (342).
- Joffe J. and E. P. Poulton. 1920. The partition of CO_2 between plasma and corpuscles in oxygenated and reduced blood. *Journ. of Physiol.* **54** (129).
- Kramer B. and F. F. Tisdall. 1921 a. A simple method for the direct quantitative determination of sodium in small amounts of serum. *Journ. of biol. Chem.* **46** (467).
- 1921 b. A clinical method for the quantitative determination of potassium in small amounts of serum. *Journ. of biol. Chem.* **46** (339).

- Kramer B. and F. F. Tisdall. 1921 c. The direct quantitative determination of sodium, potassium, calcium and magnesium in small amounts of blood. *Journ. of biol. Chem.* **48** (223).
- 1921 d. A simple technique for the determination of calcium and magnesium in small amounts of serum. *Journ. of biol. Chem.* **47** (475).
- Lundsgård Ch. und. S. A. Holböll. 1926. Untersuchungen über die Verteilung einiger Nicht-Elektrolyte auf Blutkörperchen und Plasma des Menschenblutes. *Bioch. Zeitschr.* **173** (269).
- Polányi M. 1920. Studien über Leitfähigkeitserniedrigung und Adsorption durch lyophile Kolloide. *Bioch. Zeitschr.* **104** (237).
- Rona P. 1910. Über das Verhalten des Chlors im Serum. *Bioch. Zeitschr.* **29** (501).
- Rona P. und P. György. 1913. Über das Natrium — und Carbonation im Serum. Beitrag zur Frage des „nichtdiffusiblen Alkalis“ im Serum. *Bioch. Zeitschr.* **48** (278).
- Van Slyke D. D., A. B. Hastings, M. Heidelberger and J. Neill. 1922. Studies of gas and electrolyte equilibria in the blood. III. The alkali-binding values of oxyhaemoglobin and reduced haemoglobin. *Journ. of biol. Chem.* **54** (481).
- Van Slyke D. D., A. B. Hastings and J. Neill. 1922. IV. The effect of oxygenation and reduction on the bicarbonate content and buffer value of blood. *Journ. of biol. Chem.* **54** (507).
- Van Slyke D. D., H. Wu and F. C. Mc. Lean. 1923. V. Factors controlling the electrolyte and water distribution in the blood. *Journ. of biol. Chem.* **56** (765).
- Sörensen S. P. L. 1915—1917. Studies on proteins. *Compt. Rend. Labor. Carlsberg.* **12**.
- Tisdall F. F. and B. Kramer. 1921. Methods for the direct quantitative determination of sodium, potassium, calcium and magnesium in urine and stools. *Journ. of biol. Chem.* **48** (1).
- Urano F. 1908. Neue Versuche über die Salze des Muskels. *Zeitschr. f. Biol.* **50** (212).
- de Waard D. J. 1919. Eine Mikrobestimmung des Calciums in Blut, Serum und anderen organischen Substanzen. *Bioch. Zeitschr.* **97** (176).
- Warburg E. 1922. Theory of the Henderson-Hasselbalch-Equation. *Bioch. Journ.* **16** (153).
- Whitehorn J. C. 1921. A system of blood analysis. Supplement II. Simplified method for the determination of chlorides in blood plasma. *Journ. of biol. Chem.* **45** (449).
- Wladimiroff G. E. 1926. Beiträge zur Embryochemie und Embryophysiologie. I. Mitt. Einige physikalisch-chemische Veränderungen des Eiereiweisses der sich entwickelnder Hühnereier. *Bioch. Zeitschr.* **177** (280).
- Zsigmondy R. u. W. Bachmann. 1918. Über neue Filter. *Zeitschr. f. anorg. u. allg. Chem.* **103** (1).

