

[Zakład Fizjologii Instytutu im. Nenckiego T. N. W. i Stacja Morska na Helu].

M. Bogucki.

O regulowaniu składu mineralnego krwi u raka rzecznoego
(Astacus fluviatilis L.).

Sur la régulation de la composition minérale du sang chez l'écrevisse (Astacus fluviatilis L.).

Rękopis nadesłany w dniu 13.III.1933 r.

Le présent travail était entrepris afin de vérifier, si les Invertébrés possèdent la faculté de régler la composition minérale de leur hémolymphe. Comme l'objet de ces recherches on a choisi l'écrevisse, animal qui, d'après le travail de M-lle H e r r m a n n (31) supporte bien le milieu marin hypertonique.

On a constaté que la composition minérale du sérum de l'écrevisse diffère de celle de l'eau douce non seulement par la concentration supérieure des sels, mais aussi par les rapports quantitatifs des différents composés minéraux (tableau I).

L'hémolymphe des animaux transférés dans le milieu marin devient de plus en plus concentrée à mesure que la concentration du milieu augmente, et en conséquence le rapport entre la teneur en différents composés minéraux de l'hémolymphe et celle du milieu approche de l'unité.

On a constaté en outre que la quantité relative des différents composants minéraux de l'hémolymphe, correspondant à 100 gr. Cl, reste la même chez les animaux provenants d'eau douce que chez ceux qui séjournaient un temps prolongé (1 mois) dans l'eau de mer à 50%. Ce fait nous prouve que dans l'organisme de l'écrevisse se produit une régulation chimique permettant à l'animal de conserver invariables les rapports quantitatifs entre les composés minéraux de son hémolymphe malgré les variations considérables que subit à cet égard le milieu ambiant.

Les écrevisses mises dans le milieu hypertonique ne perdent pas de l'eau comme le prouve le poids constant de leur corps. Néanmoins dans l'intérieur de l'organisme de l'animal se produisent les déplacements de l'eau à la suite desquelles la quantité d'eau contenue dans les muscles diminue à mesure que la concentration du milieu devient plus grande (tableau V).

Z prac Duvala ('25), Schliepera ('29), Hermannówny ('31) i Boguckiego ('32) wynika, że zarówno słodkowodne bezkręgowce, jak i wiele morskich posiadają mniej lub więcej wyraźną zdolność regulowania ciśnienia osmotycznego krwi.

Analiza składników mineralnych krwi bezkręgowców wskazuje nadto, że stosunek wzajemny składników mineralnych we krwi jest inny, niż w otaczającym środowisku (Macallum '03, '10, Bethe i Berger '31, Białaszewicz '30, Bogucki '32). Fakt ten sam przez się nasuwa przypuszczenie, że bezkręgowce posiadają nie tylko zdolność regulowania ciśnienia osmotycznego cieczy ciała, lecz również posiadają mechanizm, pozwalający im utrzymać odmienny, niż w otoczeniu, stosunek ilościowy poszczególnych składników mineralnych krwi.

Zadaniem pracy niniejszej jest próba stwierdzenia słuszności powyższego przypuszczenia na drodze doświadczalnej.

Materiał i metody.

Przy wyborze obiektu do zamierzonych doświadczeń kierowałem się tem, by badany organizm posiadał dostatecznie szeroką skalę osmoregulacyjną, oraz aby był odporny na zmiany, zachodzące w składzie chemicznym środowiska. Warunkom tym, na podstawie badań Hermannówny ('31), odpowiadał w zupełności rak rzeczny (*Astacus fluviatilis* L.), którego też użyłem do niniejszych doświadczeń.

W toku swych doświadczeń stwierdziłem słuszność spostrzeżeń Hermannówny. Rak rzeczny, wbrew dotychczasowym poglądom, znosi dobrze nawet dość duże stężenie wody morskiej (66%). W wodzie morskiej rozcieńczonej do połowy rak rzeczny wytrzymuje do 3 miesięcy.

W doświadczeniach moich raki trzymane były w różnych stężeniach wody morskiej sztucznej, przygotowywanej według zmodyfikowanego przepisu Mc Clendona ('17). Na litr wody morskiej brałem: NaCl —

28.27 g, KCl — 0.763 g, CaCl₂ — 1.22 g, MgCl₂ — 5.105 g, MgSO₄ — 7.035, NaBr — 0.08 g, NaHCO₃ — 0.21 g.

W wybranych odstępach czasu brana była z raków krew i w niej oznaczano składniki mineralne. Analizy wykonywane były następującymi metodami: potas — metodą Kramera i Tisdalla ('21), sód — metodą Barrenschena i Messiner ('27), wapń — metodą de Waarda ('19), zmodyfikowaną przez Hechta ('23), magnez — metodą Kramera i Tisdalla ('21), skombinowaną z metodą Briggsa ('22), według wskazówek Białaszewicza ('26), chlor — metodą Whitehorna ('21).

Zaznaczyć należy, że w przeciwieństwie do raków, żyjących w wodzie słodkiej raki, pozostające czas jakiś w wodzie morskiej nawet o nieznanym stężeniu ($S = 70/_{00}$), posiadają krew niekrzepnącą. Krew przed użyciem jej do analiz była odbiałczana 10-procentowym kwasem trójchlo-rooctowym w stosunku 1:1.

Skład mineralny krwi raka z wody słodkiej.

Wobec wybitnej krzepliwości krwi raków, żyjących w warunkach normalnych, używana była do analizy składu mineralnego hemolimfy surowica, która oddziela się po kilku godzinach od skrzepu. Wyniki analiz przedstawione są w tabeli I, zawierającej jednocześnie analizę wody wodociągowej, w której trzymane były zwierzęta. Liczby dotyczące składu wody, podają, według nieogłoszonych danych S. K u c z k o w s k i e g o.

T a b e l a I.

Skład mineralny surowicy raka (*Astacus fluviatilis*) w mg/cm³.
Composition minérale du sérum de l'écrevisse provenant de l'eau douce en mgr/cm³.

	Cl	Ca	Mg	Na	K
surowica sérum	6.21	0.48	0.06	3.49	0.11
woda eau	0.017	0.059	0.006	0.015	0.003

Pomijając ilości absolutne poszczególnych składników, które w surowicy raka są wielokroć razy większe, niż w otaczającej wodzie, należy podkreślić odmienne ustosunkowanie się wzajemne analizowanych jonów w tych dwu cieczach. Jeśli przyjmiemy ilości chloru, znalezione w wodzie i surowicy za 100, to ilości względne metali jedno- i dwuwartościowych w porównywanych cieczach wyrażą się, jak następuje:

	Cl	Ca	Mg	Na	K
Surowica	100	7.73	0.97	56.19	1.77
Woda	100	335	34	84	16.6

Tak odmienne ustosunkowanie się tych samych składników mineralnych we krwi i wodzie wskazuje na daleko posuniętą niezależność składu krwi raka od otaczającego środowiska.

Część doświadczalna.

Celem zbadania zmian, jakim ulega skład mineralny krwi raka, przeniesionego do środowiska o wyższym stężeniu soli i innym, niż w wodzie słodkiej, ustosunkowaniu się składników mineralnych, używałem wody morskiej sztucznej, przygotowanej według uproszczonego przepisu *McClendon*a (17).

Raki przeniesione do wody morskiej nierozcieńczonej żyły krótko, bo kilka dni zaledwie, w stanie odrętwienia. W wodzie morskiej rozcieńczonej żyły znacznie dłużej: w 66 procentowej 1 miesiąc, w 50-procentowej do 3 miesięcy.

W tabeli II przedstawione są wyniki analiz krwi raków, trzymanyh po miesiącu w różnych stężeniach wody morskiej.

Tabela II.

Skład mineralny krwi raków, trzymanyh 31 dni w różnych stężeniach wody morskiej.
Composition minérale du sang des écrevisses séjournant 31 jours dans les différentes concentrations de l'eau de mer.

Rodzaj środowiska		Cl	Ca	Mg	Na	K
woda morska <i>aeu de mer</i> 66%	a) krew — <i>sang</i>	14.18	0.96	0.28	—	0.56
	b) środowisko — <i>milieu</i>	13.20	0.29	0.57	7.46	0.26
woda morska <i>eau de mer</i> 50%	a) krew — <i>sang</i>	11.10	0.50	0.12	5.91	0.25
	b) środowisko — <i>milieu</i>	10.00	0.22	0.43	5.68	0.20
woda morska <i>eau de mer</i> 20%	a) krew — <i>sang</i>	7.8	0.39	0.09	—	—
	b) środowisko — <i>milieu</i>	4.0	0.09	0.17	2.27	0.08
woda słodka <i>eau douce</i>	a) krew — <i>sang</i>	6.21	0.48	0.06	3.49	0.12
	b) środowisko — <i>milieu</i>	0.017	0.059	0.006	0.015	0.003

Z porównania liczb, zawartych w tabeli II, wynika, że w miarę zwiększania się stężenia poszczególnych jonów w środowisku

wzrasta również ich stężenie we krwi raka, ale znacznie słabiej, niż dzieje się to w środowisku. Krew raków z 50 procentowej wody morskiej zawiera około 2 razy więcej chloru, magnezu, sodu i potasu, niż krew raka z wody słodkiej, gdy w tem rozcieńczeniu wody morskiej stężenie chloru jest 588 razy, sodu — 378 razy, magnezu — 72 razy i potasu — 70 razy większe, niż w wodzie słodkiej.

Wynikiem tego nierównomiernego wzrostu stężeń elektrolitów we krwi i w środowisku jest to, że stężenia ich stopniowo wyrównywają się w miarę zwiększania się stężenia w środowisku. Tabela III przedstawia nam, w jakim kierunku zmienia się stosunek stężenia poszczególnych jonów we krwi do ich stężenia w środowisku w miarę, jak wzrasta stężenie tego ostatniego.

Tabela III.

Stosunek stężenia poszczególnych jonów krwi do ich stężenia w środowisku.
Rapport entre la concentration des ions du sang et celle du milieu.

	Woda słodka <i>eau douce</i>	Woda morska — <i>eau de mer</i>		
		20%	50%	66%
Cl	365	1.95	1.11	1.07
Ca	8	4.3	2.3	—
Mg	10	0.53	0.28	0.49
Na	233	—	1.04	—
K	37	—	1.25	2.15

Liczby tej tabeli wskazują, że stosunek stężenia poszczególnych jonów we krwi i w środowisku maleje w miarę, jak stężenie środowiska zwiększa się, zbliżając się do jedności. Fakt ten znajduje swój wyraz w pomiarach krioskopowych *Herrmann ó w n y* ('31), która stwierdziła, że krew raka przeniesionego do środowiska morskiego odpowiedniej koncentracji staje się izotoniczna z tem środowiskiem. Z pośród zbadanych jonów jeden magnez zachowuje się inaczej, niż inne jony krwi. Gdy u raka z wody słodkiej stężenie magnezu we krwi jest 10-ciokrotnie większe, niż w środowisku, to w krwi raka, przeniesionego do środowiska morskiego, stosunek Mg krwi/Mg wody staje się mniejszy od jedności, podobnie, jak u organizmów morskich.

Na podstawie danych tabeli II dokonano obliczenia względnego stężenia badanych jonów krwi, przyjmując stężenie chloru za 100. Wyniki tego obliczenia w odniesieniu do krwi raka z wody słodkiej i z 50-cioprocentowej wody morskiej przedstawione są w tabeli IV.

Tabela IV.

Ilości poszczególnych składników krwi raka, przypadające na 100 g chloru w g.
Quantité des différents composants minéraux du sang de l'écrevisse correspondant à 100 gr. Cl en gr.

	Rak z wody słodkiej <i>Animal provenant de l'eau douce</i>	Rak z 50% wody morskiej <i>Animal provenant de l'eau de mer à 50%</i>
Cl	100	100
Ca	7.7	4.5
Mg	1.0	1.0
Na	56.2	53.2
K	2.0	2.2

Jak z tych liczb wynika, na 100 g chloru we krwi raka przypadają jednakowe ilości metali jedno- i dwuzasadowych niezależnie od tego, czy zwierzę żyło w wodzie słodkiej, czy w rozcieńczonej do połowy wodzie morskiej. Ta stałość ustosunkowania się wzajemnego jonów we krwi raków, pochodzących z dwu porównywanych środowisk, jest tem więcej uderzająca, że środowiska te różnią się nie tylko ogólnym stężeniem soli, ale jednocześnie odmiennym ustosunkowaniem elementów składowych. Gdy bowiem w wodzie słodkiej na 100 g chloru przypada: 335 g Ca, 34 g Mg, 84 g Na i 17 g K, to w wodzie morskiej stu gramom Cl odpowiada: 2.2 g Ca, 4.3 g Mg, 56.6 g Na i 2.0 g K.

Przytoczone powyżej fakty przemawiają za tem, że organizm raka posiada nie tylko zdolność regulowania ogólnej koncentracji soli w hemolimfie, ale jednocześnie posiada zdolność regulowania jej składu mineralnego, dzięki czemu skład ten jest w pewnych granicach niezależny od zmian zachodzących w otoczeniu.

Nie jest możliwym dzisiaj sprecyzować, jakie procesy wchodzi w grę, których wynikiem jest stwierdzone tu zjawisko che-

moregulacji. Przyjmując, że powierzchnie chłonne organizmu raka są nieprzepuszczalne dla rozpuszczonych w wodzie elektrolitów, możnaby zjawisko chemoregulacji objaśnić utratą wody przez organizm pod wpływem hipertoniczności środowiska. Tłumaczenie takie zgadzałyby się zarówno z faktem wzrastania ciśnienia osmotycznego krwi raka pod wpływem stężenia soli w środowisku, jak i z faktem zachowania się niezmiennego ustosunkowania się elektrolitów krwi pomimo przeniesienia zwierzęcia do zmienionego pod względem chemicznym środowiska. Takiemu tłumaczeniu omawianego zjawiska sprzeciwiają się jednak spostrzeżenia Hermanna ówny, które miałem sposobność potwierdzić w ciągu niniejszych badań. Okazuje się mianowicie, że raki przeniesione do hipertonicznego środowiska, jakim jest 50-cioprocentowa woda morska, nie tracą na wadze, jakby to powinno dziać się, gdyby stężenie krwi odbywało się wyłącznie na zasadzie osmozy. Należy przypuścić, że zjawisko chemoregulacji jest znacznie więcej złożone. Jeżeli wyłączymy ze swych rozważań nieprzepuszczalność powierzchni ciała dla elektrolitów, to utrzymanie niezmiennego stosunku wzajemnego poszczególnych jonów we krwi pomimo zachodzących różnic w składzie środowiska może być skutkiem następujących przyczyn: 1) niejednakowej przepuszczalności powierzchni chłonnych organizmu dla różnych składników, rozpuszczonych w wodzie, 2) czynności wydalniczej gruczołów czułkowych, 3) absorpcji pewnych składników krwi przez tkanki organizmu.

Który z tych czynników odgrywa większą, który zaś mniejszą rolę w procesie regulacji chemicznej krwi raka, czy na proces ten nie wpływają inne, nieuwzględnione tutaj czynniki — oto pytanie, na które dzisiaj nie mamy jeszcze odpowiedzi.

Przyczynkiem, rzucającym pewne światło na zmiany, zachodzące w organizmie raka, przeniesionego z wody słodkiej do wody morskiej, są spostrzeżenia, dotyczące uwodnienia tkanki mięsnej w różnych stężeniach wody morskiej. Tabela V zawiera dane co do procentowej zawartości wody w mięśniach odwłoku raków, trzymanyh w różnych środowiskach.

Jak widzimy, w miarę wzrastania stężenia środowiska i krwi ilość wody w tkance mięsnej maleje. Wskazuje to, że w organizmie raka, przeniesionego do wody morskiej, aczkolwiek ogólna ilość wody pozostaje bez zmiany, jak na to wskazuje brak ubytku na

Tabela V.

Zawartość wody w mięśniach raka w ‰ wagi mokrej.
Quantité d'eau dans les muscles de l'écrevisse en ‰ du poids humide.

Środowisko <i>Millieu</i>		% wody
Woda słodka <i>Eau douce</i>		84
Woda morską <i>Eau de mer</i>	20%	83.6
	50%	79.3
	66%	76.2
	100%	74.5

wadze, dokonywają się wyraźne przesunięcia wody, zmieniające pierwotny stan uwodnienia poszczególnych tkanek.

Streszczenie wyników.

1°. Wykonano analizę składników mineralnych surowicy raka (*Astacus fluviatilis* L.).

2°. Stężenie elektrolitów w hemolimfie raka, przeniesionego do wody morskiej, wzrasta w miarę zwiększania się stężenia wody morskiej.

3°. O ile stężenie wody morskiej nie przekracza pewnych granic (50%), to stosunek wzajemny stężenia elektrolitów we krwi raka nie ulega zmianie pod wpływem zmienionego środowiska. Fakt ten świadczy o zdolności organizmu raka do regulowania składu chemicznego krwi.

4°. Pomimo że rak, przeniesiony do środowiska hipertonicznego nie traci wody, zachowując ciężar ciała niezmienny, to ilości wody w jego mięśniach maleją w miarę zwiększania się stężenia środowiska.

Piśmiennictwo.

Barrenschen H. K. und L. Messiner. 1927. Eine kolorimetrische Mikrobestimmung des Natriums. *Bioch. Zeitschr.* 189 (308).
 Bethe A. und Berger E. 1931. Variationen im Mineralbestand verschiedener Blutarten. *Pflüg. Archiv.* 227 (574).
 Białaszewicz K. 1926.

O składzie mineralnym komórek jajowych. Prace Instyt. im. Nenckiego 3. Białaszewicz K. 1930. Badania nad zjawiskami regulowania składu mineralnego cieczy ciała. I. Doświadczenia nad krabem Maja squinado. Acta Biol. Exper. 5 (57). Bogucki M. 1931. O regulowaniu ciśnienia osmotycznego hemolimfy równonogów morskich (*Mesidotea entomon* L.). Acta Biol. Exper. 7 (61). Briggs A. P. 1922. A modification of the Bell-Doisy phosphate method. Jour. of Biol. Chem. 53 (13). Duval M. 1925. Recherches physico-chimiques et physiologiques sur le milieu intérieur des animaux aquatiques. Ann. de l'Inst. Océanogr. Nouvelle série 3 (233). Hecht G. 1923. Bestimmung des Organkalkes nach de Waard. Bioch. Zeitschr. 143 (342). Herrmann F. 1931. Ueber den Wasserhaushalt des Flusskrebses. Zeitschr. f. vergl. Physiol. 14 (479). Kramer B. and F. F. Tisdall. 1921. A clinical method for the quantitative determination of potassium in small amounts of serum, Jour. of Biol. Chem. 46 (339). Kramer B. and F. F. Tisdall. 1921. A simple technique for the determination of calcium and magnesium in small amounts of serum. Jour. of Biol. Chem. 47 (475). Macallum A. B. 1903. On the inorganic composition of the Medusae, *Aurelia flavidula* and *Cyanea arctica*. Journ. of Physiol. 29 (223). Macallum A. B. 1910. The inorganic composition of the blood in Vertebrates and Invertebrates, and its origin. Proc. Roy. Soc. B. 82 (602). Macallum A. B. 1926. The paleochemistry of the body fluids and tissues. Physiol. Reviews 6 (312). Mc. Clendon J., F. C. C. Gault and S. Mulholland. 1917. The hydrogen-ion concentration, CO₂ tension and CO₂ content of sea-water. Papers from Depart. Marine Biology of H. Carnegie Istitute 9 (23). Schlieper C. 1929. Ueber Einwirkung niederer Salzkonzentrationen auf marine Organismen. Zeitschr. f. vergl. Physiol. 9 (478). Whitehorn J. C. A system of blood analysis. Simplified method for the determination of chlorides in blood plasma. Jour. of Biol. Chem. 45 (449).
