

P. 1528

ROCZNIK LXIII.

1938

ZESZYT IV.

KOSMOS

Seria B.

PRZEGLĄD ZAGADNIEŃ NAUKOWYCH

POD REDAKCJĄ

D. SZYMKIEWICZA



WE LWOWIE

NAKŁADEM POLSKIEGO TOWARZYSTWA PRZYRODNIKÓW
IM. KOPERNIKA Z ZASIŁKIEM MINISTERSTWA W. R. i O. P.
i FUNDUSZU KULTURY NARODOWEJ

PIERWSZA ZWIĄZKOWA DRUKARNIA WE LWOWIE, ULICA LINDEGO L. 4.

1938



rcin.org.pl

TREŚĆ

	Str.
1. Tadeusz Matuszewski. — O pleomorfizmie we współczesnej bakteriologii	351
2. Tadeusz Garlej. — Nowsze badania in vitro nad jajami ssaków	373



Adres redakcji: Lwów, ul. Nabelaka 22.

KOSMOS

CZASOPISMO POLSKIEGO TOWARZYSTWA PRZYRODNIKÓW IM. KOPERNIKA

Seria B.

PRZEGLĄD ZAGADNIENŃ NAUKOWYCH POD REDAKCJĄ D. SZYMKIEWICZA

ROCZNIK LXIII.

ROK 1938

ZESZYT IV.

TADEUSZ MATUSZEWSKI

O pleomorfizmie we współczesnej bakteriologii.

Wielki systematyk XVIII wieku — Linneusz — objął świat drobnoustrojów charakterystyczną nazwą systematyczną „Chaos”. Miał nawet wątpliwości, czy zgodne byłoby z prawem Bożym zagłębianie się w tę dziedzinę zjawisk, skoro Bóg sam zechciał stworzyć organizmy uchylające się od naszej bezpośredniej obserwacji. W nazwie tej odzwierciedla się stan ówczesnej wiedzy o świecie mikroskopowym. Istnienie tego świata było już wówczas niezaprzeczalne. Obserwacje Kirchera i Leeuwenhoek'a (XVII wiek) znajdowały potwierdzenia coraz liczniejsze i zapoczątkowany był wyraźnie pierwszy okres nauki mikrobiologii, który do czasów Pasteura (druga połowa XIX wieku) nazwać możemy morfologicznym. Teorie samoródtwa, znaczenie drobnoustrojów w ogólnej gospodarce przyrody, ich biochemizm, istota fermentacji i chorób zakaźnych — zagadnienia te dojrzały dopiero. W przedpasteurowskim okresie głównym przyrządem badań mikrobiologa był doskonalący się ciągle mikroskop, przedmiotem — środowiska, w których drobnoustroje spotykano, celem — opis ich wyglądu, podobieństw i różnic.

Teorie pleomorfizmu czyli wielopostaciowości drobnoustrojów były wówczas często wysuwane i wynikały przede wszystkim z braków metodyki badań. Środowiska naturalne bytowania drobnoustrojów opanowane są najczęściej przez liczne gatunki występujące obok siebie. Zmiany warunków hodowli selekcyjonować mogą liczniej jeden lub drugi, zmienność kształtu

tęgo samego gatunku w różnych warunkach nasuwać znów może przypuszczenia o przechodzeniu jednej formy w drugą. Trudności wyjąłowania środowisk, łatwość zakażenia hodowli z otoczenia wiodły w gąszcz tego „chaosu“ i pleomorfizm najprościej tłumaczył fakty, które w następstwie traktować zaczęto, jako zjawiska symbiozy i metabiozy, zakażeń kontaktowych, zmienności morfologicznej określonych gatunków w zmiennych warunkach hodowli itp. Pleomorfizm owych czasów nosił cechy, które nazwalibyśmy obecnie „defetystycznymi“. Był niepłodny. Skoro zakładano, iż świat ten nie jest zamknięty w jakichś dających się uchwycić i rozróżnić formach czy gatunkach, skoro zaobserwowane formy są płynne, przejściowe, czasowe — trudno spodziewać się rezultatów ze zgłębiania tego świata. To też, zanim jeszcze zdobycze metodyczne Kocha pozwoliły swobodnie operować czystą kulturą, eliminować błędy wynikające z zanieczyszczeń szczepów — już teoria monomorfizmu odnosiła zwycięstwa. Za wyraziciela teorii monomorfizmu uznać należy Cohna, zwalczającego pleomorfistyczne teorie Nägeli'ego. Walka ta odbyła się już w drugiej połowie wieku XIX i oparta była na pokaźnym materiale obserwacyj. Zwycięstwo Cohna zbiegło się niemal z wyjaśnieniem znaczenia świata drobnoustrojów przez Pasteura i nie o wiele wyprzedziło zdobycze metodyczne Kocha. Cohn podjął trud zaprowadzenia ładu do „chaosu“ Linneuszowskiego i pozostawił pierwsze systematyczne ujęcie podziału bakteryj, którego idea, a mianowicie sprowadzenie wszystkich form do trzech zasadniczych: ziarniaka, pałeczki i skrętniaka przetrwało do dzisiaj.

Zwycięstwo monomorfizmu utrzymało się. Bakteriologia stała na stanowisku istnienia określonych gatunków w trzech powyższych zasadniczych kształtach. Gatunki nie przechodzą jeden w drugi, posiadają określoną postać, ulegającą wprawdzie wahaniom wywoływanych warunkami hodowli, lecz wahaniom w pewnych, dość wąskich granicach, przy czym powrót do warunków wyjściowych wywoływał wystąpienie bakteryj o kształtach i własnościach pierwotnych. Prace Hansena wprowadziły ład do pojęć o grzybkach drożdżowych, oddzielając je, w szeregu starannie opracowanych i zdefiniowanych gatunków, od grzybów wielokomórkowych, za których fazę rozwojową były wielokrotnie uważane.

W ostatnich jednak latach pojęcia pleomorficzne zaczynają ponownie zjawiać się w dziedzinie prac bakteriologicznych. Spotykamy obecnie w literaturze nie tylko opisy obserwacji tłumaczonych wielopostaciowością drobnoustrojów, nie same tylko studia czysto morfologiczne, lecz i próby wiązania tych obserwacji pewną wspólną nicią przewodnią, uporządkowania ich i wysunięcia często bardzo daleko idących wniosków. Badania te i obserwacje, a tym bardziej uogólnienia i syntezy, przyjmowane są jeszcze krytycznie przez wielu bakteriologów. Błędy i braki metodyki, mimo zdobyczy w tym zakresie, są jednak ciągle jeszcze nie wykluczone, tym nie mniej jednak zarówno ilość jak i jakość prac stojących na stanowisku wielopostaciowości drobnoustrojów w latach ostatnich wskazuje, iż walka monomorfizmu z pleomorfizmem wchodzi w nową i ostrą fazę.

Walka ta zresztą — jak twierdzi jeden z poważniejszych współczesnych bakteriologów, zwolennik pleomorfizmu, Löh n i s — nie ustała właściwie od początków istnienia bakteriologii. Löh n i s (14) zaznacza, iż mimo przyjęcia przez oficjalną naukę i podręcznikową literaturę zasad monomorfizmu, na odcinku lat 1838—1918 pojawiło się ok. 1000 prac, stwierdzających wyraźnie istnienie wielopostaciowości drobnoustrojów. Poziom tych prac jest oczywiście nierówny, jednak dla Löh n i s a niezależność ich wykonania, zbieżność ich wyników z obecnie zauważonymi faktami — sprawia, iż złożenie ich na karb błędów metodyki, zakażeń, zanieczyszczeń nie byłoby słuszne.

O ile z dostępnej mi literatury¹⁾ zorientować się mogę, pierwszeństwo w postawieniu tezy wielopostaciowości w nowoczesnej bakteriologii, tezy opartej na wieloletnich obserwacjach doprowadzających autora do stwierdzenia istnienia cykliczności rozwoju bakteryj, znacznie przekraczającej cykle poznane dotąd, przyznać należy Almquistowi (1). Prace jego dotyczące cykliczności rozwoju bakteryj chorobotwórczych zjawiają się w r. 1904 i trwają do r. 1925. W oddzielnej broszurze wydanej w tym roku zestawia swoje wyniki i rozpatruje je

¹⁾ Zaznaczam, że opieram się głównie na literaturze z zakresu mikrobiologii ogólnej i technicznej. Ciekawe omówienie prac pleomorficznych w literaturze z zakresu mikrobiologii lekarskiej znajdzie czytelnik w Pamiętniku V Zjazdu Mikr. i Epidemiol. Polskich, Medyc. Dośw. i Społ., r. 1933 t. XVII, z. 3/6.

syntetycznie. W r. 1914 i 1915 Löh nis wraz z współpracownikami ogłasza prace nad *Azotobacterem*, stwierdzające cykliczność jego rozwoju. W r. 1921 Löh nis ogłasza monografię literatury pleomorfistycznej, w r. 1922 podaje syntetyczne zestawienie i obronę faktów przemawiających za pleomorfizmem. W r. 1924 Enderlein (5) ogłasza pracę „O cykliczności rozwoju bakteryj“. W pracach, które w latach ostatnich regularnie zjawiają się w czasopismach naukowych, poszczególni autorowie powołują się stale na tych właśnie trzech badaczy: Almq uista, Löh nisa i Enderleina przy stosowaniu terminów, uogólnień i porównywaniu wyników obserwacji. Najczęściej uwzględniane są terminy i opisy zjawisk według schematu Löh nisa, zbliżonego w wielu punktach do schematu Almq uista.

Schemat Löh nisa w ogólnych zarysach przedstawia się następująco. Monomorfizm przyjęty przez oficjalną naukę był wynikiem obserwacji morfologicznych, wykonywanych nad bakteriami przez krótki okres czasu hodowli i w określonych środowiskach. Sprzeczności z teorią monomorfizmu tłumaczono zanieczyszczeniem preparatu, powstawaniem form powikłanych, zdegenerowanych itp. Jednak ustalony pogląd, że 1) bakterie występują w jednej z form zasadniczych stale i niezmiennie, 2) że zdolne są do rozmnażania się wyłącznie drogą podziału, 3) że zmiany postaci związane są tylko z wytwarzaniem przetrwalników lub z degeneracją komórek czyli wytwarzaniem form inwolucyjnych — obecnie utrzymać się nie da. Zmiany postaci bakteryj związane są z ich zdolnością do cyklicznego sposobu rozmnażania się. W szczególności Löh nis generalizuje następujące zjawiska.

Bakterie zdolne są wytwarzać organy reprodukcji w postaci gonidij. Gonidie, drobne twory różnych kształtów, wytwarzane są wewnątrz komórki i brane były często dotąd za substancje zapasowe. Mogą się rozmnażać samodzielnie lub wyrastać w formy wegetatywne. Pozostając w połączeniu z komórką macierzystą, zamknięte w niej lub położone nazewnątrz, wyrastać mogą w większe ciała, tzw. ciała regeneracyjne. Te, zanim utworzą komórkę wegetatywną, mogą także rozmnażać się samodzielnie jako formy ziarniaka. Löh nis stawia hipotezę, iż mikrokokki są ciałami regeneracyjnymi innych gatunków bakteryj form pałeczki. W drobnych komórkach

bakteryj gonidij jest 1—4, w większych więcej. Niektóre komórki wegetatywne rozrastają się silniej od innych, tworząc tzw. gonidiangium o licznych gonidiach. Te mogą wprost przechodzić w komórki wegetatywne i analogiczne są do form opisywanych jako arthrospory, ammy, sporangia. Gonidia z gonidiangiów uwalniane są przez rozpuszczanie błony lub jej rozdarcie, wreszcie przez pączkowanie. Tworzenie się gonidiangiów związane jest często ze zmianami postaci komórek, przybierających, obok innych, także kształty analogiczne do znanych w okresach przetrwalnikowania, jak buławy i wrzeciona. Jeśli gonidia pozostają w połączeniu z komórką macierzystą, mogą rozrastając się w ciała regeneracyjne, dawać charakterystyczne postaci rozgałęzione, nazywane dawniej formami inwolucyjnymi, bakteroidami, formami roboczymi. Gonidia mogą także dawać przetrwalniki, będące dla komórki macierzystej nie endo- lecz ekzosporami. Gonidia nieraz wykazują ruch właściwy, zaś występując czasem w postaciach bardzo drobnych, zdolne są przenikać przez filtry bakteryjne. Stadium to może ułatwiać bakteriom chorobotwórczym przenikanie do organizmu, gdzie przechodzą w komórki wegetatywne. Tworzące się u bakteryj komórki kuliste lub owalne mogą dawać mikrocyсты charakterystyczne tym, iż zdolne są produkować komórki wegetatywne drogą rozpadu.

Tak jak ciała regeneracyjne zaliczano dawniej do form inwolucyjnych bakteryj, tak samo drugie zasadnicze zjawisko związane z cyklicznością rozwoju bakteryj, czyli tworzenie symplazmy, nazywano autolizą, tworzeniem mas śluzowych, zanieczyszczeniem. Symplazma — zdaniem autora — jest bezpostaciową formą, jaką przybierać mogą bakterie drogą rozpuszczania błony komórek lub wylewania z nich treści protoplazmatycznej. Jeśli — co było obserwowane — plazma przybiera kształt kulisty, nazwać ją można makrocystą. Symplazma zawiera drobniotkie jednostki regeneracyjne, mogące albo wprost wyrastać w komórki wegetatywne lub też pośrednio poprzez utworzenie uprzednio różnie ukształtowanych ciał regeneracyjnych, dawniej uważanych za formy inwolucyjne, a które uważać należy słuszniej za formy ewolucyjne.

Obok tych zjawisk, ujmujących schemat cyklicznego rozwoju bakteryj, Löhnis stwierdza zjawisko koniunkcji

komórek czyli łączenia się ich ze sobą. Termin koniunkcji wprowadza Löhnis zamiast kopulacji, gdyż nie posiadamy danych o dwupłciowości bakteryj. Koniunkcje takie obserwować się dają u form dużych (*Azotobacter*, *Spirillum*) i u kultur młodych. Wyraża się ona w tworzeniu przez bakterie wyrostków łączących sąsiednie komórki.

W zakończeniu tego szkicu cyklicznego rozwoju bakteryj, Löhnis zaznacza, iż należy uważać za dowiedzione istnienie: symplazmy, gonidij, gonidiangiów, jednostek i ciał regeneracyjnych, mikrocyt, makrocyt i wreszcie koniunkcji. Schemat ten — według autora — znajduje pewne analogie ze schematami właściwymi dla innych grup świata mikroskopowego, jak grzybów, pierwotniaków i glonów.

Zjawiska dotyczące cyklicznego rozwoju bakteryj, opisane przez Almquist, są w wielu szczegółach zbieżne. Symplazma Löhnisa nosi u Almquista nazwę plazmodium, opisana jest zresztą podobnie. Gonidia nazywa Almquist konidiami, przy czym formy drobne konidij są u niego mikrokonidiami, probakteriami, antheroidami. Ciała regeneracyjne odpowiadają sporom antheroidalnym, gonidiangia i mikrocyty — sporangiom, oosporom. Według Almquista gonidia, wytwarzane przez jeden szczep bakterii, mogą być różne między sobą.

W schemacie Almquista odgrywa dużą rolę zjawisko odrębne od opisanych w schemacie Löhnisa, mianowicie zjawisko zwane przez autora „krzyżowaniem“ bakteryj. Polegało ono na tym, że dwa różne szczepy np. *Bact. typhi* i *Bact. dysenteriae* w stadium plazmodium zostały zmieszane i wspólnie hodowane, a następnie wyodrębniono szczepy różne od wyjściowych morfologicznie, a serologicznie reagujące jak oba wyjściowe. „Krzyżowanie“ z rezultatem pozytywnym dokonywał Almquist także z konidiami bakteryj.

Almquist nie stawia wyraźnie tezy pleomorfizmu w znaczeniu zdolności przekształcania się „gatunku“ w obecnym pojęciu w drugi, odrębny gatunek, co przypuszcza Löhnis, wyrażając pogląd, iż ziarniaki są fazą rozwoju bakteryj innych form, i co jak zobaczymy w późniejszych pracach wysuwane jest niejednokrotnie. Uważa jednak, iż dopiero zbadanie cykli rozwoju bakteryj pozwoli nam we właściwy sposób mówić o ich systematyce. Powstawanie „krzyżówek“ bakteryj nasuwa jednak

też wnioski pleomorfistyczne, gdyż w stadium plazmodium (= symplazma) bakterie według autora bytują właśnie w przyrodzie i mogą ulegać daleko idącym przekształceniom morfologicznym i fizjologicznym.

Almqvist zajmuje się przeważnie bakteriami chorobotwórczymi i z naciskiem wysuwa hipotezę saprofitycznego cyklu rozwoju pasorzytów, tłumaczącą wiele niewyjaśnionych dotąd zjawisk epidemicznych, jak osłabianie i nasilanie się wirulencji bakterij, rozpowszechnianie się zarazy, wtargnięcie jej do organizmu itp. Istotą metodyki otrzymania rozwoju cyklicznego bakterij jest u Almqvista prowadzenie czas dłuższy hodowli w ciepłotach 15—18° C na pożywkach wysuszonych.

Metodyka ta znalazła zastosowanie w pracach późniejszych, obok jednak metod krańcowo różnych, jak stosowanie — przeciwnie — ciepłot wysokich przez czas krótki. Szeroko także stosowane są metody poddawania bakterij działaniu trucizn, co stosował zresztą i Almqvist. Jeśli zestawić opisy metod, nasuwa się uogólnienie następujące: cykliczność rozwoju bakterij wywołać można przez różnego rodzaju oddalenie się od warunków optymalnych dla bakterij: czynniki mogą być różne, jak niska i wysoka ciepłota, wysuszenie pożywki, dłuższy czas hodowli, trucizny, wysoka koncentracja środowiska itp. W tych warunkach znane już zmiany morfologiczne, uogólniane jako formy powikłane, są właśnie wynikiem występowania u bakterij rozmnażania się odmiennego niż wegetatywne. Stąd też Enderlein (5) rozróżnia dwa cykle rozwoju bakterii: cykl rozmnażania wegetatywny (*Auxanogenie*) i postępowy, cykliczny (*Probaenogenie*). Pozostawiając omówienie teoretycznych uogólnień Enderleina na później, możemy obecnie na szeregu prac współczesnych zilustrować, w jaki sposób zwolennicy pleomorfizmu komentują zaobserwowane przez siebie zjawiska.

I tak w r. 1931 Cunningham (3) ogłosił obszerną pracę pt.: „Cykl rozwoju *Bac. saccharobutyricus* v. Klecki“, w której stwierdza na podstawie obserwacji 20 szczepów, iż zjawiskom ujętym w schemacie Löhniisa podlegają wszystkie te szczepy. Autor stwierdza powstawanie ekzospor, mikrocyst, gonidianiów, gonidij, ciał regeneracyjnych, symplazmy, koniunkcji. Stanowisko jego jest zdecydowane pleomorfistycznie. Z bakterij beztlenowych formy lasecznika wyodrębnia on cały szereg

szczepów o formie ziarniaka, utrzymuje je w czystych kulturach i identyfikuje z ziarniakami w gatunkach znanych już: *Micrococcus candidans*, *aurantiacus* i *roseus*. Otrzymuje też szereg szczepów pałeczek tlenowych i beztlenowych, częściowo identyfikujących się ze znanymi dotychczas, częściowo zidentyfikować się niedających. Zasadą metody była hodowla szczepów w ciepłocie pokojowej na agarze pochyłym oraz na szeregu pożywek specjalnych, jak bibuła, woda z solami wapnia, hodowla wspólna z drożdżami itp. Założenie więc Almquista i Löhnisa o zdolności przekształcania się bakterij form lasecznika w ziarniaki i o tym, iż ziarniaki poznane już są fazą rozwojową innych gatunków, według autora znajduje potwierdzenie doświadczalne.

Także w r. 1931 Hüttig (10) i Hausam (9) ogłaszają z tego zakresu prace wykonane w pracowni Instytutu mleczarskiego w Kilonii pod kierunkiem Henneberga. Praca Hüttiga posiada charakterystyczny tytuł: „*Streptococcus lactis* jedna z form *Bacterium herbicola*“. Jak wiadomo, *Streptococcus lactis* — bakterie właściwe dla mleka — powodują jego normalne zsiadanie się, zaś *Bacterium herbicola* jest bakterią równie regularnie stwierdzaną na powierzchni roślin. Punktem wyjścia przeprowadzonych badań jest zjawisko regularnego występowania paciorkowca mlecznego w mleku, mimo iż w otoczeniu tego mleka często nie udaje się go wykryć. Autor zakażał powietrzem okolic miasta wyjałowione mleko chude i zauważył, iż stale występowały w mleku *Bact. herbicola*, zaś w części próbek, po pewnym dopiero czasie, zjawiał się paciorkowiec drobny, niezdolny do kwaszenia innych cukrów poza gronowym, a więc niezdolny do ścinania mleka. Po dłuższym czasie hodowli forma ta, słabo kwasząca, nagle przechodziła w silnie kwaszącą, ścinającą mleko, jednocześnie zaś z jej wystąpieniem zmniejszała się ilość *Bact. herbicola*. Działając wyższymi (58° C) ciepłotami na szczepy *Streptococcus lactis*, po wysiewie kultur na płytki Petri, autor otrzymał ruchliwe pałeczki o wszystkich cechach *Bact. herbicola*. Ogrzewanie ponowne tych szczepów i dłuższa ich hodowla, połączona z częstym przeszczepianiem, dała powrót do formy paciorkowca. W wyniku bliższych obserwacji morfologicznych tego rodzaju hodowli, autor rozróżnia osiem form cyklu rozwoju *Bact. herbicola*, analogicznych z goni-

diami, gonidiangiami, ciałami regeneracyjnymi itp. Wyszedłszy z *Bact. herbicola*, autor w analogiczny sposób wyprowadził paciorkowca. Mamy więc przykład stanowiska zdecydowanie pleomorfistycznego, gdyż odrębne dotąd gatunki uważane są za fazy rozwoju tegoż szczepu. Jednocześnie metodyka odbiega od metod Almqvista, opartych na niskich ciepłotach w kierunku ciepłot wysokich. Tenże Hüttig (11), kombinując działanie wysokich ciepłot i amoniaku, otrzymał z bakteryj typu *Bacterium coli*, paciorkowca mlecznego, obserwując szereg form przejściowych.

Hausa m działał na szczepy *Bacterium coli* różnymi stężeniami soli kuchennej. W pewnych stężeniach, najjaskrawiej w obecności 7% *NaCl*, otrzymywał znaczną zmienność form, wśród których obserwował gonidia, gonidiangia itp. Ciekawa jest obserwacja powstawania ameboidalnej symplazmy, wykazującej pełzający ruch w badaniu mikroskopowym. Także Meyn (16), opisując cykl rozwoju *Bac. Chauvoei*, obserwował ruchliwą symplazmę, z której powstawały nowe komórki o postaci kulistej i kształcie pałeczki (ciała regeneracyjne), przy czym symplazma, w przeciwieństwie do laseczników wegetatywnych, zdolna była do życia w warunkach tlenowych. Autor za Löhniem uważa, iż nie da się utrzymać uogólnienie „*omnis cellula e cellula*“, dowodząc, że plazma sama w sobie jest nosicielką życia, nie zaś komórka uorganizowana. Analogię z tym widzi w plazmatycznym rozwoju glonów, gdzie dopiero jako zjawisko wtórne następuje podział na komórki wielojądrowe, które u wyższych organizmów stają się jednojądrowe.

David (4) operuje wibrionami gramoujemnymi, zbliżonymi do cholerycznych, lecz psychrofilnymi, wywołującymi choroby ryb. W 37°C dają one nitkowate i wzdęte „formy inwolucyjne“. Po powrocie do ciepłoty 16–18°C zjawiają się znowu wibriony gramoujemne. Jeżeli jednak dłużej hodować wibriony w 37°C, nieprawidłowości postaci zwiększają się i zaczynają się zjawiać formy gramodatnie. Z kulistych większych ciał wysypują się gramodatnie drobne kulki. Ciała kuliste gramodatnie tworzą się wyraźnie na brzegach nici gramoujemnych. Po dalszym szczepieniu w 37°C nici gramoujemne zanikają i powstają gramodatnie ziarniaki. W tym stadium powrót do ciepłoty 16–18°C daje jeszcze powrót do wibrionów, na któ-

rych koloniach, jako kolonie wtórne, powstają gramododatnie ziarniaki. Jeżeli szeregiem przeszczepień hodować formy gramododatnie w 37° C, wibriony zanikają zupełnie i otrzymujemy kulturę gramododatnich ziarniaków. Serologicznie ziarniaki i wibriony są zbliżone lecz nie identyczne. Powrót ziarniaków gramododatnich do wibrionów gramoujemnych otrzymać można przez hodowlę w roztworach soli. Po dłuższym i częstym przeszczepianiu na agar pochyły w 37° C, ziarniaki gramododatnie przechodzą początkowo w gramoujemne a następnie w gramoujemne wibriony, jednak różne w szczegółach niż wyjściowe. W mieszanej hodowli ziarniaków i wibrionów powstają odrębne formy ruchliwe. Autor dyskusję wyników prowadzi według schematu Löhnisa. Otrzymane formy ziarniaków są według niego ciałami regeneracyjnymi, powstałymi za pośrednictwem gonidij. Pośrednie formy o charakterze inwolucyjnych oraz otrzymane formy ziarniaków autor zamiast inwolucyjnych nazywa „formami bojowymi“. Fazą bojową bakteryj jest właśnie forma ziarniaka, powstająca w warunkach nie sprzyjających normalnemu rozwojowi wegetatywnemu. Gramododatność tych form autor tłumaczy gromadzeniem przez nie zapasowych substancyj odżywczych. Obserwowane przez siebie wysypywanie się form ziarniakowatych z dużych komórek (gonidiangium) przypomina bardzo zjawisko tzw. plazmoptozy, tj. wylewania się treści plazmatycznej na skutek zmian ciśnienia osmotycznego środowiska. Jednak w wypadkach opisanych przez autora zmiany ciśnień środowisk nie było. Gonidia zawarte wewnątrz tych większych komórek są według autora identyczne z tym, co nazywano ziarenkami chromatyny, wolutyny, tłuszczu. W badaniach tych ponownie odchylenie od warunków optymalnych wykonano w kierunku zastosowania ciepłot wysokich oraz działania soli kuchennej. Jako pojęcie nowe wprowadza autor pojęcie ziarniaka jako „formy bojowej“ ogółu bakteryj.

Zjawisku koniunkcji czyli łączenia się komórek poświęcone są badania Potthoffa (20) z r. 1922. Autor potwierdza obserwacje Förstera z r. 1892, dotyczące łączenia się komórek *Chromatium Okenni* za pomocą specjalnych wyrostków. Potwierdzenie to znajduje w obserwacjach własnych, wykonanych zresztą, jak zaznacza, przed zapoznaniem się z pracami För-

stera. Obserwacje dają rezultat pozytywny, jeśli wykonywać je wiosną lub jesienią. Autor szczegółowo opisuje stwierdzone przez siebie koniunkcje gatunku *Rhodospirillum photometricum*. Bakterie zapomocą „ruchu poszukującego“ zbliżają się do siebie i łączą specjalnymi wyrostkami zazwyczaj w jednym, rzadziej w dwu miejscach. Struktura tych wyrostków, sądząc z reakcji na barwiki, jest różna niż treści komórki. Podobne zjawiska autor stwierdza u *Spirillum volutans*. Autor uważa, iż jego obserwacje stwierdzają reakcje seksualne komórek bakteryj i wyraża pogląd, iż zjawisko to winno być właściwe dla ogółu bakteryj.

Zdecydowanym zwolennikiem pleomorfizmu jest von Niessen (17), który tłumaczy wielopostaciowością obserwowane przez siebie cykle rozwoju skrętniaków, sięgające od ziarniaków aż do form analogicznych z komórkami drożdży. Przytacza także szereg obserwacji innych badaczy przemawiających za pleomorfizmem, obserwacji rewelacyjnych, gdyż nasuwających hipotezę, iż rzęski bakteryj jednego gatunku mogą po usamodzielnieniu się tworzyć nowe formy (*Spirochaete pallida*, jako usamodzielniona rzęska innych bakteryj), lub iż grzybki drożdżowe na drodze rozwoju gonidialnego dają formy ziarniaka (cykl rozwoju gonokokków).

Od pojęć cykliczności rozwoju bakteryj, na których oparte są prace omówione dotąd, odróżniać trzeba wprowadzone przez niektórych autorów pojęcie zjawiska o charakterze mutacji czyli nagłej zmiany w wyglądzie lub uzdolnieniach biochemicznych. Almqvist stwierdza, że wywoływać można mutacje bakteryj, działając na nie ogrzewaniem lub truciznami. Zauważył wyłącznie tylko mutacje wsteczne, to znaczy trawienie przez drobno-ustroje pewnych uzdolnień, jak np. zdolności zarodnikowania u drożdży, przetrwalnikowania u bakteryj, wirulencji bakteryj chorobotwórczych. Mutacją także nazywa Gorini (7) obserwowane przez niego zjawisko dotyczące bakteryj fermentacji mlekowej. Szczepy, które obdarzone były jednocześnie zdolnością ścinania mleka drogą produkcji kwasu oraz rozpuszczania sernika enzymami peptonizującymi, w dłuższej hodowli, po częstym szczepieniu, dawały nagle szczepy peptonizujące mleko bez uprzedniego ścięcia. Zdarzały się także wypadki powrotu do poprzedniego zachowania się. Autor tego rodzaju „mutacje“

tłumaczy tym, iż dany szczep może składać się z komórek o obu wymienionych zdolnościach biochemicznych, obok komórek o zdolnościach wyłącznie peptonizujących. Przypadkowy wysiew wyłącznie pierwszych lub drugich daje w rezultacie ową zmienność zachowania się. Podobne zjawisko opisuje Hammer (8). Z jednego szczepu *Streptococcus lactis* wyodrębnia on „podszcypy“, powodujące i niepowodujące ciągliwości mleka.

Z punktu widzenia cykliczności rozwoju bakteryj zjawiska te, o charakterze mutacji, mogą być uważane za rezultaty cyklicznych przemian, ujawniających się i ocenianych w końcowym efekcie powstania szczepu o odmiennych od wyjściowego uzdolnieniach biochemicznych. Niepozbawione logiki jednak są wywody Gorini'ego o możliwości operowania w danej czystej kulturze komórkami o różnych uzdolnieniach. Zawsze przecież mamy do czynienia w bakteriologii nie z indywidualum, lecz z populacją osobników i to populacją bardzo liczną. Można przypuścić, iż poszczególne komórki nie posiadają cech zupełnie identycznych, lecz — jak w każdej innej populacji — pewna ilość komórek posiada daną cechę wyrażoną przeciętnie, inna — silniej, jeszcze inna zaś słabiej. Gorini przypuszcza istnienie krańcowego wypadku, gdy część komórek w ogóle pewnej cechy nie posiada. Nasuwa się tutaj przypuszczenie, iż określony rodzaj hodowli może selekcionować komórki obdarzone daną cechę w znaczeniu dodatnim lub ujemnym i doprowadzać do zjawisk nazywanych mutacją. Populacja bakteryj wykazuje zresztą pewne szczególne osobliwości będące wynikiem prostoty sposobu rozmnażania się wegetatywnego drogą podziału, na co wskazał już w r. 1912 Benecke (2). Jeśli schematycznie zilustrować sposób rozmnażania się bakteryj i zwrócić uwagę na jego konsekwencje, trudno np. wyrazić opinię o „wieku“ komórki bakteryjnej, w znaczeniu układu pokoleń. Bakterie bowiem postaci pałeczki, której bieguny nazwiemy *a* i *b* dadzą naskutek podziału dwie komórki nowe *ac* i *cb*: powstające komórki dzielą się w analogiczny sposób i w rezultacie otrzymamy populację, w której rozróżnienie pokoleń „starszych“ i „młodszych“ nie daje się wprost dokonać. Czy za „młodsze“ należy np. uważać komórki o biegunie *a-z*, czy też o biegunie *m-n*? Czy wirulencja, uzdolnienia biochemiczne, zdolności do dalszego rozmnażania się związane są z takim lub innym schematem powstania komórki?

Przytoczyłem to rozumowanie jako przykład trudności i konieczności zachowania krytycyzmu przy przenoszeniu pojęć ustalonych dla świata roślinnego lub zwierzęcego do bakteriologii. Zwraça na to uwagę Almquist, wprowadzając swoje terminy „konidij“, „plazmodium“, „krzyżowania“ itp. Uważa je raczej za zło konieczne, za pewien niedoskonały sposób porozumiewania się, zaznacza jednak, że nazwa pewnego zjawiska winna być jedynie uzupełnieniem należycie podanego opisu. Tym bardziej stanowisko Almquista uznać należy za słusne, iż cytowane badania chociaż dotyczą zjawisk rozrodczych i szukają w nich analogij ze zjawiskami właściwymi dla organizmów wyższych, nie zdradzają tendencji głębszego wniknięcia w dziedzinę, co prawda z przyczyn technicznych mało dotąd zbadaną i niewdzięczną, a mianowicie w dziedzinę badań cytologicznych. Budowa komórki bakteryjnej rzadko jest rozpatrywana bliżej w związku z opisywanymi zjawiskami. Spotykamy jedynie przytaczane już hipotezy, np. o gramododatności ziarniaków. jako rezultatu gromadzenia rezerwowych substancyj odżywczych, o błędnym nazywaniu substancjami zapasowymi zawartych w komórce gonidij itp.

Budowa wewnętrzna komórki jest podstawą złożonego schematu rozwoju cyklicznego bakteryj podanego przez Enderleina. W budowie tej, wychodząc z własnych obserwacyj, popartych odpowiednio zestawionym materiałem historycznym badań cytologicznych, Enderlein odróżnia część zasadniczą, nosicielkę życia, prajądro, którą nazywa „mych“. Mych ten o wymiarach $0,1-0,25 \mu$ ukryty jest w plazmie i substancjach zapasowych komórki „troposomach“ (komórka w stadium pliotrofitu), można go jednak zobaczyć po specjalnym zabarwieniu lub wówczas, gdy komórka substancyj zapasowych nie posiada (atrofit). Ów mych jest istotną częścią komórki, ulegać może podziałowi i wówczas komórki bakteryjne mogą posiadać mychów dwa, cztery i więcej. Jednocześnie z podziałem mychów (nie komórki) następują zwykle wydłużenia postaci. Komórki o jednym mychu — mychity mogą przechodzić w komórki o dwóch — dimychity, dalej didimychity, syndimychity i wreszcie pliomychity. Jak widzimy Enderlein tworzy nową zupełnie nomenklaturę zjawisk związanych z cyklicznym rozwojem bakterij — bardzo złożoną, wymagającą posługiwania się specjal-

nym słownikiem, załączonym przez autora do książki. Mych jako taki, obłoniony grubą otoczką, może zostać wydzielony z komórki i wówczas mówimy o gonidialnej fazie rozwoju. W tym stadium, zwłaszcza w warunkach niesprzyjających, następuje mychomitoza mychu dla utworzenia komórki płciowej, polegająca na zredukowaniu prajądra do połowy i utworzenia mychomeru. Z mychomerów powstają „spermity“ i „oity“, komórki płciowo kopulujące, które to stadium silnie podnosi wirulencję i czynność bakteryj.

Bakterie w swym cyklicznym rozwoju przechodzą przez szereg kombinacji układów mychu. W stadium posiadania w komórce jednego i dwu mychów bakterie są basitami, dimychitu i didimychitu — phytitami, didimychitów i syndimychitów — ascitami, w stadium przetrwalnikowania sporitami itp. Cykle wywołane są czynnikami wewnętrznymi (kausale Faktoren) lub zewnętrznymi (conditionelle Faktoren). Autor odróżnia cykle wstępujące i zstępujące, obdarzając je specjalnymi nazwami. Analogiczne stadium do plazmodium Almquista i symplazmy Löhnsa, autor nazywa stadium symplastu. Poszczególne gatunki „sumując elementy morfologiczne“ dochodzą do pewnych stadiów rozwoju, w których rozmnażają się wegetatywnie, drogą podziału, rozpadu oidialnego komórek itp. Stadium najwyższego rozwoju nie u wszystkich gatunków jest to samo. „Kulminantą“ rozwoju jednych może być ascit, drugich phytit, basit itp. Cykl rozwoju danego gatunku nazywa autor cyklodą. Na podstawie swego schematu Enderlein tworzy nowe podstawy systematycznego układu bakteryj, grupowanych przede wszystkim według osiągniętych w rozwoju „kulminant“. Cykl ewolucyjny rozwoju bakteryj według Enderleina bierze początki z praorganizmu „prototu“, przechodzącego przez filtry i identycznego z bakteriofagami, a zbliża się w wyższych stadiach do pierwotniaków i organizmów roślinnych.

W pracy Enderleina spotykamy szereg takich właśnie daleko idących uogólnień, syntez i schematów.

Podziwiać należy wysiłek argumentacji historycznej i ogrom wykonanych obserwacji mikroskopowych, wiodących do zbudowania tak w szczególach wykończonego gmachu myślowego. Nie znajdujemy tu żadnych punktów wątpliwych. Wszystko pasuje do siebie i pasuje do schematu. Ilustracje w powiększeniu 1:10.000, a więc w wymiarach znacznie przekraczają-

cych możliwości szkieł mikroskopu, wyraźnie pokazują nam mychy, tropozomy, ich układ, podział, kopulacje itd. Niewątpliwie piękna to praca, jako spekulacja myślowa, tym bardziej ciekawa, iż często w wielu szczegółach zbieżna ze schematami tworzonymi na podstawie późniejszych obserwacji. W stosunku jednak do danych faktycznych zbyt syntetyczna, zbyt mocno i pewnie operująca hipotezami, podanymi jako twierdzenie.

Z wymienionych uprzednio już badaczy w schemacie Enderleina umieszcza obserwowane fazy rozwojowe bakteryj — Hüttig.

Odmianą tezę, opartą na 15-letnich obserwacjach, wysuwają Kuhn i Sternberg (13). Twierdzą oni, iż kultury bakteryj, z którymi mamy do czynienia, są kulturami dwóch odmiennych organizmów: właściwych bakteryj, a obok nich organizmów zupełnie odmiennych, nazwanych przez autorów pettenkoferia mi. Pettenkoferie są pewnego rodzaju pasorzytami bakteryj, chociaż w niektórych fazach wspólnego rozwoju obserwować można zjawiska raczej o charakterze symbiotycznym. Pettenkoferie tym zasadniczo różnią się od bakteryj, iż posiadają wyraźne jądro, a w budowie swej zbliżają się ku organizmom zwierzęcym — pierwotniakom. Posiadają zdolność ruchu ameboidalnego, rozmnażają się drogą podziału lub też tworzą cysty wypełnione zarodnikami. Zarodniki (spory) są to twory ultramikroskopowe, przenikające przez filtry bakteryjne i one to właśnie przenikają do organizmów bakteryj, w których bytują czas pewien, po czym rozrastają się dając formy rozgałęzione (to co nazywamy formami inwolucyjnymi), niszczą ostatecznie komórki bakteryjne i powodują degenerację kultury. Pettenkoferie stale i niezmiennie towarzyszą bakteriom. Według autorów w każdej czystej kulturze mamy do czynienia z obydwo ma organizmami. Zarodniki (spory) pettenkoferyj autorowie identyfikują z bakteriofagami d'Herella. Bakterie zdolne są tworzyć formy odporne na przenikanie i działanie pettenkoferyj, dając kultury o postaci ziarniaków. Doprowadza to autorów do stwierdzenia zjawiska nie pleomorfizmu lecz dimorfizmu bakteryj. Formy o komórkach wydłużonych (pałeczki, skrętniki) nieodporne na przenikanie pettenkoferyj nazywają oni formą *B*, odporne ziarniki — formą *C*. Formy rozgałęzione i nieprawidłowe *F* i *D* powstają z formy *B* przy udziale rozwoju pettenkoferyj z zarodników noszonych przez komórkę

bakteryjną. Są to formy nazywane dotąd inwolucyjnymi, zaś degeneracja kultur w tym stadium, zatracanie przez nie czynności, tłumaczy się pożeraniem bakterij przez pettenkoferie, które następnie tworzą cysty z zarodnikami i w przesączach działają jako bakteriofagi.

Autorowie krytycznie odnoszą się do uogólnień Löhnisa i Enderleina, jednak w niektórych szczegółach obserwacje ich pokrywają się z już omówionymi. A więc znów forma ziarniaka jest formą odrębną innych postaci bakterij, formy inwolucyjne — specjalną fazą rozwoju bakterij, co prawda wywołaną obecnością innego organizmu, gonidia odpowiadają sporom pettenkoferyj, treść wewnętrzna komórki bakteryjnej — to nie odkłady substancyj zapasowych lecz spory pettenkoferyj, tak jak dla poprzednio omówionych autorów — gonidie, mychy, konidie itd.

Dla uogólnień Kuhna i Sternberga momentem najbardziej charakterystycznym jest związanie zjawisk pleomorfistycznych ze zjawiskami równoległe i niezależnie opracowywanymi, dotyczącymi fenomenu bakteriofagów.

Najobszerniej w latach ostatnich reprezentowana jest literatura zjawisk pleomorfistycznych w właściwej bakteriologii czyli dotyczącej bakterij. Zjawiają się jednak także prace dotyczące innych grup drobnoustrojów: grzybków drożdżowych i pleśniaków. U wielu organizmów tych grup stadia i fazy rozwojowe ustalone były już dawniej, obecnie jednak przytaczane badania ujmują zjawisko w sposób odmienny i doprowadzają autorów do wniosków wykazujących pewne analogie z uogólnieniami przyjętymi dla świata bakterij.

Jonáš (12) w r. 1930 poddaje drożdże piekarniane działaniu niszczących środków fizycznych i chemicznych i otrzymuje komórki mniejsze od wyjściowych, o odmiennym zachowaniu się. Nazywa je formami „drobnymi“ i „bakteryjnymi“. Z tych form po dłuższej hodowli w jednym środowisku, otrzymuje formy duże, wykazujące poza pączkowaniem i zarodnikowaniem także i inne sposoby rozmnażania się. Autor różni rozmnażanie się „sporoidalne“, tym charakterystyczne, iż wewnątrz komórki powstają bardzo drobne ciała, wysypujące się po rozdarciu lub rozpuszczeniu błony komórki macierzystej. Ciała te pozbawione były błony i rozmnażały się samodzielnie przez pączkowanie. Obok tego autor obserwował

rozmnażanie się „plazmatyczne“, polegające na tym, iż plazma wylewała się z komórki i z niej powstawały drobne ciała rozwijające się samodzielnie. Także żywą i zdolną do dawania form rozmnażających się była plazma komórek, u których zanikła błona. Jednocześnie ze zmianami form drożdży następowały różnice w ich uzdolnieniach fermentacyjnych. Rewelacyjną jest obserwacja autora o wytrzymywaniu przez formy plazmatyczne ciepłot wyjaławiania. Formy plazmatyczne po podaniu ich temu zabiegowi dawały „formy drobne“ i „bakteryjne“. Autor nie poszukuje analogii pomiędzy swymi obserwacjami i zjawiskami opisywanymi przy badaniach bakteryj, jednak analogie te nasuwają się. Mamy więc działanie trucizn i ciepłot, jako warunek wywołania tych form, mamy wytwarzanie się form „sporoidowych“ analogicznie do gonidij bakteryj, mamy bezpostaciową plazmę, reprodukcją komórek nowe. Uogólnienia autora też zbiegają się z uogólnieniami już spotykanymi. Śmierć komórki — mówi autor — jest przejściem w inną formę życia; nosicielką życia jest nie komórka lecz plazma, zdolna do reprodukcji organizmów komórkowych.

Odrębnego zagadnienia dotyczą badania Fuchsa (6) ogłoszone w r. 1926, zagadnienia otwartego przez Kützinga w r. 1837. Chodzi w nim o hipotezę, czy grzybki drożdżowe są samodzielnymi organizmami, czy też fazami rozwoju pleśniaków. Zdolność dawania przez grzyby komórek pączkujących, wywołana pewnymi warunkami hodowli, jest znana; jednak tzw. drożdże właściwe (*Saccharomyces*) od czasów badań Hansena wyodrębnione są w oddzielną grupę systematyczną i uznane za organizmy samodzielne.

Fuchs, podobnie jak Löhnis w stosunku do bakteryj, przytacza bogatą literaturę, przemawiającą za tezą odmienną, iż drożdże są fazą rozwojową pleśni i sam dowodzi tego w swych badaniach nad *Aspergillus oryzae*, *Penicilium glaucum* i *Rhizopus nigricans*. W stanowisku swym Fuchs nie jest odosobniony. Jeśli nawet pominąć — jako niedostatecznie metodycznie ugruntowane — obserwacje z okresu przedhansenowskiego, we współczesnej literaturze analogiczne tezy niejednokrotnie były wysuwane i właśnie około przedmiotu badań Fuchsa, *Aspergillus oryzae*, toczyły się walki. Gatunek ten jest czynny przy wyrobieniu japońskiego trunku alkoholowego saké i część badaczy

jak Takamine i Jörgensen stwierdzali jego zdolność dawania vegetacji drożdżowej o cechach drożdży właściwych, podczas gdy inni, jak Wehmer, Kozai, Yabe, Klöcker, zjawisku temu zaprzeczali. Stanowisko pierwszych poparł już w r. 1922 Zikes, zwalczany znowu przez Klöckera i szkołę Hansena. Podobne walki toczyły się około innych grzybów, jak *Dematium*, *Ustilago*, *Penicilium*, *Gleosporium* itp. Jak dotąd jednak silnie metodycznie uzasadnione stanowisko Hansena znajduje większe uznanie i przytaczane jest powszechnie.

Fuchs postępuje w ten sposób, iż na drodze hodowli konidij *Aspergillus oryzae* w środowisku o ograniczonym dostępie tlenu otrzymuje vegetację pączkującą z tych konidij, poprzedzoną wytworzeniem grzybni zredukowanej. Tę vegetację „drożdżową“ pleśniaka wyodrębnia następnie i utrzymuje w postaci kultur czystych, nie zdradzających tendencji do vegetacji pleśniowej. Otrzymane „drożdże“ są różnych typów, a między innymi typu *Willia* o kapeluszkowatych zarodnikach, tworzącego kożuch, produkującego estry. Powrotu do pleśniaków autor nie otrzymał. W konkluzji swych badań Fuchs dochodzi do wniosku, iż wykrycie związku cyklicznego pomiędzy pleśniami i grzybkami drożdżowymi jest tylko kwestią czasu. Podstawą metody postępowania jest tutaj znowu stworzenie dla organizmu warunków niesprzyjających w postaci ograniczenia dostępu tlenu.

Poza pracami zreferowanymi powyżej, spotykamy wiele innych, pośród których nie wszystkie stoją tak zdecydowanie na stanowisku pleomorfistycznym. Do takich należy np. praca Porcheta (19) z r. 1931 opisująca polimorfizm zachowania się bliżej nieokreślonego gatunku wyodrębnionego z gleby. Autor nie przesądza w niej, czy ma do czynienia z właściwą wielopostaciowością, czy też z symbiozą trudno dających się oddzielić kilku szczepów różnych. Jak już zaznaczyłem, na teren nauki oficjalnej i literatury podręcznikowej wnioski z prac tego typu dotąd nie weszły, choć już np. Löhnis (15) w swych wykładach bakteriologii rolnej zjawiska pleomorficzne i ich znaczenie uwzględnia.

Jest rzeczą charakterystyczną, iż prac, któreby stanowiły krytykę i ocenę negatywną uogólnień pleomorfizmu nie spotykamy. Wyczuwa się w nauce stanowisko wyczekujące, tym bardziej nadające się do utrzymania, że pleomorfiści właściwie nie negują zjawisk ustalonych, jak stałość rozmnażania się

wegetatywnego przez podział, zmienność form w różnych warunkach hodowli, lecz je uzupełniają, podkreślając niejednokrotnie, iż właśnie jednostronność dotychczas stwierdzana w rozwoju bakteryj była zdumiewająca i budziła wątpliwości. Nie znajdowała ona analogii w cyklu życiowym innych organizmów mikroskopowych (glony, pierwotniaki, grzyby), zaś ich odkrycia nasuwają cały szereg takich analogij, dając zrozumialszy i logiczniejszy obraz życia drobnoustrojów.

I stąd pomiędzy pleomorfizmem obecnym i pleomorfizmem początków rozwoju mikrobiologii istnieje kardynalna różnica. O ile wówczas świat drobnoustrojów wydawał się tak odrębny od pozostałych znanych form życia, że w nim właśnie, w teoriach samoródtwa szukano istoty powstania życia na ziemi, życia o nieuchwytnych, płynnych formach, podlegającego bezpośrednio, widocznej ewolucji i zmienności, o tyle obecnie pleomorfici z naciskiem podkreślają analogię form tego świata z pozostałym światem żywym, uważają, że zbyt prymitywnie potraktowane zostały dotąd obowiązujące schematy rozmnażania się i bytowania drobnoustrojów. Nie wysuwają omówieni tu badacze tezy o istotnym przechodzeniu gatunku w gatunek, grupy w grupę, lecz zdradzają tendencję do odmiennego ujęcia istoty gatunku. W obręb tych nowych „gatunków“ winny wejść te formy, które dotąd uznane były jako organizmy samodzielne.

Rewelacyjność obecnie wprowadzonych pojęć nabierze na wyrazistości, jeśli zestawić je z pojęciami współczesnego monomorfizmu. Oto stanowisko Omeliańskiego (18) w jego „Zasadach mikrobiologii“ z r. 1924: „Choć nikłe wymiary, ubóstwo typowych oznak i daleko posunięta zmienność morfologiczna i fizjologiczna drobnoustrojów stwarzają trudności w przyjęciu ostatecznym też monomorfizmu, jednak na podstawie dotychczasowych danych należy przyjąć, iż dla każdego gatunku istnieje określona forma typowa w normalnych warunkach bytowania“. A dalej: „zatrzymywanie się na charakterystyce form inwolucyjnych jest zbyt techniczne, gdyż nie da się ustalić żadnego związku pomiędzy normalną dla danego gatunku postacią i formą inwolucyjną; krótkie pałeczki często wyrastają w długie nitki i odwrotnie długie laseczniki rozpadają się na oddzielne kulki; byłoby niesłuszne przypadkowo powstające formy inwolucyjne uważać za cechujące gatunek i włączać w charakterystykę

*

bakteryj". Wreszcie: „mimo wielkiej zmienności fizjologicznej gatunku (pleogonii) nie przekracza ona granic właściwych dla danego gatunku“.

W pracach omówionych otrzymano właśnie „normalne bytowanie“ form zupełnie odrębnych od wyjściowych, a tzw. formy inwolucyjne uważane były za oznakę wystąpienia cykliczności rozwoju i budziły specjalne zainteresowanie. Odmienność więc stanowisk jest wyraźna.

Nie da się zaprzeczyć, iż uogólnienia i hipotezy nasuwające się pleomorfistom nowoczesnym są pociągające i interesujące. Ziarniak jako forma obronna innych postaci (najkorzystniejszy stosunek objętości do powierzchni), gramodatność, jako skutek gromadzenia rezerw, faza symplazmy bakteryj, odmładzająca kulturę, zwiększająca ich wirulencję, przenikanie bakteryj i pettenkoferyj (?) do organizmu w stadium gonidij przechodzących przez filtry bakteryjne, ewentualny związek z bakteriofagami, przystosowywanie się bakteryj do otoczenia drogą zupełnej zmiany postaci, uzdolnień biochemicznych i potrzeb fizjologicznych — tego rodzaju syntetyczne ujęcia są niewątpliwie zachęcające.

Jednak stanowisko krytyczne wydaje się najwłaściwsze. Właśnie to gromadzenie pospiesznych uogólnień, syntez, tworzenie schematów na podstawie badań dotychczasowych, budzi zastrzeżenia. Mimo całkowitego zaufania do dobrej woli obserwatorów, mimo doceniania ich staranności i samokrytycyzmu, nie można także oprzeć się przypuszczeniom, iż nieraz zjawiska przypadkowe mimowoli podciągane zostały do schematów myślowych i nasuwały zbyt bezwzględne uogólnienia.

Tym nie mniej, chociażby ten szczegół, iż zapoczątkowany został na większą skalę okres badań drobnoustrojów w warunkach odchylających się od optymalnych dla nich, jest niewątpliwą zdobyczą mikrobiologii, tym cenniejszą, iż w przyrodzie właśnie stosunkowo rzadko przewidywać można układ warunków analogicznych do stosowanych powszechnie w laboratoriach, a częściej znacznie warunki te odznaczać się muszą zmiennością i ubóstwem czynników uznanych za sprzyjające.

*Z Instytutu Przemysłu Fermentacyjnego i Bakteriologii Rolnej
Muz. Przem. i Roln. w Warszawie.*

LITERATURA.

1. Almqvist E. Biologische Forschungen über die Bakterien. Stockholm, 1925.
2. Benecke W. Bau und Leben der Bakterien, Leipzig, 1912.
3. Cunningham A. The Life-Cycle of *B. saccharobutyricus* v. Klecki, Zentr. f. Bakt. A. II, 1931, t. 82 i t. 83, str. 25 i str. 1.
4. David H. Beiträge zur Morphologie der Bakterien, Zentr. f. Bakt. A. II, 1928, t. 70, str. 1.
5. Enderlein G. Bakteriencyklogenie, Berlin, 1925.
6. Fuchs J. Schimmelpilze als Hefebildner, Zentr. f. Bakt. A. II, 1926, t. 66, str. 490.
7. Gorini C. Über plötzliche physiologische Mutationen durch individuelle Abweichungen bei der Milchsäurebakterien, Zentr. f. Bakt. A. II, 1922, t. 55, str. 241.
8. Hammer B. Variations in *Streptococcus lactis*, Journ. of Dairy Science, 1930, t. 13, str. 64.
9. Hausam W. Untersuchungen über *Bacterium coli*, Zentr. f. Bakt. A. II, 1930, t. 82, str. 103.
10. Hüttig C. Der *Streptococcus lactis* eine Form des *Bact. herbicola*, Zentr. f. Bakt. A. II, 1931, t. 84, str. 231.
11. — Über die Entstehung von Milchsäurestreptokokken aus Bakterien der Coligruppe, Milchwirtsch. Forschungen, 1932, t. 6, str. 455.
12. Jonáš V. Neue Vermehrungsmethoden von Kulturpreshefen und die Entstehung neuer Hefeformen, Wochenschr. f. Brauerei, 1930, str. 205.
13. Kuhn Ph. i Sternberg K. Über Bakterien und Pettenkoferien, Zentr. f. Bakt. A. I, 1931, t. 121, str. 113.
14. Löhnis F. Zur Morphologie und Biologie der Bakterien, Zentr. f. Bakt. A. II, 1922, t. 56, str. 529.
15. — Vorlesungen über landwirtschaftliche Bakteriologie, Berlin, 1926.
16. Meyn A. Über Symplasmabildung und Zellneubildung beim Rauschbrandbacillus, Zentr. f. Bakt. A. II, 1931, t. 83, str. 113.
17. Niessen v. Bakteriogenetisches, Zentr. f. Bakt. A. II, 1926, t. 66, str. 320.
18. Omelianskij W. Osnovy mikrobiologii, Leningrad, 1924.
19. Porchet B. Polymorphisme d'un organisme du sol, Zentr. f. Bakt. A. II, 1931, t. 85, str. 115.
20. Potthoff H. Zur Entwicklungsgeschichte der Gattungen *Chromatium* und *Spirillum*, Zentr. f. Bakt. A. II, 1922, t. 55, str. 9.

1. Altmann E. Biologische Forschungen über die Bakterien. Stuttgart, 1935.

2. B. ... W. ... 1912.

3. ... 1912.

4. ... 1912.

5. ... 1912.

6. ... 1912.

7. ... 1912.

8. ... 1912.

9. ... 1912.

10. ... 1912.

11. ... 1912.

12. ... 1912.

13. ... 1912.

14. ... 1912.

15. ... 1912.

16. ... 1912.

17. ... 1912.

18. ... 1912.

19. ... 1912.

20. ... 1912.

*Instytut Przemysłu Fermentacyjnego i Bakteriologii Rolnej
 Muzeum i Rolnictwa w Warszawie*

TADEUSZ GARLEJ

Nowsze badania in vitro nad jajami ssaków.

Wstęp.

Badania in vitro nad żywymi komórkami jajowymi w ostatnich czasach były bardzo liczne, lecz dotyczyły najczęściej jaj zwierząt niższych, a rzadko tylko ssaków. Przyczyna tego leży, zdaje się, w możliwości łatwego otrzymania zwierząt niższych w dużej ilości oraz nieskomplikowanego sposobu ich hodowania; jajko np. płaza lub ryby rozwija się w zwykłej wodzie, niema tu żadnego kłopotu o utrzymanie specjalnych warunków, chyba że te właśnie warunki są przedmiotem badań. Natomiast u ssaków już samo otrzymania jaj sprawia duże trudności. Nic dziwnego, że wykorzystywano przede wszystkim ten materiał, który dostać i utrzymać przy życiu najłatwiej; zresztą poznanie niektórych zjawisk życiowych na jajach zwierząt niższych rzuca nam odrazu przez analogię światło na te same procesy u ssaków.

Trudności w uzyskiwaniu materiału były też przyczyną tak późnego odkrycia jaj ssaków (von Baer 1827), podczas gdy dużo drobniejsze plemniki wykryto już w wieku XVII (Hamm i Leeuwenhoek 1677). Te same powody długo nie pozwalały też na szczegółowe zbadanie pierwszych stadiów rozwojowych. Przeprowadził je dopiero w r. 1895 Sobotta, stosując dosyć kłopotliwą metodę wyszukiwania jaj na skrawkach z jajowodu. Na uwagę zasługują jednak także i przyczynki podane już przez poprzedników Sobotty. Bischoff (1842)

obserwował niektóre stadia bruzdkowania. Van Beneden (1875) opisał w jajach zapłodnionych dwa jądra: centralne — żeńskie i peryferyczne — męskie. Pierwszy Tafani (1889) obserwował wniknięcie plemnika i powstanie z niego pronukleusa męskiego, zlewającego się następnie z pronukleusem żeńskim. Pełny jednak obraz procesu dojrzewania, zapłodnienia i bruzdkowania dała dopiero praca Sobotty, a następnie Lamsa 1913. Odtąd częściej zwracano się do tych problemów i wynikiem tego jest cały szereg prac, które pozwoliły głęboko wniknąć w strukturę i procesy życiowe jaj zwierząt ssących.

Badania *in vitro*, jakkolwiek sięgają do czasów van Benedena i Sobotty, którzy znali już sposób uzyskiwania jaj przez płókanie jajowodu, naprawdę jednak ruszyły naprzód dopiero w ostatnich latach po oparciu ich o doniosłe zdobycze w dziedzinie kultur tkanek. Ciekawe prace w tym kierunku wykonali: Pincus (1930 i 1932), Levis i Gregory (1929) i Yamane (1930, 1935, 1938), Krassowskaja (1934 i 1936), Moricard i de Fonbrune (1937) oraz Arnold (1937). Badania te dotyczyły przede wszystkim procesów dojrzewania jaja, zapłodnienia i bruzdkowania, dalej rozwoju partenogenetycznego i barwienia przyżyciowego.

Materiał i metody.

Większość tych autorów, podobnie jak ostatnio Krassowskaja i Arnold, stosowała w celu otrzymania materiału metodę przepłókiwania jajowodu. Dla uzyskania zapłodnionych jaj królika pokrywa się samicę normalnym samcem i najwcześniej po 10 godz. przeprowadza odpowiednią operację. Po otwarciu jamy brzusznej robi się nacięcie w macicy o 2 cm od ujścia jajowodu i przepuszcza przez trąbkę strumień roztworu fizjologicznego lub takiego płynu, który ma służyć za środowisko w hodowli jaj. Czasami sprawia to pewne trudności wskutek skurczu jajowodu. W tych wypadkach przecina się jajowód napół i każdą połówkę przepłókuje oddzielnie (Yamane). Płyn wycieka przez ujście brzuszne jajowodu do podstawionego naczynia szklanego. Zazwyczaj już po pierwszym płókanu znajdujemy w płynie komórki jajowe i to w takiej ilości, ile pękniętych pęcherzyków Graafa wykazuje jajnik. Jajka te przenosi się następnie zapomocą pipety do środowiska, w którym zamie-

rzamy je obserwować lub hodować. W ten sposób przeprowadzając przepłókiwanie jajowodu po odpowiednio dłuższym okresie czasu post coitum, uzyskać można jaja zapłodnione, bruzdkujące a nawet stadia moruli i pęcherzyka zarodkowego. Dla uzyskania jaj niezapłodnionych pokrywa się króliczkę samcem z podwiązanymi przewodami nasiennymi. Przy zachowaniu pewnych środków ostrożności można zwierzę operować pod narkozą, wtedy jedna samica może posłużyć do tego samego celu kilkakrotnie (Krassowska).

Cała ta metoda opiera się na wyzyskaniu tego faktu, że u królika (a także u kota) owulacja występuje dopiero wskutek kopulacji i ma miejsce w 10 godz. post coitum. U innych zwierząt owulacja następuje spontanicznie: pęcherzyk Graafa dojrzewa, pęka i jajko wypada do jamy otrzewnowej, skąd z prądem płynu surowiczego trafia do jajowodu. Jeśli w tym czasie jajko zetknie się z plemnikami, to następuje jego zapłodnienie, w przeciwnym razie komórka jajowa obumiera. Zapłodnienie musi nastąpić przed pokryciem jaja osłonką białkową, wytwarzaną w jajowodzie, co następuje mniej więcej w trzy godziny po owulacji, gdy jajko osiągnie część gruczołową trąbki.

Dla uzyskania jaj niezapłodnionych a nawet jeszcze nie rozpoczynających dojrzewania można nakłuwać dojrzałe do pęknięcia pęcherzyki Graafa.

Ostatnio jeszcze inną metodę podali Moricard i de Fonbrune (1937); pozwala ona uzyskiwać jaja niezapłodnione w większej ilości. Pobiera się je taksamo przez nakłuwanie pęcherzyków Graafa; różnica polega jedynie na uprzednim pobudzeniu jajnika zapomocą hormonu gonadotropowego przedniego płatu przysadki. Hormon ten ma wywoływać prócz wzrostu pęcherzyków Graafa także podział jądra oocytu (Moricard 1935 i inni).

Cały zabieg przeprowadza się w sposób następujący. Nie-dojrzałej płciowo 9-cio gramowej myszce zastrzykuje się surowicę ciężarnej kłaczy, zawierającą hormon gonadotropowy, względnie odpowiedni z niej ekstrakt. Po 100-tu godz. otrzymuje się efekt, jak przy wykonywaniu reakcji Aschheima-Zondeka.

Pod wpływem hormonu następuje masowe dojrzewanie pęcherzyków Graafa, produkowana zaś przez nie follikulina

wywołuje objawy rui (złuszczone komórki nabłonka w rozmazie pochwowym). Tak przygotowanej samiecze wycina się jajniki i nakłuwa dojrzałe pęcherzyki Graafa w kropli surowicy myszki, dzięki czemu oocyty przechodzą do płynu. Następnie przenosi się je po 6—20 do komór wilgotnych i hoduje w cieplarni w 37° C.

Metoda ta jest bardzo efektywna, choć nie jest pewna, czy takie masowe sztucznie wzbudzone dojrzewanie nie powoduje w jajach pewnych nieprawidłowych zmian; zdaje się wskazywać na to wg. Moricard'a niemożność sztucznego ich zapłodnienia. Możliwe, że przyczyna tego ostatniego leży jednak w składzie chemicznym środowiska, wpływ którego na plemniki podkreślano już niejednokrotnie.

Warto tu wspomnieć jeszcze o sposobie uzyskiwania zarodków starszych niż 4-dniowe, zagnieżdżonych już w macicy. Wg. Zaleskiego zbiera się je maleńką 3 mm × 5 mm łyżeczką szklaną z otwartych rogów macicy.

Jako środowisko do hodowania oocytów stosowano różne płyny. Okazało się, że roztwory samych tylko soli mineralnych nie mogą być używane, w ogóle, gdyż komórki jajowe degenerują w nich bardzo szybko. Środowisko musi odpowiadać wielu warunkom. Przede wszystkim musi stwarzać odpowiednie ciśnienie osmotyczne i *pH*, przy czym musi ustalić się stan równowagi między komórką a środowiskiem. Ten ostatni warunek nie jest spełniany przez roztwory soli mineralnych, na co wskazuje zaobserwowana przez Arnolda dyfuzja substancji alkalicznych z oocytu do takiego płynu. Zdaje się, że ten stan równowagi sprowadza dopiero obecność w płynie koloidów, których znaczenie może polegać na wprowadzaniu pewnej stabilizacji jonów, nie pozwalając na ich przewędrowanie poprzez półprzepuszczalną błonę plazmatyczną jaja i niekorzystne ich rozłożenie po obu jej stronach. Koloidy poza tym stwarzają odpowiednią lepkość i napięcie powierzchniowe niezbędne tak dla dalszej egzystencji jak i rozwoju jaja. Znaczenie tych ostatnich czynników podnieśli ostatnio Moricard, Gothie i Tsatsaris stwierdziwszy, że w roztworze Ringera z niewielkim dodatkiem gumy arabskiej oocyty mogą nawet wydzielać pierwsze ciała kierunkowe.

Krassowska (1934) do hodowania zapłodnionych jaj królika stosuje plazmę tego samego zwierzęcia. W środowisku

tym otrzymała ona zupełnie dobre wyniki, podobnie Arnold używając surowicy i plazmy krwi. Natomiast ani plazma kurczęcia, ani ekstrakt embrionalny nie dają dobrych warunków do rozwoju. Specjalnej uwagi wymaga środowisko dla jaj niedojrzałych. Wg. Moricarda powinno ono zawierać w sobie czynnik, pobudzający jajko do rozwoju, a mianowicie hormon gonadotropowy przedniego płatu przysadki.

Dla hodowania jaj stosujemy podobne metody co i przy kulturze tkanek: jajko więc dla umożliwienia obserwacji pod mikroskopem umieszcza się w kropli wiszącej, a szkiełko uszczelnia się wazeliną i parafiną. Moricard hoduje jajka w specjalnych komorach wilgotnych typu Commandona i de Fonbrune'a. Jeśli chodzi o temperaturę, to stosuje się podobnie jak w kulturach tkanek ciepłotę taką samą, jaka panuje w ciele zwierzęcia, z którego pochodzą jajka. Wszelkie jednak obserwacje pod mikroskopem, mikrooperacje i barwienie przyżyciowe wykonuje się przeważnie w temperaturze pokojowej. Nie wpływa to na oocyty ujemnie, jak twierdzi większość badaczy, o ile trwa krótko. Temperatura 37 C, jaką stosuje się przeważnie, kryje w sobie pewne niebezpieczeństwo w razie, gdy środowisko niezupełnie odpowiada potrzebom jaja. Przyspiesza ona bowiem procesy degeneracyjne, a jednym z nich jest właśnie dyfuzja substancji alkalicznych z komórki. W płynie Ringera następuje to w temperaturze pokojowej po 10-u godz. a w 37 C — już po 7-u godz. (Arnold).

Niższa temperatura hamuje procesy fizyko-chemiczne, dlatego Arnold, chcąc np. dłużej utrzymać barwę indykatora w jaju barwionym przyżyciowo, umieszcza je w lodowni.

Jednym z najczęstszych badań, wykonywanym na jajach in vitro, była obserwacja sztucznego zapłodnienia. Sposób pobierania plemników podał ostatnio Yamane 1935. Samca królika kastruje się bez narkozy, wycina ogon najądrza, przepłukuje go roztworem dekstrozo-fosfatowym ($10\text{ cm}^3\text{ m}/10\text{ H}_3\text{PO}_4$ — $17,2\text{ cm}^3\text{ m}/10\text{ NaOH}$ — 4 gr dekstrozy — $72,8\text{ cm}^3\text{ H}_2\text{O}$ dest.) a następnie rozdrabnia nożyczkami na bardzo małe kawałeczki. Powstałą zawiesinę miesza się z odpowiednią ilością roztworu dekstrozo-fosfatowego, gruntownie wytrząsa dla oddzielenia plemników, a następnie odfiltrowuje przez cienką szmatkę jedwabną. Przesącz trzyma się w temperaturze pokojowej. Samo sztuczne

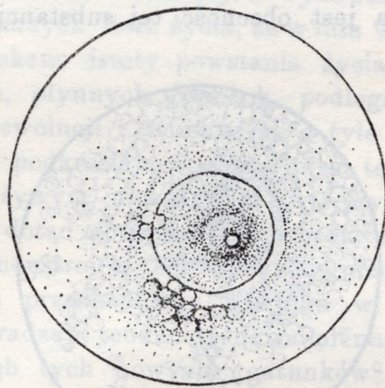
zapłodnienie odbywa się po dodaniu do środowiska, w którym znajduje się jajko, takiej ilości zawiesiny plemników, aby roztwór był nieprzejrzysty. Zabieg ten przeprowadza się w temp. 37° C dla wzmożenia procesów życiowych jaja i ruchów plemników. W celu szybkiego pobrania plemników można je wydobywać szklaną kapillara wprost z vas deferens (Krassowska). Roztwór dekstrozo-fosfatowy ma najlepiej zastępować płyn ejakulatu, natomiast w płynie Tyrode'a, jak twierdzi Yamane, plemniki mają ulegać aglutynacji. Wielu jednak badaczy stosowało płyn Tyrode'a, otrzymując zupełnie dobre wyniki. Krassowska zaś przeprowadzała sztuczne zapłodnienie w płynie Ringera, po tym dopiero dodając plazmy krwi jako właściwego środowiska.

Dane ogólne o jajku.

Jajko myszy jest jednym z najmniejszych jaj ssaków i ma około 80–100 μ średnicy, z błoną przejrzystą zaś około 120 μ . (ryc. 1). Jajko królika jest większe i ma około 170 μ średnicy razem z grubą błoną przejrzystą (20 μ – 30 μ) (ryc. 2). Nie oznacza to wcale, żeby wielkość jajka rosła proporcjonalnie do wielkości zwierzęcia, średnica jego waha się w dość wąskich granicach od 100 μ – 200 μ , osiągając największe rozmiary u człowieka. Jajko myszy jest prawie zawsze wolne od komórek korony promienistej, a jeśli je posiada to w niewielkiej ilości i łatwo je uwolnić od nich przez kilkakrotne wciąganie i wypuszczanie z pipety. Natomiast jajko królika jest zawsze otoczone koroną promienistą i ściętą masą płynu pęcherzykowego, od której mechanicznie uwolnić je bardzo trudno i dopiero po zapłodnieniu i przejściu przez jajowód jest zupełnie od niej wolne. Yamane oczyszczał taki oocyt zapomocą cieniutkiego włosa i stwierdzał, że na błonie przejrzystej zostają jakby odcisnięte ślady komórek. Jak wiadomo, błona przejrzysta jest wytworem nabłonka otaczającego oocyt. Powstaje ona już wtedy, gdy jajko otoczone jest zaledwie jedną warstwą komórek, z jakiejś jednorodnej masy. Grubość jej jest różna, dosyć duża u królika, niewielka zaś u myszy, co nadaje odrazu jajku pewien charakter w jego wyglądzie.

Oocyt, oglądany in vitro, jest prawie zupełnie przezroczysty, posiada silnie błyszczące jąderko, lekko zarysowującą

się błonę jądrową, a w cytoplazmie błyszczące ziarenka. Jądro leży mniej lub więcej ekscentrycznie. Na granicy ooplazmy i jasnej błonki przejrzystej znajdujemy ciemną linię błony żółtkowej, której obecność jednak wielu autorów podaje w wątpliwość. Oocyty, uzyskane przez płókanie jajowodu i niektóre z otrzymanych metodą Moricard'a i de Fonbrune'a, mogą od razu zawierać wydzielone już pierwsze ciała kierunkowe. Jak wiadomo bowiem, podziały redukcyjne u większości zwierząt rozpoczynają się już przed owulacją (jajko królika wydziela się w stadium metafazy drugiego podziału redukcyjnego).



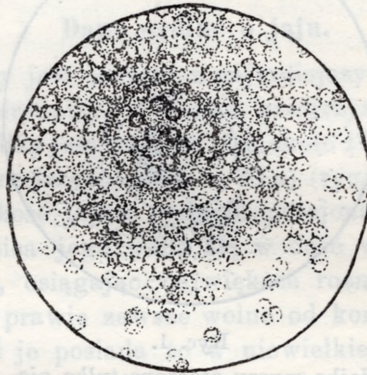
Ryc. 1.

Jajko myszy otoczone tylko niewielką ilością komórek.

Dojrzewanie.

Dojrzewanie jaj in vitro opisują szczegółowo Moricard i de Fonbrune, obserwowali je także Pincus, Enzmann, Krassowskaja i Yamane, ale w ostatnich stadiach przed zapłodnieniem. In vitro dojrzewanie odbywa się pod wpływem hormonu gonadotropowego przedniego płata przysadki. W szeregu prac wykazał Moricard (1934—1936), że hormon ten nie tylko pobudza do wzrostu sam pęcherzyk Graafa, ale następnie oddziałuje także na oocyt. Autor ten obserwował przechodzenie drobnych wakuolek z wakuomu komórek follikularnych poprzez błonkę przejrzystą do jajka. Wakuolki te, tworzące przejściowo „Vacuom radié“, przenoszą zdaniem Moricard'a

do jajka hormon gonadotropowy, a możliwe że także i follikulinę, gdyż obie te substancje są wtedy zawarte w płynie pęcherzyka Graafa. Rezultatem tego procesu są zmiany w ooplazmie. Mianowicie leżący dotąd tuż pod błoną przejrzystą w postaci drobnych wodniczzków wakuom oocytu rozprasza się teraz po całej cytoplazmie i znika i od tej chwili przy użyciu metod srebrnych do wybarwiania aparatu Golgi'ego cała ooplazma zaczyna się impregnować srebrem. Zmiany te są wstępem do pierwszego podziału redukcyjnego. Temu więc hormonowi gonadotropowemu należy przypisać pobudzenie jajka do dojrzewania. Jak wynika z badań Moricarda, także *in vitro* konieczna jest obecność tej substancji, aby nastąpiło



Ryc. 2.

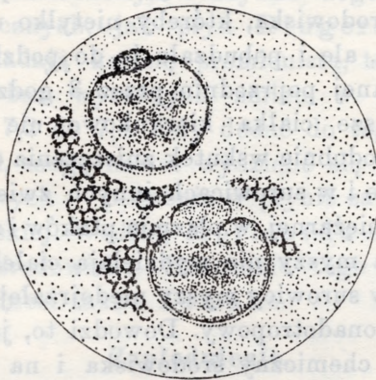
Jajko królika po owulacji.

wydzielanie ciałek kierunkowych. Zachodzi ono tylko w surowicy tego samego zwierzęcia z okresu rui, ciąży lub menopauzy, a więc z okresów, kiedy hormonu gonadotropowego jest w krwi najwięcej.

Według Moricarda już w $\frac{1}{2}$ —1 godz. po umieszczeniu w surowicy oocytu, wydobytego z jajnika myszki, zanika jąderko; jest to pierwszy objaw przygotowywania się jaja do podziału. Po 6—7 godz. obserwujemy stadium metafazy: w cytoplazmie zjawia się jasne wrzecionko i przezroczysta płytka równikowa, utworzona z chromosomów. Cała figura mitotyczna leży peryferycznie na biegunie i ustawiona jest prostopadle do powierzchni

oocyty. Mniej więcej po 10 godz. wydziela się pierwsze ciało kierunkowe (ryc. 3). Jest ono owalne lub kuliste, ma około $10\ \mu$ średnicy, jednak wielkość jego wahać się może w bardzo szerokich granicach. Ułożone jest ono na biegunie animalnym jaja między nim a błoną przejrzystą w tak zwanej przestrzeni okołozółtkowej, tworzącej tutaj rozszerzenie w postaci komory ciałek kierunkowych. Cytoplazma ciała jest tak samo delikatnie ziarnista jak w oocyte. Ponieważ jajko ustawia się najczęściej biegunem animalnym ku górze, przeto ciało kierunkowe znajduje się zwykle u góry, rzadziej z boku lub z dołu.

Drugie ciało kierunkowe wydziela się w sposób analogiczny jak pierwsze i ma taki sam kształt i wielkość. Odsznu-



Ryc. 3.

Oocyty z wydzielonymi ciałkami kier.
Ciała kier. są nierówne.

rowanie się jego następuje w tym samym miejscu i pozostaje ono w styczności z pierwszym. Przez to samo miejsce przechodzi u królika także pierwsza bruzda południkowa (Krasowska ja).

Niekiedy jajko posiada trzy ciała kierunkowe, jeśli pierwsze ulegnie dalszemu podziałowi. Podział ten u królika jest prawdopodobnie amitotyczny, gdyż brak w jego obrazie obecności wrzecionka kariokinetycznego, chociaż jądro występuje w takim stanie, w jakim wyszło z poprzedniego podziału (Yamane 1938). Zjawisko przebiega zupełnie niezależnie od podniety ze strony plemnika i niezależnie od wydzielenia dru-

giego ciała kierunkowego. Trzecie ciało jest o wiele mniejsze od pierwszego i posiada pewne właściwości podobne do drugiego: mianowicie może być zapłodniane. Charakterystyczne jest, że ciała kierunkowe, których jądra prawie nigdy nie przechodzą w stan spoczynkowy, po zapłodnieniu tworzą pronucleusy, tak jak to występuje w jajach.

O mechanizmie wydzielania ciałek kierunkowych pouczają nas ciekawe badania Moricarda i de Fonbrune'a nad niedojrzałymi jajami myszki, hodowanymi w różnych płynach. Miernikiem wpływu środowiska, jako czynnika wywołującego to zjawisko, jest stosunek ilości wydzielonych pierwszych ciałek kierunkowych do ogólnej liczby oocytów, umieszczonych w kulturze. W eksperymentach, o których mowa poniżej, chodziło o dobór takiego środowiska, któreby nie tylko umożliwiała jajom dalszą egzystencję, ale i pobudzało je do podziału. W surowicy mysiej, podgrzewanej poprzednio przez 3 godziny do temperatury 56°C , pierwsze ciała kierunkowe nie wydzielają się zupełnie, prawdopodobnie wskutek zniszczenia ciepłochwiejnego hormonu. Podobnie i w surowicach innych zwierząt, jak kłaczki ciężarnej, kobiety ciężarnej, w plazmie ptaków i surowicy szczura z okresu rui jajka myszy nie wydzielają ciałek kierunkowych, nieliczne zaś — w surowicy myszy niedojrzałej, której zastrzykiwano hormon gonadotropowy. Dowodzi to, jak czułe są jaja ssaków na skład chemiczny środowiska i na obecność w nim pewnych specyficznych substancji. Oocyty nie dojrzewają także ani w płynie macicznym, ani w follikularnym; w tym ostatnim również *in vivo* oocyty degenerują, gdy nie dojdzie do owulacji. Możliwe, że działa tu obecność w płynie pęcherzykowym Graafa follikuliny, której dodanie do surowicy myszki zahamowuje też wydzielanie ciałek kierunkowych *in vitro*. O wpływie środowiska pouczyć nas mogą jeszcze badania nad oddziaływaniem niektórych substancji na jajko. Kryształek *NaCl*, dodany do surowicy, stwarzając środowisko hipertoniczne, wywołuje przejściowe deformacje błonki przejrzystej i całego oocytu, który przyjmuje wtedy kształt czarki wskutek plazmolizy. Kwas cholanowy sprowadza także deformację, połączoną z wydzieleniem jakiejś przejrzystej substancji, a kolchicina — degenerację jąder oocytów, na które działa ściśle wybiórczo, a pozostaje bez wpływu na komórki follikularne. Zdegenerowane

jądra oocytów przyjmują formy nieregularnych brył (pyknoza). Ciekawe, że kwas cholanowy choć wywołuje deformację jaja, nie powstrzymuje jednak wydzielania ciałek kierunkowych. (Warto zaznaczyć, że kwas cholanowy strukturalnie jest blisko spokrewniony z hormonami płciowymi). Poza tym dodanie do środowiska oocytów tkanki tarczycy lub przysadki zwiększa ilość wydzielanych pierwszych ciałek kierunkowych, tkanka mięśnia natomiast hamuje to zjawisko. Nie stwierdzono zaś żadnego wpływu na jajka tkanki śledziony, która wg. nowych poglądów ma być magazynem dla wyprodukowanej ponad normę follikuliny. Jeśli chodzi o inne czynniki zewnętrzne, to światło ma wpływać na podziały redukcyjne hamująco.

Zupełny brak rozwoju i szybka degeneracja następuje w płynach sztucznych, jak płyn Ringera lub Tyrode'a. Jeśli jajka posiadają koronę promienistą, to można je dłużej przetrzymywać bez wyraźnych zmian w płynie Ringer-Locke'a o pH 7,2 do 7,4. Gdy dodać do tego płynu $\frac{1}{10}$ część surowicy myszki, mogą nawet wydzielić się nieliczne pierwsze ciała kierunkowych — podobnie w płynie zawierającym pewną ilość gumy arabskiej. Według Moricarda chodzi tu o zwiększenie lepkości środowiska. Znaczenie tego czynnika dla podziałów jaja podnosi także Yamane.

Zapłodnienie.

Zasadniczo drugie ciało kierunkowe wydziela się już wtedy, gdy do jaja wtargnął plemnik. Następuje to in vivo mniej więcej po $1\frac{1}{2}$ do 3 godz. po owulacji a przed uzyskaniem przez jajko osłonki białkowej (Pincus). W kontakt z jajem wchodzi in vivo niewiele plemników. Muszą one sobie przede wszystkim utorować drogę do jaja poprzez otaczającą je galaretowatą masę płynu pęcherzykowego oraz koronę promienistą, przy czym oczyszczają oocyt gruntownie. Proces tego oczyszczania jest w głównej mierze według Yamane wynikiem działania fermentów proteolitycznych, jakie przynoszą z sobą plemniki, w części zaś polega na mechanicznym rozbijaniu uderzeniami witek. Trwa to in vivo 7–8 godz. W razie kopulacji jałowej (z samcem z podwiązanymi przewodami nasiennymi) oczyszczenie oocytów występuje także, ale po znacznie dłuższym okresie czasu (14 godz.). W tym wypadku przy-

pisujemy je mechanicznemu działaniu perystaltyki jajowodu i ruchom rzęsek nabłonka. In vitro proces ten nasutek silnego zagęszczenia plemników dokoła jaja trwa bardzo krótko, bo już po 30—40 min. jajko jest wolne od masy folikularnej a korona promienista znacznie zniszczona. Badania Yamane wykazały, że fermenty proteolityczne łatwo dają się ekstrahować z plemników, a bliższe dane (optimum działania $pH = 7,7$, zdolność adsorbpcji na kaolinie, inaktywacja przez gotowanie) wskazują, że są to prawdopodobnie tryptazy. Ekstrakt nasienny działa o wiele silniej niż zawiesina plemników i oddziałująwuje także na samo jajko, powodując albo jego cytolizę, albo pobudzenie do żywych podziałów jądra i cytoplazmy. Zjawisko rozpuszczania galaretki ściętej masy pęcherzykowej i korony promienistej przez plemniki obserwowano także u kota (Longley 1911) i u białego szczura (Gilchrist i Pincus 1932) a prawdopodobnie występuje także i u innych zwierząt ssących (ryc. 4).

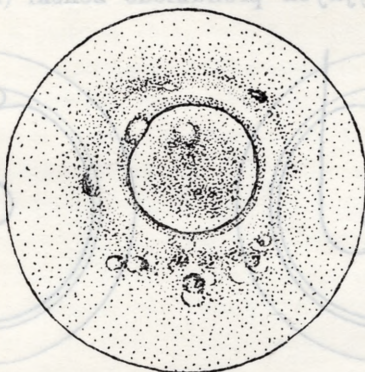
W ścisły kontakt z jajem wchodzi in vivo około 10 plemników, które częściowo otaczają oocyt, częściowo dostają się do błonki przejrzystej i do przestrzeni okołozótkowej (3 lub więcej). O ile wtargną do tak zwanej komory ciałek kierunkowych, mogą naciskać na nie, powodując ich ruchy toczenia się. Z tych plemników tylko jeden dostaje się do wnętrza jaja, prawdopodobnie powstaje wtedy jakaś substancja, która szybko dyfunduje do ooplazmy i błony zótkowej i czyni ją nieprzepuszczalną dla innych plemników.

Natomiast in vitro zapłodnienie bywa bardzo często polispermiczne, a przy tym mogą być zapładniane także ciałka kierunkowe drugie i trzecie. Yamane tłumaczy to wpływem fermentów proteolitycznych plemników, niszczących to uodpornienie plazmatycznej błony jajowej. Pierwsze ciałka kierunkowe nie ulegają zapłodnieniu, jakkolwiek wydzielone przed wtargnięciem plemnika do jaja pozbawione są tego uodpornienia swej błony, a więc powinny ulegać zapłodnieniu tym łatwiej. Przyczyny, jak sądzi Yamane tkwią w innych właściwościach cytoplazmy.

Po wtargnięciu plemnika jajko kurczy się nieco wskutek wydzielania płynu okołozótkowego. Następnie w 45 min. wydziela się drugie ciałko kierunkowe, po czym zaraz stają się

widoczne oba pronukleusy to jest jądra męskie i żeńskie, przygotowujące się do kariogamii.

Badania Terni i Maleci (1937) wykazały, że plemniki mogą atakować także komórki somatyczne. Autorzy ci dodawali plemników koguta do kultury embrionalnej tkanki mięśnia sercowego kurczęcia. Plemniki atakowały komórki i ruchem śrubowym próbowały przedostać się do wewnątrz. Na preparatach utrwalonych i zabarwionych stwierdzano bardzo często obecność plemników w protoplazmie komórki a niejednokrotnie dość ścisły kontakt między obu jądrami. Przy tym główka plemnika po aktywnym wtargnięciu wykazywała często zmiany,



Ryc. 4.

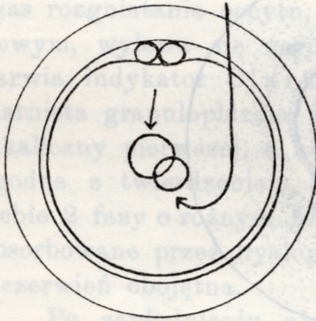
Jajko królika oczyszczone z korony promienistej i galaretowatego płynu pęcherzykowego; w osłonce przejrzystej widoczny plemnik, w samym zaś oocycie pronukleus.

charakterystyczne dla okresu przed kariogamią; w jądrze jednak komórki somatycznej zmian odpowiednich nie dostrzegano. Doświadczenia te dowodzą, że plemniki wykazują jakiś tropizm wobec żywych komórek. W stosunku do komórek martwych zachowują się obojętnie i nie układają się dokoła nich wieńcem. Na jajach zwierząt niższych wykazywano jednak niejednokrotnie, że wydzielają one do swego otoczenia jakieś substancje, oddziaływujące na plemniki, przy czym reakcja tych ostatnich

*

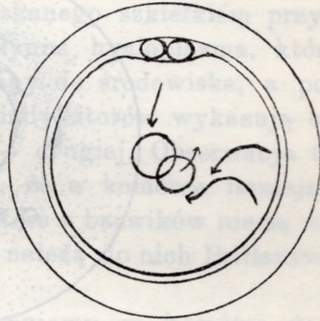
może iść w kierunku aktywacji, agregacji lub aglutynacji (Godlewski, Just i Lillie).

Punkt, w którym spermatozoid przenika przez błonkę przejrzystą i dostaje się do wnętrza ooplazmy, nie jest dostatecznie znany, ponieważ podczas wnikania plemnik jest niewidoczny, a przy tym okres wtargnięcia, obrotu o 180° i przemiany w pronukleus jest bardzo krótki, stąd też liczne błędy w obserwacjach. Plemnik dostrzegamy dopiero później w postaci pronukleusa męskiego. Lams sądzi, że wtargnięcie następuje w pobliżu ciałek kierunkowych na biegunie animalnym. Stąd następnie jądro plemnika ma się przesuwać ku biegunowi wegetatywnemu i skręcać ku środkowi jaja, dokąd podąża także po odbyciu podziałów redukcyjnych pronukleus żeński (ryc. 5). Podobnie



Ryc. 5.

Droga plemnika w jajku
wg. Lamsa.



Ryc. 6.

Droga plemnika w jajku
wg. Krassowskiej.

Yamane sądzi, że plemnik wnika od strony bieguna animalnego, bez witki i szyjki, a czy z centriolami napewno nie wiadomo. Natomiast wg. Krassowskiej (ryc. 6) plemnik dostaje się do jaja raczej zdala od bieguna animalnego, gdyż w tamtej okolicy pojawia się w postaci pronukleusa i zdąża ku środkowi jaja. Z obserwacji Krassowskiej wynika, że miejsce to nie jest ściśle preformowane, tak jak to mamy w jajach wielu innych zwierząt, które mogą nawet posiadać odpowiednie otworki — mikropyle w osłonce. (Mają one ułatwiać wejście plemnikowi i zapobiegać polispermii).

Omawiając sprawę wnikania plemnika do jaja, warto wspomnieć o wybitnym wpływie ektoplazmy na to zjawisko. Okazuje

się bowiem, że jeśli spermatozoid wniknie do ooplazmy z pominięciem warstwy korowej, a więc wprost do endoplazmy, to dalszy rozwój nie nastąpi. Wykazywał to Kite (1919), wstrzykując plemniki do jaj *Nereis* za pomocą mikromanipulatora, oraz Just (1923), który przez przenoszenie jaj z roztworu hipertonicznego do izotonicznego wywoływał na jajach *Echinorachnius* wypuszczanie pączków endoplazmatycznych. Jeśli następnie przy sztucznym zapłodnieniu plemnik wtargnął do takiego pączka, nie sprowadzał w jaju żadnych charakterystycznych zmian, natomiast rozwój następował, o ile plemnik wtargnął przez ektoplazmę. Podobnych badań nie przeprowadzano na ssakach, być może jednak wpływ ektoplazmy jest tu podobny.

Droga, jaką przebywa spermatozoid od chwili wtargnięcia do zetknięcia się z jądrem jaja, nie jest prosta. Podkreśla to Krassowska, zaznaczając natomiast, że wędrówka pronukleusa żeńskiego odbywa się najbliższą drogą ku środkowi. Roux rozróżniał w torze plemnika w jaju dwa odcinki: pierwszy o tym samym kierunku, co droga aktywnego przenikania przez osłonkę jaja, i drugi tzw. odcinek kopulacji, wykazujący skręt ku środkowi. Z badań na preparatach utrwalonych wiemy poza tym, że plemnik, przesuając się, odbywa obrót o 180° , tak, że szyjka z centriolami znajdzie się po stronie dośrodkowej. Poza tym tuż przed kariogamią obserwujemy wtórne obroty pronukleusów: męski ustawia się najpierw pod żeńskim a następnie przesuwa się w położenie obok niego. Istnieje kilka teorii, tłumaczących te ruchy. Część badaczy sądzi, że są one wynikiem wzajemnego przyciągania się obu pronukleusów, lecz w takim razie powinny one zbliżyć się do siebie najkrótszą drogą a więc prosto. Tymczasem wiemy, że tylko pronukleus żeński wędruje w ten sposób. Inni wiążą to z wytwarzaniem się promieniowania kariokinetycznego. W każdym bądź razie muszą to być ruchy wywołane przez prądy w ooplazmie, które powstają wskutek oddziaływania na nią plemnika. Że czynniki, które te prądy wywołują, tkwią w plemniku, zdają się dowodzić tak obrazy zapłodnienia ciałek kierunkowych jak i wspomniane wyżej doświadczenia Terni i Maleci, gdzie spermatozoidy zachowywały się w komórkach somatycznych podobnie jak w jaju, wchodząc nawet w kontakt z ich jądrami.

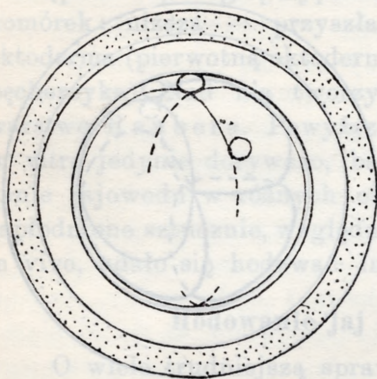
Jak wiemy, plemnik wnosi z sobą do jaja pewne substancje, które, działając cytolitycznie, wywołują wydzielenie płynu okołoołtkowego i podniesienie błony zapłodnienia (u zwierząt niższych) oraz wpływają katalitycznie na procesy oksydacyjne i resyntezę kwasu nukleinowego. Jak wspomniałem wyżej, Yamane twierdzi, że substancjami tymi są w pierwszym rzędzie tryptazy. Rozpuszczają one ooplazmę, dostawszy się do niej wraz z plemnikiem, zmniejszając przez to jej lepkość a podnosząc napięcie powierzchniowe, ułatwiają jajku wykazanie jego aktywności w formie podziałów.

Zaraz po kariogamii obserwujemy duży przyrost objętości jaja, które wypełnia ponownie przestrzeń okołoołtkową a nawet rozciąga błonkę przejrzystą. Ciałka kierunkowe zostają przy tym otoczone przez ooplazmę. Kinematograficznie wykazali Lewis i Gregory (1929) takie pęcznienie i odwadnianie w postaci pulsacji. Pęcznienie towarzyszy mianowicie każdemu podziałowi jądra. Pozostaje to w związku z okresowymi zmianami przepuszczalności błony komórkowej, która w okresie metafazy staje się prawie zupełnie nieprzepuszczalna dla substancji rozpuszczalnych w wodzie, izolując w ten sposób jajko od otoczenia. W tym stanie może ono przetrwać nawet dosyć długie okresy czasu [owulacja w stadium metafazy podziału redukcyjnego (H. Herlant)].

Bruzdkowanie.

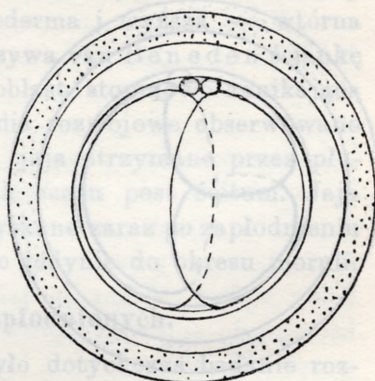
Natychmiast po kariogamii komórka wchodzi w stadium metafazy pierwszego podziału bruzdkowania. Pierwsza bruzda rozpoczyna się wg. Krassowskiej na biegunie animalnym po 16—17 godz. od chwili dodania plemników i stąd posuwa się dość szybko ku biegunowi vegetatywnemu (ryc. 7). Po 30 min. przekracza już równik jaja i wkrótce osiąga przeciwny biegun. In vivo następuje to w 22—22½ godz. po kopulacji, a w 12—12½ godz. po owulacji i zapłodnieniu, a więc nieco prędzej (około 10 godz. potrzeba na wystąpienie owulacji). Opóźnienie pierwszego podziału bruzdkowania in vitro kładzie Krassowskaja na karb pewnych okoliczności, związanych z samą techniką hodowania. Oziebianie np. może mieć tu wpływ znaczny. Dane te dotyczą królika, gdyż przede wszystkim na tych zwierzętach przeprowadzano badania nad zapłodnieniem

i bruzdkowaniem in vitro. Pierwsze 2 blastomery są mniej więcej równej wielkości, jednakże jeden z nich następnie nieco wzrasta (ryc. 8). Przed każdym podziałem blastomery w ogóle powiększają swoją objętość i wydłużają się, podczas gdy młode komórki potomne są bardziej okrągłe. Bruzda zjawia się w nich bardzo szybko (w przeciągu kilku minut). Oba pierwsze blastomery stykają się z sobą płaskimi powierzchniami, większy z nich dzieli się nieco wcześniej, wskutek czego występuje przejściowo stadium 3 blastomerów z jądrami w różnych okresach spoczynku lub podziału (ryc. 9). Dalsze podziały jaja następują teraz szybko po sobie: po 20 godz. znajdujemy już 4 blastomery, po 25 — 8, po 27 — 10, po 29 — 12, a po 46 godz. — morulę złożoną



Ryc. 7.

Pierwsza bruzda.



Ryc. 8.

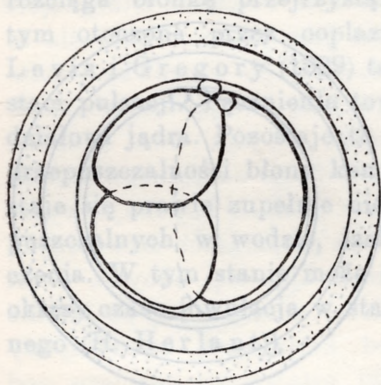
Dwa pierwsze blastomery.

z 28 komórek. Asynchronizm podziałów trwa w dalszym ciągu, dlatego spotykamy przejściowo stadia 5, 6, 7, 9, 10 itd. blastomerów. Wcześniej dzielą się komórki pochodzące od większego jaśniejszego blastomeru. Niektórzy autorzy twierdzą, że z tych komórek powstają organy najwcześniej funkcjonujące: istnieje także hipoteza, że z większego blastomeru wywodzi się cały zarodek z wyjątkiem entodermalnej ściany pęcherzyka żółtkowego.

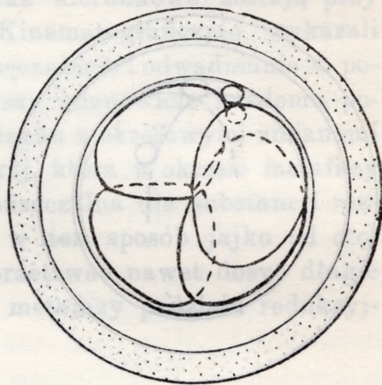
Ułożenie wrzecionek kariokinetycznych w 2 pierwszych blastomerach nie jest równoległe, raczej prostopadłe do siebie, tak że w stadium 4 blastomerów komórki potomne są ułożone na krzyż i 3 komórki leżą w jednej płaszczyźnie a czwarta

w drugiej (ryc. 10). Taka zmiana kierunku polaryzacji blastomerów odbywa się tylko po pierwszym podziale; dlatego zaś ten sposób bruzdkowania występuje u ssaków, nie wiemy. Ponieważ takie przegrupowanie protoplazmy odbywa się tylko w jednym blastomerze, dlatego być może dzieli on się później. Każde następne wrzecionko dalszych podziałów ustawia się prostopadłe do poprzedniego, a więc drugie jest prostopadłe do pierwszego, trzecie do drugiego, czwarte do trzeciego, przy czym czwarte jest równoległe do drugiego (Gregory).

Kształt blastomerów jest mniej więcej sferyczny, może być jednak nieregularny, jeśli jajko uzyskało już w jajowodzie osłonkę białkową. Osłonka ta jest mniej rozciągliwa niż błonka



Ryc. 9.
Trzy blastomery.



Ryc. 10.
Cztery blastomery.

przejrzysta i dlatego bardziej deformuje blastomery. W rozwoju normalnym *in vivo* występuje ona przejściowo i zanika po osiągnięciu przez jajko macicy. Błonka przejrzysta u większości zwierząt zachowuje się długo aż do stadium pęcherzyka zarodkowego. Natomiast u myszy zanika ona już we wczesnych okresach bruzdkowania (Sobotta). Wielkość blastomerów w czasie podziałów stale się zmniejsza i każda komórka potomna jest 2 razy mniejsza od drugiej macierzystej. Dopiero po skończeniu bruzdkowania tj. po osiągnięciu stadium blastuli i wyrównaniu stosunku plazmo-jądrowego komórki zaczynają wzrastać. Ciałka kierunkowe podczas bruzdkowania zmieniają

czasami swoje położenie i wzdłuż bruzd oba lub jedno mogą ulec przesunięciu aż do bieguna wegetatywnego, przy czym powoli degenerują i zanikają (Sobotta, Krassowskaja).

Następne stadia rozwojowe po moruli obserwowano na zarodkach, otrzymanych przez płókanie jajowodu po odpowiednio dłuższym czasie aż do 4 dni post coitum, gdyż po tym okresie (72—96 godz.) jajo płodowe kończy swą wędrówkę przez jajowód i przechodzi do macicy. W dalszym rozwoju z moruli powstaje więc pęcherzyk zarodkowy z czopem komórkowym, zwisającym dowewnątrz (metagastrula van Benedena), a wewnątrz pęcherzyka wypełnia płyn, produkowany przez komórki. Pęcherzyk ten u myszy jest wydłużony wskutek ucisku ścianki jajowodu. Następnie czop ulega przyplaszczeniu. Powstają w nim 2 warstwy komórek: niższa — przyszła entoderma i wyższa — wtórna ektoderma (pierwotną ektoderma nazywa van Beneden ściankę pęcherzyka). Nad nią tworzy trofoblast stopniowo zanikającą warstwę Raubera. Powyższe stadia rozwojowe obserwowano in vitro jedynie dorywczo, badając jaja otrzymane przez płókanie jajowodu w różnych okresach czasu post coitum. Jaja zapłodnione sztucznie, względnie uzyskane zaraz po zapłodnieniu in vivo, udało się hodować in vitro jedynie do okresu moruli.

Hodowanie jaj niezapłodnionych.

O wiele trudniejszą sprawą było dotychczas badanie rozwoju dzieworodnego. In vivo niezapłodnione jajko ssaka nie bruzdkuje zupełnie, lecz po pewnym czasie ulega degeneracji, rozpadając się na fragmenty (Sobotta, Yamane). W doświadczeniach nad partenogenezą sztuczną chodzi o poznanie czynnika, mogącego pobudzić jajko do rozwoju — czynnika, który mógłby zastąpić i ewentualnie wyjaśnić działanie plemnika. Jak wiadomo, kwestia ta znalazła już pewne oświetlenie w badaniach nad partenogenezą u zwierząt niższych (Bataillon, Loeb, Delage, Herlant i inni). W odniesieniu do jaj ssaków sprawa ta jest nieco bardziej skomplikowana wobec dużej wrażliwości tych jaj na zmiany środowiska, czego wyrazem jest łatwość ich degenerowania.

Bruzdkowanie partenogenetyczne opisywał Pincus na jajach królika, otrzymanych metodą przepłókiwania jajowodu. Są one, jak twierdzi Pincus, bardzo skłonne do rozwoju

dzieworodnego, bruzdkują przy tym nadzwyczaj szybko, osiągając po 37 godz. post coitum stadium 36 komórek. W jego doświadczeniach rozwój nastąpił w 64% jaj niezaplodnionych. Czynnikiem pobudzającym do rozwoju mogą być nagła zmiana temperatury, zmniejszenie prężności CO_2 , zwiększenie zaś O_2 , wreszcie wzrastająca hipertonia środowiska. Byłaby tu więc duża analogia do partenogenezy u zwierząt niższych. Nie zawsze jednak rozwój tych jaj następował normalnie, bardzo często występowało bruzdkowanie nieregularne, a raczej rozpad, będący jednym z objawów degeneracji. Możliwe, że we wszystkich tych wypadkach sztucznej partenogenezy chodzi raczej o podziały, które są wynikiem ujawniania się podczas degeneracji sił wywołujących mitozy (Moricard).

Nieco światła rzucają na sprawę partenogenezy badania Moricarda, który poddawał jajka wpływowi czynników hormonalnych. Jak wynika z jego eksperymentów, można pobudzić jajka do rozwoju dzieworodnego przez dodanie do środowiska kawałka tkanki tarczycy, co wywołuje bruzdkowanie do 2 blastomerów lub tkanki przysadki, sprowadzającej rozwój do 4 blastomerów. Chodzi tu prawdopodobnie o wzmożenie metabolizmu komórkowego przez hormony wydzielane przez te gruczoły. Wybitny wpływ wykazuje także ekstrakt embrionalny, dodanie którego do surowicy sprowadza bruzdkowanie aż do 16 blastomerów. W jakim jednak kierunku idzie wpływ tego ostatniego, nie wiemy.

Podobny efekt wywołuje także ekstrakt nasienny. W tym ostatnim Yamane przypisuje główną rolę enzymom proteolitycznym, które wywołują częściową cytolizę jaja a przez to pobudzają je do bardzo żywych podziałów. Mają one być dla jaja czynnikami zupełnie naturalnymi, gdyż i po zapłodnieniu podziały mogą nastąpić tylko dzięki częściowej cytolizie. Zresztą stan całkowitej cytolizy graniczy blisko z pobudzeniem do częściowych podziałów, jak na to wskazują nie tylko eksperymenty na jajach szkarłupni, ale i doświadczenia Yamane na jajach ssaków, gdzie podobne dawki ekstraktu nasiennego mogą wywoływać efekt i jeden i drugi.

Czasami zdarza się także obserwować bruzdkowanie partenogenetyczne jaj, które nie uległy owulacji i pozostały w pęcherzykach Graafa (Zakolska 1929, Mathis 1935).

Degeneracja.

Po krótkim lub dłuższym rozwoju in vitro jajko ulega degeneracji. Polega ona wg. Moricarda na dosyć różnorodnych zmianach, stwierdzonych na obiektach żywych. Przede wszystkim w biegu tego procesu obserwujemy grupowanie się ziarnistości dokoła jądra (takie oocyty nie wydzielają już ciałek kier.). Następnie daje się zauważyć odstawanie błonki przejrzystej, w której pojawiają się drobne wakuolki z cząsteczkami, wykazującymi żywy ruch Browna. Do dalszych zmian należy nieregularne kurczenie się cytoplazmy, zjawianie się drobnych pęcherzyków, deformujących powierzchnię oocytu, i wreszcie występuje plazmoliza oraz rozpad degeneracyjny na fragmenty w kształcie nieregularnych brył, jakich nie obserwuje się w ewolucji normalnej (podziały). Zdaje się, że zjawisku temu towarzyszy amitotyczny podział jądra. Jąderka pozostają przeważnie widoczne podczas rozpadu w przeciwieństwie do podziałów mitotycznych, gdzie ich zniknięcie jest pierwszym sygnałem rozpoczynającej się kariokinezy. Obraz ten jest bardzo podobny do degeneracji komórek w kulturze tkanek (Zweibaum). Ogólnie biorąc składa się nań tworzenie ziarnistości, wakuolizacja, będąca prawdopodobnie wynikiem autolizy protoplazmy, powstawanie olbrzymiej centrosfery wskutek promienistego układania się mitochondriów oraz pyknoza jądra (te ostatnie zjawiska obserwujemy na preparatach utrwalonych). Śmierć komórki objawia się zmętnieniem jądra i zjawieniem się w nim ziarnistości oraz dyfuzyjnym barwieniem się protoplazmy; ostatecznie komórka rozpada się na ziarna i fragmenty. Dyfuzyjne barwienie się komórki jest zwykle dowodem jej śmierci, rozpoczyna się zaś ono z chwilą rozerwania związku między białkami i lipidami, w których to połączeniach Lepeschkin upatruje najważniejszy składnik żyjącej materii. Takie połączenia nie przyjmują barwików, absorbują je zaś i białka, i lipidy dopiero po rozłączeniu. Pod koniec degeneracji występują w jajku obrazy podziałów, przebiegających jednak w znacznie zmienionej formie amitozy. Jakie są przyczyny degeneracji, nie wiemy. Poza oczywiście winą składu chemicznego środowiska, dzięki któremu komórki wyrodniają bardzo szybko, mogą tu działać także czynniki, zmieniające koncentrację jonów wodorowych, nagromadzenie się produktów przemiany materii itd.

Barwienie przyżyciowe.

Sprawą barwienia przyżyciowego jaj ssaków zajmowali się Moricard i de Fonbrune i stwierdzili, że przy użyciu czerwieni obojętnej barwik ten rozprasza się po całej cytoplazmie, sprawiając wrażenie barwienia dyfuzyjnego, jakkolwiek obok leżące komórki follikularne absorbują czerwień obojętną na wakuomie. Takie zachowanie się tego barwika w oocyście może być spowodowane rozproszeniem się wakuomu w cytoplazmie przed procesem dojrzewania. Podobnie błękit metylenowy zabarwia cały oocyt równomiernie, nie jest on jednak obojętny dla komórki i barwienie to uważać należy raczej za przedśmiertne.

W innym kierunku poszły badania Arnolda. Starał się on zbadać zachowanie się koloidów jajka podczas rozwoju. Badania takie przeprowadzali Chambers i Spek na komórkach jajowych zwierząt niższych. W szeregu prac wykazał Spek, że pH w protoplazmie żyjącej komórki nie jest wyrównane między poszczególnymi jej składnikami. Chodzi tu mianowicie o różnice między ośrodkiem dyspersyjnym a fazą rozproszoną, a więc koloidami protoplazmy. O ile w tym pierwszym pH jest jednolite, to wśród koloidów znajdujemy znaczne różnice. Przede wszystkim rzuca się odrazu w oczy inne zakwaszenie części płynnej — hyaloplazmy i ziarnistej granuloplazmy. Jest to możliwe dzięki istnieniu koloidów ochronnych i hydratacji cząsteczek plazmy. Na skutek tych różnic wskaźnik zaabsorbowany na cząsteczkach koloidów wykazuje różne odcienie barw. Normalnie dyspersja jest znaczna i barwy zlewają się w jeden ton, można jednak rozdzielić koloidy o różnych pH przez wciąganie np. plazmy do rurki włoskowatej, gdzie koloidy o różnym ładunku wędrują dzięki włoskowatości na różną wysokość. Podobny objaw wystąpi również przy wypływananiu protoplazmy ze zranionej komórki, kiedy najpierw wypływa bardziej zasadowa hyaloplazma, a następnie kwaśniejsza granuloplazma.

Rozdział koloidów, połączony z ich przegrupowaniem, może wystąpić w żyjącej komórce samoistnie. Występuje to mianowicie w bruzdkujących jajach *Nereis*. Już po wydzieleniu ciałek kierunkowych rozpoczyna się w zapłodnionych jajach przesuwanie się koloidów alkalicznych ku biegunowi

animalnemu a kwaśnych ku wegetatywnemu. Wykazuje to przez zmianę barwy naturalny indykator zawarty w jajach. Ten proces trwa przez okres bruzdkowania i w rezultacie z komórek alkalicznych powstaje ektoderma a z kwaśnych entoderma. Całość procesu sprawia wrażenie, jakby cząsteczki koloidów zmieniały swe położenie drogą kataforezy w polu elektrycznym. Zdaniem Speka zjawisko to można wytłumaczyć tylko istnieniem takiego pola, tym bardziej że można je wywołać i w jajach niezapłodnionych przez dodanie do środowiska elektrolitów np. KCl lub $NaCl$. Spek sądzi, że pole elektryczne w komórce może być wynikiem zmian w przepuszczalności błony jajowej, zdaniem zaś Konopackiej jest on raczej wynikiem metabolizmu komórkowego, na który wpływają zmiany w stężeniach H i OH .

Jak wykazały dotychczasowe badania, proces dwubiegowego zróżnicowania odbywa się w większości jaj zwierząt o rozwoju mozaikowym. Stwierdzono go więc u ryb kostnoszkieletowych, u żaby, głowonogów, mięczaków i innych. Okazuje się jednak, że zjawisko to występuje także w jajach o typie rozwojowym regulacyjnym, lecz odbywa się tam o wiele później, u rozgwiazdy *Asterias* np. dopiero w stadium 64 blastomerów. Podobnie więc powinny zachowywać się jaja ssaków, o których przypuszczamy, że są jajami regulacyjnymi. Odpowiedź na to dają nam właśnie badania Arnolda (1937).

Przeprowadzał on mianowicie barwienie przyżyciowe jaj myszy i królika za pomocą indykatorów, używanych do tego samego celu poprzednio przez Speka. Były to Brillantkresylviolett (w skrócie BCV), Kresylechtviolett (CEV), Brillantvitalrot (BVR), czerwień obojętna (NR), oraz Prune pure (Pp). Ten ostatni, stosowany dotąd tylko przez botaników, okazał się do tego celu bardzo przydatny, dając piękne różowe zabarwienie koloidów kwaśnych, a niebieskie — zasadowych. Indykatory te nie pozwalają nam ściśle określać pH , zachowanie się ich bowiem jest różne w różnych środowiskach; w zwykłych roztworach bardzo często wypadają w kłaczkach, podobnie w płynach fizjologicznych lub surowicy. Możliwe także, że zmiana barwy zależy w znacznym stopniu od stanu dyspersji, co Spek próbuje tłumaczyć fenomenami optycznymi, przy czym stopień dyspersji zmienia się odpowiednio do pH . Na szczególne pod-

kreślenie zasługuje tu jedno zjawisko, mianowicie zupełny brak jakiegokolwiek wypadania barwików w protoplazmie komórki, widocznie cząsteczki barwika są tutaj w idealny sposób chronione przed wypadaniem.

Barwienie przyżyciowe przeprowadzał Arnold w płynie Ringera lub surowicy, stanowiącej środowisko oocytów, z dodatkiem 1—2 kropli $\frac{1}{2}$ procentowego barwika w temp. 37°C przez 1—2 godz. W temperaturze pokojowej barwa jaja zachowuje się przez około 10 godz., w lodowni zaś o wiele dłużej. Barwienie indykatorami Clark'a nie udaje się zupełnie wobec nieprzepuszczalności błony komórkowej dla tych barwików. Natomiast mają one zastosowanie w badaniach *pH* komórki drogą nastrzykiwania.

Badając jajka niezapłodnione, stwierdził Arnold, że podczas rozgniataania oocytu, przyciskanego szkiełkiem przykrywkowym, wylewa się najpierw płynna hyaloplazma, którą zabarwia indykator Clark'a dodany do środowiska, a po tym ziarnista granuloplazma. Barwy indykatorów wykazują odczyn alkaliczny pierwszej, a kwaśny — drugiej. Obserwacja ta jest zgodna z twierdzeniem Speka, że w komórce istnieją obok siebie 2 fazy o różnym *pH*. Niektóre z barwików nie są w ogóle absorbowane przez hyaloplazmę, należą do nich Brillantvitalrot i czerwień obojętna.

Po zapłodnieniu nie obserwujemy w komórce żadnych istotnych zmian, jakkolwiek w tym stadium w jajach mozaikowych rozpoczyna się dwubiegunowe przegrupowanie koloidów ooplazmy. Także dodanie jakiegoś elektrolitu np. *KCl* do środowiska nie sprowadza tego zjawiska. Podczas bruzdkowania znajdujemy niewielkie różnice w zawartości większych ziarnistości w obu pierwszych blastomerach. Po dalszych podziałach różnice te zostają zachowane, choć komórki takie są dość beładnie pomieszane. Barwieniem przyżyciowym jednak nie można wykazać żadnych istotnych różnic i zmian, które mogłyby świadczyć o rozpoczynającym się procesie przemieszczania koloidów. Jedynie w stosunku do oocytu niezapłodnionego znajdujemy w komórkach nieco więcej substancyj kwaśnych.

Przemieszczenie koloidów rozpoczyna się dopiero w zarodkach 4-dniowych. Już od okresu pęcherzyka zarodkowego (*metagastrula* van Benedena) poczynając, obserwujemy

rosnące różnice w zabarwieniu jaja: czop komórkowy zaczyna barwić się inaczej niż ścianka pęcherzyka (pierwotna ektoderma). Między obu skrajnymi okolicami występuje stopniowanie barw, tak że każda komórka, leżąca bliżej bieguna animalnego, wykazuje odczyn bardziej alkaliczny niż komórka leżąca tuż pod nią. Stopniowanie barw znajdujemy więc w każdej części zarodka: i w ścianie pęcherzyka, i w czopie. W tym ostatnim warstwa wyższa komórek jest bardziej alkaliczna niż warstwa leżąca niżej (dalej od bieguna animalnego). Bezpośrednio stwierdzić można te różnice po rozerwaniu pęcherzyka i wyciowaniu go czopem nazewnątrż, względnie przez izolację dolnej warstwy komórek, tj. przyszłej entodermy. Mesoderma wykazuje taką samą zawartość koloidów alkalicznych, jak i ektoderma, zgodnie ze swym od niej pochodzeniem.

Wyniki tych eksperymentów świadczą o istnieniu w jajach ssaków takiej samej dynamiki rozwojowej, jaką obserwujemy w jajach zwierząt niższych. Potwierdzają też one nasze poglądy, wg. których jaja ssaków są jajami regulacyjnymi, czego wyrazem jest tak późno występujące przegrupowanie koloidów.

Mechanizm tych przesunięć nie jest znany, możliwe że polega na dyfuzyjnym przewędrowaniu koloidów poprzez błony komórkowe, na co wskazywałoby zachowanie gradientu barw indykatorów. Działoby to się pod wpływem pola elektrycznego, którego wpływ na przepuszczalność błon komórkowych jest znany. Jednakże w jajach mozaikowych przemieszczenie koloidów następuje w każdym blastomerze samoistnie, tak że np. u *Nereis* biegun wegetatywny mezomeru jest bardziej kwaśny niż biegun animalny leżącego tuż pod nim makromeru. Fakt ten możnaby wytłumaczyć brakiem przepuszczalności błon komórkowych blastomerów dla barwików i koloidów i wzajemnym odizolowaniem się komórek, po podziale. Możliwe jest jednak, że siła biegunowa działa oddzielnie na każdą komórkę a nie bezpośrednio na całość, a wtedy bipolarne zróżnicowanie całego zarodka należałoby przypisać powstawaniu pod działaniem tej siły biegunowej nowych substancyj alkalicznych i kwaśnych, w różnej ilości, w różnych komórkach. Za pomocą indykatorów Clark'a określił także Arnold pH płynu, wypełniającego jamę pęcherzyka zarodka. I tutaj, jak stwierdził, występują nieliczne substancje koloidalne kwaśne, bo o pH nieco wyż-

szym od 5, podczas gdy faza rozpraszająca wykazuje reakcję alkaliczną o pH około 8,5. Zdaniem Arnoldda jest rzeczą zupełnie możliwą, że czynniki zewnętrzne mają także wpływ na zawartość, ilość i zróżnicowanie płynu pęcherzyka. Stwierdzenie tego jest jednak trudne wobec dużej wrażliwości zarodków na zmianę środowiska.

Transplantacja jaj.

Wielu badaczy hodujących jaja *in vitro* próbowało umożliwić im dalszy rozwój. Najlepsze warunki znajduje jajko w macicy, gdzie po nidacji w błonie śluzowej wytwarza sobie łożysko, przez które czerpać może z ustroju matczynej substancje, potrzebne do odżywiania i oddychania. Tych warunków nie zastąpią żadne płynne środowiska sztuczne, czy naturalne, ani żadne ich kombinacje. Takie same próby z przeszczepianiem prowadzono także w celu porównania przygotowania błony macicy do przyjęcia jaja po owulacji z zapłodnieniem lub bez zapłodnienia.

W. Zaleski (1931) przeszczepiał więc jajka 4- 5- 6- 7-dniowe do odcinków rogów macicy króliczki, transplantowanych pod skórę ucha lub gruczołu mlecznego, jak i do pozostałych kikutów macicy. Nie otrzymał jednak pozytywnych wyników, jak sądzi, wskutek oddziaływania na jaja gromadzącej się wydzieliny śluzowej oraz zrostów. Dopiero po zastosowaniu specjalnych środków ostrożności oraz karmienia samic pożywieniem, zawierającym *E* i *B*, udało mu się w dwu wypadkach doprowadzić ciążę do końca (1936). Wykonanie zabiegu operacyjnego przedstawiało się w ten sposób, że jaja zbierano z rozciętej macicy szklaną łyżeczką i od razu przenoszono do rozciętych i przygotowanych do zeszycia rogów macicy innej króliczki. Była ona przygotowana do ciąży przez pokrycie samcem z podwiązanymi przewodami nasiennymi. Zabieg więc polegał na oszukaniu organizmu, który zamiast własnych otrzymywał jajka cudze. Większość prób nieudanych przypisuje Zaleski uszkodzeniom mechanicznym przy pobieraniu jaj łyżeczką, jako też wypływanu jaj z kurczącej się macicy. Być może ważną też tu rolę odgrywa niezgodność grup krwi samicy „jajodawczyni“ i „jajoodbiornicy“, co jest wg. opinii Hirszfelda zupełnie możliwe.

Podobne eksperymenty przeprowadzała też Krassowska (1936). W pierwszej serii prób transplantała ona jaja zapłodnione in vitro w stadium 2 blastomerów, przenosząc je do jajowodu króliczki, pokrytej przez samca normalnego. Z 7 eksperymentów tylko w jednym wypadku otrzymano wśród młodych jedno pochodzące z wszczepionego jaja innej rasy. Nie można tu wykluczyć jednak ewentualnych pomyłek lub niedopatrzeń. O wiele lepiej udały się próby z transplantacją jaj nieco starszych — w stadium moruli, pobieranych z samic zapłodnionych po 48–62 godz. Z 5 eksperymentów 4 dały pozytywne wyniki, jeden nieudany przypisuje Krassowska zbyt długiemu przebywaniu jaja w płynie Ringera, co spowodowało jego degenerację.

Pomyślnie próby transplantacji przeprowadzali także na świnkach morskich Pincus i Enzmann.

Nikom jednak jak dotychczas nie udało się umożliwić rozwoju do końca jajom transplantomowanym po przeprowadzeniu sztucznego zapłodnienia in vitro. Zasadniczo nic nie stoi temu na przeszkodzie, jaja transplantomowane bowiem, jak wykazały przytoczone wyżej pomyślnie próby, rozwijają się zupełnie normalnie. Spostrzeżenie Krassowskiej, że młode powstałe z jaj transplantomowanych, były większe i owłosione, a ciąża nieco dłuższa, nie znajduje potwierdzenia u Zaleskiego.

Czym należy tłumaczyć negatywne wyniki przeszczepiania jaj hodowanych in vitro? Możliwe, że jaja już w czasie przeszczepiania znajdują się na drodze do degeneracji, dotyczy to specjalnie tych, które in vitro osiągnęły już stadium późniejsze. Procesy te zaczynać się mogą prawdopodobnie bardzo wcześnie, a gdy jajko wstąpi na tę drogę, zawrócić już nie może.

Znalezienie metody, któraby pozwoliła hodować jaja in vitro, a następnie przeszczepiać w warunki naturalne do dróg rodnych żeńskich, mogłoby dać bardzo szerokie możliwości dla badań przede wszystkim nad mechaniką rozwojową u ssaków, o której dotychczas niewiele wiemy.

Zakończenie.

Z badań przedstawionych powyżej wynika, że procesy zapłodnienia jak i cała dynamika rozwojowa u ssaków nie odbiega daleko od tych samych procesów u innych zwierząt. Różnice

jakie występują są spowodowane przystosowaniem do rozwoju w ustroju samicy. Metody, jakie opracowano dla hodowania jaj, pozwolą prawdopodobnie na jeszcze głębsze wniknięcie w te zjawiska. Dzisiaj poznaliśmy już do pewnego stopnia mechanizm wydzielania ciałek kierunkowych, w czym ważną rolę odgrywają tak procesy chemiczne (działanie hormonu gonadotropowego na oocyty) jak i fizyczne (zwiększenie lepkości a obniżenie napięcia powierzchniowego protoplazmy jaj). W zapłodnieniu zdają się pewną rolę odgrywać fermenty proteolityczne, wnoszone przez plemnik do ooplazmy; działanie na komórki otaczające jajko byłoby tutaj raczej reakcją uboczną. Polispermia *in vitro* jest tylko dowodem znacznie zmienionych warunków zapłodnienia, a mianowicie wynika ze zbyt silnego zagęszczenia plemników dokoła jaja. Wreszcie dwubiegunowe przemieszczenie koloidów, zdaje się ściśle związane ze zdeterminowaniem potencji twórczej jaja jest dowodem powstania w nim jakichś sił biegunowych, pod których wpływem zaczyna się organizacja zarodka. Różnice między jajami mozaikowymi a regulacyjnymi zdają się być tylko ilościowe.

Im więcej poznajemy zjawisk związanych z rozrodem, tym szersze otwierają się horyzonty, tym więcej zjawia się problemów, że tylko wymienię takie kwestie, jak izolacja substancji czynnych w procesach dojrzewania i zapłodnienia, poznanie mechaniki rozwojowej ssaków, istota zmiany polaryzacji w jednym z dwu pierwszych blastomerów, wyjaśnienie mechanizmu dwubiegunowego przemieszczenia koloidów itd. Wiele tu może dać badanie jaj wolnych *in vitro*.

L I T E R A T U R A.

1. Arnold Ernst. Vitalfärbungen an Säugertiereier. Protoplasma 29, 1937.
2. Fischer. Gewebezüchtung.
3. Just i Lillie. Fertilization. General Cytology.
4. Konopacka B. Z badań nad dynamiką komórki jajowej i jej determinacją. Wszechświat. 1938, zes. 2.
5. Krassowskaja. Fertilization of the egg of the rabbit *in vitro*. Arch. Russ. d'Anat. d'Hist. d'Embr. 1934.
6. — Transplantierung des Kanincheneies in den Uterus eines anderen Tieres. Arch. Russ. d'Anat. d'Hist. d'Embr. 1936.

7. Levis and Gregory. Cinematographs of living developings. *Science* V. LXIX, No. 1782, 1929.
 8. Martinovich N. Development in vitro of the mammalia gonad. *Nature*, v. 139, 413, 1937.
 9. Moricard R. Effets mitotiques germinaux et somatiques provoques par l'injection des mitosine. *C. R. Assoc. des Anat.* 245, 1936.
 10. Moricard R. et de Fonbrune. Nouvelles etudes experimentales sur les mecanismes de la formation du premier globule polaire in vitro chez les Mammiferes. *Arch. d'Anat. Micr.* 33, 113, 1937.
 11. Pincus. Observations on the living eggs of the rabbit. *Proc. Roy. Sc. B.* 107, 1930.
 12. Pincus and Enzmann. Fertilization in the rabbit. *J. exp. Biol.* 1932.
 13. Spek J. Zustandsänderungen der Plasmakolloiden bei Befruchtung u. Furchung des Nereiseies. *Protoplasma* 9, 1930.
 14. — Die bipolare Differenzierung des Teleostereies u. ihre Entstehung. *Protoplasma* 18, 1933.
 15. Spek J. u. Chambers. Neue experimentelle Studien über das Problem der Reaktion des Protoplasmas. *Protoplasma* 20, 1934.
 16. Sobotta J. Die Befruchtung u. Furchung des Eies der Maus. *Arch. f. Mikr. Anat.* 45, 1895.
 17. Wertheimer E. Die physiologische Bedeutung der Zellstrukturen im besondern der Struktur der Zellgrenzschicht. *Protoplasma*, 20, 1934.
 18. Yamane K. Kausalanalytische Studien über die Befruchtung des Kanincheneies, I, II, III. *Cytologia*, 1935, 1938.
 19. Zaleski W. Próby wszczepiania zapłodnionego jaja u króliczek. *Polska Gaz. Lek.* Nr 49, 1931.
 20. — O wynikach wszczepiania zapłodnionych jaj u króliczek. *Ginekol. Polska*, XV, 1936.
-

Do p. z. Członków Towarzystwa!

***Prezydium Towarzystwa uprasza o regularne
wplacanie wkładek, stanowią one bowiem
podstawę jego działalności.***

***Administracja czasopism prosi o niezwłoczne
powiadomianie o każdej zmianie adresu.***

**KONTO TOWARZYSTWA W P. K. O.
ZOSTAŁO ZMIENIONE NA
511.230**

KOSMOS

CHASOPISMO POLSKIEGO
TOWARZYSTWA PRZYRODNIKÓW
IM. KOPERNIKA

WYCHODZI W DWU SERIACH PO 4 ZESZYTY ROCZNIE
WE LWOWIE

SERIA A. ROZPRAWY:

Redaktor **Stanisław Kulczyński**, ul. św. Mikołaja 4.

SERIA B. PRZEGLĄD ZAGADNIEŃ NAUKOWYCH:

Redaktor **Dezydery Szymkiewicz**, ul. Nabelaka 22.

Administracja Serii A. Lwów, ul. Kochanowskiego 67. Prof. Dr A. Bant.

„ B. „ ul. Nabelaka 22.

Członkowie Towarzystwa otrzymują „Kosmos“ bezpłatnie.

Prenumerata: Seria A. — 10 zł, Seria B. — 6 zł.

Skład główny: Księgarnia „Książka“. Lwów, ul. Czarnieckiego 12.

WSZECHŚWIAT

ORGAN POLSKIEGO TOWARZYSTWA
PRZYRODNIKÓW IMIENIA KOPERNIKA

wychodzi w 6 zeszytach rocznie

pod redakcją

JANA DEMBOWSKIEGO

Adres redakcji i administracji:

WILNO, ul. Zakretowa 1. 23. — P. K. O. 21.650.

Prenumerata roczna 12 zł., — półroczna 6 zł.

Członkowie Towarzystwa otrzymują „Wszechświat“ bezpłatnie.