

P.99
N° 7—10 B II JUILLET—DÉCEMBRE

1939

BULLETIN INTERNATIONAL
DE L'ACADÉMIE POLONAISE
DES SCIENCES ET DES LETTRES

CLASSE DES SCIENCES MATHÉMATIQUES ET NATURELLES

SÉRIE B: SCIENCES NATURELLES (II)

(SUBVENTIONNÉ PAR LE MINISTÈRE DE L'INSTRUCTION PUBLIQUE)

CRACOVIE
IMPRIMERIE DE L'UNIVERSITÉ
1946



rcin.org.pl

Publié par l'Académie Polonaise des Sciences et des Lettres, sous la direction
de M. **S. Maziarski**, Secrétaire de la Classe des Sciences Mathématiques et
Naturelles (Cracovie, Institut d'Histologie de l'Université, Kopernika 7)

Nakładem Polskiej Akademii Umiejętności.
Drukarnia Uniwersytetu Jagiellońskiego pod zarządem K. Kiecia
M—05697

Wrażliwość cieplna tkanek embriona kurzego in vitro.
*Heat Resistance of Chicken Embryo Tissues in vitro*¹⁾

Mémoire

de M. H. SZARSKI,

présenté le 26 Juin 1939 par M. H. Hoyer m. t.

Introduction

Several investigators have been interested in the problem of the resistance of animal cells to heat. The majority of them experimented on tissue cultures, because the flow of blood *in vivo* sets the temperature of the tissues considerably lower than the temperature of the experimental medium. Lambert and Hanes (1912, 1913) investigated the resistance of tissue cultures to heat and stated that rat tissues die after a stay of 50 minutes in 44°C, while chicken tissues die after being exposed, for a similar period of time, to a temperature 3—4°C higher. Friedgood (1928) emphasized the necessity of the use of a water-bath, instead of an air incubator, and observed the death of rat cells after a stay of 30 minutes in 44°C. Kokott (1931) observed that a temperature of 45°C, applied for 30 minutes, kills rabbit tissues. Kemp and Juul (1931) tested chicken tissues and found that death follows after a stay of 20 minutes in 50°C, and that a temperature of 48°C applied for a short period of time only induces temporary injury. According to the experiments of Pincus and Fischer (1931), a strain of chick osteoblasts dies after being 90 minutes in 47°C, and finally M. R. Lewis (1933)

¹⁾ The present work was performed thanks to the pecuniary aid of the Polish National Culture Fund (Fundusz Kultury Narodowej Józefa Piłsudskiego).

stated that a temperature of 53°C kills the chick cells after 1 minute of action.

In spite of the numerous publications on the injury caused by heat, only a few authors have given the comparative values of the heat resistance of various tissues. Lambert (1912) showed that the heat resistance of malignant cells is lower than the resistance of healthy ones. This, however, was later contradicted by Friedgood (1928). Westermarck (1927) stated that rat skin treated, *in vivo*, by heat is more resistant than the cells of sarcoma, and Ono (1928)¹⁾ observed the various degrees of heat resistance in different types of the white blood cells of rabbits. I therefore performed experiments which would give the comparative values of the heat resistance of various chicken tissues.

Material and methods

Tissues from the following organs were used in the experiments: heart, spleen, intestine, skin and amnion. All were taken from the chicken egg on the 11-th day of incubation. The cultures were mounted in the usual manner, in hanging drops, on mica coverslips sealed to the depression slides with a thick layer of a mixture (1:10) of vaseline and hard paraffin (melting point 72°C). The mediums for the cultures were always formed by a mixture of identical drops, one of chicken plasma and the other of chick embryonic extract. The extract was prepared in the following manner: After reducing the embryo to a pulp, 3 ccm of Tyrode's solution was added and the whole was centrifuged, then the fluid was discarded and the pulp was again mixed with 6 ccm of Tyrode's solution. After standing for ten minutes, the contents of the tube were again centrifuged and the supernatant fluid was stored for use without further dilution.

After preparation of the cultures, they were transferred for 24 hours to an incubator at 34°C. Later, after 10 minutes in the room temperature used for the examination of the cultures, they were put into a water-bath and heated to 48°C. This temperature was chosen, after several trials, because it gives clear differences in the heat resistance of various types of cells, without prolonging the experiment too much.

¹⁾ Quoted after Bělehrádek (1935).

The temperature of the water in the water-bath was maintained at the desired level by the aid of an automatically regulated electrical installation. The oscillations of temperature did not exceed 47·8—48·2°C. Their duration was about one minute. The use of a water-bath allows an almost instantaneous heating of the tissue fragments together with the medium, to the desired temperature. As was stated by Friedgood, the temperature of a culture heated in an air incubator rises very slowly and this may be the source of the great discrepancies in the estimation of results.

Usually 30 cultures were prepared at a time. They were put together in a water-bath and afterwards taken out separately every few minutes. After the termination of experiment the whole series was put into the incubator and, without transferring them to a new medium, observed on the following days. Pincus and Fischer stated that the morphological alterations caused by heat, in the majority of tissues appear most distinctly 24 hours after the completion of the experiment. For this reason it was decided to note the degree of injury from the appearance of the culture after a stay of 24 hours in the incubator.

Experiments and results

As Kokott stated, the most striking feature of a culture affected by heat, is the rounding of the cells connected with a shortening of the pseudopodia. In the overheated cultures of the heart, which were only slightly affected, not only rounded cells, but also those of a normal appearance are present. In the more affected cultures all the cells lying in the periphery of the culture are rounded. In the majority of cases a cell once rounded does not show signs of life, and if in a culture that is seriously affected, normal cells do appear after some days, they grow from the centre of the original fragment.

Thus we can describe three degrees of heat injury: 1. In the cultures, in which not only normal cells, but also rounded cells are present. 2. In the cultures, in which all the cells on the outside of the original fragment are rounded, but the culture is still able to regenerate. 3. In the cultures, in which all the cells are dead, and even after a prolonged stay in the incubator, living elements do not appear.

We must emphasize the fact that even in a third degree injury we cannot be sure that some of the cells are not still alive in the middle of the fragment. In another environment, for instance in Carrel flasks, they might multiply. As Stein (1938) proved, the cultures damaged by cytotoxins of immune sera and apparently killed, regain the property of proliferation after transfer to a new medium. Morimoto¹⁾ stated that a culture of Honda rat sarcoma, heated for 30 minutes to 50°C, never regenerates *in vitro*, but when implanted in a new host can multiply again. We must emphasize that in a third degree injury death is observed only under given experimental conditions, and therefore its presence has only a comparative value.

Of the three degrees of injury described above, it is only possible to observe exactly the presence of the first and third. The estimation of second degree injury is very difficult, as in slightly affected cultures, 24 hours after the experiment, parallel to the rounding of destroyed cells, new cells grow out from the centre of the culture, and it is not easy to decide whether the eventual living cells that are present have migrated before or after the experiment.

If, 24 hours after the experiment we look through a series of cultures taken from the same specimen, mounted at the same time, with the same mediums, and overheated simultaneously in the same water-bath, during varying periods of time, we are struck at once by the continuous increase in the degree of injury, proportional to the time of exposure to high temperature. Rare exceptions are those cultures which look worse than the others though belonging to the same experimental series, in spite of a shorter duration of overheating. In contrast to this fact, the migration of cells from the centre of seriously injured cultures, which takes place on the following days is very irregular. It happens that in some cultures heated for a shorter period of time no regeneration takes place, while in the same series, two or three cultures which were heated considerably longer, showed that living cells appear after some days. This indicates a great difference in the heat resistance of separate cultures. The same thing is to be seen in the comparison of the results on Table I.

¹⁾ Quoted after Ludford (1939).

Small, imperceptible variations of experimental conditions, or individual characteristics, may cause large deviations in the results of overheating.

TABLE I
Cultures of the heart

Date of experiment:	3. III	7. IV	2. IV	30. IVa	30. IV b	4. V	5. V	
24 hours after the experiment	Injury perceptible after heating for:	30 min	30 min	44 min	38 min	34 min	45 min	36 min
	All freshly grown cells killed after heating for:	38 min	46 min	48 min	46 min	46 min	50 min	36 min
Regeneration also takes place in cultures heated for:			94 min	112 min	110 min	102 min	90 min	60 min
Cultures were taken from the water-bath every		4 min	4 min	4 min	4 min	4 min	5 min	4 min

The cultures of heart tissue examined immediately after being taken out of the water-bath, as a rule do not beat if they have stayed in hot water longer than 25 minutes. During the following days the cultures gradually regain their beat, even those that are seriously affected. The beating usually commences before the appearance of living cells on the periphery of the fragment. Thus it is usually possible to perceive the beat of a culture seemingly dead. But all the beating cultures regenerate sooner or later, though very badly injured cultures, in which only after some days a few living cells appear, usually do not beat at all.

Similarly to the cultures of heart mesenchyme, cultures of the skin, examined 24 hours after the experiment, present a gradual increase of injury, proportionate to the time of overheating. In cultures of the skin, as is well known, two kinds of cells grow, epithelial and mesenchymal. Unfortunately 24 hours after the experiment it is impossible to distinguish between these two types of cells, because too short a period of growth prevents the cells from forming their characteristic structures. Therefore

the two first degrees of injury were described as identical to the cultures of the heart. The first, in which only some cells of the culture are rounded, and the second, in which all freshly grown cells are dead. During the regeneration of the cultures, in the days that followed the experiment, in the majority of cases, it was easy to trace the origin of the growing cells to one of the two kinds of tissue present. The findings of the experiments are included in Table II. We see that the deviations in the presence of the two first degrees of injury are great, while the heat resistance of the epithelial cells, as tested by the power of regeneration of the original fragment, is very uniform in all series. The heat resistance of the mesenchymal cells of the skin, varies in the different series, but is on the whole, similar to the heat resistance of the mesenchymal heart cells.

TABLE II
Cultures of the skin

Date of experiment:	16. III	18. III	23. III	27. III	9. IV
24 hours after the experiment { Injury perceptible after heating for:	35 min	37 min	26 min		44 min
{ All freshly grown cells killed after heating for:	35 min	50 min	42 min		48 min
Regeneration of epithelium also takes place in cultures heated for:	60 min		58 min	53 min	52 min
Regeneration of mesenchyme also takes place in cultures heated for:	85 min		94 min	71 min	117 min
Cultures were taken from the water-bath every:	5 min	3 min	4 min	3 min	4 min

In the cultures of amnion two types of tissue appear, epithelium and mesenchyme. The epithelium of the amnion always grows very quickly, and already after 24 hours distinct membranes form. It is easy therefore to observe, 24 hours after the experiment, injured epithelial cells, while the mesenchymal cells are difficult to detect. Similarly in regenerating cultures the epithelium grows much more rapidly than the mesenchyme. The findings of the observations are collected on Table III. We see that the appearance of first degree heat injuries in the amniotic

epithelium is rather uniform. The heat resistance of the epithelial cells of the amnion is very pronounced, and in general, is equal to the heat resistance of the mesenchyme of the heart, skin and the amnion itself. The great heat resistance of the amnion suggests the analogy to its potency of surviving the death of the organism (Wilburg 1937).

TABLE III
Cultures of the amnion

Date of experiment:	24. IV	26. IV	17. V	15. V	
24 hours after the experiment	Injury of the epithelium perceptible after heating for:	40 min	35 min	30 min	35 min
	All freshly grown epithelium cells killed after heating for:	40 min	55 min	40 min	55 min
Regeneration of epithelium also takes place in cultures heated for:		100 min	105 min	80 min	125 min
Regeneration of mesenchyme also takes place in cultures heated for:		80 min	90 min	125 min	100 min
Cultures were taken from the water-bath every		5 min	5 min	5 min	5 min

The epithelium present in the cultures of the intestine, also grows very rapidly and 24 hours after the experiment, distinct changes are to be seen in the epithelial cells. In the summary of the findings given in Table IV, the very small heat resistance of the intestine is striking. Freshly grown intestine epithelium is always killed by staying 26 minutes in a temperature of 48°C, and often dies after a shorter period of time. The regenerative power of the original fragment is lower than in all of the tissues described above. Even the mesenchymal cells originating from the intestine have a lower heat resistance than similar cells of the other organs. The uniformity of results in the experimental series is, in comparison to other tissues, rather high.

During the observations of overheated spleen cultures, attention was chiefly directed to the migratory cells. Here it was impossible to distinguish the degrees of injury. All migratory cells die at the same time, and new cells never migrate from the original fragment. The cultures of the spleen were never

TABLE IV
Cultures of the intestine

Date of experiment:	19. IV	21. IV	24. IV	23. V	
24 hours after the experiment	Injury of the epithelium perceptible after heating for:	20 min	15 min	15 min	26 min
	All freshly grown epithelium cells killed after heating for:	20 min	15 min	20 min	30 min
Regeneration of epithelium also takes place in cultures heated for:		20 min	30 min	30 min	30 min
Regeneration of mesenchyme also takes place in cultures heated for:		75 min	70 min	40 min	74 min
Cultures were taken from the water-bath every		5 min	5 min	5 min	4 min

TABLE V
Cultures of the spleen

Date of experiment:	3. III	7. III	9. III	18. III
All migratory cells killed after heating for:	25 min	25 min	28 min	27 min
Cultures were taken from the water-bath every	5 min	2 min	1 min	1 min

heated longer than 60 minutes so the mesenchymal cells were always alive. The results of the experiments are put together on Table V. They show a low heat resistance and are very uniform.

In comparing the findings, the differences in the heat resistance of various tissues are obvious. The greatest difference in the heat resistance of the same kind of tissue, taken from various organs, was noted between the epithelium of the intestine which belongs to one of the most easily injured tissues, and the epithelium of the amnion which is one of the most heat resistant tissues.

The heat resistance is lowest in the spleen migratory cells and in the intestine epithelium. This fact suggests that their high susceptibility is connected with the presence of a large quantity of proteolytic enzymes, and so may throw a light on the nature of the death induced by heat.

The great divergencies in the heat resistance of the fragments of the same tissue may be attributed to faults in the experimental technique. It is naturally impossible to affirm that there were no differences in the mounting of different cultures, but great care was taken that the experimental conditions should always be the same. If, in spite of that, the deviations are so considerable, we must conclude that they are the result of real existing differences in the heat resistance of different fragments. Bělehrádek and Melichar¹⁾ obtained similar results when working on the *Elodea canadensis*. Kokott, also, describes large deviations in the heat resistance of rabbit tissues, and Pincus and Fischer state that the exposure of a culture of osteoblasts to a temperature of 47°C for 60 minutes, may or may not kill the culture and that the absolute limit of life is only attained after 90 minutes of exposure.

Summary

The heat resistance of the different tissues of a chick embryo vary.

The heat resistance of the fragments of a given tissue fluctuates between considerable limits, the greatest being for the mesenchyme, the smallest for the migratory cells of the spleen.

The heat resistance of freshly grown cells is lower than that of the cells present in the centre of the culture.

The heat resistance of the centre of the culture of the tissues investigated can be ranged in the following series, from the most susceptible to the most resistant: migratory cells, epithelium of the intestine, skin epithelium, mesenchyme of the intestine, mesenchyme of the heart, mesenchyme of the skin, the mesenchyme and the epithelium of the amnion.

The present work was executed under the friendly guidance of Dr. Z. Zakrzewski and I have great pleasure in expressing my deep gratitude for his ready help and valuable advice.

The Biological Laboratory of the Maria Skłodowska-Curie Radium Institute, Warszawa and the Institute of Comparative Anatomy of the Jagellonian University, Kraków.

¹⁾ Quoted after Bělehrádek (1935).

Bibliography

1. Bělehrádek J.: Temperature and living matter. Berlin 1935. —
2. Bucciante L.: Ulteriori ricerche sulla velocità della mitosi nelle cellule coltivate *in vitro* in funzione della temperatura. Arch. Exp. Zellforsch. 5. 1928. —
3. Friedgood H. B.: On the thermal death point of sarcoma and normal mononuclear cells (Walker rat tumor N° 1). Arch. Exp. Zellforsch. 7. 1928. —
4. Kemp T.: Untersuchungen über das Verhalten der Mitosen in Gewebekulturen mit besonderem Hinblick auf ihre Beeinflussung durch verschiedenartige Einwirkungen (Röntgen- und Radium-Bestrahlung, Wärme und Äthereinwirkung). Arch. Exp. Zellforsch. 11. 1931. —
5. Kemp T. et Juul J.: Influence de la chaleur sur la division cellulaire, dans un tissu cultivé *in vitro*. C. R. Soc. Biol. 108. 1931. —
6. Kemp T. und Juul J.: Der Einfluß der Wärme auf die Zellteilung. Untersucht in Gewebekultur. Arch. Exp. Zellforsch. 11. 1931. —
7. Kokott W.: Zur Frage des Einflusses erhöhter Temperatur auf die Mitosen in Gewebekulturen. Z. Zellforsch. 11. 1930. —
8. Kokott W.: Die Formbeeinflussung *in vitro* gezüchteter Fibrozyten erwachsener Kaninchen durch erhöhte Temperaturen. Z. Zellforsch. 12. 1931. —
9. Lambert R. A.: Demonstration of the greater susceptibility to heat of sarcoma cells. Journ. Am. Med. Ass. 59. 1912. —
10. Lambert R. A.: The influence of temperature and fluid medium on the survival of embryonic tissues *in vitro*. Jour. exp. Med. 18. 1913. —
11. Lambert R. A. und Hanes F. M.: Beobachtungen an Gewebekulturen *in vitro*. Virchows Arch. 211. 1913. —
12. Lewis M. R.: Reversible changes in the nature of the mitotic spindle brought about in living cells by means of heat. Arch. exp. Zellforsch. 14. 1933. —
13. Ludford R. J.: The comparative reactions of normal and malignant cells *in vitro* to physical and chemical agents. Arch. exp. Zellforsch. 22. 1939. —
14. Parker R. C.: Methods of tissue culture. New York 1938. —
15. Pincus G. and Fischer A.: The growth and death of tissue cultures exposed to supranormal temperatures. J. exp. Med. 54. 1931. —
16. Stein J.: On the influence of cytotoxic immune sera and normal heterogenic sera on tissue cultures *in vitro*. Nowotwory (Les Néoplasmes) 13. 1938. —
17. Westermarck N.: The effect of heat upon rat tumors. Skand. Arch. f. Physiol. 52. 1927. —
18. Wilburg J.: Das Überleben der Gewebe in der Temperatur von +38° C nach dem Tode des Hühnerembryos. Bull. Acad. Polon. Sc. Lettr. Cracovie 1937.

Miniaturowe narzędzia w dziedzinie regeneracji. — Miniaturorgane bei den Regenerationsprozessen.

Mémoire

de M. Z. *WICIŃSKI*,

présenté le 26 Juin 1939 par M. E. Godlewski m. t.

(Planches 30).

Einleitung.

Bei den Betrachtungen über die Regenerationsprozesse vom Standpunkt der Entwicklungsmechanik aus, trat schon vor längerer Zeit des Problem der Analyse derjenigen Faktoren hervor, die den Regenerationsprozeß hervorrufen oder hemmen können. Die Meinungen über diese Frage waren geteilt. In letzter Zeit kam Godlewski ('28) auf Grund seiner Experimente zu dem Schluß, daß die eigentliche Ursache für die Hemmung des Regenerationsprozesses darin zu suchen wäre, daß die frühere biologische Nachbarschaft hergestellt worden ist. Der beschädigende Faktor verursacht ein Fehlen dieser Nachbarschaft.

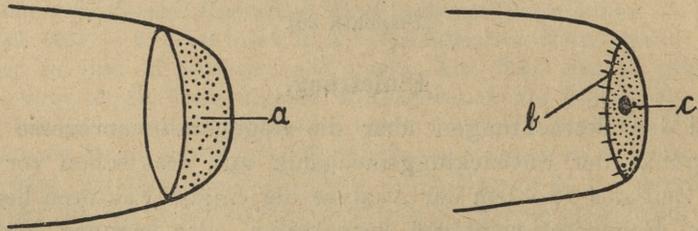
Die diesen Schluß bestätigenden Experimente bestanden darin, daß die Wunde, nachdem der Schwanz abgeschnitten worden war, mit einem Hautlappen bedeckt wurde. Im Verlaufe des Experimentes bemerkte Godlewski ('28), daß nach einem ungenauen Bedecken der Wunde dünne fingerartige Proliferationsknospen entstehen können, die manchmal das Aussehen von »Miniaturschwänzen« haben.

Auf Veranlassung des Herrn Prof. E. Godlewski, unter dessen Leitung ich im Biologisch-Embryologischen Institut der Jagellonischen Universität arbeitete, beschäftigte ich mich näher mit dem Problem dieser Erscheinungen. Es interessierte mich nämlich die Frage, ob der Miniaturschwanz alle anatomischen Bestandteile eines

normalen oder normal regenerierten Schwanzes enthält oder ob und in welchem Grad Unterschiede vorhanden sind. Die Ergebnisse dieser Beobachtungen sind in der vorliegenden Arbeit enthalten.

Um die Bildung eines Miniaturschwanzes an Stelle eines normalen hervorzurufen, bediente ich mich bei der Bedeckung des Amputationsstumpfes der Methode von Godlewski ("28).

Ich führte die Operation nach einer vorgehenden Narkotisierung des Axolotls in einer 1% Urethanlösung aus, was ungefähr 20 Minuten in Anspruch nahm. Ich hielt während der ganzen Operation das Tier möglichst unter Wasser, da unter diesen Umständen die Heilungs- und Regenerationsprozesse einen viel günstigeren Verlauf nehmen. Ich schnitt dem Axolotl den Schwanz ungefähr 1 cm hinter dem Anus senkrecht zur Körperlänge ab.

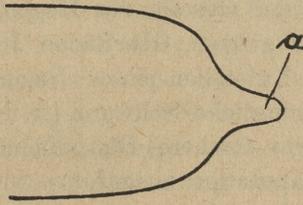


Schema 1. a) Abpräparierter Hautlappen. b) Nähte, welche den Hautlappen an die Oberfläche des Stummels befestigen. c) Das in der aufgelegten Haut ausgeschnittene Fenster.

Dann präparierte ich auf einer Seite des Schwanzes mittels eines Skalpells einen Hautlappen von 7 mm Breite von den darunterliegenden Geweben ab, die ich an der Basis des Lappens abschnitt. Mit dem auf diese Weise erhaltenen Lappen bedeckte ich die ganze Wundfläche, befestigte ihn dann mit einem Seidenfaden so, daß die Ränder des Lappens genau mit der den Schwanz bedeckenden Haut zusammentrafen. Schließlich schnitt ich in der Mitte des aufgelegten Hautlappens mittels einer dünnen Schere eine Öffnung von 2–3 mm Durchmesser aus, um auf dieser Stelle die Amputationswunde aufzudecken.

An der Wundpartie, die genau von dem Hautlappen bedeckt war, traten keine Regenerationsprozesse auf. Der mit den Seidennähten befestigte Hautlappen war eng mit dem Stummel verwachsen. Die aufgedeckte Wundpartie dagegen, die durch Ans-

schneiden des Fensters entstanden war und auf diese Weise ihrer früheren biologischen Nachbarschaft beraubt worden war, zeigte ein anderes Verhalten. Im Bereich des Defekts zeigte sich hier ein Regenerationskegel, welcher 4 Monate später das Aussehen eines Zylinders von 2 cm Länge hatte und einen dem ausgeschnittenen Fenster entsprechenden Durchmesser aufwies. Dieser Zylinder wurde im Laufe der Zeit länger.



Schema 2. a) Der Miniaturschwanz ungefähr 2 Monate nach der Operation.

Zu den histologischen Untersuchungen benützte ich Schnitte von 7,5 bis 10 μ Dicke, die ich mit einer 0,1% wässrigen Eosinlösung und Ehrlichschem Hämatoxylin färbte. Da die Schnitte auch Knochenpartien berührten, mußte ich die Präparate vor der Einbettung entkalken. Ich erhielt gute Resultate bei Benützung von 5% Salpetersäure nach der Methode von Schaffer¹⁾. Nach der Entkalkung bettete ich die Präparate in Paraffin ein.

1. Bau und makroskopische Unterschiede zwischen dem Schwanz eines normalen Individuums während der Entwicklung, einem normalen Regenerat und einem Miniaturschwanz.

Ich beginne mit der Beschreibung der Unterschiede, die äußerlich sichtbar und dem unbewaffneten Auge zugänglich sind.

Der normale Schwanz besitzt die Gestalt eines Bajonetts, was er einerseits der Gruppierung der inneren Gewebe, andererseits der Anwesenheit zweier Flossen: einer höheren an der Rückenseite und einer weniger hervortretenden an der Bauchseite verdankt. Gegen die Spitze zu wird der Schwanz schmaler und stärker abgeflacht.

¹⁾ Romeis. Taschenbuch der mikroskopischen Technik. Auflage 13, 1921. Seite 448.

Genau so sieht ein jüngeres Individuum aus. Schon bei einem Axolotl von einigen Zentimetern Körperlänge treten die erwähnten Merkmale hervor. Während der weiteren Entwicklung des Tieres vergrößern sich alle seine Ausmaße, aber die Gestalt bleibt grundsätzlich unverändert.

Die makroskopische Untersuchung eines nach Amputation des Endabschnitts und mit einer ganz unversehene Wunde gelasenen regenerierten Schwanzes, stellt ebenfalls keine bedeutenden Unterschiede in der Gestalt des Regenerats fest. Es finden in diesen Fall an der ganzen Oberfläche Bildungsprozesse statt, deren Ergebnis das Entstehen eines Regenerats von derselben Gestalt wie der ursprüngliche Schwanz ist. Nur eine gewisse Verdickung und das etwas reichere Blutgefäßnetz verraten, daß an dieser Stelle eine Amputation ausgeführt wurde und daß hier ein wiedergebildeter Abschnitt beginnt.

Im Bau des Miniaturschwanzes fallen sofort kennzeichnende Veränderungen auf. Wie schon erwähnt, treten in diesem Fall die Regenerationsprozesse nur an dieser Stelle des Stumpfes auf, die dank der ausgeschnittenen Öffnung in der Haut unbedeckt geblieben war. Aus dieser kleinen bloßgelegten Wundoberfläche wuchs eine Regenerationsknospe hervor, die im Laufe der Zeit länger wurde und sich zu einem Miniaturschwanz entwickelte. Der von dem Hautlappen bedeckte Teil dagegen wies außer einer unbedeutenden Verdickung dieser Haut keinerlei formative Prozesse auf. Ein Jahr nach der Amputation schwankte die Länge der Miniaturschwänze zwischen 4 und 6 cm, je nach den individuellen Eigenschaften des Tieres. Die Schwänze hatten die Gestalt eines Zylinders, dessen Durchmesser der Größe des Fensters in der Haut entsprach. In manchen Fällen war der Endabschnitt eines auf diese Weise entstandenen Regenerats abgeplattet und erinnerte an die Flossen der normalen Exemplare.

Dieser Prozeß drückt das Bestreben der lebenden Materie aus, den ursprünglichen Organisations- und Funktionszustand wieder herzustellen. Diese Eigenart der lebenden Materie, deren Ziel die Erhaltung des Normalzustandes ist und die also auch die aus verschiedenen Gründen entstandenen Defekte zu beseitigen trachtet, tritt ziemlich deutlich hervor. Wir haben es hier also mit der von Driesch ('01) als Regulation bezeichneten Erscheinung zu tun. Trotz der Schwierigkeiten, welche sich dem normalen Verlauf des

Regenerationsprozesses entgegenstellen, mobilisiert der Organismus auf einer begrenzten Oberfläche seine Kräfte, um so weit als möglich den früheren Zustand wiederherzustellen. Man könnte also diese Gruppe von Zellen, die ihre biologische Nachbarschaft verloren hat, als ein determiniertes harmonisches System ansehen, ein von Driesch ('09) eingeführter Begriff, welches im Stande ist, ein einheitliches harmonisches, jedoch streng begrenztes Organ auszubilden. Es ist sogar möglich, daß im Regenerationsprozeß etwas neues entsteht, was im normalen Lebenszyklus nicht vorhanden war, da bekannterweise die prospektive Potenz der lebenden Materie größer ist als ihre prospektive Bedeutung (Driesch '09).

Die erwähnte Abflachung des Endabschnittes tritt nicht immer ein. Ich beobachtete Miniaturregenerate, die trotz einer ziemlich bedeutenden Länge diese Abflachung nicht aufwiesen, so daß der entstandene Miniaturschwanz in seiner ganzen Länge zylindrisch war und keine Flossen besaß.

Diese Tatsachen lassen vermuten, daß innerhalb des Miniaturregenerats gewisse Veränderungen, sowohl quantitativer wie auch qualitativer Art eintreten. Im Schwanz entstehen nämlich Gebilde, die ganz kleine Ausmaße haben, und deren Aussehen verändert ist. Die genaueren Einzelheiten kann man nur auf histologischem Wege ermitteln. Ehe ich jedoch zu dieser Beschreibung übergehe, möchte ich noch erwähnen, daß ein Miniaturschwanz im Vergleich mit einem normalen eine festere Struktur aufweist. Schon durch Berühren eines solchen Gebildes mit einem Finger kann man die festere Konsistenz des Miniaturschwanzes feststellen, denn der Miniaturschwanz weist eine größere Ansammlung von kompaktem Gewebe auf als der normale Schwanz. Wenn man die quantitativen und strukturellen Unterschiede zwischen dem amputierten und dem neu entstandenen Organ vergleicht, erscheint das neugebildete Organ gewissermaßen mit den Merkmalen einer Heteromorphose ausgestattet. Diese Erscheinung wurde bei *Tubularia* als Bildung eines Köpfchens an Stelle eines Stolos beschrieben (Bickford '94), bei den Krustaceen als Bildung einer Antenne an Stelle des abgeschnittenen Auges (Herbst '89). Sie wurde während entwicklungsmechanischer Untersuchungen öfters analysiert. Es wurde beobachtet, daß bei *Tubularia* nicht etwa ein ganz neues Gebilde entsteht, sondern daß für die Regeneration die Umkehr der Polarität des Organismus charakteristisch ist, wodurch

an der Basis ein apikales Gebilde entsteht. Bei den Krustazeen entstand in den Versuchen Herbst's ('89) ein ganz anderes Gebilde. In meinen Untersuchungen unterscheiden sich die heteromorphen Eigenschaften der entstanden Gebilde in mancher Hinsicht von denjenigen des normalen Schwanzes, was schon zum Teil erwähnt wurde und wovon noch im weiteren die Rede sein wird.

2. Der Bau des Schwanzes eines normalen Exemplars, eines in Entwicklung begriffenen Tieres, eines normalen Regenerats und eines Miniaturschwanzes, sowie die mikroskopischen Unterschiede zwischen diesen Gebilden.

So wie beim Besprechen der makroskopischen Unterschiede werde ich bei einem Vergleich der histologischen Präparate von verschiedenen Exemplaren die Verhältnisse im normalen Schwanz als Ausgangspunkt benützen. Um systematisch vorzugehen, werde ich die Gewebe in derselben Reihenfolge beschreiben, wie sie im Schwanz liegen, nämlich von der Außenseite her nach dem Innern zu.

A. Bau der Haut.

Zuerst wollen wir das den Körper bedeckende Organ, d. h. die Haut beschreiben, die bei einem normalen Tier aus zwei Schichten zusammengesetzt ist: der Oberhaut (Epidermis) und der Lederhaut (Cutis). Sowohl an Längs- wie an Querschnitten durch den Schwanz beobachtete ich, daß die Oberhaut hauptsächlich aus Schleimzellen besteht. Diese sind von runder Gestalt und liegen gewöhnlich in zwei, selten in mehreren Schichten. Zwischen den Schleimzellen befinden sich undifferenzierte Zellen, die keinen Schleim bilden. Die Mehrzahl dieser Zellen liegt an der Basis der Oberhaut (Taf. 30, Abb. 1 em). Unter der Epidermis liegt die Lederhaut, welche Pigment und hie und da Schleimdrüsen (auf den Tafelabbildungen mit *z* bezeichnet) enthält. Wie man sieht, bildet die Lederhaut eine ziemlich breite Schicht, die von den tiefer liegenden Geweben durch einen Streifen kompakteren Bindegewebes, welcher noch zur Cutis gehört, abgegrenzt ist: unmittelbar unter der Lederhaut befinden sich im Schwanz eines normalen Exemplars Muskeln.

Die Oberhaut eines normalen Schwanzes besteht bei einem jungen Tiere fast nur aus runden Schleimzellen. Dagegen sind

die undifferenzierten Zellen nur sehr spärlich vertreten. Die Lederhaut bildet nur eine dünne Lage. Dieselbe weist keine Schleimdrüsen auf.

Der Bau des soeben beschriebenen Organs in einem normal regenerierten Schwanz erinnert an die Verhältnisse, die man bei Miniaturschwänzen etwa zwei Jahre nach der Operation beobachten kann. Die folgenden Angaben über den Miniaturschwanz gelten also auch für ein normales Regenerat.

Die Epidermis eines zwei Jahre alten Miniaturregenerats besteht ebenfalls aus einigen Lagen, deren Zahl nicht bestimmt ist, meistens jedoch größer ist als im normalen Gebilde. Im Bereich der Epidermis (Abb. 2 r) sind ebenfalls helle ovale Schleimzellen in großer Anzahl feststellbar. Außerdem sind Gruppen undifferenzierter Zellen vorhanden, es sind dies Reservate von Bildungszellen (Godlewski '28). Dieser Verfasser nimmt an, daß diese Bildungszellen die verbrauchten Epidermispartien ersetzen und, nachdem sie ins Innere des Regeneratsubstrats eingewandert sind, an der Bildung des Bildungsgewebes als Proliferationsmaterial, welches die Regenerationsblasten organisiert, teilnehmen. Während sie ihrer zweiten Aufgabe nachkommen, wandern diese Zellen aus den Reservaten unter die Epidermis, wo sich eine faserige Substanz befindet, die eine Art Netz bildet und aus dem sich organisierenden Serum des Blutes entsteht, welches während der Amputation aus den Gefäßen herausfließt. Im Bereich dieser Zellgruppen verändert sich ein Teil dieser Elemente derart, daß das Epithel ein spindelförmiges Aussehen annimmt. Später bilden die Zellen Ausläufer und nehmen eine sternförmige Gestalt an. Diese undifferenzierten Zellen liegen nicht nur an der Basis des Epithels, sondern auch an seiner Oberfläche. Eine genaue Untersuchung des Präparats verrät große Gruppen dieser Zellen (Taf. 30, Abb. 2 r). In manchen Fällen nehmen diese Zellen alle Schichten des Epithels ein. In solchen Nestern undifferenzierter Zellen fehlen die für die Epidermis der Amphibien charakteristischen Schleimzellen.

Unter der Epidermis liegt die Lederhaut, welche etwas dünner ist als bei normalen Exemplaren. Die letztere ist auch in diesem Fall von den tiefer gelegenen Geweben durch eine deutlich abgegrenzte dünne Lage des Cutisbindegewebes getrennt. Die Lederhaut liegt nicht unmittelbar den Muskeln an, wie das bei einem

normalen Exemplar der Fall ist, sondern ist von ihnen durch eine Bindegewebsschicht von verschiedener Breite getrennt. Im Bereich der Lederhaut ist eine größere Anzahl von Schleimzellen vorhanden als in dem ursprünglichen Organ (Abb. 5 *gl*), so daß sie zu zweien oder dreien zusammenliegen.

Die Präparate aus einem Miniaturschwanz ungefähr zwei ein halb Monate nach Beginn des Regenerationsprozesses zeigen ein anderes Bild. Abb. 4 stellt einen Querschnitt durch solch einen Miniaturschwanz dar. Unter einer stärkeren Vergrößerung erkennt man (Abb. 3), daß die Epidermis ebenfalls aus einigen Schichten besteht. Die Zellkerne sind groß und stärker gefärbt. In der tiefsten Schicht sind ovale Kerne mit senkrecht zur Körperoberfläche gerichteter Längsachse. In der mittleren Zellage befinden sich Kerne, deren Längsachse parallel zur Körperoberfläche gerichtet ist, während die Oberflächenzellen ebenfalls ovale Kerne besitzen. Es ist das also derselbe Bau, der in einem mehrschichtigen flachen Epithel auftritt. Diese Zellen weisen einen ähnlichen Bau auf wie die Schleimzellen, aber sie sind noch nicht ganz ausgebildet. Unter der Epidermis ist eine Basalmembran sichtbar. Dagegen ist die Lederhaut hier nicht vorhanden und es sind auch keine Schleimdrüsen entwickelt.

Abb. 6 und 7 (Taf. 30) stellen Längsschnitte durch den Schwanz dar. Die Schnitte wurden derart angelegt, daß auf den Präparaten ein Teil des ursprünglichen normalen Schwanzes (mit A bezeichnet) sowie eine Partie des Miniaturschwanzes (mit B bezeichnet) sichtbar ist. Punkt C bezeichnet auf den Abbildungen die Stelle, welcher der Miniaturschwanz entwächst. Abb. 6 stellt einen Schnitt nahe der Oberfläche des Körpers dar, Abb. 7 dagegen einen Längsschnitt durch die Mitte des Körpers. An diesen Präparaten ist sichtbar, daß die Epidermis aus zahlreichen Schichten besteht und in der Vertiefung zwischen der normalen Partie und dem Regenerat aus einer ziemlich dicken Lage Zellen besteht. Im Bereich der Epidermis sind neben zahlreichen Schleimzellen auch undifferenzierte Zellen vorhanden. Der Lederhaut fehlt in der Nähe der Amputationsfläche (C) eine deutlichere Abgrenzung von den tieferen Schichten in Gestalt einer Bindegewebsschicht. Eine solche trennende Schicht ist in einer gewissen Entfernung vom Punkt C erkennbar. In der Lederhaut befinden sich große Ansammlungen von Schleimzellen. Die Kerne derselben sind klein und in den meisten

Fällen nahe an der Oberfläche der Zellen gelegen. Mitten in der Plasmasubstanz sind die Schleimansammlungen erkennbar, welche die Form irregulärer Polyeder besitzen und gewöhnlich in der Mitte der Zelle liegen. Diese Gebilde treten nicht nur in der Lederhaut, sondern auch zwischen den Muskelbündeln auf.

B. Verhalten des Muskelgewebes in den verschiedenen Schwanztypen.

Die Muskulatur eines normalen Axolotlexemplars besteht aus den längs der Körperseiten gelegenen Muskelbündeln, die an der Außenseite des Knochensystems gelegen sind. Auf einem Querschnitt durch den Schwanz sieht man, daß die Bündel der rechten Körperseite weder in der dorsalen noch in der ventralen Partie mit den Bündeln der gegenüberliegenden Seite verbunden sind, da sie mittels Bindegewebes voneinander getrennt sind. Die Anordnung der Bündel ist ellipsenförmig. Die einzelnen Bündel liegen nebeneinander und werden durch Bindegewebstreifen voneinander getrennt (Abb. 8). Aus den letzteren dringen Bindegewebszellen und Fasern in die Muskulatur beider Körperseiten ein, zwischen den einzelnen Fasern ist jedoch nur sehr wenig Bindegewebe vorhanden.

Gegen den Abschnitt des Körpers zu vermindert sich die Anzahl der Bündel und es sind auch in den einzelnen Bündeln weniger Fasern vorhanden, aber die allgemeine Anordnung der Muskulatur bleibt bis ins Schwanzende unverändert. Auf den Längsschnitten durch einen normalen Schwanz sieht man, daß das Muskelsystem segmental aufgebaut ist. Die einzeln, hinter einander liegenden Segmente sind durch Bindegewebe verbunden.

Ganz ähnlich liegen die Verhältnisse bei einem jungen Exemplar. Schnitte, die von Axolotln von ungefähr 2·5 cm Körperlänge angefertigt wurden, weisen dieselbe Anordnung dem Knochensystem gegenüber sowie auch den segmentalen Bau auf. In normalen Regeneraten bleibt die Anordnung der Muskelbündel unverändert. Man sieht ganz deutlich, daß die einzelnen Muskelbündel weniger Muskelfasern enthalten, weshalb die Gestalt der Bündel weniger regulär ist. Die letzteren liegen nicht unmittelbar unter der Haut, sondern sind durch einen Streifen lockeren Bindegewebes von derselben getrennt. Man kann jedoch sowohl bei jungen Exem-

plaren wie auch bei normalen Regeneraten die Anwesenheit von Muskeln bis in die Endpartie des Schwanzes hinein feststellen. Die Unterschiede zwischen den erwähnten Schwänzen sind nicht qualitativer sondern quantitativer Natur.

Wenn wir jetzt zur Beschreibung des Muskelgewebes in den Miniaturschwänzen übergehen, so müssen wir bemerken, daß die Verhältnisse in diesen, den normalen Exemplaren gegenüber, nicht nur quantitative sondern auch qualitative Unterschiede aufweisen. An erster Stelle ist die Anordnung der Muskelbündel zu erwähnen. In einem Miniaturschwanz bilden diese eine Art Kranz, der sich konzentrisch um das Knochensystem herumlegt (Abb. 5 m). Es sind also nicht, wie in den bisherigen Fällen, zwei Muskelgruppen an den Seiten des Körpers vorhanden, sondern ein geschlossener Kreis. Die einzelnen Bündel sind nicht ellipsenförmig, ihre Gestalt nähert sich eher derjenigen eines Kreises. Diese Bündel bestehen aus Bindegewebe, aber das letztere ist spärlicher als in den normalen Schwänzen vorhanden. Dagegen ist im Bereich der Muskelbündel selbst etwas mehr Bindegewebe, das zwischen die einzelnen Muskelfasern eindringt, vorhanden als in den normalen Schwänzen. Die Anordnung und Form der Bündel machen den Eindruck, als ob dieselben jeden freien Platz zu besetzen bestrebt wären, und das lockere Bindegewebe verdrängen wollten, welches hier viel spärlicher vertreten ist. Die Anordnung der Muskelbündel untereinander ist dieselbe. Es ist dagegen ein quantitativer Unterschied vorhanden. Im Miniaturschwanz ist die Anzahl der Muskelbündel und ihre Größe im Verhältnis zu den Ausmaßen des Schwanzes bedeutender als in einem normalen Schwanz. An dieser stärkeren Ansammlung der muskulären Elemente trägt die erwähnte konzentrische Anordnung der Bündel, welche auch hier längs des ganzen Schwanzes vorhanden sind, bedeutend bei.

Ein Längsschnitt (Taf. 30. Abb. 6 m) zeigt, daß der segmentale Bau der Muskeln erhalten geblieben ist. Die Bündel in der Miniaturpartie sind dagegen kürzer als im normalen Teil. Auch ist im Miniaturschwanz die Unterbrechung der einzelnen Segmente durch Bindegewebe deutlicher. In der Schwanzpartie, welche unmittelbar dem normalen Teil anliegt, ist der metamere Bau etwas verwischt. Man sieht hier deutlich, wie die einen und anderen Bündel miteinander verbunden sind.

C. Unterschiede im Knochenbau und in der Anordnung des lockeren Bindegewebes.

Im Schwanz eines normalen Exemplars befindet sich ein Knochenskelett in Form von mehreren Wirbeln. Jeder Wirbel der Schwanzpartie besteht aus dem Wirbelkörper und zwei Bogen. Einer dieser Bogen befindet sich an der dorsalen Seite, er enthält das Nervenrohr, der andere liegt ventral und dient als Schutz für die in seinem Inneren verlaufenden Blutgefäßstämme. Das Material, aus dem die Bogen aufgebaut sind, ist von festerer Konsistenz als das des Wirbelkörpers.

Während meiner Beobachtungen über die Entstehung des Knochensystems im Laufe der Entwicklung bemerkte ich, daß zuerst der Wirbelkörper erscheint. Bei sehr jungen Tieren fehlen sowohl der dorsale wie der ventrale Bogen. An der Stelle, die diesem Ort entspricht, liegt ein sehr schmaler Bindegewebsstreifen von etwas festerem Bau (Abb. 10 v. ad). Bei etwas älteren Exemplaren ist auf den Querschnitten ein etwas besser entwickelter Wirbelkörper und die in Bildung begriffenen Bogen in Form ziemlich großer Knorpelplatten zu sehen. Dieselben bilden einen Schutz dorsalseits für das Nervenrohr und ventralseits für die Blutgefäße. Die Seitenpartien der Bogen sind noch nicht ausdifferenziert und sind noch im Stadium von Bindegewebsstreifen, welche den Wirbelkörper mit den erwähnten Knorpelplatten verbinden. Der dorsale Bogen bildet sich aus einem knorpeligen in einen knöchigen früher um als der ventrale.

Die Besprechung des Skeletts der Miniaturschwänze können wir mit der Beschreibung eines Präparats (Abb. 4 v) aus einem Miniaturschwanz beginnen, der im Alter von zwei ein halb Monaten nach der Amputation ist und nur den Körper des Wirbels enthält. Das Nervenrohr ist von Bindegewebe umgeben. Der Neuralbogen fehlt, an seiner Stelle erscheint ein Streifen festeren Bindegewebes. Auch die ventral gelegenen Blutgefäße sind noch mit keinem Bogen bedeckt. Bei Miniaturschwänzen im Alter von ungefähr zwei Jahren ist außer dem Wirbelkörper deutlich ein dorsaler Bogen erkennbar (Abb. 5 ad). Ein Ventralbogen ist dagegen nicht vorhanden. Es ist jedoch auch hier eine Tendenz zur Ausbildung aller Bestandteile vorhanden. Der Bogen, welcher im normalen Schwanz die Blutgefäße umgibt, erscheint in Gestalt einer Knor-

pelplatte, welche die Gefäße von der Ventralseite beschützt. An Serienschritten konnte ich feststellen, daß der Dorsalbogen in der Nähe des Schwanzendes allmählich verschwindet und nur der Wirbelkörper sowie das unter dem Bogen befindliche Nervenrohr übrigbleiben. Man sieht das auf Abb. 9, die einen Schnitt aus der Endpartie desselben Schwanzes darstellt wie Abb. 5. In der Beschreibung der makroskopischen Unterschiede wurde erwähnt, daß die Endpartie der Miniaturschwänze oft abgeplattet ist und eine Gestalt annimmt, die der normalen ähnelt. Abb. 11 (Taf. 30) stellt einen Querschnitt durch einen solchen etwas abgeplatteten Teil dar. Wie aus der Abbildung ersichtlich ist, entsteht diese Abplattung nur dank der stärkeren Entwicklung des Bindegewebes ohne Mitwirkung des Knochensystems.

So weit die qualitativen Unterschiede im Bau des Skeletts bei den untersuchten Schwanztypen. Für die quantitativen Verhältnisse gilt dasselbe, was wir beim Besprechen des Muskelgewebes betonten. Auf Querschnitten durch einen Miniaturschwanz ist sichtbar (Abb. 5), daß die Wirbel kleiner sind. Die auf dem Querschnitt vom Wirbel eingenommene Fläche liegt im Verhältnis zur Fläche des ganzen Schwanzquerschnittes in den Miniaturschwänzen höher als in den normalen, d. h. der Wirbel ist viel weniger verkleinert als der ganze Schwanz.

Der Miniaturschwanz erreicht die Länge eines normalen Schwanzes, was dank einer Vergrößerung der Wirbelanzahl möglich ist.

Die im Verhältnis zum ganzen Schwanz unproportionale Verkleinerung des Muskel- und Knochensystems wird durch eine stärkere Reduktion des lockeren Bindegewebes ermöglicht. Das letztere nimmt im Schwanz eines normalen Exemplars verhältnismäßig viel Platz ein. Die größten Ansammlungen des Bindegewebes befinden sich in den Flossen, sowohl auf der Rücken- wie auch auf der Bauchseite und in der Nähe des Knochensystems.

Im Schwanz eines jungen Exemplars herrschen ähnliche Verhältnisse, nur mit dem Unterschied, daß von dem lockeren Bindegewebe mehr vorhanden ist.

Die Anordnung dieses Gewebes in den normalen Regeneraten und in den Miniaturschwänzen ist dieselbe. Es können nur quantitative Unterschiede festgestellt werden, weil nämlich in den Mi-

niaturschwänzen weniger von diesem Gewebe entwickelt ist und das sowohl in der Nachbarschaft des Knochensystems, zwischen den Bündeln, als auch innerhalb der einzelnen Bündel zwischen den einzelnen Fasern. Außerdem ist das lockere Bindegewebe auch dadurch reduziert, daß die Flossen fehlen. Unabhängig davon unterscheiden sich beide erwähnten Regeneratformen dadurch von normalen Schwänzen, daß zwischen der Lederhaut und der Muskelschicht in den Regeneraten eine dünne Lage lockeren Bindegewebes von verschiedener Dicke vorhanden ist, während in einem normalen Schwanz die Lederhaut den Muskeln unmittelbar aufliegt. In einem Miniaturschwanz ist dagegen eine größere Anzahl stark durchbluteten lockeren Bindegewebes vorhanden, innerhalb dessen das Nervenrohr, der Wirbelkörper mit der Anlage des Dorsalbogens sowie hie und da verstreute dünne Muskelbündel liegen (Abb. 4).

D. Die Blutgefäße.

Die Hauptstämme der Blutgefäße sind im normalen Schwanz des Axolotls, so wie bei allen Schwänzen als Schwanzarterie und Schwanzvene entwickelt (*Art. und v. caudalis*). Diese Gefäße verlaufen derart innerhalb des ventralen Bogens, daß die Arterie näher dem Wirbelkörper zu gelegen ist, während das venöse Gefäß sich unter derselben, d. h. eher ventral befindet. Außerdem ist in dem Bindegewebe eine große Anzahl kleinerer und größerer Blutgefäße vorhanden.

Ganz ähnliche Verhältnisse treten bei jungen Exemplaren auf, jedoch mit der Ausnahme, daß das Gefäßnetz dichter ist. Auf Querschnitten durch die Endpartie von Schwänzen junger Tiere kann man das Fehlen des ventralen Bogens erkennen. Hier liegen also die Gefäße innerhalb des Bindegewebes unter dem Wirbelkörper und behalten dieselbe Anordnung bei, die bei erwachsenen Tieren auftritt.

In Regeneraten, die nach einer Amputation des Schwanzendes, ohne daß die Wunde mit Haut bedeckt würde, entstehen, tritt keine so reguläre Anordnung auf. Obwohl auch hier die Gefäße innerhalb des ventralen Bogens liegen, ist ihre Anzahl doch viel größer. Ein anderer Unterschied besteht darin, daß die charakteristische Anordnung fehlt, die in normalen Schwänzen auftritt.

Im gegenwärtigen Fall liegen die Blutgefäße regellos im Bindegewebe innerhalb des ventralen Bogens.

In jungen Miniaturschwänzen ist ein reichliches Blutgefäßnetz vorhanden. Sowohl Arterien wie Venen liegen regellos innerhalb des lockeren Bindegewebes, die Mehrzahl derselben befindet sich jedoch an der Ventralseite des Wirbelkörpers (Abb. 4 vs). Mit dem Wachstum des Miniaturschwanzes verringert sich ihre Anzahl. Sie liegen ebenfalls um das Knochensystem herum, weisen aber nicht die Regelmäßigkeit der Anordnung, welche wir in den normalen Schwänzen beobachteten, auf (Abb. 5 vs). Es trägt dazu auch das Fehlen des ventralen Bogens bei, der bei den normalen Schwänzen einen Schutz für die Gefäßstämme bildet.

E. Das Nervenrohr.

Neben der Blutversorgung spielt bei Regenerationsprozessen das Nervenrohr eine große Rolle.

Godlewski ('04 und '05) kam bei seinen Versuchen über den Einfluß des Nervensystems auf den Regenerationsprozeß bei den Molchen zu dem Schluß, daß der normale Verlauf der Schwanzregeneration bei den Molchen von dem Vorhandensein eines unbeschädigten Rückenmarks abhängt. »Das Vorhandensein des Zentralnervensystems bedingt die Aktivierung der prospektiven Potenzen jener Elemente, welche durch den operativen Eingriff zur Realisierung ihrer regenerativen Tätigkeit angeregt worden sind«. Zu einem grundsätzlich ähnlichen Ergebnis kam auch Walter ('12), welcher der Bedeutung des Nervensystems bei der Extremitätenregeneration der Molche seine Untersuchungen widmete. Der Unterschied in den Ansichten beider Verfasser besteht darin, daß der erstere der Meinung ist, daß die Regeneration vom Vorhandensein eines unbeschädigten Rückenmarks abhängt, während der letztere eine solche Abhängigkeit sowohl vom Rückenmark als auch von den Spinalganglien und dem sympathischen System annimmt. Es sind jedoch nicht alle Forscher von der Richtigkeit dieser Meinungen überzeugt. Aus der Gruppe der Gegner wollen wir nur Goldfarb ('11) erwähnen, der auf Grund seiner Experimente an Amphibien zu dem Schluß kommt, daß man den Einfluß des Nervensystems auf das Regenerationsgeschehen ausschließen kann. Borenstein ('35) bemerkt in seinem diesem

Problem gewidmeten Sammelreferat, daß man dem Nervensystem einen Einfluß nicht absprechen darf, daß aber die wirksamen Zentren, die Art der Reize und die Wirkungsweise derselben unbekannt sind.

Die Vermutung lag also nahe, daß das Nervenrohr sich in unveränderter Gestalt wiederbilden werde. Die Untersuchung der Schnitte bestätigte diese Annahme.

Sowohl bei normalen Tieren als auch bei jungen, normalen oder Miniaturregeneraten ist das Nervenrohr längs des ganzen Schwanzes gelegen. In all diesen Fällen werden fast dieselben Verhältnisse beobachtet. Gewisse minimale Unterschiede betreffen nur die Anzahl der Zellen, sowie die Weite des Lumens des Zentralkanals. Diese Veränderungen hängen von den individuellen Eigenschaften jedes Exemplars ab. Sehr lehrreich ist Abb. 7, welche einen Schnitt darstellt, der sowohl das Nervenrohr in der normalen Schwanzpartie als auch im Miniaturschwanz getroffen hat. Man sieht, daß das Nervenrohr in seiner ganzen Länge einen gleichartigen Bau aufweist.

Zusammenfassung und Besprechung der Versuchsergebnisse.

Ich widmete meine Untersuchungen der Entstehung von Miniaturgebilden, die sich auf regenerativem Wege nach Amputation des Schwanzes beim Axolotl organisieren.

1) Die Versuche bestätigen die von Godlewski ("28) gegebene Erklärung des auslösenden Moments der Regeneration, d. h. daß die Entfernung der früheren biologischen Nachbarschaft im Bereich der Fläche den Ausgangspunkt für die Regeneration bildet.

2) Wenn bei Amputation des Axolotlschwanzes die Wunde bedeckt wird, und nur ein Teil der Fläche derselben ihrer ursprünglichen biologischen Nachbarschaft beraubt wird, bildet eben diese freie Wundfläche die Basis für den Regenerationsprozeß, es entsteht ein Miniaturschwanz.

3) Die Größe dieses neuentstandenen Gebildes hängt von der Größe der Oberfläche dieses Regenerats ab.

4) Makroskopische und mikroskopische Untersuchungen stellten Unterschiede zwischen dem ursprünglichen Schwanz und dem Miniaturschwanz fest, der regeneriert wird. Die unten stehende Zusammenstellung gibt ein Bild derselben:

Normaler Schwanz

1) Bajonettförmig.

2) Oberhaut: Zahl der Zellschichten verschieden, gewöhnlich zwei bis drei; aus Schleimzellen sowie aus undifferenzierten Elementen zusammengesetzt. In der Lederhaut, die den Muskeln unmittelbar anliegt, sind einzelne Schleimzellen vorhanden.

3) Die Muskeln in Form elliptischer Bündel an beiden Körperseiten angeordnet, die einzelnen Bündel durch lockeres Bindegewebe getrennt.

4) Skelett aus einer Anzahl von Wirbeln zusammengesetzt. Der einzelne Wirbel besteht aus Wirbelkörper sowie dorsalem und ventralem Bogen.

5) Viel lockeres Bindegewebe.

6) Von Blutgefäßen Schwanzarterie und -Vene vorhanden.

Miniaturschwanz

1) Zylindrisch, mit einem von der Größe des in der Haut ausgeschnittenen Fensters abhängigen Durchmesser.

2) Die Zahl der Zellschichten der Oberhaut dünner mit zahlreichen Schleimzellen, von den unterliegenden Muskeln durch lockeres Bindegewebe getrennt.

3) Die runden Bündel, zwischen welchen nur sehr wenig Bindegewebe vorhanden ist, bilden einen geschlossenen Ring. Die Zahl der Muskelbündel ist im Verhältnis zur Oberfläche (auf dem Querschnitt) des Schwanzes größer als im normalen Schwanz.

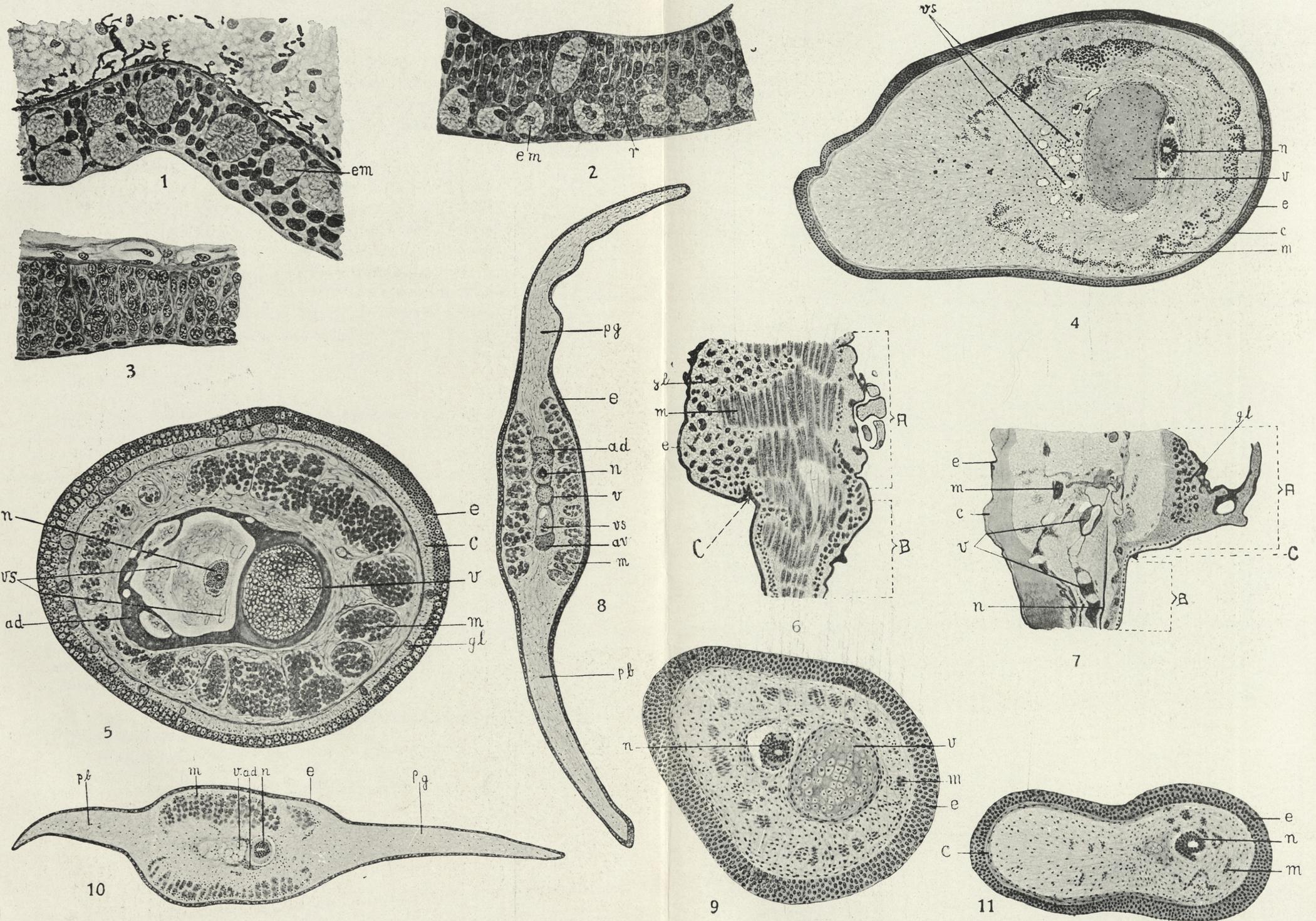
4) Die Wirbel aus Wirbelkörper sowie dorsalem Bogen zusammengesetzt. Der ventrale Bogen bildet sich entweder überhaupt nicht oder hat die Form einer Knorpelplatte, welche die Blutgefäße von der Ventralseite her beschützt. Der Wirbelkörper ist verkleinert, aber nicht in dem Maß wie der ganze Schwanz.

5) Sehr wenig lockeres Bindegewebe.

6) Das Blutgefäßsystem besteht aus zahlreichen kleinen Arterien und Venen.

5) Die erwähnten Unterschiede quantitativen und qualitativen Charakters erlauben nach meiner Ansicht diesen Typus einer regulativen Regeneration als eine Art Heteromorphose anzusprechen.

6) Das heteromorphe Regenerat, welches in diesem Fall entsteht, ist nach der Terminologie von Driesch ('09) als ein gemischt-komplex aequipotentiell System anzusehen. Das Wesen eines solchen Systems besteht darin, daß sich entweder die fehlende Schwanzpartie, oder auch das ganze Organ,



Z. Wiciński

in diesem Fall der ganze Schwanz bilden kann. In diesem und in jenem Fall wird ein harmonisches Ganzes gebildet, aber dasselbe kann entweder dadurch zustande kommen, daß nur der fehlende Teil sich von neuem bildet, oder daß ein neuer harmonisch organisierter Schwanz entsteht.

Die Bildungskraft des Organismus ruft hier eine Erscheinung hervor, die den während der ontogenetischen Entwicklung auftretenden Prozessen analog ist. Die Bildungskraft eines aus 4 oder 8 Blastomeren bestehenden Embryos kann sich während der normalen Entwicklung auf die Bildung von $\frac{1}{4}$ oder $\frac{1}{8}$ Embryo beschränken. Die isolierten Blastomeren bilden nicht einen Teil, sondern einen ganzen Embryo, so wie in unserem Fall der Regeneration nicht ein Teil des Schwanzes sondern das ganze Organ entsteht.

Die vorliegende Arbeit wurde im Biologisch-Embryologischen Institut der Jagellonischen Universität in Kraków ausgeführt. Ich fühle mich verpflichtet, dem Leiter des Instituts, Herrn Prof. Emil Godlewski, meinen tiefsten Dank für die Überlassung des Themas, wie auch für die wertvollen Ratschläge, die mir während der Arbeit zuteil wurden, auszusprechen.

Erläuterung der Abbildungen auf der Tafel 30.

<i>ad</i> — Dorsalbogen	<i>n</i> — Nervenrohr
<i>av</i> — Ventralbogen	<i>pb</i> — Bauchflosse
<i>c</i> — Bindegewebe der Kutis	<i>pg</i> — Rückenflosse
<i>em</i> — Schleimzellen der Epidermis	<i>r</i> — Reservate
<i>e</i> — Epidermis	<i>v</i> — Wirbel
<i>gl</i> — Schleimzellen	<i>vs</i> — Blutgefäße
<i>m</i> — Muskeln	

Alle Abbildungen wurden nach Zeichnungen von mikroskopischen Schnitten von Fräulein Stanisława Wojciechowska ausgeführt.

- 1) Epidermis eines normalen Schwanzes. Vergr. ungefähr 200 ×.
- 2) Epidermis eines Miniaturschwanzes. Vergr. ungefähr 200 ×.
- 3) Epidermis eines $2\frac{1}{2}$ Monate alten Miniaturschwanzes. Vergr. ungefähr 200 ×.
- 4) Querschnitt eines Miniaturschwanzes $2\frac{1}{2}$ Monate nach Beginn des Regenerationsprozesses. Vergr. 25 ×.
- 5) Miniaturschwanz — Querschnitt. Vergr. 25 ×.

6) Längsschnitt eines normalen und eines Miniaturschwanzes. Oberflächlicher Schnitt. Vergr. 4 X.

7) Ein ähnlicher Schnitt wie auf Abb. 6, aber aus der mittleren Körperpartie. Vergr. 3 X.

8) Querschnitt durch den Schwanz eines normalen Axolotls. Vergr. 15 X.

9) Querschnitt durch die Endpartie eines Miniaturschwanzes. Vergr. 25 X.

10) Querschnitt durch den Schwanz eines jungen normalen Tieres. Vergr. 25 X.

11) Querschnitt durch die Endpartie eines Miniaturschwanzes. Vergr. 25 X.

Literaturverzeichnis.

- 1) Bicford Elizabeth E.: Notes on Regeneration and Heteromorphosis of Tubularia Hydroids. Journ. of Morph. Vol. IX, 1894. — 2) Borenstein P.: Wpływ systemu nerwowego na regenerację organów u kręgowców. Kosmos 1935, Seria B. — 3) Driesch H.: Die organischen Regulationen. Leipzig 1901. — 4) Driesch H.: Philosophie des Organischen. Leipzig 1909. — 5) Godlewski E. jun.: Versuche über den Einfluß des Nervensystems auf die Regenerationserscheinungen der Molche. Bull. Acad. Sc. Cracovie 1904. — 6) Godlewski E. jun.: Doświadczalne badania nad wpływem układu nerwowego na regenerację. Rozpr. Wydz. mat. przyr. T. XLIV, Seria B, 1905. — 7) Godlewski E. jun.: Badania nad istotą podniety zjawisk regeneracyjnych i ich hamowaniem. Acta Biol. Exper. 1928. — 8) Godlewski E. jun.: Untersuchungen über Auslösung und Hemmung der Regeneration beim Axolotl. Arch. für Entw. Mech. der Org. 1928. — 9) Goldfarb A. J.: The central nervous system in its relations to the phenomenon of regeneration. Arch. für Entw. Mech. der Org. 1911. — 10) Herbst C.: Ueber die Regeneration von antennenähnlichen Organen an Stelle von Augen. Arch. f. Entw. Mech. der Org. 1889. — 11) Walter F. K.: Welche Bedeutung hat das Nervensystem für die Regeneration der Triton-Extremitäten? Arch. f. Entw. Mech. der Org. 1913.
-

*Badania nad systemem dokrewnym jeża (Erinaceus).
II. Histologiczne zmiany w jajnikach i macicy występujące okresowo i pod wpływem bodźców dokrewnych. —
Untersuchungen über das endokrine System des Igels (Erinaceus). II. Histologische Veränderungen in den Eierstöcken und dem Uterus, die periodisch oder unter dem Einfluß von endokrinen Reizen auftreten¹⁾.*

Mémoire

de M. S. ZAJĄCZEK,

présenté le 26 Juin 1939 par M. E. Godlewski m. t.

(Planches 31—32).

Den Inhalt dieser Arbeit bildet das Problem der Veränderungen im Eierstock und im Uterus des Igels während des Jahreszyklus, sowie die Frage, welchen Einfluß die während des Östrus und auch während des Winterschlafes injizierten gonadotropen Hormonen auf den Eierstock dieser Tiere ausüben. Es werden also an dieser Stelle Probleme behandelt, welche denen analog sind, die in letzter Zeit von Skowron (1938) für das Igelmännchen bearbeitet worden sind.

Unter den Abhandlungen, die sich auf den Igel beziehen, enthält die von R. Deanesly (1934) die genaueste Zusammenstellung von Beobachtungen über den weiblichen Genitalzyklus dieses Tieres. Diese Verfasserin interessierten jedoch weniger die Veränderungen im Eierstock während des Anöstrus, als der Verlauf der aufeinander folgenden Veränderungen im Bereich des Eierstocks und des Uterus zur Zeit des Östrus, der Schwanger-

¹⁾ S. Skowron. Untersuchungen über das endokrine System des Igels (*Erinaceus*). I. Histologische Veränderungen in den Hoden und in den akzessorischen Drüsen des männlichen Genitalapparates, die periodisch oder unter dem Einfluß von endokrinen Reizen auftreten. Bull. Ac. Pol. Sc. 1938.

schaft und der nach einem Coitus ohne gleichzeitige Befruchtung eintretenden Pseudoschwangerschaft. Übrigens führte Deanesly ihre Untersuchungen an aus England stammenden Igel aus, wo die Östralperiode dieser Tiere in eine andere Zeit fällt als in Polen, was von Skowron erwähnt wurde, als er die Dauer des Östrus bei Männchen bestimmte. Nach Deanesly werden schwangere Weibchen in England vom Monat Mai bis September angetroffen. In der Periode zwischen Oktober und Ende April sind in den Eierstöcken dieser Tiere keine neuen gelben Körper vorhanden, und Uterus als auch Vagina befinden sich bis März in rückgebildetem Zustand. Die Igelweibchen werfen Junge im zweiten Lebensjahr, es kann jedoch schon eine Ovulation bei jungen Weibchen in ihrem Geburtsjahr vorkommen. Deanesly gibt an, daß eine Reihe von Östralzuständen nach einer langen Anöstralperiode auftritt, die von kurzen Diöstern unterbrochen wird. Nach einer spontanen Ovulation entwickeln sich gelbe Körper, welche im Fall, wenn kein Coitus erfolgt, klein und schwach luteinisiert sind und einen faserigen Bau aufweisen. Wenn jedoch ein Coitus erfolgt, entwickeln sich die gelben Körper sehr stark, unabhängig davon, ob eine Befruchtung eingetreten ist oder nicht. In letzterem Fall hat man es mit einer Pseudoschwangerschaft zu tun. Nach Deanesly kann man also beim Igel drei Arten gelber Körper unterscheiden: Ovulationskörper, Pseudoschwangerschaftskörper sowie Schwangerschaftskörper. Deanesly betont, daß die Igel in England oft zweimal nacheinander schwanger werden, da die Verfasserin schwangere Weibchen mit gleichzeitig tätigen Milchdrüsen beobachtet hat. Auf einige von Deanesly gemachte Beobachtungen werde ich noch bei der Besprechung meiner eigenen Ergebnisse zurückkommen. Im Zusammenhang mit den Untersuchungen von Deanesly sowie mit meinen eigenen stehen die von der erwähnten Verfasserin unberücksichtigt gelassenen Beobachtungen von Cognetti de Martiis (1930) über die normale und pathologische Ovogenese bei *Erinaceus europaeus*. Dieser Verfasser beschäftigt sich hauptsächlich mit dem Problem der sogenannten parthenogenetischen Teilung der Eizelle beim Igel, stützt jedoch seine Beobachtungen auf ein Material von nur drei Tieren und gibt nicht an, zu welcher Jahreszeit sie getötet worden waren. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen werde ich in einem weiteren Kapitel erwähnen.

Die vorliegende Arbeit wurde im Biologisch-Embryologischen Institut der Jagellonischen Universität in Kraków ausgeführt. Dem Leiter des Instituts, Herrn Prof. Dr E. Godlewski sowie Herrn Prof. Dr S. Skowron, spreche ich meinen herzlichsten Dank aus für die Hilfe und Ratschläge, die sie mir während der Arbeit freundlich erteilten.

Material und Methoden.

Die von mir untersuchten Igel gehörten den Arten *E. roumanicus* und *E. europaeus* an, sie stammten zum größten Teil aus der Umgebung von Kraków, es befanden sich jedoch unter ihnen auch Exemplare aus dem zentralen Klempolen sowie aus Schlesien. Während der Untersuchungen im Winter und im Vorfrühling waren die Tiere in einem ungeheizten Zimmer in mit Heu gefüllten Käfigen untergebracht, wo sie in einen normalen Winterschlaf verfielen. Das Material für histologische Untersuchungen aus den Eierstöcken und den Hörnern des Uterus wurde in Bouin'scher Flüssigkeit fixiert, danach in Paraffin eingebettet und in Schnitte von $7\ \mu$ Dicke zerlegt. Aus den Eierstöcken stellte ich komplette Schnittserien her. Die den Eierstock umgebende Kalotte wurde meistens vor der Fixierung entfernt. Die Schnitte färbte ich mit Ehrlichschem Hämatoxylin und mit Eosin, benützte aber zur Färbung der Schnitte aus den Uterushörnern die Methode von van Gieson, um eine Kontrastfärbung von Bindegewebe und Muskeln zu erzielen.

Von den Hormonalpräparaten benützte ich Prolane (Pregnyl) in Form subkutaner Injektionen. Außerdem injizierte ich den Tieren die aus einem zerriebenen Vorderlappen der Rindshypophyse ausgepresste Flüssigkeit.

Die Veränderungen in den Eierstöcken und im Uterus während des Jahreszyklus.

Ehe ich an eine Beschreibung der Veränderungen in den Eierstöcken und im Uterus des Igelweibchens gehe, lasse ich eine kurze Charakteristik des histologischen Bildes des Eierstocks beim neugeborenen Tier und beim unreifen Weibchen vorangehen, da ich in dem betreffenden Schrifttum keinerlei Angaben über diese Einzelheiten finden konnte.

Der Eierstock eines Embryos von ungefähr 6 cm Länge ist histologisch noch wenig differenziert. Ein Schnitt durch den Eierstock zeigt die vom Hilus eindringenden Blutgefäße und das Bindegewebe, welches die einheitliche Anlage der Gonade in Teile zerlegt, Bindegewebszellen, welche aus dem Inneren des Ovariums eindringen, trennen das Oberflächenepithel (Genital-epithel) des Eierstocks von den tieferen Partien des ersteren ab, die den sogenannten Epithelkern bilden. In dem durch Bindegewebe zerteilten Epithelkern beobachtet man außer undifferenzierten Zellen auch genitaloidale Zellen, deren bläschenförmiger Kern größer ist und deren Chromatin in größere Brocken geballt ist. Teilungen der genitaloidalen Zellen treten öfter beim Embryo als beim neugeborenen Tier auf. Häufig umringen die undifferenzierten Zellen die genitaloidalen, von denen sie sich durch ihre ovalen, dunkel gefärbten Kerne unterscheiden. Die Hörner des Uterus haben beim neugeborenen Tier eine dünne Wand und ihr spaltförmiges Lumen ist mit hohen Epithelzellen bedeckt.

Der Eierstock eines neugeborenen Tieres von ungefähr 8 cm Länge ist im allgemeinen so gebaut wie der soeben beschriebene embryonale Eierstock. Er unterscheidet sich von dem letzteren höchstens durch ein etwas häufigeres Auftreten der genitaloidalen Zellen mit gleichzeitig verringerter Anzahl von undifferenzierten Zellen, der ganze Eierstock kann auch manchmal etwas größer und stärker durchblutet sein. Ebenso beruht der Unterschied zwischen dem Uterus beim neugeborenen Tier und demjenigen beim Embryo nur auf der Größe des Uterus und der Dicke seiner Wände.

Im Vergleich mit dem menschlichen Eierstock unmittelbar nach der Geburt, befindet sich der Eierstock des neugeborenen Igels in einem früheren Stadium histologischer Differenzierung. Beim neugeborenen Menschen befinden sich nämlich in den tieferen Lagen des Eierstocks Graaf'sche Follikel von 5—6 mm Durchmesser, welche schon Follikelflüssigkeit enthalten. Dagegen ist der Hoden des neugeborenen Igels Skowron zufolge im Vergleich mit einem neugeborenen Menschen weiter entwickelt. Er enthält nämlich bereits ausdifferenzierte Sertoli'sche Zellen und außerdem bilden sich manche Samenstränge in Samenkanälchen um, was beim Menschen erst während der Pubertät eintritt. Die männliche Gonade des Igels überholt also im Vergleich mit

den Verhältnissen beim Menschen die weibliche Gonade stark in der Entwicklung.

Das nächste von mir untersuchte Stadium waren Eierstöcke von Tieren im Alter von einigen (3—4) Wochen. Der Eierstock dieser Tiere besteht schon aus drei Schichten, d. h. aus dem Oberflächenepithel, der *Zona parenchymatosa* und der *Zona vasculosa*. Im Bereich der *Zona parenchymatosa*, unmittelbar unter dem Oberflächenepithel, befinden sich die Primärfollikel. Außer den Primärfollikeln, die eine Ureizelle enthalten, treten auch oft größere Gruppen von Ureizellen auf, die von Zellen des Follikel-epithels umgeben sind. In den tieferen Partien der *Zona parenchymatosa* zerfallen jedoch diese Gruppen in eineiige Primärfollikel, was durch ein Eindringen jener Zellen aus dem Follikel-epithel zwischen die einzelnen Ureier bedingt ist, die anfänglich eine gemeinsame Hülle für die ganze Gruppe der Ureier bildeten. In den tiefsten Schichten der *Zona parenchymatosa* befinden sich größere Follikel, welche schon ein Follikel-epithel von zwei bis zu drei Zellschichten aufweisen. Die Wände der Uterushörner sind bei mehrwöchigen Weibchen bereits ziemlich dick und man kann an ihnen außer der Schleimhaut deutlich eine Muskelschicht unterscheiden. Von dem spaltförmigen Lumen des Uterus gehen ins Innere der Schleimhaut schlauchförmige nichtverzweigte Drüsen ab.

Bei etwas älteren Weibchen (anderthalb Monate nach der Geburt) treten im Eierstock neben zahlreichen Primärfollikeln auch Follikel mit einer mehrschichtigen Wandung auf, in deren Innerem sich schon die Follikelflüssigkeit zu bilden beginnt. In manchen dieser Follikel, die jedoch keinerlei sichtbare Regressions- anzeichen aufweisen, kann man verschiedene Stadien der ersten Reduktionsteilung beobachten (Abb. 1, Taf. 31). Trotzdem kann man schon in solchen jugendlichen Eierstöcken häufig degenerierende Graaf'sche Follikel beobachten, in denen sowohl Kern wie auch Zytoplasma der Eizelle in Rückbildung begriffen sind. Bei Weibchen dieses Alters reichen die Drüsen der Schleimhaut so weit in die Tiefe, daß sie fast die Muskellage berühren und ihr Anfangs- abschnitt knäuel förmig aufgewunden ist. Im Uteruslumen fehlt noch die Sekretion.

Ehe ich zur Beschreibung der Veränderungen in den Eier- stöcken erwachsener Igelweibchen im Laufe des Jahreszyklus

übergehe, möchte ich noch bemerken, daß der Anfang der Östralperiode bei den in Polen lebenden Igelweibchen ungefähr in die zweite Aprilhälfte fällt, ähnlich wie bei den Männchen (Skowron), während bei den Igel in England der Östrus anfangs Mai beginnt und nur ausnahmsweise sich in die letzten Tage des Aprils verschiebt. Außerdem kann man in England trüchtige Weibchen während einer längeren Periode beobachten als in Polen. In dem von mir untersuchten Material befanden sich trüchtige Weibchen aus den Monaten Mai, Juni und Juli, während in England solche noch im August und sogar im September vorkommen. Nach Deanesly befinden sich in den Eierstöcken der Igel in England schon im April Graaf'sche Follikel von ungefähr 1 mm Durchmesser, dieselben degenerieren jedoch und die Ovulation tritt meistens erst im Mai auf. In Polen konnte ich jedoch oft große nichtdegenerierte Graaf'sche Follikel in den Eierstöcken der Igel schon im April beobachten, außerdem fand ich in einem anfangs Mai getöteten Weibchen Föten, deren Größe auf eine Befruchtung im April hinwies. Wenn man mit Herter (1933) die Dauer der Trüchtigkeit beim Igelweibchen mit 5—6 Wochen annimmt, so mußte die Befruchtung bei diesem Tier spätestens um den 20. April herum erfolgt sein, also zu einer Zeit, wo die Igel in England sich gewöhnlich noch im anöstralen Zustand befinden. Von anderen Verfassern erwähne ich Herter, der nach eigenen Beobachtungen, sowie nach den Angaben von Heck, Krumbiegel und Eisentraut annimmt, daß die Östralperiode schon im März beginnt. Auf jeden Fall beginnt im Vergleich mit England der Östrus beim Igel in Polen früher, er ist jedoch von kürzerer Dauer. Nach Beendigung der Anöstralperiode und mit beginnendem Östrus vergrößern sich die Eierstöcke stark (Abb. 2). Die Primärfollikel sind sehr zahlreich, sie sind jedoch nur selten in Gruppen gesammelt und von Follikelepithelzellen umgeben, wie das bei den unreifen Weibchen der Fall war. Außer den Primärfollikeln treten auch zahlreich größere und sehr große Graaf'sche Follikel auf, die nahe der Oberfläche des Eierstocks gelegen sind. In den kleinen Follikeln, in welchen sich noch keine Follikelflüssigkeit ansammelt, befinden sich häufig zwischen den Zellen des Follikelepithels die sogenannten Call'schen und Exner'schen Körperchen, welche von den Eierstöcken vieler anderer Tiere herbekannt sind. Diese Körper entstehen an manchen Stellen

durch ein Zusammentreten der Zellen des Follikelepithels zu kugelförmigen Gebilden, welche innen hohl und mit einem eosinfärbbaren Sekret ausgefüllt sind. Zur Zeit, da sich im Graaf'schen Follikel die Follikelflüssigkeit zu bilden beginnt, verschwinden die Call'schen und Exner'schen Körperchen aus den Follikeln, weswegen ich diese Gebilde in größeren Follikeln niemals beobachten konnte.

Nach Deanesly machen die Igelweibchen in England nach Beendigung des Anöstrus gewöhnlich einige Östralperioden durch, die durch kurze Diöstralperioden voneinander getrennt sind. Nach Ansicht der Verfasserin tritt in jeder Östralperiode beim fehlenden Coitus eine spontane Ovulation ein, welche das Entstehen der sogenannten gelben Körper der Ovulation bedingt. Die erste Ovulation tritt beim Igel in England gewöhnlich im Mai ein, obwohl sie ausnahmsweise schon anfangs April stattfinden kann. Meistens degenerieren jedoch die großen Graaf'schen Follikel im April, bevor sie noch ovulieren. Da das Weibchen einige Male eine spontane Ovulation durchmachen kann, beschreibt die Verfasserin das Auftreten der gelben Körper der Ovulation bei Igelweibchen verschiedenen Alters und bestimmt daraufhin die Anzahl der durchgemachten Ovulationen. Es können also im Eierstock eines Weibchens zur Zeit, wo die Östralperioden auftreten, Sätze von gelben Körpern der Ovulation erscheinen, noch bevor die Befruchtung und Trächtigkeit eintritt. Im Gegensatz zu den Beobachtungen dieser Verfasserin konnte ich in meinem Material weder geplatzte Graaf'sche Follikel, noch gelbe Körper der Ovulation auffinden, obwohl mehr als zwanzig Weibchen genau untersucht worden waren. In den von mir beobachteten großen Graaf'schen Follikeln waren die Zellen des *Stratum granulosum* zu Polyedern umgeformt (Abb. 3) und ihr Plasma war vakuolisiert, was das Eintreten einer teilweisen Luteinisierung beweist. Im Innern jedes dieser Follikel, die Follikelflüssigkeit in ansehnlicher Menge enthielten, befand sich eine Eizelle, welche oft im Stadium der Ausstoßung des ersten Richtungskörpers war. An der Peripherie der Follikel zeigten sich oft Blutungen. Neben Follikeln ohne deutliche Anzeichen von Degeration enthält jeder Eierstock in dieser Periode zahlreiche Follikel, die in Rückbildung begriffen sind. Ich sah jedoch in keinem Fall geplatzte Follikel ohne Eizelle, oder gelbe Körper der Ovulation. Sogar bei Weib-

chen, welche über einen Monat, von Ende April bis Ende Mai, jede für sich allein in besonderen Käfigen gehalten wurden, fehlten in den Eierstöcken geplatzte Graaf'sche Follikel sowie gelbe Körper, die für eine spontane Ovulation sprechen könnten. Auch bei einem Ende Juni getöteten Weibchen, welches nicht trächtig war, wiesen die Eierstöcke keine gelben Körper der Ovulation auf, obwohl die Weibchen schon im April trächtig werden können und zu dieser Zeit ovulationsfähige Graaf'sche Follikel besitzen. Auf Grund dieser Beobachtungen neige ich zur Annahme, daß bei Igelweibchen in Polen in den Eierstöcken keine spontane Ovulation eintritt. Wenn sich diese Vermutung als richtig erweisen sollte, müßte man annehmen, daß die Ovulation infolge des Coitus stattfindet, so wie das z. B. beim Kaninchen und beim Iltis (*Mustela putorius*) (Robinson 1918—19) oder bei der Waldspitzmaus (*Sorex araneus*) (Brambell 1935) der Fall ist. Wenn kein Coitus stattfindet, so unterliegen meiner Ansicht nach die großen Graaf'schen Follikel der Degeneration, die man so oft in den Eierstöcken der Weibchen im Frühling und Sommer beobachten kann. Die gelben Körper entstehen also beim Igel wahrscheinlich nur nach einem vorangehenden Coitus. Schließlich muß bemerkt werden, daß ich in keinem der von mir untersuchten Eierstöcke der Igelweibchen gelbe Körper beobachtete, ohne daß sich gleichzeitig im Uterus Föten befanden, d. h. also, daß keine gelben Körper der Pseudoschwangerschaft vorkamen.

Ehe ich an die Beschreibung der gelben Körper der Schwangerschaft gehe, muß ich bemerken, daß ich das Alter derselben nach der Größe der sich in den Uterushörnern entwickelnden Föten bestimmte. In den jüngsten der von mir untersuchten gelben Körper waren in den großen polyedrischen Luteinzellen schon viele Vakuolen enthalten, die daher stammten, daß sich die Fettsubstanzen in den Reagentien auflösten. Neben Luteinzellen mit nur einem bläschenförmigen Kern sieht man häufig auch etwas größere Zellen mit 2—4 Kernen (Abb. 4, Taf. 31). In manchen Fällen liegen diese Kerne gesondert im Zytoplasma, an anderen Stellen sind sie einander genähert (Abb. 5 x). Daneben treten auch sehr große Luteinzellen auf, in denen zahlreiche Kerne von unregelmäßiger Gestalt und ungleicher Größe kettenförmig aneinander gereiht sind (Abb. 6). Zellen dieser Art erscheinen am

häufigsten an der Oberfläche des gelben Körpers, während die zwei- bis vierkernigen über den ganzen gelben Körper verteilt sind. Zusammen mit dem in den gelben Körper eindringenden Bindegewebe treten auch Blutgefäße ein. Für gewöhnlich sind jedoch die jüngeren gelben Körper nicht sehr stark durchblutet. In der Mitte des gelben Körpers befindet sich eine größere Ansammlung von Bindegewebe, innerhalb dessen oft Gruppen eines dunklen Farbstoffes sichtbar sind, die vom Blutfarbstoff stammen.

Die gelben Körper aus späteren Trächtigkeitsperioden sind stärker durchblutet, in ihrem Inneren befindet sich nicht mehr so viel Bindegewebe, die Luteinzellen sind größer und enthalten mehr Vakuolen, die ein Überbleibsel der aufgelösten Fettsubstanzen sind. Im Laufe der fortschreitenden Trächtigkeit zeigen sich im gelben Körper immer mehr freie Stellen, die infolge der Degeneration der Luteinzellen entstehen. Damit steht das immer häufigere Auftreten von Luteinzellen mit pyknotischen Kernen sowie das Kleinerwerden der Zellen selbst im Zusammenhang. Bei einem unmittelbar nach der Geburt getöteten Weibchen sind die gelben Körper sehr schwach durchblutet, und die verkleinerten Luteinzellen (Abb. 7, Taf. 31), die schon oft pyknotische Kerne aufweisen und undeutliche Grenzen haben, machen den Eindruck, als ob sie teilweise ineinander fließen würden. Das Innere des gelben Körpers ist stark von Bindegewebe durchwachsen. Die Rückbildung der gelben Körper schreitet nach der Geburt fort, so daß ich schon im August nur Spuren früherer gelber Körper auffinden konnte.

Ich wendete zwar bei meinen Untersuchungen keine spezielle Methode zur Färbung der Fettsubstanzen an, doch kann ich trotzdem feststellen, daß sich die Luteinzellen beim Igel während der Trächtigkeit und nach der Geburt ganz ähnlich verhalten wie beim Kaninchen. Nach Skowron und Keller (1934), vergrößert sich die Anzahl der Fettropfen in den Luteinzellen beim Kaninchen im Laufe der Trächtigkeit, und die ersten Degenerationsanzeichen, ein Ineinanderfließen der Fettropfen und eine Verkleinerung der Luteinzellen, erscheinen am gelben Körper schon am Ende der Trächtigkeitsperiode und nach der Geburt. Die von Skowron und Keller erwähnten Anzeichen einer Degeneration der gelben Körper, kann man auch an den gelben Körpern des Igels beobachten. Auch bei dieser Tierart findet im Laufe

der Trächtigkeitsperiode ein Zusammenfließen der Fettröpfchen in den Luteinzellen statt, und die Rückbildung der Zellen ist unmittelbar nach der Geburt sehr deutlich erkennbar. Auf jeden Fall treten die ersten Degenerationserscheinungen schon gegen Ende der Trächtigkeitsperiode auf und schon im August fand ich nur noch Spuren früherer gelber Körper im Eierstock.

Der Angabe von Skowron zufolge werfen die Igelweibchen in Polen nur ausnahmsweise zweimal im Laufe eines Jahres Junge, während das in England sehr häufig vorkommt. Das steht ohne Zweifel mit der kürzeren Dauer der Östralperiode bei den Igel in Polen im Zusammenhang. In meinem Material war nur ein einziges Weibchen, in dessen Eierstock sich außer den gelben Körpern der Schwangerschaft die im Zusammenhang mit den im Uterus vorhandenen Föten, noch sehr stark rückgebildeten gelben Körper befanden, welche meiner Ansicht nach von einer schon vorher durchgemachten Trächtigkeit zeugten. Es wäre zwar möglich, daß in diesem Fall eine Gruppe der gelben Körper, und zwar diejenigen, welche Degenerationserscheinungen aufwiesen, durch eine Pseudoschwangerschaft entstanden wären, aber diese Annahme ist sehr unwahrscheinlich, da ich in keinem einzigen Fall das Auftreten einer Pseudoschwangerschaft beobachten konnte. Es wäre also anzunehmen, daß dieses Weibchen im Laufe einer Saison zweimal trächtig wurde, was jedoch beim Igel in Polen nur ausnahmsweise vorkommt.

Wenn man bei den trächtigen Weibchen die Zahl der Föten im Uterus mit der Anzahl der gelben Körper vergleicht, so beobachtet man, daß, so wie bei den Nagetieren, die Zahl der Föten gewöhnlich geringer ist. Das Igelweibchen trägt durchschnittlich 6—7 Föten, während sich meistens 7—12 gelbe Körper entwickeln. Es wird also ein Teil der Eier nicht befruchtet, oder, was wahrscheinlicher ist, ein Teil der Embryonen stirbt in sehr frühen Entwicklungsstadien ab, was möglicherweise von letalen erblichen Faktoren bedingt ist.

Während der Monate August und September sind die Eierstöcke noch groß und enthalten zahlreiche große Graaf'sche Follikel, obwohl ich zu dieser Zeit schon keine trächtigen Weibchen beobachtete. Es treten jedoch immer häufiger degenerierte Follikel auf, und das am häufigsten im September. Auch die Primärfollikel nehmen an Zahl ab und es kommen häufiger

Gruppen von Ureizellen vor, die von einer gemeinsamen Schicht Follikel­epithelzellen bedeckt sind. Zur Zeit, da sich der Herbst nähert, weisen die Eierstöcke schon keine gelben Körper und größere Graaf'sche Follikel auf und nehmen gleichzeitig an Größe ab. Im Oktober sind die Eierstöcke im Vergleich mit den vorangehenden Monaten bereits klein. Die Gefäße der *Zona vasculosa* sind reichlich mit Blut gefüllt, und in der *Zona parenchymatosa* kommen häufig kleine Blutungen vor. Die Zahl der Primärfollikel vermindert sich weiter, was besonders deutlich bei reifen Weibchen auftritt. Die Eierstöcke der jungen Weibchen dagegen, welche noch keine Trächtigsperiode durchgemacht haben, weisen sogar in den späteren Herbstmonaten eine größere Anzahl von Primärfollikeln auf. Die größte Rückbildung des Eierstocks wird im November erreicht (Abb. 8, Taf. 31 und Abb. 18, Taf. 32). Das stimmt auch mit der Beobachtung von Skowron überein, der am Hoden den höchsten Grad der Rückbildung um diese Zeit beobachtete. Die *Zona parenchymatosa* des Eierstocks wird kompakt und enthält nur noch einzelne Primärfollikel. Sowohl die Primärfollikel als auch die größeren Follikel befinden sich oft im Zustand der Degeneration.

Die ersten Anzeichen einer regeren Tätigkeit der Eierstöcke sind im Dezember sichtbar, obwohl sich die Igel zu dieser Zeit noch im Winterschlaf befinden. Es wächst vor allem die Anzahl der Primärfollikel und viele Follikel beginnen langsam zu wachsen, wobei sie einer fortschreitenden Luteinisierung erliegen. In den nächsten Monaten, d. h. im Januar, Februar und März vermindert sich die Blutmenge in den Gefäßen der *Zona vasculosa*, die Eierstöcke werden größer, und die primären, mittleren und großen Follikel werden immer zahlreicher. Die *Zona parenchymatosa* verliert allmählich ihren kompakten Bau und es lockert sich das Bindegewebe in der *Zona vasculosa*.

Wenn man den Verlauf des Jahreszyklus im Eierstock mit demjenigen im Hoden vergleicht, so sieht man, daß nicht nur der Zeitpunkt des Östrus beim Weibchen und beim Männchen übereinstimmt, sondern auch der Zeitpunkt der stärksten Rückbildung des Eierstocks und des Hodens sowie auch derjenige, in dem die ersten Anzeichen einer allmählichen Rückkehr zum normalen Zustand sichtbar werden. Man kann nämlich sowohl am Eierstock als auch am Hoden beobachten, daß im Dezember

die degenerativen Veränderungen zu verschwinden beginnen. Im Gegensatz jedoch zum Hoden, in dem das Ende der Östralperiode mit raschen und weitgehenden Veränderungen verbunden ist, erfolgen die Veränderungen im Eierstock langsam und der Eierstock geht nur allmählich von der Tätigkeitsperiode in den Zustand des Anöstrus über.

Gleichzeitig mit dem Verlauf der Veränderungen im Eierstock während des Jahreszyklus treten auch ebenso kennzeichnende Veränderungen in den Uterushörnern auf. Hubrecht (1890) beschreibt den histologischen Bau des Uterus beim Igel während des Östrus und zu Beginn der Schwangerschaft, richtet jedoch sein Augenmerk hauptsächlich auf die Implantation des befruchteten Eies. Deanesly dagegen untersuchte die Veränderungen im Bau des Uterus während des ganzen Jahreszyklus und meine Untersuchungen bestätigen in den wichtigsten Punkten die Ergebnisse dieser Verfasserin. Die ersten Veränderungen im Bau der Uterushörner erscheinen bereits im März. Die das Uteruslumen bedeckenden Epithelzellen sind noch niedrig und kubisch, aber das Bindegewebe unter dem Epithel ist aufgelockert und das besonders an der antimesometrialen Seite. Die Drüsen reichen bis in die Nähe der Muskellage, und sind in ihrer Anfangspartie knäueiförmig aufgewunden und erweitert. Von der Seite des Epithels dagegen bilden sich neue Drüsen. Während des vollen Östrus macht sich eine Auflockerung des Bindegewebes, eine Vergrößerung der Drüsen und eine Veränderung in der Höhe der Epithelzellen, welche jetzt zylinderförmig werden, bemerkbar. Während der Trächtigkeit ist in den Uteruswänden, an den nicht von den Föten eingenommenen Stellen die Muskellage bedeutend verdickt, es wächst viel Bindegewebe nebst Blutgefäßen in dieselbe hinein, während die Schleimhaut charakteristisch aufgefaltet ist. Im Uteruslumen befindet sich eine größere Menge von Sekret, welches weiße und rothe Blutkörperchen enthält.

Nach der Trächtigkeit bleiben im Uterus dauernd Veränderungen bestehen, dank welchen man die Weibchen, die noch keine Trächtigkeit durchgemacht haben, von denen unterscheiden kann, die schon trächtig waren. Deanesly bemerkte beim Igel und Brambel bei *Sorex araneus*, daß sich nach der Trächtigkeit die Gefäße erweitern und ihre Wände dick und hyalinisiert sind. Außer diesen Veränderungen beobachtete ich bei Weibchen,

die eine Trächtigkeit durchgemacht hatten, eine Veränderung im Bau der Muskellage. Diese Veränderungen, welche von den genannten Autoren nicht beschrieben wurden, betreffen die Längsmuskelschicht, die bis zur nächsten Trächtigkeit eine vergrößerte Breite beibehält und reichlich von Bindegewebe durchwachsen ist. Auf Grund dieser Veränderungen konnte ich eben so sicher entscheiden, ob das betreffende Weibchen in der laufenden Saison schon trüchtig war, wie auf Grund der Blutgefäßerweiterung. Im Ganzen wird jedoch die Uteruswand nach der Trächtigkeit dünner und zwar hauptsächlich wegen der geringeren Dicke der Ringmuskellage, deren Fasern nun einen regelmäßigen Verlauf haben. Das zylindrische Epithel wird kubisch, und die Drüsen, deren Kanal verengert ist, nehmen an Zahl ab. Das interglanduläre Bindegewebe, in welchem Leukozyten und Pigmentkörner verstreut liegen, hat einen festeren Bau.

Die Veränderung des bindegewebigen Aufbaus hat eine Verdünnung der ganzen Uteruswand zur Folge. Den höchsten Grad der Rückbildung im Uterus beobachtete ich im November, die ersten Anzeichen einer Rückkehr zur Aktivität schon im März, und das sogar dann, wenn das Weibchen noch im Winterschlaf lag. Es verdient hervorgehoben zu werden, daß die Restituierung der Rückbildungserscheinungen rasch und plötzlich stattfindet und der Übergang von Anöstrus zum Östrus nur kurz dauert. Der Uterus verhält sich also in dieser Hinsicht etwas anders als der Eierstock, an dem diese Veränderungen allmählich vor sich gehen.

Die Veränderungen im Uterus, welche von den Perioden des Östrus und des Anöstrus abhängen, treten also nahezu parallel mit den degenerativen und regenerativen Veränderungen im Eierstock auf.

Das Entstehen der Eizellen im postembryonalen Leben.

Mit dem Problem der Entstehung der Eizellen im postembryonalen Leben beschäftigten sich schon zahlreiche ältere Beobachter. Schon Pflüger (1863) sprach die Meinung aus, daß die Eizellen auch in der postembryonalen Periode entstehen können und zwar während des Östrus durch Einwachsen des Oberflächenepithels (Genitalepithels), aus welchem die sogenannten Pflügerschen Schnüre entstehen. Zu einem ähnlichen Schluß kommt auch

Paladino (1888), welcher auf Grund seiner Beobachtungen an verschiedenen Tieren (Meerschweinchen, Hund, Rind, Schwein, Ziege, Pferd, Bär und Mensch) die Meinung ausspricht, daß ein Teil der weiblichen Geschlechtszellen degeneriert, während gleichzeitig im Laufe der ganzen Periode der Geschlechtsreife andere aus dem Oberflächenepithel entstehen. Schrön (1863) bestätigte diese Untersuchungen und sprach die Meinung aus, daß die Zahl der primären Follikel im extrauterinen Leben bei der Katze und beim Kaninchen während des Östrus, beim Menschen aber während der Menstruation zunimmt.

Neuerdings beschäftigte sich mit diesem Problem Arai (1920), der die Eier und die Follikel des Ratteneierstocks zählte und zu dem Schluß kam, daß die Eizellen periodisch auch bei reifen Individuen entstehen. Diese Untersuchungen ergänzte später Allen (1922) durch Beobachtungen am Eierstock der Maus. Er fand nicht nur Mitosen in den Zellen des Oberflächenepithels, sondern auch kleine Eizellen, die von Zellen des Follikel­epithels umgeben waren und unmittelbar unter dem Oberflächenepithel lagen. Die Mitosen treten am häufigsten während des Östrus auf und die aus der Teilung hervorgehenden Zellen verwandeln sich binnen 4—6 Tagen in junge Eier, von welchen jedoch zirka 99% rückgebildet wird. Allen ist also der Ansicht, daß im Eierstock der Maus periodisch weibliche Geschlechtszellen entstehen, was auch Butscher (1927) feststellt, welcher die Eierstöcke unreifer und reifer Ratten untersuchte. Butscher ist der Ansicht, daß die unmittelbar nach der Geburt entstandenen Eizellen degenerieren und an ihrer Stelle neue aus dem Oberflächenepithel entstehen, welcher Prozeß bis zum Altern des Tieres anhält. Ähnliche Schlüsse zieht auch O. Swezy aus Untersuchungen an Ratteneierstöcken. Auch Evans und Swezy (1931) nehmen das Entstehen neuer Eizellen aus dem Oberflächenepithel beim Meerschweinchen, bei der Ratte, der Katze und dem Hund, besonders zur Zeit des Östrus, an. Diese Verfasser nehmen an, daß bei der Frau Eizellen während der Geschlechtsreife entstehen. Sehr wichtig sind auch die Beobachtungen von Papanicolaou (1924) an radiumbestrahlten und normalen Eierstöcken des Meerschweinchens. Nach Ansicht dieses Verfassers dauert die Bildung der Eizellen bis zum Schluß der Geschlechtsaktivität. Sowohl gute Ernährung als auch der Östralzustand erhöht die Intensität dieses Prozesses, während die An-

wesenheit von gelben Körpern sie herabsetzt. Papanicolaou spricht die Meinung aus, daß neben Eizellen aus dem Oberflächenepithel auch Zellen des Follikelepithels und interstitielle Zellen entstehen. Im Eierstock des juvenilen Weibchens entstehen Oozyten und interstitielle Zellen in großer Anzahl, im Eierstock des reifen Weibchens bilden sich dagegen reichlicher Primärfollikel und Luteinzellen. Die entstandenen Oozytengruppen differenzieren sich häufig in interstitielle Zellen und tragen Anzeichen einer fettartigen Degeneration. Im Oberflächenepithel kommen Mitosen so selten vor, daß man eher annehmen sollte, daß die Oogonien ohne vorhergehende Teilung zu Oozyten auswachsen, wobei diese Veränderung der Zellen nur in manchen Partien des Oberflächenepithels auftreten kann, wohl infolge einer besseren Durchblutung und Ernährung der letzteren. Von anderen Ergebnissen erwähne ich nur diejenigen von Robinson (1918), der für die Fledermaus die Bildung von Eizellen aus dem Oberflächenepithel bei erwachsenen Tieren annimmt.

Manche Verfasser sprechen sich jedoch gegen die Ansicht aus, daß Eizellen beim geschlechtsreifen Tier entstehen können. Ihrer Meinung nach bedeutet die Anwesenheit großer Zellen im Oberflächenepithel keineswegs, daß aus den letzteren Eizellen entstehen sollten und zwar deswegen, weil im Chromatin ihrer Kerne die für die Ovogenese charakteristischen Veränderungen nicht beobachtet wurden (Cowperthwaite bei der Ratte) (1925). Cowperthwaite fand auch die von Allen beschriebene periodische Proliferation des Oberflächenepithels im erwachsenen Eierstock nicht wieder, genau so wie sie Kingsbury (1917) bei der Katze und Brambell (1927) bei der Maus nicht feststellen konnte.

Bei einer genauen histologischen Untersuchung der Eierstöcke des Igels während des Jahreszyklus, und der Eierstöcke juveniler Tiere stellte ich eine ganze Anzahl von Tatsachen fest, die dafür sprechen, daß bei dieser Tiergattung die Eizellen möglicherweise im postembryonalen Leben entstehen, und zwar bemerkte ich, daß die Zahl der primären Follikel im Eierstock großen Schwankungen unterworfen ist, je nach der Periode, aus der das untersuchte Material stammt. Es zeigte sich, daß die größte Anzahl von Follikeln während des Östrus, d. h. von Mitte April bis ungefähr Ende Juli auftritt, in der Anöstralperiode dagegen sich die ge-

ringste Anzahl von Follikeln entwickelt. In den Zwischenzeit kann man beobachten, wie beim Übergang von der Östralperiode zum Anöstrus die Anzahl derselben allmählich geringer wird, und wie, umgekehrt, beim Übergang vom Anöstrus zum Östrus die Zahl derselben im Eierstock wächst. Die Veränderungen in der Anzahl der Primärfollikel, welche mit dem Jahreszyklus in einem engen Zusammenhang stehen, lassen sich am leichtesten durch die Annahme erklären, daß neue Primärfollikel während des Östrus aus dem Oberflächenepithel entstehen, obwohl dieser Prozeß auch während des Anöstrus nicht gänzlich stillsteht. Es wäre nämlich schwer, auf eine andere Weise die periodischen Veränderungen der Zahl der Primärfollikel in den Eierstöcken erwachsener Igel zu erklären. Auch die histologischen Bilder sprechen für diese Annahme.

Wie schon im vorgehenden Kapitel erwähnt, ist das Oberflächenepithel aus einer einfachen Zelllage aufgebaut, deren Grundlage eine Basalmembran bildet. An den Stellen, wo ein Follikel oder ein *Corpus luteum* sich stark über der Oberfläche des Eierstocks wölbt, sind die Zellen des Oberflächenepithels abgeflacht, in den anderen Teilen dagegen, vor allem in den Vertiefungen des Eierstocks ist das Oberflächenepithel zu einem mehrschichtigen umgebildet und seine Zellen nehmen eine kubische oder spindelförmige Gestalt an, wie das auf Abb. 9, Taf. 31 sichtbar ist. Derartige Zellen befinden sich auch, einzeln oder in Gruppen, in der *Zona parenchymatosa* des Eierstocks. Es ist also wahrscheinlich, daß dieselben vom Oberflächenepithel aus ins Innere des Eierstocks vordringen, wobei sie oft Zellgruppen bilden, wie das auf Abb. 10 (1) sichtbar ist, die ganz nahe unter der Oberfläche des Eierstocks liegen und deutlich von der Umgebung abgegrenzt sind. Auf derselben Abbildung ist auch ein Strang von Oberflächenepithelzellen sichtbar, welche ins Innere des Eierstocks vordringen (2). Die aus dem Oberflächenepithel stammenden Zellen unterscheiden sich von Parenchymzellen des Eierstocks, sowohl durch ihre Gestalt wie auch durch ihre Färbbarkeit. Evans und Swezy (1931) beobachteten das Eindringen von Oberflächenepithelzellen ins Innere des Eierstocks auch beim Meerschweinchen, bei der Ratte, der Katze, beim Affe, beim Hund und beim Menschen. Meiner Meinung nach muß man annehmen, daß an gewissen Stellen der Oberfläche des Eierstocks das Oberflächenepithel proliferiert und

auf diese Weise einzelne Zellen oder auch Gruppen solcher Zellen entstehen, die ins Parenchym des Eierstocks zu liegen kommen und sich später in Eizellen umbilden. Die Proliferation der Oberflächenepithelzellen kommt beim Igel sehr häufig vor, und das sogar auch während des Anöstrus. Sie tritt sowohl bei reifen Tieren auf wie auch bei nur einige Wochen alten Weibchen. Ich konnte auch nicht beobachten, daß die Anwesenheit der gelben Körper das Eindringen der Oberflächenepithelzellen ins Innere des Eierstocks bedeutend beeinflusste, wie das Papanicolaou für das Meerschweinchen angibt. Rasmussen (1918) beobachtete bei einem anderen winterschlafenden Tier, dem Waldmurmeltier (*Marmota monax*), ähnliche Bilder. Der Igel verhält sich also in dieser Hinsicht so wie die anderen bisher untersuchten Tierarten. Die einzige Schwierigkeit für die Erklärung der Epithelproliferation liegt in der Tatsache, daß ich trotz genauesten Nachforschungen nur ein einziges Mal eine Mitose in einer Oberflächenepithelzelle auffinden konnte. Es ist möglich, daß die Teilungsaktivität in gewissen Teilen des Oberflächenepithels nur kurze Zeit dauert, weshalb man für gewöhnlich nur sich nichtteilende Zellen sieht. Auf jeden Fall kann man ohne die Annahme von Zellteilungen im Oberflächenepithel das Entstehen der mehrschichtigen Epithelpartien nicht erklären. Ich muß hier noch hervorheben, daß ich oft Zellteilungen im Oberflächenepithel als Folge von Injektionen gonadotroper Hormone beobachten konnte (siehe das Kapitel über den Einfluß gonadotroper Hormone auf den Eierstock).

Eine genaue Untersuchung der Schnitte ergibt, daß sowohl den Epithelzellen an der Eierstockoberfläche wie auch unter den ins Innere vertieften, sich Übergangsstadien zwischen Epithelzellen und bereits deutlich differenzierten Ureizellen befinden.

Auf Abb. 11, Taf. 31 ist eine (x) der Oberflächenepithelzellen durch ihre Größe und den Aufbau ihres Chromatingerüsts erkennbar, von der ich annehme, daß sie sich im Zustand der Differenzierung in eine Ureizelle befindet. Auf Abb. 12 befinden sich neben Primärfollikeln eingesunkene Oberflächenepithelzellen, von denen eine für das Urei gehalten werden kann (a), während die das Urei umgebenden zwei anderen Zellen des zukünftigen Follikelepithels sind (b). Auf Abb. 13, Taf. 31 endlich sind weitere Entwicklungsstadien der Primärfollikel dargestellt. Neben einem älteren Primärfollikel liegen noch sehr junge Primärfollikel (x). Meiner Meinung

nach entstehen die Primärfollikel entweder aus ins Innere des Eierstocks gesunkenen Oberflächenepithelzellen, oder auch bilden sich aus den Oberflächenepithelzellen am Ursprungsort aus. Auf Abb. 14 sind zwei an der Eierstockoberfläche liegende Primärfollikel sichtbar, die ohne Epithelzellenbedeckung sind. Es sind das wahrscheinlich Follikel, deren Eizellen aus Zellen des Epithels innerhalb derselben entstanden sind. Auf Abb. 15 sieht man vier Primärfollikel in einer Reihe angeordnet, deren erster ganz nahe der Eierstockoberfläche liegt. In diesem Fall entstanden die Follikel aus eingesunkenen Oberflächenepithelzellen. Der auf Abb. 16 dargestellte Primärfollikel erlag wahrscheinlich während seiner Entwicklung einer Verschiebung und schob sich sekundär von unten an die Eierstockoberfläche zwischen die Oberflächenepithelzellen zurück.

Es kommt vor, daß eine größere Anzahl von eingesunkenen Oberflächenepithelzellen sich zu Eizellen umbildet, wie das auf Abb. 17 sichtbar ist, wo über zehn Ureizellen von einer gemeinsamen Lage Follikelepithelzellen umgeben sind. Solche Gruppen werden jedoch später durch das Eindringen der Follikelepithelzellen zertrennt, wofür sowohl das mikroskopische Bild als auch das Nichtvorhandensein der vieleiigen Graaf'schen Follikeln beim Igel spricht. Ich muß hervorheben, daß ich im Bereich derartiger Ureizellengruppen in keinem Fall Degenerationserscheinungen beobachtete.

Auf Grund der angeführten Beobachtungen nehme ich an, daß beim Igel die Eizellen auch während der Geschlechtsreife aus dem Oberflächenepithel entstehen und daß dieser Prozeß zwar den höchsten Intensitätsgrad während des Östrus erreicht, aber auch im Anöstrus stattfindet. Wie nämlich aus Abb. 18, Taf. 32. ersichtlich ist, die den Durchschnitt eines anöstralen Eierstocks darstellt, befinden sich innerhalb derselben deutlich sichtbare Gruppen von Oberflächenepithelzellen (x), welche unter der Oberfläche und im Inneren des Eierstocks gelegen sind.

Über die sogenannten parthenogenetischen Teilungen der Eizellen im Eierstock des Igels.

Die erste Beschreibung von Furchungen der Eizellen im Inneren der Graaf'schen Follikel stammt von Morel aus dem Jahre 1864. Den zwingenden Beweis für die Möglichkeit einer

parthenogenetischen Entwicklung der Eizelle erbrachte jedoch erst L. Loeb (1911), welcher die Eierstöcke junger Meerschweinchen histologisch untersuchte. Von den neueren Verfassern beschreibt auch Zakolska (1929) die Anfänge einer Furchung der Eier in den Graaf'schen Follikeln bei der weißen Ratte. Eine genaue Zusammenstellung der Untersuchungen über die parthenogenetische Entwicklung des Säugetiereies befindet sich in dem Buch von Rostand (1938).

In dem mir zugänglichen Schrifttum fand ich nur eine Arbeit von Cognetti de Martiis (1930) über die normale und anormale Ovogenese beim Igel, welche jedoch von den späteren Forschern unberücksichtigt geblieben ist. Cognetti de Martiis stützte seine Beschreibung auf ein ziemlich spärliches Material, da ihm nur die Eierstöcke von zwei trächtigen und einem juvenilen Weibchen zur Verfügung standen. Dieser Verfasser beschreibt einige Fälle von Teilungen der Eizelle im Graaf'schen Follikel, wobei er sich jedoch nicht ausdrücklich äußert, ob es sich um parthenogenetische Teilungen handelt, oder um Fragmentationserscheinungen an der Eizelle.

In meinem Material sah ich sehr oft verschiedene Stadien von Reduktionsteilung der Eizellen, und das sowohl im Sommer als auch im Winter. Neben normal verlaufenden Reduktionsteilungen, wie sie auf den Abb. 1 und 19 sichtbar sind, und die die Anaphase der ersten Reduktionsteilung darstellen, kommt die Reduktionsteilung und die Bildung des Richtungkörpers am häufigsten in Graaf'schen Follikeln im Zustand der Degeneration vor, welche letztere im Zytoplasma der Eizelle sichtbar ist. Es entstehen in demselben größere stark mit Eosin färbbare Körner, wobei die *Zona pellucida* auch hyalinisiert ist. In solchen degenerierten, im Graaf'schen Follikel eingeschlossenen Eizellen kann die Reduktionsteilung schon deswegen einen anormalen Verlauf nehmen, weil nicht alle Chromosomen nach der Teilung zusammenhängende Gruppen bilden, sondern einige derselben sich von den übrigen abtrennen können. So ist z. B. auf Abb. 20 eine Gruppe von Chromosomen nach der ersten Reduktionsteilung sichtbar, während etwas unterhalb derselben vier deutliche Chromosomen auf einer kleinen Spindel ohne Polstrahlungen angeordnet sind. Auf anderen Schnitten desselben Eis sieht man nur eine größere Chromosomengruppe, welche in dem sich abtren-

nenden ersten Richtungskörper gelegen ist. Wahrscheinlich trennten sich also während der ersten Reduktionsteilung einige Chromosomen von den übrigen, welche zur Zeit, wo die anderen Chromosomen sich schon am Anfang der Telophase befanden, das Stadium der Metaphase noch nicht überschritten hatten. Möglicherweise hat die von mir oft beobachtete verschiedene Kerngröße in der Eizelle ihren Ursprung in einer unregelmäßigen Reduktionsteilung. Die von der Hauptgruppe abgetrennten Chromosomengruppen können nämlich später Ruhekerne bilden, deren Größe von der Anzahl der in ihnen enthaltenen Chromosomen abhängt, was die von mir beobachteten Bilder bestätigen.

Der von einer Furche abgetrennte Richtungskörper ist häufig in den degenerierenden Follikeln sehr groß, wobei sich seine Chromosomen zu einem Ruhekerne umbilden können. In solchen Fällen hat der erste Richtungskörper das Aussehen eines etwas verkleinerten Blastomeren, wie das Abb. 21 zeigt. In manchen Fällen zerfällt jedoch, wie man auf Abb. 22 sieht, das Zytoplasma der degenerierten Eizelle in einige Teile. In zwei von denselben ist je ein Kern enthalten, wobei einer dieser Kerne unzweifelhaft der Kern einer Eizelle ist, während der zweite zum ersten Richtungskörper gehört. Außerdem sieht man noch zwei kleine abgetrennte Zytoplasmateile, die wenige Chromosomen enthalten, die sich noch nicht zu Ruhekerne umgebildet haben. Es sind das wahrscheinlich Chromosomen, die während der Reduktionsteilung von der Hauptgruppe der Chromosomen abgetrennt wurden oder sind es auch Richtungskörper, von denen jeder von einem der zwei großen Kerne ausgestoßen wurde. In derselben Eizelle sind auch abgetrennte Zytoplasmateile ohne Kerne enthalten.

Neben den beschriebenen Störungen im Verlauf der Reduktionsteilung, fand ich häufig einen degenerativen Zerfall der Eizelle in eine größere Anzahl ungleicher Teile, von denen einige kernlos sind, andere dagegen mit einer sogar ansehnlichen Kernzahl versehen sein können. Auf Abb. 23 sieht man eine dieser Eizellen, die im Vergleich mit anderen ähnlich zerteilten in verhältnismäßig wenige Einzelteile zerfallen ist, wobei diese Teile, wie aus der Abbildung ersichtlich ist, kernlos sind und in ihrem Plasma deutliche Degenerationserscheinungen aufweisen.

Da die beschriebenen Teilungen der Eizelle ausschließlich in degenerierten Graaf'schen Follikeln vorkamen und da die abge-

rennten Teile oft kernlos waren, kann ich diese Teilungen nicht als eine parthenogenetische Entwicklungsform der Eizelle betrachten, sondern nur als das Anzeichen einer Fragmentation des Zytoplasmas sowie möglicherweise auch der Kerne als Folge einer Degeneration des ganzen Eies. Die Tatsache, daß man häufig in degenerierenden Follikeln auf eine Reduktionsteilung stößt, deren Verlauf, wie beschrieben, unregelmäßig sein kann, stimmt mit den Beobachtungen anderer Verfasser überein, welche auch an anderem Material feststellten, daß Reduktionsteilungen sehr häufig in degenerierenden Follikeln auftreten (Flemming, Henneguy, Sobotta, Janosik, Rabl, Seitz).

Die beschriebenen Fragmentationserscheinungen kommen sehr häufig während des ganzen Jahreszyklus vor, treten jedoch in der Anöstralperiode am häufigsten auf.

Einfluß der gonadotropen Hormone auf den Eierstock des Igels.

B. Zondek (1935) beschreibt die Wirkung gonadotroper Hormone auf den Eierstock winterschlafender Tierarten, und zwar bei Fledermäusen, von denen er angibt, daß die Ovulation und die Befruchtung der Eizelle durch die im Uterus befindlichen Spermien im Winter unter dem Einfluß von Prolaninjektionen stattfindet. Während meiner Untersuchungen am Igel injizierte ich gonadotrope Hormone nicht nur den winterschlafenden Tieren, sondern auch Weibchen zur Zeit des Östrus, um mich zu überzeugen, ob der Eierstock in beiden Fällen gleichartig reagieren würde. Die während des Sommers untersuchten Weibchen erhielten einige Tage lang täglich je 500 Einheiten Pregnyl, wonach die Tiere zwecks histologischer Untersuchung der Eierstöcke getötet wurden. Während des Winters injizierte ich den schlafenden Weibchen dieselbe Menge Pregnyl, außerdem wurde einigen von ihnen der Auszug von zerriebenen Rindshypophysen verabreicht. Makroskopisch hatten die Eierstöcke der im Sommer und im Winter mit gonadotropen Hormonen behandelten Weibchen das selbe Aussehen. Die Eierstöcke waren vergrößert, sie wiesen viele große Graaf'sche Follikel auf, Blut war jedoch nicht ausgetreten.

Die makroskopische Untersuchung der Eierstöcke erwies jedoch neben Ähnlichkeiten auch gewisse Unterschiede. Von gemeinsamen Eigenschaften möchte ich vor allem die große Anzahl

geplatzter Graaf'scher Follikel hervorheben (Abb. 24). Die Ovulation, deren spontanen Verlauf ich sonst beim Igel nicht beobachten konnte, erfolgt unter der Einwirkung der gonadotropen Hormone. Die Ovulation tritt jedoch leichter im Sommer auf als im Winter, weshalb man bei Weibchen, denen im Sommer gonadotrope Hormone injiziert wurden, weit häufiger geplatzte Graaf'sche Follikel antrifft. Die geplatzten Follikel luteinisieren und auf diese Weise entstehen die einzigen *Corpora lutea ovulationis*, die ich an meinem Material beobachten konnte. Ich konnte also die gelben Körper der Ovulation, die nach Deanesly beim Igel in England normalerweise vorkommen, nur durch Behandlung mit gonadotropen Hormonen erzielen.

Als den ersten Unterschied, welcher zwischen der Reaktion der Eierstöcke im Sommer und derjenigen im Winter auf die gonadotropen Hormone beobachtet wird, erwähne ich die häufige Luteinisierung der Graaf'schen Follikel mittlerer Größe im Sommer und das Austreten kleiner Blutmengen im Inneren der Follikel (Abb. 25), was im Winter nicht vorkommt. Außerdem rufen die gonadotropen Hormone sogar im Winter eine lebhafte Proliferation des Oberflächenepithels hervor, wobei man, wie schon erwähnt, an den Zellen des Oberflächenepithels Teilungen beobachten kann. Während jedoch im Sommer die proliferierenden Zellen rasch luteinisieren (Abb. 24 und Abb. 26 x), erfolgt im Winter die Luteinisierung dieser Elemente nur selten, die Mehrzahl derselben bildet sich in Eizellen und Follikelepithelzellen um, wodurch sich die Anzahl der Primärfollikel vergrößert. Die verschiedene Reaktion des Eierstocks auf die gonadotropen Hormone im Winter und im Sommer beweist, daß der Zustand des Eierstocks sich je nach der Periode des Zyklus ändert.

Die Reaktion des durch gonadotrope Hormone oder durch einen Auszug des Hypophysenvorderlappens stimulierten Eierstocks (ich konnte keinerlei bedeutende Unterschiede in der Wirkung dieser beiden Faktoren feststellen) ist also nicht nur verschieden im Sommer und im Winter, sondern auch schwächer in der letzteren Jahreszeit. In beiden Fällen wirken diese Faktoren auf die Graaf'schen Follikel und auf aus dem Epithel stammende Zellen, also auf jeden Fall auf Teile des Epithels, aber die Einwirkung derselben ruft im Sommer eine schnellere und intensivere Reaktion dieser Teile hervor als im Winter. Sko-

wron (1938), der Igel Männchen untersuchte, macht ebenfalls auf die Möglichkeit einer verschiedenen und periodischen Empfindlichkeit der akzessorischen Geschlechtsorgane den Hodenhormonen gegenüber aufmerksam, in letzter Zeit machte Duszyńska (1938) die Beobachtung, daß die Empfindlichkeit kastrierter Mäuse dem Follikelhormon gegenüber von der Jahreszeit abhängt. In all diesen Fällen kann fast als sicher angenommen werden, daß die Organe je nach der Jahreszeit endokrinen Faktoren gegenüber verschieden empfindlich sind.

Zusammenfassung der Ergebnisse.

1. Der Östrus dauert beim Igelweibchen in Polen kürzer als in England. Trächtige Weibchen kommen ab Ende April bis Juli vor. Im Gegensatz zu den in England gemachten Beobachtungen konnte ich das Vorkommen einer spontanen Ovulation, der gelben Körper der Ovulation sowie derjenigen der Pseudoschwangerschaft nicht feststellen.

2. Die von der Periode, in welcher das Tier untersucht wurde, abhängigen histologischen Unterschiede im Eierstock beziehen sich auf die Anzahl und die Größe der Graaf'schen Follikel, die Degeneration derselben, wie auch auf die Veränderungen im bindgewebigen Substratum und in der Durchblutung des Eierstocks. Parallel mit diesen Veränderungen treten solche auch im histologischen Bau der Uterushörner auf.

3. Die mikroskopischen Befunde sprechen für das Entstehen von Eizellen aus Zellen des Oberflächenepithels beim Igel während der ganzen postembryonalen Lebensperiode.

4. Die sogenannten parthenogenetischen Teilungen der Eizellen im Eierstock des Igels sind meiner Meinung nach als Anzeichen einer Degeneration der Eizelle zu betrachten.

5. Die gonadotropen Hormone rufen eine Ovulation hervor. Die Reaktion des Eierstocks auf diese Faktoren hängt von der Periode ab, in welcher den Weibchen die gonadotropen Hormone injiziert wurden. Die Eierstöcke reagieren im Winter anders als im Sommer.

(Aus dem Biologisch-Embryologischen Institut der Jagellonischen Universität, Leiter: Prof. Dr Emil Godlewski und aus der Abteilung für Zoologie des Pharmazeutischen Studiums derselben Universität).

Ausgeführt mit Unterstützung des Tyszkowski-Fonds.

Schrifttum.

- 1) Allen E.: Amer. Journ. Anat., v. 31, 1922. — 2) Arai H.: Amer. Journ. Anat., v. 27, 1920. — 3) Brambell F. W. R.: Proc. Roy. Soc. London S. B., v. 101, 1927. — 4) Brambell F. W. R.: Phil. Trans. Roy. Soc. London S. B., v. 225, 1935. — 5) Butscher E. O.: Anat. Rec., v. 37, 1927. — 6) Cognetti de Martiis L.: Boll. Mus. Zool. Anat. comp. d. Univ. d. Genova, v. 10, 1930. — 7) Deanesly R.: Phil. Trans. Roy. Soc. London S. B., v. 223, 1934. — 8) Duszyńska J.: Acta Biol. Exper., v. 12, 1938. — 9) Evans H. M. and Swezy O.: Mem. Univ. Calif., v. 9, 1931. — 10) Herter K.: Zool. Jahrb. Abt. Syst. Ökol. Geogr. d. Tiere, B. 65, 1933. — 11) Herter K.: Zeitschr. f. Säugetierk. B. 8, 1933. — 12) Hubrecht A. A. W.: Quart. Journ. micr. Sc., v. 30, 1890. — 13) Klein M.: Proc. Roy. Soc. London S. B., v. 125, 1938. — 14) Niezabitowski E. L.: Klucz do oznaczania zwierząt ssących Polski, Kraków 1933. — 15) Papanicolau G. N.: Proc. Soc. Exper. Biol. Med., v. 21, 1924. — 16) Rasmussen A. T.: Endocrinol., v. 2, 1918. — 17) Robinson A.: Trans. Roy. Soc. Edinb., v. 52, 1918—19. — 18) Rostand J.: La parthénogénèse des Vertébrés. Paris 1938. — 19) Schottlaender J.: Arch. f. mikr. Anat., B. 41, 1893. — 20) Schrön O.: Zeitschr. f. wissenschaftl. Zool., B. 12, 1863. — 21) Schröder R.: Handb. d. mikr. Anat. d. Menschen, B. VI, 1930. — 22) Skowron S.: Bull. Acad. Pol. Sc., 1938. — 23) Skowron S. und Keller T.: Zeitschr. f. Zellf. u. mikr. Anat., B. 21, 1934. — 24) Swezy O.: Quart. Rev. Biol., v. 8, 1933. — 25) Swezy O. and Evans H.: Proc. Soc. Exper. Biol. Med., v. 27, 1929. — 26) Zakolska Z.: Fol. Morph., v. 1, 1929. — 27) Zondek B.: Hormone des Ovariums etc. 1935. — 28) Heys F.: Quart. Rev. Biol., v. 6, 1931.

Erklärung der Abbildungen auf den Tafeln 31—32.

Abb. 1. Anaphase der ersten Reduktionsteilung. Vergr. ungefähr 750 ×. Mikrophoto.

Abb. 2. Eierstock des Igels seit Beginn des Östrus. Erklärungen im Text. Vergr. ungefähr 20 ×. Mikrophoto.

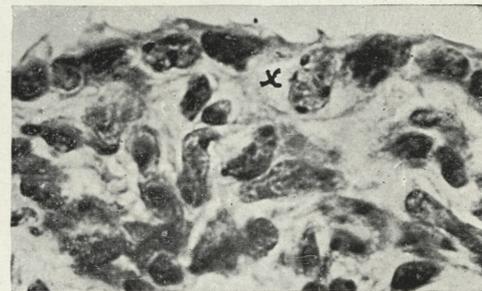
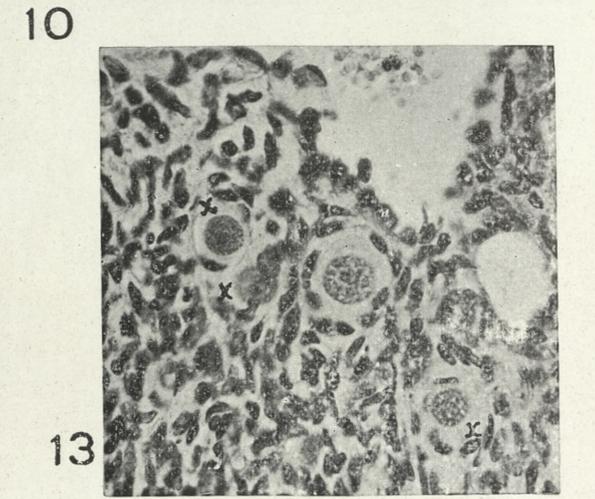
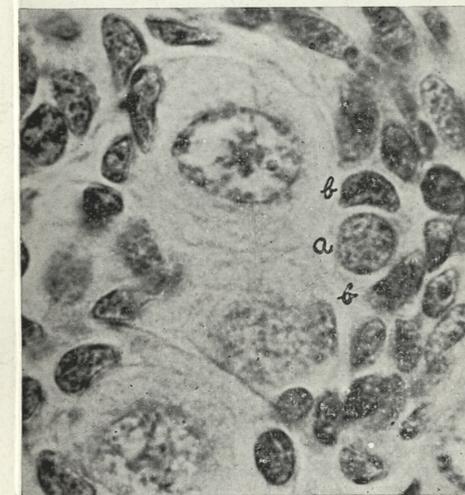
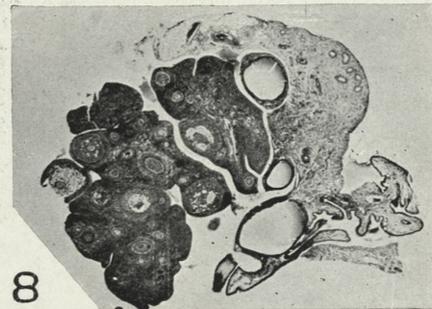
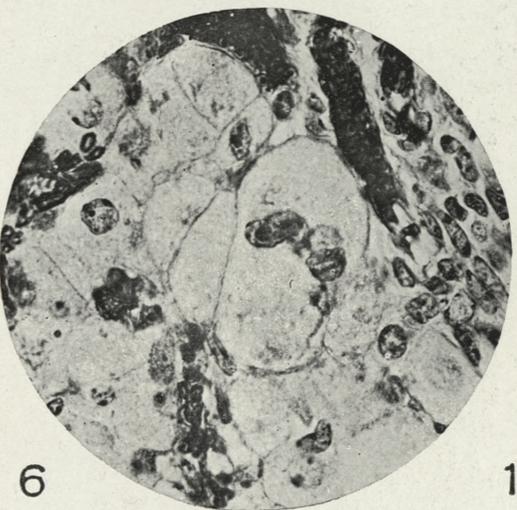
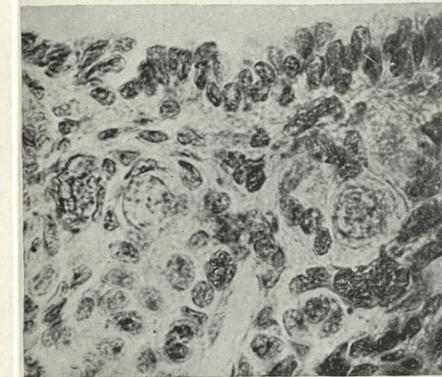
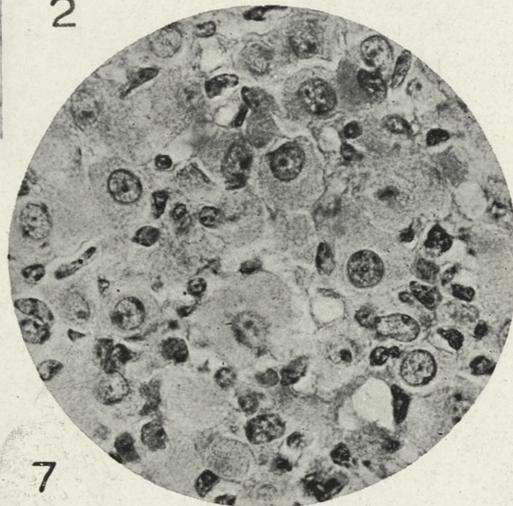
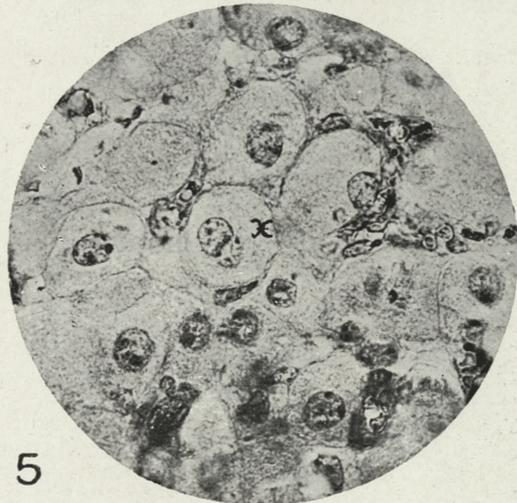
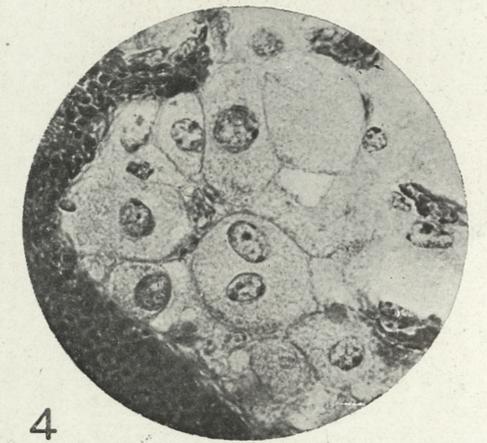
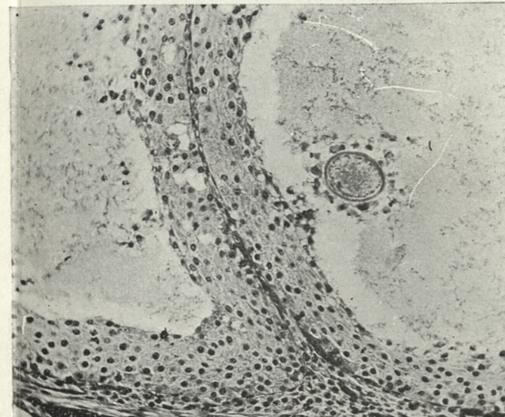
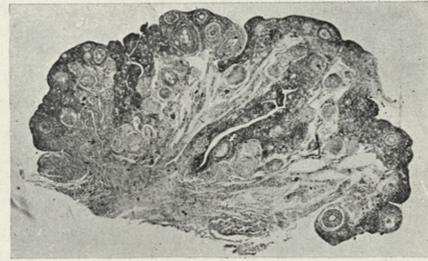
Abb. 3. Degeneration eines Graaf'schen Follikels und der Eizelle, welche die Richtungsfurur ausstößt. Die Zellen der Granulosa sind luteinisiert. Vergr. ungefähr 140 ×. Mikrophoto.

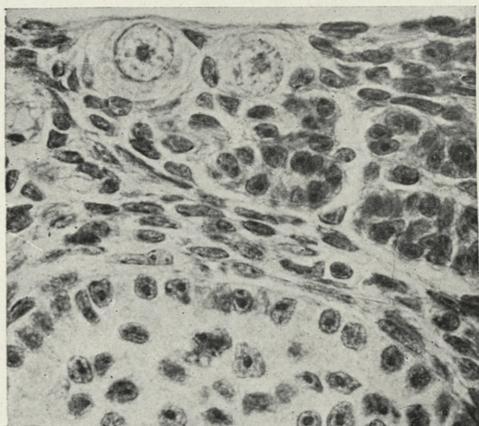
Abb. 4. Die zweikernige Luteinzelle eines gelben Körpers. Vergr. ungefähr 750 ×. Mikrophoto.

Abb. 5. Die zweikernige Luteinzelle eines gelben Körpers. Vergr. ungefähr 750 ×. Mikrophoto.

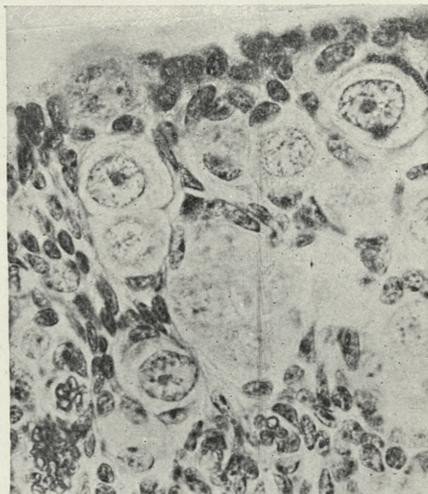
Abb. 6. Vielkernige Luteinzelle eines gelben Körpers. Vergr. ungefähr 750 ×. Mikrophoto.

Abb. 7. Luteinzellen eines gelben Körpers unmittelbar nach der Geburt. Vergr. ungefähr 750 ×. Mikrophoto.

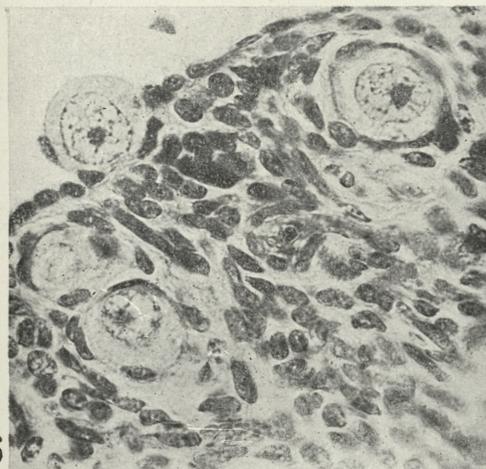




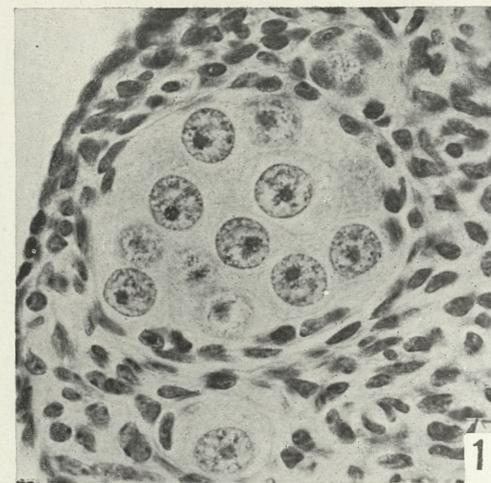
14



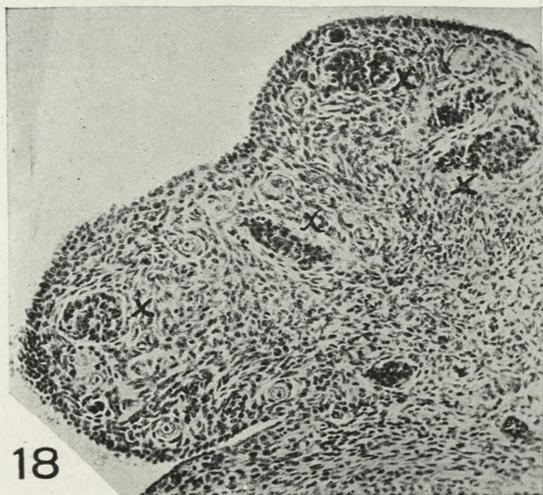
15



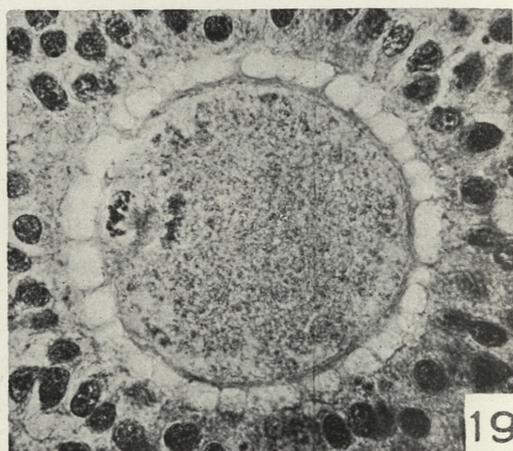
16



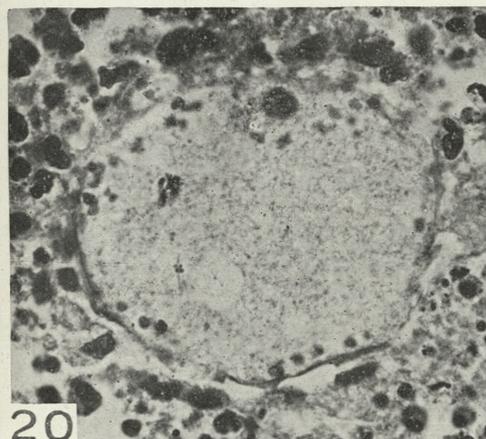
17



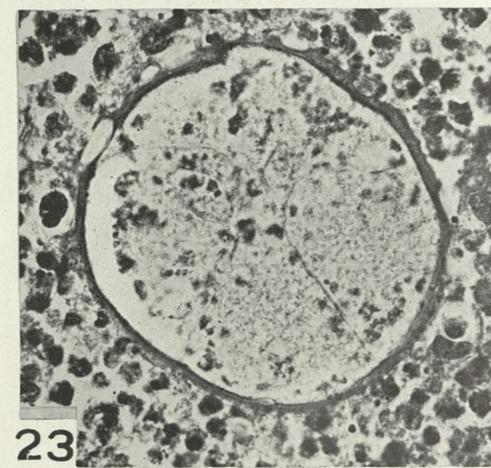
18



19



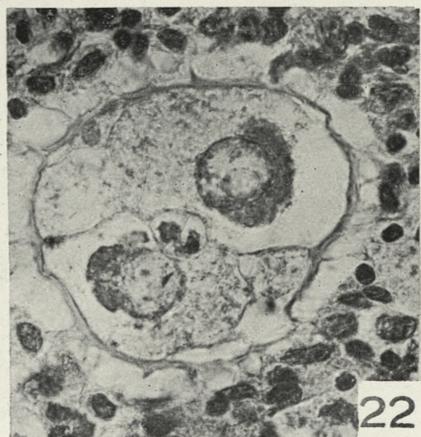
20



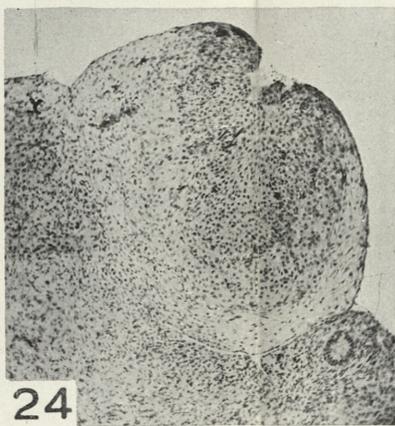
23



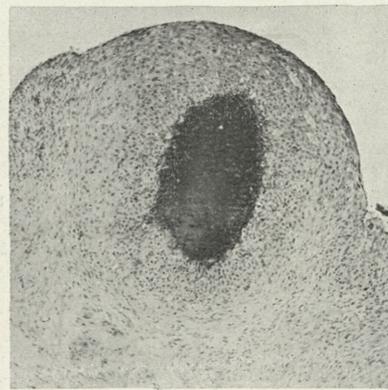
21



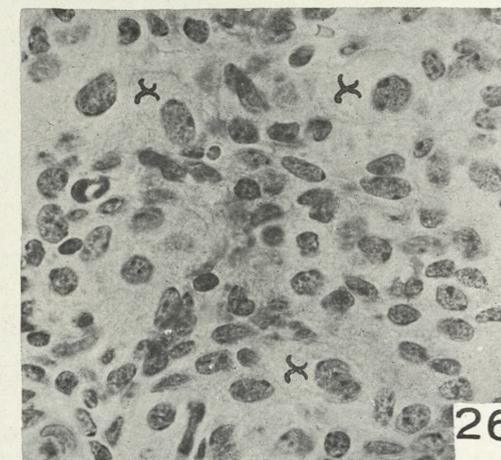
22



24



25



26

1844. 1845. 1846. 1847. 1848. 1849. 1850. 1851. 1852. 1853. 1854. 1855. 1856. 1857. 1858. 1859. 1860.

Abb. 8. Eierstock aus dem Anöstrus. Erklärungen im Text. Vergr. ungefähr $20 \times$. Mikrophoto.

Abb. 9. Teil eines mehrschichtigen Oberflächenepithels, aus kubischen und spindelförmigen Zellen zusammengesetzt. Vergr. ungefähr $750 \times$. Mikrophoto.

Abb. 10. Vordringen der Oberflächenepithelzellen (2) in das Stroma und eine abgegrenzte Gruppe (1) derselben unter der Oberfläche des Ovariums. Erklärungen im Text. Vergr. ungefähr $750 \times$. Mikrophoto.

Abb. 11. Eine mit \times bezeichnete, sich vergrößernde Oberflächenepithelzelle. Erklärungen im Text. Vergr. ungefähr $1500 \times$. Mikrophoto.

Abb. 12. Umbildung der Oberflächenepithelzellen, die sich im Stroma befinden, in eine Ureizelle (a) und in Zellen des Follikelepithels (b). Vergr. ungefähr $1500 \times$. Mikrophoto.

Abb. 13. Sehr junge Primärfollikel mit \times bezeichnet, die durch Umbildung der Oberflächenepithelzellen entstanden sind. In der Mitte liegt ein etwas älterer Primärfollikel. Vergr. ungefähr $750 \times$. Mikrophoto.

Abb. 14. Primärfollikel, welche an der Oberfläche des Eierstocks liegen, unter welchen drei aus Oberflächenepithelzellen zusammengesetzte Gruppen liegen. Vergr. ungefähr $750 \times$. Mikrophoto.

Abb. 15. In einer Reihe angeordnete Primärfollikel. Erklärungen im Text. Vergr. ungefähr $750 \times$. Mikrophoto.

Abb. 16. Ein Primärfollikel, welcher der Eierstockoberfläche aufliegt. Neben ihm (rechts) zwei wachsende Oberflächenepithelzellen. Vergr. ungefähr $750 \times$. Mikrophoto.

Abb. 17. Eine große, von einer gemeinsamen Lage Follikelepithelzellen umgebene Eizellengruppe. Erklärungen im Text. Vergr. ungefähr $750 \times$. Mikrophoto.

Abb. 18. Ein Teil des Eierstocks aus dem Anöstrus. Mit \times sind die Gruppen der Oberflächenepithelzellen, welche im Stroma liegen, bezeichnet. Erklärungen im Text. Vergr. ungefähr $190 \times$. Mikrophoto.

Abb. 19. Ausstoßung der ersten Richtungsfigur. Vergr. ungefähr $750 \times$. Mikrophoto.

Abb. 20. Anormale Teilungsfigur in einer degenerierten Eizelle. Vergr. ungefähr $750 \times$. Mikrophoto.

Abb. 21. Degeneration der Eizelle. Erklärungen im Text. Vergr. ungefähr $750 \times$. Mikrophoto.

Abb. 22. Degeneration der Eizelle. Erklärungen im Text. Vergr. ungefähr $750 \times$. Mikrophoto.

Abb. 23. Degeneration der Eizelle. Erklärungen im Text. Vergr. ungefähr $750 \times$. Mikrophoto.

Abb. 24. Unter dem Einfluß des gonadotropen Hormons geplatzter und luteinierter Graafscher Follikel, neben welchem eine mit \times bezeichnete luteinisierte Zellgruppe liegt. Vergr. ungefähr $65 \times$. Mikrophoto.

Abb. 25. Unter dem Einfluß des gonadotropen Hormons ausgetretenes Blut im Innern des Graafschen Follikels. Vergr. ungefähr $65 \times$. Mikrophoto.

Abb. 26. Luteinisierte Zellen, welche im Stroma des Eierstocks liegen. Erklärungen im Text. Vergr. ungefähr $750 \times$. Mikrophoto.

*Wpływ niskiej temperatury (do -20°C) na plemniki żaby (*Rana temporaria*). — L'influence de basses températures (jusqu'à -20°C) sur les spermatozoïdes de la grenouille (*Rana temporaria*).*

Mémoire

de M. Z. MENSCHIK,

présenté le 26 juin 1939 par M. E. Godlewski m. t.

(Planche 33).

Introduction.

L'action des basses températures sur la matière vivante est d'une grande importance scientifique, vu le caractère des cellules et de leurs agglomérations qui constituent les tissus dont sont formés les différents organes. Dans les expériences en rapport avec cette question il s'agissait non seulement d'étudier la résistance que diverses plantes et différents animaux offrent à l'action de ces températures, car il fallait élucider également le mécanisme des altérations internes, observées dans la structure morphologique de la matière vivante sous l'influence du froid.

On n'ignore pas que lorsque la température ambiante a fortement baissé, il se forme de la glace aussi bien dans les cellules végétales et animales isolées, que dans les tissus et qu'en conséquence, l'eau est expulsée du protoplasme, n'importe si la congélation a lieu dans les cellules ou entre celles-ci. On admettait que cette expulsion d'eau déterminait les altérations constatées dans la matière vivante, soumise à l'action du froid, néanmoins Metz (1905) était d'un autre avis. A l'en croire, la formation de glace ne jouerait pas de rôle dans les troubles dont s'accompagne la congélation de la matière vivante. Cet auteur cherchait la cause de ces

altérations dans le fait d'arriver au minimum spécifique de température ou point de mort, minimum différent pour les diverses espèces animales ou végétales. Cette hypothèse n'a cependant pas résisté à la critique; en effet, il résulterait du travail de Maxwell (1914) que le fait de retirer de l'eau entraîne un rapprochement excessif des molécules colloïdales du protoplasme et aboutit ainsi à la coagulation mécanique de celui-ci et à des troubles des fonctions vitales.

Au cours de recherches sur l'action de basses températures chez les animaux, on fut frappé par la manière dont se comportaient leurs spermatozoïdes, exposés au froid. La motilité de ces cellules et leur faculté de libérer les énergies latentes de la matière vivante sont autant de propriétés qui rendent susceptibles les spermatozoïdes de se prêter aux recherches expérimentales, d'autant plus qu'ils sont effectivement des cellules isolées, sur lesquelles agit directement la température de l'ambiance.

L'influence de basses températures sur les cellules sexuelles et sur le développement a déjà été étudiée par O. Schultze (1894a, b) et par O. Hertwig (1894) sur des grenouilles et ensuite sur les oursins par Bury (1912, 1913). Ces auteurs se sont cependant occupés surtout de la température de 0° C, sans tenir compte des températures plus basses et se sont particulièrement intéressés à l'action exercée sur le développement. La température de 0° n'a pas d'influence nettement nocive sur les spermatozoïdes; au contraire elle contribue à prolonger leur vie. D'après Bury une basse température réduit probablement au minimum les processus végétatifs, ralentit les mouvements des spermatozoïdes et arrête le développement de la flore bactérienne. Après avoir séjourné 8 jours dans une température de 0°, les spermatozoïdes d'Echinodermes sont encore capables de féconder les oeufs, sans changer leur constitution et sans qu'on ait réussi à constater des altérations quelconques dans ceux-ci. Pawlow (1927) a établi ensuite que les spermatozoïdes de l'Homme et du Cafard (*Periplaneta orientalis*) supportent relativement bien une baisse de la température et une congélation de 10—11 heures. Etudiant l'action de la température sur les spermatozoïdes, Hammond (1930) a constaté enfin que même après un séjour de 16 heures dans une température de 0°, les spermatozoïdes de Lapin sont encore capables de fécondation.

Les recherches brièvement résumées ci-dessus, s'intéressent surtout aux températures voisines de 0°, aussi n'ont-elles pas épuisé le sujet dans toute son étendue. J'ai donc étudié à l'Institut d'Embryologie et de Biologie de l'Université des Jagellons l'influence de basses températures (jusqu'à -20°C) sur les spermatozoïdes de la Grenouille rousse (*Rana temporaria*). Le présent travail a été exécuté sur l'initiative et sous la direction de M. le Professeur Dr Emil Godlewski qui ne ménagea ni sa peine, ni son temps pour me prodiguer ses précieux conseils et indications. Qu'il me soit donc permis de lui exprimer ma profonde reconnaissance et mes plus sincères remerciements.

Mes recherches poursuivaient trois buts; il s'agissait: 1° de connaître le degré de la résistance vitale qu'opposent les spermatozoïdes de grenouille à l'action de basses températures extérieures, 2° de savoir comment retentissent sur la fécondation les altérations déclanchées dans les spermatozoïdes par ces températures, 3° de se rendre compte, si le développement, consécutif à la fécondation par les spermatozoïdes exposés à une basse température, détermine des troubles et, si c'est le cas, de connaître leur nature.

Le matériel étudié et la technique des expériences et recherches.

Je me suis servi dans mes expériences de grenouilles de l'espèce *Rana temporaria*. Les oeufs employés dans toutes les épreuves étaient normaux, soit ils étaient tirés des voies génitales des femelles, immédiatement après les avoir tuées. Je n'ai fait des expériences que pendant l'oestrus.

Mes recherches comprenaient trois genres d'épreuves: 1) des expériences préliminaires, en vue de fixer les méthodes de recherches, 2) des expériences fondamentales en vue d'étudier l'influence de basses températures sur les spermatozoïdes, 3) des expériences complémentaires pour éclaircir certaines questions en rapport avec le problème central.

Je procédais toujours de la même manière pour exécuter les expériences fondamentales, et ce n'étaient que les températures et la durée des expositions qui variaient.

Désirant obtenir une concentration égale du sperme, je mettais dans 15 cm³ d'eau de fontaine les spermatozoïdes tirés des vési-

cules séminales et des testicules d'un mâle précédemment tué, ensuite je répartissais cette quantité de sperme entre de petites éprouvettes dont chacune en contenait 3 cm³. Avant de m'en servir je les refroidissais jusqu'à la température indiquée par le plan des expériences. J'exposais ensuite ces éprouvettes avec du sperme dans l'appareil électrique de congélation, réfrigéré par système Frigidaire qui conserve automatiquement la température voulue. Une partie du sperme dont la température correspondait à celle du laboratoire (+ 15° C environ), servait de contrôle. Dès que le temps de l'exposition, indiqué par le plan de l'expérience, s'était écoulé, j'examinais *in vivo* au microscope le sperme non coloré (lorsque le sperme était gelé, je le dégelais dans l'espace de 20 minutes), puis j'en faisais des préparations fixées. Me servant de ce sperme réfrigéré, je procédais à la fécondation artificielle des oeufs non réfrigérés, extraits directement d'une femelle que je venais de tuer. Je contrôlais ensuite de temps en temps le développement de ces oeufs et j'en faisais des préparations fixées. Dans les expériences de contrôle, j'examinais parallèlement des oeufs normaux, fécondés par des spermatozoïdes qui n'avaient pas été soumis à l'action de basses températures. Avant chaque expérience, je contrôlais les spermatozoïdes respectivement les oeufs de chaque animal, afin de m'assurer si ceux-ci sont capables de développement normal.

En procédant à la fécondation artificielle, je passais légèrement un pinceau humecté de sperme sur la surface de chaque oeuf.

Les préparations de sperme étaient fixées à l'aide de vapeurs d'acide osmique (Romeis 1932) et ensuite colorées soit avec de la safranine¹⁾, soit par la méthode de Pappenheim (Romeis 1932).

En vue de conserver l'image macroscopique que présentaient les oeufs après la fécondation, ceux-ci étaient fixés à l'aide d'une solution de formaline $\frac{1}{10}$, portée à 80° C.

Lorsqu'il s'agissait de recherches microscopiques, les oeufs étaient fixés soit par le liquide de Bouin acétifié, soit par le liquide d'Allen (Dalcq 1931).

¹⁾ 10 gr de safranine Grüber sont dissous dans une solution préparée avec 155 cm³ d'alcool à 95% et 145 cm³ d'eau distillée. Pour colorer les préparations, 20 cm³ de solution sont étendus de 80 cm³ d'alcool à 50%. La coloration ayant duré 24 h, on procède à la différenciation dans de l'alcool absolu, xylol, baume de Canada.

Ayant fixé les oeufs, j'enlevais leur enveloppe gélatineuse tantôt à l'aide d'aiguilles, la gangue n'adhérant plus après l'avoir traitée par de la formaline $\frac{1}{10}$, portée à 80° C; tantôt je les en débarrassais chimiquement avec de l'eau de Javelle étendue d'alcool (1 partie d'eau de Javelle, 4 parties d'alcool à 80%) et les agitais un moment. Après avoir enlevé chimiquement la gélatine, je rinçais les oeufs avec de l'alcool à 80%, additionné de thiosulfite de soude, afin de lier les restes de chlore, contenus dans l'eau de Javelle.

Une fois débarrassé de l'enveloppe gélatineuse, le matériel était lavé avec de l'alcool à 80%, additionné de carbonate de lithium (Dalcq 1931), puis il était brièvement rincé encore une fois avec de l'alcool à 95%. Je le déshydratais ensuite pendant 20 minutes avec de l'alcool absolu, changé à trois reprises, puis durant 10 minutes je le soumettais à la déshydratation par du benzène que je changeais deux fois. A la température de 53°, je l'imprégnais durant une heure de paraffine que je changeais une fois après 15 minutes, enfin je procédais à l'enrobage dans la paraffine. Je me suis aperçu que ce procédé était le meilleur de tous ceux que j'avais essayé d'appliquer.

Après l'enrobage, j'ai fait des séries continues de coupes dont l'épaisseur oscillait entre 7.5 μ et 10 μ .

Voici comment je colorais les coupes: je dissolvais la paraffine avec du xylol, je saturais d'eau les coupes et les mordançais pendant 24 h dans du liquide faible de Flemming. Les coupes étaient ensuite rincées 10 minutes à l'eau courante et colorées pendant 7 minutes avec de la safranine, préparée selon Dalcq (1931). Après un nouveau rinçage de 10 minutes dans de l'eau de fontaine, les coupes étaient colorées au vert clair de Benda. Dans les coupes ainsi traitées, les chromosomes prenaient une teinte rouge-cerise foncé, les fils de la partie achromatique des cinèses avaient une couleur vert foncé tirant sur le bleu, les globules du deutoplasme se coloraient en rouge et les granules du protoplasme en vert.

Influence d'une basse température sur la motilité, la forme et la vitalité des spermatozoïdes.

Dans les expériences où je me proposais d'étudier l'influence de basses températures sur les spermatozoïdes, le sperme, introduit dans des éprouvettes qui en contenaient 3 cm³, chacune était exposée à la température dont je voulais connaître les effets.

TABLEAU I.

| N° de l'expérience | 71 | 72 | 73 | 74 | 77 |
|--|--------------------|-------------------|--------------------|-------------------|-------------------|
| Température dans l'appareil de congélation | - 9° | - 11° | - 13° | - 15° | - 17° |
| Date de l'expérience | 14. IV. 1936 | 14. IV. 1936 | 14. IV. 1936 | 14. IV. 1936 | 15. IV. 1936 |
| Heure où le sperme était placé dans l'appareil de congélation | 14 ^h 30 | 7 ^h 40 | 14 ^h 30 | 7 ^h 40 | 8 ^h 50 |
| Température du sperme au moment où il était placé dans l'app. d. cong. | + 16° | + 14° | + 16° | + 14° | + 15° |
| A p r è s 5 m i n u t e s | | | | | |
| Heure du contrôle de la température | — | — | — | — | 8 ^h 55 |
| Température du sperme | — | — | — | — | 0° |
| A p r è s 1 5 m i n u t e s | | | | | |
| Heure du contrôle de la température | 14 ^h 45 | 7 ^h 55 | 14 ^h 45 | 7 ^h 55 | — |
| Température du sperme | 0° | 0° | - 3° | - 3·5° | — |
| A p r è s 2 0 m i n u t e s | | | | | |
| Heure du contrôle de la température | — | 8 ^h | — | 8 ^h | — |
| Température du sperme | — | 0° | — | - 6° | — |
| A p r è s 3 0 m i n u t e s | | | | | |
| Heure du contrôle de la température | 15 ^h | 8 ^h 10 | 15 ^h | 8 ^h 10 | 9 ^h 20 |
| Température du sperme | - 4° | - 5° | - 9° | - 11·5° | - 15° |
| A p r è s 4 5 m i n u t e s | | | | | |
| Heure du contrôle de la température | — | 8 ^h 25 | — | 8 ^h 25 | 9 ^h 35 |
| Température du sperme | — | - 9° | — | - 15° | - 17° |
| A p r è s 1 h e u r e | | | | | |
| Heure du contrôle de la température | 15 ^h 30 | 8 ^h 40 | 15 ^h 30 | 8 ^h 40 | — |
| Température du sperme | - 9° | - 10·5° | - 13° | - 15° | — |

Les éprouvettes étaient portées à cette température avant d'y introduire le sperme. Pour pouvoir parler de l'action d'une température donnée sur les spermatozoïdes, toute la quantité de sperme étudié devrait cependant la prendre. Or, il faut un certain temps pour que 3 cm³ de sperme, préparé dans la température du laboratoire, puissent être refroidis p. ex. à -19° , temps pendant lequel la température du sperme passe par toute la gamme des températures, de sorte que les spermatozoïdes subissent un moment leur action. Désirant me rendre compte, combien de temps il faut avant que la température du sperme étudié descend aussi bas, j'ai fait une série d'épreuves supplémentaires, au cours desquelles j'introduisais de petits thermomètres dans le sperme, dont je contrôlais de temps en temps la température. On trouve, à titre d'exemples dans le tableau I des extraits empruntés aux protocoles de ces expériences. L'exposition du sperme à -17° C pendant 5 minutes correspond, à proprement parler, à une baisse de la température de celui-ci à 0° . Le sperme ne prend la température de -17° , que si la température ambiante a agit pendant 40 minutes.

Le diagramme 4 permet de se renseigner sur l'espace de temps, après lequel on arrive à obtenir une baisse de la température donnée dans la portion de sperme étudié.

L'action sur le sperme de grenouille d'une température baissant de $+15^{\circ}$ (laboratoire) à -9° et -20° C.

M'étant proposé d'étudier l'influence de basses températures sur le sperme, je commence par décrire une série d'expériences, dans lesquelles la température de celui-ci baissait de $+15^{\circ}$ (laboratoire) à -9° , -11° , -13° , -15° , -17° et -19° C. Les résultats des épreuves sur le comportement des spermatozoïdes durant la baisse de la température ambiante à -15° , sont autant d'exemples que illustrent les effets que produisent les températures les plus basses que j'ai appliquées. Désirant jeter de la lumière sur les résultats de mes recherches, j'emprunte quelques passages aux protocoles de mes épreuves.

Expérience n° 66.

2. IV. 1936. 16^h15.

Température dans l'appareil de congélation: -15° C.

Couple de grenouilles, tué à 15^h30.

Sperme tiré des testicules et des vésicules séminales, étendu de 15 cm³ d'eau de fontaine.

Les spermatozoïdes et les oeufs sont normaux *in vivo* et dans les préparations fixées.

Trois éprouvettes dont chacune avec 3 cm³ de sperme, sont exposées à la température de — 15°.

Après 15 minutes. 16^h30.

Deux éprouvettes avec du sperme sont retirées de l'appareil de congélation.

Température du sperme, actuellement: — 4°.

Dégèlement après 15 minutes.

Examen *in vivo*:

Sperme de contrôle: normal.

Sperme réfrigéré: Mouvements très vifs. Les spermatozoïdes se meuvent plus vite dans différentes directions que dans le sperme de contrôle et exécutent tous des mouvements, tandis que quelques-uns sont immobiles dans le sperme témoin. L'amplitude des mouvements oscillatoires est plus grande que chez les spermatozoïdes témoins. Activité augmentée. En déplaçant la préparation sur la platine du microscope, j'aperçois après quelques minutes que, formant des rayons et continuant à faire des mouvements certains spermatozoïdes tâchent de pénétrer dans le centre d'une agglomération en voie de se former.

Préparations fixées:

Sperme de contrôle: normal.

Sperme réfrigéré: Tous les spermatozoïdes affectent la forme de baguettes droites et ne sont pas tordus (on en trouve de tordus dans le sperme de contrôle). Ça et là agglomérations radiées.

Expérience n° 69.

4. IV. 1936. 11^h25.

Couple de grenouilles, tué à 11^h15.

Détails, comme dans l'exp. n° 66.

Après 1^h 12^h25.

Deux éprouvettes avec du sperme sont retirées de l'appareil de congélation.

Température actuelle du sperme — 15°.

Dégèlement après 18 minutes.

Examen *in vivo*:

Sperme du contrôle: normal.

Sperme réfrigéré immobile et mort. La plupart des spermatozoïdes sont désagrégés et forment des grumeaux irréguliers. Les spermatozoïdes accusent des courbures irrégulières et leurs têtes sont enroulées en cercles. Les préparations fixées présentent une image pareille.

Toutes les expériences où la température baissait à -9° , -11° , -13° , -15° , -17° et -19° ont donné les mêmes résultats; j'en ai faites plusieurs, voire plus de dix dans chacune de ces températures.

Il résulte des expériences en vue d'étudier l'action de températures au-dessous de -9° , que celles-ci déclenchent dans la première phase une réaction des spermatozoïdes dont les mouvements deviennent plus vifs et que cette réaction est suivie de la formation d'agglomérations d'une structure radiée.

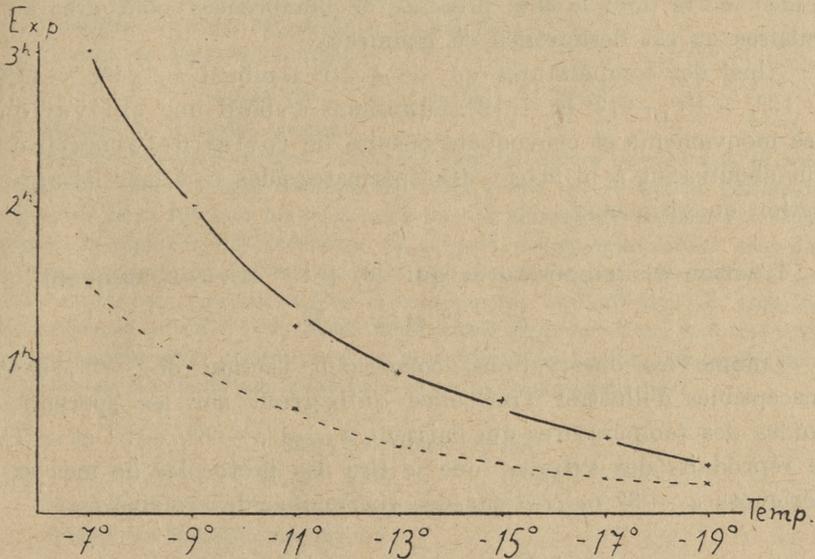


Diagramme 1. Action sur les spermatozoïdes de grenouille de températures qui, de $+15^{\circ}\text{C}$ tombent successivement à -9° , -11° , -13° , -15° , -17° et -19°C . Activation au début, altérations prémortelles et mort des spermatozoïdes dans la suite. La ligne $\times\text{---}\times$ correspond à la limite entre l'apparition de l'activation et la manifestation des altérations prémortelles. Ligne $+\text{---}+$, — limite de la motilité des spermatozoïdes.

Lorsque la réfrigération dure plus longtemps, de sorte que sa durée varie de 10 minutes à une demie heure suivant la température appliquée (v. diagramme 1), les spermatozoïdes présentent des altérations de leur forme, qui précèdent la mort à brève échéance. L'épaisseur de leurs têtes n'est plus constante et leur coloration pas uniforme. Chez quelques échantillons, la tête s'infléchit sous un angle d'à peu près 90° , tandis que la queue exé-

cute des mouvements oscillatoires plus étendus, mais plus lents que les mouvements à l'état normal. Dès que ces mouvements ont cessé, les spermatozoïdes demeurent courbés en permanence sous un angle plus ou moins grand. La tête présente des courbures multiples chez un certain nombre de spermatozoïdes.

Lorsque les spermatozoïdes sont plus longtemps exposés à l'action de basses températures et que cette action s'étend de 20 minutes à 3^h, suivant la température (v. diagramme 1), on observe dans les préparations de sperme réfrigéré des spermatozoïdes morts dont la tête présente de nombreuses courbures angulaires ou est désagrégée en grumeaux.

Ainsi des températures qui de +15° tombent à -9°, -11°, -13°, -15°, -17° et -19°, entraînent d'abord une activation des mouvements et provoquent ensuite de fortes déformations qui aboutissent à la mort des spermatozoïdes et à leur désagrégation en grumeaux.

L'action de températures qui de +15° environ, tombent
à -1° et à -7°.

Comme les observations, concernant l'action de -3°, sont susceptibles d'illustrer l'influence qu'exercent sur les spermatozoïdes des températures qui baissent à -1°, -3°, -5° et -7°, je reproduis des extraits, que je tire des protocoles de mes expériences à -3° *in vivo* sur des spermatozoïdes réfrigérés.

Expérience n° 18.

6. IV. 1935. 10^h

Température dans l'appareil de congélation: -3°.
Sperme de contrôle: normal.

Après 3^h 13^h

Température actuelle du sperme: -3°.
Sperme de contrôle: normal.

Sperme réfrigéré n'accuse, soit *in vivo*, soit dans les préparations fixées aucune altération par rapport au contrôle.

Expérience n° 39.

16. IV. 1935. 11^h

Température dans l'appareil de congélation: -3°.
Sperme de contrôle: normal.

Après 6^h 17^h

Sperme de contrôle: normal.

Sperme réfrigéré *in vivo*: A peu près un tiers des spermatozoïdes font des mouvements qu'ils exécutent plus facilement que les spermatozoïdes à l'état normal. Les mouvements en avant sont accélérés; les oscillations de la tête, lentes mais distinctes, ne décrivent pas d'angles. Parmi les spermatozoïdes immobiles, il en est un certain nombre dont la tête est enroulée. Sur toute l'étendue de la préparation, il n'y avait que deux agrégats, ainsi que quelques agglomérations à disposition non concentrique.

Expérience n° 40.

16. IV. 1935. 21^h30.

Température dans l'appareil de congélation: — 3°.

Sperme de contrôle: normal.

Après 12^h 17. IV. 9^h30.

Sperme de contrôle: normal.

Sperme réfrigéré *in vivo*: Quelques spermatozoïdes se meuvent et exécutent des mouvements oscillatoires de la partie où se trouve l'inflexion angulaire de la tête, ou font des mouvements vibratoires rapides qui intéressent le segment intermédiaire. La plupart des spermatozoïdes sont déformés, par suite de l'inflexion de la tête ou d'une partie de celle-ci. La déformation peut également être la conséquence de l'inflexion du segment intermédiaire ou de la tête. Assez nombreuses agglomérations de forme irrégulière. Après avoir communiqué un mouvement au liquide, les agglomérations ne se relâchent pas d'habitude et ne se désagrègent pas.

Expérience n° 89.

22. IV. 1936. 17^h30.

Température dans l'appareil de congélation: — 3°.

Sperme de contrôle: normal.

Après 15^h 23. IV. 8^h30.

Sperme de contrôle: normal.

Sperme réfrigéré *in vivo*: Immobilité. A peine une partie des spermatozoïdes sont pourvus de tête droite n'accusant ni inflexions, ni courbures. Quant aux autres têtes (environ 75%), elles sont repliées en forme de petits cercles ou accusent une ou plusieurs courbures. Ça et là, des grumeaux peu nombreux, — résultat de la désagrégation des spermatozoïdes. Les agglomérations de forme irrégulière se relâchent et se désagrègent dès que le liquide est en mouvement.

La série d'épreuves concernant l'action sur les spermatozoïdes de températures portées à — 1°, — 3°, — 5° et — 7°C, nous apprend que lorsque cette action s'étend à un espace de temps dont la durée ne dépasse pas 1 à 5 heures suivant la température appliquée

(v. diagramme 2) la manière de se comporter de la plupart des spermatozoïdes ne s'écarte généralement pas de la norme. Après

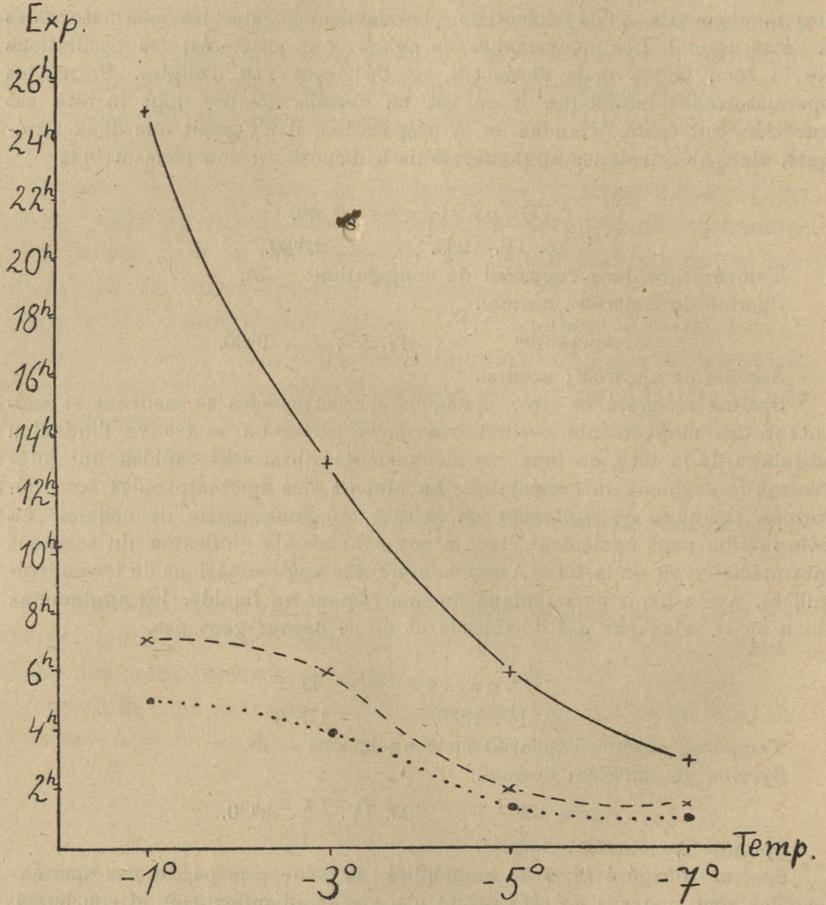


Diagramme 2. Action sur les spermatozoïdes de grenouille de températures qui, de $+15^{\circ}\text{C}$ tombent successivement à -1° , -3° , -5° et -7°C . Manque d'action appréciable de la température au début, ensuite activation, suivie d'altérations prémortelles et de coagulation en masse, enfin mort des spermatozoïdes. La ligne pointillée correspond au début de l'activation. Autres lignes — comme dans le diagramme 1.

une exposition plus prolongée dont la durée s'étend à plus de 5 heures (v. diagramme 2), la motilité des spermatozoïdes accuse une augmentation et il se manifeste une tendance à former des

agrégations. Plus la température baisse, plus les mouvements sont intenses, tandis que la tendance à former des agrégations diminue en même temps.

Lorsque l'exposition est encore plus longue (2 à 7^h, v. diagramme 2), les spermatozoïdes forment des agglomérations irrégulières qui se désagrègent d'habitude dès que le liquide est agité. Les spermatozoïdes présentent des déformations et dépérissent.

Ainsi, l'action de températures qui baissent à -1° , -3° , -5° et -7° se traduit par une courte période où des effets appréciables de la baisse font d'abord défaut, après quoi vient une phase caractérisée par une motilité prononcée et par la formation d'agregats; les agglomérations deviennent ensuite irrégulières, phase qui précède immédiatement la mort des spermatozoïdes.

L'action sur les spermatozoïdes de températures au-dessus de 0° .

En ce qui concerne les températures au-dessus de 0° , je me suis borné à étudier celles de $+1^{\circ}$, $+3^{\circ}$, $+5^{\circ}$ et $+15^{\circ}$, le sperme à la température du laboratoire servant de contrôle. Pendant quelques heures, voire durant plus de dix, ces températures n'exercent pas d'action appréciable sur les spermatozoïdes. Après ce laps de temps, on observe des symptômes prémortels, sans qu'une activation soit intervenue. Ils se traduisent par une mortification progressive et lente, ainsi que par des mouvements de plus en plus ralentis, qui aboutissent à l'immobilité complète et à la mort.

Le diagramme 3 indique la durée de la vie des spermatozoïdes dans ces températures.

D'après mes observations, $+1^{\circ}$ est la température optimale qui permet aux spermatozoïdes de grenouille de se maintenir en vie durant 192^h, soit pendant 8 jours, c'est-à-dire aussi longtemps que vivaient les spermatozoïdes d'oursin dans une atmosphère de 0°C (Bury 1912, 1913). En ce qui concerne le sperme des animaux homioïthèrmes, les travaux sur l'élevage (T. Olbrycht 1935, 1936, 1937a, b, 1938, Prawocheński et Walton 1935) considèrent également 0° ou quelques degrés au-dessus, comme température optimale pour la conservation des spermatozoïdes d'animaux domestiques.

le sperme a atteint cette température, il meurt. Mantegazza (1866) a déjà fixé cette limite critique des basses températures pour les spermatozoïdes de l'Homme et l'a trouvée égale à -15° environ.

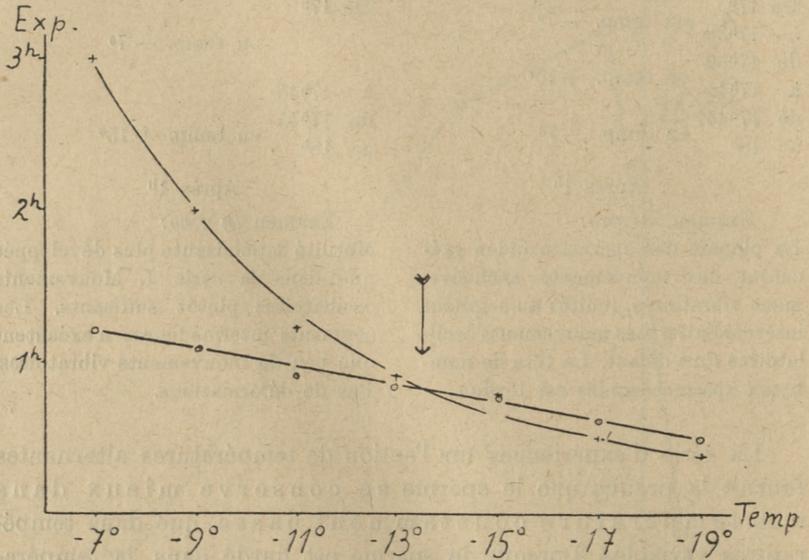


Diagramme 4. Température critique représentée graphiquement, en indiquant dans le même diagramme la limite de la motilité des spermatozoïdes dans des températures descendant au niveau de -7° à -20° C (ligne + — +), et le temps que prend le sperme pour atteindre une température donnée (ligne o — o). La température critique est marquée par une flèche.

Il semblerait à première vue que l'exposition de spermatozoïdes à des températures encore plus basses est dénuée d'intérêt, car toutes ces expositions donneraient toujours le même résultat et ne feraient que constater la mort du sperme. On ne pouvait que s'étonner cependant en voyant que certains animaux de la faune propre aux mousses supportent les températures, dans lesquelles l'hydrogène et l'hélium sont liquifiés (-253° C, respectivement -271° C) (Rahn und Gilbert 1920). En étudiant sur des lapins l'action que ces températures exercent sur des spirilles pathogènes, Jahnke (1937, 1938a) a observé que certains spermatozoïdes les supportent également, observation qui l'a engagé

TABLEAU II.

| Numéro de l'expérience | 53 | | | | | | 62 | | | | | | 61 | | | | | | 63 | | | | | | 82 | | | | | |
|--|------------------------------------|-------|------------------------------------|-------|------------------------------------|------|------------------------------------|-------|------------------------------------|-------|------------------------------------|-------|------------------------------------|-------|------------------------------------|-------|------------------------------------|------|----------------------------------|-------|----------------------------------|-------|----------------------------------|------|----------------------------------|-------|----------------------------------|-------|---------------------------------|-------|
| | Contrôle avant l'expérience | | Contrôle pendant l'expérience | | Expérience | | Contrôle avant l'expérience | | Contrôle pendant l'expérience | | Expérience | | Contrôle avant l'expérience | | Contrôle pendant l'expérience | | Expérience | | Contrôle avant l'expérience | | Contrôle pendant l'expérience | | Expérience | | Contrôle avant l'expérience | | Contrôle pendant l'expérience | | Expérience | |
| Température dans l'appareil de congélation | — | | — | | —5° | | — | | — | | —7° | | — | | — | | —9° | | — | | — | | —11° | | — | | — | | —19° | |
| Durée de l'exposition dans l'appareil de congélation | — | | — | | 2h | | — | | — | | 1h | | — | | — | | ½h | | — | | — | | ½h | | — | | — | | 5 min | |
| Température actuelle du sperme après l'exposition | — | | — | | —5°/° | | — | | — | | —6° | | — | | — | | —5° | | — | | — | | —5° | | — | | — | | 0° | |
| Sperme <i>in vivo</i> | normal | | normal | | activation | | normal | | normal | | activation | | normal | | normal | | activation | | normal | | normal | | activation | | normal | | normal | | activation | |
| Date et heure de l'insémination | 20. III. 36.
13 ^h 20 | | 20. III. 36.
15 ^h 45 | | 20. III. 36.
15 ^h 45 | | 31. III. 36.
12 ^h 15 | | 31. III. 36.
13 ^h 25 | | 31. III. 36.
13 ^h 25 | | 31. III. 36.
12 ^h 15 | | 31. III. 36.
12 ^h 50 | | 31. III. 36.
12 ^h 50 | | 2. IV. 36.
16 ^h 05 | | 4. IV. 36.
17 ^h 05 | | 2. IV. 36.
17 ^h 05 | | 17. IV. 36.
8 ^h 05 | | 17. IV. 36.
8 ^h 40 | | 17. 4. 36.
8 ^h 40 | |
| Heure à laquelle a été tuée la femelle | 13 ^h 20 | | 13 ^h 20 | | 13 ^h 20 | | 12 ^h | | 12 ^h | | 12 ^h | | 12 ^h | | 12 ^h | | 12 ^h | | 15 ^h 40 | | 15 ^h 40 | | 15 ^h 40 | | 7 ^h 30 | | 7 ^h 30 | | 7 ^h 30 | |
| Heure de l'apparition du I ^{er} sillon | 16 ^h 14 | | 18 ^h 45 | | 18 ^h 50 | | — | | 16 ^h 25 | | 16 ^h 25 | | — | | 15 ^h 55 | | 15 ^h 55 | | — | | — | | — | | — | | — | | — | |
| Heure de l'apparition du II ^e sillon | 17 ^h | | 19 ^h 35 | | 19 ^h 40 | | 16 ^h 05 | | — | | — | | 16 ^h 05 | | — | | — | | — | | 21 ^h 15 | | 21 ^h 15 | | — | | — | | — | |
| Heure du comptage des altérations des oeufs | 19 ^h 30 | | 21 ^h 15 | | 21 ^h 15 | | 21 ^h | | 21 ^h 20 | | 21 ^h 15 | | 21 ^h | | 21 ^h 10 | | 21 ^h 10 | | 4. IV. 36.
10 ^h | | 4. IV. 36.
10 ^h | | 4. IV. 36.
10 ^h | | 17 ^h 10 | | 17 ^h 10 | | 17 ^h 10 | |
| | Nom-
bre | % | Nom-
bre | % | Nom-
bre | % | Nom-
bre | % | Nom-
bre | % | Nom-
bre | % | Nom-
bre | % | Nom-
bre | % | Nom-
bre | % | Nom-
bre | % | Nom-
bre | % | Nom-
bre | % | Nom-
bre | % | Nom-
bre | % | Nom-
bre | % |
| Nombre des oeufs employés dans l'expérience | 47 | | 46 | | 37 | | 62 | | 68 | | 85 | | 62 | | 57 | | 53 | | 70 | | 66 | | 75 | | 75 | | 86 | | 69 | |
| Segmentation normale | 45 | 95·8% | 45 | 97·8% | 37 | 100% | 61 | 98·4% | 66 | 97·1% | 84 | 98·8% | 61 | 98·4% | 55 | 96·6% | 53 | 100% | 68 | 97·1% | 65 | 98·3% | 75 | 100% | 24 | 31·9% | 24 | 27·8% | 67 | 97·1% |
| Segmentation irrégulière | 1 | 2·1% | 1 | 2·2% | 0 | 0% | 1 | 1·6% | 0 | 0% | 0 | 0% | 1 | 1·6% | 1 | 1·7% | 0 | 0% | 0 | 0% | 0 | 0% | 0 | 0% | 0 | 0% | 0 | 0% | 0 | 0% |
| Oeufs restés vierges | 1 | 2·1% | 0 | 0% | 0 | 0% | 0 | 0% | 2 | 2·9% | 1 | 1·2% | 0 | 0% | 0 | 0% | 0 | 0% | 2 | 2·9% | 1 | 1·7% | 0 | 0% | 1 | 1·4% | 1 | 1·2% | 0 | 0% |
| Apparition de froncements à la surface | 0 | 0% | 0 | 0% | 0 | 0% | 0 | 0% | 0 | 0% | 0 | 0% | 0 | 0% | 0 | 0% | 0 | 0% | 0 | 0% | 0 | 0% | 0 | 0% | 50 | 66·6% | 61 | 71% | 2 | 2·9% |

à faire des recherches sur la manière de se comporter des spermatozoïdes humains dans des températures aussi basses. Il s'aperçut (Jahnel 1938b) »dass im menschlichen Sperma nach starker Abkühlung einzelne Samenfäden ihre Beweglichkeit wiedergewinnen können. Dies war der Fall nach Einwirkung einer Kälte von -196°C , in flüssigem Helium (-269.5°C), welche 3 Stunden eingewirkt hatte«.

Comment s'explique le phénomène, paradoxal en apparence, que les spermatozoïdes périssent dans des températures de -10° à -20° , tandis qu'ils peuvent supporter des températures de -196° et de -269.5°C ? Jahnel (1938b) suppose que »das Wasser bei plötzlicher starker Abkühlung nicht zu Eis erstarrt, sondern in einen anderen glasartigen Zustand gerät«.

L'influence de basses températures sur la faculté de féconder et l'attitude des oeufs à l'égard des spermatozoïdes réfrigérés.

Dans toutes les expériences dont j'ai parlé dans le chapitre précédent, une certaine quantité de sperme réfrigéré était destinée à inséminer des oeufs normaux, tirés d'une grenouille femelle que je venais de tuer. Le sperme réfrigéré à $+5^{\circ}$, $+3^{\circ}$, $+1^{\circ}$, -1° , -3° , -5° , -7° , -9° , -11° , -13° , -15° , -17° et -19° servait donc dans cette série d'expériences, à agir sur des oeufs normaux, à observer le développement des embryons et, si celui-ci faisait défaut, à étudier le comportement des oeufs à l'égard des spermatozoïdes réfrigérés.

Après avoir comparé les expériences exécutées dans différentes températures où les spermatozoïdes réfrigérés accusaient *in vivo* une motilité augmentée (v. tabl. II., chiffres soulignés dans la rubrique »segmentation normale«), on s'aperçoit que celle-ci correspond à une faculté exaltée de féconder les oeufs. 100% d'oeufs sont le plus souvent fécondés dans ces conditions, tandis que ce taux n'est que de 90% environ dans les expériences de contrôle. Le développement des embryons, issus d'oeufs fécondés par des spermatozoïdes, devenus plus mobiles sous l'action d'une basse température, ne s'écarte en rien du développement normal dans les épreuves de contrôle; en effet, ni l'examen à la loupe, ni l'étude au microscope des préparations en série, ne permettent de déceler une différence quelconque. Il résulte de la

formation du I^{er} et du II^e sillon (tabl. II.) dont nous avons noté le moment d'apparition, puis de la comparaison des stades ultérieurs du développement, que celui-ci n'est pas accéléré.

L'activation des spermatozoïdes sous l'influence du froid n'accélère ni la fécondation, ni le développement des embryons, par contre, elle détermine la fécondation normale d'un plus grand nombre d'œufs (tous les œufs normaux sont fécondés d'habitude) et rend ceux-ci aptes à se développer normalement.

Il en était bien autrement, lorsque dans les expériences je me servais de spermatozoïdes altérés par le froid. L'insémination des œufs normaux, fraîchement tirés d'une femelle, avec du sperme à tel point réfrigéré que, examinés *in vivo*, les spermatozoïdes présentent des agglomérations irrégulières et des altérations prémortelles de leur forme, aboutit, il est vrai, à leur fécondation, toutefois leur segmentation est irrégulière.

En examinant le développement de l'embryon à la loupe, on s'aperçoit que le parcours des sillons est irrégulier, que leur profondeur est inégale et que la segmentation ne dépasse souvent pas le stade de plusieurs blastomères. S'il se forme quelques dizaines de blastomères, la segmentation ne s'étend généralement qu'à une partie limitée de la surface de l'œuf (voir fig. 1).

Lorsqu'on examine au microscope des séries de coupes passant par des blastomères, produits par une segmentation irrégulière, on trouve dans le protoplasme de l'embryon une ou plusieurs dizaines de stries pigmentées qui sont autant de voies qu'ont prises les spermatozoïdes pour pénétrer dans l'œuf en vue de la féconder (microph. 1, pl. 33). On réussit à découvrir parfois les têtes des spermatozoïdes au bout des stries en question. Une partie de ces spermatozoïdes gonfle et périt d'habitude, tandis que d'autres déclenchent des mitoses et isolent dans l'œuf des aires protoplasmiques de différentes dimensions (microphoto 2). Les têtes de ces spermatozoïdes se gonflent ensuite et sont vouées à la destruction (microph. 3). Une fois que la tête du spermatozoïde est détruite, les parties de protoplasme qui en dépendent, sont vouées à la dégénérescence (microphoto 4) et l'embryon périt.

Dans les expériences où le sperme réfrigéré agit sur des œufs normaux et où, examiné *in vivo*, il révèle de nombreuses altérations prémortelles, tandis que certains spermatozoïdes sont en voie de se désagrégier, on peut établir la

présence de froncements se dessinant à la surface des oeufs et pénétrant de plus en plus en profondeur. Ces froncements ont une tendance à s'effacer en parties. Les oeufs à surface froncés ne commencent souvent pas à se développer, néanmoins la segmentation ne se fait pas attendre dans certains cas. Elle s'arrête généralement bientôt, cependant elle donne parfois naissance à des têtards normaux.

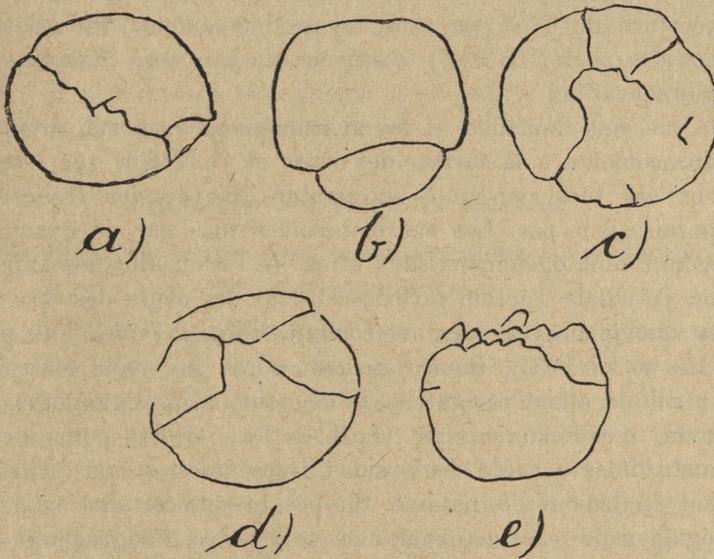


Fig. 1. Segmentation irrégulière, à la suite de l'insémination d'oeufs normaux par du sperme réfrigéré. a) Sillons s'enfonçant à une profondeur inégale, b) Deux blastomères de forme irrégulière, c) et d) la segmentation s'arrête au stade de plusieurs blastomères, e) la segmentation ne s'étend qu'à une partie limitée de l'oeuf, au cas où elle n'a donné naissance qu'à quelques dizaines de blastomères.

Examinées au microscope, les séries de coupes passées par des oeufs à surface froncée, ont fourni différentes images; en effet, on voyait sur les unes un commencement de segmentation régulière, sur d'autres il s'agissait de polyspermie, encore d'autres ne différaient en rien de l'aspect que présente un oeuf vierge.

Désirant connaître l'origine des froncements à la surface des oeufs, ainsi que la cause qui les détermine, j'ai fait une série d'expériences supplémentaires. Or, les recherches microscopiques

ont fourni la preuve que ce phénomène ne dépend pas de la pénétration du spermatozoïde dans l'oeuf.

Quinze minutes après l'apparition des froncements sous l'influence du sperme réfrigéré, j'inséminais les oeufs avec des spermatozoïdes frais. Or, je m'aperçus que les oeufs froncés peuvent recevoir des spermatozoïdes et commencer à se segmenter normalement. La température du sperme réfrigéré, au moyen duquel j'inséminais les oeufs après de dégelément, par conséquent une température de 0° à peu près, ne produit aucune altération à la surface des oeufs. Lach¹⁾ confirme de son coté l'exactitude de cette observation.

Je me suis demandé si les spermatozoides morts produisent des froncements à la surface des oeufs et j'ai établi que lorsqu'ils avaient été tués par une température élevée, les froncements n'apparaissaient pas. Les spermatozoïdes tués par du cyanure de potassium sont également sans effet. Je fis ensuite des expériences où j'étudiais l'action qu'exercent sur les oeufs des spermatozoïdes que je broyais sous une forte pression à l'aide d'une presse (Godlewski 1934), immédiatement après les avoir centrifugés. Les résultats étaient négatifs. Je ne pouvais appliquer une autre méthode, recommandée par Godlewski (1934) pour tuer les spermatozoïdes à l'aide de liquides hypotoniques, vu qu'ils supportent facilement l'hypotonie. Supposant que certains substances se dégagent des spermatozoïdes en voie de se désagréger et qu'elles sont la cause des froncements à la surface des oeufs, j'ai fait de nouvelles expériences en vue de les isoler. Je me suis donc servi de filtres dont les pores avaient différentes dimensions, pour filtrer des spermatozoïdes réfrigérés ou normaux. Le diamètre des pores devait être inférieur à la largeur des spermatozoïdes, qui mesure 0.001 mm en moyenne (Ecker, Wiedersheim, Gaupp 1896), et laisser passer les colloïdes dont la pression oncotique pouvait agir également sur les oeufs. Le filtre de E. K.-Seitz (Seitz-Werke in Kreuznach) se prêtait le mieux aux expériences. L'application de ces procédés m'a permis d'établir que les spermatozoïdes désagréés par le froid, dégagent des substances qui passent à travers le filtre et produisent ainsi des

¹⁾ Je tiens ce renseignement de M. Lach dont le travail sur l'action de basses températures sur les oeufs de la grenouille n'a pas encore paru.

froncements, sans que l'intervention des spermatozoïdes soit nécessaire. Dans des expériences ultérieures, je produisais des froncements en traitant les oeufs par des solutions de NaCl, de sorte que j'ai confirmé l'exactitude des observations enregistrées par Jenkinson (1906, 1911).

Les spermatozoïdes désagrégés par le froid augmentent probablement la quantité de substances osmotiquement actives. Je suppose par conséquent que les froncements, consécutifs à l'action du sperme réfrigéré, sont la conséquence de l'augmentation locale de la pression osmotique et oncotique des colloïdes du spermatozoïde, en voie de se désagréger à proximité de la surface de l'oeuf dont l'eau est localement retiré.

Discussion des résultats obtenus.

Les réactions en masse des spermatozoïdes sous l'action de basses températures.

L'action des facteurs énergétiques sur les spermatozoïdes déclenche des réactions en masse, en d'autres termes, la manière dont se comportent la plupart de ceux-ci est toujours identique, ce qui n'empêche pas qu'il y ait un certain nombre de réactions différentes. Ainsi p. ex., lorsque la majorité des spermatozoïdes se meut dans une certaine direction, il est de petits groupes qui demeurent immobiles ou s'avancent dans un autre sens. Ces phénomènes collectifs sont connus sous les noms d'activation, d'agrégation, d'agglutination et de coagulation en masse (mass-coagulation), notions que nous devons à F. R. Lillie (1910, 1912, 1913b, 1914, 1915b, 1921) et que Godlewski (1926a) a définies avec autant de concision que de précision.

En fait de réactions en masse, mes recherches concernant l'influence de basses températures sur les spermatozoïdes, m'ont fourni l'occasion d'observer l'activation et l'agrégation des spermatozoïdes, ainsi que d'étudier leurs agglomérations irrégulières, phénomènes que j'ai décrits dans les chapitres précédents.

L'activation déclenchée par de basses températures, telle que je l'ai observée moi-même, consiste dans une exaltation générale des activités propres aux spermatozoïdes. Les mouvements deviennent plus vifs, quoique leur nombre n'augmente pas dans l'unité de temps, l'amplitude des mouvements oscillatoires accuse

un accroissement, enfin les mouvements rotatoires et en spirale sont plus accentués. Les spermatozoïdes s'avancent sans hésitation en suivant des lignes droites. La faculté de féconder les oeufs est, elle aussi, exaltée, ainsi que je l'ai montré dans le chapitre précédent.

Les caractères propres à l'activation, que j'ai observés dans mes expériences, correspondent en tout point à la définition qu'en ont donné Lillie (1913a, b, 1914, 1915a, b, c) et Godlewski (1926a).

Gemmill (1900) a étudié ce phénomène, tel qu'il se produit après avoir étendu le sperme d'eau, Carter (1930) l'a observé en traitant les spermatozoïdes par des composés de l'iode, tandis que Cloves et Bachman (1921) ont fait des investigations sur l'activation des spermatozoïdes, après les avoir soumis à l'action des alcools plus riches en carbone.

Mes recherches ont enrichi la connaissance de l'activation d'une observation nouvelle; elles ont montré en effet qu'on peut la déclencher par de basses températures et ont contribué ainsi à confirmer encore une fois la thèse de Gray (1931), suivant laquelle les réactions des spermatozoïdes sont rarement spécifiques, si elles le sont en général.

Il faut établir cependant une différence entre l'activation, telle que je l'entends avec les auteurs mentionnés, et la stimulation de la motilité qui ne s'accompagne pas d'exaltation de la faculté de féconder les oeufs. Loeb et F. R. Lillie (cités d'après Morgan 1927) ont observé une stimulation pareille après avoir traité les spermatozoïdes par un mélange de chlorure de potassium et de chlorure de sodium.

En soumettant les spermatozoïdes à l'action de basses températures, je pouvais observer d'habitude à côté de leur activation, un autre phénomène qui présentait des analogies avec celui décrit par Buller (1902), et que F. R. Lillie (1913b) ainsi que Godlewski (1926a) connaissent sous le nom d'agrégation des spermatozoïdes. Autour d'un centre immobile plus ou moins grand (microphoto 5) dont les dimensions étaient généralement très faibles au début, et qui se composait soit de quelques spermatozoïdes, soit d'une parcelle de tissu, on en voyait d'autres s'agglomérer en forme de rayons et faire des mouvements intenses, au moyen desquels ils paraissaient tâcher de pénétrer dans le centre de

l'agrégat. Les spermatozoïdes les plus rapprochés du centre devenaient immobiles après quelque temps, tandis que d'autres s'accumulaient à la périphérie, si bien que les dimensions de l'agrégat accusaient une augmentation. L'agrégat n'affectait pas toujours une forme circulaire, car il formait parfois un secteur de cercle. J'ai remarqué que l'agrégation était plus forte, plus l'activation était faible, mais durait plus longtemps. Le degré d'agrégation est par conséquent en fonction du degré et de la durée de l'activation des spermatozoïdes. Or, comme la quantité de produits acides du métabolisme dépend de l'intensité et de la durée des processus vitaux, on pourrait admettre que l'agrégation étudiée est une conséquence de la concentration des ions d'hydrogène.

Comme on s'était aperçu qu'une forte concentration de CO_2 paralyse les mouvements des spermatozoïdes, Con (1918) a supposé que les agrégations étaient la conséquence de l'immobilité du sperme, qui s'est manifestée dans les parties où il y avait une quantité de CO_2 suffisante pour immobiliser les spermatozoïdes et que, parvenant à atteindre ces parties, ceux-ci deviennent immobiles, de sorte que leur présence ne fait qu'augmenter la quantité de CO_2 . Après avoir ajouté des alcalis, cet auteur a remarqué que des agrégats ne se formaient plus, le CO_2 était neutralisé. Morgan (1927) admet que l'origine des agrégats s'explique par la rencontre fortuite de deux spermatozoïdes qui produisent déjà une plus grande quantité de CO_2 et que d'autres spermatozoïdes, passant par hasard à côté de ce piège, tombent victime de la concentration plus forte de l'acide carbonique. De l'avis de Gray (1922, 1931), la formation des agrégats dépend de l'altitude active que prennent les spermatozoïdes à l'égard de la concentration spécifique des ions d'hydrogène. Au cours de mes recherches sur les agrégations, j'ai observé qu'elles se formaient de préférence autour des parcelles de tissu testiculaire que renfermait parfois le sperme, ou bien qu'elles se constituaient autour de quelques spermatozoïdes immobiles et morts. J'en conclus que la parcelle, pour ainsi dire arrachée de son ambiance naturelle a bien plus vite été décomposée que les spermatozoïdes capables d'une vie indépendante et qu'il s'en dégagait des substances acides, comme c'est toujours le cas dans toute décomposition, surtout dans la décomposition des substances protéiques.

Nous pouvons nous imaginer aussi que par suite d'une hypoplasie individuelle et de conditions vitales défavorables, un ou plusieurs spermatozoïdes sont condamnés à périr dans un bien plus bref délai que les autres, de sorte que ce ou ces spermatozoïdes une fois morts constituent probablement un nouveau foyer d'acidification et deviennent par conséquent le centre d'un nouvel agrégat. Ce n'est donc pas nécessairement le CO_2 qui devient le point de départ de l'agrégation des spermatozoïdes, car ce rôle échoit probablement à chaque acidité d'un certain degré et à la concentration spécifique des ions d'hydrogène (Gray 1931).

Outre l'activation et l'agrégation des spermatozoïdes, j'ai observé les agglomérations irrégulières de ceux-ci, formées sous l'action de basses températures et accompagnées d'un arrêt des mouvements. En examinant les spermatozoïdes *in vivo*, je pouvais établir que les agglomérations prenaient la forme de boules ou de paquets, parfois réunis entre eux par une espèce de pont prolongé, formé également d'agglomérations de spermatozoïdes morts (microphoto 6). J'ai constaté à cette occasion qu'il s'agissait dans ce cas de phénomènes irréversibles.

L'image que je viens de décrire correspond exactement à la coagulation en masse de Lillie (1913b), dont Godlewski (1926a) a précisé la nature.

Kölliker (1856) s'est servi d'acide chromique pour produire des agglomérations pareilles, Lillie (1913a, b) et Kalwaryjski (1926) ont employé du CO_2 , Yamane (1921) et Gellhorn (1922) ont appliqué du FeCl_3 , Gellhorn (1922) a utilisé des sels de plomb et d'aluminium, enfin Gray (1920a, b) a eu recours à d'autres sels. Quelques-uns de ces auteurs ont donné à ce phénomène le nom d'agglutination, mais l'emploient dans un sens un peu différent de celui qu'on lui donne actuellement.

Les agglomérations des spermatozoïdes, formées sous l'action du froid que j'ai observées, ne sont rien d'autre qu'une coagulation en masse et rappellent de très près les phénomènes décrits par les auteurs cités ci-dessus.

Il importe de distinguer l'agglomération de l'agglutination, phénomène spécifique pour la réaction des spermatozoïdes à une substance appelée fertilizine (Godlewski 1911, 1926b, 1930, 1934, Sampson 1922, Walton 1924, Lillie et Just 1926, Morgan 1927, Dalcq 1928) et qui offre certaines analogies

avec des phénomènes connus en bactériologie (von Dungen 1902, Schücking 1903) et en sérologie (Goldforb 1929 a, b, c, Grodziński et Marchlewski 1938).

Les altérations prémortelles des spermatozoïdes réfrigérés.

Exposés à l'action de facteurs extérieurs, les spermatozoïdes dépérissent peu à peu et meurent après un temps plus ou moins long. Le dépérissement s'accompagne d'altérations prémortelles qui intéressent l'aspect des spermatozoïdes.

En étudiant l'influence que différentes températures exercent sur les spermatozoïdes, j'ai remarqué que le froid produit des altérations suivies après peu de temps de mort et qu'elles sont caractérisées par des inflexions angulaires de leur tête et par des courbures multiples de celle-ci (microphoto 7; comparer le sperme normal, microphoto 8, pl. 33). Le premier signe d'altérations prémortelles dans les préparations fixées, est donné par le fait que la tête des spermatozoïdes est d'une épaisseur variable et que sa coloration est inégale. J'ai observé en outre qu'au lieu d'avoir la forme d'une baguette droite, comme c'est le cas chez les spermatozoïdes normaux, cette forme de la tête tend à s'effacer et rappelle plutôt une série de grumeaux irréguliers, disposés sur un fil.

Nous savons que l'action de basses températures sur la matière vivante donne naissance à de petits cristaux de glace, déjà avant qu'elle ait cessé de vivre (Molisch 1921, Jensen et Fischer 1911, Bachmetjew 1911, Lewis 1920, Zacharowa 1926); j'emets donc la supposition que les changements de forme, particuliers aux spermatozoïdes réfrigérés, s'expliquent peut-être par la formation de cristaux de glace dans ces cellules.

La segmentation irrégulière déclanchée par le sperme réfrigéré.

Après avoir soumis les oeufs à l'action de sperme réfrigéré, j'ai observé une segmentation irrégulière; or, l'examen des oeufs au microscope m'apprit qu'elle était une conséquence de la polyspermie. On trouve en effet une série de stries pigmentées qui indiquent la voie qu'ont prises les têtes des spermatozoïdes. Parfois elles déclanchent des cinèses, tandis que dans d'autres cas elles demeurent inactives, gonflent et finissent par se liquéfier.

Le nombre des spermatozoïdes qui pénètrent dans l'oeuf, varie de plusieurs à quelques dizaines et correspond à la polyspermie moyenne de Brachet (1912).

Pour obtenir une fécondation polyspermiq ue Oscar et Richard Hertwig (1887) soumettaient les oeufs à l'action de narcotiques, Boveri (1907) se servait de sperme condensé, Brachet (1910a, b) et Herlant (1911) appliquaient du sperme dilué par une solution de chlorure de sodium, Smith et Cloves (1924) changeaient la concentration des ions d'hydrogène du milieu ambiant des oeufs, Bury (1912) les refroidissait, enfin Godlewski (1934) ajoutait à une culture pure d'oeufs d'oursin des extraits tirés du sperme d'une espèce éloignée.

Mes expériences complètent la série d'observations précédentes; il en résulte en effet qu'on réussit à obtenir une fécondation polyspermiq ue en faisant agir des spermatozoïdes réfrigérés sur des oeufs normaux.

Résumé et conclusions.

Nous pouvons résumer comme suit les résultats de nos recherches, ainsi que les conclusions qui en découlent:

1) Les basses températures dont nous avons étudié l'action, déterminent chez les spermatozoïdes l'apparition de phénomènes collectifs, observés également après l'intervention d'autres agents externes; il s'agit notamment de l'activation, de l'agrégation et de la coagulation en masse.

2) Nous pouvons ranger dans trois groupes les températures appliquées, chaque groupe se distinguant par une action différente. a) les températures dont le degré ne descend pas au-dessous de 0°, agissent quelque temps dans le sens de la conservation du sperme (+ 1° C); b) les températures entre 0° et - 7° n'ont pas l'action nocive, vu qu'elles activent la motilité des spermatozoïdes et rendent leur vie plus intense, quoique plus courte; enfin c) les températures qui baissent au dessous de - 9° C jusqu'à - 20°, limite que nous n'avons pas dépassée au cours de nos recherches, exercent sur le sperme une action manifestement délétère.

3) Les températures du groupe a) déterminent peu à peu une diminution progressive de la motilité des spermatozoïdes, qui aboutit au dépérissement du sperme.

4) Les températures comprises dans le groupe b) (-1° à -7°), déterminent d'abord une courte période où des effets appréciables font défaut chez la plupart des spermatozoïdes. Elle est suivie d'une période d'activation et d'agrégation, après laquelle se forment des agglomérations irrégulières; enfin, les spermatozoïdes subissent des déformations et périssent.

5) L'action des températures du groupe c) (-7° à -20°) se traduit d'abord par l'activation, puis par une forte déformation des spermatozoïdes qui dépérissent et dont une partie se désagrège en grumeaux.

6) L'activation ne consiste pas à exécuter un nombre plus grand de mouvements dans l'unité de temps; bien plus, elle se traduit par l'amplitude augmentée des mouvements oscillatoires, par des mouvements rotatoires et en spirale plus intenses et par des mouvements rectilignes rapides en avant.

7) L'activation n'accélère ni la fécondation, ni le développement; en revanche, elle augmente le nombre des oeufs normalement fécondés et les rend capables de développement régulier. Elle exalte la faculté de féconder les oeufs, de sorte que la segmentation est normale dans 90 à 100%, tandis que ce taux ne correspond qu'à 80 à 90% pour les oeufs de contrôle.

8) Moins l'activation est prononcée et plus longtemps elle dure, plus la tendance à former des agrégats est manifestée. Les agrégats naissent soit autour de menus parcelles de tissus, soit ils se forment autour de spermatozoïdes morts dont la décomposition produit de substances acides qui constituent des centres d'agrégation.

9) La coagulation en masse que j'ai observée également rappelle de près les processus déclanchés par des substances chimiques. Elle est cependant foncièrement différente de l'agglutination qui offre des analogies avec des phénomènes observés en sérologie.

10) Sous l'action des basses températures, il se produit avant la mort des spermatozoïdes une série d'altérations, caractérisées par des inflexions plus ou moins anguleuses de la tête ou du segment intermédiaire. Plus le dépérissement est rapide, plus les contours de ces inflexions sont saillants. Je suppose qu'on pourrait expliquer ces altérations par la formation de cristaux de glace dans les spermatozoïdes.

11) Le sperme réfrigéré dans lequel se manifestent *in vivo* des commencements de coagulation en masse ainsi que des altérations prémortelles de la forme des spermatozoïdes détermine une segmentation irrégulière des oeufs. Examinée au microscope, cette segmentation anormale correspond à la polyspermie.

12) L'application de sperme réfrigéré dont l'examen *in vivo* décèle de nombreuses altérations prémortelles des spermatozoïdes ou leur désagrégation, produit des froncements de la surface des oeufs. Je crois que ces froncements s'expliquent par l'augmentation des pressions osmotique et oncotique des colloïdes que contient le spermatozoïde et qui se désagrègent à proximité de la surface de l'oeuf, dont la quantité d'eau subit une diminution locale.

13) La température optimale correspond à $+1^{\circ}\text{C}$ pour les spermatozoïdes de grenouille, qui la supportent pendant 192 heures, soit durant 8 jours de suite.

14) Non seulement des changements brusques de la température sont défavorables aux spermatozoïdes, car ceux-ci sont sensibles également à la fréquence et à l'étendue de ces changements. Le sperme se conserve mieux dans des températures constamment basses que dans des conditions, où elles alternent avec des hausses de la température.

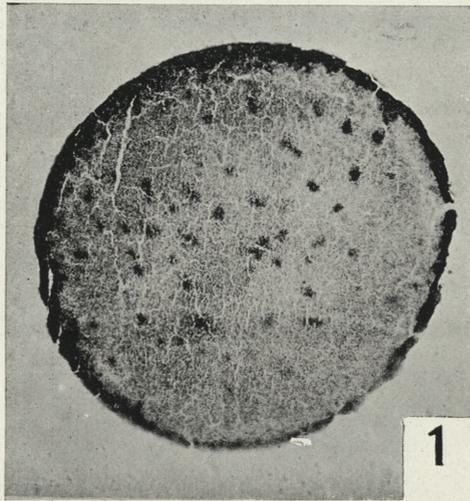
15) Lorsque les spermatozoïdes de grenouille sont exposés à l'action de -13° à -14° , soit à la température critique, le sperme meurt dès qu'il l'a atteinte.

Explication de la planche 33.

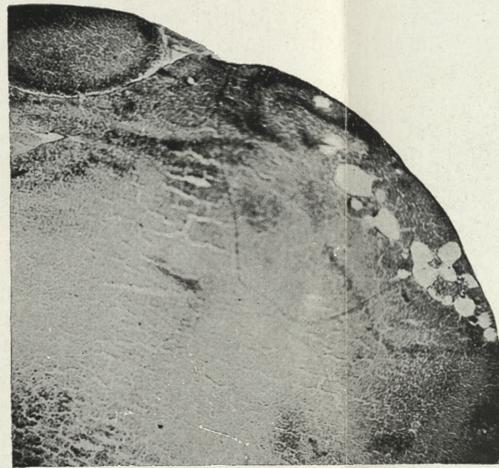
Microphot. 1. Coupe transversale d'un oeuf au début de la segmentation irrégulière, conséquence de l'insémination par du sperme réfrigéré. Polyspermie. Coupe transversale de quelques dizaines de stries pigmentées, voies dont se sont servis les spermatozoïdes pour pénétrer dans l'oeuf. Grossiss. $\times 75$.

Microphot. 2. Coupe transversale d'un oeuf au début de la segmentation irrégulière, conséquence de l'insémination par du sperme réfrigéré. Polyspermie. Formation d'aires protoplasmiques de différentes dimensions. Stries pigmentées irrégulières. Grossiss. $\times 150$.

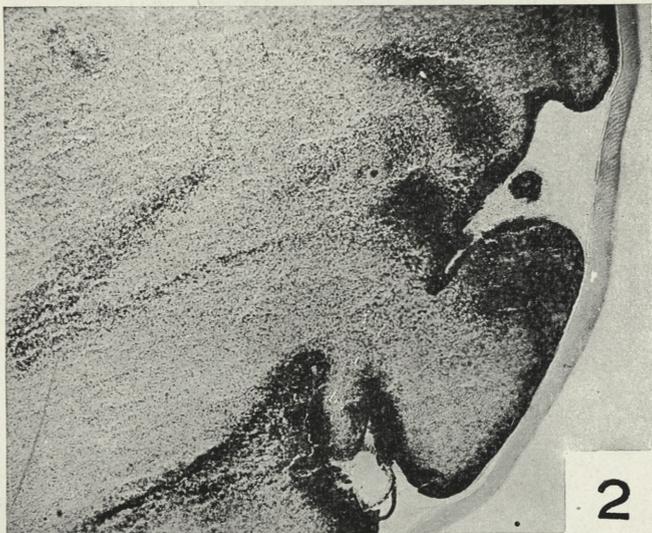
Microphot. 3. Coupe transversale d'un oeuf au début de la segmentation irrégulière, conséquence de l'insémination par du sperme réfrigéré. Polyspermie. Deux stries pigmentées se voient distinctement. Dans la partie comprise entre les deux stries, on aperçoit deux points plus clairs qui cor-



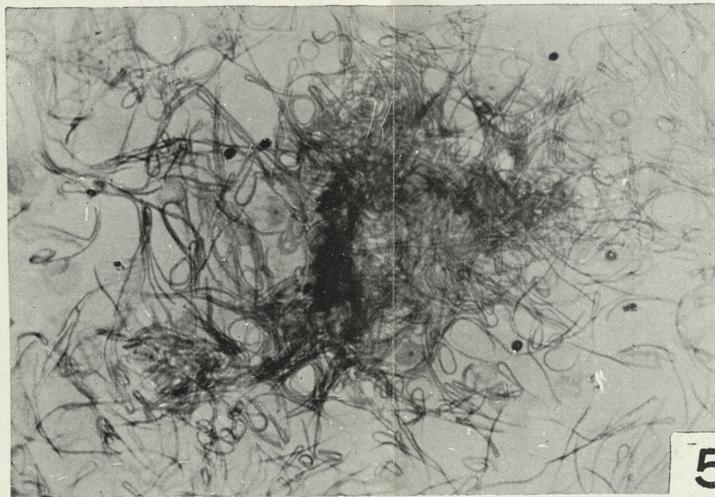
1



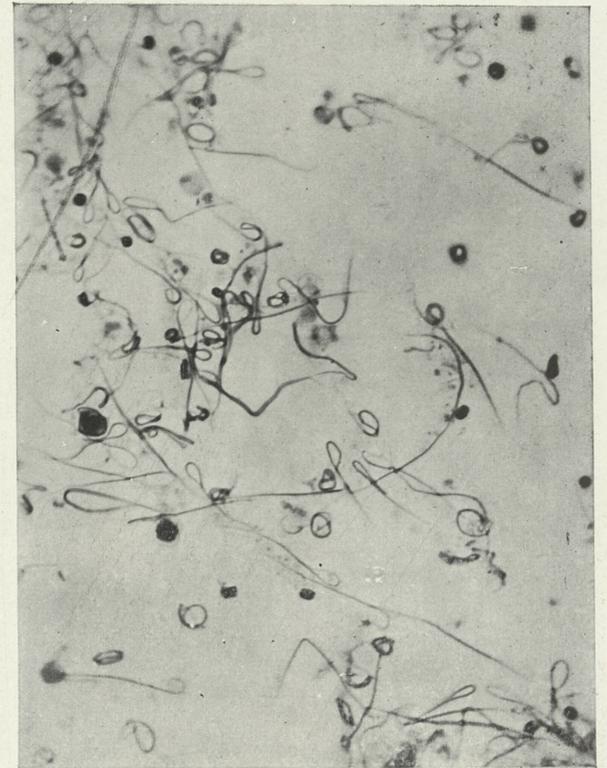
4



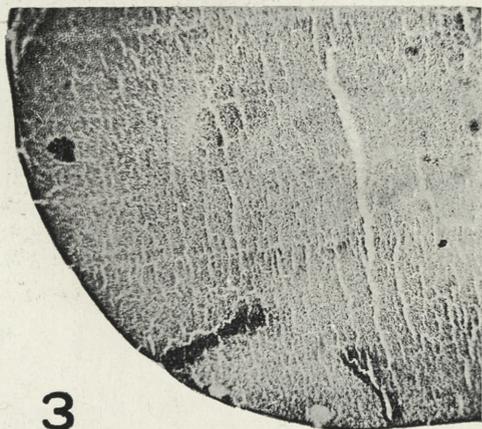
2



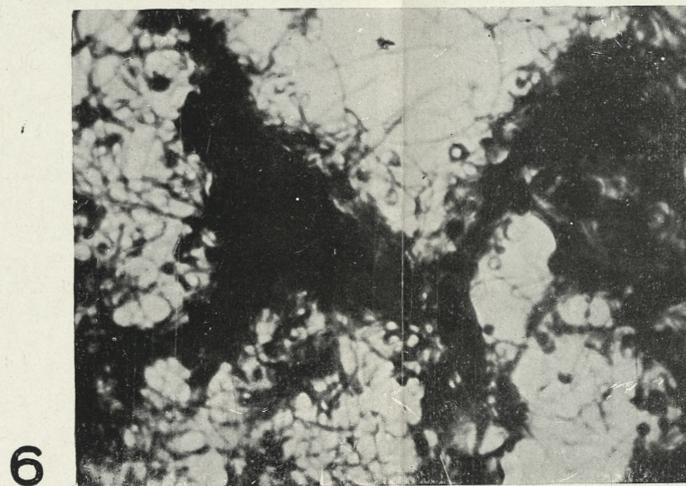
5



7



3



6



8

Z. Menschki

respondent aux têtes des spermatozoïdes. Elles ont gonflé et se sont désagrégées. Grossiss. $\times 75$.

Microphot. 4. Coupe transversale d'un oeuf au début de la segmentation irrégulière, conséquence de l'insémination par du sperme réfrigéré. Polyspermie. Dégénérescence par vacuolisation des aires protoplasmiques, formées autour de spermatozoïdes morts, après avoir pénétré dans l'oeuf. Grossiss. $\times 150$.

Microphot. 5. Agrégation des spermatozoïdes déterminée par la réfrigération du sperme. Description dans le texte. Grossiss. $\times 450$.

Microphot. 6. Coagulation en masse des spermatozoïdes déterminée par la réfrigération du sperme. Description dans le texte. Grossiss. $\times 450$.

Microphot. 7. Altérations prémortelles des spermatozoïdes, déterminées par la réfrigération du sperme. Description dans le texte. Grossiss. $\times 450$.

Microphot. 8. Sperme normal non réfrigéré de la Grenouille rousse. Grossiss. $\times 450$.

Bibliographie.

- 1) Bachmetjew A.: 1911. Experimentelle entomologische Studien vom physikalisch-chemischen Standpunkte aus. Bd. I. Leipzig. — 2) Boveri Th.: 1907. Zellenstudien. VI. Die Entwicklung dispermer Seeigeleier. Ein Beitrag zur Befruchtungslehre und zur Theorie des Kerns. Jena. — 3) Brachet A.: 1910a. Recherches sur l'influence de la polyspermie expérimentale dans le développement de l'oeuf de *Rana fusca*. Arch. de Zool. exp. et gén. V. série VI. — 4) Brachet A.: 1910b. La polyspermie expérimentale comme moyen d'analyse de la fécondation. Arch. f. Entw. mech. XXX, 261. — 5) Brachet A.: 1912. La polyspermie expérimentale dans l'oeuf de *Rana fusca*. Arch. f. mikroskop. Anat. LXXIX. — 6) Buller A. H.: 1902. Is chemotaxis a factor in the fertilization of the eggs of animals? Quart. Journ. Micr. Sc. 56, 145. — 7) Bury J.: 1912. Über den Einfluß der Temperatur von 0°C auf die Entwicklung der Echinideneier. Bull. Ac. Sc. Cracovie. B. 791. — 8) Bury J.: 1913. Experimentelle Untersuchungen über die Einwirkung der Temperatur 0°C auf die Entwicklung der Echinideneier. Arch. f. Entw. mech. XXXVI. — 9) Carter G. S.: 1930. Thyrotoxine and the oxygen consumption of the spermatozoa of *Echinus miliaris*. Journ. Exp. Biol. 7, 41. — 10) Cloves G. H. and Bachman E.: 1921. On a volatile sperm-stimulating substance derived from marine eggs. Journ. Biol. Chem. 46, 31. — 11) Cohn E. J.: 1918a. Studies in the physiology of spermatozoa. Biol. Bull. 34, 167. — 12) Cohn E. J.: 1918b. Self-fertilization in the airbreathing pond smails. Biol. Bull. 35. — 13) Dalcq A.: 1928. Les bases physiologiques de la fécondation et de la parthénogénèse. Presses Univers. de France. — 14) Dalcq A.: 1931. Contribution à l'analyse des fonctions nucléaires dans l'ontogénèse de la grenouille. I. Étude cytologique des oeufs fécondés par du sperme trypaflaviné. Arch. de Biol. XLI. — 15) Dungern E.: 1902. Neue Versuche zur Physiologie der Befruchtung. Zeit. Allg. Physiol. I. — 16) Ecker A., Wiedersheim R., Gaupp E.:

1896. Anatomie des Frosches. Braunschweig. — 17) Gellhorn E. 1922. Beiträge zur vergleichenden Physiologie der Spermatozoen. II, III. Pflügers Arch. 193. — 18) Gemmil J.: 1900. On the vitality of the ova and sperm of certain animals. Journ. Anat. Physiol. XXXIV. — 19) Godlewski E. jun.: 1911. Studien über die Entwicklungserregung. I. Kombination der heterogenen Befruchtung mit der künstlichen Parthenogenese. II. Antagonismus der Einwirkung des Spermas von verschiedenen Tierklassen. Arch. f. Entw. mech. XXXIII. — 20) Godlewski E.: 1926a. Problem der Entwicklungserregung. Handbuch d. norm. und pathol. Physiologie. Bethe-Bergmann, Embden. XIV. — 21) Godlewski E.: 1926b. L'inhibition réciproque de l'aptitude à féconder de spermés d'espèces éloignées comme conséquence de l'agglutination des spermatozoïdes. Arch. Biol. XXXVI. — 22) Godlewski E.: 1930. Über die Agglutinationserscheinungen der Echinidensamenfäden unter dem Einfluß der aus fremdartigen Geschlechtselementen gewonnenen Substanzen und deren Fähigkeit die Sistierung des Entwicklungsganges herbeizuführen. Bull. Ac. Sc. Cracovie. — 23) Godlewski E.: 1934. Nouvelles recherches sur l'hétéroagglutination des spermatozoïdes et sur l'action d'extraits de cellules sexuelles d'espèces étrangères. Arch. Biol. XLV. — 24) Goldforb A. J.: 1929a. Variation of normal germ cells. Studies in agglutination. Biol. Bull. LVII. — 25) Goldforb A. J.: 1929b. Changes in agglutination of ageing germ cells. Biol. Bull. LVII. — 26) Goldforb E.: 1929c. Factors that change Agglutinability of ageing sperm. Biol. Bull. LVII. — 27) Gray J.: 1913. The effects of hypertonic solutions upon the fertilized eggs of Echinus. Quart. Journ. Micr. Sc. LVIII. — 28) Gray J.: 1920a. The relation of animal cells to elektrolytes. I. A physiological study of the egg of the trout. Journ. Physiol. 53, 308. — 29) Gray J.: 1920b. The relation of spermatozoa to certain elektrolytes. II. Proc. Roy. Soc. B. 91, 117. — 30) Gray J.: 1922. A cortical study of the facts of artificial fertilization. Quart. Journ. Micr. Sc. 66, 419. — 31) Gray J.: 1931. A Text-Book of experimental Cytology. — 32) Grodziński Z. and Marchlewski J.: 1938. The influence of the serum upon the motility of spermatozoa of the domestic Cock. Bull. Ac. Sc. Cracovie. — 33) Hammond J.: 1930. The effect of temperature on the survival in vitro of rabbit spermatozoa obtained from the vagina. Journ. of Exp. Biol. VII, 175. — 34) Herlant M.: 1911. Recherches sur les oeufs di- et trispermiques de grenouille. Arch. Biol. XXVI. — 35) Hertwig O.: 1894. Über den Einfluß der Temperatur auf die Entwicklung der Froscheier. Sitz-Ber. d. Kgl. Preuss. Akad. d. Wiss. Berlin. 17. — 36) Hertwig O. und R.: 1887. Über die Befruchtungs- und Teilungsvorgänge des tierischen Eies unter dem Einfluß äußerer Agentien. Jen. Zeitschr. XX. — 37) Jahnelt F.: 1937. Klinische Wochenschr. II. 1304. — 38) Jahnelt F.: 1938a. Klinische Wochenschr. I. 836. — 39) Jahnelt F.: 1938b. Über die Widerstandsfähigkeit von menschlichen Spermatozoen gegenüber starker Kälte. Klin. Wochenschr. 37, 1274. — 40) Jenkinson J. W.: 1906. On the effect of certain solutions upon the development of the Frog's egg. Arch. Entw. mech. 21, 367. — 41) Jenkinson J. W.: 1911. On the effect of certain isotonic solutions on the development of the Frog. Arch. Entw. mech. 32, 688. — 42) Jensen P. und Fischer H. W.: 1911. Der

Zustand des Wassers in der überlebenden und abgetöteten Muskelsubstanz. Zeitschr. f. allg. Physiol. Bd. II. — 43) Kalwaryjski B.: 1926. Über Samenfädenagglutination unter Einwirkung chemischer Agentien. Biochem. Zeitschr. 169. — 44) Koelliker A.: 1856. Physiologische Studien über die Samenflüssigkeit. Zeit. Wiss. Zool. VII. — 45) Lach L.: Communication de nature privée. Recherches sur l'influence de la température basse sur les oeufs de grenouilles. Travail exécuté dans l'institut de Biologie et d'Embryologie de l'Université de Cracovie, jusqu'à présent non publié. — 46) Lewis F. J.: 1920. Osmotic properties of some plant cells at low temperatures. Ann. of botany. 34, 405. — 47) Lillie F. R.: 1910/12. Studies of fertilization. I, II. Journ. of morphol. XXII.—III., IV. Journ. of exp. zool. XII. — 48) Lillie F. R.: 1913a. The mechanism of fertilization. Science. XXXVIII. — 49) Lillie F. R.: 1913b. Studies of fertilization. V. The behaviour of the spermatozoa of Nereis and Arbacia with special reference to egg extractives. Journ. Exp. Zool. XIV. — 50) Lillie F. R.: 1914. Studies of fertilization. VI. The mechanism of fertilization in Arbacia. Journ. Exp. Zool. XVI. — 51) Lillie F. R.: 1915a. Sperm agglutination and fertilization. Biol. Bull. XXVIII. — 52) Lillie F. R.: 1915b. St. of fertil. VII. Analysis of variations in the fertilizing power of sperm suspensions of Arbacia. Biol. Bull. XXVIII. — 53) Lillie F. R.: 1915c. The fertilizing power of sperm dilutions of Arbacia. Proc. Nat. Acad. Sc. I. — 54) Lillie F. R.: 1921. St. of fertil. VIII., IX. Biol. Bull. of the marine biol. laborat. XC. — 55) Lillie F. R. and Just E. E.: 1926. Fertilization. Text-book of E. V. Cowdry: General Cytology. — 56) Loeb J. and Lillie F. R.: Cité d'après Morgan 1927. — 57) Mantegazza P.: 1866. Gaz. Met. Ital. Lombard. Sér. V. 34, 289. Cité d'après Jahnel 1938b. — 58) Maximow N. A.: 1914. Experimentelle und kritische Untersuchungen über das Gefrieren und Erfrieren der Pflanzen. Jahrb. f. wiss. Bot. 53, 327. — 59) Mez C. 1905. Neue Untersuchungen über das Erfrieren eisbeständiger Pflanzen. Flora. — 60) Morgan T. H.: 1927. Experimental Embryology. — 61) Olbrycht T.: 1935. Sztuczne unasienienie (inseminacja) klaczy. Przegląd Weterynaryjny XII. — 62) Olbrycht T.: 1936. Technika sztucznego unasieniania bydła. Przegląd Weterynaryjny XI et XII. — 63) Olbrycht T.: 1937a. Sztuczna inseminacja owiec. Przegląd Weter. VII. — 64) Olbrycht T.: 1937b. Sztuczna inseminacja zwierząt gospodarskich. Przegląd Hodowlany IX—XI. — 65) Olbrycht T.: 1938. La fecondazione artificiale degli animali domestici. La Clinica Veterin. VI. — 66) Pawlow G.: 1927. Einfluß niedriger Temperaturen auf die Spermatozoen. Russkij fiziologiceskij žurnal. 10, 3/4, 291. — 67) Prawocheński R. et Walton A.: 1935. Sztuczna inseminacja owiec na odległość. Pamiętnik Państw. Inst. Nauk Gosp. Wiew. w Puławach. XVI, 1. — 68) Rahn O. und Gilbert H.: 1920. Einwirkung sehr niederer Temperaturen auf die Moosfauna. Verhandl. d. koninkl. akad. v. wetensch. Amsterdam. (Naturwiss. Abt.) XXIX. 499. — 69) Romeis B.: 1932. Taschenbuch der mikroskopischen Technik. — 70) Sampson M.: 1922. Iso-agglutination and heteroagglutination of spermatozoa. Biol. Bull. XLIII. — 71) Schultze O.: 1894a. Über die Einwirkung niederer Temperatur auf Entwicklung des Frosches. 1. Mitt.

- Anat. Anz. Bd. X. — 72) Schultze O.: 1894b. Über die Einwirkung niederer Temperatur auf die Entwicklung des Frosches. 2. Mitt. Anat. Anz. Bd. XVI. — 73) Schücking A.: 1903. Zur Physiologie der Befruchtung, Parthenogenese und Entwicklung. Arch. ges. Physiol. XCVII. — 74) Smith H. W. and Cloves G. H. A.: 1924. The influence of CO₂ on the velocity of division of marine eggs. Am. Journ. Phys. LXVIII. 183. — 75) Walton A.: 1924. Studies on the Physiology of Reproduction. I. The Flocculation of Sperm-suspensions in Relation to Surface. Brit. J. Exper. Biol. II. — 76) Yamane J.: 1921. Studien über die physikalische und chemische Beschaffenheit des Pferdesspermas mit besonderer Berücksichtigung der Physiologie der Spermatozoen. Hokkaido Imp. Univers. Sapporo. IX. — 77) Zacharowa M.: 1926. Jahrb. f. wiss. Botanik. LXV. 61.
-

*Badania nad zachowaniem się stosunku plazmojądrowego
w nowotworach. — Einige Beiträge zur Frage der Kern-
plasma-Verhältnisse bei malignen Tumoren.*

Mémoire

de M. H. KOWARZYK,

présenté le 26 Juin 1939 par M. E. Godlewski m. t.

Literaturübersicht.

Bekanntlich ist das Kernplasma-Verhältnis der Zellen in den gleichen Geweben bei Tieren derselben Art und Rasse, des gleichen Alters, wenn in deren Lebensbedingungen keine Veränderung eintritt, meistens konstant. Es unterliegt dagegen Veränderungen im Laufe der Ontogenese, und hängt außerdem vom Funktions- und Ernährungszustand des Gewebes ab. Eine Übersicht der Literaturangaben bis zum Jahre 1910 ist in einem Referat von J. Bury enthalten (Kosmos, Bd 35).

Die Veränderungsmöglichkeiten der Zell-Kernverhältnisse lassen sich ihrem Wesen nach in zwei Hauptgruppen einteilen, denen eine verschiedene biologische Bedeutung zugeschrieben werden muß.

Die erste Hauptgruppe umfaßt alle Veränderungen in der Kernplasma-Relation, die eine Beziehung zu den Vorgängen der Zellteilung und der Entwicklung aufweisen. Hierher gehören zahlreiche Arbeiten, die in der Folge ausführlich besprochen werden sollen.

Die zweite Hauptgruppe umfaßt Veränderungen der Kernplasmarelation, die durch äußere Einwirkungen auf die Zelle (wie z. B. durch die Wirkung von Kohlensäure, Temperatur, Osmose) durch den funktionellen Zustand des Gewebes, durch Altersveränderungen und desgleichen hervorgerufen worden sind. Hierher ge-

hören die Untersuchungen von E. Godlewski jun. (1), S. u. H. Skowron (2), Latyszewski (3), Berezowski (4), H. Marcus (5), S. Morgulis (6), O. Koehler (7) u. v. anderen.

In der vorliegenden Arbeit wird ausschließlich die erste Hauptgruppe der Kern-Plasmaveränderungen eingehender besprochen werden. Nichtsdestoweniger muß dabei stets an die Möglichkeit gedacht werden, daß auch außerhalb der Entwicklungsvorgänge Unterschiede in dem Verhalten der Relation vorkommen können.

Im Ruhestadium einer Zelle, zwischen zwei Teilungsschritten, wächst zuerst das Zellplasma, nicht aber der Zellkern, die Relation verschiebt sich also zugunsten des Plasmas. Kurz vor der Teilung beginnt der Zellkern an Masse zuzunehmen, er holt das Plasmawachstum ein, so daß im Augenblick der Zellteilung die Relation den Höchstwert erreicht. Dieses Verhalten der Relation ist als eine allgemein gültige Gesetzmäßigkeit von Gerassimow (8), Boveri (9), R. Hertwig (10), M. Popoff (11) anerkannt worden. Eine Ausnahme bildet nach Godlewski (12) das befruchtete Ei; bei der Teilung in 2 Blastomeren weist dieses keinen Zuwachs der Kernmasse auf.

Die Lehre von der Kernplasmaanspannung wurde auf das Gebiet der morphogenetischen Lebensvorgänge zum ersten Male von E. Godlewski jun. (1) ausgedehnt.

Von den drei morphogenetischen Prozessen, bei denen die prospektive Zellpotenz zur Auswirkung gelangt, nämlich bei der ontogenetischen Entwicklung, bei den Regenerationsvorgängen und schließlich bei der Bildung von Tumoren, hat Godlewski jun. die beiden ersten Vorgänge untersucht, die Bedeutung des dritten Prozesses erkannt und zur Untersuchung desselben mehrmals aufgefordert.

E. Godlewski jun. fand beim *Echinus microtuberculatus* und bei der *Asteria glacialis*, während der Eireifung einen hohen Zuwachs des plasmatischen Raumes, bei gleichzeitiger Abnahme des Kernvolumens so, daß das reife Ei ein vielfach kleineres Kern-Plasma-Verhältnis als die unreifen Eizellen aufweist.

In den späteren Stadien der Entwicklung beschränkte sich Godlewski jun. nicht auf die Untersuchung der Kernplasmaanspannung einzelner Zellen, sondern er berechnete die gesamte Kernmasse des Embryos. Er fand auf diese Weise, daß die Gesamtmasse aller Kerne im Blastulastadium der Masse des Kernes im

unreifen Ei entspricht. Daraus folgte nun der Schluß, daß ein Teil der im Kerne gelagerten Substanzen den Kernraum während der Eireifung verlassen und sich im Plasma verteilt hatte. Während der Furchungsstadien sammeln sich dieselben Substanzen wiederum in den neugebildeten Kernen an.

Bei den Seeigeln genügt der während der Eireifung im Plasma deponierte Vorrat an Kernmaterial zur späteren Organisation der gesamten Kernmasse bis in das Gastrulastadium hinein. Bei der *Asteria glacialis* findet Godlewski einen etwas früheren Aufbrauch dieses vorrätigen Kernmaterials: die gesamte Kernmasse ist hier bereits im Gastrulastadium derart groß, daß eine Neubildung des Kernmaterials angenommen werden muß.

Den Zuwachs der Kernsubstanz während des ontogenetischen Geschehens hält J. Loeb (13) — da sich in den frühen Entwicklungsvorgängen des Embryos keine Substanzen von außen assimilieren — für einen Synthese-Vorgang, bei dem aus Plasmasubstanzen die für den Kern spezifischen Verbindungen entstehen. Nach den Untersuchungen von E. Godlewski jun., die auch bezüglich des Verhaltens der Nukleinsäure und ihrer Komponenten eine direkte chemische Bestätigung in den Untersuchungen Masings's (14), L. F. Schackel's (15) u. a. fanden, handelt es sich hier, wenigstens bis in das Blastulastadium hinein, nicht um eine Synthese, sondern um eine Umorganisation, wobei die Kernsubstanz (resp. die Nukleinsäure) aus dem Plasmaraum in den Kernraum verlagert wird. In den späteren Entwicklungsvorgängen wird sich natürlich die Kernsubstanz von neuem bilden müssen. Es ist selbstverständlich, daß bei jedem Wachstumsvorgang, bei dem sich die Kernplasmarelation nicht verändert, aber neue Kerne entstehen, eine »Synthese« von Kernsubstanzen stattfinden muß.

Während der Epithelregenerierung bei den Amphibien hat wiederum E. Godlewski jun. (16) eine erhöhte Plasmakernrelation so wie beim Prozeß der Eireifung gefunden. Dieses Ergebnis läßt vermuten, daß das Zellplasma der Regeneratanlage ein Material enthält, aus dem sich während der weiteren Entwicklung des Regenerates die Kerne der neugebildeten Zellen organisieren.

E. Godlewski jun. hält jedoch diesen Vorrat an Kernmaterial für viel zu klein, um die gesamte spätere Kernbildung damit erklären zu können. Offenbar wird außer des umorganisierten Vorrats an Kernmaterial in der Regeneratanlage, später auch eine

richtige »Synthese« der Kernsubstanzen stattfinden müssen, damit der Mangel an Kernmaterial im gesamten Regenerat behoben wird.

Die Untersuchungen von E. Godlewski jun. ergaben also, daß während der Eireifung ein Übergang der Substanzen aus dem Kernraum in das Plasma stattfindet. Analog findet man bei den Amphibien eine Verschiebung des Kernplasma-Verhältnisses zugunsten des Plasmas in den Haut-Regeneratanlagen. Während der weiteren Entwicklung des befruchteten Eies bis etwa in das Gastrulastadium hinein sowie während der Reifung des Regenerates findet eine Rückwanderung der Substanzen in der Richtung vom Plasmatorritorium in den Kernraum statt. Hier muß noch erwähnt werden, daß ähnliche Ergebnisse bei der Entwicklung der Eier von E. C. Conklin (l. c. 11) und von O. Koehler (17) erhoben wurden. Im Laufe der Spermatogenese bei der *Helix pomatia* fand S. Skowron (18) zwar keine Anhaltspunkte für die Annahme einer Auswanderung der Kernsubstanzen in das Plasma der Spermatogonien und der Spermatocyten, nichtsdestoweniger ergaben sich hier beträchtliche Schwankungen der Kernplasmarelation, für die eine Erklärung noch nicht vorliegt (S. Skowron, 18).

Die Gedankengänge und Versuchsergebnisse von E. Godlewski jun. über die Kernplasmaverhältnisse während der Entwicklung und der Regeneration bilden den Ausgangspunkt meiner Untersuchungen. Es handelt sich hier also um eine Untersuchung der Kernplasmaspaltung in den malignen Tumoren, die im Anschluß an ähnliche Untersuchungen bei der Eireifung und Regeneratbildung einen Einblick in die Tumorgenese ermöglichen könnte.

Wir verfügen bis heute nur über eine geringe Anzahl von Messungen der Kernplasmarelationen in den verschiedenen Geschwulstgeweben, wobei überdies noch keine eindeutigen Resultate erzielt worden sind. Soweit ich die diesbezügliche Literatur übersehen kann, haben systematische Untersuchungen nur Sokoloff (19) und Heiberg (20) unternommen. Die Ergebnisse beider Forscher stimmen überein, doch ist ihre Deutung recht verschieden.

Sokoloff bestimmte die Plasmakernrelation an 10 Mäuseepitheliomen und bei einer Reihe menschlicher Tumoren. Das

Ergebnis war in beiden Reihen das gleiche. Das Tumorgewebe hatte im Vergleich zum reifen Normalgewebe eine kleinere Plasmakernrelation.

Sokoloff berechnet das Kern-Zellverhältnis auf eine prinzipiell andere Weise, als dies im hiesigen Institut üblich ist. Er berechnet nämlich nicht die Volumina der Zelle und des Kernes, sondern er mißt die Querschnittsoberflächen und berechnet durch Division dieser Oberflächenwerte eine Relation, die zu dem räumlichen Kernplasmaverhältnis in einer fixen Proportion steht, ihm jedoch nicht gleicht.

Sokoloff bestimmte die Kernzellrelation (nach der Oberflächenformel) bei 10 Mäuseepitheliomen und bekam Werte, die (nach einer annähernden Umrechnung in die Volumenverhältnisse) durchschnittlich 8,3, maximal 9,8, minimal 7,4 entsprachen. Seine Werte verglich er, ohne selbst nach einem Vergleichswert zu streben, mit den Angaben von Berezowski (21), wobei er jedoch nicht beachtete, daß Berezowski seine Untersuchungen an Darmepithelzellen, nicht aber an Hautschichten angestellt hatte. Leider war mir die ausführliche Mitteilung Sokoloff's (J. of Cancer Research. 7. 395. 1923) nicht zugänglich, so daß ich mich auf seine Angaben in den C. R. de la Soc. de Biol. beschränken muß. Das Kernplasma-Verhältnis der Tumoren ist danach kleiner als im Normalepithel, es nähert sich dagegen sehr den Werten bei neugeborenen Mäusen.

Heiberg bestätigte das Ergebnis von Sokoloff an menschlichen Tumoren, er glaubt jedoch aus seinen Messungen andere Schlußfolgerungen ziehen zu müssen. Vor allem wirft er Sokoloff vor, daß das Kernplasmaverhalten des menschlichen spinocellulären Karzinoms nicht mit der *Spinosum*-Schicht verglichen werden kann, sondern eher mit dem *Stratum basale*, d. h. also mit der wachsenden Hautschicht. Diese hat aber eine kleinere Plasmakern-Relation. Er kommt bei diesem Vergleiche zu dem Schluß, daß das Kernplasmaverhalten des Karzinoms demjenigen des wachsenden Hautepithels (des *Stratum basale*) der Haut ähnelt, resp. gleich ist.

Die Behauptung Sokoloff's, daß bei menschlichen spinocellulären Karzinomen das Kernplasmaverhältnis zugunsten der Kerne verschoben sei, widerlegt also Heiberg mit dem Hinweis, daß dieses Verhältnis bei schwach verhornenden Karzinomen

nicht mit dem *Stratum spinosum*, sondern mit dem wachsenden *Stratum germinativum* verglichen werden kann und daß dieser Vergleich eine weitgehende Ähnlichkeit der Kernplasma-Verhältnisse ergibt.

Laut den Angaben von A. H. Roffo und A. Lasserre (22) ist im Embryonalgewebe das Verhältnis des Purinstickstoffes zum gesamten Stickstoff bei Ratte und Huhn zugunsten des Purinstickstoffes verschoben. Dies würde ein relatives Übergewicht der Kernsubstanzen dem Zellplasma gegenüber bedeuten. Bei einer Reihe von Rattensarkomen und Karzinomen finden Roffo und Lasserre ein ähnliches Übergewicht an Purinstickstoff.

Dieser Versuch ist kein Beweis, doch weist er darauf hin, daß die Kernplasmaspaltung im Tumorgewebe der Norm gegenüber erhöht ist, und sich den embryonalen Verhältnissen nähert. Nebenbei muß vermerkt werden, daß sich laut einer Untersuchung von G. Klein und J. Beck (23) die Thymonukleinsäure aus menschlichen und tierischen malignen Tumoren von derjenigen der Normalorgane in der Zusammensetzung und im Verhalten bei Salzsäure-Hydrolyse nicht unterscheidet.

Viel reichhaltiger als in Bezug auf das Kernplasmaverhalten, ist die Literaturübersicht in Bezug auf Messungen der Kerngröße allein, im Normal- und Tumorgewebe.

Die Besprechung dieser Befunde erheischt eine kurze Einführung in die normal-histologischen Befunde über die Zellkerngrößen.

Jacobj (24) fand, daß sich in der Mäuseleber erwachsener Tiere die Kerngrößen nicht nach der einfachen variationsstatistischen Kurve nach Quetelet verteilen, sondern, daß hier mehrere »bevorzugte« Größenklassen vorkommen. Die am häufigsten vorkommende Kerngröße wird als »Regelklasse« bezeichnet. Die kleinsten Kerne bilden die sog. »Grundklasse«. Jacobj fand nun, daß die Kerngrößen der einzelnen Kernklassen dem Gesetz der Multipla folgen: sie verhalten sich nämlich zu der Grundklasse wie 1:2:4. Bei der embryonalen Leber und auch bei der Leber der Neugeburt der Maus, ist nur eine Kernklasse, nämlich die Grundklasse vorhanden. Bei manchen Tieren (Jacobj hat in dieser Hinsicht die Leber des Proteus gemessen, ich habe gelegentlich das nämliche auch bei der Molchleber und bei den Zel-

len der *Tubuli contorti* von Mäusenieren feststellen können) haben die Leberkerne auch bei dem erwachsenen Tiere nur eine einfache variationsstatistische Größenkurve. Bei vielen Tieren, insbesondere aber beim Menschen, treten die weiteren Klassen auf, wobei als Regelklasse nicht mehr die Grundklasse, sondern eine der nächsten Größenordnungen auftritt. Jacobj nennt diese Gesetzmäßigkeit den »volumetrischen Bauplan« der Organe.

Die Ergebnisse von Jacobj wurden von Clara (25), Voss (26) u. a. nachuntersucht und bestätigt.

Wenn man von den älteren Angaben absieht, die die Kerngröße in den Tumoren nicht auf Grund genauer Messungen, sondern einfacher Schätzungen für erhöht halten, so müssen hier (außer den bereits besprochenen Untersuchungen von Heiberg und Sokoloff, ferner von Nomicos (27) und von Epantschin (28)) die Untersuchungen zweier Arbeitskreise erwähnt werden: nämlich desjenigen im Pathologischen Institut der Universität Rostock (29—33) und des Pathologischen Institutes der Universität Tübingen (34—36). Das Verdienst, die Kerngröße in den Tumoren im Anschluß an die Untersuchungen von Jacobj, mit den modernen technischen Mitteln erstmalig gemessen zu haben, muß G. Arndt (29) aus Rostock zugeschrieben werden.

Obwohl die Kernmessungen in verschiedenen Instituten unternommen worden sind, stimmen alle Forscher darin überein, daß im Krebsgewebe eine Vergrößerung der Kerne vorkommt sowie, daß bei benignen Gewächsen eine ähnliche Vergrößerung im kleineren Maßstabe stattfindet. Die Ergebnisse der Messungen führen jedoch zu verschiedenen Folgerungen. Während der Arbeitskreis in Rostock zu beweisen strebt, daß die Krebskerne im Vergleich zu den Normalkernen des Ausgangsgewebes ein doppeltes oder vierfaches Volumen haben, liefern die Untersuchungen aus Tübingen Beispiele für maligne Gewebe, die eine größere oder kleinere Abweichung von dieser Gesetzmäßigkeit aufweisen.

Eine Übersicht der einander gegenüber stehenden Meinungen kann meiner Meinung nach zur Annahme führen, daß zwar Hinweise dafür vorliegen, daß die Krebszellkerne sich nach dem volumetrischen Bauplan Jacobj's verhalten, daß jedoch die technischen Meßschwierigkeiten und nicht zu allerletzt auch die Abweichungen der Kerngrößen, die durch äußere Nebenumstände (z. B. Hungerzustand der Zelle infolge nicht genügender Blutversorgung,

mechanische Druckmomente, u. v. a.) bewirkt werden, die Feststellung einer volumetrischen Gesetzmäßigkeit bei den Krebszellen beträchtlich erschweren. Wermel (36) u. m. a. stellten fest, daß die Kerngröße durch verschiedenartige äußere Einwirkungen beeinflusst werden kann. Ähnliches berichten Lukjanoff (38) Jarotzky (39), Angyal (40), u. a.

Schließlich muß noch erwähnt werden, daß nach Carrel (41) bei Umwandlung von Normalzellen in Tumorzellen, in Explantaten und unter Einwirkung der Extrakte von Roustumoren, ebenfalls eine unzweifelhafte Vergrößerung der Zellkerne eintritt.

Der Befund, daß sich die Kerngröße verändert, hat von den ersten Untersuchungen Heibergs angefangen, oft zu der Annahme geführt, daß sich die maligne Zelle von der Normalzelle durch die Chromosomenzahl unterscheidet. In Anlehnung an die bereits erwähnten Kernmessungen des Rostock'schen Arbeitskreises nimmt Arndt an, daß die Tumorzelle aus der Normalzelle durch eine »tetraploide Entgleitung« entstehen kann. Dazu muß prinzipiell Folgendes bemerkt werden.

Abnormitäten in der Chromosomenzahl bedeuten an sich keineswegs eine karzinomatöse Entartung der Zelle; sie können sogar normale Entwicklungsvorgänge begleiten.

Die Versuche, die Chromosomen in den mitotisch sich teilenden Tumorzellen zu zählen, ergaben kein gesetzmäßiges Bild; im Gegenteil, sie widersprachen einander.

Überzeugend fiel eine Untersuchung von Winge (42) aus. Als Objekt diente ihm der sog. »crown gall« — Tumor der Zuckerrüben und die Tumoren nach Inokulation des *Bct. Tumefaciens* auf Zuckerrüben. Bei beiden Tumorzellarten wurde gewöhnlich eine tetraploide Chromosomenzahl in den sich teilenden Zellen festgestellt. Bei den Teertumoren der Maus fand Winge gleichfalls Abnormitäten in der Chromosomenzahl, die jedoch in demselben Tumor von Zelle zu Zelle verschieden ausfielen. Er vermied hier also die gesetzmäßige Tetraploidie, wie sie bei den Pflanzentumoren vorkommt. Nun tragen jedoch die pflanzlichen Wachstums-exzesse einen durchaus anderen Charakter, als die tierischen malignen Tumoren.

Für die Tumefacienstumoren hat H. Hamdi (43) in einer eingehenden Untersuchung nachgewiesen, daß es sich hier ausschließlich um eine durch fortgesetzte Bakterienreizung hervorgerufene

Mißbildung handelt, so wie sie auch bei Tieren, bei wiederholten Regenerationsreizen vorkommen kann. Dabei fehlt jedoch das Hauptmerkmal des Karzinoms, nämlich die Befähigung der Geschwulstzellen zum autonomen Wachstum. Die tetraploiden Pflanzenzellen wachsen nicht autonom, sondern ausschließlich, wenn sie durch die begleitenden Tumefaciensbakterien zum Wachstum angeregt werden.

Bei den Tomaten findet man nach einfacher Abtragung der Stammspitze und bei der *Nicotiana* nach Behandlung der Wunde mit Heteroauxin zwischen den aus dem regeneratorschen Callus hervordachsenden Sprossen Tetraploide in einem großen Prozentsatze (W. H. Greenleaf, 44). Bezeichnenderweise betont Greenleaf, daß die tetraploiden Sprossen nicht nur keine größere, sondern sogar eine langsamere Wachstumstendenz besitzen als die normalen Diploiden.

Wenn es sich um pflanzliches, karzinomähnliches Versuchsmaterial handelt, so sind in dieser Hinsicht die Versuche von Emmy Stein (45) äußerst belehrend. Die Verfasserin fand in manchen Fällen von ausgedehnten Radium-Bestrahlungsversuchen der Samen einer Löwenmaulsippe eine extreme Form von Wachstumsexzessen, die dem Wachstum der Krebsgewebe durchaus gleichzustellen sind.

Die auf diese Weise krebsig entarteten pflanzlichen Zellen weisen sehr große Kerne auf. Bei der Mitose kann die Chromosomenzahl Tausende betragen. Auch hier ist keine einfache Gesetzmäßigkeit, etwa das Auftreten von Tetraploidie zu sehen, denn die Chromosomenzahl kann die allerverschiedensten Werte annehmen.

R. Goldschmidt und A. Fischer (46) haben Chromosomenuntersuchungen an Ehrlich'schem Mäuseadeno-Karzinom und einigen spontanen Mamma-Karzinomen in der Gewebszucht angestellt. Sie fanden, daß der Verlauf der Mitose in einer überwältigenden Mehrzahl von Fällen durchaus normal ist. Unter Hunderten von Mitosen stellten sie nur zwei dreipolige Mitosebilder fest. In den meisten Zellen war jedoch die Chromosomenzahl kleiner als normal. Während bei der Maus die diploide Chromosomenzahl 40 beträgt, wurden bei den gezüchteten Tumorzellen Zahlen zwischen 32 und 36 gefunden. Nicht selten kamen jedoch auch Zellen vor, die ungefähr 40 Chromosomen enthielten. In manchen Präparaten ergab die Zählung etwa 80 Chromosomen,

also die tetraploide Zahl. Im allgemeinen beweisen die Befunde von Goldschmidt und Fischer, daß die Tumorzellen abnorme Chromosomenverhältnisse aufweisen, gleichzeitig jedoch, daß diese Abnormitäten nicht typisch sind und in den gleichen Präparaten von Zelle zu Zelle verschiedenartig auftreten. Zu dem gleichen Ergebnis kamen Hirschfeld und Klee-Rawidowicz. Es ist schwer, auf Grund derartiger Befunde unzweifelhafte Beweise für die Tumorgenese aufzustellen. Eher dürfte eben die große Variabilität der Chromosomenbefunde für sekundäre Ursachen sprechen. Fischer will in der Stoffwechselabnormität der Tumoren die Vorbedingung für diese, seiner Meinung nach unwesentlichen Chromosomenabnormitäten sehen. Jedenfalls können all diese Chromosomenzählungen nicht die Hypothese bestätigen, daß die Tumorzelle durch eine Verdopplung der Chromosomenzahl und des Kernvolumens aus der Normalzelle entstanden sei.

Eigene Untersuchungen.

Die Technik der Untersuchung und das Meßmaterial.

Die Bestimmung des Kernplasma-Verhältnisses erfolgte in meinen Untersuchungen nach zwei voneinander unabhängigen Methoden.

Die eine, wir wollen sie die Aufzeichnungs-Methode nennen, ist, meines Wissens, zuerst von E. Godlewski jun. ausgearbeitet worden. Bei Geschwulstuntersuchungen hat sie auch Heiberg benutzt.

Das Prinzip der Aufzeichnungsmethode ist folgendes: das mikroskopische Bild des Präparates wird auf einen Karton projiziert. Im Rahmen einer beliebigen, im Verhältnis zur Zellgröße möglichst groß gewählten Oberfläche, werden Umriss aller Kerne aufgezeichnet, wobei die Einstellung der Projektionsoptik nicht abgeändert werden darf. Man zeichnet also sowohl diejenigen Kerne, die im Projektionsbilde scharf hervortreten, wie auch die mehr oder weniger verschwommenen Umriss der Kernkalotten. Nachdem dies erfolgt ist, schneidet man das Projektionsbild aus dem Karton heraus. Man wägt dasselbe, dann schneidet man die Umriss der Kerne heraus und wägt separat die gesamten Kerne und die Plasmaschnitzel. Vorausgesetzt, daß der Karton in seiner gesamten Oberfläche in Bezug auf das spezifische Gewicht und die Dicke gleichmäßig beschaffen ist (dies muß bei jeder Messung

nachkontrolliert werden), ergibt der Quotient des Plasmas und des Kerngewichtes direkt den Wert des Plasma-Kernverhältnisses.

Um der Gefahr etwaiger Mißverständnisse vorzubeugen, glaube ich hier eine kurze Besprechung der geometrischen Voraussetzungen dieser Methode einfügen zu dürfen.

Das mit der Aufzeichnungsmethode nach Godlewski ermittelte Plasma-Kernverhältnis gibt keine Aufschlüsse über die absoluten Größen der Kern- oder der Plasma-Volumina. Nichtsdestoweniger ist der Wert dieses Verhältnisses gleich dem richtigen Werte, den wir erhalten würden, wenn wir eine direkte Methode für die Volumenmessung des Kernes und des Plasmas in der Hand hätten. Abgesehen von den unvermeidlichen Fehlern technischer Art bei der Aufzeichnung, Ausschneidung und Wägung, gibt die Aufzeichnungsmethode den absoluten Wert für das Verhältnis der Plasma- und Kern-Volumina, ohne Rücksicht auf die Schnittdicke sowie die Kern- und Zellgestalt.

Das hier vorausgeschickte Resultat einer geometrischen Analyse der Aufzeichnungsmethode läßt sich durch eine relativ einfache Umrechnung, die mir autoritativ seitens eines Fachmathematikers bestätigt wurde, beweisen. Der mathematische Beweisgang darf in dieser Arbeit wohl übergangen werden. Für die biologische Seite des Problems ist ja nur das Endresultat wichtig.

Prinzipiell setzt die Aufzeichnungsmethode nur den Umstand voraus, daß möglichst viele Querschnitte der Zellen und der Zellkerne wahllos aufgezeichnet und gewogen werden. In der Praxis kommen die bereits angeführten technischen Fehler selbstverständlich dazu, die übrigens nicht zu allerletzt von der persönlichen Geschicklichkeit des Ausführers abhängen. Ferner wird die Genauigkeit der Methode durch Mitwägung der von lymphatischen, interzellulären Spalten und Blutgefäßen besetzten Territorien beeinträchtigt.

In den in diesem Berichte enthaltenen Untersuchungen habe ich die Resultate der Aufzeichnungsmethode meistens durch eine zweite, vollständig unabhängige Messung zu bestätigen versucht. Diese zweite Methode, die ich werde sie die »Zählungsmethode« nennen, beruht auf der Aufzählung der Kernzahl, die sich in einem bestimmten Gewebsvolumen befindet. Da gleichzeitig das mittlere Volumen der Kerne bestimmt wird, so läßt sich das Plasmakernverhältnis aus diesen Daten berechnen.

Die praktische Ausführung der Versuche gestaltet sich folgendermaßen. Das Projektionsbild wurde auf einen Karton geworfen und die Kerne innerhalb eines Rahmens (der in meinen Versuchen eine Oberfläche von 5×5 cm hatte) aufgezählt. Die Dicke des Präparates wurde aus dem Mikrotomschnitt berechnet; außer einigen Präparaten, die am Eingang der Untersuchung gemacht wurden, habe ich stets den Mikrotomschnitt von 10 Mikronen gewählt. Da die Vergrößerung des mikroskopischen Bildes in diesen Versuchen 605 betrug, ließ sich aus diesen Daten das Volumen des Gewebes (freilich im fixierten Zustand) leicht berechnen. Gezählt wurden alle Kerne, deren größter Durchschnitt sich innerhalb des Gewebeschnittes befand. Es wurden also alle Kernkalotten verworfen. Während der Aufzählung wurde die Mikroschraube des Projektionsapparates dauernd gedreht und jeder Kern nur dann in die Zählung aufgenommen, wenn sein Umriß den scharfen Rand, der nach Jacobj und Arndt für den größten Kerndurchschnitt charakteristisch ist, aufwies. Es wurden also alle Kerne gezählt, die sich im Präparate *in toto* vorfanden, oder die durch den Mikrotommesser aufgeschnitten worden waren, aber deren größter Durchmesser sich innerhalb des Präparates befand. Das mittlere Kernvolumen wurde nach einem Verfahren berechnet, das weiter unten beschrieben wird, das Volumen des Gewebes war bekannt, da der Mikrotomschnitt und die mikroskopische Vergrößerung bekannt waren. Folglich konnte aus diesen Daten das Verhältnis des Zell- und Kernvolumens berechnet werden. Daraus kann man rein rechnerisch das Plasma-Kernverhältnis ermitteln. Und zwar ist das:

$$\frac{\text{Zell-Volumen}}{\text{Kern-Volumen}} = \frac{\text{Kernvolumen} + \text{Plasma Volumen}}{\text{Kernvolumen}} =$$

$$= \frac{\text{Plasma-Volumen}}{\text{Kernvolumen}} + 1$$

Inwieweit die beiden Methoden: die Aufzeichnungsmethode nach Godlewski und die Zählungsmethode übereinstimmende Werte ergeben, ist aus der unten angeführten Tabelle ersichtlich. Ein Beispiel für die Ausführung der Kernplasma-Relation-Messung vermittelt der Aufzählungstechnik liefert die Bestimmung bei einem Methylcholanthren-Epitheliom.

Es wurden drei Präparate von drei verschiedenen Tumorstellen untersucht. Schnittdicke 10 Mikronen. Vergrößerung 605. Die Kerne wurden innerhalb einer Projektionsfläche von 5×5 cm gezählt. Es wurden also bei jeder Zählung die Kerne innerhalb eines Gewebevolument (richtiger eines Präparatvolumens) von 68.200 Kubikmikronen (genauer 68.227,6) gezählt. In jedem Präparat wurden drei derartige Territorien gezählt.

Präparat 1 35 Kerne, 46 und 48

Präparat 2 49 „ 45 und 46

Präparat 3 49 „ 46 und 40

Durchschnittlich beträgt die Kernzahl 44·8

Man erhält nun das mittlere Zellvolumen durch die Division des Präparatvolumens durch die Kernzahl: $68.200 : 44 \cdot 8 = 1550$.

Das mittlere Kernvolumen (die Berechnungsart ist weiter unten angegeben) beträgt: 152 Mikronen. Daraus ist nun die Kernplasma-relation leicht zu berechnen: sie beträgt 9·2. Dementsprechend werden die maximalen Werte berechnet, indem einmal 35, das andere Mal 49 in die gleiche Rechnung als Kernzahl aufgenommen wird.

Nun muß die Untersuchungstechnik der Kerngrößen besprochen werden. Der Arbeitskreis in Rostock und in Tübingen geht nach der Originalmethode von Jacobj vor, indem er von jedem Kern (bei einer Vergrößerung von $1650 \times$ resp. $1500 \times$) zwei zueinander senkrechte Durchmesser mißt und daraus das Volumen nach der Ellipsoid-Formel berechnet, wobei er für die dritte, der direkten Messung nicht zugängliche Achse der Ellipsoide, das arithmetische Mittel der beiden gemessenen Durchmesser annimmt.

Meine Untersuchungen wurden bei einer Vergrößerung von $1350 \times$ vorgenommen. Ich habe die Kerne mit fein gespitztem Bleistift auf dem Projektionsbilde abpausiert, dann vermittels eines Millimeterpapiers ihre Oberfläche bestimmt. Aus der so erhaltenen Oberflächenzahl (O) wurde das Volumen (V) nach der Formel

$$V = \frac{4}{3} \sqrt{\frac{O^3}{\pi}}$$

berechnet.

Die praktische Ausführung erfolgte folgendermaßen: die Abhängigkeitskurve des Volumens von der gemessenen Querschnitt-

Oberfläche wurde ein für alle Male berechnet und graphisch ausgeführt, so daß durch einfache Verschiebungen des Lineals, das einem jeden Oberflächenwert entsprechende Volumen schnell abgelesen werden konnte. Die Volumenwerte wurden in Kubik-Millimetern ausgedrückt und auf Hundert abgerundet. Die Zahlen dienten schließlich zur Aufstellung der Variationskurven. Um aus diesen in Kubik-Millimetern ausgedrückten Werten die absoluten Werte in Kubikmikronen zu erhalten, müssen dieselben (wie leicht zu berechnen ist) bei einer Vergrößerung von $1350 \times$ durch die Zahl 2·5 dividiert werden.

Das hier benutzte Verfahren ist jedenfalls nicht weniger genau als die Methoden der Durchmessermessung. Beachtenswerterweise berücksichtigt Jacoby und der ganze Arbeitskreis in Rostock bei den Messungen ausschließlich die kreisrunden Kernumrisse. Ich habe dagegen auch alle ovalen Kerne mitgezählt und ausschließlich nur die vollkommen mißgestalteten Kerne ausgelassen, d. h. also diejenigen, die eine Einbuchtung oder etwa eine hammerförmige Gestalt aufwiesen. Ich hoffte, auf diese Weise einen um so höheren Objektivitätsgrad zu erreichen.

Meßmaterial und Meßergebnisse.

Die gesamten Untersuchungen wurden an frisch fixierten Geweben unternommen. Wir benutzten die Fixierungsflüssigkeit (außer einigen in Vorversuchen angefertigten und in diese Arbeit nicht einbezogenen Präparaten) von Bouin, modif. nach Allen (Romeis: Taschenb. der mikroskop. Technik, XIII Aufl., S. 84). Das Fixierungsgemisch wurde stets frisch zubereitet. Die Fixierung wurde im Thermostaten 5 St. lang vorgenommen. Die Schnitte wurden nach Einbettung in Paraffin mit Eisenhämatoxylin gefärbt. Die Nachfärbung wurde mit Eosin vorgenommen. Die Schnitte betrogen in allen Präparaten, außer in den Vorversuchen, je 10 Mikronen.

Es wurden stets von mehreren Stellen die Gewebstücke gleichzeitig fixiert und bei Messungen von jedem Schnitt die Präparate verschiedener Stellen berücksichtigt. Um etwaigen Fehlern, die durch eine ungleichmäßige Einschrumpfung der Präparate, die doch zu verschiedener Zeit fixiert und eingebettet wurden, vorzubeugen, habe ich bei Sarkomuntersuchungen mehrmals gleichzeitig ein Stück Leber mitfixiert, um auf diese Weise eine Kon-

trolle der relativen Größen, in Bezug auf das Lebergewebe zu erhalten. Da diese Vorsichtsmaßregel in durchaus befriedigender Weise die Gleichartigkeit der Präparate bewies, werde ich darauf verzichten, eine Zusammenstellung dieser Kontrolle noch separat anzuführen.

Der Mäusesarkom-Stamm, der zu dieser Untersuchung verwendet wurde, wird seit mehreren Jahren im Institut der allgem. Pathologie der Jagellonischen Universität in Kraków gezüchtet. Er zeichnet sich durch eine hundertprozentige Sterblichkeit innerhalb von drei Wochen bei Mäusen aus, wenn die Verimpfungen sorgfältig und zu rechter Zeit vorgenommen werden. Die Präparate weisen zahlreiche Mitosenbilder auf. Die Zellumrisse sind schlecht sichtbar, die Kerne sind zum Teil kreisförmig, zum Teil oval. Nur wenige Kerne haben Einbuchtungen. Es werden auch mehrkernige Zellen angetroffen.

Das Methylcholanthren-Epitheliom entstammt einem Lot von 30 Mäusen, denen 2-mal wöchentlich 2 Tropfen einer 1/2^o/_o-igen Azetonlösung des Handelsmethylcholanthrens auf die Rückenhaut eingetropft wurden. Die Sterblichkeit war derart groß, daß ich nach einem halben Jahre die Eintropfungen abstellen mußte. Von den drei Tumoren, die sich seit der Abstellung des Methylcholanthrens weiterentwickelt haben, habe ich 2 in Brei-Aufschwemmung auf 21 gesunde Mäuse verimpft. Die Impfungen gingen nicht an.

Das histologische Bild des Methyl-Cholanthren-Epithelioms hat das typische Bild eines verhornenden Plattenepithelkrebses. Stellenweise waren Spindelzellen, mit gut ausgebildeten interzellulären Brücken sichtbar. Zahlreiche Mitosen waren vorhanden. Von demselben Epitheliom wurden zu präparativen Zwecken auch Stellen aus der Umgebung entnommen. Dieselben zeigten eine verdickte Haut, in der mehrere Schichten sichtbar waren. Die Malignität des Tumors ergibt sich aus folgenden Befunden: der Tumor entwickelte sich auch nach Abstellung des Methylcholanthrens während 2¹/₂ Monaten. Er wuchs von innen nach außen und durchbrach die Hautmuskelschicht. Die Zellkerne wiesen mitotische Bilder und eine weitgehende Polymorphie der Kerne auf.

Trotzdem Impfungsversuche mit makroskopisch ähnlichen Tumoren mißlingen, muß mein Epitheliom, den Forderungen zufolge, die Döderlein (47) für maligne Teertumoren aufstellt, für ein Karzinom gehalten werden.

Ergebnisse und Besprechung.

Bevor ich zu den eigentlichen Untersuchungen überging, hielt ich es für notwendig, die Meßtechnik durch eine Untersuchung des bereits in der Literatur beschriebenen Normalgewebes, nämlich desjenigen der Mäuseleber zu überprüfen. Da diese Messungen neue Gesichtspunkte eröffnen, wollen wir sie hier kurz anführen.

Diagramm 1 zeigt die variationsstatistischen Zahlen der Leber einer neugeborenen und einer erwachsenen Maus. Der Kurvenverlauf entspricht vollkommen den Angaben von Jacobj; meine Berechnungsart der Kerngrößen bestätigt ebenfalls das volumetrische Gesetz der Kerngrößen nach Jacobj. Es muß noch kurz erwähnt werden, daß sich auch bei der Fixierungsmethode nach Heidenhain mit dem »Susa«-Fixiermittel vollkommen analoge Befunde ergaben. (Romeis: Taschenbuch der mikroskopischen Technik, XIII. Aufl. S. 91).

Die variationsstatistischen Kernkurven wurden zu folgender Berechnung benutzt. Es interessierte mich nämlich der Umstand, wie sich das Gesamtvolumen der Kerne auf die einzelnen Kernklassen verteilt. Die Regelklasse ist nämlich diejenige Kerngröße, die die zahlreichsten Kerne umfaßt. Daraus folgt aber nicht, daß die Regelklasse auch den größten Teil der gesamten Kernsubstanz enthält. Es könnte nämlich auch so sein, daß die weniger zahlreichen, aber dafür größeren Kerne der höheren Kernklassen mehr Kernmaterial enthalten als die Regelklasse.

Diagr. 2 zeigt, daß dies tatsächlich in einem gewissen Grade der Fall ist. Es wurde folgendermaßen konstruiert: auf der Abszissen-Achse wurden die Kerngrößen vermerkt, auf der Ordinate Achse — das Produkt der Kerngröße multipliziert mit der Prozent-Zahl der entsprechenden Kerne. Die Kurvenflächen entsprechen also dem Gesamtvolumen von je 100 Kernen (vergl. Tabelle I). In Wirklichkeit wurden selbstverständlich mehrere hunderte von Kernen gemessen.

Ein Blick auf die Kurve belehrt, daß ihr Verlauf ungefähr der variationsstatistischen Größenkurve (vergl. Diagr. 1) entspricht. Vergleichen wir aber die Gesamtvolumina der Kerne, die in den einzelnen Kernklassen enthalten sind, so sehen wir, daß die Regelklasse weniger als die Hälfte der gesamten Kernsubstanz enthält (vergl. Tabelle I). Die 3. Kernklasse spielt bei dem volume-

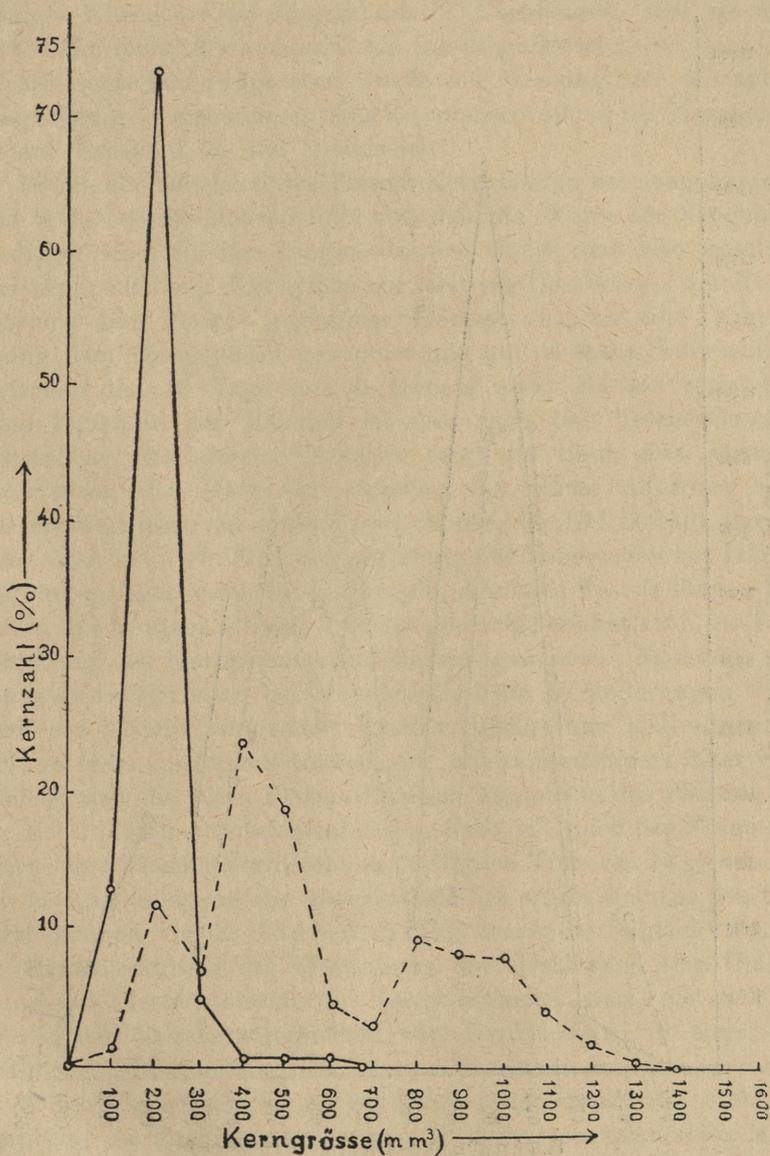


Diagramm 1. Ausgezogene Linie: Leber einer neugeborenen Maus. Gestrichelte Linie: Leber einer erwachsenen Maus.

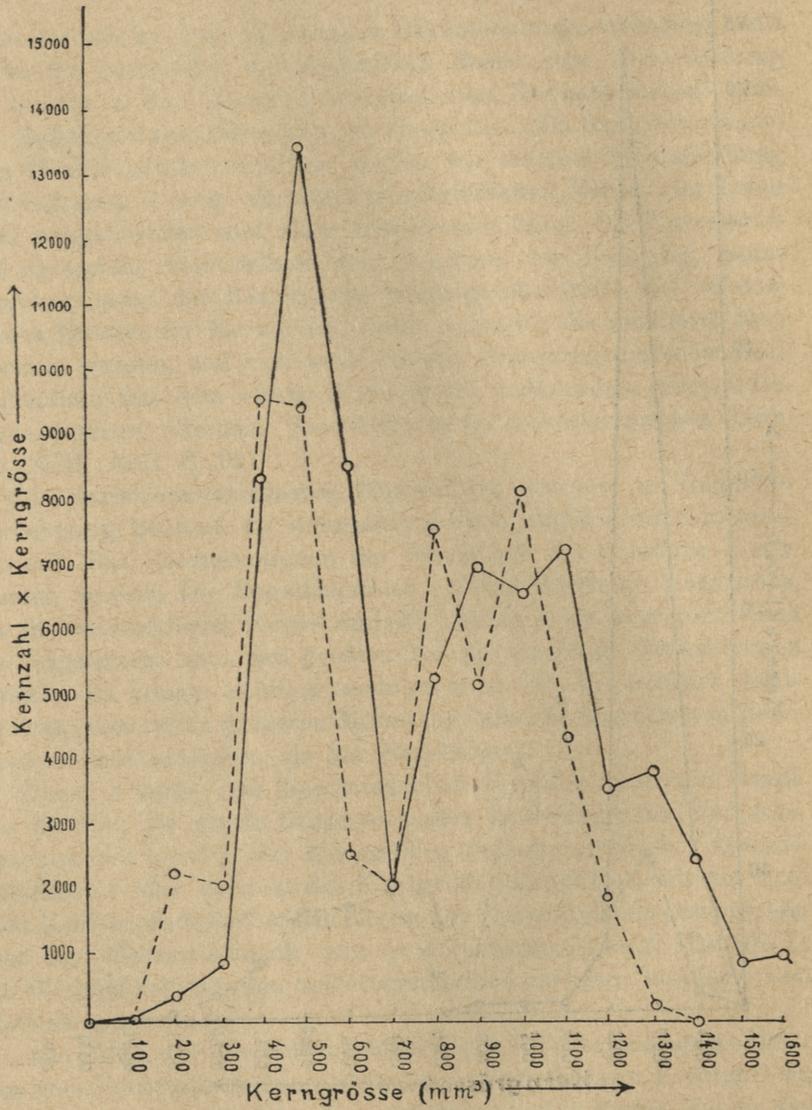


Diagramm 2. Ausgezogene Linie: Leber einer erwachsenen Maus. Gestrichelte Linie: desgl.

trischen Aufbau des Gewebes keine geringe Rolle: sie enthält zwar weniger Kerne als die Regelklasse (2. Kernklasse), aber sie umfaßt dafür mehr Kernmaterial als die Regelklasse.

Mit denselben Präparaten wurde die Messung der Kernplasma-spannung vorgenommen. Eine Zusammenstellung der Ergebnisse ist auf Tabelle I (S. 456) ersichtlich.

Bei einem Vergleich der Plasma-Kernrelation bei neugeborenen und erwachsenen Mäusen fällt auf, daß die Werte der Neugeburt niedriger sind. In dem jungen Gewebe findet man also trotz der kleineren mittleren Kerngröße ein relatives Überwiegen der Kernsubstanz dem Plasma gegenüber. Berezowski hat eine Untersuchung dem Darmepithel gewidmet und gut meßbare Unterschiede zwischen den 10 Tage und 6 Monate alten Mäusen gefunden. Eine Zunahme der Relation ist also auch bei diesem Gewebe feststellbar. Das gleiche Verhalten zeigt die Haut. Das *Stratum cylindricum* der Haut der neugeborenen Mäuse differiert vom Plasma-Kernwert der erwachsenen Mäuse, der 13:1 beträgt, durchschnittlich um — 5. Eine Vergrößerung der Leberzellen hat Illing bei älteren Haustieren (48) festgestellt. Ähnliche Feststellungen hat Laura Kaufman (49) an Tauben gemacht; sie hat auch die Verschiebung des Kernplasmaverhältnisses gemessen. Nachdem von Latyszewski auch bei Molchen ähnliche Veränderungen während des Alterns festgestellt wurden, scheint hier eine allgemein gültige Gesetzmäßigkeit vorzuliegen: mit zunehmendem Alter verschiebt sich die Kern-Plasma-Relation zugunsten des Plasmas.

Nach diesen Voruntersuchungen habe ich mich der Frage des Kern- und Plasma-Verhaltens bei malignen Tumoren zu gewendet.

In Anlehnung an die Geschwulstlehre ergibt sich aus den Untersuchungen von E. Godlewski jun. zuerst die folgende Frage:

Findet während des Wachstums der Geschwulst eine Umbildung des Plasmamaterials in Kernsubstanzen statt, die sich so wie in den Regeneratversuchen von Godlewski in einer allmählichen Herabsetzung der Plasma-Kernspannung kundgibt?

Diese Frage suchte ich zu beantworten, indem ich nach der Impfung die Kernplasma-spannung bei einem transplantablen Mäusesarkom in verschiedenen Zeitabständen untersuchte. Dabei wurde der Umstand im Auge behalten, daß die Wachstumsart der Geschwulst in den späteren Perioden sich anders verhält, als kurz nach der Impfung. Falls sich Unterschiede in der Kernplasma-spannung

Tabelle I.

| Mefmaterial | Methode | Plasma-Kern-Relation | Durchschn. Kerngröße | Klassen-Bezeichnung (in mm^2) | Durchsn. Kerngröße in den einzelnen Kernklassen | Gesamtgröße aller Kerne in den einzelnen Kernklassen, bei Zählung von hundert Kernen |
|-------------------------------|--------------------|----------------------|----------------------|---|---|--|
| Leber einer erwachsenen Maus | Aufzeichn. Methode | 9.37 | 225 | Kl. I.
100—300 | 102 | 1840 |
| | | | | Kl. II.
400—600 | 184 | 8720 |
| | Abzählungs-Methode | 10.0 | | Kl. III.
700—1400 | 350 | 11920 |
| Leber einer erwachsenen Maus | Aufzeichn. Methode | 11.49 | 273 | Kl. I.
100—300 | 112 | 560 |
| | | | | Kl. II.
400—600 | 197 | 11400 |
| | | | | Kl. III.
700—1400 | 388 | 15320 |
| Leber einer neugeborenen Maus | Aufzeichn. Methode | 7.51 | 80 | Kl. I.
100—300 | 80 | 7280 |
| | | | | Kl. II.
400—600 | 190 | 380 |
| | Abzählungs-Methode | 7.5 | | Kl. III.
700—1400 | nicht vorhanden | |

und der Kerngröße bei demselben Sarkom, bei schnellem und verzögertem Wachstum feststellen ließen, so würde dies meiner Mei-

nung nach dafür sprechen, daß bei dem Aufbau der Kernsubstanz, das Plasmamaterial mitbeteiligt ist.

Trotzdem ich keine besonderen Untersuchungen über die Wachstumsgeschwindigkeit des Sarkoms anlässlich dieser Untersuchungen unternommen habe, kann ich auf Grund einer mehrjährigen Praxis feststellen, daß sich seine Eigenschaften im Laufe der Entwicklung verändern. Verimpft man nämlich das Sarkom regelmäßig je 10 bis 14 Tage, so bekommt man schnell wachsende Tumoren, die innerhalb von 3 Wochen in 100% die Tiere töten. Wird dagegen die Impfung mit Tumoren ausgeführt, die bereits so lange gewachsen sind, daß das Tier dem Tode nahe ist, so wachsen die Impftumoren langsamer; sie erreichen beträchtliche Größen, da von der Verimpfung bis zum Tode der Tiere des öfteren ein voller Monat vergeht, und sie gehen nicht mehr hundertprozentig an. Dies alles kann auch dann beobachtet werden, wenn zur Verimpfung mikroskopisch gesundes Material verwendet wird. Dies hängt auch nicht mit der Menge des verimpften Materials zusammen; auch wenn die Tumoraufschwemmung zur Verimpfung unter Gewichtskontrolle hergestellt wird, kann unter den genannten Impfbedingungen eine Verzögerung des Wachstums eintreten.

Diese Verzögerung des Tumorwachstums ist nicht durch eine irreversible Veränderung der Eigenschaften der Geschwulstzellen bedingt. Wenn man nämlich von dem langsam wachsenden Sarkom ausgeht und für die rechtzeitige Verimpfung des Materials sorgt, kann man wiederum zu dem hundertprozentig angehenden Sarkomstamm gelangen, der innerhalb von 3 Wochen den Tod der Tiere bewirkt.

Um Sarkome mit verzögertem Wachstum zu bekommen, habe ich eine spezielle Impfserie angelegt, in der mehrmals hintereinander die Verimpfung erst kurz vor dem Tode der Tiere vorgenommen wurde. Wie erwartet, tötete das so verimpfte Sarkom die Tiere erst nach Ablauf von 4 Wochen; bei etwa einem Viertel der Tiere ging es überhaupt nicht an. Von dieser Impfserie wurden Tumoren von 6, 14 und 28 Tagen untersucht (vergl. Diagr. 4). Gleichzeitig wurden die Sarkomimpfungen in der optimalen Weise, je 10—14 Tage vorgenommen und davon Tumoren von 7, 9, 14, 18 und 21 Tagen auf das Kernplasmaverhältnis hin untersucht (vergl. Diagr. 3 und Tabelle II).

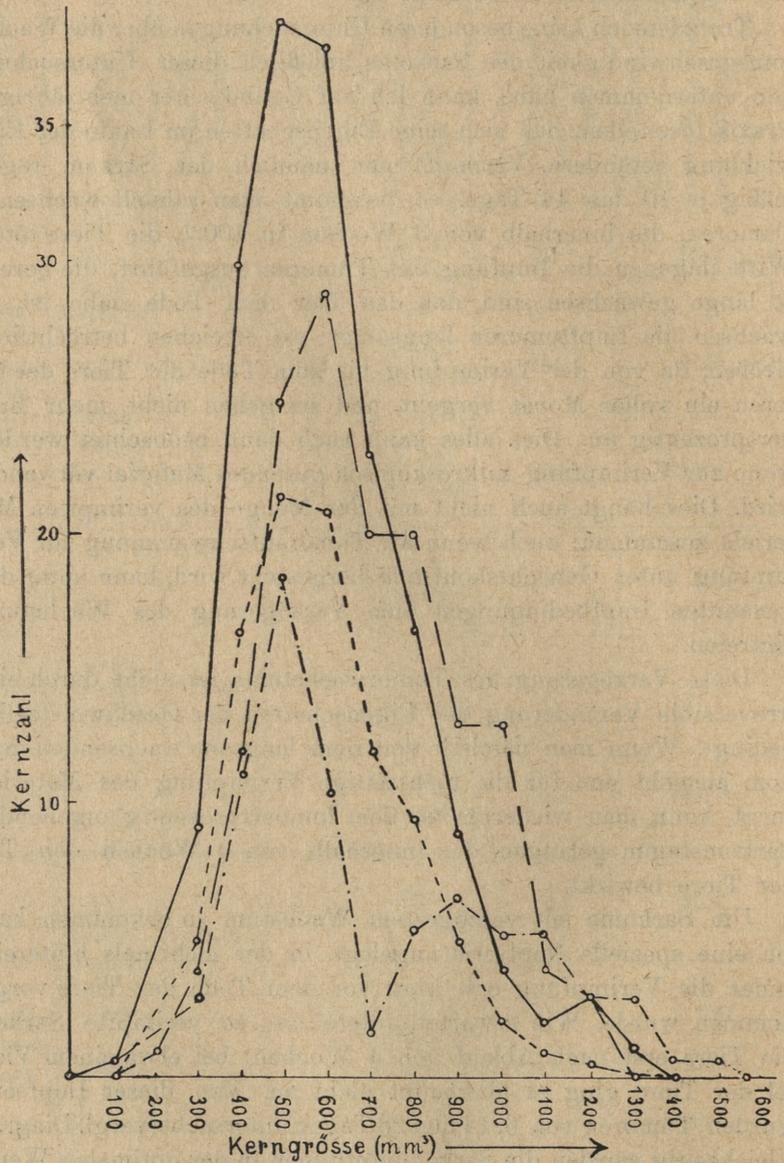


Diagramm 3. Ausgezogene Linie: Mäusesarkom 14 Tage nach Impfung. Gestrichelte Linie (lange Striche): Mäusesarkom 7 Tage nach Impfung. Gestrichelte Linie (kurze Striche): Mäusesarkom 9 Tage nach Impfung. Strich-Punkt-Linie: Mäusesarkom 21 Tage nach Impfung.

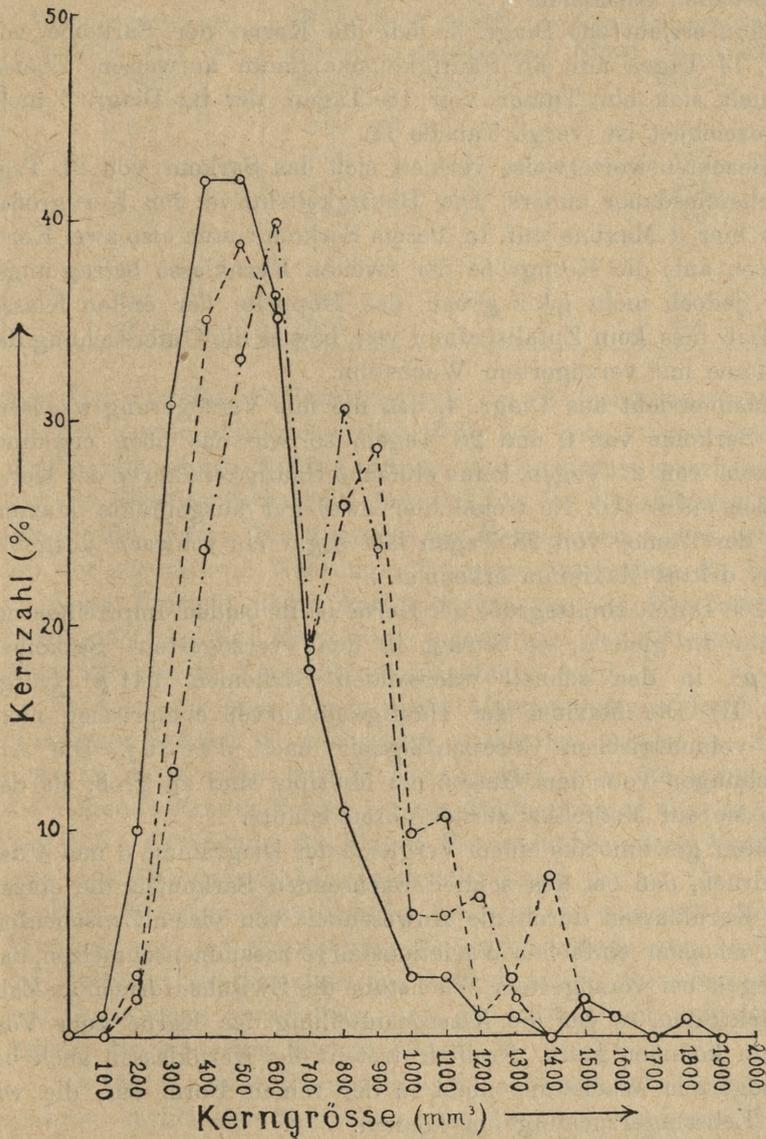


Diagramm 4. Ausgezogene Linie: Mäusesarkom 14 Tage nach Impfung. Gestrichelte Linie: Mäusesarkom 28 Tage nach Impfung. Strich-Punkt-Linie: Mäusesarkom 6 Tage nach Impfung. (Sarkome mit verzögertem Wachstum).

Diagr. 3 zeigt den Kurvenverlauf der Kerngrößen bei schnell wachsenden Sarkomen.

Man ersieht aus Diagr. 3, daß die Kerne der Sarkome von 7, 9, 14 Tagen nur ein Häufigkeitsmaximum aufweisen. Ebenso verhielt sich ein Tumor von 18 Tagen, der im Diagr. 3 nicht eingezeichnet ist (vergl. Tabelle II).

Beachtenswerterweise verhielt sich das Sarkom von 21 Tage Wachstumsdauer anders. Die Häufigkeitskurve der Kerngrößen wies hier 2 Maxima auf. In diesem Sarkom traten also zwei Kernklassen auf; die Kerngröße der zweiten Kernklasse betrug ungefähr, jedoch nicht ganz genau, das Doppelte der ersten Klasse.

Daß dies kein Zufallsbefund war, bewies die Untersuchung der Sarkome mit verzögertem Wachstum.

Man ersieht aus Diagr. 4, daß die mit Verzögerung wachsenden Sarkome von 6 und 28 Tagen, so wie das oben erwähnte Sarkom von 21 Tagen, keine einfache Häufigkeitskurve der Kerngrößen aufweisen. Es treten hier zwei gut ausgeprägte Maxima auf, der Tumor von 28 Tagen läßt sogar ein schwach ausgebildetes drittes Maximum erkennen.

Die Durchschnittsgröße der Kerne ist in beiden Impfreihen ungefähr die gleiche; sie beträgt in den »verzögerten« Sarkomen $267 \mu^3$, in den schnell wachsenden Sarkomen $241 \mu^3$ (vergl. Tab. II). Die Maxima der Häufigkeitskurven entsprechen nicht der volumetrischen Gesetzmäßigkeit nach Jacobj. Die Abweichungen vom dem Gesetz der Multipla sind zu groß, als daß man sie auf Meßfehler zurückführen könnte.

Man gewinnt aus einem Vergleich der Diagramme 3 und 4 den Eindruck, daß bei den schnell wachsenden Sarkomen die einzelnen Kernklassen durch die Anwesenheit von vielen Zwischenformen zu einer einfachen Variationskurve zusammenschmelzen, daß dagegen bei verzögertem Wachstum die Zwischenformen an Zahl zurücktreten, so daß die Klasseneinteilung der Kerne zum Vorschein kommen kann. Freilich treten die Kernklassen auch bei verzögertem Wachstum nicht in der reinen Form auf, die wir von Leberuntersuchung her kennen.

Die Ergebnisse meiner Untersuchung der Plasma-Kernverhältnisse in den Sarkomen sind in Tabelle II zusammengefaßt.

Das Kern-Plasmaverhältnis ist (wie aus der Tabelle ersichtlich) sowohl bei schnell als auch bei langsam wachsenden Sarko-

Tabelle II.

| Wachstumszeit des Sarkoms, seit der Impfung | Plasma-Kern Verhältn. | | Kern-Volumen-Durchschnitt in Kubikmikronen |
|---|-----------------------|--------------------|--|
| | Aufzeichn. Methode | Abzählungs-Methode | |
| 6 ¹⁾ | 3·20 | | 266 |
| 7 | 3·56 | 4·0 | 248 |
| 9 | 3·10 | 3·1 | 272 |
| 14 ¹⁾ | 3·55 | 4·1 | 252 |
| 14 | 3·48 | | 208 |
| 18 | | | 237 |
| 21 | 3·43 | 3·5 | 240 |
| 28 ¹⁾ | 3·55 | | 282 |

men fast dasselbe. Es beträgt (nach der Aufzeichnungsmethode) bei den ersten durchschnittlich 3·39, bei den zweiten 3·43. Ich glaube, daß dieser Befund gegen die Annahme sprechen muß, daß die Plasmasubstanz das Material für die Kernbildung in der Geschwulst liefert. Die Synthese des Kernmaterials muß auf Kosten der zugeführten Nahrungssubstanzen stattfinden. Es besteht in dieser Hinsicht keine Analogie zwischen dem Wachstum der Geschwulst und des Regenerats, in welchem das Plasma wenigstens teilweise in Kernmaterial umgebildet wird.

Nachdem die erste Frage dieser Untersuchungen durch obige Messungen geklärt zu sein schien, suchte ich, wieder in Anlehnung an die Arbeiten von E. Godlewski jun., die Antwort auf die folgende Frage: Findet bei der Bildung einer Geschwulstanlage eine Verschiebung des Plasma-Kernverhältnisses im Verhältnis zum Ausgangsgewebe der Geschwulst statt?

Eine derartige Verschiebung fand ja Godlewski bei der Eireifung und bei der Bildung der Regeneratanlagen. Auch sind die Plasmakernverhältnisse bei den einzelnen Geweben desselben Organismus verschieden und sie mußten sich erst bei der Anlage der einzelnen Organe bilden.

Ich führte meine Untersuchungen an einem mit Methyl-Cholanthren ausgelösten Epitheliom der Maus mit malignen Wachstumskennzeichen aus. Die Herkunft dieses Epithelioms ist im Ab-

¹⁾ Mit dem Stern sind die Sarkome mit verzögertem Wachstum bezeichnet.

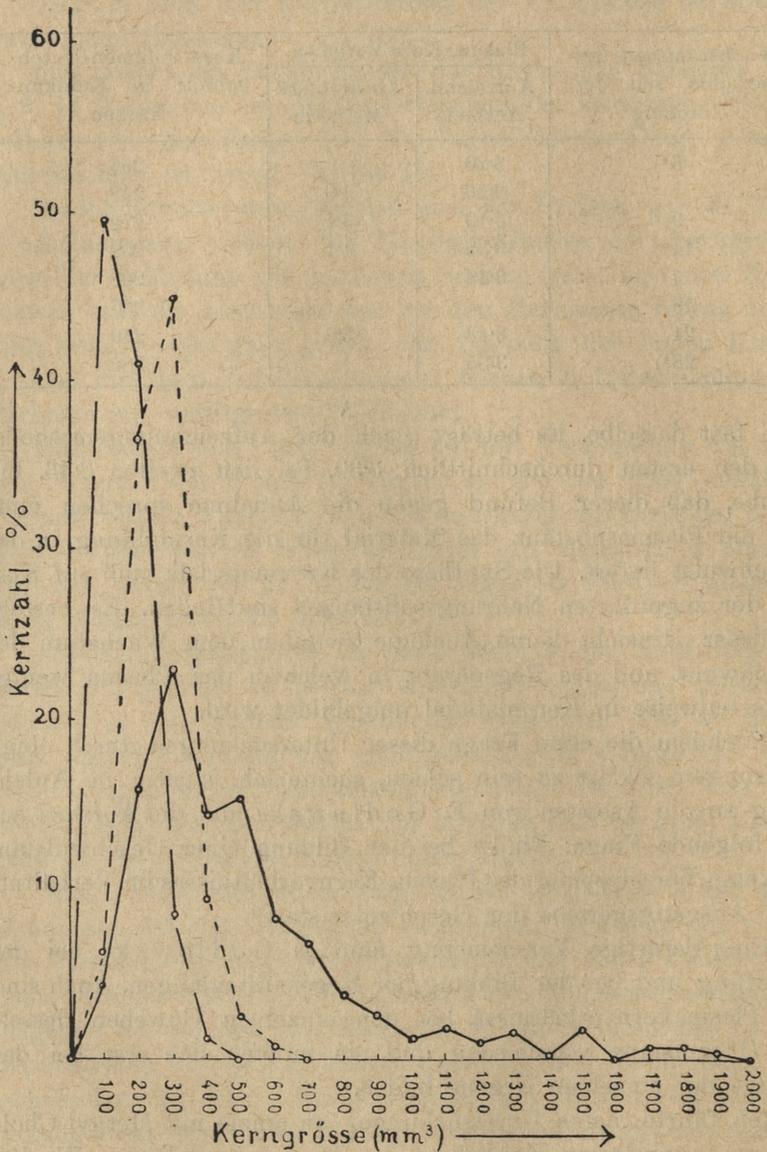


Diagramm 5. Ausgezogene Linie: Metylcholanthren-Epitheliom. Gestrichelte Linie (lange Striche): Stratum cylindricum der Haut von neugeborener Maus. Gestrichelte Linie (kurze Striche): Stratum spinosum der Haut von neugeborener Maus.

schnitt »Meßmaterial« bereits beschrieben worden. An diesem Epitheliom wurden die Messungen der Kerngrößen und der Kernplasmaausdehnung ausgeführt und mit den Verhältnissen in der Haut neugeborener und erwachsener Mäuse verglichen.

Diagramm 5 zeigt einen Vergleich zwischen den variationsstatistischen Größenkurven in der Normalhaut neugeborener Mäuse und im Methyl-Cholanthren-Karzinom. Wie ersichtlich, hat das Karzinom eine eingipflige Kurve. Ebenfalls eingipflig, aber viel steiler ist die (in Diagr. 5 nicht eingezeichnete) Häufigkeitskurve des Normalepithels der erwachsenen Maus. Das Hautepithel der neugeborenen Maus zeigt verschiedene Kerngrößen in den Basalschichten und in den darüber liegenden Plattenepithelschichten. Die Kerngrößen verhalten sich dabei ungefähr nach dem Gesetz der Multipla (vergl. Tab. III).

Tabelle III zeigt die Ergebnisse der Ausmessungen. Neben dem Durchschnittswert des Plasmakernverhältnisses sind hier auch die maximalen und minimalen Meßbefunde angegeben (in Klammern).

Tabelle III.

| Meßmaterial | Plasma-Kern
Verhältnis | Durchschnittl.
Zellvolumen in
Kubikmikronen | Durchschnittl.
Kernvolumen in
Kubikmikronen |
|--|----------------------------|---|---|
| Normalhaut
einer erwach-
senen Maus | $\frac{13.1}{(11.9-15.1)}$ | 1259 | 89 |
| Methyl-Chol.
Epitheliom | $\frac{9.2}{(8.3-12.0)}$ | 1550 | 152 |
| Pacchydermische
Haut der
Tumorumgebung | $\frac{10.4}{(10.1-10.9)}$ | 1518 | 132 |
| Neugeborenen
Haut, Stratum
basale | $\frac{9.8}{(9.5-11.2)}$ | 690 | 64 |
| Neugeborenen
Haut, Stratum
spinale | $\frac{11.7}{(10.1-14.1)}$ | 1327 | 104 |

Es ist ersichtlich, daß das Plasma-Kernverhältniss der Epitheliumzellen kleiner ist als dasjenige der Normalhaut erwachsener Mäuse. Es nähert sich dagegen sehr den Verhältnissen in der Haut neugeborener Mäuse und desgleichen dem *Stratum spinosum* der Haut in der Nähe der Geschwulst.

Die Kerngröße der Karzinom-Zellen beträgt etwa das Doppelte der Normalkerne.

Es muß nun die Frage aufgeworfen werden, wie die kleine Verschiebung der Plasma-Kernrelation im Tumor, der Normalhaut des erwachsenen Tieres gegenüber, gedeutet werden soll. Jedenfalls ist hier der Unterschied zu groß, um ihn mit einem Meßfehler erklären zu können. Meine Messung des Methyl-Cholanthren-Epithelioms ergab übrigens eine fast identische Relation mit dem Mittelwert Sokoloff's.

Wie bereits früher erwähnt wurde, hat das Gewebe der Neugeburt überall, wo es untersucht wurde, eine kleinere Relation als das reife Gewebe. Ebenso fand ich in der pachydermischen Haut der Tumorumgebung eine kleinere, den embryonalen Verhältnissen annähernd gleiche Kernplasmarelation. Diese pachydermische Haut zeigt, so wie nach Literaturangaben die geteerte Mäusehaut, Wachstumsmerkmale; sie ist mehrschichtig und weist ein *Stratum spinosum* auf.

Ich glaube, daß, wenn ein Vergleich des spinozellulären Karzinoms bei der Maus, wie in meinem Falle, vorgenommen werden sollte, dieser Vergleich am ehesten mit einer wachsenden Haut, daß heißt also mit der Haut der neugeborenen Maus, oder mit dem *Stratum spinosum* der geteerten Hautstellen vorgenommen werden sollte. In beiden Fällen ist evident, daß das Kernplasma-verhältnis des Epithelioms von der normalen aber wachsenden Haut im wesentlichen nicht abweicht.

Von diesem Standpunkte aus könnte man die Verschiebung, die das Plasmakernverhalten des Tumors ergab, für den Ausdruck einer Annäherung der biologischen Eigenschaften der Tumorzelle an die Embryonalzelle, resp. an die Zellen des frühen Jugendalters halten. Gegen die Möglichkeit einer Rückdifferenzierung in die embryonalen Zellverhältnisse spricht sich jedoch B. Fischer-Wasels (50) in seinem klassischen Buche über Geschwülste entschieden aus. Aber ich glaube auch auf Grund des morphologischen Meßmaterials eine derartige Annahme ablehnen zu müssen

Die Verschiebung der Relation erfolgt nämlich während des Alterns vor allem durch Zunahme der Zellplasmamasse, wobei sich die Kernvolumina dabei relativ wenig verändern (vergl. die Untersuchungen von Latyszewski und Berezowski). Es ist vor allem das Zellplasma, das mit dem Alter zunimmt.

Nach dem übereinstimmenden Befund aller, die Kernmessungen bei Tumorgeweben unternommen haben, ist dagegen bei den Tumoren eine Vergrößerung der Kerne feststellbar. Während die embryonalen Kerne klein sind, sind die Tumorkerne im allgemeinen größer als die Kerne ihres Ausgangsgewebes. Die Ähnlichkeit, welche zwischen dem Verhalten des Kernplasmas der Tumoren und den embryonalen Verhältnissen sichtbar ist, erfolgt nicht durch eine Reduktion der mit dem Alter zunehmenden Zellplasmamasse, sondern auf umgekehrtem Wege: durch eine Erhöhung des Kernvolumens, mit dem gleichzeitig, aber in relativ kleinerem Ausmaße, eine Plasmazunahme vergesellschaftet ist (vergl. Tabelle III).

Hiemit ist erwiesen, daß die gleichartige Veränderung in der Kernplasmarelation des Tumorgewebes und des Embryonalgewebes auf anderen Wegen zustande kommt. Man kann hier jedenfalls nicht von einer Rückdifferenzierung sprechen.

Schlußbetrachtungen.

Soweit aus meinen eigenen, leider sehr kargen Untersuchungen und aus den Literaturangaben gefolgert werden kann, unterscheidet sich bezüglich der Kernplasmarelation das maligne Wachstum nicht von dem Wachstum des Normalepithels. Dieses Ergebnis dürfte man bei einer oberflächlichen Betrachtung für ein negatives Resultat unserer Bestrebungen halten, die dahin gingen, auf diesem Wege das spezifische Wachstumsmerkmal des malignen Gewebes zu bestimmen.

Diese Feststellung kann jedoch auch als Sonderfall einer viel umfassenderen Gesetzmäßigkeit gedeutet werden.

Versuche, ein zytologisches, charakteristisches Merkmal des Krebswachstums aufzufinden, sind überall, wo sie unternommen worden waren, gescheitert. Ich möchte auf eine Arbeitsreihe des Rostock'er Pathologischen Institutes (51—56) hinweisen. In diesen eingehenden Untersuchungen wurde eine Reihe von Drüsenkarzinomen an Hand von Schnittserien und plastischen Modellen

einer Analyse unterworfen, aus der in einwandfreier Weise bewiesen wurde, daß die Formentwicklung von dieser Art Tumoren durchaus der Entwicklung der normalen Drüsen entspricht. Durch zahlreiche Wiederholungen der normalen Entwicklungsvorgänge, nämlich durch die Bildung von Drüsenknospen an dem Drüsentubulus, die äquatorielle Einfurchung derselben, die transversale Erweiterung zu einer hammerähnlichen Form (wobei gewisse Unregelmäßigkeiten durch ein Zurückbleiben des Wachstums einzelner Drüsengänge und mechanische Wachstumsstörungen nicht ausschließlich in Karzinomen, sondern auch im Normalwachstum angetroffen werden), entsteht das Bild des Drüsenkarzinoms, das sich somit quantitativ, nicht qualitativ vom Normalwachstum unterscheidet.

Zu der nämlichen Überzeugung, daß zwischen dem Wachstum der malignen und der normalen Gewebe ausschließlich quantitative, nicht aber qualitative Unterschiede bestehen, führen auch die gewebezüchterischen Erfahrungen (57) und die serologischen Untersuchungen (58).

Pathologisch ist also nicht der Wachstumsvorgang der Tumoren, sondern die Schrankenlosigkeit, mit der sich das Wachstum fortsetzt.

In einem zusammenfassenden Bericht über die morphologischen Befunde bei Vitaminmangel, gibt Burt Wolbach (59) der Überzeugung Ausdruck, daß alle pathologischen Wachstumsvorgänge, die durch äußere Einwirkungen hervorgerufen werden, auf einer Wiederholung der normalen, physiologischen Wachstumsereignisse beruhen. Nach all dem, was die neuere Forschung über die Wachstumsart der malignen Gewebe erbracht hat, scheint dieser Satz des amerikanischen Forschers seine Gültigkeit auch im Falle des autonomen, malignen Wachstums zu behalten. In Bezug auf den Aufbau der Adenokarzinome, wie auch in Bezug auf die Verteilung der Kerngrößen, schließlich in Bezug auf das Verhalten der Kernplasmarelation verhält sich das wachsende Tumorgewebe dem wachsenden normalen Gewebe gleich. Der Unterschied besteht darin, daß alle anderen Gewebe im Verlaufe des Wachstums allmählich bis zum Wachstumsstillstand heranreifen, daß dagegen das maligne Gewebe schrankenlos den Wachstumsvorgang wiederholt.

Meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Professor Dr Emil Godlewski jun. gestatte ich mir auch an dieser Stelle meinen Dank für die Anregung zu dieser Arbeit, seine zahlreichen, wertvollen Ratschläge und seine wohlwollende Kritik auszusprechen. Ich empfand es als eine hohe Ehre und besondere Gunst, daß Professor Godlewski diese Abhandlung auf der Tagung der Poln. Ärzte und Natuforscher in Lwów (1937) persönlich referierte.

Aus dem Biologisch-Embryologischen Institut der Jagellonischen Universität, Kraków. Vorstand: Prof. Dr E. Godlewski.

Literaturverzeichnis.

- 1) E. Godlewski jun.: Arch. f. Entwicklungsmech. **26**. 278 (1908). —
- 2) S. et H. Skowron: Bull. de l'Acad. Polon. des Sc. S. B. 859 (1926). —
- 3) M. Latyszewski: Bull. de l'Acad. Polon. des Sc. S. B. 751 (1927). —
- 4) A. Berezowski: Arch. f. Zellforsch. **5**. 375 (1910); **7**. 185 (1911). —
- 5) H. Marcus: Arch. f. Entwicklungsmech. **22**. (1906). — 6) S. Morgulis: Arch. f. Entwicklungsmech. **32**. 169 (1911). — 7) O. Koehler: Arch. f. Zellforsch. **8**. 272 (1912). — 8) J. Gerassimow: Z. f. allg. Physiol. **1**. (1902). —
- 9) Th. Boveri: Zellenstudien 71. 5. cit. nach Godlewski jun. — 10) R. Hertwig: Arch. für Zellforsch. **1**. (1908). — 11) M. Popoff: Arch. f. Zellforsch. **1**. (1908). — 12) E. Godlewski jun.: Rozpr. Wydz. mat.-przyr. Polskiej Akad. Um. **57**. (1917). — 13) J. Loeb: Arch. f. Entwicklungsmech. **23**. (1907). — 14) E. Masing: Z. f. physiol. Chemie **67**. 161 (1910). — 15) L. F. Schackell: Science **34**. 573 (1911). — 16) E. Godlewski jun.: Arch. f. Entwicklungsmech. **30**. 81 (1910). — 17) O. Koehler: l. c. 7. — 18) S. Skowron: Bull. de l'Ac. Polon. des Sc. S. B. 341 (1924). — 19) Sokoloff: C. R. de la Soc. de Biol., Paris. **87**. 1200 (1922). — 20) K. A. Heiberg: Die Grundlage der Geschwulstlehre. Leipzig 1933. Z. f. Krebsforsch. **29**. 234 (1929); **30**. 60 (1929). — 21) A. Berezowski: l. c. 4. — 22) A. H. Roffo u. A. Lasserre: Boletin del Institut. de Medecina Exper. dicembre 1925. —
- 23) G. Klein u. J. Beck: Z. f. Krebsforsch. **42**. 163 (1935). — 24) W. Jacoby: Arch. f. Entwicklungsmech. **106**. 124 (1925). — 25) Clara: cit. nach G. Arndt. — 26) Voss: Z. Zellforsch. **7**. (1928). — 27) Nomicos: cit. nach Epantschin. — 28) W. Epantschin: Z. Krebsforsch. **26**. 439 (1928). — 29) G. Arndt: Z. Krebsforsch. **41**. 393 (1935). — 30) W. Schmitz: Z. Krebsforsch. **41**. 372 (1934). — 31) W. Epstein: Z. Krebsforsch. **42**. 474 (1935). — 32) E. Stapel: Z. Krebsforsch. **42**. 488 (1935). — 33) W. Ehrich: Zbl. Path. **63**. 277 (1935); Z. Krebsforsch. **44**. 308 (1936). — 34) E. Schairer: Z. Krebsforsch. **43**. 1 (1935); **45**. 289 (1937). — 35) Th. Heinkele: Z. Krebsforsch. **43**. 323 (1936). — 36) K. Deuticke: Z. Krebsforsch. **43**. 39 (1935). — 37) Wermel: Z. Zellforsch. **20**. (1934), daselbst Literatur. — 38) Lukjanoff: cit. nach Schairer. — 39) Jarotzky: cit. nach Schairer. — 40) Fr.

Angyal: Zbl. f. allg. Path. **66**. 209 (1936). — 41) A. Carrel u. A. H. Ebeling: J. of exp. Medicine **43**. 463 (1926). — 42) Ö. Winge: Z. f. Zellforsch. **10**. 683 (1930); **6**. 397 (1927). — 43) H. Hamdi: Z. f. Krebsforsch. **30**. 547 (1930). — 44) W. H. Greenleaf: Science, N. Y. **86**. 565 (1937). — 45) E. Stein: Naturwiss. **24**. 337 (1936). — 46) R. Goldschmidt u. A. Fischer: Z. Krebsforsch. **30**. 281 (1929). — 47) Döderlein: Z. Krebsforsch. **23**. 12 (1926). — 48) Illing: Anat. Anz. **26**. (1934) cit. nach Latyszewski. — 49) L. Kaufman: Pam. Inst. Nauk. Gosp. Wiejsk. w Puławach **4**. (1923) **7**. (1926) cit. nach Latyszewski. — 50) B. Fischer-Wasels: Handb. d. norm. u. path. Physiologie Bd. XIV/2 1927. — 51) R. Baumann: Z. Krebsforsch. **42**. 178 (1935). — 52) R. Böhmig: Verh. dtsh. pathol. Ges. **28**. 112 (1935). — 53) Franck: Z. Krebsforsch. **42**. 381 (1935). — 54) Havemann: Z. Krebsforsch. **44**. 365 (1936). — 55) E. H. Rapp: Z. Krebsforsch. **44**. 405 (1936). — 56) R. Wirszing: Z. Krebsforsch. **45**. 324 (1937). — 57) Z. Zakrzewski: Z. Krebsforsch. **36**. 513 (1932). — 58) H. J. Fuchs u. H. Kowarzyk: Klin. Wochenschr. 1936, N. 9/10, S. 289 u. 329. — 59) S. Burt Wolbach: Science, N. Y. **86**. 569 (1937).

Wpływ kastracji na regenerację u płazów. — Der Einfluß der Kastrierung auf die Regeneration bei den Amphibien.

Mémoire

de M^{me} J. BEAUPRÉ,

présenté le 26 Juin 1939 par M. E. Godlewski m. t.

Einleitung, kurze Übersicht des Schrifttums.

Die Gestaltungskraft der lebenden Materie offenbart sich in einer ganzen Reihe von Erscheinungen, wie z. B. in den Prozessen der Onto- und Phylogenese, der Regeneration, der Neubildungen und dgl.

Die Regenerationprozesse beruhen auf einer Neubildung verlorener Körperteile und haben die Aufgabe, in dem beschädigten Organismus die ursprüngliche Organisation wiederherzustellen, und ihm zu ermöglichen, seine Lebensfunktionen normal auszuüben. So ist die Regeneration also eine regulierende Tätigkeit, die dem Organismus als Ganzem untergeordnet sein muß. Diese gegenseitige Anpassung der einzelnen Teile des Organismus nennen wir bekanntlich Korrelation. Der Mechanismus der Korrelation ist in der Mehrzahl der Fälle sehr kompliziert, bisher in seiner Gänze nicht bekannt und recht schwer analysierbar. Es handelt sich hier nämlich um die Bestimmung der Mittel und Wege, welche zwischen den einzelnen Organen vermitteln, um bei den Bildungsprozessen zu einer harmonischen Zusammenarbeit dieser neuen Organisation zu führen.

Die Regenerationsprozesse hängen so, wie alle anderen Prozesse des Wachstums vom Einfluße der äußeren Umgebung ab. Wie aus der Biologie bekannt ist, kommen folgende Faktoren in Frage: thermische Einflüsse, Nahrungszufuhr, bei einigen Organismen Einfluß der Lichtstrahlen, der Schwerkraft u. s. w. Eine

besonders große Bedeutung hat für die Regeneration das Problem der Ernährung der Versuchstiere, was von Hillier (1928) beschrieben wurde, als er den Verlauf der Regeneration beim Axolotl quantitativ untersuchte und feststellen konnte, daß sich im Vergleich zur Trockensubstanz des Regenerats die Wassermenge vergrößert. Nach Ansicht dieses Verfassers beruhen die ersten Stadien der Regeneration hauptsächlich auf einer Vermehrung der Zellelemente, während in den späteren Stadien eher die Interzellularsubstanz anwächst. Wenn man die Tiere kurze Zeit vor Beginn der Regeneration hungern läßt, nimmt das Regenerat langsamer an Masse zu, Differenzierung und Längenwachstum hingegen unterliegen keiner Veränderung.

Außer den äußeren Faktoren spielen aber auch die inneren eine ungeheure Rolle. Vom Standpunkt der Korrelation müssen vor allem die zwei vermittelnden Systeme: das Nervensystem und das endokrine System, beachtet werden.

Das Nervensystem war bis vor kurzem, nämlich bis zur Entdeckung der endokrinen Einflüsse, das einzige, dem man eine vermittelnde Rolle zwischen den Funktionen der verschiedenen Organe und eine Normierung ihrer Funktionen zu Gunsten der Ganzheit des Organismus zuschreiben konnte.

Aus der reichen Literatur, die sich mit den Forschungen über den Einfluß des Nervensystems auf die Regeneration bei den Wirbeltieren befaßt, möchte ich vor allem die Resultate der Autoren anführen, welche an Hand ihrer Versuche zu dem Schluß kommen, daß das Nervensystem eigentlich keinen Einfluß auf die Regeneration ausübt. Besonders interessant sind die Arbeiten von Rubin (1903), welcher den Froschlarven (*Rana fusca*) das Rückenmark zerstörte oder während anderer Versuche das ganze Gehirn der Kaulquappe entfernte, und trotzdem beweisen konnte, daß die Regeneration des amputierten Schwanzes normal vor sich ging. Derselbe Verfasser stellte fest, daß das fehlende Nervensystem beim *Siredon pisciformis* nicht imstande ist, die normale Regeneration in ihren ersten Stadien zu verhindern. Später manifestiert sich dagegen das Fehlen der Innervierung in Form einer Verspätung, resp. eines völligen Stillstandes der Regenerationsvorgänge. Ähnliche Versuche machte an den Larven des Molches (*Triton taeniatus*) Goldstein (1904). Er zerstörte das Rückenmark und amputierte dann ein Bein. Die Regeneration

erfolgte normal, was den Autor zu der Feststellung berechtigte, daß das Nervensystem zumindest in den frühen Entwicklungsstadien weder auf die Regenerationsprozesse noch auf die ontogenetische Entwicklung einen Einfluß ausübt. Hamburger (1925) entfernte ein Auge und einen Teil des Mittelhirns der Kaulquappe des Grasfrosches (*Rana temporaria*) und amputierte ein Hinterbein. In 14 Fällen regenerierten diese Gliedmaßen in einer anormalen Form. Walter (1912), welcher Versuche an erwachsenen Molchen anstellte, meint, daß die Nervenzentren die Zellen zum Wachstum anregen, daß hingegen der Faktor, der die ganze Gestaltung bestimmt, in den regenerierenden Zellen selbst zu suchen ist, daß also zur Regeneration zwei Reize nötig seien, die aus zwei verschiedenen Quellen stammten.

Dem zweiten Lager gehören diejenigen Forscher an, deren Untersuchungen davon zeugen, daß die Regeneration doch nicht ohne Einfluß des Nervensystems vor sich geht. In diesem Sinne entfernte Szüts (1914) in seinen Versuchen an erwachsenen Molchen das Riechepithel und die Riechflächen und stellte fest, daß zur Regeneration des Organes der unbeschädigte oder regenerierte Nerv, oder das Nervenzentrum notwendig sei, der das gegebene Organ innerviert. Wenn er nämlich die Riechflächen, in denen das primäre Zentrum des Geruchsnervs liegt, unbeschädigt ließ, so erfolgte die Regeneration der zerstörten Teile normal. Paul Weiss (1925) erklärte ebenso auf Grund seiner Versuche über die Regeneration an erwachsenen Molchen, daß der Einfluß des Zentralnervensystems unbedingt notwendig sei, nicht nur am Beginn, sondern auch während des Regenerationsprozesses. Aus seinen Versuchen über den Einfluß des zerstörten Rückenmarks auf die Schwanzregeneration beim erwachsenen Molch, gelangte Godlewski (1904) zu der Schlußfolgerung, daß die Anwesenheit des Rückenmarks für den normalen Verlauf der Regenerationsprozesse unumgänglich notwendig ist. Hingegen zeigten die Versuche an Amphibienlarven, daß die Regenerationsfähigkeit nicht erlischt, wenn man Teile des Rückenmarks zerstört.

Was also den Einfluß des Nervensystems auf die Regeneration betrifft, so sind die endgültigen Resultate nicht eindeutig, und die Verschiedenheit der Resultate dürfte wohl auf den Unterschied im Alter und auf die Art der Versuchstiere zurückzuführen sein. Es ist nicht ausgeschlossen, daß die Verletzung des

Nervengewebes einer der Faktoren ist, die die Regenerationsercheinungen auslösen (Godlewski), und daß ein tonischer Einfluß des Nervensystems auf den Verlauf der Regenerationsercheinung angenommen werden kann.

Obige Ausführungen erschöpfen bei weitem nicht das Thema. Ich wollte nur an Hand dieser Beispiele illustrieren, wie derartige Arbeiten ausgeführt und deren Resultate gedeutet wurden.

Ein zweiter Faktor, welcher auf den Mechanismus der Korrelation ein gewisses Licht wirft, sind zweifellos die Hormone. Uns interessiert an dieser Stelle ihr Einfluß auf die Regeneration. Leider besitzen wir bis heute nur sehr wenig sichere Daten über die Funktion des endokrinen Systems. Diese Erscheinungen sind eng mit dem Wachstum verbunden; andererseits üben die Geschlechtshormone auf den Wuchs des Individuums einen großen Einfluß aus [Tandler-Grosz (1913)]; aus diesem Grunde muß ich bei der Besprechung der Literatur auch die Wachstumsveränderungen berücksichtigen.

In seinen an Tieren ausgeführten Versuchen bemerkte Sloanaker (1930) u. a. bei kastrierten Ratten eine Vergrößerung des Körpergewichtes, was er nicht nur durch Fettablagerung erklärte, sondern auch durch eine Verlängerung der Wachstumsperiode.

Von anderen Autoren meint Dubiski (1930), daß die Kastration die Größe der Muskelzellen beeinflusst, und daß dadurch ein stärkerer Wuchs des Tieres hervorgerufen wird. Er beobachtete eine ziemlich starke Verdickung der Muskelfasern bei kastrierten jungen männlichen Ratten, was eine größere Zunahme ihres Körpergewichtes denjenigen der Kontrolltiere gegenüber begründete. In seiner Arbeit beruft sich Dubiski auf Berezowski (1910), welcher auch eine Vergrößerung der Muskelfasern bei weißen Mäusen nach der Kastration beschrieb. Sehr interessant sind die Beobachtungen von Parchon (1926), welcher innerhalb der Muskelfasernzellen eine Vermehrung des Wassergehaltes infolge der Kastration, eine Verarmung des Muskelgewebes an Kalziumsalzen und eine Bereicherung an Magnesiumsalzen beobachtete. Die parenterale Zufuhr eines Hodenätherextraktes rief eine Verminderung des Wassergehaltes in den Muskeln hervor.

So wie bis heute in der Frage, welchen Einfluß das Nervensystem auf die Regenerationsprozesse ausübt, keine einheitliche Anschauung vorherrscht, so ist auch das Problem der Hormon-

funktion noch nicht gelöst. Die diesbezügliche Literatur umfaßt nur ein spärliches Material.

Von den Forschern, die diese Frage behandelt haben, hat Spencer (1932) durch parenterale Zufuhr von Follikulin eine Wachstumshemmung bei Ratten und Jasiński (1930) eine Verkleinerung der Muskelfasern nach Kastration hervorgerufen. Der letztgenannte Verfasser hingegen, daß nach Kastrierung die Menge des Bindegewebes, welches sich zwischen den einzelnen Muskelfasern befindet, wächst.

Trotz dieser Anschauungen könnte man wohl kaum annehmen, daß die Geschlechtshormone keinen Einfluß auf die Regenerationsprozesse ausüben, da wir doch wissen, daß sie Stoffwechsel und Wachstum sehr wohl beeinflussen, und andererseits, nach Präbram, z. B. Regeneration einem lokal verstärkten Wachstum entspricht.

Zu den Erscheinungen der Regeneration gehören auch die Heilungsprozesse von Wunden. In letzter Zeit konnte man einen günstigen Einfluß des Follikulins auf die Vernarbung feststellen.

Interessant ist die Beobachtung, wie sich die Regenerationserscheinungen der Amphibien beim Ausfall der Geschlechtshormone verhalten. Dieses Thema ist noch nicht eingehend behandelt worden. Es existiert darüber nur eine ältere Arbeit von Tornier (1896), in welcher der Verfasser den Einfluß einer vollständigen Eierstockexstirpation auf den Regenerationsverlauf der Gliedmaßen des Molches beschreibt. Er erzielte jedoch ganz negative Resultate. Er konnte nämlich in bezug auf die Regeneration keinen Unterschied zwischen kastrierten und nicht kastrierten Kontrolltieren nachweisen.

Unter der Leitung von Prof. E. Godlewski befaßte ich mich näher mit dem Einfluß des Geschlechtshormons auf die Regeneration des Schwanzes beim Axolotl (*Ambystoma*) und bei zwei Molcharten.

Material und Untersuchungsmethoden.

Als Versuchsmaterial dienten zweijährige Weibchen des Axolotls (*Ambystoma mexicanum*), einer Tierart, die sich bekanntlich neotheren vermehrt, d. h. im Larvenzustand Geschlechtszellen produziert. Die Tiere stammten aus einer mehrjährigen Zucht des Biologisch-Embryologischen Institutes der Jagellonischen Univer-

sität. Um ihnen möglichst einheitliche Bedingungen zu schaffen, werden die Tiere in großen Blechgefäßen mit fließendem, bis zur Zimmertemperatur erwärmtem Wasser gezüchtet. Sie werden zweimal wöchentlich mit dünn zerschnittener Rindsleber gefüttert. In jedem Gefäß ist ein anderer Jahrgang der Tiere untergebracht. Diese Verhältnisse ertragen sie gut, wachsen ziemlich gleichmäßig und vermehren sich spontan. Die Versuchstiere brachte ich in besonderen Gefäßen unter, unter denselben Verhältnissen wie bisher. Zu jedem Versuche benützte ich außer den Versuchstieren genau so viele Kontrollexemplare ein und desselben Geschlechts, die dasselbe Gewicht, dieselbe Größe, ungefähr 26 cm Länge hatten. Im allgemeinen benützte ich zu den Versuchen 40 Versuchstiere und 40 Kontrolltiere.

Die Versuche stellte ich in den Jahren 1933/34/35/36/37 an, und zwar von Dezember angefangen bis Mitte Februar. Da der Axolotl in den Zuchtverhältnissen des Biolog. Institutes sich ungefähr ab Mitte Januar vermehrt, führte ich meine Versuche sowohl in der Zeit vor der Brunstperiode als auch während derselben aus, also in der Periode der intensivsten Tätigkeit des Eierstockes. Den operativen Eingriff, der darauf beruht, daß man beiderseitig die Eierstöcke entfernt, führte ich folgendermaßen aus. Das Tierchen wurde mit einer $1\frac{1}{2}$ -igen Urethanlösung eingeschlafert und in Rückenlage an den Operationstisch festgebunden. Kopf und Kiemen bedeckte ich mit in Urethanlösung getränkter Watte. Mit einem 4—5 cm langen Schnitt durch die Mittellinie des Rumpfes öffnete ich die Bauchhöhle und entfernte die Eierstöcke zusammen mit dem Fettkörper, in dem ich das Mesenterium des Eierstockes in seiner ganzen Länge durchtrennte. Zwecks Blutstillung senkte ich die Blutgefäße des Mesenteriums mit einer glühenden Nadel. Die Wunde vernähte ich doppelt, nämlich das Bauchfell mit den Muskeln mit einer Catgutnaht, die Haut mit Seide mittels Knotennaht. Nach der Operation brachte ich die Tierchen für eine Stunde in ein Gefäß mit fließendem kaltem Wasser. Im späteren Verlaufe wechselte ich das Wasser alle zwei Stunden bis die Tiere erwachten. Die Axolotl ertrugen den Eingriff gut, erwachten 5—8 Stunden später. Die ersten 4—5 Tage nach dem Eingriff waren sie wenig beweglich, nahmen keine Nahrung an, später kehrten sie langsam zur Norm zurück.

Die Sterblichkeit betrug unter den operierten Tieren ca 25%, eine Ziffer, die mit Rücksicht auf die Größe des Traumas, die Empfindlichkeit Eingriffen in der Bauchhöhle gegenüber, die man bei Kaltblütlern beobachtet hat, und auf die Verhältnisse, in welchen die Wundheilung der Körperoberfläche vor sich geht (ununterbrochener Zutritt von Wasser) wohl nicht sehr hoch ist. Als ich im Jahre 1937 eine Reihe von Tieren kastrierte, um noch einmal meine Resultate zu kontrollieren, brach unter den Axolotln eine Epidemie aus, welcher nicht nur die 25 operierten, sondern auch noch die 25 Kontrolltiere, die nicht operiert worden waren, zum Opfer fielen. Die bakteriologische Untersuchung des Inhaltes der Bläschen, welche während dieser Krankheit auf ihrem Körper auftraten, erwies den Bazillus der Fischpest, welche eine Plage großer Fischereien ist. Erst nach einer gründlichen Desinfektion der Gefäße, in welchen die Tiere aufbewahrt waren, konnte man weitere Versuche unternehmen.

Ich amputierte den Schwanz der Tiere 3 cm unter dem Anus, und zwar in der ersten Versuchsserie 30 Tage nach der Kastrierung, in der zweiten Serie 102 Tage und in der dritten 131 Tage nach der Kastrierung. Gleichzeitig mit der Schwanzamputation in jeder Gruppe der Versuchstiere, also der Kastraten, amputierte ich auf dieselbe Weise die Kontrolltiere, die im Besitze ihrer Eierstöcke waren. 20—25 Tage nach der Amputation begann der Regenerationsprozeß, und vom 45 Tage an waren die Regenerate so groß, daß man sie deutlich abzeichnen konnte. Von diesem Zeitpunkt an narkotisierte ich die Versuchs- und die Kontrolltiere zu gewissen Zeitabständen und zeichnete die Regenerate auf Millimeterpapier ab. Die Oberfläche dieser Regenerate berechnete ich nach 3 Methoden:

- 1) nach der Wagemethode,
- 2) mit Hilfe des Planimeters,
- 3) auf Millimeterpapier, in dem ich darauf die Oberfläche des Regenerates, welches auf weißem Pauspapier gezeichnet war, ablas.

Die Wagemethode beruht darauf, daß man eine Kopie des Regenerates auf einem speziellen Karton von $\frac{1}{2}$ mm Stärke ausführt, die Konturen der Zeichnung ausschneidet und diese Bilder auf der analytischen Wage wiegt. Da ich das Gewicht eines mm^2

Karton kannte, war ich mit Hilfe einer einfachen Rechnung imstande, die Oberfläche jeder Zeichnung zu berechnen¹⁾.

Die Oberflächenberechnung führte ich für jede Versuchsserie während 6—8 Monaten aus, ungefähr alle 30 Tage einmal. Das Wachstum der Regenerate verlief in den ersten Monaten, d. h. bis zum 5—6 Monat nach der Amputation am schnellsten.

Um die Resultate, die ich an den Axolotln gewonnen hatte, vergleichen zu können, stellte ich analoge Versuche an zwei Molcharten an, nämlich am *Triton (Triturus) cristatus*, und am *Triton (Triturus) vulgaris*. Diese Versuche wurden zwischen Mai und Dezember ausgeführt, also in der Brunst- und Ruheperiode, so daß, wenn wir sowohl die Axolotln als auch die Molche berücksichtigen wollen, die Versuche das ganze Jahr hindurch liefen. Die letzteren wurden in stehendem Wasser gefangen (Teiche und Pfützen) und gleich darauf operiert.

Die Operationstechnik und auch die Ausführung der Berechnungen waren in beiden Fällen dieselben, nur mit dem Unterschied, daß ich die Oberfläche der Regenerate beim *Triton*, seiner kleinen Körperausmaße wegen, nur durch direktes Anschlagen des Durchschlagpapiers auf Millimeterpapier berechnete. Die Sterblichkeit der Molche betrug ungefähr 75%. Da Champy nach Operationen der Bauchhöhle ein massenhaftes Eingehen dieser Tiere beobachtete, wenn man sie nach dem Eingriff im Wasser hielt, brachte ich sie, nach seinen Angaben, in feuchtes Moos. Und tatsächlich verminderte sich deutlich die Sterblichkeit der Tiere an Bauchfellentzündung. Die Tiere gingen hauptsächlich zwischen der ersten und zweiten Woche nach der Operation ein. Bei den Kaltblütlern verläuft nämlich die Entwicklung der Peritonitisereger verhältnismäßig langsam.

Um die Regenerate der Versuchs- und Kontrolltiere histologisch zu untersuchen, fixierte ich die amputierten Regenerate in Gilson'scher Lösung, bettete sie nach Entkalkung mit Salpetersäure (Methode Schaffer) in Paraffin, wonach ich sie in Schnitte von 12 μ Dicke zerlegte. Die Präparate färbte ich mit dem Ehrlich'schen Hämatoxylin und Eosin.

¹⁾ Diese Methode ist in den Arbeiten, die in dem Literaturverzeichnis unter 4 und 5 figurieren, ausführlich beschrieben.

Beschreibung der eigenen Versuche.

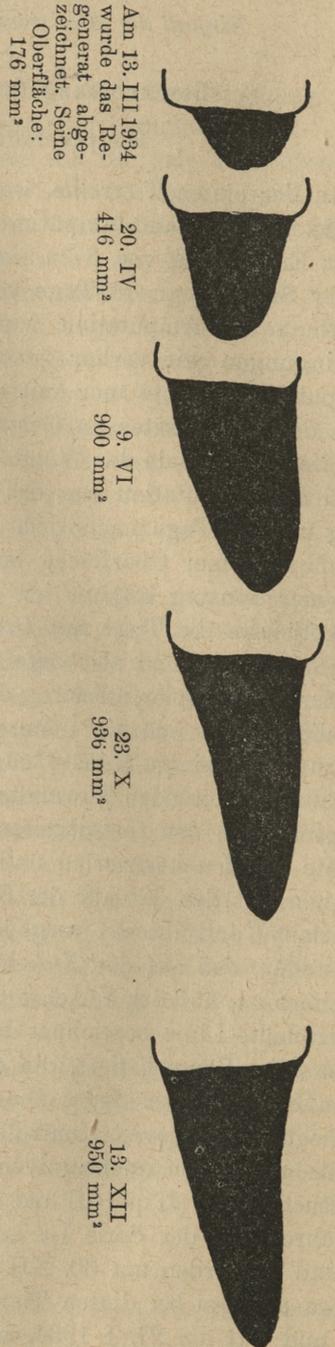
Hauptversuche am Axolotl.

In der ersten Tierreihe, welche aus 3 Versuchs- und 3 Kontrollaxolotln bestand, amputierte ich gleichzeitig den Schwanz in einer Entfernung von 3 cm von der Kloake. Die Versuchstiere dieser Serie waren 44 Tage vorher kastriert worden.

Nach der Amputation wurden sie unter denselben äußeren Bedingungen wie vorher gezüchtet. Ungefähr 22 Tage nach der Amputation, konnte man mit unbewaffnetem Auge die erste Anlage des Regenerates in Gestalt eines kleinen, ungleichmäßigen Streifens am Rande der Wundoberfläche erblicken. Zirka 30 Tage nach der Amputation war das Regenerat schon einige Millimeter lang und 45 Tage nach dem Eingriff konnte man mit der Berechnung seiner Oberfläche beginnen. Zwischen dem 30 und 45 Regenerationstag begann ich die Regenerate abzuzeichnen. Ich narkotisierte die Tiere mit Urethan, legte sie zwischen zwei gläserne Scheiben und zeichnete die Konturen des Regenerates auf weißem Pauspapier, übertrug dann diese Konturskizze auf Papier. Ähnlich führte ich die späteren Zeichnungen alle 25—30 Tage aus, und dies einige Monate lang. Indem ich die im vorigen Kapitel erwähnten Methoden anwandte, berechnete ich im Verlaufe der Regeneration den fortschreitenden Oberflächenzuwachs der Regenerate bei den kastrierten und bei den Kontrolltieren. Am besten können wir den Verlauf der Regeneration bei den kastrierten und bei den Kontrolltieren vergleichen, wenn wir ihn graphisch so darstellen, daß auf der X-Achse der Zeitpunkt der Messung verzeichnet ist, auf der Y-Achse die Oberfläche des Regenerates. Die gestrichelte Linie bezeichnet den Oberflächenzuwachs des Regenerates beim Versuchstiere, die gezogene Linie hingegen denselben beim Kontrolltiere. Jedes Diagramm bezieht sich auf 2—3 Versuche und ebensoviel Kontrolltiere. Als Beispiel will ich an dieser Stelle genau den quantitativen Verlauf der Regeneration an zwei Versuchstieren (L und U) und an zwei Kontrolltieren (VI und VII) anführen, die der Serie I-a angehörten. Die beiden Versuchstiere L und U wurden am 30. XII 1933 kastriert. Die Schwanzamputation erfolgte bei diesen Tieren und den beiden Kontrolltieren VI und VII am 27. I 1934, also 44 Tage nach der Kastration. Zum ersten Mal zeichnete ich die Regenerate aller Tiere dieser

Abbildungen der Regenerate an den kastrierten Tieren *t* und *U* (Gruppe Ia).

Versuchstier *t*, kastriert am 13. XII 1933. Amputiert am 27. I 1934.



Versuchstier *U*, kastriert am 13. XII 1933. Amputation am 27. I 1934.

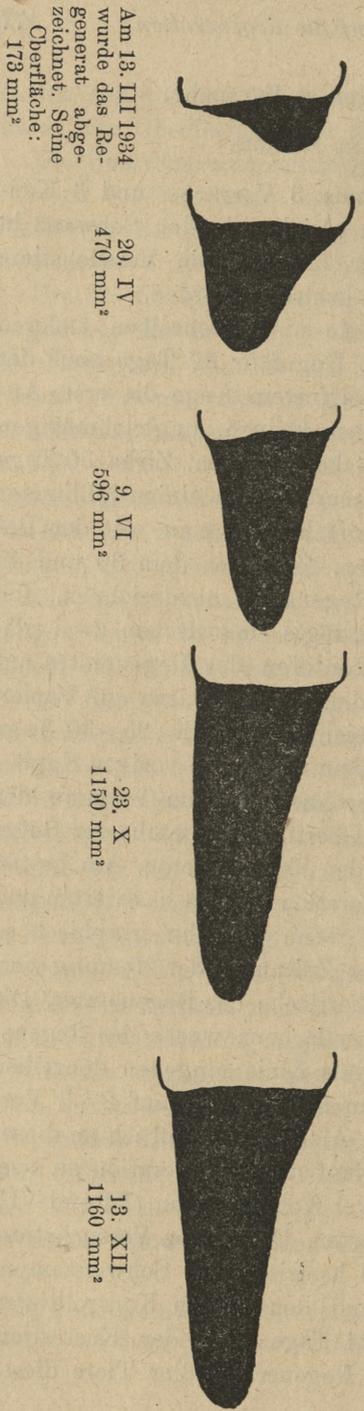


Fig. 1.

Abbildungen der Regenerate an den Kontrolltieren VI und VII (Gruppe Ia).

Kontrolltier VI. Amputation am 27. I. 1934.



13. XII
730 mm²



23. X
493 mm²



9. VI
480 mm²



20. IV
350 mm²



Am 13. III 1934
wurde das Re-
generat abge-
zeichnet. Seine
Oberfläche:
176 mm²

Kontrolltier VII. Amputation am 27. I. 1933.



13. XII
630 mm²



23. X
583 mm²



9. VI
560 mm²



20. IV
245 mm²



Am 13. III 1934
wurde das Re-
generat abge-
zeichnet. Seine
Oberfläche:
170 mm²

Fig. 2.

Gruppe am 13. III 1934, später am 20. IV, am 9. VI, 23. X und am 13. XII 1934, also fünfmal. Als Beispiel führe ich die Tabelle I sowie die Figuren 1 und 2 an, welche die gepausten Regenerate der Kontrolltiere und der Versuchstiere dieser Serie darstellen.

Weiter unten füge ich die planimetrische Berechnung der Regeneratoberfläche nach diesen Zeichnungen an.

Die Regeneratoberfläche beträgt in mm:

TABELLE I.

| Kastraten | | | | Kontrolltiere | | | |
|---------------------|---------------------|---------------------|-----------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| Datum der Zeichnung | Tier L | Tier U | Durchschnitt | Datum der Zeichnung | Tier VI | Tier VII | Durchschnitt |
| 13. III. 34 | 176 mm ² | 173 mm ² | 174.5 mm ² | 13. III. 34 | 176 mm ² | 170 mm ² | 173 mm ² |
| 20. IV. | 416 „ | 470 „ | 443 „ | 20. IV. | 350 „ | 245 „ | 297.5 „ |
| 9. VI. | 900 „ | 596 „ | 748 „ | 9. VI. | 480 „ | 560 „ | 520 „ |
| 23. X. | 936 „ | 1150 „ | 1050 „ | 23. X. | 493 „ | 583 „ | 538 „ |
| 13. XII. | 950 „ | 1160 „ | 1051 „ | 13. XII. | 730 „ | 630 „ | 680 „ |

Der durchschnittliche Unterschied zwischen der Regeneratoberfläche der beiden Versuchstiere und der Regeneratoberfläche bei den Kontrolltieren beträgt bei der letzten Messung 406 mm² zu Gunsten der Regenerate bei den kastrierten Tieren. Die obigen Angaben stellt das Diagramm 1 dar.

Wie aus diesem Diagramm ersichtlich ist, verläuft das Wachstum des Regenerates am Versuchstiere rascher als am Kontrolltiere. Im Widerspruch mit den Resultaten Tornier's also, welcher die Eierstöcke reifer Tritonen exstirpierte, die Regeneration der amputierten Gliedmaßen beobachtete und keinen Wachstumsunterschied zwischen den Versuchs- und den Kontrolltieren feststellte, konnte ich in meinen Versuchen einen solchen Unterschied bestimmen. Besonders deutlich macht sich das raschere Wachstum des Regenerates am Versuchstiere in den späteren Perioden der Regeneration bemerkbar. In der ersten Versuchsserie (I-a) erfolgte also die Regeneration bei den Kastraten rascher als bei den Kontrolltieren.

Auf dieselbe Art führte ich die Zeichnungen, Berechnungen und Kurven für alle Serien der Versuchs- und Kontrolltiere aus.

Weiter unten werde ich nur noch die mittleren Wachstumsunterschiede anführen und die dazugehörigen Diagramme beilegen.

Zur ersten Tierserie, bei welcher die Amputation 44 Tage nach der Kastrierung vorgenommen wurde, gehört außer der oben beschriebenen Gruppe I-a auch noch die Gruppe I-b, welche aus einem Versuchs- und einem Kontrolltiere bestand. Der Verlauf

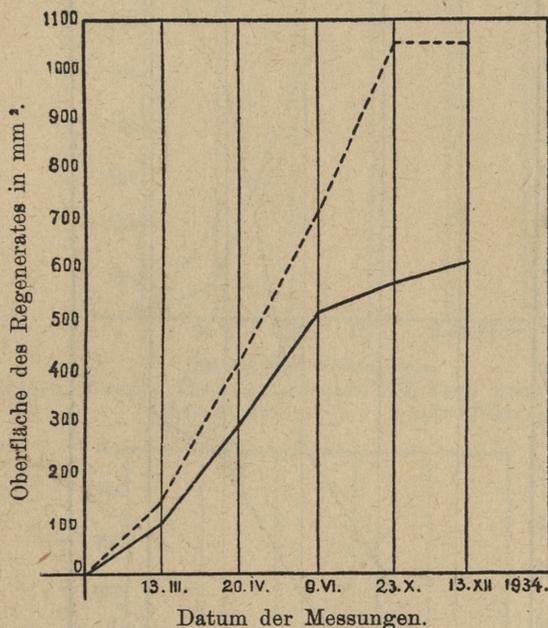


Diagramm 1. Gruppe Ia. Amputation 44 Tage nach der Kastrierung.
 ----- Kastrate, ——— Kontrolltiere.

der Regeneration verhält sich in dieser Gruppe ebenso wie in der vorigen. Die Regeneration geht bei dem kastrierten Tiere viel rascher vor sich, der Unterschied in den Regeneratoberflächen beträgt zwischen dem Versuchs- und dem Kontrolltiere 1034 mm². Die Kurve I-b, die sich auf die Serie Ib bezieht, verläuft ähnlich wie die des Diagrammes Ia. Auch hier vergrößert sich die Regenerationsgeschwindigkeit bei Kastraten in den späteren Perioden.

Die weiteren Versuchsserien befaßten sich mit Tieren, an denen ich die Schwanzamputation in einem späteren Zeitraume nach der Kastrierung ausführte, als in den vorigen Versuchen. Es zeigte

sich, daß man an Tieren, bei welchen ich die Amputation 102 Tage nach der Kastrierung (Gruppe II-a und II-b) und 131 Tage nach der Kastrierung (Gruppe III-a und III-b) vorgenommen hatte

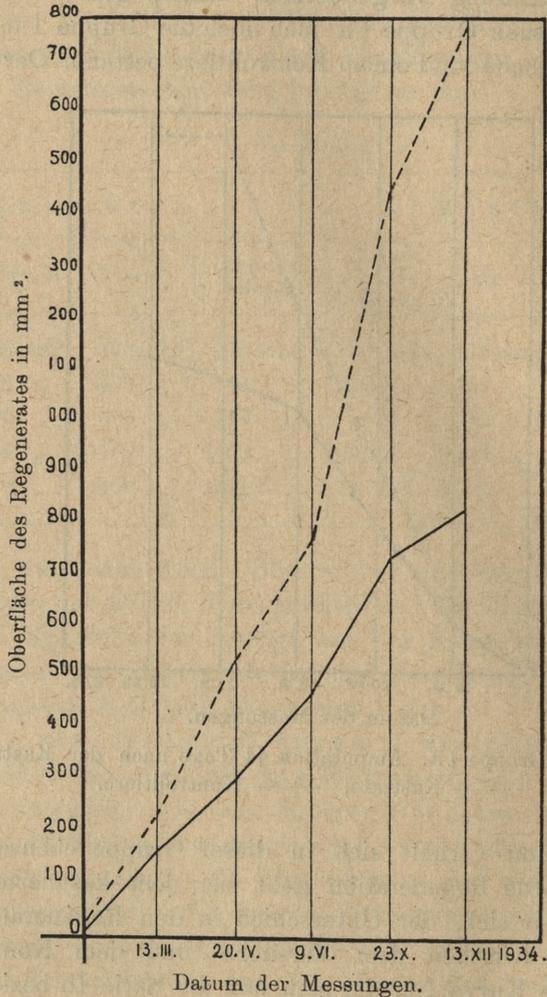


Diagramm 2. Gruppe Ib. Amputation 44 Tage Nach der Kastrierung.
 ----- Kastrate, ——— Kontrolltiere.

auch eine Beschleunigung des Regenerationsprozesses feststellen kann. In der Gruppe II-a, welche aus zwei Versuchs- und 2 Kontrolltieren bestand, verlief die Regene-

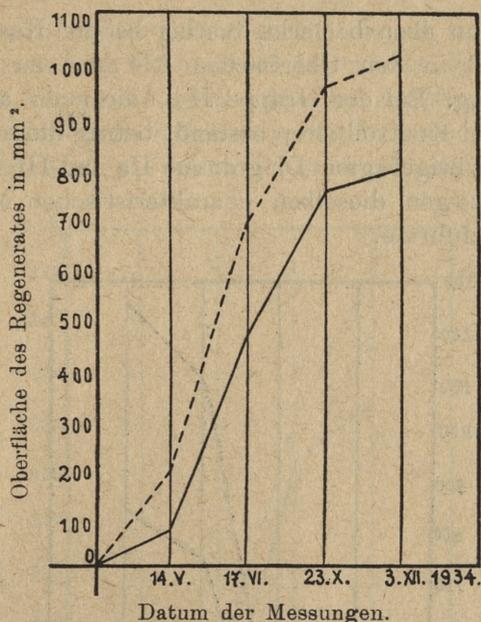


Diagramm 3. Gruppe II a. Amputation 102 Tage nach Kastrierung.
 ----- Kastrate, ——— Kontrolltiere.

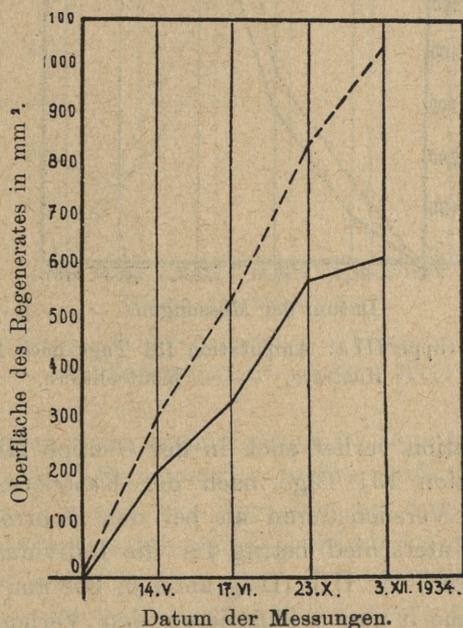


Diagramm 4. Gruppe II b. Amputation 102 Tage nach Kastrierung.
 ----- Kastrate, ——— Kontrolltiere.

ration, wie schon oben bemerkt, rascher bei den Kastraten, wobei der Unterschied in den Oberflächen 224 mm^2 zu Gunsten der Kastraten betrug. Bei der Gruppe II-b, die auch aus zwei Versuchs- und zwei Kontrolltieren bestand, betrug dieser Unterschied 421.5 mm^2 . Die beigefügten Diagramme IIa und IIb (Diagramm 3, Diagramm 4) zeigen dieselben charakteristischen Merkmale wie die bisher angeführten.

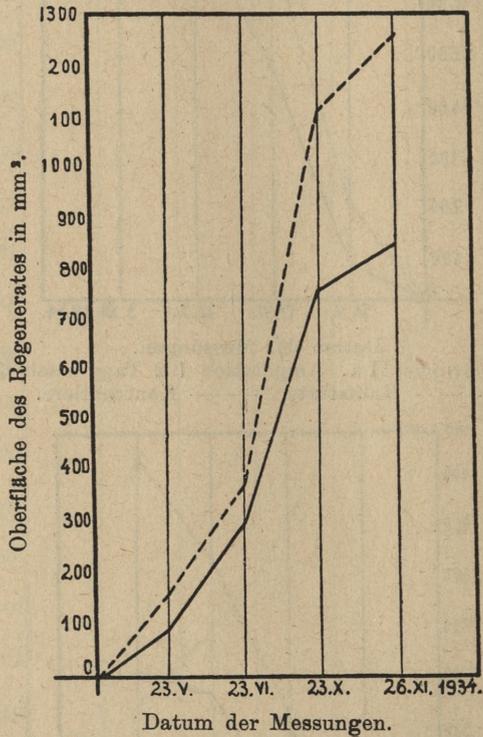


Diagramm 5. Gruppe III a. Amputation 131 Tage nach Kastrierung.
 ----- Kastrate, ——— Kontrolltiere.

Die Regeneration verlief auch in der Gruppe III-a und III-b, wo die Amputation 131 Tage nach der Kastrierung stattfand, rascher bei den Versuchstieren als bei den Kontrolltieren. Der durchschnittliche Unterschied betrug für die Individuen IIIa (Diagramm 5) 399 mm^2 , für IIIb (Diagramm 6) 268 mm^2 .

Die Diagramme 5 und 6 illustrieren den Verlauf der Regeneration in dieser Gruppe.

Wenn wir nun alle angeführten Diagramme miteinander vergleichen, so können wir beobachten, daß nur in der Gruppe III-b (trotzdem auch hier die Regeneration an den Kastraten rascher verlief) die Unterschiede nicht so groß sind wie in den vorhergehenden. Eine Analyse dieser Diagramme zeigt auch, daß bei

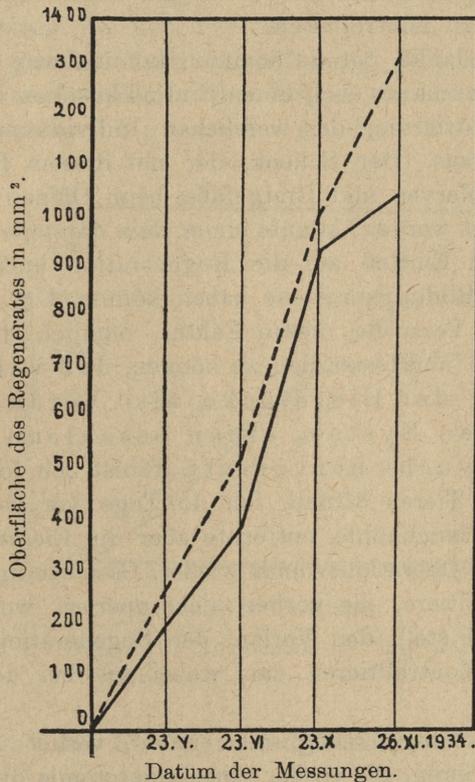


Diagramm 6. Gruppe III b. Amputation 131 Tage nach Kastrierung.
 ----- Katastrate, ——— Kontrolltiere.

den Tieren, deren Schwanzamputation 44 Tage nach der Kastrierung erfolgte, die Regeneration rascher erfolgte, als bei den Tieren, welche 102 und 131 Tage vor der Amputation kastriert worden waren. Daraus folgt, daß je kleiner der Zeitraum zwischen Kastrierung und Amputation ist, desto rascher die Regeneration vor sich geht.

Ergänzende Versuche am Axolotl.

Außer den oben beschriebenen Hauptversuchen, die eine grundlegende Bedeutung haben und die den Einfluß der Kastrierung auf die Regenerationsprozesse beleuchten sollten, stellte ich noch eine Reihe von Versuchen an, um die gewonnenen Resultate möglichst allseitig zu kontrollieren.

Der erste Gedanke, der aufkommen konnte, war die Möglichkeit, daß das Trauma an sich einen Einfluß ausüben könnte. Dem Eingriff der Kastrierung des weiblichen Individuums geht eine Laparatomie voraus. Der Schock, der mit diesem Eingriff verbunden ist, wo Nerven und Blutgefäße beim Öffnen der Bauchwand durchtrennt werden, könnte einen Reiz darstellen, der einen beschleunigenden Einfluß auf die Regeneration und einen stärkenden auf die Bildungsprozesse haben könnte. Um also bei der Analyse meiner Versuche diesen Faktor, nämlich die Laparatomie, ausschließen und feststellen zu können, daß wirklich die Exstirpation der Eierstöcke, also Veränderungen im endokrinen System, einen beschleunigten Regenerationswuchs hervorruft, führte ich folgende Versuche aus: an 2 Tieren öffnete ich 45 Tage vor der Schwanzamputation die Bauchhöhle, entfernte aber die Eierstöcke nicht und vernähte die Operationswunde wieder. Gleichzeitig amputierte ich zwei Kontrolltiere, die vorher nicht operiert worden waren. Das Diagramm 7 stellt den Verlauf der Regeneration bei diesen Versuchs- und Kontrolltieren dar, wobei wie bei den früheren Versuchen.

Wie man aus obigen Diagramm ersieht, verlief die Regeneration bei den Tieren, die vorher eine Laparotomie durchgemacht hatten, in den ersten $4\frac{1}{2}$ Monaten in demselben Tempo wie bei den Kontrolltieren und in der Endperiode sogar etwas langsamer als bei den Kontrolltieren. Der Unterschied zwischen den Regeneratsoberflächen der Versuchs- und der Kontrolltiere beträgt in dieser Endperiode 128 mm^2 zugunsten der Kontrolltiere. So muß man also die Regenerationsbeschleunigung in den früher beschriebenen Fällen nicht dem Trauma zuschreiben, das eine Laparotomie ist, sondern der Exstirpation der Eierstöcke. Um noch auf eine andere Art zu kontrollieren, ob wirklich die Kastrierung der Tiere die

Regeneration beschleunigte, führte ich noch eine Serie von Versuchen aus, welche 2 Versuchs- und 2 Kontrolltiere umfaßte. Die Versuche beruhten darauf, daß ich an demselben Tage die Versuchs- und die Kontrolltiere amputierte und nach Verlauf von 47 Tagen die Versuchstiere kastrierte. Es ergab sich nun folgendes: die ersten 30 Tage nach der Kastrierung war das Tempo der Regeneration bei den Versuchs- und den Kontrolltieren ungefähr das gleiche. Nach Ablauf dieser Zeit hingegen machte sich ein rascherer Wuchs des Regenerats bei den kastrierten Tieren bemerkbar. Daraus folgt, daß diese Versuchs-

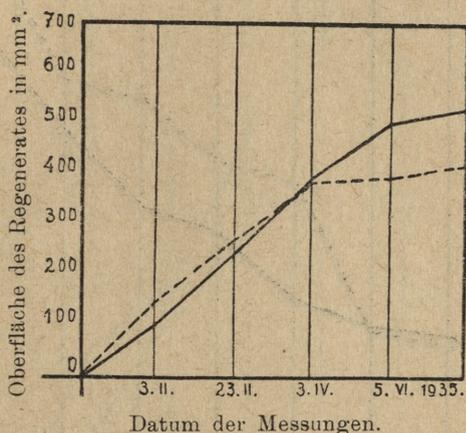


Diagramm 7. Gruppe IV. Amputation 45 Tage nach Laparatomie.
 ----- Operierte Tiere, ——— Kontrolltiere.

serie, in der die Kastrierung erst nach der Amputation vorgenommen wurde, sich ähnlich verhielt wie die vorhergehenden.

Bei diesen Versuchen konnte ich auf Grund der oben angeführten Zahlen und Kurven feststellen, daß die Unterschiede in der Intensität der Regeneration nicht gleich zu Beginn auftreten, sondern sich erst nach ca. einem Monate manifestieren. Diesen Tatbestand kann man meiner Meinung nach damit erklären, daß die Geschlechtshormone während des ersten Monats noch in genügender Anzahl im Blute vorhanden sind und die Regeneration hemmen. Aus den Versuchen an Säugetieren ist ja bekannt, daß sich noch einen Monat nach der Kastrierung und eventuell noch

später Follikulin im Organismus befindet, und daß man bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht alle Veränderungen feststellen kann, die im Organismus eines kastrierten Individuums vor sich gehen. Wie aus dem Diagramm 8 hervorgeht, erschöpft sich der Vorrat an Hormonen im Blute 30 Tage nach der Kastration, und erst ihr Fehlen bewirkt eine beschleunigte Regeneration.

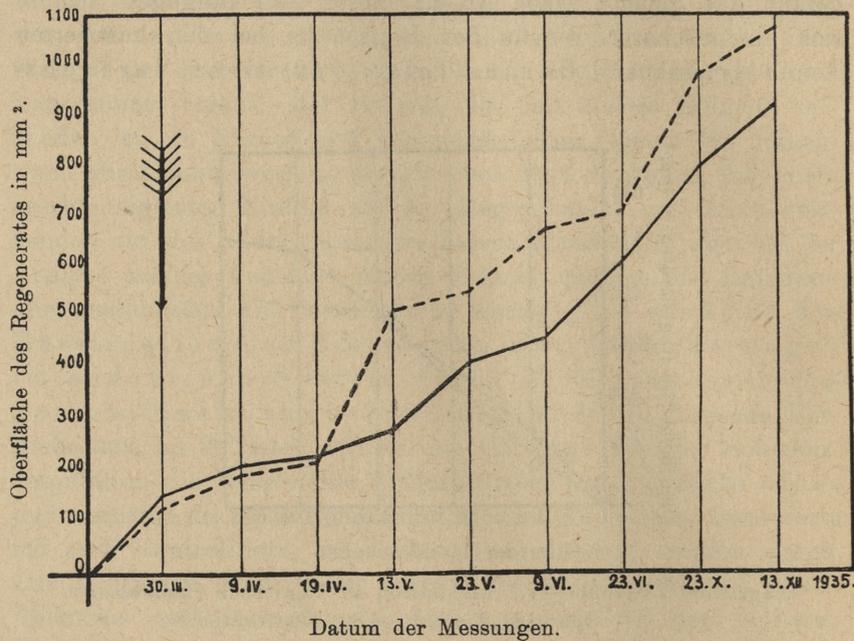


Diagramm 8. Gruppe V. Kastration am 47 Tage der Regeneration.

----- Kastrierte Tiere, ——— Kontrolltiere.

Amputation am 11. II, Kastration am 30. III (Pfeil!). Der Einfluß der Kastration macht sich nach Verlauf eines Monats bemerkbar.

Das Diagramm 8 stellt den Verlauf der Regeneration bei den Tieren dieser Gruppe dar, wobei der Pfeil den Tag bezeichnet, an dem die Kastration stattgefunden hat.

Zur Vervollständigung möchte ich erwähnen, daß ich in zwei Versuchsserien Resultate erzielte, die im ersten Augenblick verschieden zu sein schienen. In diesen beiden Serien verlief nämlich die Regeneration beim Kontrolltiere rascher als beim kastrierten. Allerdings wuchsen die Regenerate in der einen Serie,

in welcher ich die Schwanzamputation 10 Tage nach der Kastrierung ausführte, nicht normal, sondern ergaben das Bild mißgestalteter Schwänze, weshalb ich dieses Resultat nicht berück-

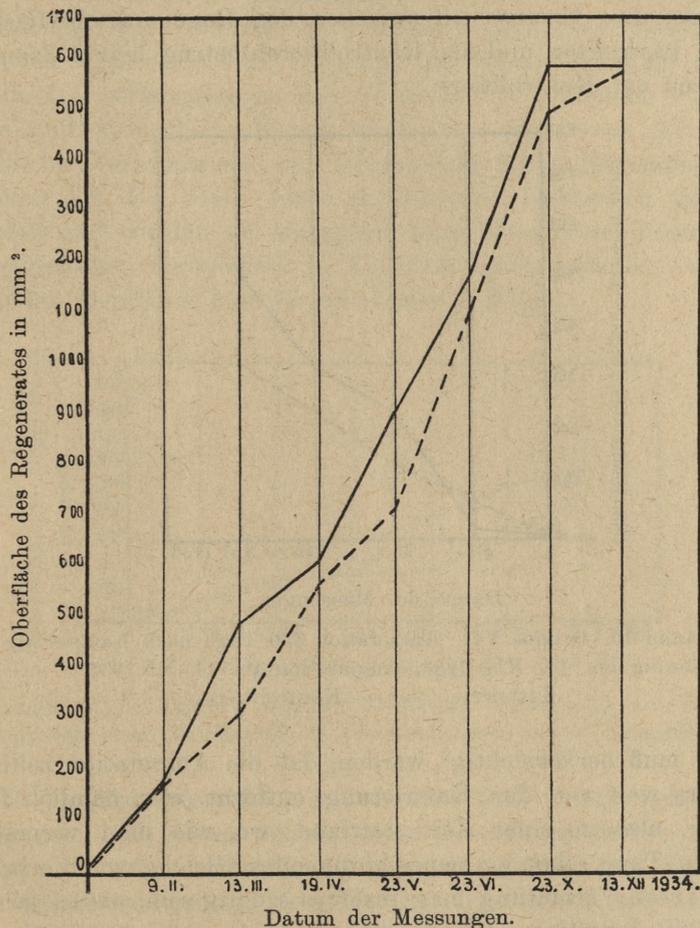


Diagramm 9. Gruppe VI. Amputation 10 Tage nach Kastrierung.

----- Kastrierte, ——— Kontrolltiere.

sichtigen will, schließlich ist ja bekannt, daß individuelle physiologische Eigenschaften des Individuums eine große Rolle spielen können.

Die Resultate dieser Gruppe enthält das Diagramm 9.

Etwas schwieriger scheint es, die negativen Resultate der folgenden Gruppe (Diagramm 10) zu erklären, bei welcher die Schwanz-

amputation 330 Tage — also fast ein Jahr — nach der Kastrierung erfolgte. Trotz normalen Wuchses des Regenerates erfolgte die Regeneration bei den Versuchstieren, also den kastrierten langsamer. Der Unterschied zwischen den Regeneratoberflächen bei den kastrierten und den Kontrolltieren betrug hier 203·5 mm² zugunsten der Kontrolltiere.

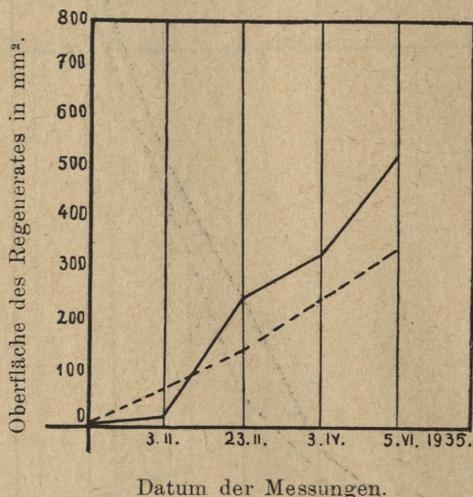


Diagramm 10. Gruppe VII. Amputation 330 Tage nach Kastrierung. Kastrierung am 14. XII 1933, Amputation am 14. XI 1934. ----- Kastrierte, ——— Kontrolltiere.

Hier muß berücksichtigt werden, daß die Amputation zeitlich besonders weit von der Kastrierung entfernt war, nämlich fast ein Jahr, also zu einer Zeit stattfand, wo, wie man vermuten kann, die Tiere schon ein neues hormonales Gleichgewicht erlangt hatten. Diese Vermutung mag insofern richtig sein, als es ja experimentell bestätigt ist, daß der Regenerationsverlauf bei den Versuchstieren um so langsamer vor sich geht, je später die Amputation nach der Kastrierung stattfindet.

Falls weitere Versuche wirklich beweisen sollten, daß eine beschleunigte Regeneration nur während einer bestimmten, begrenzten Zeit nach der Kastrierung stattfindet, müßten genauere Untersuchungen der Funktion anderer endokriner Drüsen die Ursache für diesen Unterschied erklären.

Ergänzende Versuche an Molchen.

Um die Resultate meiner Hauptversuche gründlicher zu belegen und um mich zu überzeugen, inwiefern sie eine allgemeine Bedeutung haben, führte ich eine Reihe ähnlicher Versuche an Molchen, *Triton (Triturus) taeniatus* und *Triton (Triturus) cristatus* durch. Ich verwendete zu den Versuchen 16 weibliche Versuchstiere und ebensoviele Kontrollexemplare der ersten Art sowie weibliche Versuchstiere und ebensoviele Kontrollexemplare der zweiten Art. Die Tiere waren in stehenden Gewässern gefangen worden und wurden im Biologisch-Embryologischen Institut der Jagellonischen Universität in Aquarien weitergezüchtet und mit lebenden Daphnien und Regenwürmern ernährt.

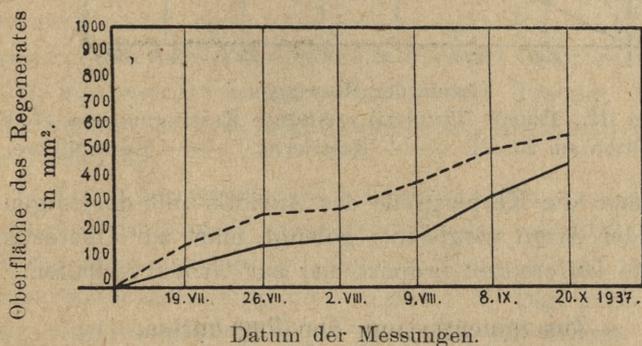


Diagramm 11. *Triton (Triturus) taeniatus*. Kastrierung am 25. V., Amputation am 30. VI 1937. ----- Kastrierte, ——— Kontrolltiere.

In der Zeit von Mai bis Dezember 1937 führte ich 7 Versuchsserien aus, wobei ich zu jeder von diesen Serien 1 bis 2 Versuchs- und ebensoviel Kontrolltiere verwendete. Das Wachstum des Regenerates erfolgt beim Molche viel rascher als beim Axolotl. 10—14 Tage nach der Amputation erreicht das Regenerat schon eine solche Größe, daß man es bequem abzeichnen kann und nach 6 Monaten ist der Schwanz vollkommen regeneriert.

Die angeführten Diagramme gestatten uns, einen Vergleich der erzielten Resultate durchzuführen. Man ersieht daraus, daß wir auch bei diesen Tieren nach der Kastrierung eine beschleunigte Regeneration erzielen, wobei die maximale Differenz der Regeneratoberflächen bei den kastrierten und den Kontrolltieren bei *Triton taeniatus* (Diagramm 11) 20 mm² zugunsten der Ka-

strierten beträgt. Bei *Triton cristatus* (Diagramm 12) hingegen beträgt die maximale Differenz 59 mm^2 zugunsten der Kastrierten

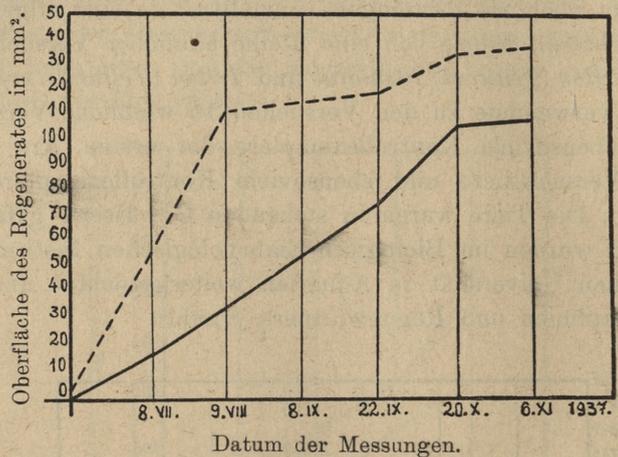


Diagramm 12. *Triton (Triturus) cristatus*. Kastrierung am 17. VI., Amputation am 23. VI. ----- Kastrierte, ——— Kontrolltiere.

Wenn man die Körpergröße des Axolotls mit derjenigen des Molche beider Arten vergleicht, gelangt man zur Überzeugung, daß sich die Differenzen proportional zur Größe verhalten.

Zusammenfassung der Ergebnisse.

In der vorliegenden Arbeit stellte ich mir die Aufgabe, den Einfluß der Geschlechtshormone auf die Regeneration des Schwanzes bei den Amphibien zu untersuchen.

Die Versuche wurden in 3 Hauptgruppen eingeteilt:

1) Hauptversuche am Axolotl, wobei die Messungen der Regenerate an kastrierten Weibchen in einer Reihe aufeinander folgender Regenerationsstadien ausgeführt wurden, und mit den Regeneraten nicht kastrierter Weibchen verglichen wurden.

2) Nebenversuche am Axolotl, in welchen

a) versucht wurde, den Einfluß des Traumas auf die Regeneration auszuschließen,

b) die Kastrierung im Verlaufe der Regeneration ausgeführt wurde und

c) der Verlauf der Regeneration untersucht wurde, die längere Zeit nach Ausführung der Kastrierung vor sich ging.

3) Versuche am *Triton*, welche auf dieselbe Art gemacht wurden wie unter 1).

Die Resultate dieser Versuche lassen sich in folgenden Thesen zusammenfassen:

Ad 1) a) Das Wachstum der Regenerate erfolgt bei kastrierten Weibchen rascher als bei Weibchen mit Eierstock.

b) Je kürzer der Zeitabschnitt zwischen der Kastrierung und der Amputation des Schwanzes ist, desto rascher erfolgt die Regeneration.

Ad 2) a) Tiere, bei denen man statt der Kastrierung nur eine Laparatomie ausgeführt hatte, regenerierten in demselben Tempo wie die Kontrolltiere. Das gestattet uns, den Einfluß eines Traumas auf eine beschleunigte Regeneration auszuschließen, und festzustellen, daß die beschleunigte Regeneration bei kastrierten Tieren nicht dem Trauma, welches eine Laparatomie bedeutet, zuzuschreiben ist, sondern der Entfernung der Eierstöcke.

b) Tiere, bei welchen die Kastrierung nach Amputation des Schwanzes ausgeführt wurde, verhalten sich ähnlich wie die oben angeführten, mit dem Unterschied, daß die Regenerationsbeschleunigung erst ungefähr 30 Tage nach der Kastrierung einsetzt, also zu einer Zeit, wo der Vorrat der im Blut kreisenden Hormone aufgezehrt ist.

c) Kastrierte Weibchen, bei denen die Schwanzamputation 330 Tage, also fast 1 Jahr, nach der Kastrierung durchgeführt wurde, regenerieren in demselben Tempo wie die Kontrolltiere, welche im Besitze ihrer Eierstöcke sind. Man kann also annehmen, daß es bei den Tieren nach einem solchen Zeitabschnitte zu einem neuen hormonalen Gleichgewichte kommt.

Ad 3) Die Versuche an Molchen ergaben ähnliche Resultate, nämlich beschleunigte Regeneration bei kastrierten Tieren.

Resultate der zytologischen Untersuchungen über die normale und die durch hormonale Einflüsse veränderte Regeneration.

Aus den bisher beschriebenen Ergebnissen kann man für bewiesen annehmen, daß das Follikulin zweifellos einen Einfluß auf die Regulierung der regenerativen Bildungstätigkeit ausübt. Nun ergibt sich die Frage, was für ein Verhältnis zwischen Plasma

und Zellkern besteht, um so mehr, da im Falle einer erhöhten Bildungstätigkeit (ontogenetische Entwicklung, Entwicklungsreiz, Neubildungen) dieses Verhältnis gewissen Veränderungen unterliegt. Zu diesem Zwecke führte ich Messungen der Kernplasmarelation an den Regeneraten von kastrierten und normal regenerierenden Individuen aus.

Die Ausführung erfolgte folgendermaßen:

Die Berechnungen führte ich auf Grund einer Reihe von histologischen Präparaten aus, nämlich von mikroskopischen Querschnitten der Regenerate des *Triton cristatus*, der Versuchs- und der Kontrolltiere. Die Regenerate waren 6 bis 10 Wochen alt. Sie wurden nach Fixierung in Gilson'scher Lösung und nach Entkalkung (nach Schaffer's Methode) durch Alkohol geführt und in Paraffin eingebettet. Die Schnitte von $12\ \mu$ Stärke färbte ich mit Ehrlich'schem Hämatoxylin und Eosin. Ein genauer Vergleich der Präparate der Versuchs- und der Kontrolltiere ergab keinen grundlegenden Unterschied in der Differenzierung und in der Anordnung der Gewebe im Regenerat. Da ich mich jedoch auf die Forschungsergebnisse von Godlewski stützte, der eine Verschiebung der Kernplasmarelation zugunsten des Plasmas während der Regeneration beim *Triton* innerhalb der Epithelzellen nachwies, unternahm ich die Berechnung dieses Verhältnisses im Epithel der Versuchs- und Kontrollregenerate.

Die Zellkerne des Epithels am Tritonregenerat ergeben im Querschnitte Ellipsen, so daß man vermuten kann, daß sie räumlich Ellipsoide darstellen. Zur Vereinfachung der Rechnung müssen wir annehmen, daß dies Rotationsellipsoide sind, also solche Ellipsoide, deren kürzere Achsen B und C einander gleichen, denn in unseren Verhältnissen sind wir nicht imstande, die dritte Achse zu berechnen.

Die Wagemethode läßt sich dort anwenden, wo die Zellkerne kugelig sind, denn aus einer Kreisoberfläche kann man das Volumen der Kugel berechnen, deren mittlerer Durchschnitt dieser Kreis ist. Bei einem Ellipsoid hingegen müssen wir die Größe der Achsen kennen, denn aus der Oberfläche des Querschnittes allein kann man das Volumen eines Ellipsoides nicht berechnen.

Die lange und kurze Ellipsoidachse berechnete ich auf Grund von Messungen, die ich an den durchgepausten Kernen ausführte, die vom mikroskopischen Präparate mittels eines im Verhältnisse

1:700 vergrößernden (Fig. 3 und Fig. 4) Projektionsapparates auf die Leinwand geworfen wurden.

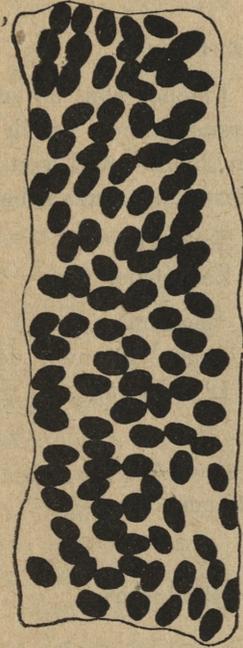


Fig. 3.

Epithelium des Regenerats eines Versuchstieres. Vergröß. 350 X.

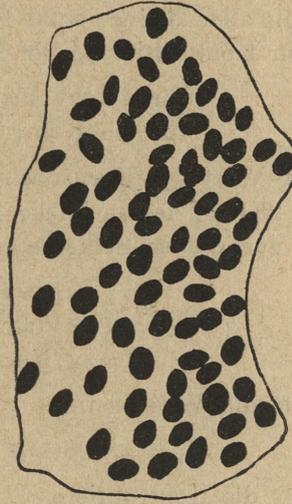


Fig. 4.

Epithelium des Regenerats eines Kontrolltieres. Vergröß. 350 X.

Indem ich dann ein Millimetermaß an 100 Zellkernzeichnungen der regenerierten Versuchstiere und ebenso an 100 Zeichnungen der Kontrolltiere anlegte, erhielt ich folgende Durchschnittswerte für die Zellkerne:

| Versuchstiere | Kontrolltiere |
|--------------------------|------------------------|
| Achse A (lange) — 9.1 mm | Achse A (lange) 7.6 mm |
| Achse B (kurze) — 5.9 mm | Achse B (kurze) 5.1 mm |

wobei ich bemerken muß, daß die B-Achse im Ellipsoid der C-Achse gleicht.

Aus diesen Werten erhielt ich auf Grund der Formel für die Oberfläche eines Rotationsellipsoides $\frac{4}{3}\pi ab^2$ (wobei die Rotationsachse $2a$ gleicht) folgendes Ergebnis:

x = das Durchschnittsvolumen eines Zellkernes.

Für die Versuchstiere:

$$x_1 = \frac{4}{3} \cdot 3 \cdot 14 \cdot 4 \cdot 5 \cdot 2 \cdot 9^2 = 164 \cdot 1 \text{ mm}^3$$

Für die Kontrolltiere:

$$x = \frac{4}{3} \cdot 3 \cdot 14 \cdot 3 \cdot 8 \cdot 2 \cdot 5^2 = 103 \cdot 4 \text{ mm}^3.$$

Die Anzahl der Zellkerne auf einer Fläche von 25 cm^2 ist mir bekannt. Ich gewann sie bei den Versuchstieren durch Summierung aller Kerne in 20 Präparaten zu 25 cm^2 und von ebensoviele Kontrolltieren. Der Mittelwert dieser Kernanzahl beträgt:

für die Versuchstiere 26·4 Zellkerne,
für die Kontrolltiere 20 Zellkerne.

Der Wert der Kernsubstanz in einem Segment, dessen Oberfläche 25 cm^2 , dessen Dicke, wo wir annehmen können, daß die Kerne nur in einer Schichte gelagert sind, 12μ beträgt, ist gleich:

$$\begin{aligned} I &= \text{Kernsubstanz} \\ x &= \text{Volumen eines Kernes} \\ I &= x \cdot \text{Kernanzahl in } 25 \text{ cm}^2, \end{aligned}$$

was für die Versuchstiere

$$I_1 = x_1 \cdot 26 \cdot 4 = 164 \cdot 1 \cdot 26 \cdot 4 = 4332 \text{ mm}^3$$

und für die Kontrolltiere

$$I = x \cdot 20 = 103 \cdot 4 \cdot 20 = 2068 \text{ mm}^3 \text{ beträgt.}$$

Die Anzahl von Plasma und Kernen in einem Segment, dessen Oberfläche 25 cm^2 und dessen Dicke 12μ beträgt, wird folgendermaßen berechnet:

$$\begin{aligned} IP &= \text{Plasma und Kernvolumen} \\ IP &= 2500 \text{ mm}^2 \cdot 0 \cdot 012 \text{ mm} - 30 \text{ mm}^3 \cdot \text{Vergrößerung.} \end{aligned}$$

Für die Versuchstiere:

$$I_1 P_1 - I_1 = 30 \text{ mm}^3 \cdot \text{Vergrößerung} - 4332 \text{ mm}^3.$$

Für die Kontrolltiere:

$$IP - I = 30 \text{ mm}^3 \cdot \text{Vergrößerung} - 2068 \text{ mm}^3.$$

Nach Subtraktion der Kernmasse von der gesamten Plasma- und Kernmasse bleibt das Volumen der Plasmasubstanz, welche für die Versuchstiere $16 \cdot 677 \text{ mm}^3$ und für die Kontrolltiere $18 \cdot 932 \text{ mm}^3$ beträgt.

In der endgültigen Zusammenstellung ergeben sich folgende Werte:

$$\begin{array}{l} \text{Versuchstiere} \quad \frac{\text{Plasma } 16.667 \text{ mm}^3}{\text{Kerne } 4.332 \text{ mm}^3} = \frac{\text{Pl}}{\text{K}} = \frac{16}{4} = 4, \\ \text{Kontrolltiere} \quad \frac{\text{Plasma } 18.932 \text{ mm}^3}{\text{Kerne } 2.068 \text{ mm}^3} = \frac{\text{Pl}}{\text{K}} = \frac{19}{2} = 9.5. \end{array}$$

So ist das Volumen der Kernsubstanz bei den Versuchstieren zweimal so groß wie bei den Kontrolltieren. Die zweifach vergrößerte Kernsubstanz bei den Versuchstieren ist nicht nur ein Beweis dafür, daß das Volumen der einzelnen Zellkerne größer geworden ist, sondern auch ein Beweis dafür, daß die Zahl der Kerne gewachsen ist. Man muß hierbei feststellen, daß bei den jüngeren (6 Wochen alten) Regeneraten die Volumenvergrößerung der Kernsubstanz in den Epithelzellen der Versuchstiere eine kleinere ist als bei den älteren (10 Wochen alten) Regeneraten.

In den vorher beschriebenen Versuchen stellte ich ein beschleunigtes Regeneratwachstum bei den Versuchstieren im Vergleich zu den Kontrolltieren fest. Die zytologischen Untersuchungen ergaben, daß die Beschleunigung darauf beruht, daß die Anzahl der Zellen wächst und das Volumen der Zellkerne in den einzelnen Zellen größer wird. Diese Tatsache könnte man nun entweder so erklären, daß die Synthese der Kernsubstanz nach der Kastrierung rascher erfolgt, oder aber, daß die Kernteilung rascher vor sich geht.

Sollte hingegen Loeb's Theorie von der Umwandlung der Plasma-substanz in Kernsubstanz zu Beginn der Ontogenese auch bei Regenerationsprozessen Geltung haben, dann würde daraus folgen daß sich bei einem Fehlen der gonadotropen Hormone dieser Umwandlungsprozeß in den Epithelzellen des Regenerats stärker auswirkt.

Aus dem Biologisch-Embryologischen Institut der Jagellonischen Universität, Kraków.

Literaturverzeichnis.

- 1) Beupré J.: Wpływ kastracji na regenerację u aksolotla. Odczyt wygłoszony na posiedzeniu Sekcji Biologicznej Zjazdu Lekarzy i Przyrodników we Lwowie, lipiec 1937. — 2) Berezowski: Archiv f. Zellforschung 5, 1910. — 3) Godlewski E. jun.: Der Einfluß des Nervensystems auf die Regenerationserscheinungen der Molche. Anz. Akad. Wiss. Krakau 1904.

- 4) Godlewski E. jun.: Plasma und Kernsubstanz im Epithelgewebe bei Amphibien. Arch. f. Entw. Mech. Bd. 30. 1910. — 5) Godlewski E. jun.: Der Eireifungsprozeß im Lichte der Untersuchung der Kernplasmarelation bei Echinodermenkeim. Archiv f. Entw. Mech., Bd. 44. 1918. — 6) Godlewski E. et Latinik I.: La croissance ontogénétique et la croissance régénérative chez l'Axolotl. Bull. Acad. Pol. Scienc. 1930. — 7) Golstein: Beiträge zur Frage nach dem Einfluß des Nervensystems auf Embryonalentwicklung und Regeneration. Archiv. f. Entw. Mech. Bd. 18. 1904. — 8) Dubiski J.: Wpływ hormonów tarczycy i jąder na średnicę włókien mięsnych u szczurów. Roczniki Nauk Rolniczych i Leśniczych. Tom XXIII. 1930. — 9) Hamburger v.: Einfluß des Nervensystems auf die Entwicklung der Extremitäten von *Rana*. Biol. Zbl. 45 Bd. 1925. — 10) Hiller St.: La régénération chez l'Axolotl. Bulletin de l'Académie de Sciences et des Lettres. 1926. — 11) Hiller St.: L'influence de jeune sur la régénération chez l'Axolotl. Bulletin de l'Académie Polonaise des Sciences et des Lettres. 1926. — 12) Hiller St.: Wpływ głodu na regenerację u aksolotla. Rozpr. Pol. Akad. Um. T. LXVIII. 1928. — 13) Jasiński J.: Wpływ kastracji na mięśnie. Polska Gazeta Lekarska Nr. 10. 1930. — 14) Parhon C. J., Marza M., Kahane W.: Compt. Rend. Soc. Biol. 95. N. 27. 781—783. 1926. — 15) Rubin: Beziehungen des Nervensystems zur Regeneration bei den Amphibien. Arch. f. Entw. Mech. Bd. 16. 1903. — 16) Slonaker: American Journal of Physiology. T. 93. 1930. — 17) Spencer: American Journal of Anatomy. T. 50. 1932. — 17) Szüts: Zur Kenntnis der Abhängigkeit der Regeneration vom Zentralnervensystem. Arch. f. Entw. Mech. 38 Bd. 1914. — 19) Tandler—Grosz: Berlin. Springer J.: 1913. — 20) Tornier: Regeneracja odnóży u kastrowanych jednostek *Triton cristatus*. Archiv f. Entw. Mech. 1896. T. 3. — 21) Walter: Bedeutung des Nervensystems für die Regeneration der Tritonenextremitäten. Arch. f. Entw. Mech. 33 Bd. 1912. — 22) Weiss P.: Abhängigkeit der Regeneration entwickelter Amphibienextremitäten vom Nervensystem. Arch. f. Entw. Mech. Bd. 104. 1925.

*Wpływ usunięcia i wszczepiania przysadki mózgowej na regenerację ogona u Aksolotla (Ambystoma mexicanum).
L'influence de l'ablation et de la greffe de l'hypophyse sur la régénération de la queue chez l'Axolotl (Ambystoma mexicanum).*

Mémoire

de M^{lle} **A. HORAK**,

présenté le 26 Juin 1939 par M. E. Godlewski m. t.

Introduction.

Les facteurs endocriniens qui retentissent sur la marche des changements morphologiques et fonctionnels dont l'organisme est le siège, ne sont également pas sans influence sur les phénomènes de la régénération, que nous rangeons dans la catégorie des transformations morphologiques que subit l'être vivant. Nous savons aujourd'hui que les deux principaux mécanismes, chargés de coordonner les fonctions de l'organisme, savoir: le système nerveux et le système endocrinien, agissent l'un et l'autre sur la marche de la régénération. La question relative à l'action des hormones sur les processus régénératifs n'a cependant pas été aussi minutieusement étudiée jusqu'ici, que l'influence du système nerveux sur ces phénomènes. Il est à remarquer toutefois que, malgré tout, les opinions de divers chercheurs sur le rôle du système nerveux sont toujours encore plutôt divergentes. Tandis que les uns (Rubin 1903, Goldstein 1903, Walter 1912, Hamburger 1925 et autres) admettent que le système nerveux n'agit pas sur la régénération, il résulterait des travaux de Godlewski (1904), Schütz (1914), Weiss (1925) et autres, qu'une action pareille se fait réellement et que le fonctionnement normal du système nerveux garantit la marche normale de la régénération.

Si nous passons à l'action du système endocrinien sur la marche de la régénération, il nous faut tenir compte en premier lieu du rôle de l'hypophyse, appelée à remplir dans ce système des fonctions d'un ordre supérieur, vu qu'en dehors d'hormones activant la croissance, la lactation etc., elle en produit encore d'autres qui stimulent l'activité de certaines glandes à sécrétion interne.

Comme nous ne disposons que d'un nombre restreint de travaux consacrés au rôle de l'hypophyse dans la régénération et que leurs résultats ne sont pas suffisamment concordants, j'ai entrepris, sur l'initiative du professeur Emil Godlewski, une série de recherches afin d'élucider la question de savoir si, et dans quelle mesure, l'ablation de l'hypophyse, respectivement la greffe de cet organe, pouvait retentir sur la marche des phénomènes liés à la régénération.

Un sujet analogue a fait, dans la littérature scientifique plus récente, l'objet d'une étude de Schotté (1926). Cet auteur a fait des recherches sur l'action qu'exerçait l'ablation de l'hypophyse sur la régénération chez les Batraciens urodèles, et put établir que cette opération inhibait la régénération des extrémités chez le Triton (*Triton cristatus*). Les conséquences de l'ablation sont semblables chez les larves de la Salamandre (*Salamandra maculosa*); par contre, les larves des Tritons (*Triton cristatus*, *Triton alpestris*) réagissent d'une manière complètement différente à l'opération, car l'ablation de l'hypophyse est absolument sans effet sur la vitesse de la régénération. Notons le détail intéressant que, si l'on avait procédé à l'opération avant d'amputer les extrémités, n'importe quelle ébauche régénérative faisait souvent défaut chez les tritons adultes et les larves de salamandre.

Au cours de ses investigations sur la régénération de la queue et des extrémités chez les larves d'axolotl, Kabak n'a observé aucune différence dans la différenciation de la partie régénérée chez les animaux témoins, les animaux après l'ablation de l'hypophyse et les animaux privés de cet organe, auxquels on le greffait ensuite. De l'avis de cet auteur, l'absence de l'hypophyse ne ralentit que la croissance de la partie régénérée, sans inhiber cependant la différenciation de celle-ci.

Après avoir soumis des têtards de grenouille (*Rana esculenta*) à l'action d'extraits tirés de l'hypophyse, Romeis a noté une régénération accélérée de la queue; enfin, en se servant d'extraits

du lobe postérieur de l'hypophyse, Belkin a constaté que les extrémités se régénéraient plus vite dans ces conditions chez des axolotls de 3 à 4 mois. La régénération commence en même temps chez les animaux témoins et chez les animaux placés dans un aquarium dont l'eau a été additionnée d'extrait du lobe postérieur de l'hypophyse; dès qu'apparaît la première ébauche de la partie régénérée, la régénération devient cependant plus rapide chez les animaux exposés à l'action des hormones que renferme le lobe postérieur.

Les auteurs des travaux dont nous venons de parler, étudiaient l'action de différents extraits et préparations, tirés tant du lobe antérieur que du lobe postérieur de l'hypophyse. N'étant pas pareils, les uns et les autres devaient forcément avoir une autre répercussion sur la marche de la régénération. Le rôle de l'hypophyse dans ce processus n'ayant donc pas été élucidé par les recherches consacrées à cette question, je résolus de faire des expériences en me servant d'un matériel identique, soit en utilisant des axolotls, afin d'étudier, d'une part, l'influence de l'ablation de l'hypophyse sur les phénomènes de la régénération, et de connaître, de l'autre, les effets de la greffe d'hypophyses accessoires. Dans mes recherches, j'ai donc fixé l'attention sur le manque, respectivement sur l'excès d'hormones que produit l'hypophyse, et ce n'est qu'à titre complémentaire que mes expériences portaient sur l'action des prolanes (Prégnyl), hormones que sécrète probablement le placenta et dont l'influence est à peu près identique à celle qu'exercent les hormones gonadotropes de l'hypophyse. De l'avis de Lauber, les prolanes ne sont pas sans action dans les processus de régénération, car, comme le dit cet auteur, ces substances accélèrent la cicatrisation de plaies chez la souris.

Matériel et méthodes.

Je me servais dans mes recherches de mâles et de femelles de l'Axolotl noir (*Ambystoma mexicanum*), élevés depuis une série d'années à l'Institut d'Embryologie et de Biologie de l'Université des Jagellons à Cracovie. Le matériel dont je disposais, comprenait 150 axolotls du même âge, dont le poids variait de 55 à 70 gr et dont la longueur mesurait 18 à 24 cm. Aussi bien les animaux témoins que les animaux soumis aux expériences étaient placés dans des conditions identiques pendant toute la durée des épreuves.

Les axolotls, réunis en groupes de deux à trois individus, vivaient dans des récipients pareils, remplis d'eau courante dont la température correspondait à celle du laboratoire. Deux fois par semaine, ils prenaient de la nourriture, composée de hachis de foie de cheval. Les animaux témoins et les animaux sur lesquels je faisais des expériences, étaient pesés et mesurés, tant avant, qu'après l'exécution des épreuves.

J'ai appliqué des méthodes différentes dans les deux séries de mes expériences.

Lorsqu'il s'agissait d'épreuves, destinées à découvrir l'influence, que la suppression des hormones de l'hypophyse aurait pu avoir le cas échéant sur la régénération de la queue chez l'Axolotl, je procédais à l'ablation de cet organe chez les animaux étudiés, préalablement anesthésiés à l'éther. Voici comment je m'y prenais: l'animal, en décubitus dorsal, étant attaché à la table d'opération, je baissais la mâchoire inférieure et isolais, à l'aide d'un scalpel, la muqueuse palatine en forme d'un triangle, juste à l'endroit où se trouve l'hypophyse. Après avoir écarté la muqueuse, je pouvais voir, à travers l'os palatin de peu d'épaisseur, une aire blanchâtre qui correspond à l'emplacement de l'hypophyse. En me servant d'un petit couteau et d'une fine aiguille, je pratiquais une ouverture, au fond de laquelle se voyait l'hypophyse que j'enlevais complètement. Une fois l'opération terminée, je couvrais l'ouverture avec la muqueuse que j'avais isolée et cousais celle-ci aux parties voisines de la muqueuse. Immédiatement après l'opération dont la durée s'étendait à 15 ou 20 minutes, je mettais les animaux dans de l'eau dont la température était celle du laboratoire. Si, pour telle ou telle autre raison, je n'avais pas réussi à complètement enlever l'hypophyse, l'animal ne servait plus aux expériences. Durant deux ou trois jours après l'opération, les animaux ne prenaient guère de mouvement et refusaient de prendre de la nourriture. Un certain nombre d'axolotls périssaient généralement soit immédiatement après l'ablation dans l'espace des premières 24 heures, soit après deux ou trois semaines. Une fois que cette période critique s'était écoulée, les animaux se portaient bien, de sorte que leur aspect ne différait nullement de celui des animaux qui n'avaient pas été opérés. Après m'être exercée à enlever l'hypophyse chez les axolotls, la mortalité des animaux opérés ne

s'élevait qu'à 10% à peine. Immédiatement après l'ablation, j'amputais le queue des animaux à 3 cm du cloaque.

A chaque groupe d'animaux servant aux expériences et dont j'avais enlevé l'hypophyse, correspondait un groupe d'animaux témoins, tout aussi nombreux, dont l'hypophyse était intacte et auxquels j'avais également amputé la queue. Je laissais tranquilles aussi bien les animaux étudiés, privés d'hypophyse, que les animaux témoins, jusqu'au jour où apparaissaient, visibles à l'oeil nu, les premières ébauches d'une régénération. Pour en étudier la marche, je mesurais la partie régénérée et pesais les animaux. Ces mesurages avaient lieu tous les deux jours pendant la première période de croissance plus intense, ensuite j'y procédais un peu moins souvent. La durée de l'observation s'étendait à 4 à 6 mois.

Dans les expériences où je me proposais de déceler l'action que la greffe d'hypophyses accessoires serait peut-être susceptible d'exercer sur la marche de la régénération de la queue, je greffais aux animaux étudiés d'abord une seule hypophyse d'axolotl, que j'introduisais profondément dans les muscles dorsaux, puis je faisais deux autres greffes pareilles à des intervalles de 48 heures. La première greffe de l'hypophyse n'avait lieu chez quelques animaux que 10 jours après l'amputation de la queue, tandis que chez d'autres cette opération ne coïncidait qu'avec le jour où commençait la régénération, c'est-à-dire avec le 18-e ou le 20-e jour après avoir amputé la queue. En outre, au lieu de greffer l'hypophyse, je faisais à un certain nombre d'animaux des injections hypodermiques de «Prégnyl», préparation qui renferme des prolanes dont l'action est à peu près la même, comme on sait, que celle des hormones gonadotropes de l'hypophyse. Comme au cours des recherches sur l'influence exercée par l'ablation de l'hypophyse, de même en observant l'action d'un plus grand nombre d'hypophyses accessoires sur la régénération chez l'Axolotl, je comparais parallèlement pour chaque groupe d'animaux ayant servi aux expériences, le groupe correspondant d'animaux témoins, auxquels je n'avais amputé que la queue. Les mesurages de la partie régénérée des animaux auxquels j'avais greffé plusieurs hypophyses, étaient exécutés comme chez les animaux dont j'avais enlevé l'hypophyse.

Les expériences et leurs résultats.

Influence de l'ablation de l'hypophyse.

Avant de parler de l'action que l'ablation, respectivement la greffe de l'hypophyse, exerce sur la régénération de la queue chez l'Axolotl, je présente un tableau (Tabl. I) qui permet de comparer les différentes catégories de mes épreuves. J'ai réuni dans ce tableau toutes les observations d'animaux que j'ai enregistrées en préparant le présent travail. Tous les animaux ayant servi aux expériences sont répartis entre deux séries. La série I comprend les axolotls, sur lesquels j'ai étudié la régénération après avoir enlevé l'hypophyse, tandis que les animaux où ce phénomène a été examiné après la greffe de quelques hypophyses, figurent dans la série II. Aussi bien à la série I qu'à la série II correspondent des animaux témoins, sur lesquels j'ai observé la régénération de la queue, sans enlever ou greffer l'hypophyse. Dans l'une et l'autre série, on trouve plusieurs groupes, indiqués dans le tableau par des chiffres arabes. Les différents animaux de chaque groupe sont indiqués par des lettres; ainsi p. ex. le groupe 1 de la série I comprend cinq animaux, savoir: trois axolotls (*a*, *b*, *c*) privés d'hypophyse et deux autres (*a*₁, *b*₁) dont l'hypophyse a été détruite sans l'enlever. Quant au groupe 1 de la série II, on y trouve deux animaux (*A*, *B*), chez lesquels la première greffe de l'hypophyse eut lieu immédiatement après avoir amputé la queue. Au groupe 1 de la série II correspondent des animaux témoins (*aA*, *bB*), où l'on s'est borné à amputer seulement la queue. Le tableau I permet de se rendre compte du nombre d'axolotls, sur lesquels j'ai fait des expériences.

La première ébauche de la partie régénérée qu'on distingue à l'oeil nu, apparaît chez les animaux témoins entre le 19-e et le 22-e jour après l'amputation de la queue. La croissance de la partie en voie de se régénérer est la plus forte pendant les premiers 10 jours après l'apparition de traces d'une régénération. Elle devient ensuite plus lente, mais ne dépend ni de la saison, ni des dimensions de l'animal, ni du sexe des axolotls.

Comparés avec les animaux témoins, les axolotls, entièrement privés d'hypophyse, accusent des différences plus sensibles dans la régénération de la queue. Dans les dessins schématiques ci-dessous (fig. 1), nous avons représenté, à titre d'exemple, la marche

TABLEAU I.
Liste de tous les animaux observés au cours de l'exécution du travail.

| Jour de l'opération | Groupes | S é r i e I | | | | S é r i e II | | | | Axolotls témoins |
|---------------------|---------|---------------------------------|--|--------------------------------------|--|------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|------------------|
| | | G e n r e | | | | H y p o p h y s e | | | | |
| | | Ablation de l'hypophyse entière | Ecrasement de l'hypophyse sans l'enlever | Trépanation sans enlever l'hypophyse | Hypophyse greffée: le jour de l'amputation de la queue | dix jours après l'amputation | le jour où commençait la régénération | Injection de prolanes «Prégnyl» | | |
| 30. X. 37. | 1. | a b c | a ₁ b ₁ | | A B | | | | | aA bB |
| 4. XI. 37. | 2. | d e | d ₁ e ₁ | | D E | | | | | dD eE |
| 6. XI. 37. | 3. | f g | | | F G | | | | | fF gB |
| 16. XI. 37. | 4. | h j | | | H J | | | | | hH jI |
| 24. XI. 37. | 5. | k l | | | K L | | | | | kK lL |
| 10. XII. 38. | 6. | m n | m ₁ n ₁ | | M N | | M ₁ N ₁ | | M ₁₁₁ N ₁₁₁ | mM nN |
| 10. I. 38. | 7. | o p | | o ₁₁ p ₁₁ | | | | | O ₁₁₁ P ₁₁₁ | oO pP |
| 14. I. 38. | 8. | r s | | r ₁₁ s ₁₁ | R S | | R ₁ S ₁ | R ₁₁ S ₁₁ | R ₁₁₁ S ₁₁₁ | rR sS |
| 28. I. 38. | 9. | t u | | | T U | | | T ₁₁ U ₁₁ | T ₁₁₁ U ₁₁₁ | tT uU |
| 20. II. 38. | 10. | w v | | | | | W ₁ V ₁ | W ₁₁ V ₁₁ | | wW vV |
| 16. III. 38. | 11. | x y | x ₁ y ₁ | x ₁₁ y ₁₁ | X Y | | X ₁ Y ₁ | X ₁₁ Y ₁₁ | X ₁₁₁ Y ₁₁₁ | xX yY |

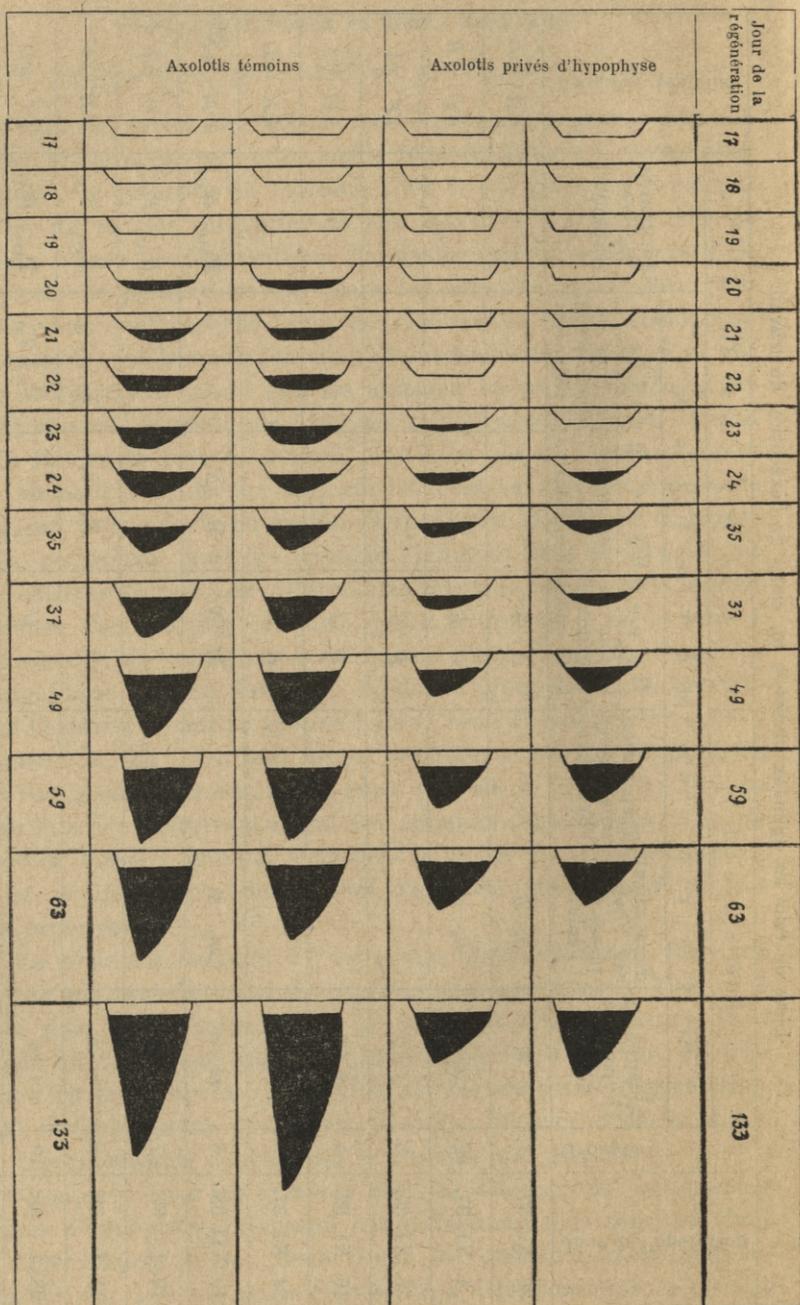


Fig. 1. Dimensions des parties régénérées, représentées sous la forme d'un schéma, chez deux axolotls privés d'hypophyse et chez deux animaux témoins.

de la régénération de la queue chez deux axolotls (t, u) dont l'hypophyse avait été enlevée, afin de pouvoir comparer ce processus avec la régénération chez deux axolotls témoins (tT, uU).

Dans ces dessins, nous avons indiqué par un contour noir la partie en voie de se régénérer, tandis que les chiffres visibles au-dessous du schème correspondent au nombre de jours écoulés depuis l'amputation de la queue.

Il résulte du schème, que la régénération commence non seulement plus tôt chez les animaux témoins, mais que la croissance de la partie régénérée est plus intense, qu'elle ne l'est chez les animaux privés d'hypophyse. La marche de la régénération était analogue, également chez d'autres individus dont l'hypophyse avait été complètement enlevée.

Désirant illustrer la marche de la régénération chez les animaux témoins et les axolotls privés d'hypophyse, j'ai indiqué en millimètres dans le tableau II, les dimensions des parties régé-

TABLEAU II.

Dimensions des parties régénérées en millimètres chez deux axolotls privés d'hypophyse et chez deux animaux témoins.

| Jour de la régénération | | 19 | 20 | 21 | 22 | 24 | 37 | 47 | 55 | 66 | 76 | 86 | 96 | 100 | 110 | 120 | 150 |
|-----------------------------|------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|-----|-----|-----|
| Axolotls privés d'hypophyse | k | — | — | — | + | 2 | 3 | 5 | 6 | 9 | 9 | 10 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 |
| | l | — | — | + | 1 | 3 | 4 | 5 | 5 | 8 | 10 | 10 | 11 | 11 | 11 | 12 | 12 |
| Axolotls témoins | kK | — | + | 1 | 2 | 3 | 6 | 7 | 8 | 13 | 16 | 16 | 20 | 23 | 27 | 35 | 42 |
| | lL | 1 | 1 | 2 | 3 | 4 | 8 | 8 | 9 | 14 | 15 | 19 | 22 | 24 | 28 | 30 | 41 |

nérées de deux animaux témoins (kK, lL) et de deux autres (k, l) ayant servi aux expériences. Les chiffres dans la partie supérieure du tableau indiquent le jour de la régénération, depuis le moment où fut amputée la queue.

Les différences observées dans la marche de la régénération chez les animaux témoins et les axolotls ayant servi aux expériences sont encore plus marquées lorsqu'on examine la courbe

ci-jointe (diagramme 1), où nous avons indiqué en millimètres sur les coordonnées les dimensions de la partie régénérée, tandis que le jour après l'amputation de la queue a été porté sur les abscisses. La ligne continue indique les animaux employés dans les expériences, la ligne pointillée se rapporte aux axolotls témoins. Il

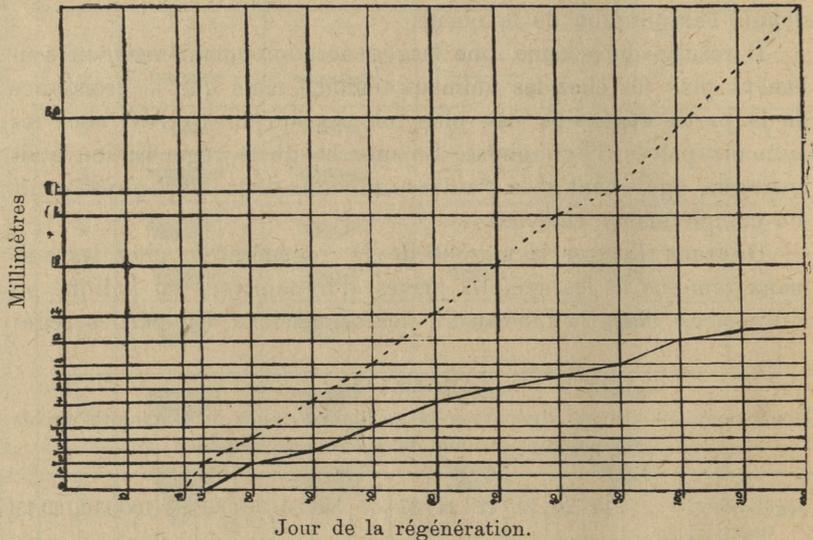


Diagramme 1. Courbe illustrant les dimensions de la partie régénérée chez un axolotl privé d'hypophyse et chez l'animal témoin correspondant.
 — Axolotl privé d'hypophyse, Axolotl témoin.

résulte de la disposition de ces lignes que chez les animaux dont l'hypophyse a été enlevée, la régénération commence plus tard, qu'elle est plus lente et que la partie régénérée n'atteint pas les dimensions auxquelles elle arrive chez les animaux témoins.

Les conclusions suivantes découlent de l'analyse de ces épreuves:

- 1) les premières ébauches de la régénération, visibles à l'oeil nu, apparaissent chez les animaux privés d'hypophyse entre le 21-e et le 25-e jour (le 23-e en moyenne); en d'autres termes, elles sont plus tardives que chez les animaux témoins où la régénération commence entre le 19-e et le 21-e jour (le 19-e en moyenne);
- 2) après une période de croissance plus intense s'étendant plus ou moins aux premiers 10 jours, la croissance diminue peu à peu

chez les animaux ayant servi aux épreuves, tandis que chez les animaux témoins elle demeure pendant quelque temps aussi intense qu'au début;

3) même après un espace de temps très prolongé dont la durée s'étend à 5 à 12 mois, la partie régénérée n'atteint jamais, chez les animaux privés d'hypophyse, les dimensions de la queue amputée; par contre, ainsi que nous l'avons déjà dit, ces dimensions sont atteintes après 3 ou 4 mois chez les animaux témoins et ne varient plus dans la suite.

On pourrait supposer, peut-être, que nos résultats s'expliquent, du moins en partie, par le choc opératoire qui accompagnait l'ablation de l'hypophyse. Pour réfuter cette objection qu'on pourrait nous faire le cas échéant, nous avons, chez un certain nombre d'animaux, trépané l'os palatin sans toucher à l'hypophyse; or, nous nous aperçûmes que chez tous les animaux auxquels nous avons amputé la queue simultanément avec la trépanation, la marche de la régénération était absolument la même que chez les animaux témoins. Il résulte de cette constatation que, dans les cas où nous avons enlevé l'hypophyse, le ralentissement de la régénération ne s'expliquait pas par le choc opératoire, mais qu'il était la conséquence de l'ablation de cet organe.

Dans certains groupes d'expériences, nous mettions l'hypophyse à découvert chez une série d'animaux, puis nous l'écrasions à l'aide d'une aiguille, mais la laissons à sa place. La régénération de la queue chez les animaux soumis à cette épreuve était absolument pareille à celle qu'on pouvait observer chez les animaux témoins.

Voici comment nous nous expliquons les résultats, toujours pareils, de ces épreuves: le ralentissement de la régénération après l'ablation de l'hypophyse est, à notre avis, la conséquence du manque d'hormones élaborées dans cet organe. La quantité de ces substances que renferme l'hypophyse, suffit à assurer la marche normale de la régénération, c'est pourquoi le fait de l'écraser sans l'enlever n'influe pas sur la vitesse qu'accuse la croissance de la partie régénérée. Les hormones produites par l'hypophyse que renferment ses tissus peuvent pénétrer dans la circulation après son écrasement et agir directement sur le processus régénératif. Il s'agit exclusivement ici de l'action de facteurs endocriniens et non de l'influence que les voies nerveuses s'étendant

à proximité immédiate de l'hypophyse exercerait sur la régénération, car les voies reliant cet organe à d'autres parties du cerveau sont vouées à la destruction, non seulement en enlevant, mais aussi en écrasant l'hypophyse.

L'action de la greffe d'hypophyses accessoires.

Pour étudier l'action que la greffe d'hypophyses accessoires exerce sur la régénération de la queue chez l'*Axolotl*, nous avons greffé des hypophyses préalablement enlevées à d'autres échantillons de la même espèce. Après avoir fait au scalpel une incision dans la peau et les muscles dorsaux, en ayant soin de mettre une hypophyse fraîchement enlevée dans la poche ainsi formée, la plaie, longue de 2 à 3 cm, était ensuite recousue avec un fil de soie. A chaque animal soumis aux épreuves, nous greffions trois hypophyses, chacune à un intervalle de 48 heures. Si la greffe avait été exécutée sur des femelles, celles-ci déposaient le frai après un ou deux jours, indépendamment de la saison de l'année. D'autres auteurs avaient déjà observé ce phénomène au cours d'expériences sur différentes espèces de Batraciens. La quantité d'oeufs était assez grande dans nos expériences et les ovules ne différaient des oeufs déposés à l'époque de la ponte, ni par leur aspect, ni par les membranes dont ils étaient entourés. A l'encontre des femelles qui déposaient régulièrement le frai après la greffe, les mâles ne réagissaient pas par l'éjaculation de spermatozoaires à la présence d'hypophyses accessoires. L'activation de la maturation des cellules femelles après la greffe de l'hypophyse est la conséquence de l'action des hormones gonadotropes qui contiennent cet organe. Comme ces hormones exercent une action stimulante également sur les cellules sexuelles mâles, ainsi que l'ont montré les observations d'autres chercheurs, nous devons admettre que, si les mâles n'éjaculaient pas de spermatozoaires au cours de nos expériences, c'est probablement parce que la gonade mâle est moins sensible aux excitations gonadotropes émanant de l'hypophyse. L'action des hormones gonadotropes sur la maturation des cellules sexuelles des Batraciens étant actuellement étudiée à l'Institut d'Embryologie et de Biologie de l'Université des Jagellons nous nous abstenons de nous étendre sur ce sujet. Lorsque nous greffions les hypophyses à des intervalles inférieurs à deux jours ou lorsque le nombre des hypophyses greffées était supérieur

à trois, les animaux manifestaient une série d'altérations caractéristiques et finissaient par périr. Il s'agissait dans ces cas-là de desquamation des couches superficielles de l'épiderme, la peau devenait plus claire, les animaux ne prenaient plus de nourriture et leur poids diminuait très rapidement.

Si la première greffe de l'hypophyse coïncidait avec le jour de l'amputation de la queue, la régénération commençait non seulement plus tôt que chez les animaux témoins, mais elle était bien plus intense que chez ceux-ci. De plus, les dimensions de la partie régénérée étaient supérieures à celles qu'on observait chez les animaux témoins.

Ces différences se voient très bien sur le dessin schématique ci-dessous (fig. 2) qui représente la croissance de la partie régénérée chez deux animaux choisis au hasard et ayant servi aux expériences, ainsi que chez les deux animaux témoins qui leur correspondent.

Dans le tableau ci-dessous, nous indiquons les résultats en chiffres (tabl. III). Les dimensions de la partie régénérée chez les animaux témoins sont exprimés en millimètres. Les chiffres dans la partie supérieure du tableau indiquent le jour de la régénération après l'amputation de la queue et après la greffe de la première hypophyse.

TABLEAU III.

Dimensions des parties régénérées en millimètres chez deux animaux avec des hypophyses greffées et chez deux animaux témoins.

| Jour après la greffe | | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 24 | 37 | 47 | 55 | 66 | 76 | 86 | 96 | 100 | 150 | 180 |
|-----------------------------------|-----------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|-----|-----|
| Axolotls avec l'hypophyse greffée | <i>K</i> | + | 2 | 4 | 5 | 6 | 9 | 12 | 16 | 20 | 23 | 33 | 39 | 45 | 50 | 70 | 83 |
| | <i>L</i> | — | 1 | 3 | 4 | 5 | 8 | 13 | 16 | 16 | 22 | 31 | 34 | 38 | 42 | 65 | 88 |
| Axolotls témoins | <i>kK</i> | — | — | — | + | 1 | 3 | 6 | 7 | 8 | 13 | 16 | 18 | 20 | 23 | 42 | 42 |
| | <i>lL</i> | — | + | 1 | 1 | 2 | 3 | 4 | 8 | 8 | 9 | 14 | 15 | 19 | 22 | 41 | 43 |

La courbe suivante (Diagramme 2) indique la moyenne de la marche de la régénération chez tous les animaux auxquels nous

| | | Axolotls témoins | | Axolotls avec des hypophysés greffées | | Jour de la régénération | |
|--|-----|------------------|--|---------------------------------------|--|-------------------------|-----|
| | 15 | | | | | 15 | 15 |
| | 16 | | | | | 16 | 16 |
| | 17 | | | | | 17 | 17 |
| | 18 | | | | | 18 | 18 |
| | 19 | | | | | 19 | 19 |
| | 20 | | | | | 20 | 20 |
| | 21 | | | | | 21 | 21 |
| | 22 | | | | | 22 | 22 |
| | 23 | | | | | 23 | 23 |
| | 24 | | | | | 24 | 24 |
| | 27 | | | | | 27 | 27 |
| | 30 | | | | | 30 | 30 |
| | 33 | | | | | 33 | 33 |
| | 43 | | | | | 43 | 43 |
| | 56 | | | | | 56 | 56 |
| | 66 | | | | | 66 | 66 |
| | 88 | | | | | 88 | 88 |
| | 150 | | | | | 150 | 150 |

Fig. 2. Dimensions des parties régénérées, représentées schématiquement, chez deux axolotls avec des hypophysés greffées et chez les deux animaux témoins correspondants.

avons greffé la première hypophyse simultanément avec l'amputation de la queue (ligne continue) et chez tous les animaux témoins qui leur correspondent (ligne pointillée).

L'analyse de cette courbe permet de tirer les conclusions suivantes:

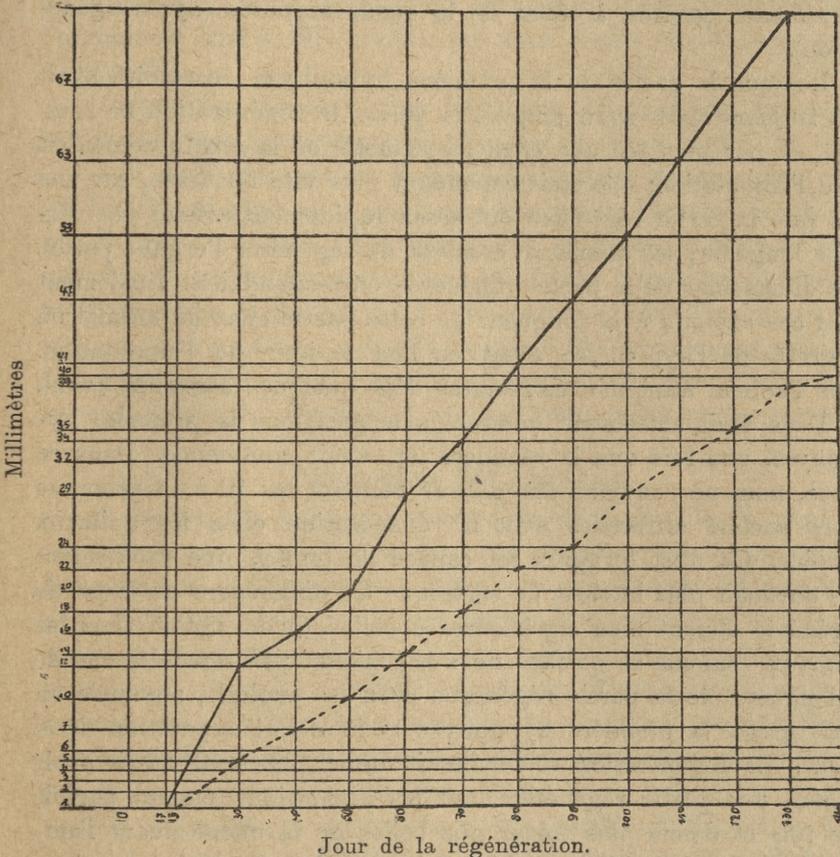


Diagramme 2. Courbe indiquant les dimensions moyennes des parties régénérées chez tous les animaux avec des hypophyses greffées (la première le jour de l'amputation de la queue) et chez tous les animaux témoins correspondants.

— Axolotls avec des hypophyses greffées, Axolotls témoins.

1) chez les animaux auxquels nous avons préalablement greffé l'hypophyse, la régénération commence entre le 16-e et le 19-e jour (le 17-e en moyenne), c'est-à-dire plus tôt que chez les animaux témoins, chez lesquels on observe le commencement de ce processus entre le 19-e et le 21-e jour (en moyenne le 19-e jour);

2) la croissance de la partie régénérée est non seulement la plus rapide dans les premiers stades de la régénération, mais elle se maintient au même niveau à peu près pendant toute la durée de ce processus;

3) les dimensions de la partie régénérée sont supérieures, chez les animaux greffés, à celles de la queue amputée (hyperrégénération).

Lorsque la greffe de la première hypophyse accessoire avait lieu 10 jours après avoir amputé la queue, la régénération ne commençait pas plus tôt que chez les axolotls où la greffe coïncidait avec l'amputation; elle était cependant plus vite terminée, car une fois que la partie régénérée eut assez rapidement atteint une certaine longueur, les animaux cessaient de régénérer l'organe perdu. Les dimensions de la partie régénérée correspondaient finalement chez ces axolotls à la longueur de cette partie chez un animal où la greffe de l'hypophyse avait eu lieu le jour de l'amputation, mais l'animal atteignait ce résultat déjà quelques semaines avant.

Il en était autrement lorsque nous greffions la première hypophyse, une fois que la régénération avait commencé. Dans ce cas-là, nous ne pouvions enregistrer pendant les 10 à 14 premiers jours aucune différence avec la régénération chez les animaux témoins. Ce n'est qu'après cet espace de temps, que rapidement elle devenait plus intense, de sorte que les dimensions de la partie régénérée étaient bien supérieures à celles qu'on notait chez les animaux témoins et qu'elles ne s'écartaient qu'insensiblement de la longueur de la partie régénérée chez les axolotls, auxquels on avait greffé la première hypophyse le jour de l'amputation de la queue. La régénération se terminait donc plus tôt, après avoir produit une partie régénérée dont les dimensions étaient parfois une fois et demie plus fortes que celles de la queue avant l'amputation, comme c'était d'ailleurs le cas chez les animaux où la greffe de la première hypophyse coïncidait avec le jour de l'amputation de la queue.

Les injections de prolanes »Prégnyl« et leur influence

Après nous être entretenu dans les deux chapitres précédents de l'influence que l'ablation de l'hypophyse, respectivement la greffe d'hypophyses accessoires, exerce sur la régénération, il nous faut dire encore quelques mots des effets que des injections de pro-

lanes produisent sur la régénération de la queue chez l'Axolotl. Ces expériences ont fait l'objet du travail de Lauber, dont nous avons déjà fait mention.

Au lieu de greffer des hypophyses accessoires, nous avons injecté des prolanes, une fois immédiatement après l'amputation de la queue, puis 24 heures plus tard. Nous avons introduit dans l'organisme 250 à 500 unités rat sous forme de la préparation »Prégnyl«.

L'action des prolanes, tirés de l'urine, est analogue, comme on sait, à celle des hormones gonadotropes de l'hypophyse. En administrant cette préparation, nous voulions nous rendre compte, s'il ne fallait pas expliquer par l'intervention de facteurs gonadotropes l'action qu'exerce l'hypophyse sur le phénomène de la régénération. Tout comme après avoir greffé une hypophyse, les femelles déposaient le frai, mais la régénération de la queue n'accusait aucune accélération. Des expériences plusieurs fois répétées, au cours desquelles nous faisons des injections intramusculaires de prolanes, donnaient toujours les mêmes résultats.

Discussion des résultats.

Il résulte de nos expériences que l'ablation de l'hypophyse, respectivement la greffe de cet organe, influe très fortement sur la marche de la régénération. Ainsi que nous l'avons dit plus haut, cette influence ne s'explique ni par le choc opératoire, ni par une lésion du tissu nerveux. Dans ces conditions, il faut admettre par conséquent que nous sommes en présence d'une action directe des hormones de l'hypophyse. On n'ignore cependant pas que l'hypophyse produit plusieurs hormones différentes, dont on ne connaît pas suffisamment les propriétés. Après avoir enlevé l'hypophyse ou l'avoir greffée, il n'est donc guère possible d'affirmer en toute certitude quelles sont les hormones qui agissent sur la régénération et quel est le mode de leur action. Les expériences où nous avons injecté des prolanes n'ayant pas de répercussion sur la régénération, nous sommes en droit de conclure que l'accélération de ce processus ne dépend pas des hormones gonadotropes de l'hypophyse. L'action de l'hormone de croissance nous paraît la plus importante de toutes celles qu'exercent les autres hormones. Nos expériences ont montré que l'ablation de l'hypophyse n'agit pas autant sur l'inhibition des premières ébauches

de la régénération, qu'elle retentit sur la partie régénérée dont elle ralentit la croissance. Il en est de même de la greffe de l'hypophyse, qui n'accélère qu'insensiblement l'apparition des premiers signes de la régénération, mais active très énergiquement la croissance de la partie régénérée dont les dimensions deviennent finalement supérieures à celles de la queue des animaux témoins. Les phénomènes régénératifs sont très étroitement liés aux phénomènes de la croissance (Przibram, Godlewski-Latinik), c'est pourquoi tous les facteurs agissant sur la croissance doivent forcément retentir sur la régénération. Nous savons en effet que la croissance de l'organisme dépend chez les Vertébrés de l'hormone de croissance que produit le lobe antérieur de l'hypophyse. Des troubles plus graves portant sur la quantité d'hormone de croissance, entraînent des perturbations pathologiques de la croissance, qu'on a souvent décrites chez l'homme. En injectant des extraits de l'hypophyse à des animaux, on a obtenu, par voie expérimentale, une croissance démesurée chez les rats ou des altérations rappelant l'acromégalie chez les chiens. Les expériences d'Uhlenhuth ont montré que les Batraciens ne s'écartaient pas des autres animaux à cet égard. Cet auteur qui faisait ingérer à des axolotls le lobe antérieur de l'hypophyse, s'aperçut que la taille de ces animaux augmentait par rapport à celle des axolotls témoins. Smith a observé de son côté qu'en injectant des extraits de l'hypophyse à des têtards de grenouille ou à des larves de salamandre, respectivement en élevant ces larves et têtards dans de l'eau additionnée de ces extraits, on pouvait établir une influence positive sur la croissance de la queue chez ces animaux.

Nous ne pensons cependant pas que les résultats de nos expériences autorisent à admettre que seul l'hormone de croissance active la croissance de la partie régénérée, quoiqu'il soit certainement appelé à jouer le rôle le plus important dans ce processus. Il ne faut pas perdre de vue en effet que l'hypophyse produit en outre une série d'hormones qui activent les fonctions d'autres glandes à sécrétion interne, en premier lieu les fonctions du corps thyroïde; or, l'hormone de cet organe retentit également sur la croissance. Quoique la croissance de la partie régénérée dépend surtout de la quantité d'hormone de croissance, d'autres facteurs

endocriniens peuvent également coopérer avec lui; aussi les variations de la croissance de la partie régénérée chez les animaux privés d'hypophyse ou avec une hypophyse accessoire greffée, pouvaient-elles être attribuées pas seulement aux changements que subissait la quantité d'hormone de croissance.

J'ai fait les recherches en rapport avec le présent travail à l'Institut de Biologie et d'Embryologie de l'Université des Jagellons à Cracovie. Je suis profondément reconnaissante à M. le Professeur Emil Godlewski, Directeur de l'Institut, non seulement pour m'avoir suggéré le sujet de ce travail, mais encore pour m'avoir prodigué ses précieuses indications et ses conseils au cours des expériences et de leur analyse.

Bibliographie.

- 1) Belkin R.: C. R. Soc. Biol. C. XV III 1934. — 2) Godlewski E. jun: Anz. Akad. Wiss. Krakau 1904. — 3) Godlewski E.-Latinik I.: Bull. Acad. Pol. Scien. 1930. — 4) Goldstein: Arch. f. Entw. Mech. Bd. 18, 1904. — 5) Hamburger V.: Biol. Z. Bl. Bd. 45, 1925. — 6) Kabak: Trans. Dyn. of Develop. Moskow 1931. — 7) Lauber: Bruns Beiträge 1933. — 8) Rubin: Arch. f. Entw. Mech. Bd. 16, 1903. — 9) Romeis: Roux Arch. 1913. — 10) Schotté O.: C. r. Soc. Phys. Hist. Nat. Genev. Bd. 43, 1926. — 11) Uhlenhuth E.: Jour. of. Gen. Physiol. v. 1922. — 12) Walter: Arch. f. Entw. Mech. Bd. 33, 1912. — 13) Weiss P.: Arch. f. Entw. Mech. Bd. 104, 1925.
-

Table des matières par noms d'auteurs

contenues dans le Bulletin International de l'Académie Polonaise des Sciences et des Lettres
(Classe des Sciences Mathématiques et Naturelles, Série B: Sciences Naturelles (II)).

Année 1939.

Le nombre inscrit à la suite de chaque Mémoire indique la page.

- Beaupré (J).** Der Einfluß der Kastrierung auf die Regeneration bei den Amphibien 469.
- Biborski (J).** Zum feineren Bau des Sinus venosus und zur Topographie seiner Ganglien beim Dorsch (*Gadus callarias* L., syn.: *G. morhua* L.) (Planches 25—26) 279.
- Borysowicz (G).** Vergleichende zytoarchitektonische Untersuchungen des äußeren Kniehöckers (*Corpus geniculatum externum*) bei einigen Säugetieren (Planches 3—10) 99.
- Bursa (A) und Wojtusiak (R. J).** Untersuchungen über die Bodenflora der Danziger Bucht unter Anwendung eines Taucherhelms (Planche 2) 61.
- Bursa (A) v. Wojtusiak (H. u. R. J).**
- Chowaniec (St).** Über die Blutgefäße der Darmwand von *Myxine glutinosa* L. (Planche 27) 297.
- Friedberg (W).** Versuche einer Stratigraphie des Miozäns von Polen auf Grund seiner Molluskenfauna. II. Teil 19.
- Gallera (J).** Etudes sur les polygénèses embryonnaires (Planches 11—18) 175.
- Głowiczower (H) v. Zweibaum (J).**
- Horak (A).** L'influence de l'ablation et de la greffe de l'hypophyse sur la régénération de la queue chez l'Axolotl (*Ambystoma mexicanum*) 499.
- Konopacka (B).** La formation de la symétrie bipolaire dans les oeufs de certains poissons osseux (*Gobius paganellus*, *Crenilabrus pavo*, *Smaris alcedo* et *Atherina hepsetus*) (Planche 29) 341.
- Kowarzyk (H).** Einige Beiträge zur Frage der Kernplasma-Verhältnisse bei malignen Tumoren 437.
- Kozłowski (A).** Untersuchungen an den in Furchung begriffenen Sommer-eiern der Aphiden (Planche 1) 31.
- Menschik (Z).** L'influence de basses températures (jusqu'à -20° C) sur les spermatozoïdes de la grenouille (*Rana temporaria*) (Planche 33) 405.
- Pautsch (F).** Einfluß der Exstirpation von Nervenrohr und Chorda auf die Entwicklung des Kaulquappenschwanzes (Planches 23—24) 255.
- Ramult (M).** On certain properties of the eggs of the shipworm *Teredo norvegica* 205.
- Rogosiński (F).** La chlorophylle dans la digestion des larves de certains Lépidoptères 1.
- La chlorophylle et les caroténoïdes chez quelques algues marines 11.
 - La chlorophylle dans la digestion humaine 121.
 - Sur les transformations de la chlorophylle dans le chyme neutralisé 127.

- Skowron (S).** Untersuchungen über das endokrine System des Igels (*Erinaeus*). III. Einfluß des Testosteronpropionats auf den Hoden 315.
- Śliżyńska (H).** Deficiency for facet in combination with translocation between sex chromosome and the right limb of the third chromosome in *Drosophila melanogaster* (Planches 28) 321.
- Stach (J).** Über *Trigoniophthalmus alternatus* (Silv.), ein tertiäres Element in der europäischen Fauna und über eine neue Art aus derselben Gattung (Planches 19—22) 231.
- Świenty (W).** Die Blutgefäße der Bauchflossen mancher Teleosteer (*Salmo, Barbus*) 51.
- Szarski (H).** Heat Resistance of Chicken Embryo Tissues *in vitro* 351.
- Wiciński (Z).** Miniaturorgane bei den Regenerationsprozessen (Planche 30) 361.
- Wojtusiak (R. J) v. Bursa (A).**
- Wojtusiak (H. u. R. J) und Bursa (A).** Quantitative Untersuchungen über die Fauna und Flora der Hafenfähle an der polnischen Ostseeküste 137.
- Zajaczek (S).** Untersuchungen über das endokrine System des Igels (*Erinaeus*). II. Histologische Veränderungen in den Eierstöcken und dem Uterus, die periodisch oder unter dem Einfluß von endokrinen Reizen auftreten (Planches 31—32) 379.
- Zweibaum (J) et Glowiczower (H).** Sur la coloration vitale des cellules cultivées in vitro irradiées par les rayons X 307.
-

BULLETIN INTERNATIONAL
DE L'ACADÉMIE POLONAISE DES SCIENCES
ET DES LETTRES

CLASSE DES SCIENCES MATHÉMATIQUES ET NATURELLES

SÉRIE B: SCIENCES NATURELLES

DERNIERS MÉMOIRES PARUS

N° 1-4 B II, 1939.

- Borysowicz G.** Vergleichende zytoarchitektonische Untersuchungen des äußeren Kniehockers (*Corpus geniculatum externum*) bei einigen Säugetieren (Planches 3-10)
- Bursa A., Wojtusiak H. und R. J.** Untersuchungen über die Bodenfauna und Bodenflora der Danziger Bucht unter Anwendung eines Taucherhelms (Planche 2).
- Friedberg W.** Versuche einer Stratigraphie des Miozäns von Polen auf Grund seiner Molluskenfauna. II. Teil.
- Kozłowski A.** Untersuchungen an den in Furchung begriffenen Sommeriern der Aphiden (Planche 1).
- Rogoziński F.** La chlorophylle dans la digestion des larves de certains Lépidoptères.
— La chlorophylle et les caroténoïdes chez quelques algues marines.
— La chlorophylle dans la digestion humaine.
— Sur les transformations de la chlorophylle dans le chyme neutralisé.
- Świenty W.** Die Blutgefäße der Bauchflossen mancher Teleosteer (*Salmo Barbus*).
- Wojtusiak H. und R. J. und Bursa A.** Quantitative Untersuchungen über die Fauna und Flora der Hafenpfähle an der polnischen Ostseeküste.

N° 5-6 B II, 1939.

- Biborski J.** Zum feineren Bau des Sinus venosus und zur Topographie seiner Ganglien beim Dorsch (*Gadus callarias* L., syn *G. morrhua* L.) (Planches 25-26).
- Chowaniec St.** Über die Blutgefäße der Darmwand von *Myxine glutinosa* L. (Planche 27).
- Gallera J.** Etudes sur les polygénèses embryonnaires (Planches 11-18).
- Konopacka B.** La formation de la symétrie bipolaire dans les oeufs de certains poissons osseux (*Gobius paganellus*, *Crenilabrus pavo*, *Smaris alcedo* et *Atherina hepsetus*) (Planche 29).
- Pautsch F.** Einfluß der Exstirpation von Nervenrohr und Chorda auf die Entwicklung des Kaulquappenschwanzes (Planches 23-24).
- Ramułt M.** On certain properties of the eggs of the shipworm *Teredo norvegica*.
- Skowron S.** Untersuchungen über das endokrine System des Igels (*Erinaceus*). III. Einfluß des Testosteronpropionats auf den Hoden.
- Stach J.** Über *Trigoniophthalmus alternatus* (Silv.), ein tertiäres Element in der europäischen Fauna und über eine neue Art aus derselben Gattung (Planches 19-22).
- Zweibaum J. et Glowiczower H.** Sur la coloration vitale des cellules cultivées *in vitro* irradiées par les rayons X.
- Śliżyńska H.** Deficiency for facet in combination with translocation between sex chromosome and the right limb of the third chromosome in *Drosophila melanogaster* (Planche 28).

TABLE DES MATIÈRES.

Juillet—Décembre 1939.

| | Page |
|---|------|
| H. SZARSKI. Heat Resistance of Chicken Embryo Tissues <i>in vitro</i> | 351 |
| Z. WICIŃSKI. Miniaturorgane bei den Regenerationsprozessen (Planche 30) | 361 |
| S. ZAJĄCZEK. Untersuchungen über das endokrine System des Igels (<i>Erinaceus</i>). II. Histologische Veränderungen in den Eierstöcken und dem Uterus, die periodisch oder unter dem Einfluß von endokrinen Reizen auftreten (Planches 31—32) | 379 |
| Z. MENSCHIK. L'influence de basses températures (jusqu'à -20° C) sur les spermatozoïdes de la grenouille (<i>Rana temporaria</i>) (Planche 33) | 405 |
| H. KOWARZYK. Einige Beiträge zur Frage der Kernplasma-Verhältnisse bei malignen Tumoren | 437 |
| J. BEAUPRÉ. Der Einfluß der Kastrierung auf die Regeneration bei den Amphibien | 469 |
| A. HORAK. L'influence de l'ablation et de la greffe de l'hypophyse sur la régénération de la queue chez l'Axolotl (<i>Ambystoma mexicanum</i>) | 499 |

Le «*Bulletin International*» de l'Académie Polonaise des Sciences et des Lettres (Classe des Sciences Mathématiques et Naturelles) paraît en deux séries. La première (A) est consacrée aux travaux sur les Mathématiques, l'Astronomie, la Physique, la Chimie, la Minéralogie, la Géologie etc. La seconde série (B) se divise en deux sous-séries; l'une d'elles »I« contient les mémoires qui se rapportent aux diverses branches de la Botanique (la Systématique, l'Anatomie et la Physiologie des Plantes), l'autre »II« est réservée aux publications qui concernent le vaste domaine des recherches morphologiques et physiologiques sur l'homme et les animaux (Anatomie, Biologie générale, Embryologie, Histologie, Physiologie, Psychologie, Zoologie systématique et expérimentale).

Depuis 1928, le «*Bulletin International*» ne contient que les communications dont l'étendue ne dépasse pas une limite strictement définie; les mémoires de plus vaste envergure sont réunis en un Recueil différent, les «*Mémoires*» de l'Académie Polonaise des Sciences et des Lettres (Classe des Sciences Mathématiques et Naturelles). Les *Mémoires* sont également publiés en deux séries: A et B. Chaque mémoire publié dans les *Mémoires* se vend séparément.

Les abonnements relatifs au «*Bulletin International*» sont annuels et partent de Janvier. Les livraisons de ce Recueil se vendent aussi séparément.

Adresser les demandes à l'Académie ou à la Librairie „Gebethner et Wolff“ Rynek Gł., Cracovie (Pologne).