

MEDYCYNĄ DOŚWIADCZALNĄ I SPOŁECZNĄ

(Dawniej Przegląd Epidemiologiczny).

TOM XXII

WARSZAWA 1937

ZESZYT 3-4

Wpłynęło 1.V.1936.

Zakład Farmakologii Doświadczalnej Uniwersytetu Józefa Piłsudskiego.
Kierownik: Prof. Dr. med. J. Modrakowski.

DZIAŁANIE ALKALOIDÓW GRZYBIENIA NA MYSZY „DECEREBROWANE”.

Podąa

MARIA RYSZKOWSKA

Badania nad wymóżdżaniem myszy rozpoczęłam w styczniu 1935 r. z polecenia p. prof. Dr *J. Modrakowskiego*.

Chodziło mianowicie o znalezienie czulego, dokładnego, a przy tym taniego preparatu biologicznego do badań farmakologicznych nad środkami działającymi na układ nerwowy. Zdawało się, że za taki preparat mogłaby służyć mysz decerebrowana wg. metody podanej przez *Jarischego* 7). Dla ścisłości zacytuję niemal dosłownie sposób operowania, jakim posługiwał się autor.

„W głębokim uśpieniu eterowym przeprowadzano cięcie w linii środkowej pomiędzy uszami. Rozpoznawano wówczas szew lambdowaty i zatokę strzałkową poprzez sklepienie czaszki; 1½ mm przed kątem szwu lambdowatego t. zn. w miejscu rozwidlania się zatoki przeprowadzono ostrym skalpelem cięcie ściśle frontalne, aż do podstawy czaszki i w ten sposób oddzielano międzymóżdże przed ciałami czworaczymi. Część zwierząt ginęła bezpośrednio po zabiegu wskutek porażenia oddechu, spowodowanego wzmożonym ciśnieniem wewnątrzczaszkowym (wg. autora)“. Dobrze jakoby robiło rozszerzenie rany pincetą natychmiast po cięciu. Krwawiła wówczas rana i następowało ewentualnie małe

wypadnięcie mózgu. Skrwawienia zwierzęcia nigdy nie obserwowano. Pozostałe przy życiu myszki były już najczęściej po 10 minutach łatwo pobudliwe i odpowiednie do doświadczeń. Badania nad dalszymi właściwościami decerebrowanych myszy z uwzględnieniem histologicznej kontroli miały być podane wspólnie z prof. *Gamperem* 7).

Mimo dokładnego przejrzenia piśmiennictwa zapowiedzianej pracy nie znalazłam. Celem upewnienia się napisałam dn. 20. II. 35 do prof. *Jarisha* w tej sprawie i otrzymałam odpowiedź dn. 23. II. 35, iż zapowiedziana praca z prof. *Gamperem* „z powodów zewnętrznych“ nie doszła do skutku.

Wobec tego rozpoczęłam własne badania nad wymóżdżonymi myszami metodą *Jarisha* 7), z uwzględnieniem kontroli histologicznej. Okazało się jednak już na wstępie, że metoda ta nie jest tak prosta, jakby się zdawało i że z różnych przyczyn, zwierząt ginie bardzo dużo, bo około 90%. Być może, że wzmożone ciśnienie wewnątrzczaszkowe oraz porażenie oddechu odgrywa najważniejszą rolę, nie jest jednak wyłączone znaczne uszkodzenie zarówno mózgu, jak podstawy czaszki, a nawet skrwawienie się zwierzęcia, jakkolwiek prof. *Jarisch* 7) tego nigdy nie stwierdził.

Starając się opanować trudności zmodyfikowałam częściowo metodę. Chodziło o uzyskanie myszek pozbawionych półkul mózgowych, ale zdolnych do życia i nadających się do doświadczeń nie tylko w 10 minut po zabiegu, ale przez znacznie dłuższy okres czasu, to znaczy po zagojeniu się rany i przejściu zarówno wstrząsu pooperacyjnego, jak i ew. diaszizy¹⁾.

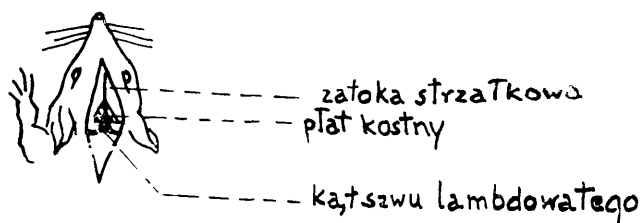
Innej metody decerebracji myszy w piśmiennictwie nie znalazłam. Przystąpiłam więc do badań zmieniając metodę *Jarisha* w sposób następujący.

M e t o d y k a .

Do doświadczeń brałam myszy dobrze odżywione, o wadze 20—30 gr., czarno-białe, szare lub białe, samce, z hodowli prof. *Kopcia*. Zabieg starałam się wykonać w warunkach aseptycznych, pod narkozą eterową. Skórę na grzbietowej powierzchni łebka goliłam na

¹⁾ Przez diaszizę rozumiemy zjawisko, polegające na zmianie czynności neuronów, zależnej od braku bodźców normalnych z okolic uszkodzonych.

znacznej przestrzeni, i jodynowałam w miejscu odpowiadającym następowemu cięciu skórному. Wszystkie narzędzia operacyjne przed zabiegiem sterylizowałam przez gotowanie w przeciągu 20 m. Po wykonaniu cięcia skórnegо na grzbiecie łebka między uszami w linii środkowej na przestrzeni $1\frac{1}{2}$ — 2 cm, rozchylałam brzegi rany, by się dokładnie zorientować w punktach topograficznych sklepienia czaszki. Następnie dawałam 1 — 2 kropli koagulenu Ciba z ampułki na okolicę operowaną i ostrymi spiczastymi nożyczkami, trzymanymi jak najbardziej na płask, odcinałam płat trójkątny kości w pokrywie czaszki w odległości 1 — 2 mm od szwu lambdowatego. Rys. 1.



Rys. 1

Po zdjęciu płata kostnego na krwawiącą ranę dawałam ponownie parę kropli koagulenu i nożem bardzo cienkim, obosiecznym wykonywałam cięcie frontalne w mózgu tuż przy brzegu kostnym. Krwawienie przeważnie było dość obfite, szybko jednak opanowane dzięki wzmożonej krzepliwości krwi, spowodowanej koagulenem. Często również widoczne było wypadnięcie mózgu w ranie operacyjnej, nieznacznego jednak stopnia. Zabieg kończyłam zaszywając brzegi skóry 2 — 4 pojedynczymi szwami. Kilkakrotnie stosowałam wstrzykiwania dożylnе stężonego roztworu NaCl w celu wywołania odpęczenia mózgu, a tym samym ułatwienia zabiegu operacyjnego w jamie czaszkowej, jednakże bez wyraźnego skutku. Operowałam ogółem 150 myszek, z tego 30% padło w czasie, lub bezpośrednio po zabiegu, 35% żyło od 1 do 3 dni, 15% od 4 do 7 dni, 20 żyło dłużej — kilka tygodni, a nawet miesięcy. U myszy, które zginęły ze zmian anatomopatologicznych stwierdzałam obfite wylewy krwawe zarówno na sklepieniu czasz-

ki, jak i podstawie. Mózg miernie przekrwiony, lub zupełnie błądy, uszkodzony był na wysokości ciał czworaczych i wyżej, przy czym u myszek, które padały w czasie zabiegu — cięcie typowe sięgało najczęściej aż do podstawy czaszki.

Niekiedy jednak w obrazie sekeyjnym nie stwierdzałam nie szczególnego. Nie było wylewów krwawych. Cięcie frontalne w miejscu typowym nie dochodziło do podstawy, a mimo to mysz ginęła i to niejednokrotnie w czasie zabiegu. Być może, że w myśl *Jarischea* wzmożone ciśnienie wewnątrzczaszkowe lub wstrząs był bezpośrednią przyczyną śmierci.

Obserwacje myszek operowanych ujęłam protokularynie. Wszystkich jednak protokółów nie podaję, gdyż niemal u każdej myszki operowanej, pozostającej czas dłuższy przy życiu, pojawiały się te same objawy.

Z tego względu załączam tylko jeden protokół myszy operowanej Nr. 80.

Mysz ta czarno-biała, [↑]0, wagi 28 gr. Stan ogólny dobry.

Dn. 29.I.35 wykonano operację w sposób typowy, według *Jarischea*. Krwawienie z rany niezbyt obfite. W czasie zabiegu myszka oddycha powierzchownie, szybko, po zabiegu oddech wyraźnie zwolniony, regularny.

Budzi się w 40' po operacji. Nieznaczne zaburzenia równowagi. Myszka iakby senna, przeważnie siedzi. Odruchy wzmożone; na ucisk ogona, łapki odpowiada gwałtownym podskokiem.

30.I.35. Zaburzenia równowagi ustąpiły; myszka jest najbardziej ożywiona ze wszystkich operowanych, biega, chwytą prawidłowo kratę, często łapkami czyści pyszczek. Sama je niewiele, pije kroplę wypuszczoną z pipety.

1.II.35. Waga 25 gr. Doskonale pije z pipety, po czym starannie czyści łapkami pyszczek, gryzie suchą bułkę. Porusza się prawidłowo; odruchy wzmożone.

4.II.35. Stan myszki dobry. Ożywiona, sama je i pije.

6.II.35. Waga 27 gr. Rana pooperacyjna zagojona przez rychłozrost.

15.II.35. Waga bez zmiany. Ożywiona, ruchliwa, na bodźce zewnętrzne oddziałuje gwałtownie, choć z pewnym opóźnieniem. Położona na grzbiecie, brzuszkiem do góry, znosi tę pozycję po ostrożnym zdjęciu pincet, które ją uprzednio trzymały. Rys. 2.

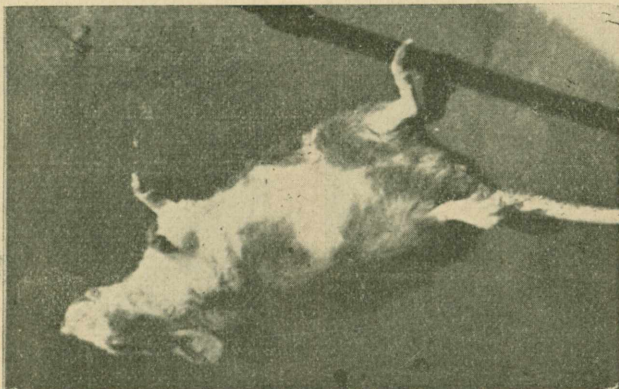
22.II.25. Waga 31 gr. Odżywia się i porusza prawidłowo. Grzbietową pozycję znosi, szybko jednak i zręcznie wraca do normalnej. Chwycona za ogon ucieka w przeciwnym kierunku, normalna myszka natomiast zwraca się w kierunku trzymającej ją pincety lub ręki. Podniesiona, zwisa biernie wyciągając łapki.

25.II.35. Waga 31 gr. Stan jak wyżej. Wyraźny tremor.

1.III.35. Waga 29 gr. Odruchy jakby osłabione, na ucisk łapki, ogona nie reaguje.

8.III.35. Waga bez zmiany. Stan dobry. Ożywiona biega po klatce. Na bodźce zewnętrzne odpowiada słabo.

25.III. 35. Waga 27 gr. W klatce siedzi spokojnie, na bodźce zewnętrzne, zwłaszcza dotykowe, oddziałuje początkowo słabo, w miarę jednak badania odruchy stają się coraz żywsze. Na ucisk ogona, łapki, odpowiada gwałtownym podskokiem.



Rys 2. Położenie grzbietowe myszy „decerebrowanej”.

15.IV.35. W klatce siedzi spokojnie. Odżywia się i porusza prawidłowo. Kończyny przednie i tylne przykurcza i przyciska do tułowia po zawieszeniu jej w powietrzu i lekkim podrażnieniu brzuszka szpilką. Rys. 3. Po badaniu wyraźny tremor.

20 V.35. Wykonano zdjęcia fotograficzne.

23.V.35. Waga 31 gr. Je, chodzi prawidłowo. W klatce siedzi spokojnie. Pozycji grzbietowej nie znosi.

30.V.35. Waga 20 gr. Odruchy wyraźnie wzmożone wskutek badania. Pozycję grzbietową znosi, szybko jednak wraca do położenia prawidłowego. Przykurcz łapek typowy i długotrwały po zawieszeniu myszy i lekkim podrażnieniu brzuszka. Zbliżona w tej pozycji do talerza wagi, lub kraty nie wykonuje żadnego ruchu, nie chwyta przedmiotu. W terenie kieruje się jakby tylko dotykiem.

31.V.35. Zabito myszkę do badań histologicznych. Mózg wyjęto natychmiast i utrwalono w 10% formalinie.

Tak więc u myszek, które dobrze zniosły operację i żyły po niej czas dłuższy, stwierdziłam bezpośrednio po zabiegu wybitne

wzmoczenie pobudliwości zwłaszcza dotykowej. Myszy te nawet na słaby dotyk łapki, ożona, podmuch sierści, oddziaływały gwałtownym podskokiem, a następnie szybkim bieganiem na nadmiernie wyprostowanych nóżkach. Jeżeli znajdowały się wówczas na brzegu stołu, lub talerza wagi, skok odbywał się w przestrzeń bez orientacji i omijania przeszkód. Okres tej znacznie wzmożonej pobudliwości utrzymywał się przez kilka dni po zabiegu, następnie



Rys. 3. Myszka „decerebrowana” zawieszona w powietrzu przyciąga i przywodzi kończyny do tułowia.



Rys. 4. Myszka normalna, zawieszona na pincecie, wyciąga kończyny broni się.

wrażliwość na bodźce zewnętrzne zmniejszała się, naogół jednak pozostawała większa niż u myszek normalnych. Niekiedy stwierdzało się okresami osłabioną pobudliwość zwłaszcza u myszek oswojonych, zawsze jednak w tych przypadkach pobudliwość wyraźnie wzmagala się na skutek drażnienia zwierzęcia przez badanie. Często już w okresie wzmożonej pobudliwości udawało się położyć myszkę na grzbiecie, brzuszkiem do góry. Pozycję tę znosiła spokojnie, dopóki jej nie podrażnił jakiś bodziec zewnętrzny,

zwłaszcza dotykowy. Zrywała się wówczas gwałtownie, i zręcznie korygując położenie wracała do normalnej pozycji. Trzeba zaznaczyć, że mysz normalna z natury bardzo ruchliwa żadną miarą nie pozwala się ułożyć na grzbiecie, zawsze się broni i uwolniona z pincety ucieka. W pewien czas po decerebracji zjawiał się jeszcze jeden objaw: myszy operowane, zawieszone w powietrzu po lekkim podrażnieniu powłok brzusznych, a niekiedy samorzutnie kurczyły i przywodziły kończyny do tułowia. Zbliżone wówczas do jakiegoś przedmiotu nie chwytaly go, jak myszy normalne. Zawieszone na ogonie zwiślały naogół biernie, nie broniąc się. Niekiedy u myszy operowanych pojawiała się drżenie, nasilające się w miarę drażnienia zwierzęcia. Poza tym myszy te odżywiały się i poruszały prawidłowo.

Nigdy nie stwierdzałam u myszy, które żyły czas dłuższy po zabiegu, utrzymujących się porażen, niedowładu, czy większych zaburzeń w koordynacji ruchów. Jeżeli nawet bezpośrednio po zabiegu pojawiło się porażenie i przykurcz jakiejś kończyny, to zawsze ustępowało ono w krótkim czasie.

Po przeprowadzeniu ścisłej obserwacji myszek operowanych, wykonałam badania histologiczne mózgów tych myszek celem ustalenia miejsca i jakości uszkodzenia.

Ogółem zbadałam 7 mózgów, myszek pozostających czas dłuższy przy życiu.

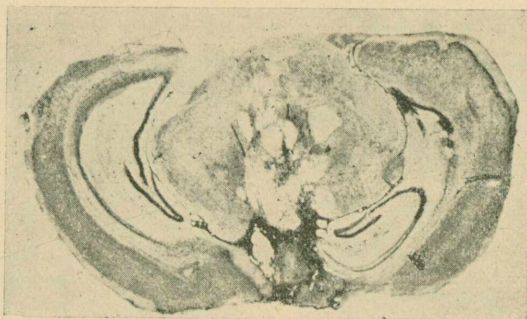
Metodyka.

Świeżo wyjęte mózgi utrzymywałam w 96% alkoholu, płynie Müllera lub 10% formalinie, następnie zatapiałam w celloidynie i wykonywałam cięcia seryjne, frontalne każdego mózgu po 15—30 μ . Co 10-ty skrawek, a w miejscu widocznego uszkodzenia, każy barwiłam metodą Nissla lub Pal-Weigerta oraz hematoksyliną i eozyną zależnie od utrwalenia materiału. Miejsce uszkodzenia określałam przy pomocy atlasów M. Rosego (15 — 16) oraz C. Winklera i A. Pottera 22). Niestety nie mogłam znaleźć atlasu całego ośrodkowego układu nerwowego myszy. Atlas M. Rosego 15) uwzględnia tylko cytoarchitektonikę mózgu myszy, resztę więc musiałam dopełnić przez porównanie z układem nerwowym ośrodkowym królika, który jest obszerniej opracowany.

Badania histologiczne stwierdziły, że uszkodzenia mózgu operowanych myszek są bardzo rozległe i różnorodne.

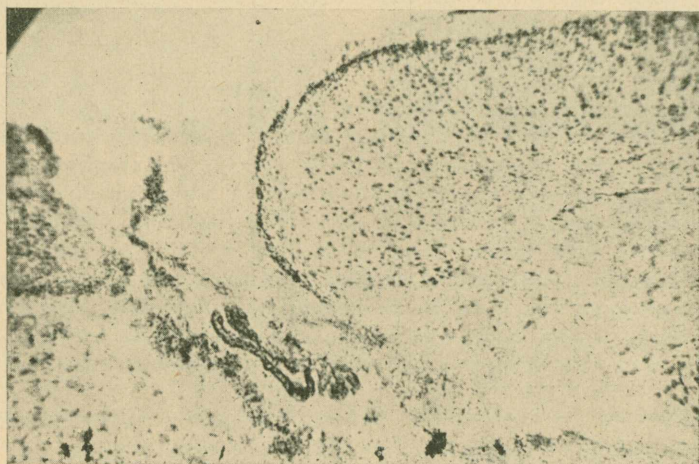
Rana operacyjna najczęściej na poziomie tablic 15 — 16 — 17 atlasu *M. Rosego*, uszkadza w linii środkowej area striata, peri-

striata, retrospleniales agranularis, granularis i drażąc klinowato wgląb do jąder podstawy, niszczy najczęściej także epithalamus i thalamus. Niekiedy znowu cięcie widocznie zbaczając, uszkadza wyłącznie jedną półkulę nie naruszając drugiej oraz jąder podstawy.



Rys. 5. Mysz Nr 24. Skrawek 240, barwiony metodą Nissla. Pow. lup. 1:10.

Oprócz uszkodzenia operacyjnego stwierdza się w każdym niemal mózgu znaczne rozszerzenie naczyń, wylewy krwawe i nacieki drobnokomórkowe. Szereg zdjęć zarówno miejsca uszkodze-



Rys. 6. Mysz Nr 20. Skrawek 235, barwiony metodą Nissla. Zeiss. Pow. Obiek. 3. Okul. 2.

nia, jak i zmian wtórnych ilustruje wyniki badań histologicznych (Rys. 5 — 9).

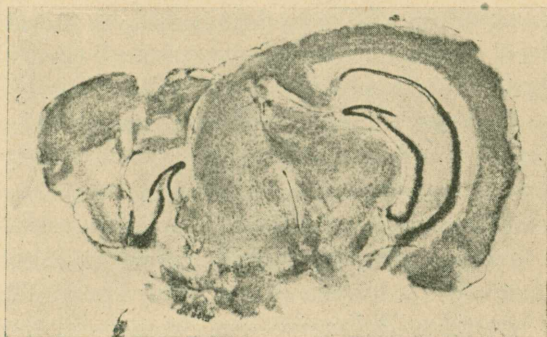
Badanie drobnowidzowe skrawka 240 myszy Nr 24 stwierdza:

Cięcie frontalne skośne, idące po stronie lewej więcej ku przodowi. Ubytek kory mózgowej area retrosplenialis i agranularis. Struktura między obu



Rys. 7. Mysz Nr 90. Skrawek 308, barwiony metodą Nissla.
Zeiss. Obiek. 3. Okul. 2.

formacjami Ammona całkowicie zniszczona przez nacisk. W jądrach podstawy b. liczne wylewy krwawe. Rys. 5.



Rys. 8. Mysz Nr 30. Skrawek 237, barwiony metodą Nissla. Pow. lupowe 1:10

Na skrawku 235 myszy Nr 20 stwierdza się ubytek i bliźnę idącą przez area retrosplenialis granularis, agranularis i peristriata, drążącą wgłąb, skośnie w kierunku subiculum i thalamus po stronie prawej, poza tym liczne nacieki drobnokomórkowe. Rys. 6.

Skrawek 308. Myszy Nr 90:

Liczne nacieki drobnokomórkowe w obrębie bliźny na granicy kory mózgowej i wzgórza. Rys. 7.

Na skrawku 237, myszy Nr. 30 widzimy:

Lewa półkula jest niemal całkowicie zniszczona. Liczne bliźny, zaciągnięcia powodują zniszczenie całej formacji Ammona, zostawiając tylko resztki blaszki komórkowej. Zniszczone regio periamgdalaris, entorhinalis, perirhinalis i ectorhinalis po stronie lewej. Jądra podstawy częściowo zdeformowane, usiane dość licznymi naciekami. Rys. 8.

Streszczając wyniki badań histologicznych muszę stwierdzić, że zabieg podany przez *Jarisch*a jest uszkodzeniem mózgu najczęściej powyżej ciał czworaczych, przy czym u myszek, które żyły czas dłuższy, cięcie prawie nigdy nie sięga podstawy mózgu i nie jest decerebracją w sensie ścisłym.

Cięciem typowym uszkadza się mózg w różnym stopniu i na różnej wysokości powyżej ciał czworaczych, ale nigdy nie oddziela się półkul mózgowych od pnia mózgowego na wysokości ustalonej przez *Magnusa* 9). Jeżeli nawet zdołano zniszczyć mózg, sięgając niemal podstawy jego, to nigdy nie było pewności, co właściwie i w jakiej mierze usunięto podczas zabiegu, i całkowite wymóżdżenie było raczej szczęśliwym wypadkiem. W badanych mózgach prócz uszkodzenia operacyjnego stwierdzałam zmiany wtórne w postaci bliźn, znacznych wylewów krwawych, nacieków drobnokomórkowych, a nawet ropni. Ciekawą jest rzeczą, że mimo tak różnorodnych uszkodzeń mózgu, niemal wszystkie myszki operowane, które żyły czas dłuższy po zabiegu, zachowały się podobnie, wykazując opisane wyżej objawy. Być może, że w dużej mierze przyczyniły się do tego wtórne zmiany które uszkadzały mózg, pogłębiając niejako cięcie operacyjne. Podkreślić należy że myszy operowane, na skutek wyżej opisanych objawów stawały się podobne do normalnych myszy, będących pod wpływem alkaloidów - grzybienia A i B, wyodrębnionych i opisanych przez *Modrakowskiego* 12) (Bull. de l'Ac. Polonaise des Sciences et des Lettres 1933 201, 1934 365, 1935 539 i 1936) oraz *Bulajewskiego*.

Alkaloidy te posiadają bardzo charakterystyczne działanie farmakologiczne. Autor badał alkaloidy grzybienia najpierw na zabach, myszach, szczurach, świnkach morskich i ptakach, a następnie na królikach, kotach i psach. Myszy służyły przede wszystkim jako bardzo czuły preparat biologiczny przy wyodrębnianiu alkaloidów i wyciągów roślinnych. Małe dawki alkaloidów grzybienia wywołują uspokojenie myszy przy wzmożonej wrażliwości zwłaszcza dotykowej. Po 0,01 gr/kg zjawia się wyraźny wpływ hamujący na półkule mózgowe, a po większych zaś dawkach wzrasta jedynie natężenie i długość działania alkaloidu. Działanie zaczyna się w parę minut po podskórnym wstrzyknięciu podnieceniem zwierzęcia. Pobudliwość odruchowa wzmacnia się szczególnie na bodźce dotykowe. Myszy podrażnione biegają szybko z uniesionym tyłem i wykonują potężne skoki na przedmioty, które im zagradzają drogę lub bez wyznaczonego celu. Powoli zjawia się okres zahamowania psychicznego z zanikiem ruchów samoistnych. Przy tym nadwrażliwość dotykowa trwa dalej, podczas gdy wrażliwość na ból wyraźnie znika. Wówczas znoszą myszy położenie na grzbiecie, lub boku zapadając w półsen, przez sekundy, a nawet minuty. Bodźce dotykowe choćby najłżejsze budzą zwierzęta. Korygują wówczas natychmiast nienaturalne położenie i uciekają. Położenie grzbietowe udaje się często wywołać już w okresie podniecenia, co jest szczególnie charakterystyczne. W dalszym przebiegu działania alkaloidów grzybienia zdarza się jeszcze następny objaw, który zależnie od dawki pojawia się w pół godziny, a często dopiero na drugi dzień i utrzymuje niekiedy tygodniami. Jest to mianowicie przykurcz wszystkich kończyn często i ogona do tyłowia po zawieszeniu myszy za kark w powietrzu. Mogą one utrzymać długi czas tę pozycję, a zbliżone do jakiejś podstawy nie starają się jej chwycić jak myszy normalne. Jeżeli ilość alkaloidu była bardzo duża, pojawiają się w dalszym ciągu zaburzenia koordynacji ruchów i paretyczne objawy zwłaszcza kończyn tylnych. Ruchy stają się coraz ociężalsze aż w końcu myszy oddziałują tylko na bardzo silne bodźce. Przy tym pojawia się drżenie zamiarowe, które może zwiększać się aż do tęcza. W tym wypadku zwykle następuje śmierć przez porażenie oddechu.

Z kolei przystąpiłam do badania wpływu alkaloidów grzybienia A i B na myszy „decerebrowane”. Zachowanie ich, jak już wspomniano, wykazuje pewne podobieństwo do objawów występujących pod wpływem wymienionych alkaloidów u myszek nieoperowanych. Jako wspólne objawy stwierdza się:

1. podniecenie
2. nadpobudliwość zwłaszcza dotykową
3. znoszenie pozycji grzbietowej
4. przykurcz i przywiedzenie kończyn po zawieszeniu myszy.

Metodyka.

Stosowałam 0,5% roztwór alkaloidów grzybienia A i B wstrzykując podskórnie dawki od 0,005 do 0,1 gr na kg wagi zwierzęcia. Do tych doświadczeń posługiwałam się myszkami operowanymi, które żyły po zabiegu czas dłuższy, i wykazywały objawy wyżej opisane przy dobrym stanie ogólnym. Równocześnie zawsze tę samą dawkę dla kontroli stosowałam myszy normalnej, nieoperowanej. Obserwacja zwierząt trwała aż do całkowitego ustąpienia działania alkaloidu, ewentualnie śmierci zwierzęcia.

Zachowanie się myszy operowanych pod wpływem alkaloidów grzybienia było podobne do myszy normalnych, lecz objawy opisane przez *Modrakowskiego* 12), a częściowo zaobserwowane już przed wprowadzeniem alkaloidu (wzmóŜona pobudliwość, skoki, pozycja grzbietowa i t. d.) występowały po dawkach najmniejszych alkaloidu znacznie silniej niŜ u myszy nieoperowanych. Tak więc dawka 0.005 gr/kg. wagi u myszy normalnej daje niewielkie wzmóŜenie pobudliwości, zwłaszcza dotykowej, a następnie nieznaczne uspokojenie, u myszy operowanych wywołuje wyraźne pobudzenie, wzmóŜenie odruchów, a następnie uspokojenie, utrzymujące się czas dłuższy. Jeden protokół z doświadczeń da nam obraz zachowania się operowanego zwierzęcia po wprowadzeniu alkaloidu — grzybienia.

↑
Mysz 140, szara, ♀, wagi 21 gr, operowana 10.X.35 r. Stan i zachowanie się po zabiegu podobny jak myszy Nr 80, której protokół zamieściłam wyŜej. Opuszczam więc obserwacje od dn. 10.X.35, a podaję wyłącznie z okresu działania alkaloidu.

17.III.36 r. Waga 19 gr. Stan dobry; w klatce siedzi spokojnie, je, chodzi prawidłowo. Odruchy wzmóŜone. Pozycję grzbietową znosi, szybko jednak

i zgręcznie wraca do normalnej. Zawieszona w powietrzu, kończyny przednie i tylne kurczy i przywodzi do tułowia samoistnie. Godz. 13.05: Wprowadzono podskórnie roztwór alkaloidu B, otrzymany z kwiatów *Nymph. albae* w dawce 0,005 gr/kg. Godz. 13.15. Myszka ożywiona, biega po klatce, na bodźce dotykowe: ucisk ogona, nawet podmuch sierści oddziałują żywo, gwałtownym podskokiem i szybkim bieganiem, natomiast na bodźce słuchowe słabo. Położenie grzbietowe, przykurcz łapek jak wyżej. Godz. 13.30. Zachowanie się myszki jakby nieco spokojniejsze, po zadziałaniu bodźca dotykowego skacze, ale mniej biega, poza tym stan bez zmian.

Godz. 13.45. W klatce siedzi spokojnie, w półśnie, z przymkniętymi oczami. Odruchy wzmożone, na ucisk łapki, ogona odpowiada pojedynczym niezbyt gwałtownym podskokiem, nie biega, na bodźce słuchowe nie oddziałuje wcale.

Godz. 14. Stan jak wyżej.

Godz. 18. Myszka robi wrażenie normalnej, gryzie zboże. Pobudliwość jak przed wprowadzeniem alkaloidu. Położenie grzbietowe znosi dobrze. Przykurcz łapek pojawia się po lekkim drażnieniu szpilką powłok brzusznych.

18.III.36 r. Godz. 13. Zachowanie się myszki w klatce nie różni się od zachowania myszek normalnych, gryzie owies. Chodzi prawidłowo. Pobudliwość zwłaszcza na ból obniżona. Pozycję grzbietową znosi dobrze; przykurcz i przywiedzenie kończyn występuje po drażnieniu brzuszka i utrzymuje się dość długo.

19.III.36 r. Zachowanie się i stan jak dn. 17.III.36 r. przed wprowadzeniem alkaloidu.

Mysz kontrolna, normalna, po takiej samej dawce, zastosowanej w tym samym czasie wykazała tylko znaczne ożywienie i silniejszą reakcję na bodźce dotykowe w przeciagu, 30', po tym czasie zachowanie jej było zupełnie normalne. Odruchy były niewzmoczone, pozycji grzbietowej ani przykurczu łapek w dniu doświadczenia, ani następnym wywołać nie było można.

W miarę zwiększania się dawek alkaloidów oddziaływanie myszek było coraz wybitniejsze. Okres podniecenia objawiał się znacznym niepokojem, bieganiem na kończynach nadmiernie wyprostowanych i skokami w przestrzeń po zadziałaniu słabego nawet bodźca, a niekiedy bez uchwytnej przyczyny. Po okresie pobudzenia, trwającym 30 — 45', pojawiała się pewne zahamowanie psychiczne, uspokojenie jakby senność, trwająca kilka, a nawet kilkanaście godzin, zależnie od dawki. Pozycję grzbietową udawało się niekiedy wywołać już w okresie podniecenia u myszy normalnych, łatwo natomiast w okresie uspokojenia, zwłaszcza u myszy operowanych. Przykurcz łapek, po zawieszeniu myszy w powietrzu,

pojawiał się zwykle później, najczęściej w drugim dniu obserwacji. Powrót do stanu prawidłowego u myszek normalnych po dawce 0.01 — 0.05 gr/kg. występował po 24 — 48 godzinach, natomiast u myszek operowanych zwykle po 48 godzinach, to znaczy w ciągu trzeciej doby.

Dawki 0.05 — 0.08 gr/kg. dawały coraz krótszą ekscytację, natomiast uspokojenie, senność trwające około 36 godzin. Większe dawki wywoływały uspokojenie po kilku minutach bez uprzedniego pobudzenia. Myszkі zarówno operowane, jak kontrolne, robiły wrażenie śpiących. Obudzone chodziły prawidłowo, ale niewiele i zasypiały po kilku krokach, lub nad gryzionym ziarnem zboża. Odruchy były wówczas osłabione, reakcja na bodźce dotykowe i ból słaba. Na bodźce słuchowe, wzrokowe nie oddziaływały prawie wcale. Senność po 24 godzinach stawała się coraz mniejsza, ale powrót do normy występował dopiero po paru dniach. Niekiedy pojawiała się drżenie zamiarowe, zwłaszcza po dawkach śmiertelnych. Jeżeli roztwór alkaloidów świeżo przyrządzony, był natychmiast wprowadzony myszom w dawce 0.1 gr/kg. wywoływał on przeważnie śmierć po 2 — 3 dniach wśród objawów asfiktycznych i sinicy.

Działanie alkaloidów grzybienia A i B było naogół podobne, tylko B silniejsze w sensie wywołania szybszego zahamowania psychicznego i wyraźniejszego uspokojenia, co się zgadza z badaniami *Modrakowskiego*.

Z doświadczeń powyższych okazało się, że myszy decerebrowane są znacznie wrażliwsze na alkaloidy grzybienia niż normalne, gdyż połowa, a niekiedy trzecia część dawki działającej dla myszy normalnej wywoływała już bardzo charakterystyczne objawy u myszy operowanej.

Zjawisko takiej zwiększonej wrażliwości zaobserwowano już niejednokrotnie przy badaniu innych środków farmakologicznych. Zwierzęta dekortikowane lub decerebrowane oddziaływują na znacznie mniejsze dawki niż zwierzęta normalne.

Pierwszy podał *Morita* (13), że króliki pozbawione kory mózgowej oddziałują na tak małe dawki narkotyków, które u normalnych zwierząt nie wywierają żadnego widocznego działania. Dawki natomiast działające tylko lekko narkotyzująco na króliki

normalne, dają u zwierząt pozbawionych półkul mózgowych wyraźne i długo utrzymującą się narkozę.

Yamawaki 23), potwierdził to w doświadczeniach na pozbawionych mózgu żabach z siarczanem magnezu, luminalem i skopolaminą. *Jöel* i *Arndts* 8) podają, że koty wzgórzowe oddziałują znieruchomieniem i kurezami na dawki morfiny, które u normalnego zwierzęcia wywoływały tylko niepokój. *Schoen* 18) wskazuje na podobne wyniki. Według *Essena* 2) pogłębienie narkozy, wywołanej uretanem, alkoholem etylowym, chlorkiem magnezu u żab bezmózgich wynosi 60%. *Mettler* 11) twierdzi na podstawie swoich doświadczeń na psach, że usunięcie kory mózgowej sprowadza stan wyraźnie wzmożonej wrażliwości na środki działające zarówno na układ nerwowy mózgowo - rdzeniowy, jak i wegetatywny. Myszy operowane, jak już zaznaczyłam, nie były pozbawione kory mózgowej w całości, ani wymóżdżone w sensie ścisłym, miały jednak uszkodzoną korę mózgową i jądra podstawy zarówno operacyjnie jak i przez zmiany wtórne na znacznej przestrzeni i dzięki temu w zachowaniu się jak i doświadczeniach przypominały bardzo zwierzęta wymóżdżone. Alkaloidy grzybienia A i B wywołują zmiany jednakowe u myszy operowanych i normalnych, tylko dawka działająca dla pierwszych jest o $\frac{1}{2}$ a nawet o $\frac{2}{3}$ mniejsza.

STRESZCZENIE.

Metoda decerebracji wg. *Jarische*a okazała się w toku doświadczeń bardzo niedokładną, przy czym skutek zabiegu ginęło 90% zwierząt.

Modyfikacja własna polegała na: wykonaniu operacji w warunkach aseptycznych oraz prowadzeniu cięcia mózgu nożem oboiecznym, pod kontrolą oka, po uprzednim zdjęciu pokryw czaszki.

Myszy, które zniosły operację i żyły po niej czas dłuższy zachowywały się naogół jednakowo wykazując ekscytację kilka godzin po zabiegu oraz stale wzmożoną pobudliwość zwłaszcza dotykową. Nawet na najłżejszy dotyk, podmuch sierści wykonywały one gwałtowne skoki w przestrzeń jakby bez orientacji, bez omijania przeszkód. Pomimo to myszy znosiły nadane im położenie grzbie-

towe. Zawieszone w powietrzu kureczyły i przywodziły kończyny do tułowia po lekkim podrażnieniu brzucha, a niekiedy samorzutnie. Poza tym odżywiały się i poruszały prawidłowo. Kontrolne badania drobnowidzowe wykazały, że operacyjne cięcie uszkadzało mózg na różnej wysokości powyżej ciał czworaczych; u myszy, które przeżyły zabieg operacyjny, cięcie prawie nigdy nie sięgało podstawy mózgu. Najczęściej uszkadzane były: area retrosplenialis granularis, agranularis, peristriata i striata oraz jądra podstawy epithalamus i thalamus w linii środkowej. We wszystkich badaniach drobnowidzowo mózgach niemal na całej przestrzeni stwierdzano zmiany wtórne w postaci licznych wylewów, nacieków drobnokomórkowych, a nawet ropni, które niejako pogłębiały cięcie operacyjne. Myszy operowane, które przeżyły zabieg dzięki temu zachowywały się jak wymóżdżone.

Na takich myszkach przeprowadzono badania nad działaniem alkaloidów grzybienia. Roztwór alkaloidu grzybienia A i B 0,5% stosowano w dawkach podskórnych od 0.005 do 1.0 gr/kg, jednocześnie operowanym i kontrolnym, normalnym myszom. W wyniku doświadczeń okazało się, że alkaloidy grzybienia działają na zwierzęta operowane podobnie jak na normalne, tylko dawka działająca jest mniejsza i wynosi 1/2 i 1/3 dawki dla myszy normalnej.

Typowe działanie alkaloidu zaczyna się pobudzeniem, z wyraźnym wzmożeniem pobudliwości zwłaszcza dotykowej, a następnie pojawia się pewne zahamowanie psychiczne, uspokojenie, senność zmagająca się w miarę wzrostu dawki alkaloidu. Okres pobudzenia po alkaloidach grzybienia pojawia się u myszy operowanych gwałtowniej i trwa dłużej niż u normalnych. Uspokojenie jest również wyraźniejsze i dłuższe. Położenie grzbietowe oraz przykucie i przywiedzenie kończyn do tułowia po zawieszeniu myszy w powietrzu występuje jednakowo u myszy operowanych, jak i normalnych. Działanie alkaloidów grzybienia A i B było podobne, tylko B silniejsze, szybciej występowało po nim pewne zahamowanie i uspokojenie.

Wielce Szanownemu Panu Profesorowi Dr. med. *Jerzemu Modrakowskiemu* składam najserdeczniejsze podziękowanie za

wyznaczenie mi tematu, kierownictwo i kontrolę w badaniach, za cenne wskazówki i rady, oraz całą życzliwość, z jaką odnosił się do mej pracy. Równocześnie dziękuję bardzo Wielce Szanownemu Panu Profesorowi Dr med. *Kazimierzowi Orzechowskiemu* za możliwość wykonania badań drobnowidzowych w Pracowni Histologicznej Kliniki Chorób Nerwowych U. J. P. Panom Docentom Dr. med. *Emilowi Leyko* i Dr. med. *Henrykowi Sikorskiemu* również gorąco dziękuję za wszystkie wskazówki oraz życzliwą pomoc.

Aus dem Institut für Experimentelle Pharmakologie der Universität J. Piłsudski
in Warschau. Leiter Prof. Dr. J. Modrakowski.

ÜBER DIE WIRKUNG DER AUS NYMPHAEA ALBA UND LUTEUM SOLIERTEN ALKALOIDE AN DECEREBRIERTEN MÄUSEN.

V o n

M. RYSZKOWSKA

ZUSAMMENFASSUNG.

Es wurde die Wirkung der aus *Nymphaea alba* und *luteum* isolierten Alkaloide an decerebrierten Mäusen untersucht.

Die Mäuse wurden nach Jarisch sowie nach eigener Modifikation enthirnt. Die Decerebration nach Jarisch erwies sich im Laufe der Versuche als unzuverlässig. Diese Methode überlebten nur 10% der Mäuse.

Die Enthirnung nach eigener Modifikation beruhte auf Entfernung des Schädeldaches und Hirnschnitt mit doppelschneidigem Messer unter Kontrolle des Auges. Das Verhalten der nach dieser Methode decerebrierten Mäuse war im allgemeinen das gleiche. Sie waren durch eine Reihe von Stunden nach dem Eingriff exzitiert und zeigten vor allem sehr erhöhte taktile Reflexerregbarkeit. Auf leiseste Berührung oder Anblasen führten die Mäuse heftige Sprünge ohne ersichtlichen Zweck aus. Hindernissen wichen sie dabei nicht aus. Trotzdem ertrugen sie Rückenlage. Am Nacken emporgehoben zogen die Mäuse bei

leichter Reizung der Bauchhaut — nicht selten von selbst — die Extremitäten an den Leib an. Im übrigen frassen und bewegten sich die Tiere normal.

Die histologische Untersuchung ergab, dass der Operationsschnitt verschiedene Hirnteile oberhalb der Vierhügel abtrennte. Bei den überlebenden Mäusen reichte der Schnitt nicht bis an die Hirnbasis. Meistens waren beiden überlebenden Tieren die Area retrosplenialis, granularis, agranularis, peristiata und striata sowie die Kerne der Hirnbasis: Epithalamus und Thalamus in der Mittellinie zerstört.

Alle histologisch untersuchten Hirne zeigten fast auf der ganzen Schnittfläche zahlreiche Blutergüsse, kleinzellige Infiltration, Entzündungs — und selbst Eiterherde, die die Schnittfläche gleichsam erweiterten. Infolgedessen verhielten sich die überlebenden Mäuse im grossen und ganzen wie hirnlose Tiere.

Die beiden Nymphaea-Alkaloide — A und B — wurden den decerebrierten und zum Vergleiche normalen Mäusen in Dosen von 0,005 — 1,0/kg. subkutan in 0,5% Lösung eingespritzt. Die decerebrierten Tiere reagierten ähnlich wie die normalen; nur war die wirksame Dosis bei ihnen kleiner und betrug $\frac{1}{2}$ — $\frac{1}{3}$ der auf normale Tiere wirkenden Gabe.

Die Alkaloide bewirkten anfangs Erregung mit stark vermehrter, besonders taktiler Reflexerregbarkeit, später trat psychische Hemmung, Beruhigung und mit der Grösse der Dosis zunehmende Schläfrigkeit ein. Die decerebrierten Tiere zeigten heftigere und längerdauernde Erregung sowie danach stärkere, länger anhaltende Beruhigung. Normale wie decerebrierte Tiere ertrugen Rückenlage, die jedoch auf taktilen Reiz sofort korrigiert wurde, und beim Aufhängen im Nackenzogen die Pfoten an den Leib an. Die Wirkung der beiden Alkaloide war gleichartig, nur wirkte B stärker und rief schneller Hemmung und Beruhigung hervor.

P I Ś M I E N N I C T W O.

- 1) *Brodmann K.* Vergleichende Lokalisationslehre der Grosshirnrinde Leipzig. 1909. 2) *Essen K. W.* Arch. f. exper. Pathol u. Pharmak. T. 159, s. 387. 1930. 3) *Flatau E.* Badania doświadczalne nad guzami złośliwymi układu ner-

- wowego ośrodkowego 1919. 4) *Girndt O.* Arch. f. exper. Pathol. u. Pharmak. T. 164. S. 118. 5) *Grünthal.* Journal f. Psychol. u. Neurolog. T. 46. S. 40. 6) *Ienschmied R.* Zur Kenntnis der Grosshirnrinde der Maus Königl. Akad. d. Wissensch. 1911. 7) *Jarisch A.* Arch. f. exper. Pathol. u. Pharmakol. B. 117 S. 53. 1926. 8) *Jöel u. Arndts.* Plügers Arch. f. d. g. Physiol. T. 210. S. 280. 1925. 9) *Kappers A.* Vergleichende Anatomie des Nervensystems der Wirbeltiere und des Menschen. 1921. 10) *Magnus R.* Körperstellung. 1924. 11) *Mettler A.* Journal Pharmac. 52-366. 1934. 12) *Modrakowski J.* Bull. de l'Ac. Polonaise des Sciences et des Lettres 1933 S. 201. 1934 S. 365 1935 S. 545 1936 S. 13) *Morita S.* Arch. f. exper. Pathol. u. Pharmak. T. 78 S. 188, 208. 1915. 14) *Rose M.* Journal f. Psych. u. Neurol. B. 19. 1926. 15) *Rose M.* Journal f. Psych. u. Neurol. T. 40. 1929. 16) *Rose M.* Mémoires de l'Ac. Polonaise d. Scien et d. Lettres III B. 1935. 17) *Schattenbrant G.* Pflüg. Arch. T. 209 S. 333. 18) *Schoen R.* Arch. f. exper. Pathol. u. Pharmakol. T. 113 S. 275. 1926. T. 135 S. 155. 1928. 19) *Spatz H.* Physiologie und Pathologie d. Stammganglien' Berlin 1927. 20) *Taco Cuiper.* Die funktionellen u. hiranatomischen Befunde bei der japanischen Tanzmaus. Rotterdam 1913. 21) *De Vries J.* Folia Neurobiologica. 1912. 22) *Wikler C. i Potter A.* An anatomical guide to experimental researches on the rabbits brain. Amsterdam 1911. 23) *Yamavaki* Arch. f. exper. Pathol. u. Pharmak. T. 136 S. 1. 1928.
-

Wpłynęło 4.X.1933.

Z Państwowego Zakładu Higieny, Filia w Łodzi. Kierownik Dr. T. Załęski.

O SZYBKICH METODACH AGLUTYNACYJNYCH.

P o d a l i

Dr. Med. HERMAN MAKOWER i Mag. fil. FRANCISZKA GOLDBERG

Aczkolwiek technika aglutynacyjna jest prosta, istnieje znaczna liczba jej odmian, i prawie w każdym laboratorium wykonywa się odczyn zlepný w sposób nieco odmienny. Niekiedy wyniki aglutynacji uzyskuje się szybko, zwłaszcza przy użyciu łaźni, często jednak do uzyskania wyniku pewnego czekać trzeba całą dobę. Istnieją przypadki, kiedy ze względów klinicznych lub epidemiologicznych, jest rzeczą ważną otrzymanie wyniku możliwie najprędzej.

Według *Northropa* 1) aglutynacja następuje wskutek zmniejszenia ładunku elektrycznego odpychającego cząstki od siebie i zwiększenia ich kohezji. Przy aglutynacji przez surowice swoiste jest to spowodowane przez otoczenie bakterij przez błonkę tej frakcji globulinowej, która stanowi aglutyninę. *Smoluchowski* 2) opracował wzór na szybkość odczynu zlepnego, oparty na prawdopodobieństwie spotykania się cząstek. Zwiększyć szybkość zlepienia się bakterij można zatem przez wytworzenie takich warunków, w których spotkanie się oddzielnych bakterij odbywać się będzie znacznie częściej niż to się dzieje w warunkach zwykłych. Już podwyższenie ciepłoty może to uczynić; stosowanie łaźni wodnej o temp. 50° C. przyspiesza występowanie aglutynacji, zwłaszcza typu O (*Hirschfeld* i *Amzelówna* 3). Wirowanie w sposób bardzo intensywny wzmaga spotkanie się bakterij, zbijanie ich

w grudkę, jednocześnie mechaniczny ucisk jednych bakteryj na drugie powoduje bardzo znaczne zwiększenie sił kohezyjnych. Częstsze spotykanie się bakteryj uzyskać można również przez trząsienie zawiesiny bakteryjnej z surowicą, oczywiście należy tutaj znaleźć pewne optimum, gdyż zbyt intensywne trząsienie może nawet rozbijać już istniejące grudki. Wreszcie warunki fizykochemiczne i chemiczne, istniejące w środowisku, w którym odbywa się odczyn zlepnny, mogą również wpływać na jego szybkość.

1. Szybki odczyn zlepnny za pomocą wirowania.

W r. 1904 zastosował wirowanie do aglutynacji *Gaethgens* 4-6). Zaobserwował on, że przy odczynie dodatnim odwirowana grudka ma kształty nieregularne, brzegi pofałdowane i przerywane, natomiast przy braku aglutynacji powstaje mały okrągły krążek o brzegach równych. Krążek taki po potrząśnięciu rozpada się, dając zupełnie jednolitą zawiesinę. Grudka zlepijonych bakteryj rozpada się na większe lub mniejsze kłaczk. *Gaethgens* odczytuje wynik odczynu zlepnego na dnie rurki. Dla ułatwienia tego odczytywania zbudował *Messerschmidt* 7) mały aparacik z lustrem, w którym zostają odbite dna probówek. Metodę *Gaethgensu* z powodzeniem stosowali poza tym *Brian* 8), *Gates* 9), który zastosował ją w czasie wojny do badań nad meningokokami, znanymi z powolnego aglutynowania się. Metoda centrifugowa nie znalazła zresztą szerokiego rozpowszechnienia, co przypisać należy jej kłopotliwości przy pracy masowej (*Gaethgens* i *Messerschmidt* zalecali ją zamiast metody zwykłej, nie zaś do celów specjalnych; *Messerschmidt* opracował nawet specjalne statywy i wirówki dla ułatwienia pracy serwjnej) oraz, być może, niezupełnie pewnemu sposobowi odczytywania wyników na dnie probówki. *Gates* stosował roztrzaskanie grudki i odczytywanie wyniku w sposób zwykły. Przy porównywaniu tych dwu sposobów otrzymaliśmy znacznie pewniejsze wyniki, stosując rozbijanie na kłaczk. Metoda wirowania dała nam nie tylko wyniki szybkie, ale w wielu przypadkach aglutynację mocniejszą, niż uzyskana przy pomocy zwykłej. Dlatego też uważamy, za słuszne i wskazane stosowanie jej w praktyce, zwłaszcza w przypadkach, w których zależy na szybkim wyniku.

Zbadaliśmy 82 szczepy, wyhodowane ze krwi w Filii Łódzkiej P. Z. H. z tego 66 szczepów durowych i 16 niedurowych.

Do 2 szeregów probówek z rozcieńczeniami surowicy durowej 1/200 do 1/6400, surowic paratyf. A, paratyf. B, paratyf. C lub Gärtnerowskiej 1/200 do 1/1600 dodawaliśmy żywej 24 - godzinnej zawiesiny bakteryjnej, poczem 1 szereg probówek (numerowanych) wirowaliśmy przez 15 minut, jaki to czas okazał się optymalnym. Po odwirowaniu rozbijaliśmy osad delikatnie i natychmiast odczytywaliśmy wynik, po czym zostawialiśmy te rurki razem z drugim szeregiem (kontrolnym) przez 24 godziny w temperaturze pokojowej, po czym odczytywaliśmy wyniki obu szeregów rurek.

W większości przypadków metoda wirowania dała wyniki lepsze od zwykłej: przeważnie zawiesina wirowana zlepiała się do ostatniego rozcieńczenia 3-plusowo, kontrole znacznie rzadziej; poza tym aglutynacja po odwirowaniu była znacznie wyraźniejsza, gruboziarnista. Wystrzegać się tylko należy zbyt mocnego potrząsania, ponieważ wtedy mogą się większe grudki rozbić na drobnutkie ziarenka. Z 66 zbadanych szczepów durowych 16 zlepiało się podobnie za pomocą obu metod, 47 — lepiej po odwirowaniu (z tego 27 w sposób bardzo wyraźny, tylko 3 zlepiały się lepiej po 24 godzinach stania w ciepłocie pokojowej, niż po 15-minutowym wirowaniu).

Mocniejszy wynik aglutynacji spostrzega się również przy zastosowaniu surowic paratyfusowych oraz Gärtnerowskiej. Surowice paratyfusowe A i C z P. Z. H. wywołują często współaglutynację prątków durowych, przeważnie nie przekraczając ++ w rozc. 1/200 (przy mianie 1/1600), surowice parat. B współaglutynują znacznie słabiej; pod wpływem wirowania ulegają zwiększeniu te reakcje niespecyficzne, nie we wszystkich oczywiście przypadkach, ale często. W niektórych przypadkach następuje zlepianie 3-plusowe w rozcieńczeniu 1/200 a nawet 1/400. Liczbowo stosunki te widzimy na tabelce I.

Największą współaglutynację wykazuje surowica paratyf. A. W praktyce współaglutynacja nie przeszkadza w stopniu znacznym dla określenia gatunku badanych bakterij (jeżeli pomija się dokładnie określenie typów paratyf. B. rzadko zresztą u nas

T A B E L K A I.

S u r o w i c e:	Ty	PA	PB	PC	Gärtner.
1. Po odwirowaniu słabsza aglutyn.	3	5	8	8	1
2. " " jednakowa "	16	12	38	16	10
3. " " silniejsza "	20	35	11	8	5
4. " " znacznie siln. "	27	10	5	1	4
Razem szczepów:	66	62	62	33	20

spotykanych), ponieważ tylko wyjątkowo osiąga rozmiary większe, a i wtedy aglutynacja właściwa jest w tak znacznym stopniu większa, że chyba tylko wyjątkowo powstaćby mogły jakieś wątpliwości. Z praktycznego więc punktu widzenia próba aglutynacyjna wirowana, nieco mniej swoista od zwykłej, ale czulsza od niej, daje wyniki zupełnie dobre dla określenia szczepów badanych i może być z powodzeniem stosowana.

16 szczepów nie durowych, wyhodowanych ze krwi w czasie epidemji duru i zbliżonych pod niektórymi względami do durowych albo paratyfusowych, zlepiły się przeważnie jednakowo słabo zarówno przy pomocy metody zwykłej, jak i po odwirowaniu.

Miano i intensywność aglutynacji w rurkach odwirowanych ulegały po 24-godzinnym staniu naogół niewielkim tylko zmianom; z surowicą durową tylko 1 szczep wykazał silniejszą aglutynację po 24 godz., z paratyfusową A — 7, parat. B — 3; nieco więcej stosunkowo z surowicą C (9 szczepów z 29) i Gärtnerowską (6 szczepów z 21).

Naogół podobne wyniki jak z aglutynacją szczepów durowych za pomocą surowicy swoistej otrzymaliśmy przy odczynie *Widala*. Aglutynacja ulega bardzo znacznemu wzmoczeniu pod wpływem wirowania. Używaliśmy w większości przypadków zawiesin żywych.

Z 59 surowic tylko w 3 wypadła aglutynacja po odwirowaniu słabiej w 37—silniej, z tego w 14—znacznie silniej. Współaglutynacja z paratyfusem B oraz OX₁₉ nie wypadła tutaj silniej po wirowaniu, niż przy metodyce zwykłej, z paratyfusem A wzmoczenie

aglutynacji nie osiągnęło tego stopnia, jaki występował przy użyciu surowicy parat. A do odczynu zlepnego z pałeczkami durowymi, (w 27 przypadkach wynik jednakowy, w 1 słabsza, w 8 silniejsza — aglutynacja po wirowaniu — z tego w 4 znacznie). W ten sposób wirowanie, wzmagające intensywność odczynu *Widala*, w bardzo tylko nieznaczny sposób zmniejsza jego swoistość. Uzyskane wyniki były tak jednolite, że nie uważaliśmy za potrzebne zwiększać liczby przebadanych surowic.

35 surowic zbadaliśmy zapomocą zawiesiny Fickerowskiej. W doświadczeniach kontrolnych okazało się, że wynik aglutynacji przy użyciu zawiesin bakterij żywych i zawiesin Fickerowskich, używanych w naszym zakładzie, naogół jest jednakowy. Wirowanie wzmagą aglutynację bardzo znacznie, z 35 surowic stwierdzono to wzmożenie w 22. W 19 przypadkach porównywano wynik po odwirowaniu zawiesiny żywej i Fickerowskiej, w 10 był wynik jednakowy, w 9 natomiast wypadła silniej aglutynacja Fickerowska. Aglutynacja po wirowaniu zawiesin formalinowanych jest bardzo ładna w postaci wyraźnych kłaczek; przy użyciu zawiesin żywych kłaczki nie mają takich ostrych zarysów, obraz często jest bardziej zamazany.

Po 24-godzinnym staniu w cieplecie pokojowej aglutynacja często jeszcze się wzmacnia, tak że różnice miana przy porównaniu ze zwykłą 24-godzinną aglutynacją stają się jeszcze większe.

Zjawisko to przy odczynie *Widala* występuje w większym stopniu, niż przy identyfikowaniu szczepów durowych za pomocą wysokowartościowej surowicy swoistej i dotyczy zarówno bakterij żywych jak i zadanych formaliną.

Dodatni odczyn *Weil - Felix*a dało 9 surowic. Silniejszy odczyn po wirowaniu wystąpił z 2 surowicami, słabszy z 4. Z tych małych liczb nie można wyciągnąć wniosków, wydaje się jednak, że wirowanie nie stanowi przy odczynie *Weil - Felix*a czynnika, wzmagającego zlepienie, tak jak przy odczynie *Widala*.

Szereg surowic, przysłanych do zbadania na odczyn *Widala* zostało zbadanych na obecność aglutynin przeciwgronkowcowych. *Kraus i Löw* 10) stwierdzili, że surowice ludzi zdrowych często zlepiają gronkowce nawet w rozcieńczeniu 1:100, co zostało potwierdzone przez wielu innych autorów. W naszych doświadcze-

niach posługiwaliśmy się 2 starymi laboratoryjnymi szczepami gronkowca, białym i żółtym. Różnie w zachowaniu się serologicznym między nimi nie stwierdziliśmy. Szczep żółty po pewnej liczbie przeszczepień zaczął tracić barwik i wreszcie zbieleł zupełnie. Aglutynacja gronkowców występowała prawie we wszystkich przypadkach, niekiedy do miana 1/200. Często miała ona postać poplątanych krótkich nitczek. Zawiesiny szczepu w soli fizjolog. zawsze wypadły ujemnie; aglutynacji nie stwierdziliśmy ani zwykłą metodą, ani po wirowaniu. Wirowanie nie wzmacnia w sposób widoczny aglutynacji gronkowców pod wpływem surowie W i d a l-dodatnich i W i d a l-ujemnych. Po 24-godzinym staniu jest zlepianie często silniejsze, niż bez wirowania. Zbadano ogółem 25 surowie, 13 aglutynowało jednakowo po wirowaniu i przy metodyce normalnej, po 6 aglutynowało po wirowaniu słabiej, wzgl. mocniej. Porównane po 24 godzinach próbki wirowane i niewirowane wykazywały w połowie przypadków silniejszą aglutynację wirowanych.

II. Szybki odczyn zlepný za pomocą trzęsienia.

Już w roku 1898 zaobserwował *Dineur* 11) szybsze wytrącanie się bakterij pod wpływem trzęsienia, co pótwierdzili *Scheller* 12) i *Kafka* 13. Wzorując się na metodzie *Kahna*, który wprowadził trzęsienie do uzyskania szybszego strącania a n t y g e n u lipoidowego przez surowice kilewe, wypracował szybką metodę aglutynacji przy pomocy trzęsienia *Noble* 14). Zastosował on również drugi czynnik, wprowadzony przez *Kahna* — większe stężenie antygenu, używając bardziej stężonych zawiesin bakteryjnych. *Noble* badał szczepy durowe paratyfusowe A i B, czerwone *Shiga*, *Hiss - Y* i *Flexner*, wąglika, błonicy, pneumokoki, meningokoki. Praktycznie najważniejszym było otrzymanie aglutynacji już po kilku minutach z bardzo powoli zlepiającymi się meningokokami. Również odczyn *Widala* dawał dobre wyniki za pomocą metodyki *Noble'a*. Odczyn *Noble'a* wykonywa się w sposób następujący:

do 0,1 cm.³ gęstej zawiesiny bakteryjnej dodaje się 0,1 cm.³ rozcieńczonej surowicy, mieszaninę trzęsie się 2 do 5 minut, po czym dodaje się 0,8 cm.³ roz-

czynu fizjologicznego i odczytuje się wynik. Surowicę rozcieńcza się w taki sposób, żeby w każdej rurce kolejnej była taka jej ilość absolutna, jaka znajduje się w 1 cm.³ mieszaniny zawiesiny i surowicy przy zwykłej metodzie aglutynacji. Ponieważ ilość płynu trzęsionego jest pięciokrotnie mniejsza od 1 cm.³, więc trzeba użyć pięciokrotnie silniejszych rozcieńczeń surowicy, a że dodajemy surowicę do takiej samej ilości zawiesiny (przez co rozcieńczamy ją dwukrotnie), więc ostatecznie używane rozcieńczenia muszą być dziesięciokrotnie silniejsze od zwykłych. Tak np. przy używanych przez nas rozcieńczeniach przy metodzie zwykłej (lub wirowanej) 2/200 — 1/400 — 1/800 — i t. d. zmieniają się one dla metody *Noble'a* na 1/20 — 1/40 — 1/80 i t. d. Wynik ostateczny odczytuje się w 1 cm.³ mieszaniny surowicy, zawiesiny i rozczynu fizjologicznego, tak, że miano ostateczne nie różni się (teoretycznie) od miana przy metodzie zwykłej. Obiekcje wysuwane na ten temat przez niektórych autorów wydają się nieistotne.

Technika *Noble'a* jest o tyle niewygodna, że trzeba odmierzать małe ilości rozczynu i zawiesiny bakteryjnej, dopełniać mieszaninę za pomocą 0,8 cm³ rozczynu fizjologicznego, co jest nieco kłopotliwe przy pracy masowej. Autor rosyjski *Czelnyj* 15) uprościł ją przez wprowadzenie mniej dokładnej ale dla celów praktycznych wystarczającej techniki kroplowej: 2 krople zawiesiny, 2 krople rozczynu surowicy dopełnia się za pomocą 1 cm³ rozczynu fizjologicznego. Wypróbowaliśmy tę modyfikację i w szeregu prób kontrolnych ustaliliśmy jej wartość praktyczną. Szereg autorów rosyjskich (próba *Noble'a* znalazła największe rozpowszechnienie w Rosji) doszło do tego samego wniosku, tak że wiele badań przeprowadzonych jest za pomocą metodyki kroplowej. I myśmy po naszych próbach porównawczych przeszli na sposób *Czelnyja*.

Czelnyj zwraca uwagę na dużą swoistość odczynu trzęsionego, na zmniejszanie odczynów grupowych. Również *Trockij i Kinzburskaja* 16), pracując nad meningokokami stwierdzili nieobecność odczynów grupowych. *Orłow i Fiedotow* 17) mieli tylko nieznacznie słabszą aglutynację, ale zato dużą swoistość przy odczynie *Widala i Weil - Felixa*. Dobre wyniki przy odczynie *Widala* mieli również *Awerbuch* 18), a zwłaszcza *Troickij i Majofis* 19). Autorzy ci uzyskali za pomocą własnej modyfikacji odczynu *Noble'a* o 10% więcej dodatnich we wczesnym okresie duru, kiedy klasyczny odczyn *Widala* był jeszcze ujemny. Podobnie *Majofis* 20) przy durze płamistym miał między 2 a 7-ym

dnem choroby za pomocą metody szybkiej 80% dodatnich odczynów *Weil - Felixa*, przy pomocy metody zwykłej tylko 64%; poczynając od 12 dnia choroby zgodność obu metod była całkowita. *Bergman i Rabinowicz* 21) mieli jednakowo dobre wyniki przy badaniu na odczyn *Weil - Felixa* za pomocą metody *Noble'a* jak i za pomocą metody zwykłej. *Roginskaja* 22) uzyskiwała dobre wyniki z meningokokami, mniej dobre z pałeczkami grupy durowo — paratyfusowej — czerwinkowej, *Orłow i Fiedotow* natomiast z dorem i paratyfusami bardzo dobre wyniki. *Fiodorow* 23) przeprowadzał badania nad zlepianiem prątków dżumy i rzekomo-gruźliczych przez swoistą surowicę dżumową; pod względem swoistości obie metody zachowały się jednakowo, po trzęsieniu nie występowały aglutynacje. *Żurnakowa* 24) otrzymała znacznie lepsze wyniki przy pomocy *Noble'a*, niż przy użyciu zwykłego sposobu przy badaniu zwierząt na chorobę Banga. Dobre i swoiste wyniki z prątkami durowymi, paratyfusowymi, czerwinkowymi, gono-meningo, i pneumokokami uzyskała *Ginzburg* 25). Większość wyżej wymienionych autorów chwali swoistość i wygodę odczynu *Noble'a*, niektórzy jednakże stwierdzają jego mniejszą intensywność: miano często bywa niższe o 1 — 2 rurki.

W doświadczeniach własnych używaliśmy przeważnie trzęsawki. Rurki trzęsiono przez 5 minut z szybkością 50 — 70 wahań na minutę. Szybsze trzęsienie wpływa niekorzystnie na przebieg aglutynacji. Odczytywanie aglutynacji przed dodaniem rozczynu fizjologicznego niekiedy jest łatwe, w większości jednak przypadków znacznie wyraźniejsze wyniki otrzymuje się po dopełnieniu rurek rozczyntem fizjologicznym.

Przebadaliśmy 62 szczepy durowe i 16 szczepów niedurowych, wyosobnionych z próbek krwi, przysłanych do zbadania na odczyn *Widala*; w znacznej większości wypadków były to te same szczepy, które służyły nam do badań nad wpływem wirowania na aglutynację. Wbrew temu co obserwowali autorzy rosyjscy, w wielu przypadkach odczyn trzęsiony wypadł u nas silniej niż odczyn zwykły. Być może spowodowane to jest przez to, żeśmy do odczynu zwykłego nie używali cieplarki. Nie tłumaczy to jednak całkowicie sprawy, gdyż przy użyciu surowic słabych, ludzkich (*Widalowskich*) stosunki te — jak zobaczymy niżej — wyglądają inaczej.

Tak np. szczep 6939 zlepia się dwuplusowo do rozcieńczenia 1/1600 przy użyciu metody zwykłej, trzyplusowo do rozcieńczenia 1/6400 przy metodzie trzęsienia; szczep 6653 — trzyplusowo do 1/1600, dwuplusowo do 1/6400, po trzęsieniu zaś trzyplusowo do 1/6400; szczep 7259 — dwuplusowo do 1/1600, po trzęsieniu — trzy plusy do 1/6400 i t. d.

Pod względem swoistości były tutaj stosunki naogół podobne, jak przy wirowaniu: tam, gdzie odczyn wypadł mocniej z surowicą durową, tam przeważnie współaglutynacja była większa, zwłaszcza z surowicą parat. A, ale również z parat. C, a nawet do pewnego stopnia z parat. B. Ilustruje te stosunki tabelka II.

T A B E L K A II.

S u r o w i c e:	Ty	PA	PB	PC	Gärtn
1. Po trzęsieniu słabsza aglutynacja	3	1	3	3	4
2. " " jednakowa "	13	16	35	11	10
3. " " silniejsza "	22	34	23	15	5
4. " " znacznie siln. "	28	11	—	4	1
Razem szczepów:	66	62	61	33	20

I tu, podobnie jak przy metodzie wirowania, współaglutynacja — praktycznie rzecz biorąc — nie stanowi przeszkody do rozpoznania szczepu badanego i nie zmniejsza wartości metody.

16 szczepów niedurowych wykazało taki sam minimalny — stopień aglutynacji, jak przy metodzie zwykłej i wirowanej.

Miano i intensywność aglutynacji w rurkach trzęsionych z surowicą durową ulegały po 24-godzinnym staniu tylko niewielkim naogół zmianom: wzmogła się aglutynacja 5 szczepów. Z surowicami paratyfusowymi to wzmoczenie aglutynacji występuje częściej: z parat. A u 22 szczepów (z 53), z parat. B u 13 (z 54), z parat. C u 14 (z 32), z surowicą Gärtnerowską u 12 (z 20).

Przy badaniach nad odczynem *Widala* odczyn trzęsiony nie wykazuje tej przewagi nad odczynem zwykłym, jaką widzieliśmy przy badaniu wyhodowanych szczepów zapomocą surowicy wysokowartościowej. Tutaj obserwowaliśmy — zgodnie z autorami rosyjskimi, często mniejsze miano o 1 — 2 rurki, niż przy metodzie zwykłej. Współaglutynacja naogół bez większych zmian.

Stosunki te ilustruje tabelka III:

T A B E L K A III.

S z c z e p y :	Ty	PA	PB	OX ₁₉	Staf.
1. Po trzęsieniu słabsza aglutyn.	21	4	—	2	—
2. „ „ jednakowa „	21	24	24	19	10
3. „ „ silniejsza „	4	1	1	2	11
4. „ „ znacznie siln. „	—	—	3	—	3
Razem surowiec:	46	29	28	23	24

Jak widzimy z tej tabelki, na której umieszczone zostały również odczyny aglutynacyjne z OX₁₉ i gronkowcem, tylko ten ostatni wykazuje pod wpływem trzęsienia aglutynację silniejszą. Z 9 odczynów dodatnich *Weil - Felixa* w 6 był wynik jednakowy metody trzęsienia i zwykłej, w 3-metoda trzęsienia dała wynik słabszy.

Zawiesiny Fickerowskie nadają się również od odczynu trzęsienia, jak to stwierdzają i autorzy rosyjscy. W niezbyt wielkiej liczbie przeprowadzonych przez nas prób uzyskano wyniki takie, jak z zawiesinami żywymi.

Podobnie jak przy wirowaniu, tak i przy trzęsieniu po 24-godzinnym staniu częściej aglutynacja wzmacnia się przy surowicach *Widalowskich*, niż przy odpornościowych zwierzęcych. Z żywą zawiesiną pał. durowych to wzmożenie wystąpiło w 32 przypadkach (z 52), z *Fickerowską* w 11 (z 20), z parat. A w 2 (z 31), z parat. B w 4 (z 35), z OX₁₉ w 9 (z 31), z gronkowcem w 6 (z 30) — w 4 aglutynacja była słabsza.

Zachowanie się współaglutynacji było też odmienne, niż przy stosowaniu szczepów wyhodowanych i surowicy wysoko-wartościowej.

Trzęsienie rurek przygotowanych w sposób zwykły niekiedy przyspiesza aglutynację, ale praktycznie dobrych wyników nie daje.

III. Porównanie wyników, uzyskanych za pomocą wirowania i trzęsienia. Niektóre inne metody szybkiej aglutynacji.

Jeżeli chodzi o sprawy natury technicznej, to prostszą — zwłaszcza w modyfikacji kropłowej — jest metoda trzęsienia. Rurek nie trzeba oznaczać, co zajmuje dość dużo czasu; trzęsienie odbywa się 5 minut, wirowanie 15; można się obejść bez żadnych przyrządów (trzęsawka jest wygodna, ale nie jest konieczna). W ten sposób metoda trzęsienia, zwłaszcza przy użyciu zawieszin Fickerowskich, może być stosowana w najbardziej prymitywnych warunkach. Jeżeli pracownia posiada dużą wirówkę, w której zmieścić się może większa liczba rurek, stosowanie metody wirowania wydaje się bardziej racjonalne. Przy porównaniu wyników musimy znów rozpatrzyć oddzielnie szczepy, badane za pomocą surowie swoistych i odczyn *Widala*.

W odniesieniu do identyfikacji szczepów obydwie metody dały mniej więcej podobne wyniki: w 18 przypadkach okazał się silniejszy odczyn w rurkach trzęsionych, w 12 — w wirowanych, w 36 były wyniki jednakowe. Pod względem aglutynacji z surowicą parat. B i parat. C metoda wirowania wykazała większą swoistość, z parat. A — mniej więcej jednakową.

W odniesieniu do odczynu *Widala* bezspornie lepsza jest metoda wirowania. Tylko w 1 przypadku był odczyn w rurkach trzęsionych silniejszy, w 15 były oba odczyny jednakowe, w 30 silniejszy odczyn był w rurkach wirowanych, przy czym w 19 znacznie silniejszy. Pod względem swoistości nieco gorzej przedstawia się odczyn wirowany, ale różnice nie są znaczne.

Próbowaliśmy w szeregu przypadków dojść do jeszcze większego wzmożenia aglutynacji przez skombinowanie obu tych metod; był to jeden z celów naszej pracy. Liczne badania wykazały jednak, że zarówno trzęsienie po wirowaniu, jak i odwrotnie, wirowanie po trzęsieniu — nie mają wielkiego wpływu na ostateczny wynik, że niekiedy nawet uzyskuje się wyniki gorsze.

Również nie dały wyników niektóre inne metody, użyte w celu ewentualnego przyspieszenia aglutynacji, które wypróbowaliśmy. Podana przez *Brilla* 26) fagoaglutynacja, której

celem właściwym (z praktycznego punktu widzenia) jest wywołanie zlepiania się trudno aglutynujących się szczepów, nie miała wybitnego wpływu na szybkość aglutynacji. Wyniki uzyskane przez dodawanie bakteriofaga do mieszaniny surowicy i zawiesiny bakteryjnej były w różnych przypadkach zupełnie różne, stwierdzało się czasem nawet wyraźne zahamowanie aglutynacji.

Krasilszczik i Safonowa 27) zaproponowali dla uzyskania szybszego wyniku aglutynacji zastąpienie roztworu fizjologicznego przez izotoniczny roztwór chlorku amonu lub siarczanu sodu. Przeprowadziliśmy szereg prób z chlorkiem amonu, jednakże nie mogliśmy się przekonać o jego większej skuteczności.

Zwiększenie szybkości aglutynacji za pomocą środków termicznych, jest mniej skuteczne, niż za pomocą metod mechanicznych, o których była mowa wyżej.

Zarówno wirowanie jak i trzęsienie z praktycznego punktu widzenia stanowi łatwą i prostą metodę do uzyskania dostatecznie pewnych wyników w ciągu kilkunastu minut. Nie są to — zdaniem naszym — metody, które zastąpić powinny klasyczny odczyn *Widala*, ale które oddać mogą w przypadkach specjalnych cenne usługi. Ponieważ po 24 godzinach rurki odwirowane, względnie trzęsione wykazują raczej tendencję do zwiększania aglutynacji, ma się w ręku jeszcze jedną kontrolę. Zresztą dla całkowitego zabezpieczenia się można jednocześnie nastawić szereg rurek do metody szybkiej i drugiej do metody zwykłej, wykorzystując ostatecznie tę z nich, która da wynik lepszy. W ten sposób metody szybkie stanowią dopełnienie metod zwykłych, i zasługują na większe rozpowszechnienie w praktyce.

De l'Institut d'Hygiène d'Etat. Filiale à Łódź. (Dir. Dr. T. Załęski).

SUR QUELQUES MÉTHODES D'AGGLUTINATION RAPIDE.

P a r

H. MAKOWER et F. GOLDBERG

R É S U M É

Les auteurs ont étudié quelques méthodes d'agglutination rapide parallèlement avec la méthode ordinaire.

En centrifugeant le mélange du sérum et de la suspension bactérienne ils ont obtenu des résultats plus nets quoique un peu moins spécifiques qu'à l'aide de la méthode classique.

En secouant les tubes avec le sérum et la suspension les auteurs ont également obtenu des résultats favorables, pourtant dans le cas de la réaction de Widal ils ont observé parfois le titre plus bas qu'au moyen de la méthode classique.

Les auteurs sont d'avis que les modifications mentionnées ci-dessus, quoique incapables de remplacer la méthode classique, peuvent tout de même servir pour obtenir le résultat de l'agglutination dans le temps le plus court.

P I Ś M I E N N I C T W O.

- 1) *Northrop*. „The Mecanism of Agglutination“ w „The Newer Knowledge of Bacteriology and Immunology“. Chicago, 1928. 2) *Smoluchowski*. cyt. wedł. *Northropa*. 3) *Hirschfeld i Amzelówna*. Medycyna Dośw. i Społ. 293, (193), 1934. 4) *Gaethgens*. Münch. med. Wschr., str. 1351. 1906. 5) *Id.*, Arch. f. Hyg., 56, 377. 1908. 6) *Id.*, Münch. med. Wschr., str. 1389. 1910. 7) *Messerschmidt*. Zeitschr. f. Immunforsch., 13. 378. 1912. 8) *Brian*. Zentr. f. Bakter., 43, 745. 1907. 9) *Gates*. Journ. exp. Med., 35, 63. 1922. 10) *Kraus i Löw*. Wien. klin. Wschr., cyt. według *Neissera* „Handb. d. pathol. Mikroorgan.“, II wyd., II tom, str. 401 1899. 11) *Dineur*. Bull. acad. roy. de méd. de Belgique, cyt. według *Paltaufa* w „Handb. d. pathog. Mikroorg.“, II wyd. II tom, str. 499. 12) *Scheller*. Zentr. f. Bakter., 36, 427 i 694. 1904. 13) *Kafka*. tamże, 40, 247. 1906. 14) *Nobile*. Journ. of Bacter., 14, 287. 1927. 15) *Czelnyj*. Laboratornaja Praktika. nr. 3, cyt. według *Orłowa i Fiedotowa* 1928. 16) *Troickij i Kinzburskaja*. Żurnał mikrobiol i immunoł., t. 8, z. 1. cyt. według *Orłowa i Fiedotowa*. 1931. 17) *Orłow i Fiedotow*. Żurn. epidemiol. i mikrobiol., 2, 29. 1933.

- 18) *Awerbuch*. Żurn. ekspierim. bioł. i mied., t. 14, z 40, cyt. wedł. *Majofisa* 1930. 19) *Troickij* i *Majofis* Gig. i epid. cyt. według *Majofisa*. 1932. 20) *Majofis*. Żurn. epidemiol. i mirobiol., 2, 42, 1932. 21) *Bergman* i *Rabinowicz*. tamże, z. 11—12, cyt. według *Majofisa*. 1932. 22) *Roginskaja*. Mikrobiol. żurn., 11 43, cyt. według *Orłowa* i *Fiedotowa*. 1931. 23) *Fiedorow*. Wiestn. mikrobiol. epidemiol. i parasit., 8, 192, cyt. wedł. *Orłowa* i *Fiedotowa*. 1929. 24) *Żurnakowa*. Sow. wietierin., Nr. 11—12, cyt. według *Orłowa* i *Fiedotowa*. 1932. 25) *Ginsburg*. cyt. wedł. *Majofisa*. 26) *Brill*. Medyc. dosw. i społ. (470) 1933 27) *Krasilszczik* i *Szafonowa*. Żurn. epidemiol. i mikrobiol., 2, 49. 1933.
-

Wpłynęło 26.X.1936.

Z Zakładu Farmakologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie.
Dyrektor: Prof. Dr. J. Supniewski.

ZWIĄZEK MIĘDZY DZIAŁANIEM HEMOLITYCZNYM SAPONIN A ICH FARMAKODYNAMICZNYM DZIAŁANIEM NA NARZĄDY WEWNĘTRZNE.

P o d a ł
M. BERMAN

W s t ę p

Pod nazwą saponin albo substancji saponinowych kryje się liczna grupa ciał posiadających wspólne własności fizyczno — chemiczne i farmakologiczne. Są to ciała o charakterze glukozydów wykryte dotychczas wyłącznie w świecie roślinnym. Ciała te przy wstrząsaniu w roztworach wodnych silnie się pienią a przy zetknięciu się z komórkami zwierzęcymi łączą się z lipidami tych komórek, uszkadzając je pod względem morfologicznym i czynnościowym.

Z nazwą saponiny spotykamy się najpierw u *Gmelina*, jednak nie ulega żadnej wątpliwości, że zdolność pienienia się niektórych wyciągów roślinnych znana już była o wiele wcześniej. Wzmianki o pewnych ciałach mydlanych spotkać można w pracach naukowych XVIII wieku. Zawartość saponin i ich rozmieszczenie w częściach roślin jest u rozmaitych roślin różna. W niektórych roślinach znajdują się one w całej ich masie, w innych natomiast tylko w poszczególnych częściach. Z części roślin, które zawierają saponiny wymienić należy: korzenie — np.

Senega, Saponaria, Cyklamen; korę — Quillaja, Gwajak; owoce — Sapindus, Saponaria; nasiona — Aesculus, Agrostemma; liście — Gwajak. Ilość saponin, tak w poszczególnych częściach, jak i w całym ustroju roślinnym jest u rozmaitych roślin zmienna i może się wahać między ułamkiem procentu aż do ponad 50%.

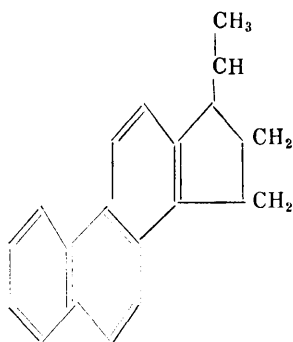
Saponiny są glukozydami o odczynie kwaśnym, niekiedy obojętnym, o smaku drapiącym, gorzkim, albo słodkim. Większość ich jest dobrze rozpuszczalna w wodzie, a tylko pewne kwaśne saponiny rozpuszczają się jedynie w postaci soli alkalicznych. W alkoholu saponiny rozpuszczają się trudniej, przy czym lepiej w alkoholu metylowym, niż w etylowym. W postaci krystalicznej otrzymano dotychczas tylko niewielkie saponiny jak np. digitoninę, cyklaminę i inne. Wszystkie saponiny są glukozydami składającymi się z sapogeniny, połączonej wiązaniem glukozydowym z jedną albo większą ilością cząstek cukru. Saponiny zbudowane są z węgla, wodoru i tlenu; tylko solanina posiada również azot. Kwasy hydrolizują saponiny powodując odszczepienie cukrów z ich cząsteczki. Przy podgrzewaniu wodnego roztworu saponin, z rozcieńczonymi kwasami mineralnymi (np. z kwasem solnym), otrzymuje się początkowo przez częściowy rozkład hydrolityczny i częściowo odszczepienie cukru wtórne glukozydy, nazywane też początkowymi sapogeninami (Anfangssapogenine), albo prosapogeninami, występujące niekiedy również i w roślinach. Wszystkie one działają hemolitycznie. Przy długotrwałym i energicznym gotowaniu saponin z kwasami nieorganicznymi, odszczepiają się wszystkie glukozydowo związane cząsteczki cukru i uzyskuje się właściwą sapogeninę, inaczej zwaną końcową sapogeniną (Endsapogenine), albo aglikonem lub geniną. Niektóre saponiny mogą dawać jednocześnie kilka genin.

Sapogeniny są w wodzie nierozpuszczalne, w alkaliach zaś są mniej rozpuszczalne niż ich substancje macierzyste. (Kobert) Podane „per os“ nie są wchłaniane z przewodu pokarmowego i są wydalane zwykle z kałem. Podobnie dzieje się z sapogeninami, gdy występują w ustroju, jako produkt trawienego rozkładu saponin. Z pośród węglowodanów związanych w saponinie z sapogeniną należy wymienić: glukozę, galaktozę, fruktozę i t. d.

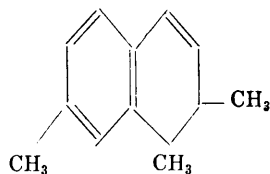
Dawny podział saponin na kwaśne i obojętne (*Kobert*), z chwilą bliższego poznania ich natury chemicznej, uległ zmianie, ustępując miejsca podziałowi, opierającemu się na strukturze chemicznej składnika niecukrowego. saponin — t. zw. aglikonu albo geniny (*Tschesche*). W związku bowiem z metodą selenowej dehydracji, zaczęto odróżniać dwie duże grupy genin saponinowych:

I. dostarczającą sapogenię, t. zw. metyl — cyklo — penteno — fenantren.

i II. która przy selenowej dehydracji daje sapotalinę (1 — 2 — 7 trójmetyl — naftalen).



I grupa
metyl-cyklo-penteno-fenantren



II grupa
trój-metyl-naftalen.

Z tych I. grupa obejmuje narazie następujących przedstawicieli saponin:

1) z *Digitalis purpurea*: digitoninę, gitoninę, tigogenię.

II. grupa obejmuje narazie saponiny:

2) z *Radix sarsaparillae*: parylinę i t. d.

1) z dzikiego kasztana: aescinę,

2) z fiołka alpejskiego: cyklaminę ($C_{63}H_{112}O_{33}$),

3) z *Gipsophila*: gipsophila — saponinę,

4) z *Quillaia*: quillaia — saponinę i t. d.

Oдноśnie do konstytucji genin to pierwszej grupie genin odpowiada budowa tigogeniny, drugiej zaś grupie — budowa hederageniny (*Tschesche i Hagedorn*).

C z ę ś ć I.

Po dożylnym wprowadzeniu zwierzętem saponin, następuje ich powolne odciąganie z przepływającej krwi przez komórki w pierwszym rzędzie mózgu i rdzenia, wskutek tego właśnie komórki te ulegają najpierw porażeniu. Nie zawsze jednak zatrucie to tak się kończy, gdyż w ustroju odbywa się również odtruwanie saponin przez cholesterol, a mianowicie drogą połączeń saponin z cholesterolem osocza krwi. Jednak, czy to wskutek tego, że te połączenia saponinocholesterolowe nie są trwałe, czy to wskutek tego, że i one również działają trująco na ośrodkowy układ nerwowy, częstym wynikiem zatrucia jest porażenie komórek tego układu nerwowego. (*Kobert*).

Bezpośrednie zetknięcie się odsłoniętych miejsc mózgu albo rdzenia z proszkami sapotoxiny, albo z kilku kroplami roztworu tego preparatu, powodowało szybkie obumieranie zatrutych części (*Pachorukow*).

Po dożylnym wprowadzeniu saponiny „gipsophili“, stwierdzono obok zmian we krwi i narządach krwiotwórczych, także zmiany anatomiczne w układzie nerwowym (*Rezek i Kollert*) wyrażające się procesami degeneracyjnymi w rdzeniu i w mózgu. Nerwy obwodowe wykazywały również bardzo ciężkie uszkodzenia. Nerwy ruchowe i czuciowe zachowują się jednakowo. Wpływ saponin na zakończenia nerwów czuciowych wyraża się, jako następstwo podrażnienia, — bólem. Zapędzłowanie błony śluzowej roztworem saponiny powoduje występowanie pieczenia i palenia oraz wywołuje odruchowe wzmożone wydzielanie śluzu i odruchowe przekrwienie tej błony. Działanie saponin na zakończenia nerwów ruchowych, tuż przy wejściu ich do włókien mięsnych, ujawnia się szybko powstającym porażeniem, które początkowo może mieć charakter kurarowego, obejmuje jednak szybko również i tkankę mięśniową.

Wysobnione nerwy i mięśnie umieszczone w roztworze fizjologicznym soli szybko obumierają pod wpływem saponin (*Kobert*). Saponiny mogą też niekiedy pobudzić kurczliwą substancję mięśnia prądkowanego i niekiedy nastąpić może przykurcz mięśnia w rodzaju przykurczu weratrynowego.

W doświadczeniach na wysobnionych sercach żab, dręt w i *Aplysia limacina* większość saponin działa jako jad sercowy (*Kobert*). Działanie ich posiada pewną analogię do działania glukozydów naparstnicowych. Wzrost czynności serca tak charakterystyczny dla działania małych dawek ciał naparstnicowych stwierdza się również po podaniu gwajak — saponiny tak na wysobnionym sercu zwierząt zimno — jak i ciepło — krwistych. (*Kakowski*). W większych stężeniach saponin występuje osłabienie czynności serca, zaś w znaczniejszych rozcieńczeniach przeciwnie — pobudzenie czynności serca. Przy zastosowaniu w lecznictwie preparatów, złożonych z ciał o działaniu naparstnicowym i z niektórych saponin, uzyskano działanie synergistyczne. Podobne wyniki otrzymano w doświadczeniach na sercach żab (*Postojew*). *Kofler*, *Kaurek* i *Hoekstra* natomiast uważają, że w tym wypadku, nie mamy wcale do czynienia z prawdziwym synergizmem, ale poprostu z szybszym wchłanianiem się glukozydów naparstnicowych, uwarunkowanym pewnym uszkodzeniem warstwy komórek ściany jelitowej przez saponiny. Dodatek saponin wzmacniać może również zdolności kumulacyjne ciał naparstnicowych (*Hoekstra*), przy czym w równej mierze zwiększa się zarówno przewodzenie bodźców, jak i siła samego mięśnia sercowego. (*Hoekstra* i *Scheusing*).

Saponiny wstrzyknięte do żyły jarzmowej psa (*Pachorukow*) i kota (*Kruskal*) powodują, obniżenie ciśnienia krwi.

Oдноśnie do działania saponin na naczynia krwionośne zauważono, że po dodaniu pewnych saponin np. saponalbinę do przepływającego przez naczynia płynu następuje rozszerzenie tych naczyń. A więc niektóre saponiny zwężają, a inne rozszerzają naczynia krwionośne (*Tufanow* i *Kruskal*).

Dla farmakologicznego wykrywania saponin najważniejszą rolę odgrywa ich działanie hemolityczne (*Kobert* 1886 r.), które związane jest i zależy od uszkodzenia przez saponiny osłonki lipoidalnej krwinek. Saponiny bowiem tworzą z cholesterolem tej osłonki związki chemiczne. Oдноśnie do samej metody hemolitycznej, zwrócić należy specjalną uwagę na źródła rozmaitych błędów, przy wykonywaniu oznaczeń tą metodą. Pamiętać więc należy, że krwinki rozmaitych zwierząt posiadają różną odpor-

ność wobec saponin. Z tego też względu można porównywać między sobą tylko te wartości, które uzyskano przeprowadzając doświadczenia z tym samym gatunkiem krwi. Dalej należy używać do doświadczeń albo krwinek z surowicą krwi, albo krwinek przemytych zawieszonych w płynie fizjologicznym. Poza tym zachowane być musi też samo stężenie jonów wodorowych (*Kofler i Adam*).

Krwinki czerwone są najbardziej wrażliwym elementem ustroju zwierzęcego wobec saponin. Najwrażliwsze są krwinki czerwone świnki morskiej, mniej wrażliwe krwinki królika, myszki białej, psa, świni, kota jeszcze mniej, wrażliwe są krwinki wołu, kozy, a najmniej wrażliwe są krwinki barana. (*Riwosch*) Charakterystycznym jest, że kolejność ta jest odwrotną do działania hemolitycznego wody destylowanej na te krwinki (*Riwosch*).

Krwinki czerwone człowieka są najmniej wrażliwe na saponiny w słabych roztworach, w silniejszych natomiast łatwiej podlegają hemolizie niż np. krwinki świnki morskiej. (*Kaulbersz*).

W pewnych stanach chorobowych np. w arteriosklerozie, gruźlicy płuc i t. d. stwierdza się wzrost odporności krwinek na saponiny (*Neilson i Wheelon*) co uzależnione jest od zwiększonej ilości cholesterolu we krwi.

Mechanizm hemolizy saponinowej polega na tym, że po dodaniu saponin do zawiesiny krwinek czerw. w fizjol. roztworze soli, następuje najpierw adsorpcja a następnie chemiczne połączenie saponin z cholesterolem i lecytyną otoczki lipoidowej krwinek. Wskutek tego otoczka ta staje się niezdadną do wykonywania swoich czynności, następnie zaś pęka w pewnym miejscu, a hemoglobina wydostaje się z krwinki do osocza. Przyczyną pęknięcia, ma być wzmożone ciśnienie wewnątrz krwinek, wskutek wtargnięcia płynu.

Z wiązaniem się saponin z cholesterolem związany jest problem działania odtruwającego i anty - hemolitycznego cholesterolu. Stwierdzono, że dodatek cholesterolu powoduje zahamowanie a nawet zniesienie hemolizy saponinowej (*Ransom*). W łączeniu się saponin z cholesterolem i z phytosterolem odgrywać ma pewną rolę grupa OH i podwójne wiązanie tychże, tak,

że ciała pokrewne cholesterolowi, pozbawione grupy OH nie mają też działania anty-hemolitycznego (*Hausmann, Abderhalden i Le Count*). Nie jest jeszcze dokładnie wyjaśnione czy odtrucie saponin przez cholesterol spowodowane jest przez reakcję chemiczną, czy też przez proces fizyczny.

W działaniu hemolitycznym saponin uwzględnić należy rolę jaką odgrywa też w hemolizie stężenie jonów wodorowych podłoża. W reakcji kwaśnej bowiem, hemoliza przebiega szybciej i silniej, a w reakcji alkalicznej — wolniej i słabiej.

Działanie saponin na surowicę krwi i na plazmę krwi jest słabsze w obecności białych ciałek krwi, bo leukocyty bogate w cholesterol wpływają hamująco na hemolizę krwinek czerwonych w tych podłożach (*Meyerstein i Allenbach*).

Cyklamina w mniejszych stężeniach zwiększa krzepliwość krwi a w większych zmniejsza ją (*Tufanow i Zak*). Nie wszystkie jednak saponiny wywierają to działanie. Jedne bowiem przyspieszają to krzepnięcie, inne opóźniają je, zwłaszcza podane w większych ilościach. Zjawisko to zdaje się polegać na tym, że cytozym, jako lipid łączy się z saponiną na ciało nieczynne. Połączenie to powoduje upośledzenie funkcji trombokinazy i przyczynia się tym samym do opóźnienia krzepnięcia krwi (*Zak*).

Kwestia hemolizy krwi w naczyniach krwionośnych oraz kwestia tworzenia się wewnątrznaczyniowych zakrzepów po podaniu dożylnym saponin nie została dotychczas z całą pewnością rozstrzygnięta. Jedni uważają, że wstrzyknięcie dożylnie małych dawek cyklaminy powoduje hemolizę i tworzenie się zakrzepów (*Kobert*) inni natomiast nie zauważyli tu żadnej hemolizy. (*Isaak, Moeckel, Kagan*).

W zatruciu chronicznym saponinami, występują często anemie, które są skutkiem zniszczenia dużych ilości erytrocytów (*Kobert*), względnie, jak przypuszczają *Hueck, Wacker, Isaac i Moeckel, Pappenheim i Szecsi*, wskutek uszkodzenia aparatu krwiotwórczego. Badania anatomiczne tego aparatu wykazały wówczas silne rozszerzenie naczyń włosowatych szpiku kostnego, hyperplazję tkanki łącznej szpikowej, krwawienia i zawały krwawe w szpiku, połączone z bujaniem bliznowatej tkan-

ki łącznej. W śledzionie i wątrobie natomiast stwierdzano rozległą metaplastję szpikową. Tworzenie krwinek przez śledzionę i wątrobę występowało tam, gdzie nie stwierdzono zaburzeń naczyniowych (*Firket*). Zmiany spowodowane przez saponinę w szpiku znajdują swoje odbicie w obrazie krwi w której spotyka się młode jądrzaste formy krwinek, poikilocyty, megalocyty i krwinki polichromatofilne oraz w niewielkiej ilości spotyka się również erytrocyty nakrapiane bazofilnie.

W licznych doświadczeniach na zwierzętach i ludziach wykazano, że po dodaniu saponin wzmagają się wielokrotnie ilość wydzielanego moczu. Jednak saponiny silnie działające jako środki moczopędne mają wiele wad, gdyż w następstwie często powodują białkomocz, leukocyturię i t. d. bowiem drażnią nerki. A zatem jako środki moczopędne podawać by można było w małych dawkach tylko te saponiny, które wywierają najslabsze działanie szkodliwe na komórki nerkowe. U zwierząt zatrutych cyklamina, makroskopowo stwierdzono powiększenie nerek, wykazujących na przekroju ciemno - czerwone zabarwienie. Mikroskopowo obraz zmian nosił charakter „nephritis desquamativa” skombinowanego z „glomerulonephritis”. W kanalikach krętych i w kanalikach prostych znajdowano grubo - ziarnistą masę składającą się z methemoglobiny. Kłębuszki zawierały skrzeplę wysięk, a pęcherz moczowy zawierał mocz zabarwiony na czerwono (*Tufanow*).

Niektóre saponiny, jak np. cyklamina, saponina sarsaparilla, wywoływały hemoglobinurię po dożylnym wprowadzeniu ich już w dawkach nieco mniejszych od śmiertelnych, natomiast inne saponiny sprowadzały ten objaw dopiero w dawkach śmiertelnych.

W doświadczeniach na zwierzętach stwierdzono, że pod wpływem saponin tak kłębuszki, jak i kanaliki nerek stają się przepuszczalne dla białka, przy czym ścianka kłębuszków jest wrażliwszą wobec saponin, niż ściana kanalików, co jest powodem białkomoczu (*Punz, Zilahy*).

Już z dawien dawna znany jest, iż ryby w roztworach saponin ulegają jak gdyby porażeniu, i wówczas wypływają na powierzchnię wody. Mechanizm tego zatrucia polega na uszko-

dzeniu i zmianie struktury nabłonka skrzeli. Także i kijanki giną szybko w obecności saponin w wodzie, przy czym stwierdza się u nich zmiany i oddzielanie się nabłonków oskrzeli i naskórka. Prawdopodobnie następuje tu chemiczne połączenie się saponin z lipidami komórek nabłonkowych, co prowadzi do uszkodzeń nabłonka skrzeli. Wskutek tego te zwierzęta wodne stają się niezdadne do życia. Sposób działania saponin na kijanki i ryby może też ułatwić zrozumienie wpływu roztworów saponinowych na błony śluzowe człowieka i ssaków. Przy zetknięciu się spojówek oczu z roztworem saponin, występują natychmiast objawy zapalne: zaczerwienienie, obrzęk spojówek, wzmożone wydzielanie łez i silny ból oczu. Na rogówce, tworzy się po tym bielmo. Przez odpowiednie rozcieńczenie roztworów saponin ich własności drażniące na błony śluzowe wyzyskać można dla celów terapeutycznych. Dobre wyniki terapeutyczne uzyskano w ożenie przy przemywaniu roztworami saponin błony śluzowej nosa (*Zickgraf* i in.) Stosowanie leków saponinowych (*Radix Senegae*, *radix Primulee*) jako środków wykrztuśnych opiera się na działaniu pobudzającym tych ciał na wydzielanie gruczołów śluzowych dróg oddechowych.

Silniejsze stężenie roztworów saponinowych powodują ustanie czynności migawek nabłonka migawkowego, natomiast bardziej rozcieńczone roztwory zdają się pobudzać ten ruch migawkowy.

W doświadczeniach na ludziach, królikach, i świnkach morskich wcieranie maści z dodatkiem 3 — 5% saponin, wzmacnia przepuszczalność skóry dla ciał przez skórę przenikających (*Milbradt*). W badaniach nad wchłanianiem się hormonów przez skórę wykazano, że saponiny przyspieszały wchłanianie się adrenaliny i insuliny. Zwiększają one także wchłanianie i wydalenie przez skórę jodu, kwasu salicylowego, pyrogallolu, naftalenu, atophanu i t. d. Dalsze badania wykazały, że przy dodaniu saponin wzmacnia się przenikanie barwików przez skórę (2% wodny roztwór Trypanblau). Tak samo odczyn Pirqueta po uprzednim przygotowaniu saponinami odpowiedniego miejsca na skórze, był silniejszy w stosunku do odczynu kontrolnego bez saponin, co odnieść należy do szybszej wymiany między przeciwciałami

a antygenem przez rozluźnioną skórę. Poza tym badania przeprowadzone z maściami znieczulającymi wykazały, że przez dodatek saponin wzrosło znacznie działanie tych maści (*Milbradt*).

Na tkankę podskórną saponiny w działaniu miejscowym wywierają wpływ drażniący. Po zastrzyku podskórnym saponiny quillaii występują bardzo bolesne objawy ropienia aseptycznego. Przy badaniu tego działania dla sapotoksyny kąkolu *Agrostemma githago* stwierdzono, że wywiera ona jakiś specyficzny wpływ na kollagenową tkankę łączną, bowiem ta przybiera galaretowato — żelatynowatą postać (*Neumayer*).

Saponiny podane „per os“ powodują zwiększenie wydzielania śliny, śluzu i soku żołądkowego, prawdopodobnie na skutek odruchowego zadrażnienia odpowiednich gruczołów. Poza tym saponiny pobudzają ruchy żołądka, powodując często wymioty. To działanie wymiotne stwierdzić można było u psów i kotów. Polega ono na odruchach wychodzących z błony śluzowej żołądka. Analogiczny wpływ drażniący wywierają saponiny na jelita. Zwiększają one wydzielanie soku jelitowego (*Petschacher i Felder*) i wzmagają perystaltykę jelit, stąd też często stwierdzić można biegunki po użyciu naparów z senegi.

Saponiny wysysają się trudno z przewodu pokarmowego. Normalnie wysysają się niezmienione jedynie tylko w niewielkich ilościach, natomiast przy uszkodzeniu błony śluzowej jelita zwiększa się ich wchłanianie. (*Bayer i Gaisböck*).

Wiele saponin podawanych „per os“ nawet w dużych stosunkowo dawkach (5 gr.) nie przynosi ludziom żadnej szkody. Saponiny szpinaku, rzepy, buraków i t. d. po wstrzyknięciu dożylnym okazują się również silnie hemolitycznymi jak sapotoksyna, są jednak bez żadnej szkody dla zdrowia, spożywane doustnie. (*Koffler*).

Fermenty ustroju jak: ptyalina i pepsyna pozostają bez wpływu na saponiny (*Brandl i Mayer*), a dopiero sok trzustkowy i sok jelitowy działają rozszczepiająco na te ciała. Rozkładają one saponiny do odpowiednich sapogenin. Wytworzona sapogenina podana zostaje następnie w jelicie grubym działaniu bakterii, w związku z czym ulega dalszym przemianom chemicznym.

Poza rozkładem i wchłanianiem w przewodzie pokarmowym odbywać się także może wydzielanie wchłoniętych albo wprowadzonych dożylnie saponin. Wydzielanie saponin może się odbywać w śliniankach (*Schulz*) a także i przez komórki gruczołowe błony śluzowej żołądka (*Schulz*) i jelit. Po dożylnym wprowadzeniu psom i kotom śmiertelnych dawek saponin, zauważono ciężkie zmiany w górnym i dolnym odcinku przewodu pokarmowego, a przy większych dawkach tych ciał także uszkodzenia w środkowym odcinku jelita cienkiego, w jelicie grubym i w śluzówce żołądka (*Kobert*).

Saponiny wywierają szkodliwy wpływ na pasorzyty jelitowe, z pośród których bardzo wrażliwymi na nie są tasiełce, nie są one bowiem, jak glisty, chronione grubą otoczką kutikularną. Tym się też tłumaczy, działanie przeciwtasiełcowe roślin bogatych w saponiny np. „*Albizzia anthelminthica*“ i „*Phytolacca Abissinica*“ (*Kruskal*).

Rola saponin w terapii nie jest dotychczas ustalona. Jedni przypisują im dużą wartość, inni natomiast stoją na stanowisku, że saponiny, poza działaniem przyspieszającym i wzmagającym wchłanianie, nie odgrywają żadnej większej roli. Nie da się zaprzeczyć, że saponiny mają wielkie znaczenie jako leki wykrztuśne. Extr. Rad. Primullae, Rad. Senegae słusznie wchodzi w skład rozmaitych preparatów farmaceutycznych używanych jako leki wykrztuśne; surowce te bowiem są bogate w saponiny.

Nie ulega wątpliwości, że dalsze badania chemiczne oraz farmakologiczne rozszerzą zakres stosowania saponin w lecznictwie.

C Z E Ś Ć II.

Działanie hemolityczne.

Sporządzono rozcieńczenia następujących saponin: glicyrrhizyny, gwaiako-saponiny, saponiny otrzymanej z quilaai, saponinum pur. albis. Merck, cyklaminy i solaniny w rozcieńczeniach od 1 : 500 do 1 : 600.000. Krew pobraną do szczawianu sodu przemywano fizjolog, roztworem soli na wirówce. Z otrzymanych krwinek (królika) sporządzono zawiesinę w soli fizjolo-

T A B E L A Nr. I

Stężenie	Glicyrr.	Gwaiako- sapon.	Quillaia	Sapon. pur. alb.	Cykla- mina	Solanina
1 : 500	+++	+++)	+++	+++	+++	+++
1 : 600	+++	+++*)	+++	+++	+++	+++
1 : 700	+++	+++*)	+++	+++	+++	+++
1 : 800	+++	+++*)	+++	+++	+++	+++
1 : 900	+++	+++*)	+++	+++	+++	+++
1 : 1000	+++*)	+++*)	+++	+++	+++	+++
1 : 2000	0	+++*)	+++	+++	+++	+++
1 : 3000	0	+)	+++	+++	+++	+++
1 : 4000		0	+++	+++	+++	+++
1 : 5000		0	+++	+++	+++	+++
1 : 6000			+++	+++	+++	+++
1 : 7000			+++	+++	+++	+++
1 : 8000			+++	+++	+++	+++
1 : 9000			+++	+++	+++	+++
1 : 19000			+++	+++	+++	+++
1 : 12000			+++	+++	+++	+++
1 : 14000			+++	+++	+++	+++
1 : 16000			+++	+++	+++	+++
1 : 18000			+++	+++	+++	+++
1 : 20000			+++	+++	+++	+++
1 : 22000			+++	+++	+++	+++
1 : 24000			+++	+++	+++	+++*)
1 : 26000			+++	+++	+++	+++*)
1 : 28000			+++	+++	+++	+++*)
1 : 30000			+++	+++	+++	+++*)
1 : 40000			+++	+++*)	+++	0
1 : 50000			+++	+++*)	+++	0
1 : 60000			+++*)	+++*)	+++	
1 : 70000			+++*)	0	+++	
1 : 80000			+++*)		+++	
1 : 90000			+++*)		+++	
1 : 100000			0		+++	
1 : 150000					+++*)	
1 : 200000					+++*)	
1 : 300000					+++*)	
1 : 400000					+++*)	
1 : 500000					+++*)	
1 : 600000					0	

gwiazdka oznacza wystąpienie hemolizy po 15 min. w cieplance,
krzyżyk oznacza częściową hemolizę, 3 krzyżyki zupełną hemolizę.

gicznej tak, aby każdy mm^3 zawierał około 1 miliona krwinek czerwonych. Następnie do probówek zawierających po 1 cm^3 rozcieńczeń poszczególnych saponin dodawano po 0.1 cm^3 tej zawiesiny. Po wymieszaniu odczytywano wyniki hemolizy, po czym wstawiano probówki na przeciąg 15 min. do cieplarki i powtórnie kontrolowano otrzymane wyniki (patrz tabela). Nr. 1.

Z przeprowadzonych doświadczeń stwierdziliśmy, iż z pośród badanych saponin najslabiej hemolizują glicyrrhizyna (hemoliza występuje w stęż. do $1 : 1000$) i gwaiako-saponina (stęż. $1 : 2000$). Silniej hemolitycznie działają solanina (stęż. $1 : 28.000$) i saponin. pur. alb. Merck ($1 : 40.000$ — $1 : 60.000$). Najsilniej działa cyklamina powodująca hemolizę jeszcze w stężeniach $1 : 300.000$ i $1 : 400.000$).

Kardiometr i ciśnienie krwi.

Doświadczenie wykonano na kocie wagi 3170 gr., narkotyzowanym urethanem (w ilości 1,4 gr. na 1 kg. wagi). Ciśnienie krwi rejestrowano manometrem rtęciowym, objętość serca, — kardiometrem Henderscna. Badane saponiny rozpuszczono w ilości 0.1% w fizjologicznym roztworze soli kuchennej. Roztwory te w ilości 2 cm^3 . wstrzykiwane były do żyły udowej kota. Wyniki doświadczeń podano w załączonej poniżej tabeli (Tab. Nr. II).

Wszystkie badane saponiny z wyjątkiem glicyrrhizyny przyspieszają czynność serca i zwiększają wysokość wychyleń rozkurczowych serca. Na ciśnienie krwi glicyrrhizyna, saponina z quillai i saponin pur. alb. Merck nie wywierają żadnego wpływu, natomiast gwaiako-saponina, cyklamina powodują spadek ciśnienia (20 — 22 mm Hg.) krwi wyrównujący się po gwaiako-saponinie i solaninie po pół minuty a po cyklaminie dopiero po 4 minutach.

T A B E L A Nr. II

Saponiny	K a r d i o m e t r				Ciśnienie krwi
	skurcz	rozkurcz	częst. akcji serca	objętość serca	
Glicyrr.	bez wpływu	nieznaczne zwiększenie wysokości	bez wpływu	bez wpływu	bez wpływu
Gwaiako saponina	nieznaczne przejściowe zwiększenie wysokości	bez wpływu	przyspieszenie	najpierw minimalna i krótkotrwała zwyżka a następnie w okresie spadku ciśnienia nieznaczne zmniejszenie	spadek ciśnienia krwi o 20 mm Hg. (1/2 min.)
Quillaia	bez wpływu	zwiększenie	„	bez wpływu	bez wpływu
Saponin pur. alb.	„ „	„	„	„ „	„ „
Cykla-mina	krótko-trwałe nieznaczne zwiększenie (30 sek.)	krótko-trwałe nieznaczne zwiększenie (30 sek.)	„	„ „	spadek 22 mm Hg., które wyrównuje się po 4 min.
Solanina	bez wpływu	nieznaczne i długo-trwałe zwiększenie wysokości	„	przejściowe zmniejszenie objętości	spadek 20 mm Hg. wyrównuje się w przeciągu 2 1/2 min.

Wyosobnione serce żaby.

Perfuzję wyosobnionej komory serca żaby wykonano metodą Strauba. Otrzymane wyniki odczytane z wykresów wyraża niżej przytoczona tabela Nr. III.

Najslabszy wpływ na wyosobnione serce żaby wywierają: glicyrrhizyna i gwaiako-saponina, które dopiero w większych stężeniach (1 : 5000) powodują zwolnienie akcji serca. Glicyrrhizyna ponadto w stężeniu 1 : 200 zatrzymuje serce w rozkurczu. Podob-

T A B E L A Nr. III
Doświadczenia nad wyosobnionym sercem żab.

		Glicyrrhizyn	Gwaiakosapon.	Quillaia	Saponin pur. alb.	Cyklamina	Solanina
1 : 1.000.000	skurecz	bez działan.	bez działan.	bez działania	nieznaczne zwiększenie	bez działania	bez działan.
	rozkurecz	"	"	"	nie zwiększa się	"	coraz mniejszy
	Częstość akcji serca	"	"	przyspieszenie	bez zmian	bez zmian	bez zmian
1 : 500.000	skurecz	"	"	bez działania	zmniejszenie	nieznaczne zwiększenie	"
	rozkurecz	"	"	"	bez zmian	bez zmian	coraz mniejszy
	Częstość akcji serca	"	"	"	" "	przyspieszenie	bez zmian
1 : 100.000	skurecz	"	"	"	to samo zmniejszen.	nieznaczne zwiększenie	"
	rozkurecz	"	"	"	bez zmian	bez zmian	coraz mniejszy
	częstość akcji serca	"	"	"	" "	przyspieszenie	bez zmian
1 : 50.000	skurecz	"	"	"	to samo zmniejszen.	coraz znaczniejsze zmniejszen. się wysok.	"
	rozkurecz	"	"	"	bez zmian	bez zmian	"
	częstość akcji serca	"	"	"	" "	" "	"
1 : 10.000	skurecz	"	"	"	to samo zmniejszen.	skurcze minimalne	"
	rozkurecz	"	"	"	bez zmian	bez zmian	"
	częstość akcji serca	"	"	"	" "	" "	"
1 : 5.000	skurecz	"	minimalne zmniejszenie	zmniejszenie wysok. do $\frac{1}{6}$	to samo zmniejszen.	" "	"
	rozkurecz	"	bez wpływu	"	bez zmian	zatrzymanie się serca	"
	częstość akcji serca	zwolnienie	"	zwolnienie	" "	"	"

Ciąg dalszy tab. III

	Glicyrrhizyna	Gwaiak	Quillaia	Saponin pur. alb.	Cyklamina	Solanina
1 : 1.000	skurecz	zmniejszenie	bez wpływu	bez zmian	wybitne zmniejszen.	bez zmian
	rozkurecz	bez zmian	"	"	bez zmian	"
	częstość akcji serca	"	"	"	zwolnienie	"
1 : 500	skurecz	"	bez zmian	"	jak wyżej	zatrzymanie serca
	rozkurecz	"	"	"	bez zmian	
	częstość akcji serca	"	zwolnienie	"	" "	
1 : 200	skurecz	"	znaczne zmniejszenie	"	znaczne zmniejszen.	
	rozkurecz	zatrzymanie serca	bez zmian	zatrzymanie serca	bez zmian	
	częstość akcji serca	"	"	"	" "	

ne działanie posiadają saponina z quillaii i saponin. alb. Merck., które poza zwolnieniem akcji serca, powodują także wybitne zmniejszenie skurezu (1 : 1000). Solanina natomiast spowodowała coraz mniejszy rozkurecz i w stężeniu 1 : 500 zatrzymuje serce w skurezu. Najsilniejsze działanie posiada cyklamina, która w większych stężeniach powoduje coraz znaczniejsze zmniejszenie skurezu i zatrzymanie serca w rozkurezu w stężeniu 1 : 500.

Wyosobniony przelyk żaby.

Wyosobniony przelyk żaby umieszczono w roztworze Ringera przez który przepuszczano tlen. Doświadczenia przeprowadzano w temperaturze pokojowej. Ruchy przelyku rejestrowano za pomocą dźwigni na kimografonie. Otrzymane wyniki ilustruje tabela Nr. IV.

Najsłabszymi w działaniu na wyosobnione przelyki żab okazują się glicyrrhizyna i gwaiako-saponina, które po za nieznacznym obniżeniem tonusu (1 : 100.000) i bardzo nieznacznym zwiększeniem perystaltyki nie wywierają żadnego działania. Jako silniej działające od wyżej wymienionych występują saponina z quillaii, saponin. pur. alb. Merck. i solanina. Najsilniej zaś działa cyklamina, gdy już w stężeniu 1 : 500.000 powoduje zwiększenie wychyleń perystaltycznych a w stężeniu 1 : 100.000 wzrost napięcia tonicznego.

Wyosobnione jelito królika.

Wyosobnione i przebyte fizjologicznym roztworem soli odcińki jelita długości około 5 cm. umieszczono w płynie Ringera o temperaturze 38° C., przez który przepływał tlen. Ruchy jelita zapisywano przy pomocy dźwigni. Otrzymane wyniki zebrano w tabeli Nr. V.

Jak wynika z tych doświadczeń najsłabszymi w działaniu na wyosobnione jelito królika okazują się glicyrrhizyna i gwaiako-saponina, które nawet w większych stężeniach (1 : 1000) nie sprowadzają zahamowania perystaltyki; przy czym daje się stwierdzić, że glicyrrhizyna ze wzrostem stężenia wywołuje potęgujące się zmniejszenie skurczu, natomiast gwaiako-saponina wręcz przeciwnie — daje wzrost skurczu. Silniejszy wpływ na jelito wywierają saponina z quillaii i saponin. pur. alb. Merck., które w stężeniu 1 : 6000 powodują zupełne zahamowanie perystaltyki. Poza tym zaś obie te saponiny w większych stężeniach powodują wyżkę napięcia tonicznego. Najsilniej działającymi z badanych saponin okazują się cyklamina i solanina, które poza wybitną wyżką tonusu powodują zahamowanie perystaltyki już w stężeniu 1 : 12.500.

Reasumując wyniki otrzymane z przeprowadzonych doświadczeń możemy stwierdzić, iż między hemolizą saponinową a farmakodynamicznym działaniem saponin na narządy wewnętrzne jak np. na serce i jelita poszczególnych zwierząt do-

T A B E L A Nr V

		Glicyrhizyna	Gwaiakosap.	Quillaia	Saponin pur. alb.	Cyklamina	Solanina
1 : 400.000	Tonus	bez efektu	bez działań.	bez efektu	bez efektu	bez efektu	
1 : 400.000	Perystaltyka	"	" "	"	" "	" "	zwiększenie amplitudy wychyleń
1 : 200.000	Tonus	"	bez zmian	"	" "	" "	
1 : 200.000	Perystaltyka	"	zwiększenie wychyleń	"	" "	" "	jak wyżej
1 : 100.000	Tonus	Od 1 : 100.000 zaczyna się potęgować się zmniejszenie wysokości skurczu bez wpływu na tonus	bez zmian	"	" "	" "	nieznaczne zwiększen.
1 : 100.000	Perystaltyka		zwiększenie wychyleń	"	zmniejszenie się amplitudy wychyleń	" "	nieznaczne zmniejszenie
1 : 50.000	Tonus		bez zmian	"		nieznaczny wzrost	jak wyżej
1 : 50.000	Perystaltyka		" "	"	zmniejszenie się amplitudy wychyleń	zmniejszenie wychyleń	" "
1 : 25.000	Tonus			"	bardzo duże zwiększenie	wybitne zwiększenie	duża zwyżka
1 : 25.000	Perystaltyka		wzrost skurczu	"	wybitne zmniejszenie wychyleń	zmniejszenie amplitudy wychyleń	zmniejszenie wychyleń
1 : 12.500	Tonus			podnosi się		bez dalszych zmian	
1 : 12.500	Perystaltyka			zmniejszenie się amplitudy wychyleń	dalsze zmniejszenie wysokości wychyleń	zahamowanie perystaltyki	zahamowanie perystaltyki
1 : 6000	Tonus				jeszcze większa zwyżka tonusu		
1 : 6000	Perystaltyka			zupełne zahamowanie	zupełne zahamowanie		

Ciąg dalszy tabl. V

	Glicyrrhizyna	Gwaiako-sap.	Quillaia	Saponin pur. alb.	Cyklamina	Solanina
1:5000 Tonus Pery-stal-tyka	Od 1.100.000 zaczyna się potęgające się zmniejszenie wysokości skurczu bez wpływu na tonus	dalszy wzrost skurczu				
1:1000 Tonus Pery-stal-tyka	wychylenie minimalne niema zwiększenia	bez zmian dalsze silne zwiększenie się amplitudy wychyleń				

świadczałnych (króliki, koty, żaby) zachodzi pewien związek. Jeżeli bowiem w przeprowadzonych badaniach nad hemolizą saponinową stwierdzamy pewną gradację pod względem siły hemolitycznej rozcieńczeń poszczególnych saponin, — co dokładnie ilustruje tabelka Nr. 1 uwidaczniająca cyklaminę, jako najsilniejszy z saponin jad hemolityczny to też cyklamina w dalszych doświadczeniach występuje również jako ciało najbardziej toksyczne i dla narządów wewnętrznych. I vice versa najsłabsze hemolityca saponinowe, jak glicyrrhizyna i gwaiako — saponina okazują się najmniej toksyczne dla serca i przewodu pokarmowego. Krwinki czerwone są najbardziej czułym składnikiem organizmu zwierzęcego w stosunku do saponin. Zależy to w pierwszym rzędzie od siły i efektu łączenia się poszczególnych saponin z lipidami otoczek erytrocytów. Na podstawie naszych doświadczeń sądzić możemy, że proces ten aczkolwiek może w słabszym stopniu, analogicznie zachodzi również przy stykaniu się saponin z komórkami innych narządów i tkanek. Otoczki bowiem tych

komórek również zawierają lipoidy, mechanizm więc działania toksycznego saponin na te komórki musi być podobny do ich działania na krwinki.

De l'Institut pharmacologique de l'Université Jagiel. de Cracovie.
Directeur: Prof. Dr. J. Supniewski.

RAPPORT ENTRE L'ACTION HÉMOLYSANTE DES SAPONINES ET LEUR ACTION PHARMACODYNAMIQUE SUR LES ORGANES INTERNES.

P a r

M. BERMAN

R É S U M É.

Dans les études sur l'action hémolytique des saponines la glicyrrhisine hémolyse les hématies du lapin à la concentration de $1/900$ — $1/1000$, le saponine de guaiac à la concentration de $1/2000$ — $1/3000$, la saponine de quillaia à la concentration de $1/90.000$, la saponine pur. alb. Merck à celle de $1/40.000$ — $1/60.000$, la solanine à la concentration de $1/2.8000$ — $1/30.000$, et la cyclamine à celle de $1/300.000$ — $1/500.000$.

Les expériences cardiométriques sur la pression sanguine du chat montrent que toutes les saponines examinées à l'exception de glicyrrhisine accélèrent l'action du coeur et amplifient les oscillations cardiaques diastoliques. La glicyrrhisine, la saponine de quillaia et la saponine pur. Merk n'exercent aucune action sur la pression sanguine; la saponine de guaiac la solanine et la cyclamine abaissent la pression sanguine (20—22 mm Hg).

Dans les expériences sur le coeur isolé de grenouille la cyclamine provoque une diminution notable de la contraction et arrête le coeur en diastole (concentr. $1/5000$). La solanine diminue la diastole et arrête le coeur en systole ($1/500$). La saponine de quillaia, la saponine pur. Merck ralentissent et diminuent les

contractions cardiaques (1/1000). La glicyrrhisine et la saponine de guaiac ralentissent le cœur à condition que leurs concentrations soient assez élevées (1/5000).

Dans l'action sur les oesophages isolés de grenouilles la glicyrrhisine et la saponine de guaiac abaissent le tonus augmentent les mouvements péristaltiques d'une façon insignifiante. La saponine de quillaia, la saponine pur. Merck et la solanine ont une action plus forte. L'action la plus forte est exercée par la cyclamine qui, déjà dans la concentration (1/500.000), provoque l'accroissement des mouvements péristaltiques et dans la concentration 1/100.000 l'accroissement du tonus.

L'action la plus faible sur l'intestin isolé du lapin est exercée par la glicyrrhisine et la saponine de guaiac, qui même dans les concentrations élevées (1/1000) n'arrêtent pas les mouvements péristaltiques. La saponine de quillaia et saponine pur. Merck dans la concentration 1/6000 arrêtent les mouvements péristaltiques. L'action la plus forte est exercée par la cyclamine et la solamine qui outre une hausse considérable du tonus provoquent déjà dans la concentration 1/12.500 l'arrêt complet des mouvements péristaltiques.

De ces expériences il ressort qu'il existe une certaine relation entre le pouvoir hémolysant des saponines et leur action pharmacodynamique. En effet les saponines douées de la plus forte action hémolysante comme par ex.: la cyclamine, sont aussi les plus actives au point de vue pharmacodynamique. Cela peut s'expliquer par le fait que les membranes cellulaires des organes internes aussi que celles des hématies contiennent des lipoides. Les saponines s'unissent avec ces lipoides et déterminent ainsi les effets toxiques qui leur sont connus.

P I Ś M I E N N I C T W O .

Autenrieth W. Abderhalden. Handb. d. biol. Arbeitsmetod. IV, 7/1, 252. *Bayer G. und Gaisbäck F.* Wien. med. Wochenschr. 74, 39, 2001, 1924. *Bayer G. und Gaisbäck F.* Wien. Klin. Wochenschr. 37, 39, 952. *Firket J. C. r. Soc. Biol.* 85, 727, 1921. *Firket J.* Arch. d. biol. 32, 4, 539, 1922. *Fühner H.* Abderhalden. Handb. d. biol. Arbeitsmetod. IV. 7/1, 454. *Hoekstra R. A.* Naunyn Schmiede-

bergs Arch. 163, 46, 1931. *Hoekstra R. A.* und *Scheusing*. Z. exper. Med. 90 36, 1933. *Kaulbersz J.* Med. Dośw. i Spol. XVII, 1—2, 1933. *Kobert R.* Hefter, Handb. d. exp. Pharmacol. II, 1476, 1920. *Kofler L.*, *Kollert V.* und *Grill H.* Wien. klin. Wochenschr. 38, 13, 352, 1925. *Kofler L.* und *Schrutka W.* Biochem. Zeitschr. 159, 3/4, 327, 1925. *Kofler L.* und *Kaurek R.* Arch. f. expr. Pathol. u. Pharmacol. 109, 5, 362, 1925. *Kofler L.* und *Adam Ph. A.* Arch. d. Pharmac. u. Ber. d. dtsh. pharmaz. Ges. 265, 37, 8, 224, 1927. *Kofler L.* und *Fischer R.* Naunyn Schmiedebergs Arch. 141, 105, 1929. *Kofler L.*, *Fischer R.* und *Newesely H.* Arch. Pharmac. 267, 685, 1929. *Kofler L.* Z. Unters. Lebensmit 63, 154, 1932. *Milbradt W.* Z. exper. Med. 87, 745, 1933. *Neilson, Chas H.* *Wheelon H.* J. of labor. a. Clin. Med. 6, 454, 1921. *Neilson, Chas H.* und *Wheelon H.* J. of labor. a. Clin. Med. 6, 487, 1921. *Neilson, Chas H.* und *Wheelon H.* J. of labor. a. Clin. Med. 6, 568, 1921. *Punz L.* *Zilahy* und *Brenndörfer*. J. Z. exper. Med. 84, 806, 1932. *Resek Ph.* und *Kollert V.* Virchovs Arch. 270, 706, 1929. *Sieburg E.* Abderhalden. Handb. d. biol. Arbeitsmetod. IV. 7 I, 454, 545. *Vestlin K.* Biochem. Zeitschr. 144, 9, 1924.

Wpłynęło 23.XI.36.

Ze stacji Badania Wartości Odżywczej Produktów Spożywczych przy P. Z. H.
Kierownik Doc. Dr. G. Szule.

WARTOŚĆ BIOLOGICZNA BIAŁKA NIEKTÓRYCH PRODUKTÓW ZBOŻOWYCH I ICH PRZETWORÓW.

P o d a ł a

Inż. Z. MARKUZE

Pracą niniejszą jest dalszym ciągiem z serii naszych badań nad wartością biologiczną białka produktów roślinnych i ich mieszanin (1, 2, 3).

Tematem jej jest 1^o. oznaczenie porównawcze wartości biologicznej białka kasz najbardziej rozpowszechnionych na rynku 2^o. określenie wartości biologicznej białka pszenicy w zależności od przeróbki jakiej podlega ziarno (całkowite ziarno, mąka i kasza) oraz 3^o. porównanie biologicznej wartości białka pszenicy szklistej i mączystej.

Część doświadczalna.

Zbadaliśmy następujące produkty: płatki owsiane, kasze pochodzące z gryki t. j. gryczana jasna i palona, oraz drobna krakowska t. zw. maczek, kasze z jęczmienia t. j. jęczmienna i perłowa, z prosa — jaglana, z pszenicy — manna, oraz ryż polerowany.

Poza tym zbadane zostały: mąka pszenna, bułka oraz parę gatunków pszenicy szklistej i mączystej. Badanie pszenic miało na celu stwierdzenie, czy ziarno pszenicy wysokobiałkowej różni

się od wysokoskrobiowej nie tylko pod względem ilościowym białka, lecz i pod względem jego wartości biologicznej.

Do określenia wartości biologicznej białka użyliśmy metody *Osborne'a* i współpracowników (4), polegającej na oznaczaniu stosunku przyrostu wagi młodego, rosnącego szczura do ilości spożytego przezeń białka w ciągu pewnego okresu czasu.

W tabl. I podane są wartości białka (Nx6,25) w badanych produktach. Produkty włączano do diet możliwie w paru pozio-

T A B L I C A I.

Produkt badany	Zawartość białka (Nx6,25) w %	Produkt badany	Zawartość białka (Nx6,25) w %
Płatki owsiane	17.4	Bułka pszenna	10.6
Kasza gryczana jasna . .	13.7	Pszonica szklista „Ma-	
Kasza gryczana palona . .	13.5	nitoba II”	15.5
Maczek	4.9	Pszonica szklista „Gar-	
Kasza jaglana	13.4	net”	14.5
Kasza jęczmienna	9.8	Pszonica pół szklista	
Kasza perłowa	8.7	„Ostka Chłopska” . .	13.2
Manna	9.7	Pszonica mączysta „Dań-	
Ryż polerowany	8.0	kowska Graniatka” . .	10.8
Mąka pszenna	10.5		

mach procentowych białka, przed włączeniem do diet były one dokładnie mielone. Diety mieszano z wodą i ogrzewano na parze w celu zdekstrynowania. Skład diet podany jest w tabl. II-giej.

Szczury na dietach bez tłuszczu otrzymywały oddzielnie tran w ilości 2 kropeł dziennie, a szczury otrzymujące niedostatecznie ilości witaminy B dostawały wyciąg z drożdży piwnych w ilościach odpowiadających 0,2 — 0,3 g. suchych drożdży i zawierających 4,3 — 6,4 mg. azotu.

Doświadczenie wykonano na szczurach łaciowych, pochodzących z własnej hodowli w wieku 3 — 4 tygodni, wagi 45 — 55 g. Technika doświadczenia była podobna do opisanej poprzednio (1). Właściwy okres doświadczenia trwał 30 — 31 dni. Rozpoczął się on po okresie przygotowawczym trwającym około 7 dni, który miał na celu przyzwyczajenie zwierząt do diety.

T A B L I C A II.

Źródło białka	S k ł a d d i e t*)			
Płatki owsiane	Poziom białka (N x 6. 25)	4.1	8.0	16.2
	Płatki	23.0	45.9	95.0
	Tłuszcz masła	10.0	10.0	—
	Skrobia ryżowa	62.0	39.1	—
	Sole **)	5.0	5.0	5 0
Kasza gryczana jasna	Poziom białka (N x 6. 25)	8.4	13.4	
	Kasza	58.3	95.0	
	Tłuszcz masła	10.0	—	
	Skrobia ryżowa	26.7	—	
	Sole	5.0	5.0	
Kasza gryczana palona	Poziom białka (N x 6. 25)	8 7	12 8	
	Kasza	59 2	95 0	
	Tłuszcz masła	10 0	—	
	Skrobia ryżowa	25.8	—	
	Sole	5.0	5.0	
Maczek	Poziom białka (N x 6. 25)		4.6	
	Maczek		95 0	
	Tłuszcz masła		—	
	Skrobia ryżowa		—	
	Sole		5.0	
Kasza jaglana	Poziom białka (N x 6. 25)	8 4	12.8	
	Kasza	59 7	95.0	
	Tłuszcz masła	10 0	—	
	Skrobia ryżowa	25.3	—	
	Sole	5.0	5 0	
Kasza jęczmienna	Poziom białka (N x 6. 25)		9.2	
	Kasza		95.0	
	Tłuszcz masła		—	
	Skrobia ryżowa		—	
	Sole		5 0	
Kasza perłowa	Poziom białka (N x 6. 25)		7.6	
	Kasza		95.0	
	Tłuszcz masła		—	
	Skrobia ryżowa		—	
	Sole		5.0	
Manna	Poziom białka (N x 6. 25)		9.3	
	Kasza		95.0	
	Tłuszcz masła		—	
	Skrobia ryżowa		—	
	Sole		5.0	

Dalszy ciąg tabl. II

Źródło białka	S k ł a d d i e t*)			
Ryż polerowany	Poziom białka (N x 6.25)		7.6	
	Ryż		95.0	
	Tłuszcz masła		—	
	Skrobia ryżowa		—	
	Sole		5.0	
Mąka pszenna	Poziom białka (N x 6.25)		9.9	
	Mąka		95.0	
	Tłuszcz masła		—	
	Skrobia ryżowa		—	
	Sole		5.0	
Bułka pszenna	Poziom białka (N x 6.25)		10.0	
	Bułka		95.0	
	Tłuszcz masła		—	
	Skrobia ryżowa		—	
	Sole		5.0	
Pszemica szklista „Manitoba II“	Poziom białka (N x 6.25)	10.1		
	Pszemica	64.5		
	Tłuszcz masła	10.0		
	Skrobia ryżowa	20.5		
	Sole	5.0		
Pszemica szklista „Garnet“	Poziom białka (N x 6.25)	10.0		
	Pszemica	69.0		
	Tłuszcz masła	10.0		
	Skrobia ryżowa	16.0		
	Sole	5.0		
Pszemica półszklista „Ostka Chłopicka“	Poziom białka (N x 6.25)	10.1		
	Pszemica	75.7		
	Tłuszcz masła	10.0		
	Skrobia ryżowa	9.3		
	Sole	5.0		
Pszemica mączysta „Dańkowska Grauliatka“	Poziom białka (N x 6.25)	10.6		
	Pszemica	95.0		
	Tłuszcz masła	—		
	Skrobia ryżowa	—		
	Sole	5.0		

Szczury na dietach zawierających płatki owsiane (poziom białka 4,1%), maczek, kaszę jaglaną (poziom białka 8,4%), jęczmienną, perłową, mannę, ryż, bułkę i mąkę pszenną otrzymywały ponadto wyciąg z drożdży piwnych jako źródło witamin B.

*) Wszystkie liczby przeliczone są na suchą substancję i wyrażone w procentach.

**) Sole w-g Steenbocka Nr. 40 (5).

Z chwilą gdy dawki dzienne pożywienia należało zwiększać i szczur zaczynał stale zyskiwać na wadze rozpoczynał się właściwy okres doświadczenia. W tabl. III w dwóch ostatnich rubrykach podany jest wynik badania wartości biologicznej białka. Wartość tę wyraża stosunek przyrostu wagi szczura do ilości spożytego przezeń białka w przeciągu 30 dni doświadczenia.

Płatki owsiane badane były w trzech poziomach białkowych: 4,1% 8,0% i 16,2%. Jak widać z tablicy najwyższą wartość biologiczną białka otrzymaliśmy dla poziomu 8% białka (2,1) Wartość ta ulega obniżeniu zarówno dla wzrastającego, jak i malejącego poziomu białka w diecie (1,6 dla 4,1% i 1,7 dla 16,2%).

Kasza gryczana jasna i palona były badane w poziomie około 8% i 13% białka. Dla kaszy jasnej w obydwóch poziomach białkowych otrzymaliśmy wyniki jednakowe i wyższe niż dla palonej (2,3 — dla kaszy jasnej 1,9 — 2,0 dla kaszy palonej).

Wynik ten jest potwierdzeniem prac autorów, wskazujących na niszczący wpływ wyższych temperatur na wartość biologiczną białka. (6, 1, 7, 8,) co być może w głównej mierze jest spowodowane gorszą strawnością produktu poddanego działaniu wysokiej temperatury (9).

Niezwyczajnie wysoką wartość biologiczną wykazało białko kaszy drobnej gryczanej t. zw. mączku. Kasza ta ze względu na niską zawartość białkową (4,9%) badana była w jednym poziomie białka w diecie (4,6%). Wartość biologiczna białka zbadana na 4 szczurach wyniosła 2,8 — 3,2. Liczby te są wyjątkowo wysokie jak na białko roślinne, wskazują one jednocześnie na doskonałą przyswajalność tego białka przez organizm.

Z dwóch kasz, pochodzących z jęczmienia dla perłowej zbadanej w poziomie 7,6% białka otrzymano wartość wyższą (2,2), aniżeli dla jęczmiennej zbadanej w poziomie 9,2% (1,9).

Średnia wartość biologiczna białka ryżu polerowanego badanego w najwyższym poziomie 7,6% wyniosła 1,8.

Najniższą wartość biologiczną z badanych produktów otrzymano dla białka kaszy jaglanej, średnie wartości oznaczone w poziomach 8,4% i 12,8% nie przekraczają jedności. Wskazuje to na niską wartość odżywczą białka prosa.

T A B L I C A III.

Źródło białka w diecie	Zawartość białka (Nx6,25) w diecie w %	Pręszczyzna	Przyrost wagi=a	Ilość gramów spożytego jedzenia*, białka*) = b	Wartość biologiczna białka = a/b	Średnio
Płatki owsiane	4,1	O +	15	223,6	1,64	1,59
		O +	14	222,0	1,54	
	8,0	O +	46	273,8	2,10	2,15
		O +	46	260,2	2,21	
	16,2	O +	92	344,5	1,67	1,68
Kasza gryczana jasna		O +	94	340,9	1,70	
	8,4	O +	60	312,4	2,29	2,27
		O +	65	342,2	2,26	
	13,4	O +	103	335,5	2,29	2,26
		O +	116	388,6	2,23	
Kasza gryczana palona	8,7	O +	60	337,9	2,04	1,96
		O +	50	305,7	1,88	
	12,8	O +	99	421,8	1,83	1,88
		O +	86	346,0	1,94	
	4,6	O +	38	272,8	3,03	2,98
Maczek		O +	33	252,9	2,84	
		O +	37	288,9	2,78	
		O +	41	279,2	3,19	

Dalszy ciąg tabl. III

Źródło białka w diecie	Zawartość białka(Nx6,25) w diecie w %	Pięć szczytów	Przyrost wagi==a	Ilość gramów spożytego jedzenia*, białka*) = b	Wartość biologiczna białka = a/b	Średnio
Kasza jaglana	8,4	0 + 1 0 0 0 + 1 0	22 17	237,2 230,7	1,10 [0,88	0,99
	12,8	0 0 0 0 0 0 0	30 36	259,8 304,0	0,90 0,93	0,91
Kasza jęczmienna	9,2	1 0 0 0 0 0 0	64 70	354,2 411,6	1,96 1,85	1,90
Kasza perłowa	7,6	0 0 0 0 0 0 0	75 54	443,2 321,8	2,23 2,21	2,22
Ryż polerowany	7,6	0 0 0 0 0 0 0	40 34 37	324,0 255,5 255,9	1,62 1,75 1,90	1,76
Manna	7,8	0 0 0 0 0 0 0	36 31	284,0 285,0	1,62 1,39	1,50
	9,3	0 0 0 0 0 0 0	61 59 51 49 58	364,2 358,3 318,3 316,1 415,0	1,80 1,78 1,72 1,67 1,50	1,69

Dalszy ciąg tabl. III

Źródło białka w diecie	Zawartość białka(Nx6,25) w diecie w %	Płeć szczura	Przyrost wagi=a	Ilość gramów spożytego jedzenia*), białka*)= a	Wartość biologiczna białka=a/b	Średnio
Mąka pszenna	9,9	♂ + ♀	22 36	251,4 304,8	0,88 1,19	1,03
Butka pszenna	10,0	♂ + ♀	21 19	203,9 231,9	1,03 0,82	0,92
Pszemica szklista „Ma- nitoba II”	10,1	♂ + ♀	57 51 52	331,1 318,4 273,3	1,71 1,59 1,88	1,73
Pszemica szklista „Gur- net”	10,0	♂ + ♀	66 58 57	372,0 308,0 306,4	1,77 1,88 1,86	1,84
Pszemica pół szklista „Osika Chłopicka”	10,1	♂ + ♀	62 55 53	361,2 328,3 320,0	1,70 1,66 1,64	1,67
Pszemica mączysta „Dań- kowska Graniatka”	10,6	♂ + ♀	58 62 59	323,3 346,5 344,8	1,69 1,69 1,61	1,66

*) Przeliczone na suchą substancję.

Kasza manna badana była w poziomach 7,8% i 9,3% i wyniosła odpowiednio średnio 1,5 i 1,7. Liczby te okazały się wyższe od liczb otrzymanych przez nas uprzednio dla białka pieczywa pszennego i glutenu, które były równe jedności (1 i 3).

W celu określenia, jak zmienia się wartość biologiczna białka pszenicy zależnie od przeróbki zbadaliśmy z jednej strony mąkę pszenną i bułkę, zaś z drugiej pełne ziarno pszenicy. Produkty włączane były w poziomie 9 — 10% białka do diety.

Wyniki otrzymane dla pełnego ziarna pszenicy, oraz mąki i pieczywa (tablica III) wykazały, że wartość biologiczna białka pełnego ziarna nie różni się wiele od wartości biologicznej białka kaszy manny, jest natomiast znacznie wyższa od mąki i produktów z niej wypieczonych (1,7 — 1,8 dla pełnego ziarna, 1,7 dla manny, 1,0 dla mąki i pieczywa pszennego). Wskazuje to iż w czasie przemiału na mąkę białą odrzuca się te części ziarna, które są najbogatsze w wartościowe białko, przy wyrobie zaś kaszy części te zostają w produkcji.

Zbadanie wartości biologicznej całego szeregu pszenic szklistych lub mączystych, z których podajemy tu tylko niektóre najbardziej typowe¹⁾, doprowadziło do stwierdzenia, że nie ma różnicy pod względem jakości białka t. j. w jego wartości biologicznej między ziarnem szklistym i mączystym.

Reasumując wyniki nad wartością biologiczną kasz stwierdzamy, że prawie wszystkie (oprócz kaszy jaglanej) mają wysoką wartość biologiczną białka. Na I miejscu należy postawić kaszę gryczaną, przy tym białko kaszy drobnej krakowskiej (mączek) ma wyższą wartość, aniżeli kaszy gryczanej z pełnego ziarna. Wynik ten można sobie wytłumaczyć obecnością trudno przyswajalnych węglowodanów w pełnym ziarnie gryki, co ma prawdopodobnie wpływ ujemny na przyswajalność białka i tym samym obniża jego wartość biologiczną.

Średnia liczba 3 otrzymana dla białka kaszy mączku, stanowiącego 4,6% białka w diecie, jest niezwykle wysoka, jak na

¹⁾ Pszenicę do badań otrzymaliśmy z Zakładu Technologii Fermentacji i Produktów Spożywczych Politechniki Warszawskiej, dzięki uprzejmości prof. W. Iwanowskiego.

białko roślinne, odpowiada ona najwyższej z liczb (3,01) otrzymanych przez *Osborne'a i Mendela* (10) dla białka zwierzęcego laktoalbuminy.

Przyrost 3 g. wagi szczura na 1 g. zużytego białka jest najwyższy jaki otrzymano dla białka roślinnego, jedynie *Morgan* i współpracownicy (11) otrzymali dla pewnej pozostałości po ekstrakcji migdałów średnią liczbą 3,87 dla poziomu 4,5% białka w diecie, ale było to dla pozostałości po chemicznych zabiegach, a nie dla naturalnej mieszaniny białek. Wyniki otrzymane dla wartości biologicznej kasz wskazują na wysoką wartość odżywczą tych produktów. Ma to duże znaczenie praktyczne jeśli wziąć pod uwagę, że spożycie kasz jest u nas bardzo rozpowszechnione, zwłaszcza wśród ubogich warstw ludności, po za tym takie produkty jak macek, manna, płatki owsiane i ryż odgrywają dużą rolę w odżywianiu niemowląt, dla których stanowią poza mlekiem główne źródło białka.

Streszczenia i wnioski.

1. Zbadano wartość biologiczną białka ($N \times 6,25$) kasz najbardziej rozpowszechnionych na rynku ilościową metodą *Osborne'a* i współpracowników.

2. Najwyższą wartość biologiczną białka z badanych produktów wykazały kasze gryczane, przy tym macek miał wyższą wartość, aniżeli kasza z pełnego ziarna, dalej kasze jęczmienna i perłowa, płatki owsiane, ryż i manna. Najniższą wartość biologiczną miało białko kaszy jaglanej.

3. Wartość biologiczna białka kaszy gryczanej jasnej jest wyższa niż palonej, co przypisać należy szkodliwemu działaniu wyższej temperatury na białko.

4. Białko kaszy manny ma wyższą wartość biologiczną aniżeli białko mąki i pieczywa pszennego i prawie równą wartości biologicznej białka pszenicy z pełnego ziarna.

5. Nie stwierdzono istotnej różnicy w wartości biologicznej białka między pszenicą szklistą a mączystą.

From the State School of Hygiene, Warsaw. Laboratory for the Investigation of the nutritional value of foodstuffs. Dir. Dr. G. Szulc

THE BIOLOGICAL VALUE OF THE PROTEINS OF CORN ORIGIN.

B y

Z. MARKUZE

SUMMARY.

1. The biological value of proteins of the most used groats has been determined by the method of Osborne and his collaborators.

2. The highest biological value has been found in buckwheat groats protein. Fine buckweats was of higher value as compared with buckwheat groats from the whole seeds, the next ones were barley groats, pearl barley groats, then oats, polished rice and manna. The lowest value was found for the protein of millet gruel.

3. The biological value of light buckwheat groats is higher as compared with the dark one, which fact is probably connected with the destructive effect of higher temperature of the proteins.

4. The protein of manna is of higher value then the protein of flour and white wheat bread, and nearly equals the biological value of the protein of the whole wheat seeds.

5. No important difference was found in the biological value of the protein of the hard and soft wheat.

P I Ś M I E N N I C T W O

1. *Kon i Markuze.* (1931) Biochem. J. **25**. 1476. 2. *Markuze.* (1931) Lek. Wojsk. T. XVIII Nr. 3/4. 3. *Markuze.* (1934) Biochem J. **28**. 463. 4. *Osborne, Mendel i Ferry* (1919) J. Biol. Chem. **37**. 223. 5. *Steenbock i Nelson.* (1923) J. Biol. Chem. **56**. 355. 6. *Morgan.* (1931) J. Biol. Chem. **90**. 771. 7. *Morgan i Kern* (1934) J. Nutrition **7**. 367. 8. *Seegers i Mattill.* (1935) J. Nutrition **10**. 271. 9. *Greaves i Morgan.* (1934) Cereal Chem. **11**. 228. 10. *Osborne i Mendel.* (1916) J. Biol. Chem. **26**. 1. 11. *Morgan, Newbecker i Bridge.* (1923) Amer. J. Physiol. **67**. 173.

Wpłynęło 24.XI.1936.

Z pracowni Mikrobiologicznej Wolnej Wszechnicy Polskiej.
Kier. Prof. Dr. A. Ławrynowicz.

PRZYSTOSOWANIE SIĘ DROBNOUSTROJÓW DO WYSOKIEJ KONCENTRACJI NaCl.

P o d a ł

I. AFREMOW

Jednym z warunków zachowania równowagi życiowej komórki jest odpowiednie ciśnienie osmotyczne środowiska. Wrażliwość komórek na odchylenie od optimum ciśnienia osmotycznego nie jest jednakowa.

Wpływ zmiany ciśnienia osmotycznego środowiska może powodować reakcję komórki bakteryjnej; najdalszym stopniem tej reakcji będą plazmoliza lub plazmoptzyza komórki, pociągające za sobą jej śmierć.

Komórka w pewnych granicach może dostosowywać się do zmiany koncentracji środowiska, zwłaszcza jeśli zmiana ta następuje stopniowo. Różne gatunki bakteryjne z różną łatwością ulegają plazmolizie, np. łatwo — przecinkowiec cholery, pałeczka durowa, pałeczka okrężnicowa, trudniej — laseczka sienna, gronkowce, pakietowce. Dla zachowania równowagi osmotycznej w podłożach dodaje się zwykle soli kuchennej w ilości 0,5 — 0,8%, otrzymując na tej drodze podłoże izotoniczne dla większości bakteryj.

W szeregu licznych, typów fizjologicznych bakteryj w przyrodzie spotykamy t. zw. bakterie halofilne, t. j. posiadające zdolność wzrostu w środowisku o wysokiej zawartości NaCl. Liczni

badacze podawali istnienie tych drobnoustrojów np.: *Le Dantec* (1906), *Namysłowski* (1913), ostatnio *Schoop* (1935).

Wysoka zawartość NaCl w podłożu wpływa pobudzająco na wzrost bakteryj halofilnych (*Schoop*). Bakterie halofilne nie rosną na podłożu zawierającym KNO_3 o tym samym ciśnieniu osmotycznym. Działanie pobudzające następuje przy połączeniu jonu sodowego i chlorowego.

Bakterie halofilne występują w postaci względnie i ściśle halofilnych. Różnica pomiędzy nimi polega na tym, że dla bakteryj względnie halofilnych podłoża z wysoką koncentracją NaCl są jedynie wyrazem ich dużej tolerancji w stosunku do NaCl, gdy dla ściśle halofilnych obecność w podłożu NaCl stanowi warunek ich pomyślnego rozwoju.

Zadaniem mojej pracy było stwierdzenie możliwości przystosowania bakteryj niehalofilnych, drogą stopniowego przyzwyczajania, do wzrostu na podłożu o wysokim stężeniu NaCl. Ściśle z tym zagadnieniem wiązało się wyjaśnienie wpływu soli na zmianę własności morfologicznych oraz biochemicznych drobnoustrojów.

Zajmowałem się głównie drobnoustrojami saprofitycznymi. Obserwacji dokonałem nad następującymi grupami drobnoustrojów: drożdże - saccharomycetes, i ziarniaki - sarcyny, gronkowce, enterokoki; zarodnikowce saprofityczne; gnilne-zasadowce b. *proteus vulgare*, b. *prodigiosum*, b. *pyocyaneum*; b. *coli commune*; otoczkowce — b. *coli aerogenes* b. *lactis aerogenes*; maczugowce — coryneb. *diphtheriae*; drobnoustroje przypadkowo wyodrębnione z piwa ciemnego.

Metodyka pracy polegała na przesiewaniu bakterji na agar skośny o coraz większej koncentracji NaCl. Najczęściej zwiększałem stężenie o 1%. W pewnych przypadkach różnica ta okazała się za duża, w innych mogłem zwiększyć stężenie od razu o 2 — 3%. Dla zorientowania się co do możliwości wzrostu bakteryj na podłożach z dodatkiem NaCl, szczep wyjściowy rosnący na podłożu o stężeniu 0,5% przesiewałem równolegle na agary skośne o koncentracji NaCl. 2%, 4%, 6%, 8%, 10%. Jeżeli szczep rósł od razu obficie na podłożu zawierającym 10% soli, jako względnie halofilny, nie brałem go pod uwagę. Przyzwyczajanie

rozpoczynalem od tego, największego stężenia, przy którym bakterie wykazywały jeszcze normalny obfity wzrost. Tak więc np: jeśli szczep rósł obficie na podłożu o stężeniu 4% NaCl, a słabo przy 6% NaCl, koncentrację 4% uważałem za wyjściową. Każdego następnego przesiewu dokonywałem po 3 — 4 dniach. Dłuższe trzymanie bakterij na podłożu o tej samej koncentracji soli okazało się szkodliwe, gdyż szczepy wymierały lub też słabły do tego stopnia, iż nie rosły już nawet na agarze o niższej koncentracji z wyjątkiem podłoża normalnego, to jest zawierającego 0,5% NaCl. Pożytecznym natomiast okazało się częste przesiewanie szczepów na agar o tej samej koncentracji NaCl a dopiero po szeregu przesiewów na agar o koncentracji wyższej. Czyniłem też próby przesiewania z agaru o wyższej koncentracji na agar o niższej koncentracji NaCl, a po tym znów zwiększałem stężenie. Według jednak moich obserwacyj pozostało to bez wpływu na stopień przystosowywania się drobnoustrojów.

Przechodzę teraz do omówienia stopnia przyzwyczajania się poszczególnych zbadanych grup drobnoustrojów.

Drożdże. Do doświadczeń używałem drożdży prasowanych (piekarskie). Wszystkie zbadane szczepy (10) dało się doprowadzić do koncentracji 8 — 9% soli bez żadnych zmian morfologicznych lub biochemicznych.

Drożdże otrzymane z piwa ciemnego dały się przyzwyczaić do stężenia soli 8 — 10%, okazując daleko idącą inwolucję już na podłożu o stężeniu 2% NaCl, zwiększającą się w miarę wzrostu koncentracji. Postacie inwolucyjne występowały jako wydłużone twory dziwacznie skręcone lub też jako postacie rozgałęzione.

Ziarniaki. a) Sarcyny: Materiał pobierałem z powietrza. Z 11 szczepów, jeden tylko rósł odrazu na podłożu o koncentracji 10% NaCl. Sarcyny łatwo przystosowują się do wysokiej koncentracji soli. Na 10 zbadanych szczepów tylko 2 z trudnością dały się przyzwyczaić do stężenia 10% NaCl: przystosowały się one łatwo do podłoży o stężeniu 8% NaCl. Dopiero po 3 — 5 krotnym przesiewie na tej koncentracji NaCl przesiewając je na podłoża o wzrastającej o 0,5% zawartości NaCl, udało się doprowadzić te dwa szczepy do wzrostu na podłożu z 10%. Pozostałe szczepy przystosowały się do 14 — 15% koncentracji soli.

Czynilem też z 8 szczepami próby zwiększania koncentracji NaCl nie stopniowo, ale odrazu o 2 — 3%. Zasluguje na uwagę fakt, że posiewy skokowe dawały gorsze wyniki, gdyż na tej drodze najwyższa osiągnięta granica stanowiła 10% NaCl.

Wysoka koncentracja soli w podłożu nie wpływała na własności morfologiczne i biochemiczne sareyn. Makroskopowc wzrost był słabszy i delikatniejszy. Dotyczyło to zresztą i innych grup bakteryjnych.

b) Gronkowce: Szczepy otrzymywałem z powietrza i ropy, W przeciwieństwie do sareyn wiele szczepów rośło bezpośrednio na podłożu o koncentracji NaCl 10%. Natomiast szczepy, które należało przyzwyczajać z trudnością przystosowywały się do wysokiej koncentracji. Z 17 szczepów 11 przyzwyczaiłem do podłoża zawierającego 9 — 12% NaCl a pozostałe (z ropy) dały się doprowadzić tylko do 5 — 8% NaCl.

Na podłożach o koncentracji soli powyżej 10% gronkowce na ogół nie rosły.

T A B L I C A I

Nr. szczepu	Najwyższa koncentracja NaCl.	Nr. szczepu	Najwyższa koncentracja NaCl.
	Szczepy z powietrza		Szczepy z ropy
1	10%	4	5%
2	10%	5	6%
6	10%	9	4,5%
7	10%	15	9%
10	10%	106	8%
20	10%	G	5%
101	10%	H	6%
104	10%		
105	10%		
G 2	10%		

Wzrost na podłożach o wysokich stężeniach NaCl, wyraźnie jest słabszy, jednocześnie jest suchy, przypominający raczej zarodnikowce niż gronkowce. Zmiany mikroskopowe polegają na tym, że w niektórych szczepach przy wysokiej koncentracji NaCl w podłożu ziarniaki są większe w stosunku do rosnących na zwykłych podłożach.

Zasługuje na zaznaczenie fakt, że gronkowce saprofityczne o wiele łatwiej dostosowały się do wysokiej koncentracji NaCl, niż chorobotwórcze. Tablica poglądowo to przedstawia.

c) Enterokoki: Dwa badane szczepy przystosowały się do koncentracji 10% NaCl, bez żadnych trudności. Powyżej 10% NaCl nie rosły. Zmian biochemicznych i morfologicznych nie obserwowałem.

Zarodnikowce. Badane szczepy pochodziły z powietrza, ziemi oraz mleka. Przeważnie bakterie te rosły od razu na podłożach o stężeniu NaCl 10%, aczkolwiek o wiele subtelniej niż na 0,5% NaCl. Szczepy te można podzielić na dwie grupy. Szczepy jednej grupy z trudnością przystosowały się do koncentracji 10% soli. Dla drugiej grupy proces przyzwyczajania nie stanowił żadnej trudności.

Z 15 badanych szczepów 11 dało się doprowadzić do koncentracji 14 — 18% NaCl.

Zmian własności biochemicznych bakterij zarodnikujących w toku przyzwyczajania nie obserwowałem. Znaczne natomiast zmiany zachodziły w obrazie mikroskopowym. Na podłożu o koncentracji 10% NaCl (a w niektórych przypadkach jeszcze wcześniej przy 5% NaCl) następuje daleko idąca inwolucja. Bakterie przybierają kształty nitkowate, wygięte, podkowiaste, koliste, pętlowate.

Niekiedy obraz mikroskopowy nasuwa przypuszczenie, że zachodzi zahamowanie podziału bakterij — obserwujemy na długiej nici liczne przewężenia.

Na podkreślenie zasługuje fakt, że u niektórych, wprawdzie nielicznych szczepów, zachodzi zmiana stosunku do barwienia sposobem Grama; bakterie barwią się chwiejnie, nierównomiernie, częściowo Gr + i Gr. —.

Wzrost makroskopowy daje też zmiany i to w różnych kierunkach. U niektórych szczepów wzrost jest o wiele bardziej suchy niż normalnie, błona ściśle przylega do powierzchni agaru. U innych bakterij wzrost na podłożu o wysokiej koncentracji NaCl staje się wybitnie śluzowaty.

Najbardziej charakterystyczne są zmiany własności życiowych, polegające na częściowej lub całkowitej utracie zdolności

zarodnikowania przy wyższej koncentracji NaCl. (powyżej 10%). Szczepy przyzwyczajone przesiewałem równolegle z podłoża 5% NaCl na agary skośne o koncentracji 10% i 0,5% NaCl; po tygodniu stwierdzałem, że przy wysokiej koncentracji nie wytwarzały się zarodniki lub były nieliczne, podczas gdy na 0,5% NaCl obecne bardzo liczne zarodniki. Próbę powtarzałem po 3 tygodniach z tym samym wynikiem. Szczepy niezarodnikujące (zupełnie) mają przy wysokiej koncentracji NaCl wzrost śluzowaty.

Niezarodnikujące przy wysokim stężeniu NaCl szczepy przesiałem na bulion o koncentracji soli 10% i 0,5%. W pierwszym przypadku błonka charakterystyczna dla zarodnikowców nie wytworzyła się, w drugim była obecna. Jeśli po przesiewie (z 10% NaCl) ogrzewałem bulion przez 30 minut w temperaturze 56° — 60° C. wzrostu nie było.

Przemawia to za tym, że szczepy te nie posiadały zarodników, które wytrzymałyby temperaturę 56° — 60° C.

W porównaniu do sarcyn i gronkowców szczepy zarodnikowców wykazały dużą oporność na działanie wysokiej koncentracji NaCl, przystosowanie się do 10% chlorku sodu jest trwałe, gdyż przesianie z agaru 10% NaCl na 0,5% NaCl, dają się powtórnie wprowadzić do wysokiej koncentracji bardzo łatwo i dużymi skokami. Żywotność zarodnikowców na podłożach z 10% NaCl zachowuje się długo

Grupa bakteryj gnilnych - zasadotwórczych. a) *B. Proteus vulgare*. Badałem 10 szczepów. Z tych 6 udało mi się przyzwyczaić do koncentracji NaCl 10%, 4 tylko do 8%. Na wyższych koncentracjach (po nad 10%) żaden szczep nie rósł. Przy koncentracji NaCl. 1,5% — 3% (przeważnie 2,5 — 3,0%) następuje zahamowanie wzrostu mgławicowego. Hamujące wzrost mgławicowy działanie różnych soli obserwował *Dimitrijewic-Speth*. Część szczepów dawała wybitne zmiany inwolucyjne poczynając od koncentracji 4,5% NaCl w podłożu.

b) *B. prodigiosum* i *b. pyocyaneum*. Zbadałem 1 szczep *b. pyocyaneum* i 1 szczep *b. prodigiosum*. Oba szczepy dały się przyzwyczaić do stężenia 10% NaCl.

B. pyocyaneum stracił barwik na agarze o koncentracji 2,5% NaCl. Innych zmian morfologicznych i biochemicznych nie stwierdziłem.

Grupa b. coli. Grupa b. coli przystosowuje się do podłoż o wysokiej koncentracji NaCl z wielką trudnością. Żadnego szczepu nie udało mi się doprowadzić do koncentracji 10%. Po zastosowaniu wszystkich metod wyżej podanych tylko 2 szczepy na 11 badanych, dały słaby wzrost na podłożu o koncentracji 8% NaCl, reszta szczepów nie przekraczała granicy 5 — 7% NaCl.

Na podłożach o wysokiej koncentracji NaCl wzrost jest subtelny, nalot traci charakterystyczną szarą barwę, jest raczej przezroczysty. Zmiany inwolucyjne otrzymałem u trzech szczepów w postaci wydłużonych nici.

Otoczkowce. Zbadałem 4 szczepy b. coli aerogenes i 3 szczepy b. lactis aerogenes. Przystosowują się do 7 — 9% NaCl w podłożu, dając kolonie o wyglądzie mniej śluzowatym.

Maczugowce. Trzy szczepy maczugowców błonicy dały się dostosować do koncentracji soli 5 — 6%.

* *

Stopień przystosowania się zbadanych drobnoustrojów do wysokiej koncentracji NaCl w podłożu podaje tablica II.

T A B L I C A I I

Gatunek drobnoustr.	Granice przyst. do wys. centr. NaCl.
zarodnikowce . . .	8 — 18%
sarcyny . . .	10 — 15%
gronkowce saprofityczne . . .	10 — 12%
b. proteus . . .	8 — 10%
drożdże . . .	8 — 9%
otoczkowce . . .	7 — 9%
b. coli commune . . .	5 — 8%
gronkowce chorob. . .	5 — 9%
macz błonicy . . .	5 — 6%

Układając poszczególne bakterie według zdolności przystosowania się do wysokich stężeń NaCl, otrzymamy następujący szereg: Zarodn. > sarcyny, gronk. saprofit. > b. proteus >

drożdże > otoczkowce > b. coli com. > gronk. chorob. > maczug. błonicy.

Po za wyżej podanymi spostrzeżeniami podjąłem próby przyzwyczajania bakterij względnie halofilnych (t. j. rosnących od pierwszego posiewu na podłożach zawierających 10% NaCl do wyższych stężeń NaCl. Na tej drodze otrzymałem.

1. szczep sarcyny rosnący na 20% NaCl.
2. szczepy zarodnikowców rosnące na 21% NaCl.
3. szczepy gronkowców rosnące na 27% NaCl.

W warunkach naturalnych znane są bakterie rosnące na podłożach o tak wysokiej koncentracji. *Lewandowski* (cyt. w/g. *Mischustin*) wyodrębnił z ziemi ogrodowej bakterie wykazujące wzrost na 25% NaCl. *Petrow* (r. 1929) w toku badań nad mikroflorą soli pochodzącej z jezior słonych, używanej do konserwacji produktów spożywczych, otrzymał 12 gatunków rozmaitych bakterij, rosnących dobrze w środowisku zawierającym do 35,9% NaCl (nasyconym).

Ze spostrzeżeń wynika możliwość powodowania przez bakterie procesów rozkładowych w produktach spożywczych, konserwowanych z dużą zawartością NaCl. Wszystkie bowiem bakterie, które posiadały zdolność wywoływania procesów fermentacyjnych (peptonizacja, peptoliza, glikoliza), zachowały ją na wysokich stężeniach NaCl. Ponieważ bakterie gnilne mogą się znajdować w produktach spożywczych, stąd zdaje się wynikać, że solenie nie zawsze zabezpiecza przed procesami rozkładowymi pochodzenia bakteryjnego.

Wnioski. 1) Zdolność przystosowania się bakterij do podłóż o wysokiej koncentracji NaCl pozostaje w pewnym stosunku do stopnia ich saprofityzmu. Im wyraźniejsze własności chorobotwórcze mają bakterie, tym mniej są one odporne w stosunku do wysokich stężeń NaCl.

2) Duża koncentracja NaCl wpływa na morfologię mikroskopową i makroskopową, oraz w niektórych przypadkach na funkcje życiowe bakterij, natomiast zmian własności biochemicznych nie wywołuje.

3) Wysokie stężenie NaCl obniża żywotność większości spostrzeganych szczepów (inwolucja szybkie wymieranie).

4) Bakterie mogą zachować żywotność i swoje własności biochemiczne w środowiskach o wysokiej koncentracji NaCl.

Laboratoire Microbiologique de l'Université Libre de Pologne.
Directeur Prof. Dr. A. Ławrynowicz.

ADAPTATION DES MICROBES A LA HAUTE CONCENTRATION DE NaCl DANS LE MILIEU.

P a r

I. AFREMOW

R É S U M É.

L'auteur a étudié la possibilité de l'adaptation des microbes à la haute concentration de NaCl au moyen de repiquages sur les milieux contenant de quantités progressives de NaCl.

Les conclusions de l'auteur sont les suivantes :

1. L'adaptation des microbes à la haute concentration de NaCl est en certain rapport avec le degré de leur saprophytisme. Les bactéries pathogènes sont résistantes à des hautes concentrations de NaCl.

2. La haute concentration de NaCl exerce une influence sur la morphologie microscopique et macroscopique et dans certains cas sur les fonctions vitales des bactéries. Les changements biochimiques ne se manifestent pas.

3. La haute concentration de NaCl abaisse la vitalité de la plupart de souches.

4. Certains microbes peuvent garder leur vitalité et leurs propriétés dans les milieux à la haute concentration de NaCl.

P I Ś M I E N N I C T W O.

1. *Dimitrijević Speth*. Centralb. f. Bact. Or. 121, s. 437, 1932. 2. *Namyśłowski B.* Bull. internat. de Séances d'Acad. de Cracovie 1913. 3. *Mischustin E. W.* Centralb. für Bact. II Abt. T. 93, s. 371. 4. *Leszczenko*. Prace Wydz. Chorób Rośl. P. I. G. W. Bydgoszcz, 1928 r. 5. *Petrow*, Mikrobiol. Żurnal., Tom IX, Zeszyt I. 6. *Schoop*. Centralb. für Bact. I, Abt., Tom 134 r. 1935).

Wpłynęło 19.XII.1936

Z Zakładu Patologii Ogólnej i Doświadczalnej U. J. P. w Warszawie.
Kierownik Prof. Dr. F. Venulet.

WPLYW PROTEINOTERAPII NA UKŁAD SIATECZKOWO-ŚRÓDBŁONKOWY.

P o d a ł

J. M. MILLER

Proteinoterapia polega na pozajelitowym wprowadzeniu nieswoistych ciał białkowych, które wywołują mniej lub silniej zaznaczony odczyn ze strony ustroju. Do ciał takich należą: mleko i jego preparaty, surowica normalna, pepton, zawiesiny bakterii i inne. Proteinoterapia znajduje szerokie zastosowanie w leczeniu już od r. 1914 (*Schmidt i Saxl*). Stosujemy ją obecnie w najróżnorodniejszych sprawach chorobowych.

Mechanizm działania proteinoterapii nie jest jeszcze całkowicie wyjaśniony. Zestawiając wszystkie zdania, wygłoszone na ten temat, możemy powiedzieć, że pod wpływem produktów rozpadu białka zachodzą zmiany fizykalne i chemiczne we krwi, oraz zmiany w czynnościach tkanek i narządów.

Pierwszy *Weichardt* wykazał wzmoczenie rozmaitych czynności ustroju pod wpływem wstrzykiwań białka. Jest ono wyrazem spotęgowania procesów życiowych zarodki. Zachodzi tu zatem wzmoczenie przemiany materii, w następstwie pobudzenia czynności gruczołów dokrewnych, pobudzenia układu nerwowo ośrodkowego i wegetatywnego. Spotykamy również zmiany we krwi, jako to: leukocytozę, zwiększoną krzepliwość i t. d. Poza

tym wzmagają się czynności obronne ustroju. Występuje wzmożona produkcja różnych ciał odpornościowych zwłaszcza w organizmach uodpornionych. Między innymi pod wpływem wstrzykiwania mleka spostrzegano narastanie miana zlepnego u zwierząt uodpornionych (*Venulet*).

Jak wiadomo, *Miecznikow* pierwszy stwierdził udział makro i mikrofagów w walce z drobnoustrojami. Obecnie ustalono, że wszystkie komórki, zaliczane do układu siateczkowo-śródbłonkowego, biorą udział w zwalczaniu zakażeń (*Aschoff, Landau*). Największym zbiornikiem komórek układu siateczkowo-śródbłonkowego jest śledziona. Z drugiej strony *Pfeiffer* wykazał, że śledziona jest głównym ośrodkiem powstawania ciał odpornościowych.

Do najbardziej charakterystycznych własności układu siateczkowego zaliczamy zdolność żerną jego komórek. Stwierdzono, że nie tylko drobnoustroje są wychwytywane przez komórki układu siateczkowo-śródbłonkowego, gdzie ulegają zniszczeniu przez trawienie. Zdolność żerna komórek układu siateczkowo-śródbłonkowego przejawia się także w stosunku do barwików i innych ciał, posiadających ujemny ładunek elektryczny. Badanie zatem tej funkcji u. s. ś. jest najlepszym sprawdzianem jego wydolności.

Na szczególną uwagę zasługują prace *H. Adlera i F. Reimana*. Badali oni zdolność wychwytywania czerwieni kongo przez komórki u. s. ś. w różnych stanach chorobowych i stwierdzili, że w zakażeniach ciężkich (posocznica, ropnica, zapalenie płuc włóknikowe), kończących się zejściem śmiertelnym, występuje zupełne porażenie układu siateczkowo-śródbłonkowego. W zakażeniach lżejszych mamy do czynienia z osłabieniem czynności tego układu.

Wobec tych faktów przypuszczać należy, że podrażnienie układu siateczkowo-śródbłonkowego wpływa dodatnio na czynności obronne ustroju, podrażnienie to wywołuje wzmożenie czynności żernej układu co się uwidoczni w przyspieszonym znikaniu barwnika wprowadzonego do krwi.

Pobudzenie układu siateczkowo-śródbłonkowego można uzyskać drogą pośrednią jak i bezpośrednią za pomocą rozmaitych

czynników. Przede wszystkim osiągamy przez wstrzykiwanie koloidowych metali, ciał białkowych, węgla aktywowanego. *Leites i Riabow* stwierdzają, że odczyn układu na te czynniki przebiega dwufazowo: początkowo zdolność żerna zmniejsza się, co dowodzi pewnego porażenia układu; później następuje wzmożenie tej czynności, czyli podrażnienie komórek u. s. ś. Co do oddziaływania pośredniego na u. s. ś. to, jak wykazały pewne doświadczenia, pod wpływem takich czynników fizykalnych, jak ogrzewanie skóry, naświetlanie i t. p. szybkość wychwytywania barwika przez komórki u. s. ś. wzmagą się (*Podsorow i Badjul*).

Na stan czynnościowy układu mogą zatem wpływać najrozmaitsze bodźce. Wśród nich pod względem skuteczności działania jedno z pierwszych miejsc zajmuje proteinoterapia. Drażniące działanie produktów rozpadu białka, wprowadzonego pozajelitowo, na komórki u. s. ś. wpływa dodatnio na przebieg chorób zakaźnych.

W pracy niniejszej chodziło o wykazanie wpływu pozajelitowego wprowadzenia mleka, wyjałowionego przez gotowanie, na zdolność żerną komórek u. s. ś. przy czym wyniki rejestrowano w zależności od dawki mleka i czasu jej działania. Wyniki były różne.

Doświadczenia przeprowadzono na jedenastu psach w warunkach prawidłowych. W tym celu wstrzykiwano psom naczeczko do żyły szyjnej czerwien Kongo w ilości 2 mg. na kg. wagi 1% roztwór barwnika przygotowany na soli fizjologicznej. Oznaczenia ilości barwnika w osoczu dokonywano na próbach krwi pobranych z żyły szyjnej w ilości 5 ccm., po upływie 2', 4', 6', 8', 15', po wprowadzeniu barwnika i dalej co 15 min. Badania przeprowadzano aż do czasu zupełnego zniknięcia barwnika z osocza. Krew po pobraniu mieszano z 1 ccm. 1% roztworu szczawianu amonu i odwirowywano w ciągu 10 min. Dzięki starannemu przygotowaniu odczynników, oraz ostrożnemu pobieraniu krwi, unikano zawsze hemolizy. Oznaczeń dokonywano w kolorymetrze Authenritha. Stężenie barwika obliczano w mg. na 100 ccm krwi. Dla większej przejrzystości wyników, poza wykresami, obliczano procentowy stosunek znikania barwnika przyjmując za 100%, stężenie barwnika we krwi w drugiej minucie po jego wprowadzeniu.

Po oznaczeniu krzywej prawidłowej, w kilka dni później, wstrzykiwaliśmy psom domięśniowo różne dawki mleka wyjałowionego przez gotowanie. Następnie, po upływie 6, 12, 24, 72, 120 godzin od chwili wstrzyknięcia, w sposób wyżej podany, oznaczaliśmy szybkość znikania czerwieni Kongo.

W pierwszej serii przeprowadzonych doświadczeń badaliśmy wpływ wstrzykiwań domięśniowych mleka wyjałowionego w dawce 3 ccm. po upływie 24 godzin od wstrzyknięcia. Wyniki badań były następujące.

Doświadczenie I. Pies wagi 12,9 kg.

Wstrzykiwano przy każdym badaniu 25,8 mgm. czerwieni Kongo 1% roztworze dożylnie.

21.VI.34 r. Badanie wstępne.

25.VI.34 r. Wstrzyknięto 3 ccm mleka wyjałowionego domięśniowo.

26.VI.34 r. Badanie w 24 godziny po wstrzyknięciu mleka.

Czas	Badanie wstępne		Badanie w 24 godz. po wstrzyknięciu 3 ccm mleka	
	Ilość czerw. Kongo w mgm/100 ccm krwi	Stosunek znikania barwika w %	Ilość czerw. Kongo w mgm/100 ccm krwi	Stosunek znikania barwika w %
2'	2,85	100,0	2,91	100,0
4'	—	—	2,64	91,0
6'	2,71	95,1	2,36	81,1
8'	2,42	84,9	—	—
15'	2,12	75,3	1,81	62,2
30'	1,21	42,7	1,12	38,4
45'	0,72	28,7	ślady	—
60'	ślady	—	niema śladów	—

Doświadczenie II. Pies wagi 20 kg.

Wstrzykiwano przy każdym badaniu 40 mgm. czerwieni Kongo w 1% roztworze dożylnie.

19.IX.34 r. Badanie wstępne.

24.IX.34 r. Wstrzyknięto 3 ccm mleka wyjałowionego domięśniowo.

25.IX.34 r. Badanie w 24 godz. po wstrzyknięciu mleka.

Czas	Badanie wstępne		Badanie w 24 godz. po wstrzyknięciu 3 ccm mleka	
	Ilość czerw. Kongo w mgm/100 ccm krwi	Stosunek znikania barwika w %	Ilość czerw. Kongo w mgm/100 ccm krwi	Stosunek znikania barwika w %
2'	2,73	100,0	2,64	100,0
4'	2,71	99,0	—	—
6'	2,25	83,5	2,56	96,9
8'	—	—	2,44	92,3
15'	2,20	81,3	1,96	74,2
30'	1,58	57,8	1,20	45,4
45'	1,03	37,7	0,84	31,8
60'	ślady	—	ślady	—

Doświadczenie III. Pies wagi 9,5 kg.

Wstrzykiwano przy każdym badaniu 19 mgm. czerwieni Kongo w 1% roztworze dożylnie.

24.IX.34 r. Badanie wstępne.

2.X.34 r. Wstrzyknięto 3 ccm. mleka wyjąłownego domięśniowo.

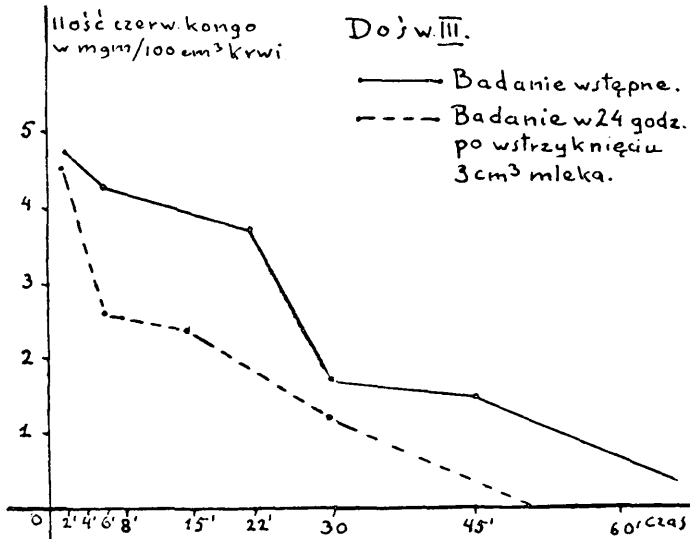
3.X.34 r. Badanie w 24 godz. po wstrzyknięciu mleka.

Czas	Badanie wstępne		Badanie w 24 godz. po wstrzyknięciu 3 ccm. mleka	
	Ilość czerw. Kongo w mgm/100 ccm krwi	Stosunek znikania barwika w %	Ilość czerw. Kongo w mgm/100 ccm krwi	Stosunek znikania barwika w %
2'	4,80	100,0	4,48	100,0
4'	—	—	—	—
6'	4,46	92,9	2,61	58,2
8'	—	—	2,59	57,8
15'	3,67	76,4	2,49	55,5
30'	1,82	37,9	1,32	29,4
45'	1,66	34,5	0,48	10,7
60'	ślady	—	śladów niema	—

Wyniki doświadczenia III przedstawione na wykresie:

Na podstawie powyższych badań możemy stwierdzić, że dawka mleka 3 ccm. wprowadzona domięśniowo, wywołuje u psów, po upływie 24 godzin, wzmożenie czynności u. s. ś. Zaznacza się

to we wszystkich trzech wypadkach, a szczególnie w doświadczeniu ostatnim. Gdy w normie mamy u tego psa po upływie 45 minut 34,5% wprowadzonego barwika, to po zastosowaniu mleka, po tym samym czasie, stwierdzamy już tylko 10,7% niewychwytanego barwnika we krwi.



W dalszych badaniach stosowano tę samą dawkę mleka t. j. 3 cem. Obecnie jednak odczyn ze strony u. s. ś. badano po upływie różnych odstępów czasu, a mianowicie po 6, 12 i 24 godz.

Doświadczenie IV. Pies wagi 13 kg.

Wstrzykiwano przy każdym badaniu 26 mgm. czerwieni Kongo w 1% roztworze dożylnie.

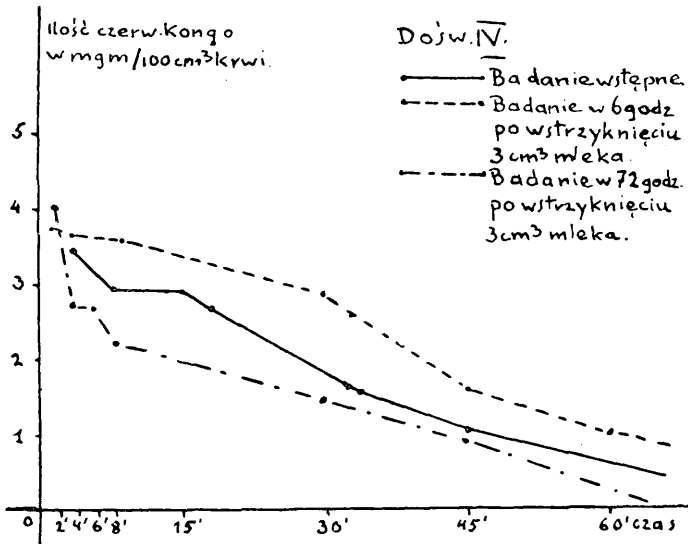
28.XI.34 r. Badanie wstępne.

3.XII.34 r. Godz. 8 min. 30. Wstrzyknięto 3 cem. mleka wyjałowionego domięśniowo. Godz. 14 min. 30. Badanie w 6 godz. po wstrzyknięciu mleka.

6.XII.34 r. Godz. 8 min. 30. Badanie w 72 godz. po wstrzyknięciu mleka.

Czas	Badanie wstępne		Badanie w 6 godz. po wstrzyknięciu 3 ccm. mleka		Badanie w 75 godz. po wstrzyknięciu 3 ccm. mleka	
	Ilość czerw. Kongo w mgm/100 ccm. krwi	Stosunek znikania barwika w %	Ilość czerw. Kongo w mgm/100 ccm. krwi	Stosunek znikania barwika w %	Ilość czerw. Kongo w mgm/100 ccm. krwi	Stosunek znikania barwika w %
2'	—	—	3,84	100,0	4,07	100,0
4'	3,57	100,0	3,74	97,4	2,68	65,8
6'	—	—	—	—	2,64	64,8
8'	3,00	84,6	3,67	95,5	2,24	55,0
15'	2,67	74,7	3,00	78,1	—	—
30'	1,57	43,6	2,90	75,5	1,48	36,2
45'	1,08	30,2	1,69	44,0	0,96	23,5
60'	ślady	—	1,12	29,1	ślady	—

Wyniki doświadczenia IV przedstawione na wykresie:



Doświadczenie V. Pies wagi 16,7 kg.

Wstrzykiwano przy każdym badaniu 33,4 mgm. czerwieni Kongo w 1% roztworze dożylnie.

14.XII.34 r. Badanie wstępne.

14.XII.34 r. Godz. 8 min. 30 wstrzyknięto 3 ccm. mleka wyjąłowego domięśniowo. Godz. 14 min. 30. Badanie w 6 godz. po wstrzyknięciu mleka. Godz. 20 min. 30. Badanie w 12 godzin po wstrzyknięciu mleka.

Czas	Badanie wstępne		Badanie w 6 godz. po wstrzyknięciu 3 ccm. mleka		Badanie w 12 godz. po wstrzyknięciu 3 ccm. mleka	
	Ilość czerw. Kongo w mgm/100 ccm. krwi	Stosunek znikania barwika w %	Ilość czerw. Kongo w mgm/100 ccm. krwi	Stosunek znikania barwika w %	Ilość czerw. Kongo w mgm/100 ccm. krwi	Stosunek znikania barwika w %
2'	3,21	100,0	3,67	100,0	4,42	100,0
4'	3,02	94,0	3,67	100,0	3,77	85,2
6'	2,83	88,1	3,38	92,1	—	—
8'	2,71	84,4	—	—	—	—
15'	2,17	67,6	3,13	85,2	2,71	83,9
30'	1,68	52,6	1,68	45,7	2,25	50,9
45'	0,94	29,2	0,69	26,1	—	—
60'	ślady	—	ślady	—	1,48	33,4

Otrzymane wyniki przemawiają za tym, że zarówno po sześciu, jak i po dwunastu godzinach po wprowadzeniu psom 3 ccm. mleka mamy dość znaczne zwolnienie wychwytywania barwika. Świadczy to o porażeniu czynności u. s. ś. w pierwszych 12 godzinach po zastosowaniu mleka. Natomiast po upływie 72 godzin, mamy w doświadczeniu IV wyraźne wzmożenie zdolności żernej układu. Krzywa, wyrażająca zawartość czerwieni Kongo we krwi, opada szybciej w porównaniu z normą.

W następnych doświadczeniach chodziło nam o wykazanie wpływu mniejszych dawek mleka, t. j. 1 ccm., oraz o działanie tej dawki w zależności od czasu.

Wyniki tej serii badań były następujące:

Doświadczenie I. Suka wagi 15,2 kg.

Wstrzykiwano przy każdym badaniu 22,4 mgm. czerwieni Kongo w 1% roztworze dożylnie.

17.XI.34 r. Badanie wstępne.

19.XI.34 r. Godz. 10. Wstrzyknięto 1 ccm. mleka wyjąłowego domięśniowo.

20.XI.34 r. Godz. 10. Badanie w 24 godz. po wstrzyknięciu mleka.

Czas	Badanie wstępne		Badanie w 24 godz. po wstrzyknięciu 1 ccm mleka	
	Ilość czerw. Kongo w mgm/100 ccm krwi	Stosunek znikania barwika w %	Ilość czerw. Kongo w mgm/100 ccm krwi	Stosunek znikania barwika w %
2'	—	—	3,00	100,0
4'	2,92	100,0	2,73	91,0
6'	—	—	—	—
8'	2,21	75,6	2,05	68,3
15'	1,58	54,1	—	—
30'	1,12	38,3	0,84	28,0
45'	ślady	—	ślady	—
60'	niema śladów	—	niema śladów	—

Doświadczenie II. Pies wilk wagi 15,7 kg.

Wstrzykiwano przy każdym badaniu 31,4 mgm. czerwieni Kongo w 1% roztworze, dożylnie.

30.X.34 r. Badanie wstępne.

7.XI.34 r. Godz. 13. Wstrzyknięto 1 ccm mleka wyjąłowego domięśniowo.

8.XI.34 r. Godz. 13. Badanie po 24 godz. po wstrzyknięciu mleka.

10.XI.34 r. Badanie w 72 godz. po wstrzyknięciu mleka.

Czas	Badanie wstępne		Badanie w 24 godz. po wstrzyknięciu 1 ccm mleka		Badanie w 72 godz. po wstrzyknięciu 1 ccm mleka	
	Ilość czerw. Kongo w mgm/100 ccm krwi	Stosunek znikania barwika w %	Ilość czerw. Kongo w mgm/100 ccm krwi	Stosunek znikania barwika w %	Ilość czerw. Kongo w mgm/100 ccm krwi	Stosunek znikania barwika w %
2'	3,80	100,0	3,48	100,0	3,40	100,0
4'	—	—	3,48	100,0	2,90	85,3
6'	3,64	95,7	2,97	85,3	2,64	77,6
8'	—	—	—	—	2,64	77,6
15'	2,64	69,4	2,97	85,3	2,45	72,0
30'	1,58	41,5	ślady	—	1,46	42,9
45'	ślady	—	niema śladów	—	ślady	—
60'	niema śladów	—	—	—	niema śladów	—

Doświadczenie III. Suka wilk wagi 28,8 kg.

Wstrzykiwano przy każdym badaniu 57 mgm czerwieni Kongo w 1% roztworze, dożylnie.

24.XI.34 r. Badanie wstępne.

28.XI.34 r. Godz. 12. Wstrzyknięto 1 ccm mleka wyjąłowego domięśniowo.

29.XI.34 r. Godz. 12. Badanie w 24 godz. po wprowadzeniu mleka.

1.XII.34 r. Badanie w 72 godz. po wprowadzeniu mleka.

3.XII.34 r. Badanie w 120 godz. po wprowadzeniu mleka.

Czas	Badanie wstępne		Badanie w 24 godz. po wstrzyknięciu 1 ccm mleka		Badanie w 72 godz. po wstrzyknięciu 1 ccm mleka		Badanie w 120 godz. po wstrzyknięciu 1 ccm mleka	
	Ilość czerw. Kongo w mgm/100 ccm krwi	Stosunek znikania barwika w %	Ilość czerw. Kongo w mgm/100 ccm krwi	Stosunek znikania barwika w %	Ilość czerw. Kongo w mgm/100 ccm krwi	Stosunek znikania barwika w %	Ilość czerw. Kongo w mgm/100 ccm krwi	Stosunek znikania barwika w %
2'	4,29	100,0	3,96	100,0	3,38	100,0	4,39	100,0
4'	3,90	90,9	—	—	3,09	91,4	3,44	78,3
6'	—	—	3,43	86,6	3,07	90,8	3,19	72,6
8'	—	—	3,28	82,8	—	—	—	—
15'	2,16	50,3	—	—	2,35	69,5	3,12	71,0
30'	1,58	36,8	1,50	37,8	1,11	32,8	1,87	42,6
45'	ślady	—	ślady	—	ślady	—	1,18	26,9
60'	niema śladów	—	niema śladów	—	niema śladów	—	ślady	—

Doświadczenia te wykazały, że dawka 1 ccm mleka również pobudza u. s. ś. u psów po upływie 24 godzin. Przyspieszenie znikania czerwieni Kongo z krwi zaznacza się jednak mniej wyraźnie, niż po zastosowaniu 3 ccm mleka. Działanie 1 ccm. mleka występuje wyraźniej po upływie 72 godz. (Doświadczenie II i III).

W ostatnim doświadczeniu stwierdzamy, że, po dłuższym okresie czasu, t. j. po 120 godz. zaznacza się upośledzenie wychwytywania czerwieni Kongo. Świadczy to o przejściu okresu podrażnienia u. s. ś. w stan osłabienia jego czynności.

W ostatniej grupie badań staraliśmy się stwierdzić jak działają na układ większe dawki mleka — 9 ccm. Badanie czynnościowe przeprowadzaliśmy po 24 godz. od chwili wprowadzenia mleka.

Otrzymaliśmy następujące wyniki:

Doświadczenie I. Pies wagi 22 kg.

Wstrzykiwano przy każdym badaniu 44 mgm. czerwieni Kongo w 1% roztw.

1.X.34 r. Badanie wstępne.

8.X.34 r. Godz. 11. Wstrzyknięto 9 ccm mleka wyjałowionego.

9.X.34 r. Badanie w 24 godz. po wstrzyknięciu mleka.

Czas	Badania wstępne		Badania w 24 godz. po wstrzyknięciu 9 ccm mleka	
	Ilość czerw. Kongo w mgm/100 ccm krwi	Stosunek znikania barwika w %	Ilość czerw. Kongo w mgm/100 ccm krwi	Stosunek znikania barwika w %
2'	3,34	100,0	3,75	100,0
4'	3,09	92,5	3,40	90,6
6'	3,00	89,8	3,28	87,4
8'	—	—	3,28	87,4
15'	2,80	84,9	2,49	66,4
30'	1,48	44,9	1,58	42,7
45'	0,83	24,8	0,66	17,6
60'	ślady	—	ślady	—

Doświadczenie II. Pies wagi 22,7 kg.

Wstrzykiwano przy każdym badaniu 45,4 mgm czerwieni Kongo w 1% roztworze dożylnie.

4 X.34 r. Badanie wstępne.

10.X.34 r. Godz. 9 min. 20. Wstrzyknięto 9 ccm mleka wyjałowionego domięśniowo.

11.X.34 r. Badanie w 24 godz. po wprowadzeniu mleka.

Czas	Badanie wstępne		Badanie w 24 godz. po wstrzyknięciu 9 ccm mleka	
	Ilość czerw. Kongo w mgm/100 ccm krwi	Stosunek znikania barwika w %	Ilość czerw. Kongo w mgm/100 ccm krwi	Stosunek znikania barwika w %
2'	3,09	100,0	3,14	100,0
4'	2,68	86,7	2,73	86,9
6'	—	—	2,73	86,9
8'	—	—	2,04	64,9
15'	1,72	55,6	1,87	59,5
30'	0,81	26,2	—	—
45'	ślady	—	ślady	—
60'	nie ma śladów	—	nie ma śladów	—

Stosowanie dawki 9 ccm mleka wykazało w dwóch doświadczeniach, że ilość ta, po upływie 24 godz., nie ma prawie żadnego wpływu na czynność wychwytywania barwnika.

Zestawiając wyniki otrzymane na podstawie przeprowadzonych doświadczeń, możemy wysunąć następujące wnioski:

1) Wprowadzenie psom drogą pozajelitową mleka, wywołuje zmiany w czynności żernej u. s. ś.

2) Dawka 1 — 3 ccm mleka wyjałowionego, wprowadzona domięśniowo pobudza zdolność wychwytywania barwnika z krwi przez u. s. ś., przy czym optimum działania występuje po upływie 24 godz. od chwili wstrzyknięcia.

3) W początkowym i końcowym okresie działania, t. j. w ciągu pierwszych 12 godz. i po upływie 120 godz. po wprowadzeniu mleka występuje upośledzenie czynności żernej u. s. ś.

4) Większe dawki mleka (9 ccm.) nie mają wyraźnego wpływu na szybkość wychwytywania ezerwieni Kongo.

Czuję się w obowiązku podziękować serdecznie p. Prof dr *F. Venuletowi* oraz p. dr Doc. *F. Goebłowi*, za umożliwienie mi zrobienia powyższej pracy i cenne wskazówki przy jej wykonywaniu.

De l'Institut de Pathologie Générale et Expérimentale de l'Université J. P.
à Varsowie. Directeur: Prof. Dr. F. Venulet.

INFLUENCE DE LA PROTÉINOTHÉRAPIE SUR LE SYSTÈME RÉTICULO-ENDOTHÉLIAL.

P a r

J. M. MILLER

R É S U M É.

Il s'agissait dans ce travail de mettre en évidence l'influence de l'introduction parentérale du lait stérilisé par la chaleur sur le pouvoir phagocytaire des cellules du s.r.-e. Les résultats en ont été enregistrés selon la dose du lait et la durée de son action.

Les expériences ont porté sur 11 chiens. Afin de déterminer la vitesse avec laquelle le colorant disparaissait du sang chez chacun d'eux, dans des conditions normales et après l'injection intramusculaire de diverses doses du lait stérilisé, on leur injectait à jeun, dans la veine jugulaire, le rouge Kongo à raison de 2 mg par 1 kg de poids du corps, en solution à 1‰ dans la solution physiologique du sel. On déterminait la quantité du colorant dans le sérum à l'aide du colorimètre d'Autenrith sur des échantillons à 5 cc. de sang, prélevés de la jugulaire, 2, 4, 6, 8 et 15 minutes après l'injection du colorant et puis tous les quarts d'heure jusqu'à la disparition complète du colorant du sang. Pour obtenir le sérum pur, dépourvu des traces d'hémolyse, on mélangeait le sang, soigneusement prélevé, avec lcc. de solution du citrate de soude à 1‰ et on le centrifugait pendant 10 minutes.

Les expériences ont été effectuées en quatre séries. Dans la première, on examinait l'influence de l'injection intramusculaire du lait, à la dose de 3 cc., après 24 h. Dans la seconde, on étudiait la réaction du s.r.-e. à l'injection de la dose égale de lait après 6, 12 et 24 h., et dans la troisième, l'action de 1 cc. de lait après divers intervalles de temps. Enfin, dans la dernière

série, on cherchait à mettre en évidence l'action de 9 cc. de lait après 24 h.

Les résultats de ces expériences ont permis d'aboutir aux conclusions suivantes:

1° l'introduction parentérale du lait provoque chez les chiens, des modifications dans le pouvoir phagocytaire du s.r.-e.;

2° la dose de 1 à 3 cc. de lait stérilisé, injecté dans le muscle, excite la faculté du s.r.-e. de capturer le colorant contenu dans le sang; l'optimum de l'action est atteint en 24 h. après l'injection;

3° aux stades initial et final de l'action, c. à d. au cours des premières 12 h. et après 120 h. du moment de l'injection du lait, une diminution du pouvoir phagocytaire du s.r.-e. se fait observer;

4° les doses plus massives (9 cc.) de lait n'exercent pas une influence nette sur la rapidité de capturation du rouge Kongo.

P I Ś M I E N N I C T W O .

1) *Adler H. i Reimann R.* Zeit. f. g. exp. Med. 1925 r., str. 617. 2) *Celarek J.* Zarys lecznictwa swoistego w chorobach zakaźnych czyli surowice i szczepionki. Warszawa, 1931 r. 3) *Goebel F. i Miller J. M.* Medycyna Nr 15, 1935. 4) *Goldman J.* Warsz. Czasop. Lek. Nr 50. 1933. 5) *Podsorow N. A i Badjul A. A.* Zeit. f. g. exp. Med. Nr 74. 1931. 6) *Szczeklik P. G.* Lek. Nr 6 1928. 7) *Venulet F.* Polskie Archiw. Med. Wewn. T. VIII. 1929. 8) *Venulet F.* Ped. Polska T. II. 1921.

Wpłynęło 4.1.1937.

Z Państwowego Zakładu Higieny. Dział Bakteriologii i Medycyny Doświadczalnej.

BADANIA NAD BIOLOGIĄ MACZUGOWCÓW BŁONICY POCHODZĄCYCH Z OBECNEJ EPIDEMII.

(Prace wykonane pod kierunkiem Doc. F. Przesmyckiego)

Doniesienie III.

W sprawie stałości typów w obrębie maczugowców błonicy.

Podąa

JULIA SEYDEL

Wybitny polimorfizm charakteryzujący pałeczki z grupy maczugowców błonicznych już oddawna skłaniał badaczy do ustalenia pewnych kryteriów, na zasadzie których udaloby się przeprowadzić dokładniejszą systematykę tych drobno-ustrojów. Próby podziału maczugowców błonicy na typy, które pojawiły się w ostatnich czasach (1931 rok) zawdzięczamy prof. Mac Leod'owi i jego współpracownikom. W badaniach swych badacze ci uwzględniali własności morfologiczne, hodowlane, biochemiczne, serologiczne i jadowitość szczepów. Zdaniem ich w obrębie maczugowców błonicy występują tak jaskrawe różnice, że pozwalają one na wyodrębnienie trzech typów, które badacze nazwali gravis, mitis i intermedius. Jak sama nazwa wskazuje autorzy dopatrują się związku między typem maczugowca, wywołującym chorobę a jej przebiegiem.

W pierwszym doniesieniu — w 1931 roku stwierdzają autorzy angielscy, że te trzy typy maczugowców błonicznych cechuje pewna stałość cech, jednakże inni badacze potwierdzić tego nie mogli, zauważyli oni bowiem w niektórych szczepach

pewną skłonność do zmian. Jak to wykazały prace *Christison*, *Robinsona* i in. zmienność dotyczy nie tylko morfologii kolonii, lecz również i charakteru wzrostu w bulionie i na podłożach z krwią. Jedyną stałą cechą charakterystyczną tych drobnoustrojów są, zdaniem *Christison* i *Robinsona*, własności fermentacyjne w stosunku do wyższych węglowodanów.

Niektórzy autorzy aczkolwiek nie mogli stwierdzić zmienności w obrębie typu, wyodrębniali czasami szczepy, które określali jako nietypowe. Szczepy takie posiadały jedynie pewną część zespołu charakteryzującego jeden, bądź drugi, bądź trzeci typ.

Podczas gdy dla jednych autorów nietypowe szczepy są wyrazem zmienności drobnoustrojów, *Hammerschmidt* (r. 1924) uważa je za mieszaninę dwóch typów, w której przeważać mogą cechy jednego lub też drugiego typu. Badania swoje przeprowadza autor na agarze głodowym uważa bowiem, że kolonie prątków błoniczych ujawniają właściwe im cechy dopiero na podłożach ubogich w substancje odżywcze. W pracy swojej brał on pod uwagę jedynie morfologię kolonii i własności hodowlane na bulionie, sądząc, że inne własności jak hemoliza i zakwaszenie podłoża są mało istotne. Wychodząc z jednej kolonii otrzymał *Hammerschmidt* pewną liczbę szczepów błoniczych, które były czystymi szczepami A, B i C. Według jego nomenklatury forma A odpowiada typowi *mitis* — forma B, typowi *gravis* zaś C, typowi *intermedius*. Jednakże obok tych zdecydowanych typów wyodrębniał on i takie szczepy, które okazały się w dalszym ciągu mieszaniną dwóch typów, wg. terminologii dzisiejszej *gravis* + *intermedius* i *mitis* + *intermedius*. Zróżnicowanie podobnej kolonii mieszanej na oddzielne typy było niemożliwe, gdyż stale pozornie czysta kolonia rozszczepiała się na poszczególne składniki. Zjawisko takie mógł zaobserwować autor nawet po kilku miesiącach badania. *Hammerschmidt* w badaniach swych za punkt wyjścia brał jedną bakterię. Otrzymane tą drogą szczepy były czasami jednolite, czasami zaś zaraz po wyosobnieniu nie były czyste, rozszczepiały się bowiem na kolonie *mitis* i *intermedius* lub *gravis* i *intermedius*. Jeszcze inne szczepy rozszczepiały się dopiero po pewnym czasie od chwili wyosobnienia. Szczepy *intermedius* nie dawały nigdy rozszczepień. Zaznaczyć należy, że autor nie zauwa-

żył nigdy pojawienia się typu, którego początkowo nie było w kolonii mieszanej.

A zatem według *Hammerschmidta* typy w obrębie maczugowców błoniczych rzadko występują oddzielnie, jedynie typ intermedius jest jak gdyby formą podstawową, do niego zaś przyłączyć się mogą formy mitis i gravis. Szczepy takie rozszczepiają się na poszczególne składniki, nawet wtedy jeśli pochodzą z jednej bakterii.

Hammerschmidt uznając istnienie szczepów nietypowych broni jednak zasady stałości typów. Inni autorzy jak *Weigmann* i *Kohen* (1936) są zdania, że typ maczugowca błoniczego może ulegać zmianie. Zauważyli oni, że pod wpływem śliny pozbawionej bakteryj przez sączenie, udało się zmienić typ maczugowca błoniczego. Szczepy używane przez nich do doświadczeń pochodziły z jednej bakterii. W badaniach uwzględniali oni własności morfologiczne, hodowlane, biochemiczne i zjadliwość szczepów dla zwierząt. W doświadczeniach ich własności niektórych szczepów pod wpływem śliny tak dalece się zmieniły, że w ostatecznym wyniku otrzymali oni szczepy rzekomobłonicze. Szczepy typu mitis i intermedius przekształciły się odrazu w szczep rzekomej błonicy, natomiast szczepy gravis przekształcały się pośrednio, najpierw w typ intermedius i dopiero później w prątki rzekomobłonicze. Autorzy są zdania, że typ intermedius nie jest typem ustalonym, lecz tylko zwyrodniałą formą typu gravis. Szczepy intermedius w warunkach korzystnych przekształcić się mogą w szczepy gravis, natomiast w niekorzystnych np. pod wpływem dłuższego działania śliny przejść mogą w prątki rzekomobłonicze.

Z prac wymienionych autorów wynika, że sprawa stałości typów jest jeszcze zagadnieniem spornym.

Nie omawiam całego piśmiennictwa wybierając celowo prace *Hammerschmidta*, *Weigmanna* i *Kohena* jako wyrazicieli przeciwnych poglądów.

Zagadnienie stałości typów maczugowca błoniczego brane było pod uwagę w pracach naszych nad biologią prątków błoniczych.

Przy powtórnym badaniu po upływie roku własności biologicznych 190 szczepów błoniczych, w dwóch przypadkach zauważyłam zmianę typu. Jeden szczep, zakwalifikowany pierwotnie na zasadzie swych własności jako typowy szczep *gravis*, przy powtórnym badaniu zachował się on jak nietypowy *mitis*. Drugi szczep określony w pierwszym badaniu jako typowy *mitis*, badany powtórnie ujawnił wszystkie cechy charakterystyczne dla typu *gravis*. Ponieważ zmiana typu odbyła się w tych szczepach samorzutnie, bez żadnej kontroli postanowiłam opracować tę sprawę metodycznie w celu prześledzenia poszczególnych etapów zmienności. Do tego rodzaju badań wybrałam szczep 869—1. Szczepu tego użyto do badań nad inwazyjnością i wyniki tych badań, które zacytuję później skłoniły mnie do użycia tego szczepu do badań nad zmiennością. Historia tego szczepu była następująca. Wyosobniono go z gardła z przypadku dość lekkiej anginy dyfterytycznej z jednostronnym nalożem, bez powikłań, chory był wyleczony. Wyosobniono z tego przypadku jednocześnie dwa szczepy. Oba w chwili wyosobnienia posiadały wszystkie cechy charakterystyczne dla typu *gravis*. Po roku jeden z tych szczepów użyto do badań nad inwazyjnością. Świnie wstrzyknięto podskórnie 0,5 ccm hodowli bulionowej, zwierzę padło następnego dnia. Z miejsca wstrzyknięcia oraz z płynu otrzewnowego wyhodowano maczugowce błonicy. Szczepy wyhodowane z ustroju świnki nie zachowywały się typowo, jak przystało na szczepy *gravis*. Każdy z 5 szczepów wyosobnionych z ustroju świnki posiadał inną zdolność hydrolizowania węglowodanów. Na zasadzie otrzymanych wyników przypuszczałam pierwotnie, że szczep *gravis* 869—1 uległ w ustroju świnki pewnemu uchwiejnieniu. Dla wyjaśnienia tej sprawy postanowiłam przebadać własności biochemiczne wyjściowego szczepu muzealnego. W tym celu szczep ten rozsiałam na płycie agarowej, aby otrzymać pojedyncze kolonie, dla kontroli rozsiałam również szczep 869—2, który nie był używany do doświadczeń na świnkach. Z jednego i drugiego szczepu wyosobniłam po 12 kolonii. Po zbadaniu własności biochemicznych szczepów pochodnych okazało się, że szczep 869—1 uległ uchwiejnieniu nie w ustroju świnki, lecz, że zmiana wystąpiła w nim samorzutnie w czasie

przechowywania w temperaturze pokojowej na agarze prostym. Szczep 869—2 wyosobniony z tego samego przypadku nie uległ uchwienieniu, wszystkie bowiem 12 wyosobnionych kolonii dały szczepy pochodne posiadające zupełnie charakterystyczne cechy dla typu *gravis*.

Nadmienić muszę, że szczepy do badania rozsiewałam na płytkach agarowych z 5% gliceryną. Płytek z podłożem Clauberga nie używałam celowo pomimo, że podłoże to daje świetne wyniki w pracy bieżącej i ułatwia odróżnianie kolonii błoniczych od innych kolonii towarzyszących. Natomiast przy badaniach subtelniejszych podłoże to sprawia pewne trudności. Jak wiadomo telluryn obecny w podłożu Clauberga posiada właściwość częściowego hamowania wzrostu innych bakterij, dlatego też przy stosowaniu płytek z tym podłożem nie ma się nigdy pewności, czy przy wyosobnianiu pojedynczej kolonii maczugowca błoniczego nie natrafiamy przypadkowo na taką, która rośnie z innymi bakteriami gramododatnimi, co przy nieprzejrzystości podłoża jest trudne do ustalenia. Z tego też powodu do rozsiewania szczepów błoniczych zamiast płytek z podłożem Clauberga używałam płytek agarowych z 5% gliceryną. Dodatnią cechą tego podłoża jest jego przezroczystość, pozwalająca na wykrywanie obecności jakiegokolwiek domieszki innej kolonii, ujemną zaś jest powolny wzrost kolonii błoniczych z powodu małej wartości odżywczej podłoża, oraz brak występowania cech różniczkowych między poszczególnymi typami tych drobnoustrojów. Płytki posiane przechowywano 3 dni w cieplarni w 37° i dwa dni w temperaturze pokojowej.

Jakie były własności owych 12 szczepów otrzymanych z rozsiania muzealnego szczepu 869—1?

Z tablicy Nr. 1 widać, że na 12 szczepów otrzymanych z wyosobnionych kolonii tylko dwa zachowały się jak typowe szczepy *gravis*, sześć szczepów było typowych, lecz dawały spóźnione odczynty fermentacyjne. Pozostałe zaś szczepy zatraciły zdolność rozsiewania jednego, dwóch, albo nawet i trzech węglowodanów. Zainteresowałam się bliżej szczepami Nr. 5, 10 i 12. Szczepy te jeszcze raz rozsiałam na płytkach agarowych z gliceryną. Chodziło bowiem o stwierdzenie czy szczepy zmienione składają się z jednostek

T A B L I C A I.

Badanie własności szczepów pochodzących z rozsiania szczepu gravis 869-1.

Szczepy pochodne Nr.	Dex-tryna	Gliko-gen	Skro-bia	Błon-ka na bulio-nie	Od-czyn zwrot-ny	U w a g i
1. 3.	+	+	+	+	+	Typowe szczepy gravis (lecz odczyn fermentacyj- ne spóźnione)
4. 6. 7. 8.	+	+	+	+	+	
9. 11.	+	+	+	+	+	
2	+	+	—	—	—	Nietypowy szczep gravis
5	—	—	—	+	+	" " "
10	—	—	—	+	—	" " "
12	+	—	—	+	+	" " "

o własnościach jednakowych, czy też różnorodnych. Otrzymałam następujące wyniki.

T A B L I C A II.

Badanie pochodnych szczepów Nr. 5-10-12.
(otrzymanych przez rozsianie szczepu gravis 869-1).

		Dex-tryna	Gliko-gen	Skro-bia	Błon-ka na bulio-nie	Od-czyn zwrot-ny	U w a g i
Pochodne szczepów Nr.	5	a. c.	+	+	+	+	Typowe szczepy gravis
		b.	+	+	+	+	Nietypowe " "
		d.	+	—	+	+	" " "
	10	e. f.	—	+	+	+	" " "
		a. e.	+	+	+	+	Typowe szczepy gravis
		b. f.	—	+	+	+	Nietypowe " "
	12	c. d.	+	+	—	+	" " "
		a. b. c.	+	+	+	+	Typowe szczepy gravis
		d. e. f.	+	+	+	+	lecz odczyn fermenta- cyjne spóźnione

Szczep Nr. 5 (tablica Nr. I) nie posiadał tak zasadniczej cechy dla typu gravis, jak zdolność rozsiewania wyższych węglowodanów, tworzył jednakże błonkę na bulionie i dawał typowy dla szczepu gravis odczyn zwrotny. Po rozsianiu tego szczepu (tablica Nr. II) otrzymano dwa zupełnie typowe szczepy gravis. Po-

zostałe 4 nie rozszczepiały tylko jednego z użytych węglowodanów, inne zaś cechy były typowe dla szczepu *gravis*. Nie otrzymano jednak ani jednego szczepu, którego własności biochemiczne przypominałyby szczep wyjściowy.

Szczep Nr. 10 (tablica Nr. I), nie posiadał dwóch cech typowych dla *gravis*; nie rozszczepiał węglowodanów oraz nie dawał reakcji zwrotnej na bulionie. Po rozsianiu tego szczepu (tablica Nr. II) otrzymano dwa typowe szczepy *gravis* z pozostałych 4-ech jeden nie hydrolizował dextryny, inne zaś skrobi. Pozostałe szczepy zachowywały się jak typowe *gravis*. Podobnie jak i w szczepie Nr. 5, nie otrzymałam po rozsianiu szczepu o własnościach takich, jak szczep wyjściowy.

Szczep Nr. 12 (tablica Nr. I), nie rozszczepiał glikogenu i skrobi, dextrynę hydrolizował szybko, tworzył błonkę i dawał typową dla szczepu *gravis* reakcję zwrotną na bulionie. Po rozsianiu otrzymano tym razem szczepy o własnościach jednakowych (tablica Nr. II), wszystkie były typowymi szczepami *gravis*, rozszczepiały jednak węglowodany w dość powolnym tempie.

A zatem z tych trzech przypadków widać, że uchwiezione szczepy błoncze składać się mogą z osobników, posiadających odrębne potencje biochemiczne. Obok osobników pełnowartościowych w sensie typu występują i takie, które utraciły jedną lub nawet więcej cech typowych. Uderza fakt, że własności szczepów, które uległy daleko idącym zmianom nie są stałe. Przemiana, która w nich wystąpiła nie jest prawdopodobnie wyrazem utraty pewnych zdolności, lecz jedynie wyrazem czasowego ich zahamowania. Cechy nietypowe, które spostrzegamy w niektórych szczepach byłyby jedynie przejściowymi. Możliwe, że to co określa *Nicolle* jako „mozaikę zdolności“ jest w stanie utajonym we wszystkich szczepach, lecz może się ujawnić jedynie w pewnych bliżej nieznanych okolicznościach.

Z kolei zainteresowałam się jakie wyniki otrzymam przez rozsianie typowych i nietypowych szczepów *gravis* i *mitis*.

Zbadałam 11 typowych szczepów *gravis* i *mitis*. W liczbie tej tylko jeden szczep *gravis* dał po rozsianiu nieliczne wprawdzie szczepy o własnościach niejednorodnych (rozszczepiały one węglowodany wyższe, nie tworzyły jednak błonki i nie dawały

odezynu zwrotnego). Pozostałe zaś 10 typowych szczepów gravis i mitis dały po rozsianiu jedynie szczepy typowe.

Nadto zbadalam 5 nietypowych szczepów gravis i mitis, pośród nich tylko jeden szczep mitis odznaczał się pewną chwiejnością biochemiczną (dextryna była całkowicie zhydrolizowana dopiero 10-go dnia, inne cechy były typowe). Po rozsianiu na płycie agarowej otrzymałam szczepy pochodne, które ścinały surowicę obecną w podłożu z dextryną w granicach od 5 do 20 dni, nadto jedne szczepy mąciły bulion jednolicie, inne zaś dawały błonkę lub zarys błonki, odczyn zwrotny występował 5 — 6 — 7 — 8 — dnia.

Z powyższego wynika, że nie tylko nietypowe lecz i typowe szczepy mogą składać się z osobników o rozmaitych potencjach biochemicznych. Jak już wspomniałam typowy szczep gravis użyty do tych badań po rozsianiu dał pewną, niewielką wprawdzie, liczbę szczepów o cechach odmiennych. Przyczyny tego zjawiska szukać może należy w tym, że właściwości szczepów są prawdopodobnie wypadkową właściwości poszczególnych osobników i obecność nielicznych osobników o cechach uwsteczniionych nie odbija się na właściwościach całego szczepu. Szczep dopiero wtedy odbiega od typu, jeżeli w skład jego wchodzi większa liczba osobników o cechach odmiennych.

Ciekawe wyniki dało rozsianie dwóch szczepów, które przy powtórnym badaniu po roku zakwalifikowano na zasadzie przekształconych cech do innego typu biologicznego niż poprzednio. Właściwości tych szczepów, jak gdyby ustabilizowały się. Jednakże stabilizacja cech nie poszła w kierunku odzyskania właściwości szczepu wyjściowego wyosobnionego przed rokiem, lecz przeciwnie w kierunku utrwalenia właściwości typu zmienionego. Jeden ze szczepów, początkowo typowy mitis, zmieniony następnie w typowy gravis po rozsianiu dał wyłącznie szczepy posiadające wszystkie cechy charakterystyczne dla typu gravis. Drugi zaś szczep wyjściowy, typowy gravis, zmieniony w nietypowy mitis, po rozsianiu dał również wyłącznie nietypowe szczepy mitis. Wszystkie zatem 32 pochodne szczepy otrzymane przez rozsianie owych dwóch szczepów, posiadały cechy jednolite.

Stwierdzić zatem możemy, że 1) mozaikowość własności biochemicznych spostrzeżona w szczepie 869—1 nie jest wypadkiem odosobnionym, w żadnym jednak szczepie badanym nie zauważono podobnie wielkiej rozpiętości zmian, jak właśnie w tym szczepie, 2) nie tylko szczep nietypowy lecz również i typowy wykazywać może obecność osobników o odmiennych potencjach biochemicznych.

Co może wpływać na zmienność szczepów pozostawionych przez rok w temperaturze pokojowej? Pierwszym przypuszczeniem, które się nasunęło było, że w hodowlach tych pojawił się bakteriofag i jego działaniu przypisać należy, te różnorodne formy biochemiczne, które zaobserwowano. Na naszą prośbę koleżanka *Fejgin*, wykonała badania w celu stwierdzenia w tych szczepach obecności bakteriofaga. Wynik tych badań był jednak ujemny. Drugim z kolei przypuszczeniem było, że zmienność tę zawdzięczamy działaniu temperatury. Dla sprawdzenia tego przypuszczenia hodowano szereg szczepów w różnych temperaturach. Przypuszczałam, że pod wpływem temperatury szczepy uchwiejnią się jeszcze bardziej, że rozpiętość zmian będzie jeszcze silniej zaznaczona.

W badaniach tych stosowano następującą technikę. Dany szczep maczugowca błoniczego wysiewano tego samego dnia do trzech butelek z bulionem zwykłym. Po zasianiu jedną butelkę trzymano w cieplarni w 37°, drugą w temperaturze pokojowej, trzecią zaś w chłodni (4—6° powyżej 0°). Po jednym, dwóch i sześciu tygodniach małą kroplę z hodowli bulionowej wysiewałam na płytki agarowe. Badaniom tym poddałam uchwiejniony szczep *gravis* 869—1 oraz jeden typowy szczep *gravis* i jeden typowy szczep *mitis*.

Omówię z początku wyniki otrzymane w doświadczeniach ze szczepem 869—1 (tablica Nr. III).

Po tygodniu hodowania w różnych temperaturach otrzymano zarówno formy typowe jak i nietypowe. Najmniej szczepów zmienionych wykrywano po tygodniu z hodowli bulionowej, przechowywanej w cieplarni, nieco więcej w temperaturze pokojowej, najwięcej zaś w chłodni. W następnych tygodniach zarówno z cieplarki, z temperatury pokojowej, jak i z chłod-

T A B L I C A 3

Wpływ temperatury i czasu na uchwycenie szczepu gravis 869 — 1

				Liczba szczepów	Dextryna	Glikogen	Skrobia	Błonka na bullionie	Odczyn zwrotny	U w a g i
T e m p. p o k o j o w a Tygodni	C i e p l a r k a Tygodni	1	5	+	+	+	+	+	+	Typowe szczepy gravis z opóź- nioną reak. ferm.
			1	+	+	-	-	-	-	Nietypowy szczep gravis
		2	1	+	+	+	+	+	+	Typowy szczep gravis z opóź- nioną reak. ferm.
			2	+	+	+	+	-	-	Nietypowe szczepy gravis
		3	2	+	+	+	+	-	-	" " "
			1	-	-	-	-	+	-	" " "
	6	1	1	+	+	-	-	+	-	" " "
			1	+	+	-	-	+	-	Nietypowy szczep mitis
		2	1	+	+	-	-	-	-	Szczep intermedius
			2	-	-	-	-	-	-	
		3	1	+	+	-	-	-	+	Nietypowy szczep gravis
			1	+	+	-	-	+	+	" " "
	1	1	2	-	-	-	-	-	+	" " "
			1	-	-	-	-	-	-	Szczep intermedius?
		2	1	-	-	-	-	-	-	
			1	-	-	-	-	-	-	
		3	1	+	+	+	+	+	+	Typowy szczep gravis
			2	+	+	+	+	+	+	Typowe szczepy gravis z opóź- nioną reak. ferm.
	2	1	1	-	-	+	+	+	-	Nietypowy szczep gravis
			1	-	-	+	+	+	-	Szczep intermedius? "
		2	1	+	+	-	-	-	-	Nietypowy szczep gravis
			1	+	+	-	-	-	-	" " mitis
		3	1	-	-	-	-	-	-	" " gravis
			2	-	-	-	-	-	-	" " gravis
	3	1	1	+	+	-	-	-	-	Szczepy intermedius?
			2	-	-	-	-	-	-	Nietypowy szczep gravis
		2	1	+	+	-	-	+	+	" " "
			2	-	-	-	-	-	-	Szczepy intermedius?
		3	1	-	-	-	-	-	-	Nietypowy szczep gravis
			1	-	-	-	-	+	-	" " "
	6	1	1	-	+	+	-	-	-	Szczepy intermedius?
			1	-	-	-	-	-	-	Nietypowy szczep gravis
		3	1	-	-	-	-	-	-	" " "
			3	-	-	-	-	-	-	Szczepy intermedius?

(ciąg dalszy)

			Liczba szczepów	Dextryna	Glikogen	Skrobia	Błotka na bulionie	Odczyn zwrotny	U w a g i
C h ł o d n i a T y g o d n i	1	1	+	+	+	—	—	—	Nietypowy szczep gravis
		1	++	++	++	—	—	—	" " mitis
		2	+	—	—	—	—	—	" " "
		2	—	—	—	—	—	—	Szczepy intermedius?
		1	+	+	+	—	—	—	Nietypowy szczep gravis
		1	+	+	+	—	+	—	" " "
2	1	1	++	++	++	—	—	—	" " "
		1	++	+	+	—	—	—	" " "
		2	+	—	—	—	—	—	" " mitis
		1	+	—	—	—	—	—	" " gravis
		1	+	+	+	—	—	—	" " "
		1	—	—	—	—	—	—	" " "
	3	1	—	+	+	—	—	—	Szczepy intermedius?
		1	—	+	+	—	—	—	" " "
		1	—	—	—	—	—	—	" " "
		3	—	—	—	—	—	—	Szczepy intermedius?
		6	+	—	—	—	—	—	Nietypowe szczepy mitis
		6	—	—	—	—	—	—	" " "

ni otrzymałam coraz więcej szczepów o cechach zmienionych. Wyniki te przypisać należy prawdopodobnie niekorzystnym warunkom, które wytworzyły się w samym podłożu.

Pośród szczepów nietypowych na szczególną uwagę zasługują takie, które nie posiadały ani jednej charakterystycznej cechy dla typu gravis. Szczepy podobne pochodziły częściej z hodowli bulionowej przechowywanej w temperaturze pokojowej w chłodni, niż w cieplarni.

Jakie są inne cechy owych szczepów gravis, tak bardzo uwsteczniionych w swych właściwościach biochemicznych? W preparatach barwionych niektórych z tych szczepów zauważono pałeczki, które kształtem i układem przypominały raczej prątki rzekomobłonicze, niż błonice, o słabej, niekiedy zaś silniejszej ziarnistości metachromatycznej. Częściej jednakże szczepy uwstecznione były morfologicznie zupełnie typowe, z obfitą ziarnistością begunową. W szczepach tych uderzał zupełny brak zdolności rozsiewania węglowodanów. Szczepy te obserwowane przez 20

dni., nie wykazały nawet śladu hydrolizy węglowodanów. Odczyn w bulionie hormonalnym był stale kwaśny (obserwowano 12 dni). Na bulionie szczepy te rosły albo w postaci słabego mętu albo też bulion był przezroczysty, a na dnie próbówki tworzył się dość znaczny grudkowaty osad. A zatem własności tych szczepów przypominały raczej szczep *intermedius*. Po rozsianiu tych szczepów zmienionych na płytki otrzymano szczepy pochodne o niezmiernie różnorodnej mozaice cech biochemicznych. (Do badania wybrałam takie szczepy, które w preparacie barwionym przypominały kształtem i układem raczej prątki rzekomobłonnicze).

Z innych szczepów *nietypowych* zasługują na uwagę takie, których cechy biochemiczne przypominały nietypowe szczepy *mitis*. Szczepy takie hydrolizowały dextrynę powodując krzepnięcie surowicy, obecnej w podłożu, oraz dawały jednolity męt w bulionie hormonalnym, lecz odczyn pozostawał stale kwaśny ($\text{pH} = 6.8$ — albo 7.0 po 12 dniach). Szczepy podobne otrzymano w bardzo niewielkiej liczbie z trzytygodniowej hodowli bulionowej pozostawionej w cieplarni, w dwutygodniowej z temperatury pokojowej oraz tygodniowej i dwutygodniowej z chłodni. Natomiast po 6 tygodniach przechowywania w chłodni, wszystkie wyosobnione szczepy okazały się nietypowymi *mitis*. Szczepami tymi zajmę się bliżej. Na zasadzie własności biochemicznych należało szczepy te zaliczyć obecnie do *nietypowych mitis*, przypuszczałam jednak, że ich własności biochemiczne są w dalszym ciągu uchwiejnione. Dlatego też jeden ze szczepów zmienionych w nietypowy *mitis* rozsiewałam na płytce agarowej, w wyniku otrzymałam szczepy o własnościach biochemicznych odpowiadających *nietypowym* szczepom *mitis*. W celu dalszej kontroli zmieniony szczep przeszczepiałam na surowicę Loefflera, na bulion, po czym ponownie rozsiałam na płytkę Clauberga i na płytkę agarową. Jednakże wszystkie szczepy otrzymane z kolonii wyrosłych na jednych i drugich płytkach ustabilizowały się, wszystkie bowiem przypominały nietypowe szczepy *mitis*. Dla uzupełnienia zbadałam również zjadliwość tego szczepu, który z chwiejnego *gravis* przekształcił się po 6 tygodniach hodowania w chłodni w nietypowy *mitis*. Jako kontroli używałam muzealnego szczepu wyjściowego 869 — 1. Swinka, której wstrzyknęto szczep

muzealny wyjściowy padła po 24 godzinach, z narządów wyosobniono szczepy, które w dalszym ciągu posiadały własności szczepu wstrzykniętego śwince. Natomiast świnka, której zaszczepiono szczep zmieniony w chłodni, w nietypowy mitis, nie padła, obserwowano ją dłużej niż miesiąc.

Widzimy zatem, że na silniejsze uchwiejnienie szczepu 869—1 wpływa nie tylko temperatura lecz również czas hodowania w poszczególnych temperaturach. Otrzymano bowiem typowe szczepy gravis, z temperatury pokojowej jedynie po tygodniu, a z ciepłarki po tygodniu oraz po 2-ch. Po dłuższym czasie hodowania w tych ciepłotach, typowe szczepy już nie występują, pojawiają się wyłącznie nietypowe. Niekorzystny wpływ hodowania w chłodni zaznacza się już po tygodniu, albowiem po tym czasie nie otrzymano już szczepów typowych, lecz wyłącznie nietypowe. Uderza fakt, że po 6 tygodniach hodowania w chłodni uchwiejniony szczep gravis przekształcił się w nietypowy mitis i takim pozostał pomimo przeszczepiania na różne podłoża.

Przypomnieć należy, że podobne przekształcenie szczepu gravis w nietypowy mitis, stwierdzono również w jednym, ze szczepów powtórnie badanych po roku, tylko, że wtedy zmiana ta odbyła się po za naszą kontrolą, nieznane były przyczyny, które spowodowały tę zmianę. Tym razem przyczynę podobnego przekształcenia się szczepu przypisać należy niekorzystnym warunkom wzrostu, wywołanym przez dłuższe hodowanie w chłodni.

Pozostaje jeszcze do omówienia wpływ różnych temperatur na typowy szczep gravis i mitis.

Szczep gravis dał po tygodniu hodowania we wszystkich temperaturach (tablica Nr IV) zarówno szczepy typowe, jak i nietypowe (brak błonki, kwaśny odczyn w bulionie hormonalnym, $\text{pH} = 6.8$, natomiast rozszczepianie węglowodanów było stale typowe). Jak widać z tablicy czas hodowania, jako czynnik niekorzystny nie uchwiejnia w silniejszym stopniu typowego szczepu gravis 3445. Albowiem liczba szczepów nietypowych otrzymanych z hodowli bulionowej po miesiącu nie tylko nie zwiększyła się, lecz przeciwnie zmniejszyła się. Jedynie z temperatury pokojowej otrzymano zarówno po tygodniu, jak i po miesiącu taką samą liczbę szczepów typowych, jak i nietypowych. Najbardziej

T A B L I C A IV.

Wpływ temperatury i czasu na uchwlejnienie typowego szczepu gravis. 3445.

		Liczb. szcze- pów	Dex- tryna	Gliko- gen	Skro- bia	Błon- ka na buljo- nie	Od- czyn zwrot- ny	U w a g i
Ciepłota	Ciepłarka	2	+	+	+	+	+	Typowe szczepy gravis
		1	+	+	+	—	—	Nietypowe „ „
		3	+	+	+	—	—	„ „ „
		5	+	+	+	+	+	Typowe „ „
		1	+	+	+	—	—	Nietypowe „ „
	Temp. pokojowa	3	+	+	+	+	+	Typowe „ „
		1	+	+	+	—	+	Nietypowe „ „
		2	+	+	+	—	—	„ „ „
		3	+	+	+	+	+	Typowe „ „
		3	+	+	+	—	—	Nietypowe „ „
Chłód	Chłodnia	3	+	+	+	+	+	Typowe „ „
		3	+	+	+	—	—	Nietypowe „ „
		6	+	+	+	+	+	Typowe „ „

uderzający był wynik hodowania w chłodni, gdyż po tygodniu otrzymano zarówno szczepy typowe, jak i nietypowe, po miesiącu zaś jedynie typowe. Szczep gravis, jak gdyby przystosował się do wzrostu nawet w tak niekorzystnych warunkach, jak w chłodni.

W przeciwieństwie do typowego szczepu gravis, typowy szczep mitis 2811 odchylił się silniej od typu (tablica Nr. V). Typowe szczepy nie wystąpiły nawet już po tygodniu hodowania w różnych temperaturach. Wszystkie szczepy pochodne nie dały już charakterystycznego odczynu zwrotnego (pH po 12 dniach wynosiło 7.0). Rozszczepianie dextryny i charakter wzrostu w bulionie hormonalnym pozostały jednak typowe. Po miesiącu zarów-

T A B L I C A V.

Wpływ temperatury i czasu na uchwycenie typowego szczepu mitis 28/1.

	Liczba szczep.	Dektryna	Męt w bul.	Odczyn zwrotny	U w a g i
Ciepłarka	5	+	+	—	Nietypowe szczepy mitis
	1	+	—	—	" " "
Temp pokoj.	6	+	+	—	" " "
	6	+	+	—	" " "
Chłodnia	6	+	+	—	" " "
	6	+	+	—	" " "
	6	+	+	—	Nietypowy intermedius?

no w temperaturze pokojowej, jak i z ciepłarki otrzymano szczepy w których poza brakiem reakcji zwrotnej, osłabła zdolność rozszczepiania dektryny (surowica obecna w podłożu krzepła dopiero 10-go dnia). W hodowlach bulionowych z chłodni po miesiącu wszystkie szczepy pochodne posiadały jednakowe własności; hydrolizowały dektrynę niezmiernie słabo, dając zaledwie ślad zaczerwienienia lakmusu.

A zatem badany typowy szczep mitis po miesiącu hodowania w chłodni zmienił się, upodabniając się w pewnym stopniu do nietypowego szczepu intermedius. Jedyną cechą charakterystyczną dla typu mitis, która pozostała było tworzenie jednolitego mętu w bulionie.

Jak widać różne temperatury oraz dłuższy czas hodowania w tych warunkach wpływają bardzo wyraźnie na zmianę własności szczepów tlenicznych, niska temperatura wywiera wpływ najbardziej niekorzystny. Szczepy podobne do typu intermedius pojawiły się pod wpływem wszystkich temperatur. Nie można jed-

nakże twierdzić, jak to czynią *Weigmann* i *Kohen*, że szczepy intermedius są zwyrodniałą postacią typu *gravis*, bowiem w naszych badaniach z szczepu *gravis* zmienionego tak, że nie posiadał już żadnej cechy typowej dla tego typu, otrzymano po rozsiaaniu szczepy pochodne o dużej rozpiętości zmian, jednakże zupełnie typowego szczepu *intermedius* nie otrzymano

Reasumując otrzymane wyniki powiedzieć możemy, że:

1) Rozsiewając szczep i badając jego poszczególne kolonie stwierdzić można, że niektóre szczepy błonnicze są niejednolite, składają się bowiem z jednostek bakteryjnych, z których prawie każda posiada cechy odmienne.

2) Własności szczepów, które uległy daleko idącym zmianom nie mają tendencji do utrzymywania się. Przemiana bowiem, która w nich wystąpiła nie jest prawdopodobnie wyrazem utraty pewnych zdolności, lecz jedynie wyrazem czasowego ich zahamowania.

3) Hodowanie szczepów w różnych temperaturach uchwieniania je, niekiedy w bardzo znacznym stopniu. W ostatecznym wyniku otrzymać nawet można zmianę typu.

4) Własności szczepów są jak gdyby wypadkową właściwości poszczególnych osobników. Obecność w szczepie nielicznych jednostek bakteryjnych o cechach odmiennych nie odbija się na właściwościach szczepu. Szczep wykazuje dopiero wtedy pewne odchylenia od typu, o ile w skład jego wchodzi większa liczba jednostek bakteryjnych o cechach zmienionych.

From the State Institute of Hygiene, Department of Bacteriology
and Experimental Medicine.

ON THE TYPE STABILITY OF *C. DIPHTHERIAE*.

By

J. SEYDEL

SUMMARY.

Isolated colonies of some diphtheria cultures show different biochemical properties as compared with the whole culture.

The disappearance of certain biochemical properties does not indicate their loss but their temporary inhibition. The prolonged cultivation of diphtheria strains at 37°, 18° and 5° causes the biochemical lability of the strain, with the result that a transformation of one type into another may take place.

The strain properties are the outcome of the properties of its components. The presence in the strain of a few changed individuals is of no influence on the properties of the whole strain. The strain show deviation from its original type when it is composed of a larger number of changed bacteria.

P I Ś M I E N N I C T W O .

- 1) *Anderson, Happold, Mc Leod, Thomson.* Journ. Path. and Bact. T. 34. 1931.
- 2) *Anderson, Cooper, Happold, Mc Leod.* Journ. Path. and Bact. T. 36. 1933.
- 3) *Cooper, Happold, Mc Leod, De Woodcock.* Royal Society of Medic. T. XXIX. 1936.
- 4) *Christison.* Journ. Path. and Bact. T. 33, str. 243. 1933. Centr. f. Bact. Orig. T. 133, str. 59. 1934.
- 5) *Hammerschmidt.* C. f. Bact. T. 93, str. 443. 1924. Deut. Med. Woch. 50, str. 1831. 1924. Klin. Woch. 14, str. 964. 1935.
- 6) *Robinson* Journ. Path. and Bact. T. 39, str. 551. 1934.
- 7) *Robinson i Marshall.* Ibid. 38, str. 73. 1934. *Lancet* (11) str. 441. 1935.
- 8) *Seydel.* Med. Dośw. i Społ. T. XXII, str. 1. 1937.
- 9) *Weigman i Kohen.* Zeit. f. Hyg. T. 118. 1936.

Wpłynęło 28.I.1937

Z Zakładu Bakteriologii Wydziału Weterynaryjnego U. J. P.
Dyrektor Prof. Z. Szymanowski.

PRZYSZYNEK DO SPRAWY STOSUNKU POMIĘDZY STRUKTURĄ ANTYGENOWĄ BAKTERII A ICH WRAŻLIWOŚCIĄ NA DZIAŁANIE BAKTERIOFAGÓW.

Podała
R. ROGOŻNICKA

Tematem mojej pracy było zestawienie własności zlepnych różnych szczepów czerwonej krwi typu Flexner z ich wrażliwością na działanie bakteriofagów. Zanim przejdę do omówienia metod i wyników mojej pracy, pragnę poświęcić kilka słów zagadnieniu swoistości bakteriofagów oraz różnym metodom klasyfikacji szczepów czerwonej krwi typu Flexner.

W nauce o bakteriofagach coraz bardziej przyjmuje się pogląd, że czynnik lityczny jest czymś od bakterii odrębnym, wbrew wszystkim koncepcjom, upatrującym w bakteriofagu ferment szczególniejszy, wytwarzany przez bakterie wrażliwe. Może pierwszych ścisłych w tym kierunku dowodów dostarczyłyby doświadczenia *Arnolda* i *Weissa*. Autorzy ci uodporniali króliki bulionem litycznym odbiałym, względnie takim, w którym białko bakteryjne pod działaniem trypsyny straciło zdolność antygenową. Króliki tak uodpornione dały surowicę, zubożającą czynnik lityczny, podany w bulionie, lecz pozbawioną zdolności reagowania z odnośnymi bakteriami w odczynie aglutynacyjnym, precypitacyjnym i wiązania dopełniacza. W ten sposób ustalona została odrębność antygenowa czynnika litycznego od własności antygenowych bak-

teryj. Surowica antyfogowa zubożętniała działanie tylko właściwego bakteriofaga i nie wywierała wpływu na inne bakteriofagi. W ten sposób udowodniona została wielorakość czynnika litycznego wbrew pierwotnym poglądom *d'Herelle'a*. Wielorakość ta zresztą zaznaczyła się już poprzednio w różnicach, zachodzących w wielkości lysinek, wytwarzanych przez bakteriofagi na pożywkach stałych, (*Bail*), w różnicach wrażliwości na temperaturę, (*Hadley* i t. p.).

Skoro czynnik lityczny jest odrębny od bakteryj wrażliwych, przeto na to, ażeby mógł wywrzeć swoje działanie musi on się przede wszystkim z bakteriami wiązać. Że tak jest w istocie, dowiodły doświadczenia różnych autorów (*Bronfenbrenner*, *Jakobsohn*, *Gough*), stwierdzające, że bakteriofag nie tylko wiąże się z bakteriami żywymi, ale nie zachowuje się obojętnie także względem bakteryj zabitych. W tym ostatnim przypadku następuje związanie bakteriofaga, które można udowodnić przez odwirowanie naładowanych bakteriofagiem bakteryj: płyn nad osadem wykazuje wyraźnie zmniejszenie stężenia czynnika litycznego. W ten sposób działanie bakteriofaga rozpada się na dwa etapy, a mianowicie: na związanie bakteriofaga przez komórkę bakteryjną i następnie na rozpuszczenie naładowanych bakteryj, połączone z procesem rozmnażania się bakteryj i czynnika litycznego. Błędem badań dawniejszych było wyłączenie interesowania się efektem ostatecznym i pomijanie pierwszego wstępnego etapu. Tymczasem dla sprawy swoistości działania bakteriofagów na bakterie ten pierwszy etap ma decydujące znaczenie. Zagadnienie tej swoistości od samego początku niepokoiło badaczy. *D'Herelle* załatwił się z nim sumarycznie, twierdząc, że bakteriofag może się przystosować do każdego podłoża i rozpuszczać wszystkie bakterie bez różnicy. Prędko przekonano się, że tak nie jest. Okazało się przede wszystkim, że pewne gatunki bakteryj, zwłaszcza barwiących się dodatnio metodą *Gram*a, nie poddają się wcale działaniu bakteriofagów, albo czynią to tylko wyjątkowo. Następnie stwierdzono, że są bakteriofagi, działające na szczepy różnych gatunków i jednocześnie działające bynajmniej nie na wszystkie szczepy jednego i tego samego gatunku. Podejrzewano tu istnienie jakiegoś swoistego stosunku, ale zupełnie nie umiano go bliżej

zdefiniować. Wiedziano tylko, że swoistość ta nie pokrywa się z ogólnie przyjętą klasyfikacją bakteryj. Z tego chaosu pojedynczych obserwacji pierwszy próbuje znaleźć wyjście *Burnet*. Wychodzi on z założenia, że zarówno wiązanie bakteriofaga, jak i serologiczne reakcje bakteryj są przede wszystkim funkcją powierzchni komórki bakteryjnej i szuka związku pomiędzy strukturą antygenową tej powierzchni a wrażliwością bakteryj na działanie określonych bakteriofagów. Rozległe doświadczenia *Burneta* doprowadziły go do wniosku, że pomiędzy własnościami zlepny mi bakteryj a wrażliwością na działanie bakteriofagów istnieje w obrębie większych grup bakteryj dająca się stwierdzić łączność. W grupie paratyfusowej szczepu R, mające, jak wiemy, wspólny „kosmopolityczny” antygen ciepłotały, wykazują wspólną wrażliwość na pewne grupy bakteriofagów. To samo dotyczy szczepów, mających wogóle wspólne antygeny ciepłotałe. Natomiast antygen ciepłochwiejny nie ma dla zagadnienia swoistości żadnego znaczenia. Analogiczne doświadczenia przeprowadził autor na grupie bakteryj okrężnicowych i zwłaszcza na bakteriach czerwonych typu Flexnera, które, jak wiemy, mają znaczną wspólność antygenową. W dalszych doświadczeniach *Burnet* i jego współpracownicy wykryli związek pomiędzy swoistym węglowodanem (antygenem resztkowym) bakteryj paratyfusowych a działaniem bakteriofagów (*Gough*). W obecności tego antygeny resztkowego działanie bakteriofagów na odnośne bakterie ulega swoistemu zahamowaniu. Podkreślić należy, że struktura antygenowa jest jednym z czynników, warunkujących swoistość działania bakteriofaga, ale nie pokrywa się z nią w całości. Zupełnie niezależnie od *Burneta Sartorius* przeprowadził próbę zastosowania swoistej wrażliwości szczepów czerwonych na działanie bakteriofagów do różniczkowania serologicznego tych szczepów i również wykrył analogię pomiędzy strukturą antygenową, wyrażającą się aglutynacją pod wpływem surowic odpornościowych, a wrażliwością szczepów typu Flexner na działanie bakteriofagów.

Przejdę teraz do drugiego zagadnienia, a mianowicie do klasyfikacji szczepów czerwonych.

Różniczkowanie bakteryj czarwonki oparte jest przede wszystkim na ich własnościach zlepnych. Próby tej klasyfikacji

były przedsiębrane kilkakrotnie przez różnych badaczy. Pierwszą próbę systematycznej klasyfikacji szczepów czerwonych przedsięwziął *Kruse*, który zastosował na szerszą skalę metodykę wysycania. *Kruse* podzielił wszystkie szczepy na 10 grup, w tym już jest pałeczka Shiga — *Kruse* oraz pałeczka *Kruse* — *Sonne*. Wszystkie pozostałe szczepy odpowiadają różnym rasom pałeczek *Flexnera*. *Kruse* oznaczył je pierwszymi literami alfabetu. Podział *Krusego* był niepełny, gdyż opierał się na małej stosunkowo liczbie szczepów.

Gdy w czasie Wojny Światowej zaszła konieczność identyfikowania na szerszą skalę rozmaitych ras pałeczek *Flexnera*, *Andrewes* i *Inman* podali klasyfikację własną o tyle niezależną od klasyfikacji *Krusego*, że nie rozporządzali wówczas wzorcowymi szczepami klasyfikacji niemieckiej.

Andrewes i *Inman* rozróżniają w obrębie gatunku *Flexner* 5 ras głównych i 2 podrzędne. Doszli oni do swych wyników, stosując próby zlepné i absorpcyjne. Każda rasa przedstawia mozaikę antygenową, złożoną z 4 antygenów cząstkowych, które autorzy angielscy oznaczają literami V, W, X i Z: rasy różnią się między sobą tylko ilościowym ustosunkowaniem się tych składników antygenowych, mianowicie: 4 główne V, W, X i Z charakteryzują się przewagą antygenu głównego, 5-ta rasa główna Y posiada wszystkie składniki antygenowe mniej więcej w równej ilości, a nie posiada dominującego i charakterystycznego dla niej elementu. 2 rasy podrzędne WX i VZ, jak wskazuje ich nazwa, posiadają po 2 dominujące składniki. Rasy należące do gatunku *Flexner* wykazują więc daleko idącą aglutynację grupową, co wynika z ich struktury antygenowej.

Po wojnie światowej zaczęto uzgadniać obie klasyfikacje na podstawie coraz większego materiału.

Z jednej strony *Aoki* wraz z uczniami podał swoją klasyfikację niezależną od powyższych dwóch, ale w znacznej mierze pokrywającą się z nimi.

Z drugiej strony gruntowne, wyczerpujące uzgodnienie wszystkich powyższych klasyfikacji przeprowadził na b. wielkim materiale szczepów zarówno starych jak nowych uczony niemiecki

Sartorius. Według niego w obrębie gatunku *Flexner* daje się wydzielić 12 grup, które oznacza literami alfabetu, zachowując oznaczenia *Krusego*, *Andrewesa* i *Aokiego*, o ile to dotyczy grup, już przez tych badaczy określonych.

Poniższa tabelka ukazuje stosunek szczepów określonych przez *Sartoriusa* do szczepów innych autorów (w skróceniu).

Autor	Rasy szczepów Flexnera									
Kruse	A	BC	H	D	—	—				
Andrewes	VZ	V	Z	W	X	Y ₁₋₂				
Aoki	—	V	ll	l	X	—	III/VI	IV/XII	IX	
Sartorius	A	BC	H	D	X	Y ₁₋₂	F	G	K	L

Powstała wówczas tak wielka liczba kategorii, że zaszła potrzeba uproszczenia podziału przez zastosowanie kryteriów, pozwalających na objęcie w jedną całość większej liczby grup.

Sartorius stwierdził, że wszystkie szczepy czerwionki rzekomej można podzielić z jednej strony na rozszczepiające, względnie nierozszczepiające sacharozy oraz na podlegające względnie niepodlegające działaniu bakteriofagów. Dwie te cechy występują w różnych kombinacjach i w rezultacie *Sartorius* otrzymał następującą tabelkę, którą podajemy z zachowaniem nomenklatury szczepów tegoż autora.

Rasy	A	BC	Y ₁ , Y ₂	L	G	K	H	D	X	F
Wpływ Bfg.	—	—	—	—	ujemny lub	+	+	+	+	+
Sacharoza	+	+	+ z op.	—	słabo +	+	+	+	+	+
po 8 dniach		niekt. —	albo —	alk.	+ i — +					

Rozszczepienie sacharozy obserwuje się na pożywce płynnej z dodatkiem indykatora, notując ostateczny wynik po 8 dniach.

Bakteriofagi otrzymuje się z kału kurzego i wzmacnia się je przez pasaż 24 — godzinne w ciągu 2 tygodni. Tabela *Sarto-*

riusa oddaje tym większe usługi, że pozwala na łatwe rozróżnianie szczepów, mianowicie szczepy rasy H i D (wrażliwe na działanie bakteriofagów) i A, B (niewrażliwe albo słabo wrażliwe) odpowiadają podług klasyfikacji angielskiej szczepom Z, W i VZ, V podług *Krusego* H. D i A, BC. Ścisłejsze rozgraniczenie w obrębie szczepów rasy H i D odbywa się na zasadzie rozsiewania sacharozy, mianowicie szczep H rozkłada a D nie rozkłada sacharozy.

W istocie swej metodyka *Sartoriusa* polega na stwierdzaniu korelacji pomiędzy strukturą antygenową rozmaitych szczepów czerwonki rzekomej, a ich wrażliwością na bakteriofagi. Mamy więc do czynienia z tą samą zasadą, do której z innej strony, bc od strony bakteriofagów, podchodzi *Burnet*.

Wobec tego, że w piśmiennictwie brak dotąd prac kontrolujących tę zasadę, zajęłam się przeprowadzeniem porównania pomiędzy zlepliwością a wrażliwością bakteriofagową szeregu szczepów czerwonki typu Flexner, nie wchodząc narazie w bliższe określenie ich przynależności grupowej. Szczepy otrzymałam z P. Z. H. 14 bakteriofagów wyhodowałam z kału małą chorych na biegunkę, 20 otrzymałam w postaci gotowej.

Technika otrzymania bakteriofagów była następująca: do bulionu o Ph 7,8 wprowadzam kał zwierzęcia i stawiam do cieplarki w temp. 37° C. Po 24 godzinach sączyłam zawartość probówki przez ziemię okrzemkową, a następnie przez świecę Chamberlanda L3. W przesączu szukałam bakteriofaga. Na płytkę 1,5% agaru o Ph 7,8 posiewałam kilka kropel 24-godzinnej hodowli bulionowej bakterii, pipetą pasteurowską puszczałam kroplę przesączu i wstawiałam do cieplarki. Po 24 godzinach odczytywałam wynik. Jeśli przesącz zawiera bakteriofag, na płytce pozostają miejsca puste — łysinki, jeśli nie, cała płytka pokryta jest szczepem posianym. Materiał z brzegu łysinki przesiewam wraz z szczepem bakteryjnym do bulionu. Po 24 godzinach wysiewam bakteriofag na płytkę. Przesiewy powtarzam kilkakrotnie, otrzymuję czysty bakteriofag, który wzmacniam.

Zanim przystąpiłam do właściwej pracy stwierdziłam, że żaden ze szczepów nie posiada własnego bakteriofaga. Wówczas zbadalam wrażliwość 15 szczepów czerwonki rzekomej na działanie 34 bakteriofagów.

T A B L I C A I
Działanie bakteriofagów na szczepy czerwoni rzekomej.
Bakteriofagi wyróżnione z kałów małą chorych na biegunkę.

s z c z e p y															
Fl. III Fl. Pozn. Fl. 1406 Fl. Past. J. 2 J. 350 J. Rog. J. 5681 H. 511 D. 711 P. A. E. 673 J. 674 Kr. s. Cr. Kr. s. 20															
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+	+	+</													

P r o t o k o ł N r 1. (Tablica I).

Zbadałam wrażliwość 15 szczepów czerwonki rzekomej na działanie dowolnie wybranych 34 bakteriofagów.

W wyniku otrzymałam podział tych szczepów na 3 charakterystyczne grupy:

1. I-a grupa jest jednolita. Do niej należą 4 szczepy: 1) Fl. III, 2) Fl. Poznań, 3) Fl. 1406 i 4) Fl. Pasteur.

Grupa ta jest wrażliwa na 7 bakteriofagów, odporna — na 27.

Charakterystyczne wyłącznie dla tej grupy są 4 bakteriofagi, gdyż działają tylko na tę grupę. Do nich należą: Bg 2 M, Bg 8 N, Bg 31 M i Bg 37 M.

2. Do II-giej grupy zaliczyłam 7 szczepów: 1) I. 2, 2) I. 350, 3) I. Rogoziński, 4) I. 5681, 5) H. 511, 6) D. 711 i 7) P. A.

Grupa ta jest niejednolita; na ogół odporna na działanie bakteriofagów. Wrażliwość poszczególnych szczepów na działanie bakteriofagów jest różna.

3. Do III-ej grupy zaliczyłam 4 szczepy: 1) E. 673, 2) I. 674, 3) Kruse Sonne Craig i 4) Kruse-Sonne 20.

Grupa ta jest jednolita. Z trzech grup jest ona najbardziej wrażliwa na działanie bakteriofagów. Z 34 bakteriofagów, szczepy III-ej grupy wrażliwe są na 21 bakteriofagów.

W II-cj części mojej pracy zbadałam w ogólnych zarysach skład antygenowy poszczególnych szczepów metodą aglutynacji i wysycień. Posługiwałam się pięcioma surowicami, które otrzymano przez uodpornienie królików szczepami angielskimi o známym składzie antygenowym. Szczepy te są przedstawicielami pięciu ras angielskich.

P r o t o k o ł N r 2.

Tablica II ilustruje aglutynację szczepów czerwonki rzekomej surowicami angielskimi.

Próby aglutynacyjne wykazały w obrębie badanych szczepów istnienie trzech grup, różniących się własnościami serologicznymi.

Do I-szej grupy należą 4 szczepy: 1) Fl. III, 2) Fl. Poznań, 3) Fl. 1406 i 4) Fl. Pasteur. Szczepy te stanowią jednolitą grupę serologiczną. Poszczególne szczepy aglutynują się jednakowo z poszczególnymi surowicami. Najwyżej zlepiają się z surowicą V, X, Z, z surowicę V i X do pełnego miana, nisko z surowicą Cable 1) 400.

T A B L I C A II
S u r o w i c e.

Szczepy Miano	Whittington Z 1/6400	Oxford V 1/6400	Hughes X 1/2560	Cable W 1/3200	Hiss Russel Y 1/6400
Fl. III	1/1600	1/6400	1/3200	1/400	1/3200
Fl. Poznań	1/3200	1/6400	1/3200	1/400	1/3200
Fl. 1406	1/1600	1/6400	1/1600	1/400	1/3200
Fl. Pasteur	1/3200	1/6400	1/3200	1/400	1/3200
I. 2	1/6400	1/400	1/1600	1/100	1/800
I. Rog.	1/800	1/400	1/200	1/400	1/400
I. 5681	1/6400	1/100	1/200	1/200	1/400
I. 350	1/3200	1/400	1/1600	1/200	1/400
H. 511	1/6400	1/400	1/400	1/100	1/400
D. 711	1/800	1/400	1/200	1/800	1/1600
P. A.	1/3200	1/3200	1/400	1/200	1/400
E. 673	—	—	—	1/200	—
I. 674	—	—	1/100	1/100	—
Kr. S. Cr.	—	—	1/100	1/200	—
Kr. S. 20	—	—	1/100	1/100	—

Do II-ej grupy zaliczam następujące szczepy: I. 2, I. Rogoziński, I. 5681 I. 350, H. 511, D. 711 i P. A.

Jest to grupa niejednolita pod względem składu antygenowego. Szczepy tej grupy niejednakowo zlepiają się z poszczególnymi surowicami.

Szczepy I. 5681, I. 350, H. 511 i I. 2 aglutynują się najwyżej z surowicą Z i X. Szczepy: I. Rogoziński, D. 711 z surowicą Z i W, a szczep P. A. z surowicą Z i V.

Szczepy III-ej grupy E. 673. I. 674, Kruse-Sonne Craig i Kruse-Sonne 20 nie aglutynują się prawie żadną surowicą, b. nisko z surowicą X (Hughes) i W (Cable) 1/100, 1/200.

Dla sprawdzenia pokrewieństwa względnie odrębności składu antygenowego szczepów poszczególnych grup, wysycałam każdą angielską surowicę najwyżej aglutynującym się szczepem każdej grupy. Następnie sprawdzałam metodą aglutynacji, czy wysycona surowica posiada jeszcze aglutyniny i w jakim stopniu dla poszczególnych szczepów.

Przy nastawieniu aglutynacji z surowicą wysyconą, dla kontroli nastawiałam także aglutynację z surowicą niewysyconą.

P r o t o k o ł N r 3.

T A B L I C A I I I

Aglutynacja szczepów z surowicą Hughes X.

Szczepy	Sur. X.	Sur. X. wysyc. szczep. Fl. Poznań	Sur. X. wysyc. szczep. I. 2
Fl. III	1/1600 ++	Nie aglutynuje	Nie aglutynuje
Fl. Pozn.	1/1600		
Fl. 1406	1/1600		
Fl. Past.	1/1600		
I. 2	1/800	1/200	
I. Rog.	1/200	—	
I. 5681	1/200 ++	—	
I. 350	1/800	1/200	
H. 511	1/800	1/200	
D. 711	1/400	—	
P. A.	1/200	—	
Hughes	1/1600	1/400	

Surowica Hughes (X) wysycona szczepem Flexner Poznań (szczep I-ej grupy) traci aglutyniny dla szczepu I-ej grupy i aglutynuje niżej szczepu II-ej grupy, przytem 3 szczepy tej grupy nie aglutynują się wysyconą surowicą zupełnie, a 3 szczepy dają aglutynację, ale niższą niż z niewysyconą surowicę.

Z tego wynika, że szczepy I-ej grupy posiadają część wspólnych i część odrębnych aglutynogenów ze szczepami grupy II-ej.

Nawiasem zaznaczam, że miano surowicy dla szczepu X wynosi 1/1600 — po wysyceniu szczepem Flexner Poznań aglutynuje szczep X 1/400.

Surowica X wysycona szczepem I.2 (II-ga grupa) nie aglutynuje żadnego szczepu I-ej i drugiej grupy; nie aglutynuje także szczepu X. Szczep I. 2 wyabsorbował z surowicy X wszystkie aglutyniny, odpowiadające wyżej wymienionym szczepom.

P r o t o k o ł N r 4.

Surowica Hiss-Russel (Y) wysycona szczepem Flexner Poznań (szczep I-ej grupy) nie aglutynuje szczepów pierwszej grupy. Niektóre szczepy II-ej grupy aglutynują się słabiej, albo wcale nie.

Z tego wynika, że szczep Flexner Poznań wyabsorbował surowicy Y wszystkie aglutyniny charakterystyczne dla pierwszej grupy i częściowo aglutyniny II-ej grupy.

Surowica Y wysycona szczepem D. 711 (szczep II-ej grupy) nie aglutynuje szczepów I-ej i II-ej grupy. Wnosząc z tego, że szczep D. 711 wy-

T A B L I C A IV

Aglutynacja szczepów z surowicą Hiss-Russel Y.

Szczepy	Surowica Y	Surowica Y wysyc. szczep Fl. Poznań	Surowica Y wysyc. szczepem D. 711
Fl. III	1/1600	1/100 ++	Nie aglutynuje
Fl. Poznań	1/1600	1/100 ++	
Fl. 1406	1/800	1/100 ++	
Fl. Pasteur	1/800	1/100 ++	
I. 2	1/800	1/100 ++	
I. Rog.	1/400	1/200 ++	
I. 5681	1/400	1/100 ++	
I. 350	1/400	—	
H. 511	1/800	—	
D. 711	1/800	1/300	
P. A.	1/200	—	

sycił w surowicy wszystkie aglutyniny, warunkujące zlepianie się szczepów I-ej i II-ej grupy z surowicą Y.

P r o t o k o ł N r 5.

T A B L I C A V.

Aglutynacja szczepów z surowicą Whittington. Z.

Szczepy	Surowica Whittington	Surowica Z wysyc. Fl. Pozn.	Surowica Z wysyc. szczep. H. 511
Fl. III.	1/1600	1/100 ++	nie aglutynuje
Fl. Poznań	1/1600	1/100 ++	
Fl. 1406	1/1600	1/100 ++	
Fl. Pasteur.	1/1600	1/100 ++	
I. 2	1/1600	1/1600	
I. Rog.	1/100	1/100	
I. 5681	1/3200	1/3200	
I. 350	1/1600	1/1600	
H. 511	1/6400	1/6400	
D. 711	1/400	1/400	
P. A.	1/1600	1/1600	
Whittington	1/6400	1/6400	1/100 +

Surowica Whittington wysycona szczepem Flexner Poznań przestaje aglutynować szczepy I-ej grupy. Szczepy II-ej grupy aglutynują się wysyconą surowicą do tego samego miana co z surowicą przed wysyceniem. Zjawisko to potwierdza odrębność tych dwóch grup i wskazuje jednocześnie, że w surowicy Whittington każdej z tych grup odpowiadają inne aglutyniny.

Szczep Z aglutynuje się z surowicą Z wysyconą szczepem Flexner Poznań do pełnego miana 1/6400.

Surowica Z wysycona szczepem H. 511 nie daje aglutynacji ze szczepem I-ej i II-ej grupy. Szczep ten wyabsorbował z surowicy wszystkie aglutyniny jednej i drugiej grupy. Szczep Z aglutynuje się z wysyconą 1/100 (przed wysyceniem 1/6400).

Protokół Nr 6.

T A B L I C A V I
Aglutynacja szczepów surowicą Oxford V.

Szczepy	Surowica V	Surowica V wysyc. szczepem Fl. III	Surowica V wysyc. szczepem P. A.
Fl. III	1/12800 ++	Nie aglutynuje	1/200
Fl. Poznań	1/12800		1/400
Fl. 1406	1/12800		1/400
Fl. Pasteur	1/12800		1/400
I. 2	1/400		
I. Rog.	1/200		
I. 5681	1/100		
I. 350	1/400		Nie aglutynuje
H. 511	1/800 ++		
D. 711	1/800		
P. A.	1/1600		
Oxford V	1 3200		1/100

Surowica Oxford (V) wysycona szczepem Flexner II (szczep I-ej grupy) — nie aglutynuje żadnego szczepu.

Surowica V wysycona szczepem P. A. (II-ga grupa) aglutynuje szczepy I-ej grupy 1/400 (przed wysyceniem 1/12000), nie aglutynuje wcale szczepów grupy II-ej.

Wnioskuję, że szczep P. A. wyabsorbował z surowicy wszystkie aglutyniny swojej grupy, częściowo aglutyniny I-ej grupy i prawie wszystkie aglutyniny dla szczepu V, 1/400 (przed wysyceniem 1/3200).

Protokół Nr 7.

Surowica Cable (W) wysycona szczepem Fl. III (I-a grupa) nie aglutynuje szczepów I-ej grupy, nie aglutynuje szczepów II-ej grupy z wyjątkiem dwóch szczepów, które aglutynują się z surowicą wysyconą tak samo jak z niewysyconą; są to szczepy I. Rogoziński i D. 711 — 1/3200. Wysycona surowica nie aglutynuje także szczepów III-ej grupy.

T A B L I C A VII
Aglutynacja szczepów surowicą Cable W.

Szczepy	Surowica W.	Surowica W wysyc. szczepem Fl. III	Sur. W wys. szczep. D. 711	Sur. W. wysyc. szczep. Kr. S. Cr.
F. III	1/3200	—	1/200	1/3200
Fl. Poznań	1/3200	—	1/200	1/3200
Fl. 1406	1/1600	1/100 ++	1/200	1/1600
Fl. Pasteur	1/1600	—	1/200	1/1600
I. 2	1/400	—		1/400
I. Rog.	1/3200	1/3200		1/3200
I. 5681	1/400	—		1/400
I. 350	1/400	—	Nie	1/200
H. 511	1/200	—	aglutynuje	—
D. 711	1/3200	1/3200		1/3200
P. A.	1/400	—		1/400
E. 673	1/400 ++		1/100	1/400 ++
I. 674	1/200 ++		—	1/200
Kr. S. Cr.	1/200 ++	Nie aglutynuje	1/100	—
Kr. S. 20	1/200 ++		1/200	1/200
Cable	1/800	1/800	1/100	

Szczep Cable aglutynuje się tą surowicą jak z niewysyconą—1/800. Miano dla danego szczepu nie spadło.

Surowica W wysycona szczepem D. 711 (II-ga grupa) aglutynuje szczepy I-ej grupy 1:200, a więc niżej niż przed wysyceniem, szczepów II-ej grupy nie aglutynuje. Szczepy III-ej grupy aglutynują się nisko tak samo jak z surowicą niewysyconą 1/100, 1/200. Szczep Cable aglutynuje się 1/100 (miano aglutynacyjne 1/800).

Wniosek. Szczepy I-ej grupy, podobnie jak i szczepy II-ej grupy posiadają część wspólnych i część odrębnych antygenów w stosunku do surowicy Cable.

Surowica W wysycona szczepem Kruse-Sonne-Cr (grupa III). Szczep Kruse-Sonne-Cr wyabsorbował z surowicy aglutyniny tylko tegoż szczepu. Wszystkie pozostałe szczepy dają aglutynację jak z surowicą niewysyconą.

Skład antygenowy szczepów czerwonych typu Flexner na zasadzie zestawionych wyników otrzymanych metodą zlepną (poprz. tablice).

Szczep Skład antygen.

Fl. III Fl. Poznań Fl. 1406 Fl. Pasteur	}	<i>VX_{zw}</i>	Szczepy te stanowią jednolitą grupę pod względem składu antygenowego, przeważa w nich element V i X (szczepy te aglutynują się z surowicą V i X do pełnego miana).
--	---	------------------------	--

I. 2	<i>Zxvw</i>	(Szczep I. 2 aglutynuje się z surowicą Z do pełnego miana 1/6400).
I. Rog.	<i>Zwvx</i>	
I. 5681	<i>Zxvw</i>	(Szczep I. 5681 aglutynuje się z surowicą Z do pełnego miana 1/6400).
I. 350	<i>Xzvw</i>	
H. 511	<i>Zxvw</i>	(Szczep H. 511 aglutynuje się z surowicą Z do pełnego miana 1/6400).
D. 711	<i>Wzvx</i>	

W grupie tej przeważa element Z.

E. 673	}	Szczepy tej grupy nie aglutynują się prawie z żadną surowicą, z surowicą X i W aglutynują się bardzo słabo 1/100 i 1/500.
I. 674		
Kr. S. Cr.		
Kr. S. 20		

Zakwalifikowanie szczepów badanych w obrębie grup jakiejkolwiek klasyfikacji wymagałoby bezwzględnie posługiwania się surowicą przeciwko każdemu z tych szczepów, co właściwie wychodzi poza ramy postawionego mi zagadnienia.

Na podstawie danych przeze mnie zebranych stwierdzić tylko można, że wszystkie szczepy badane mają strukturę antygenową złożoną i narazie trzeba je zaszerzegać w grupie Y klasyfikacji *Andrewesa* i *Inmana*.

Zbadawszy wrażliwości szczepów czerwonych typu Flexner na działanie bakteriofagów i ich własności serologiczne (skład antygenowy zbadalam metodą zlepną) — doszłam do wniosku, że istnieje korelacja między składem antygenowym pałeczek czerwonych typu Flexner, a ich wrażliwością na działanie bakteriofagów.

Panu Profesorowi Z. *Szymanowskiemu* składam serdeczne podziękowanie za podanie mi tematu oraz za rady i wskazówki udzielane mi podczas wykonywania pracy.

Laboratoire de Bactériologie vétérinaire de l'Université Joseph Piłsudski
à Varsovie. Directeur Prof. Z. Szymanowski.

SUR LA CORRÉLATION ENTRE LA LYSO-SENSIBILITÉ ET L'AGGLUTINABILITÉ DES SOUCHES DU B. FLEXNER.

P a r

R. ROGOŹNICKA

R É S U M É.

L'auteur a examiné 15 souches du b. Flexner et 34 phages et a constaté l'existence d'une corrélation entre la lyso-sensibilité et l'agglutinabilité. Les souches sont mises en relation avec la structure antigénique d'après Andrewes et Inman.

P I Ś M I E N N I C T W O.

Andrewes W. and Inman A. C. A Study of the Serological Races of the Flexner Group of Dysentery Bacilli. Medical Research. Council Special Report series Nr. 42. *Sartorius*. Centralbl. f. Bakt. 1929 r., t. 111, 226. *Sartorius*. Centralbl. f. Bakt. 1931 r., t. 112, 135. *Sartorius*. Klinische Wochenschrift 1931 r., str. 2216. *Sartorius*. Zeitschrift f. Immunitätsforschung 1932 r., t. 74, str. 313. *Sartorius*. Medizinische Klinik, 1932 r., str. 777. *Fenigsteinówna*. Medyc. Dośw. i Społeczna 1935 r., t. 19, str. 317.

Wpłynęło 15 II.1937.

Z Zakładu Fizjologii U. J. w Krakowie. Kierownik: Prof. Dr. Jerzy Kaulbersz.

BADANIA NAD NIEPOBUDLIWOŚCIĄ MIĘŚNI POD WPŁYWEM WIELOKROTNEGO DRAŻNIENIA.

P o d a ł

BOŻYDAR SZABUNIEWICZ

Jeżeli mięsień pracujący zaczyna słabiej reagować na jednakowo silne podniety — mówimy zwykle o zmęczeniu mięśnia. Zmęczenie to przypisywane jest powszechnie albo brakowi ciał ulegających rozpadowi przy skurczu, albo brakowi tlenu w środowisku otaczającym mięsień względnie zatruciu mięśnia przez produkty powstające dzięki niecałkowitej resyntezie substancji rozpadających się przy skurczu. Charakterystycznym dla zmęczonego mięśnia jest to, że po odpowiednio długim wypoczynku przy dostatecznym dopływie tlenu mięsień wypoczywa, powraca w nim zdolność do dalszej pracy.

Istnieje jednak jeszcze inny rodzaj pozornego „zmęczenia“, które rozwija się w mięśniu izolowanym, t. j. oddzielonym od organizmu. Stan ten charakteryzuje się tym, że wypoczynek, choćby w atmosferze czystego tlenu, nie powoduje powrotu do normy. Ze stanem takim spotkałem się przy doświadczeniach, w których izolowany mięsień krawiecki żaby drażniony był wielokrotnie. Mięśnie, na których eksperymentowano, pozostawały w możliwie najlepszych warunkach w tlenie i nie były bynajmniej drażnione do wyczerpania. Mimo to po pewnym

czasie rozwijał się w nich stan niepodobudliwości, który raczej pogłębiał się, niż znikał z czasem. Dopiero wymoczenie mięśnia w płynie *Ringera* przywracało mu zdolność do dalszej pracy. Ponieważ zjawisko to może mieć znaczenie nie tylko dla teorii skurczu mięśnia, ale również praktyczne dla badań nad pracą mięśni, więc postanowiłem zjawisko powyższe zbadać dokładnie.

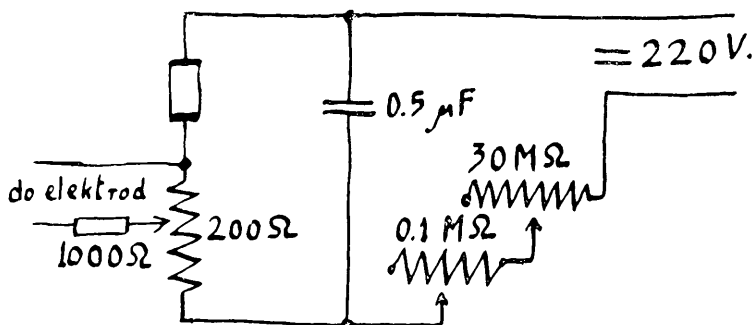
Już dawno w pracowni *A. V. Hilla* spostrzegano, że izolowane mięśnie żaby pozostające w komorze wypełnionej tlenem, stają się czasem niepodobliwe po paru tężcowych skurczach, które bynajmniej nie mogły doprowadzić do wyczerpania mięśnia. Niepodobliwość ustępowała po wypłukaniu mięśnia w płynie *Ringera*. Zauważono również (1), że mięśnie drażnione w atmosferze azotu, jeżeli później odpoczywają w tlenie, stają się po pewnym czasie niepodobliwe i nie powracają do siebie w tlenie, choć można ich niepodobliwość usunąć przez wymoczenie w płynie fizjologicznym. Ostatnie spostrzeżenia potwierdzone zostały przez *Hortona* (2), przy czym okazało się, że niepodobliwość powstaje z powodu zatrucia mięśnia jego własnym potasem, który z włókien wydostaje się do przestrzeni międzywłóknkowej. Po wypłukaniu potasu z mięśnia staje się on znów podobliwy. Z wyżej wspomnianych doświadczeń oraz badań *Duliera* i *Hortona* (3) okazało się, że niepodobliwość na skutek zatrucia potasem pojawia się z reguły w mięśniach izolowanych, które były preparowane bez użycia płynu fizjologicznego, a także w mięśniach uszkodzonych, w mięśniach znajdujących się w płynie w wysokim stężeniu soli potasowych, lub niskim stężeniu chlorku sodu. Z badań opisanych w niniejszej pracy wynika, że podobna niepodobliwość powstaje również często w mięśniach drażnionych grupami podniet.

1. M e t o d y .

Przy badaniu powstawania niepodobliwości wykonywano stale, z wyjątkiem kilku pierwszych doświadczeń, dwa równoległe eksperymenty na dwóch symetrycznych mięśniach krawieckich jednej żaby. Oba mięśnie udaje się łatwo wypreparować bez usz-

kodzenia, jeżeli — po częściowym wypreparowaniu — przeciąć ostrą brzytwą kość łonową pomiędzy przyczepami obu mięśni. Każdy mięsień umieszczony bywał w małej szklanej kamerze wypełnionej żądanym płynem lub gazem. Kamera mogła być dowolnie wypełniona bez poruszenia mięśnia. Kości miednicy przytwierdzano do specjalnego haczyka. Dolny koniec mięśnia przez pośrednictwo ścięgna i nitki łączono z myografem izometrycznym o słabej sprężynie. Mięsień pozostawał w kontakcie z elektrodami.

Do badań używano żab wodnych (*R. esculenta*) i trawiastych (*R. fusca*) różnego pochodzenia, mianowicie belgijskich, angielskich, węgierskich (głównie *R. escul.*) oraz polskich. Posługiwano się głównie małymi żabami, gdyż przy użyciu małych mięśni łatwiej jest o dostateczne przesylenie ich tlenem. Czasem preparowano oba mięśnie krawieckie z nerwami, dla porównania pośrednie-



Rys. 1

go i bezpośredniego drażnienia. Nerw umieszczony bywał na małych elektrodach platynowych, przytwierdzonych do małego parafinowego bloczka. Każdy mięsień po wypreparowaniu i przed eksperymentem umieszczano na przeciąg 1½ godz. w płynie *Ringera*, przez który perliły się pęcherzyki tlenu. Stosowano bodźce maksymalne, przy czym wielkość bodźców oznaczano przed rozpoczęciem doświadczenia i nie zmieniano ich w dalszym ciągu.

Do wytwarzania bodźców służyły wyładowania kondensatora ($\frac{1}{2} \mu F$) przez pośrednictwo lampy neonowej, podług

Hilla. Umożliwiał to drażnienie w dowolnych odstępach czasu, Kondensator był wyladowywany przez opór 200 Ω , od którego część prądu odprowadzano do mięśnia. W przewodniku prowadzącym do mięśnia umieszczony był jeszcze opór 1000 Ω , (Rys. 1). W niektórych doświadczeniach, dla kontroli, mięsień drażniono prądami otwarcia cewki indukcyjnej. Doświadczenia prowadzono w temperaturze pokojowej, która wynosiła 17 — 23°. Skurcze mięśnia były notowane na wolno obracającym się walcu. Jeśli mięsień znajdował się w środowisku gazowym, wówczas wolny prąd gazu stale przepływał przez kamerę. Jeśli mięsień znajdował się w płynie, wówczas pęcherzyki gazu stale mieszały ciecz w kamerze. Badania zostały wykonane w czasie od kwietnia do września 1934 r.

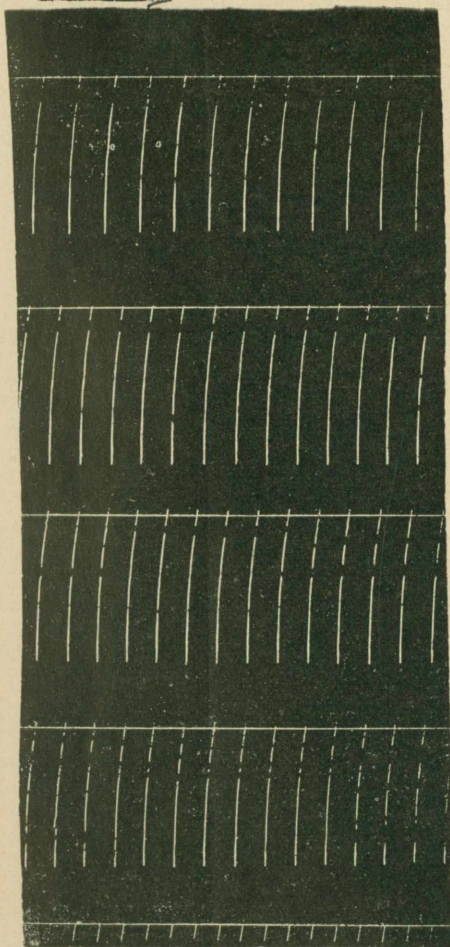
Trzymałem się stale zasady, aby jedno z doświadczeń na jednym z symetrycznych mięśni było doświadczeniem kontrolnym, gdy równocześnie na drugim badano wpływ zmiany warunków, lub sposobu drażnienia.

2. Doświadczenie zasadnicze.

Przy badaniu warunków pojawienia się niepobudliwości w mięśniach pod wpływem drażnienia okazało się zaraz na wstępie, że izolowane mięśnie zachowują się zupełnie odmiennie w zależności od częstości otrzymywanych podrażnień. Jeżeli częstość udzielanych bodźców jest nieznaczna, t. j. mięsień otrzymuje 2 — 3 — 4 maksymalne bodźce na minutę, wówczas jest on zdolny do pracy przez czas bardzo długi, nawet parę dni. Nie wykazuje on przy tym przez dłuższy czas zmęczenia, jeżeli znajduje się w środowisku tlenowym i w niezbyt wysokiej temperaturze. Mięsień wykonać może w tych warunkach kilka tysięcy skurczów. Jeżeli natomiast izolowany mięsień, pozostający zresztą w zupełnie tych samych warunkach, otrzymuje jednakową liczbę podniet na godzinę, ale grupami, w których bodźce szybko — np. co sekunda — po sobie następują, wówczas niepobudliwość szybko się pojawia, mimo długich odpoczynków stosowanych między poszczególnymi grupami podniet.

Dla przykładu przytaczam tu jedno z licznych takich doświadczeń, wykonane dn. 6.IX.34 r. Oba symetryczne mięśnie kra-

mięsień lewy



6. $\overline{\text{IX}}$.

10^h

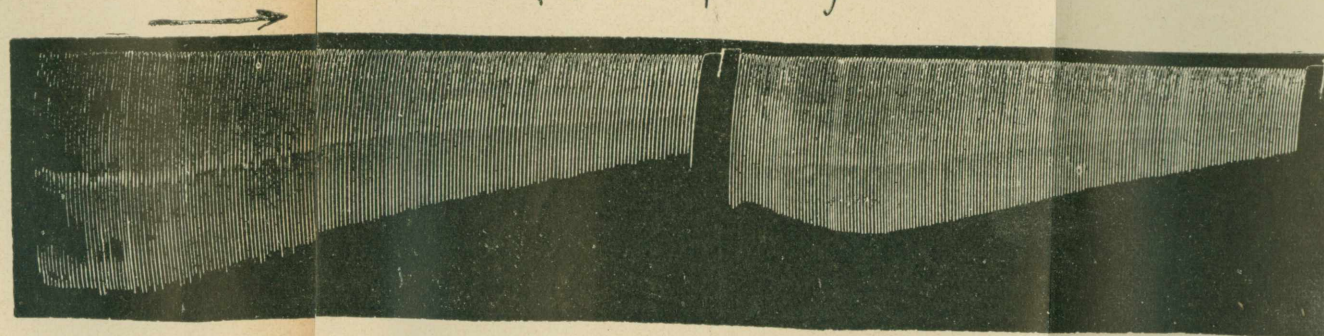
11^h

14^h05

8^h

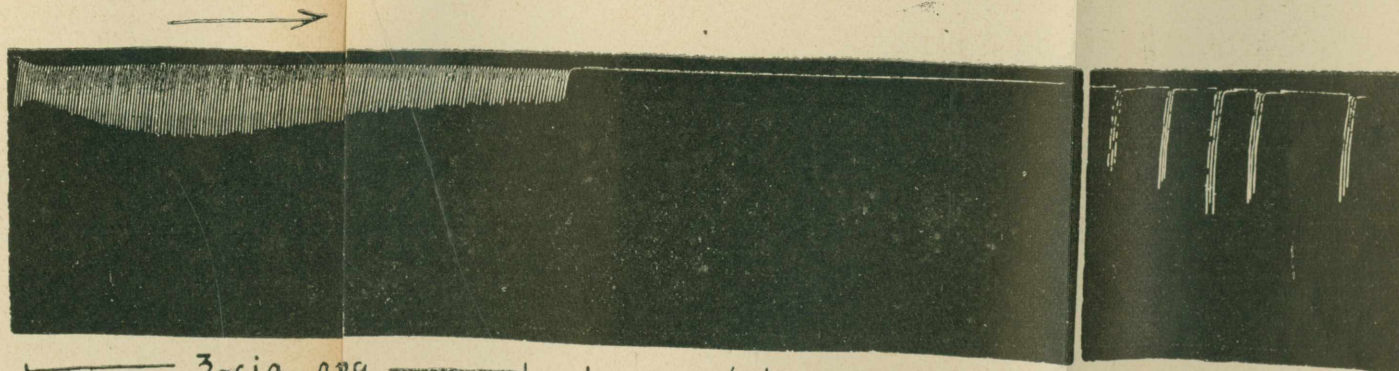
7. $\overline{\text{IX}}$
14^h

mięsień prawy



1-sza grupa
9^h45

2-ga grupa.
10^h45



3-cia grupa
11^h4

4-ta grupa
12^h45

↑
moczenie
od 13^h30 - 14^h

R. 2. Żaba 104. 6. $\overline{\text{IX}}$. 34.

wiekie po wypreparowaniu umieszczone zostały w kamerze w utlenionym płynie *Ringera*, w którym przebywały przez 1½ godz. Następnie płyn wypuszczono i odtąd mięśnie pozostawały w tlenie w temp. 19° C. Po 15 minutach przystąpiono do porównawczego doświadczenia z drażnieniem grupowym.

Mięsień lewy: Podniety maksymalne stosowano regularnie co 15 sekund (t. j. 240 bodźców na godzinę), mięsień działa bez objawów zmęczenia przez cały dzień od rana dalej pracuje bez przerwy przez całą noc, następnie dzień do godz. 14 kiedy eksperyment przerwano. Skurcze mięśnia przy końcu były już słabe, miały ok. 10% wysokości pierwszego skurczu. Po godzinnym odpoczynku na bodźce o tejże samej sile mięsień reaguje skurczami nieco wyższymi — około 15% wysokości pierwszego skurczu. Mięsień wykonał w tym doświadczeniu 6.720 skurczów w ciągu 28¼ godzin. Odpoczynek, trwający godzinę, wpłynął na zmniejszenie zmęczenia.

Mięsień prawy otrzymuje co godzina grupę bodźców maksymalnych złożoną ze 180 podniet następujących szybko po sobie — 80 na minutę. Mięsień ten otrzymywał więc ogółem mniej podniet, niż mięsień lewy, gdyż tylko 180 na godzinę. Bodźce te były tu jednak zgrupowane razem w ciągu 2¼ minut, przy czym po każdej takiej grupie następował blisko godzinny wypoczynek. Rys. 2 ilustrujący to doświadczenie wykazuje, że po 1-szej grupie mięsień wypoczął — choć nie całkowicie. Pierwszy skurecz drugiej grupy jest wyższy, niż ostatni pierwszej. Natomiast po drugiej grupie mięsień nie wykazał oznak wypoczynku, przeciwnie widać, że po przerwie skurcze są jeszcze mniejsze, niż przy końcu drugiej grupy. Czwartej grupy skurczów wogóle już nie dało się otrzymać, ponieważ po dalszej jeszcze godzinnej przerwie mięsień okazał się niebudliwy. Widzimy więc, że wypoczynek w tlenie nie tylko nie wpływa — w naszych warunkach — na wzrost siły mięśnia, ale przeciwnie — osłabienie reakcji czyni postępy także w mięśniu nie pracującym. Po ostatniej grupie bodźców, która pozostała bez reakcji ze strony mięśnia, o g. 12.45 mięsień moczono przez 30 min. w płynie *Ringera*, po czym co 10 min. udzielano mięśniowi 3 bodźce. Widać, że po wymoczeniu w płynie *Ringera* pobudliwość częściowo została przywrócona.

Na podstawie kilkudziesięciu podobnych doświadczeń powiedzieć można, że ogromna większość izolowanych mięśni krwioćwieckich żaby przy podobnym jak wyżej grupowym drażnieniu staje się niebudliwa już po upływie 2 — 3 godzin. Istnieje jednak wielka różnica w sposobie zachowania się różnych mięśni. Kiedy jedne z nich, np. mięśnie żab wiosennych, szczególnie przy badaniu ich w wysokiej temperaturze (23° C.), okazują niebudliwość po upływie $1\frac{1}{2}$ godz., to inne znów wytrzymują czasem nawet kilka grup podniet. Około 80% badanych mięśni okazywało się niebudliwymi 2—3 godz. po rozpoczęciu doświadczenia.

Podobne doświadczenia wykonano jeszcze w inny sposób — przeprowadzając doświadczenie kontrolne na tymże samym mięśniu. Mianowicie po umieszczeniu w kamerze z tlenem drażniono mięsień grupami bodźców po 180 co godzina. Gdy po wykonaniu, zwykłych w tych warunkach, 360 — 540 skurczów mięsień stawał się niebudliwy, wówczas moczo go przez przeciąg $1\frac{1}{2}$ g. w płynie *Ringera*, przywracając mu pełną zdolność reakcji. Następnie rozpoczynano drażnienie mięśnia pojedynczymi bodźcami następującymi co 20 — 25 sek. W takich doświadczeniach łatwo wykazać, że mięsień, który przy grupowym drażnieniu stał się niebudliwy, po wykonaniu kilkuset skurczów, może — po wymoczeniu — wykonać kilka tysięcy skurczów, jakby był zupełnie świeży.

W niniejszych doświadczeniach stosowano różne odstępy czasu pomiędzy poszczególnymi grupami bodźców. Jeżeli grupy te są odpowiednie, wówczas pojawienie się niebudliwości nie zależy od częstości stosowania grup podniet. Pierwsze z odnoszonych doświadczeń wykonano na symetrycznych mięśniach krwioćwieckich jednej żaby. Jeden z nich otrzymywał grupę 180 bodźców (80 na minutę) co godzina, drugi zaś — takąż samą grupę co 30 minut. Okazało się, że czas nastania niebudliwości jest w tych warunkach zupełnie jednakowy w obu mięśniach. Tak więc mięsień, drażniony dwa razy częściej grupami podniet, wykonuje dwa razy więcej pracy. Jeżeli w stosunku do drugiego z mięśni stosować takie same grupy bodźców jeszcze częściej, np. co 20. lub co 10 minut, i wówczas niebudliwość pojawia się

jednocześnie w obu. Poniżej zamieszczona tablica I podaje wyniki kilku odpowiednich doświadczeń.

Wygląda więc tak, jakby ilość pracy wykonana nie wpływała wcale na powstanie niebudliwości. Również i to doświadczenie daje się przeprowadzić na jednym mięśniu: najpierw stosujemy np. grupy bodźców co 30 minut i po nastaniu niebudliwości moczymy mięsień w płynie *Ringera* przez $1\frac{1}{2}$ g., po czym działamy takimiż samymi grupami np. co 10 minut lub co 4. Czas pojawienia się niebudliwości będzie w obu doświadczeniach jednakowy.

T A B L I C A I.

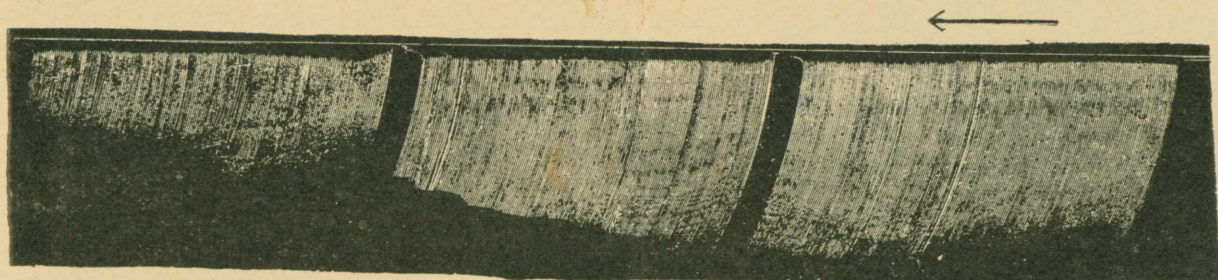
Nr. Żaby	D a t a	Mięsień lewy			Mięsień prawy (kontrolny)		
		Odstęp czasu pomiędzy grupami po 180 podniet	Czas pojawienia się niebudliwości	Liczba wykonanych skurczów	Odstęp czasu pomiędzy grupami po 180 podniet	Czas pojawienia się niebudliwości	Liczba wykonanych skurczów
24	17.V	60 min.	3 godz.	540	30 min.	2 $\frac{1}{2}$ g.	900
26	18.V	60	2	360	"	2 $\frac{1}{2}$	900
31	29.V	60	3	540	"	3	1080
66	20.VIII	60	2	360	"	2	720
69	22.VIII	60	2	360	"	2 $\frac{1}{2}$	850
18	10.V	15	1 $\frac{1}{4}$	1080	"	2	720
67	20.VIII	15	2 $\frac{1}{4}$	1620	"	2	720
71	24.VIII	15	2	1440	"	2	720
25	17.V	10	1 ^h 50	1980	"	2	720
17	9.V	4	1 ^h 40	4500	"	2	720
16	8.V	4	2 ^h 56	7920	"	2 $\frac{1}{2}$	900
76	27.VIII	4	1 ^h 48	4860	"	2	720

W doświadczeniach takich trzeba jednak uwzględnić jeden konieczny warunek: na to, aby stan niebudliwości nie wpłynął na późniejsze zachowanie się mięśnia, tenże nie może być pozostawiony w stanie niebudliwości na długo. Płukanie mięśnia w płynie *Ringera* musi nastąpić natychmiast po zaprzestaniu reagowania na bodźce. Jeżeli mięsień pozostawiony jest w stanie niebudliwym dłużej, wówczas po wymoczeniu nie powraca do

normy — wysokość skureczów będzie stale mniejsza, a skłonność do „zmęczenia“ — większa.

Ponieważ trwanie drażnienia przy stosowaniu grupy liczącej 180 podniet przy częstotliwości 80 na minutę wynosi $2\frac{1}{4}$ min., więc przy stosowaniu takiej grupy co 4 min. przerwy dla odpoczynku mięśnia są bardzo krótkie. Powstało więc pytanie kiedy nastanie niepobudliwość, jeżeli podniety będą stosowane bez przerwy. Jeżeli mięsień pozostaje w tlenie i w niezbyt wysokiej temperaturze, wówczas może pracować przez godzinę i dłużej. Skurecze stają się coraz niższe i po upływie najczęściej 1 — 2 godz. mięsień przestaje reagować. Jednak jeżeli działanie bodźców zostaje przerywane, choćby na kilka minut, wówczas mięsień na nowo staje się czynny, chociaż siła reakcji jest zwykle bardzo słaba. W tych atoli mięśniach — bez względu na to, czy będą nadal pobudzane, czy też nie — niepobudliwość pojawia się w 2 — 3 — 4 godz. po rozpoczęciu drażnienia, jeżeli nie zostaną umieszczone w płynnym środowisku.

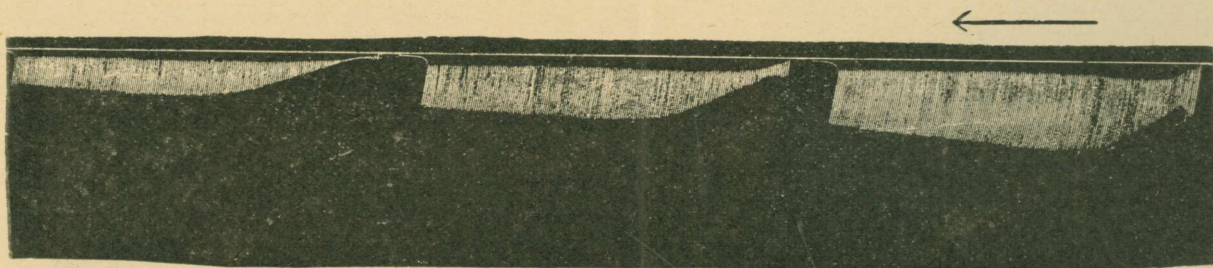
Badanie siły reakcji mięśnia przy grupowym drażnieniu daje możliwość poczynienia ciekawych spostrzeżeń. W obrębie każdej grupy spostrzega się z reguły na początku wzrost siły reakcji (mierzony wysokością skureczów). Jest to zjawisko zwane schodkami *Bowditcha*. W dalszym ciągu reakcja słabnie, co odpowiadałoby powstaniu zmęczenia. Jeżeli porównamy wysokość skureczów w poszczególnych grupach — stosowanych np. co godzina — wówczas spostrzeżemy, że pierwszy skurecz drugiej grupy jest zazwyczaj wyższy, niż ostatni skurecz pierwszej. Jest to zrozumiałe ze względu na oddzielający obie grupy reakcji odpoczynek mięśnia w tlenie. Czasem, jakkolwiek rzadko, to samo dotyczy i trzeciej grupy, której pierwszy skurecz, jest wyższy, niż ostatni poprzedzającej. Z reguły jednak w trzeciej grupie i w dalszych mamy zjawisko odwrotne: pierwszy skurecz danej grupy jest znacznie słabszy, niż ostatni poprzedzającej. Często nawet mięsień nie reaguje wcale, jakkolwiek reagował na ostatnie bodźce grupy, zastosowanej przed godziną. Mamy więc tu zjawisko odwrotne do wypoczynku — w p a u z a c h p o m i ę d z y g r u p a m i b o d ź c ó w pojawia się niepobudliwość. Tak więc w czasie



12^h15

11^h45

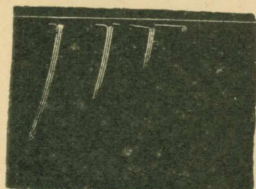
11^h15



13^h45

13^h15

12^h45

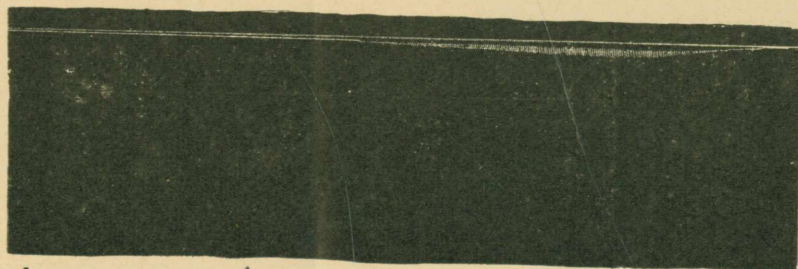


14^h15 ↑ 15^h55 ↑

14^h05 15^h45



↑
noczenie
od 15^h10-15^h40



14^h45

14^h15

Rys 3. Zaba 15. 8.V.34. Sartorius lewy.

wielokrotnego drażnienia rozwija się w mięśniu zmęczenie, a w okresach odpoczynków — stan niebudliwości.

Schodki *Bowditcha* — t. j. wzrost siły reakcji na początku wielokrotnego drażnienia — są tym większe, im silniej wyrażony jest w mięśniu stan niebudliwości. Jeżeli skurcze na początku grupy są słabe, wówczas następne stają się nieraz wielokrotnie silniejsze. Ciekawym jest, że schodki *Bowditcha* uwydatniają się: azwyczaj dopiero po kilku skurczach. Na samym początku grupy zwykle skurcze słabną i dopiero po kilku bodźcach siła reakcji zaczyna wzrastać. Rys. 3 przedstawia przebieg jednego z doświadczeń, w których powyżej wspomniane zjawiska wyrażone są silnie. W doświadczeniu tym mięsień otrzymywał 180 bodźców co 30 minut. Był to silny mięsień (żaba nr. 15, dn. 8. V. 34), który w tych warunkach dał około 1200 skurczów.

Jak to zaznaczyliśmy na początku, wielkość podniety dobierano zawsze na początku eksperymentu i po tym nie zmieniano jej przez cały czas jego przebiegu. To też brak reakcji mięśnia odnosi się właśnie do bodźców, które były maksymalnymi na początku doświadczenia. Okazuje się, że w miarę pojawiania się niebudliwości, bodźce maksymalne na początku okazują się po tym niedostateczne do wywołania najsilniejszej reakcji, a z chwilą nastania „niebudliwości“ opadają poniżej progu pobudliwości. Z chwilą bowiem nastania niebudliwości można uzyskać jeszcze dość znaczną reakcję mięśnia przez użycie silniejszych bodźców. Po pewnym jednak czasie mięsień przestaje reagować nawet na najsilniejsze podniety.

Przy badaniu mięśni żab różnego pochodzenia nie stwierdzono żadnych zasadniczych różnic. Niebudliwość powstaje szczególnie łatwo u żab, które przetrwały zimę. Również umieszczenie żaby przed badaniem na parę tygodni w wyższej temperaturze (15 — 20° C.) ułatwia powstanie niebudliwości. Najtrudniej uzyskać ten stan na mięśniach świeżo złapanych żab na jesieni.

3. Wpływ płynnego środowiska na niebudliwość.

Niebudliwość nie powstaje w mięśniu izolowanym, jeżeli mięsień ten w czasie doświadczenia pozostaje w płynie

Ringera. Również splukiwanie mięśnia od czasu do czasu płynem *Ringera*, lub fizjologicznym roztworem soli znacznie opóźnia, lub nawet uniemożliwia powstanie tego stanu. Przy badaniach niniejszych posługiwano się również dwoma mięśniami symetrycznymi jednej żaby, z których jeden pozostawał w płynie *Ringera* utlenionym, drugi — w tlenie. W paru doświadczeniach posłużono się tym samym mięśniem — najpierw pracującym w tlenie, a po tym w płynie *Ringera*.

Przeprowadzono dalej szereg badań nad długością okresu moczenia mięśnia w płynie *Ringera* w celu przywrócenia mu pełnej zdolności reagowania. Czas ten był dość podobny w różnych doświadczeniach. Trzeba jednak zaznaczyć, że mięsień powinien zostać zanurzony do płynu *Ringera* jaknajprędzej po pojawieniu się niepobudliwości.

Jeżeli za miarę powrotu mięśnia do normy weźmiemy wysokość skurczu, wywołanego poprzednio dobraną podniecią maksymalną, przy czym bodziec próbny zastosujemy zaraz po wypuszczeniu płynu *Ringera*, wówczas łatwo się przekonać, że moczenie mięśnia musi trwać około $1\frac{1}{2}$ godz., aby skurcze były tak wysokie, jak na początku. Czasem zdarza się, że po tak długim wymoczeniu mięśnia skurcze są nawet wyższe, niż na początku.

Jeżeli kąpiel trwa krócej, niż $1\frac{1}{2}$ godz., wówczas natychmiast po wypuszczeniu płynu reakcja jest mniejsza i dopiero z czasem wzrasta, osiągając — zależnie od trwania kąpieli — wartość normalną lub też nie. Po bardzo krótkim moczeniu mięśnia, trwającym np. 3 lub 5 minut, pierwsze skurcze są bardzo nieznaczne, po przerwaniu kąpieli stopniowo wzrastają, osiągając maksimum mniej więcej po godzinie, po czym reakcja znówu słabnie.

W takich doświadczeniach nie można oczywiście zbyt często badać reakcji mięśnia, aby nie wywołać zmęczenia. Przy powyższych badaniach stosowano najczęściej 3 bodźce co 5 lub co 10 min.

Przyczyną powyższych zjawisk jest prawdopodobnie wylugowanie potasu z całego mięśnia przy dłuższej kąpieli, lub też tylko z warstw powierzchownych przy krótszej. W tym ostatnim wypadku po przerwaniu kąpieli stężenie potasu wyrównywuje się stopniowo w całym mięśniu osiągając po pewnym czasie wartość,

przy której wpływ potasu na pracę mięśnia jest już nieznaczny. Wnosić przy tym trzeba, że dla wyługowania potasu z mięśni małych, z jakimi mieliśmy do czynienia, potrzeba ok. $1\frac{1}{2}$ g czasu. Dla dużych mięśni okres ten musi być prawdopodobnie dłuższy. Wniosek ten o tyle ważny jest dla eksperymentów na mięśniu krawieckim, że — jak stwierdzili *Horton* i *Dulier* — samo preparowanie tego mięśnia powoduje powstanie niepobudliwości, jak się zdaje zupełnie analogicznej do naszej. Wobec tego każdy mięsień po wypreparowaniu powinien być umieszczony conajmniej na $1\frac{1}{2}$ g. w płynie Ringera zanim może posłużyć do badania.

Ponieważ mięśnie nasze wykonywały pracę w możliwie najlepszych warunkach, więc zachodzi pytanie, czy i przy normalnym skurczu mięśnia nieizolowanego występuje przemieszczenie potasu w mięśniu, mogące prowadzić do stanu niepobudliwości w razie niedostatecznego krążenia.

4. Wpływ różnych sposobów drażnienia.

Szereg doświadczeń poświęcony został zbadaniu, czy sam sposób pobudzania mięśnia nie był przyczyną powstania niepobudliwości. Drażnienie wyładowaniami kondensatora oraz prądami otwarcia cewki indukcyjnej daje zupełnie jednakowe wyniki. Wykonano również szereg doświadczeń, w których jeden z mięśni symetrycznych jednej żaby pobudzany był bezpośrednio, a drugi przez nerw. Jeżeli oba mięśnie pozostają w jednakowych warunkach i otrzymują jednakowe grupy maksymalnych bodźców czas pojawienia się niepobudliwości w obu mięśniach jest jednakowy. Nawet pojawienie się niepobudliwości jest najczęściej nieco wcześniejsze w mięśniu pobudzonym przez nerw. Tak więc nie podniecia, lecz sam skurcz jest przyczyną powstania zmian w mięśniu.

5. Czas pojawienia się niepobudliwości.

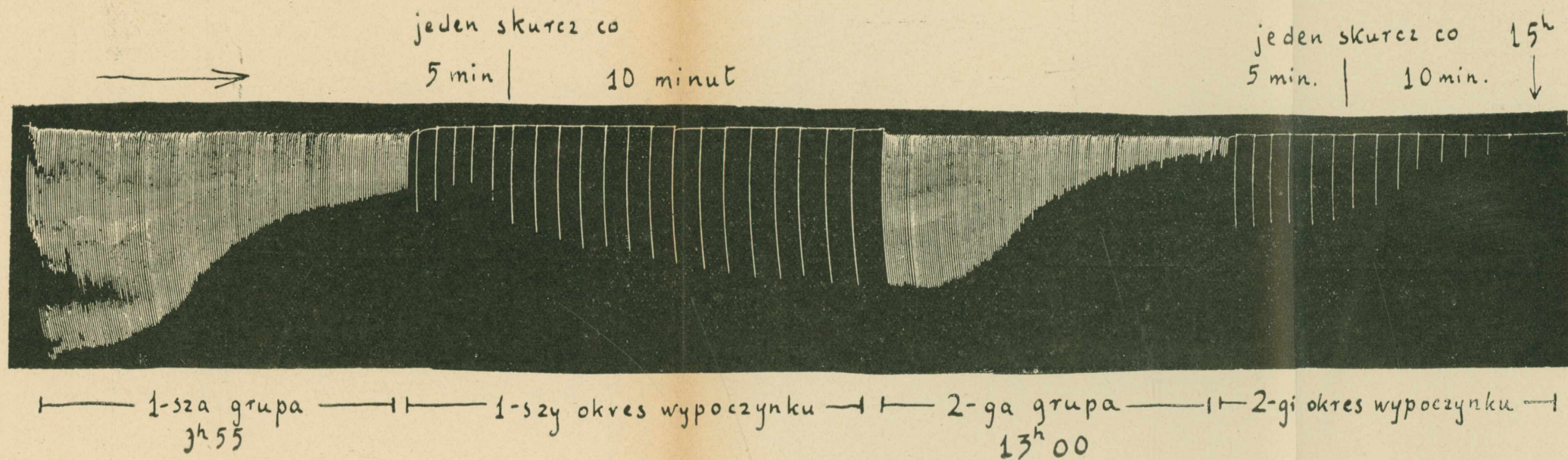
Trzeba więc dojść do przekonania, że niepobudliwość powstaje w mięśniu, który wykonał liczny szereg skurczów szybko po sobie następujących. Nasuwa się pytanie, czy dla pojawienia się

tego stanu konieczne jest zadrażnienie mięśnia szeregiem grup bodźców czy też wystarczy jedna tylko. Odnosne badania wykonano w ten sposób, że mięsień otrzymywał 180 podniet (80 na min.) po czym pozostawał w spoczynku, przy czym w większych odstępach czasu, np. co minutę lub co 5 minut, badano siłę jego reakcji na poprzednio dobrany bodziec maksymalny.

Rys. 4 przedstawia jedno z typowych doświadczeń. Mięsień kontrolny prawy, nie uwzględniony na rysunku, otrzymywał podniety maksymalne co 30 sekund przez przeciąg 12 godz., przy czym przy końcu doświadczenia nie wykazywał objawów większego zmęczenia. Mięsień lewy (rys. 4) otrzymał grupę 180 podniet, po czym wypoczywał, otrzymując jeden bodziec co 5, potem co 10 minut. Widać, że siła reakcji zaraz po grupie bodźców powiększa się, po czym maleje, osiągając minimum po 15 min. Po tym następuje definitywny wzrost siły reakcji. W licznych doświadczeniach sprawdzono, że siła reakcji w tych warunkach zmniejsza się dopiero z obumieraniem mięśnia, a więc po dłuższym czasie. W doświadczeniu, które przytaczamy powyżej, trzy godziny po pierwszej grupie mięsień otrzymał drugą. Także i po tej grupie widzimy szybki wzrost reakcji, po tym (bardzo słabe w danym wypadku) zmniejszenie się jej i znów wzrost, podobnie jak po pierwszej grupie bodźców. W dalszym jednak ciągu reakcja słabnie dość szybko i znika zupełnie w 2½ godz. po udzieleniu drugiej grupy bodźców.

Przebieg podobnych doświadczeń jest bardzo różny zależnie od indywidualnych własności badanego mięśnia. Po zastosowaniu dwóch lub trzech grup bodźców po 180 w odstępach czasu co 60 minut lub dłużej mięsień zwykle staje się niepobudliwy. Tylko nieznaczna część mięśni słabszych staje się niepobudliwa po jednej grupie, przy czym ta niepobudliwość pojawia się dopiero po kilku godzinach.

Zachowanie się reakcji mięśnia po wykonaniu grupy skurczów jest zawsze bardzo charakterystyczne i daje się streścić następująco: 1. Po skończeniu grupy skurczów reakcja mięśnia szybko wzrasta tak, że już kilka sekund po zakończeniu grupy mięsień reaguje znacznie, często 2 i 3 razy, silniej, niż przy ostatnim skurczu grupy. 2. Zaraz po tym wzroście reakcji występuje charakte-



Rys 4. Żaba 77. 27. VIII. 34. Sartorius prawy.

rystyczne jej osłabienie, często nieznaczne, ale zawsze wyraźne, osiągające swe minimum 10 — 20 min. po zakończeniu grupy. 3. Wreszcie później widoczny jest okres powolnego wzrostu siły reakcji, która stopniowo może osiągnąć wielkość taką, jak na początku doświadczenia. Niewiadomo który z powyższych okresów — to znaczy 1. czy 3. — uważać należy za „wypoczynek” mięśnia. Pierwszy z tych okresów występuje bez względu na to, czy mięsień wypoczywa w tleniu, czy też w azocie.

Jeżeli pod wpływem grupy podniet rozwija się w mięśniu nie pobudliwość, wówczas powyższe zmiany siły reakcji przerwane zostają przez stopniowe jej osłabienie, które może doprowadzić do znanego stanu nie pobudliwości. Pierwsze objawy jej mogą ukazać się dopiero po upływie godziny, a nawet paru godzin. W mięśniach osłabionych, albo w takich które już poprzednio otrzymały parę grup podniet, może się zdarzyć, że brak reakcji, który pojawił się w czasie stosowania grupy bodźców, jako objaw zmęczenia, nie ustąpi już więcej, przechodząc niejako w stan nie pobudliwości, która ustąpi dopiero po wymoczeniu w płynie Ringera. Może się też zdarzyć, że po pierwszym okresie wzrostu reakcji występuje jej spadek, prowadzący do stanu nie pobudliwości w ciągu krótkiego czasu. Jednak zdarza się to tylko w bardzo słabych mięśniach.

6. Wpływ tlenu na powstawanie nie pobudliwości.

Wykonano szereg doświadczeń, w których dwa symetryczne mięśnie pozostawały w jednakowych warunkach i były drażnione jednakowymi grupami podniet, lecz jeden z nich pozostawał w tleniu, drugi — w azocie. Okazało się że powstanie nie pobudliwości nie zależy od obecności tlenu w otoczeniu mięśnia. Różnym jest w takich mięśniach powrót do stanu normalnego po otrzymaniu grupy bodźców. Wypoczynek widoczny jest w obu mięśniach, w tleniu i w azocie. Powrót do normy jest nieco szybszy i zupełniejszy w mięśniach umieszczonych w tleniu. Mięśnie, znajdujące się w azocie z reguły nie powracają do poprzedniego stanu — skurcze ich, nawet po dłuższym wypoczynku, pozostają nieco niższe, niż na początku doświadczenia. Tymczasem wysokość skurczów mięśni

trzymanych w tlenie po pierwszej grupie podniet najczęściej (ale nie zawsze) powraca po pewnym czasie do pierwotnej wysokości. Tak wielkich różnic w zachowaniu się mięśni pozostających w tlenie i w azocie, jak to podaje *Fletcher* (4) i liczni inni badacze nigdy nie spostrzegano w ciągu niniejszych doświadczeń.

Mimo tych różnic w wypoczywaniu mięśnia pozostającego w azocie lub tlenie czas pojawienia się niepobudliwości w obu symetrycznych mięśniach był zupełnie jednakowy. W paru doświadczeniach mięsień badano nie w atmosferze gazu, lecz w płynnej parafinie, przy czym okazało się, że i tu czas pojawienia się niepobudliwości nie ulega zmianie.

7. Doświadczenia na mięśniu łydkowym.

Że warunki utlenienia mięśnia nie wpływają na powstawanie niepobudliwości wynika również z eksperymentów przeprowadzonych na mięśniu łydkowym. Ponieważ grubość mięśni krawieckich małych żab nie przekracza zwykle 1 mm, więc, jeżeli mięsień taki pozostaje w atmosferze tlenu, dostęp tego gazu do mięśnia jest w spoczynku zupełnie dostateczny i może go mięśniowi brakować jedynie przy dłuższej pracy (*Hill*, 5). Natomiast grubość mięśnia łydkowego uniemożliwia dostęp tlenu do jego warstw głębszych. Nawet przy wypoczynku tlen miałby dostęp jedynie do warstw powierzchniowych, gdy głębsze pozostawałyby w anaerobiozie (*Hill*). Jeżeli więc brak tlenu, wzgl. wypoczynek mięśnia po pracy przy niedostatecznym utlenieniu, powodowałby powstanie niepobudliwości, wówczas mięśnie łydkowe musiałyby ulegać jej łatwiej, niż krawieckie.

Dla sprawdzenia powyższego wykonano szereg doświadczeń na mięśniach łydkowych, przy czym stale badano jednocześnie m. krawieckie tejsze żaby dla kontroli. Stosowano, jak i w poprzednich doświadczeniach grupy bodźców maksymalnych po 180 w rytmie 80 na min., przy czym używano podniet pośrednich lub bezpośrednich.

Kontrast w zachowaniu się obu mięśni jest ogromny. Gdy mięsień krawiecki — przy stosowaniu grup podniet co 30 — 60 minut — stawał się niepobudliwy po 2 lub 3 godzinach i powracał

do normalnego stanu dopiero po dłuższym moczeniu w płynie Ringera, mięsień łydkowy w tych samych warunkach pracował długi szereg godzin. Doświadczenia na mięśniu łydkowym przerywano zazwyczaj po 10 godzinach, a więc wówczas, gdy mięsień wykonał 1980 skurczów (grupa podniet co 60 min.), wzgl. 3780 skurczów (grupa podniet co 30 min.) przy czym mięsień pracował jeszcze sprawnie, choć wysokość skurczów była mniejsza niż na początku eksperymentu. Czasem mięśnie takie pozostawiano na noc i stosowano dalsze grupowe drażnienie. I wtenczas pracowały one jeszcze przez parę godzin, jakkolwiek wysokość skurczów była nieznaczna.

Mamy tu więc wynik, który wydaje się pozostawać w sprzeczności z dotychczasowymi pojęciami o warunkach pracy mięśni oddzielonych od organizmu. Mięsień krawiecki, mając rzekomo najlepsze warunki pracy, staje się niepobudliwy po paru godzinach grupowego drażnienia, gdy mięsień łydkowy, pracujący w częściowej anaerobiozie, reaguje sprawnie przez liczny szereg godzin i zdaje się wcale nie ulegać stanowi niepobudliwości. Trudno na tym miejscu powiedzieć co jest tu istotną przyczyną, czy specjalne cechy mięśni, czy też fatalny wpływ preparowania i izolowania mięśnia na jego późniejsze losy. Gdyby ta druga możliwość była słuszną, wówczas ogólnie przyjęte zapatrywanie, że mięsień krawiecki i inne o włóknach równoległych, przedstawiają szczególnie korzystne obiekty doświadczeń, musiałyby ulec rewizji.

8. Wpływ wielkości grupy bodźców na powstawanie niepobudliwości.

Powstanie niepobudliwości przy grupowym drażnieniu zależy w wysokim stopniu od liczby podniet w grupach. Tak np. ogromna większość badanych mięśni zapadała w stan niepobudliwości po 2 — 3 godz. przy stosowaniu 180 bodźców co 60 minut. Natomiast stosując po 90 bodźców co 30 min. w tym samym rytmie, t. j. 80 na minutę, znacznie trudniej jest uzyskać niepobudliwość — przeważnie mięśnie pracują kilka godzin zanim stan ten powstanie. Przez stosowanie 60 podniet co 20 minut nie daje się zwykle wywołać niepobudliwości — choć wysokość skurczów się zmniej-

sza, ale mięsień może pracować długi szereg godzin. Przy jeszcze mniejszych i częściej stosowanych grupach skutek jest jeszcze słabszy — stan mięśni w czasie doświadczenia jest wówczas zupełnie podobny do tegoż, gdy mięsień otrzymuje np. jedną podniecie co 30 sek. Tak więc widać, że dla powstania niepobudliwości konieczne jest, aby liczba bodźców po sobie następujących była dość liczna.

Wyniki podobnych doświadczeń przedstawiają się różnie w zależności od indywidualnych własności mięśni. Mięśnie żab słabych stają się niepobudliwe nawet przy stosowaniu zupełnie małych grup bodźców, np. 40 co 20 minut. Są to jednak wyjątki, spotykane najczęściej u żab, które przezimowały w przechowalni, lub przebyły dłuższy czas w zbiornikach o wysokiej temperaturze. Przeciwnie, żaby świeżo złapane późną jesienią wytrzymują 180, a nawet 300 podnieć co godzina przez czas dłuższy.

Jeżeli badamy zachowanie się siły reakcji mięśnia między grupami bodźców w mięśniu żab bardzo silnych, wówczas możemy nieraz spostrzec pojawianie się niepobudliwości nie w postaci braku, lecz zmniejszenia siły reakcji. Jednak po pewnym czasie reakcja znów wzrasta i powraca do normalnej wielkości. Tak więc również i w mięśniach silnych żab stan ten pod działaniem drażnienia grupowego powstaje, ale zostaje najwidoczniej przez mięsień opanowany.

W tych badaniach indywidualne różnice w mięśniach różnych żab są bardzo znaczne, przy czym z góry nie można powiedzieć, jak zachowują się mięśnie danej żaby. Wobec tego koniecznym jest przeprowadzanie eksperymentów na dwóch mięśniach symetrycznych jednej żaby, z których jeden służy za kontrolę. Również dobrze można powtórzyć doświadczenie na tym samym mięśniu po przywróceniu jego pobudliwości przez dłuższą kąpiel w płynie Ringera.

Obniżenie reakcji mięśnia pod działaniem stanu niepobudliwości nieczym nie różni się od zmian w „zmęczeniu“. Ponieważ stany te splatają się nieraz ze sobą, więc nieraz można się spotkać z trudnością rozstrzygnięcia, czy ma się do czynienia z niepobudliwością, zachodzącą pod działaniem zatrucia potasem, czy też ze „zmęceniem“ mięśnia, a więc stanem powstałym także

wskutek pracy, ale z innych powodów. Rozstrzygającym jest tu głównie zachowanie się mięśnia w kąpeli — niepobudliwość znika pod działaniem kąpeli całkowicie, jeżeli kąpiel zastosowano dość wcześnie. Natomiast zmęczenie znika w czasie wypoczynku mięśnia.

W n i o s k i.

W powyższych badaniach przeprowadzono próby w celu wyświetlenia warunków powstawania specjalnego stanu niepobudliwości w mięśniu krawieckim żaby, izolowanym. Stan ten powstaje prawdopodobnie w skutek zatrucia mięśnia własnym potasem, a spowodowany jest pracą mięśnia w specjalnych warunkach, mianowicie stan ten rozwija się, gdy mięsień wykonuje liczny szereg skurczów pojedynczych szybko po sobie następujących. Stan ten nie powstaje pod działaniem samego bodźca, ani też pod wpływem większej liczby wykonanych skurczów, ale właśnie wówczas, gdy skurcze te następują szybko po sobie. Dla pojawienia się tego stanu koniecznym jest, aby mięsień był izolowany i by pozostawał w otoczeniu, do którego nie mogłyby dyfundować ciała powstające w mięśniu, a więc np. w gazie lub w płynnej parafinie. Stan niepobudliwości nastaje w warunkach podobnych do tych, w jakich występuje zmęczenie. Niepobudliwość pojawia się jednak nie natychmiast po zastosowaniu grupy bodźców, lecz dopiero po upływie paru godzin. Niepobudliwość pogłębia się z czasem, gdy zmęczenie w miarę czasu przemija.

From the Institute of Physiology University of Kraków,
Director Prof Dr. J. Kaulbersz.

INVESTIGATIONS ON THE UNEXCITABILITY OF MUSCLES SUBJECTED TO REPEATED IRRITATIONS.

B y
B. SZABUNIEWICZ

S U M M A R Y.

When isolated sartorius muscle in gas atmosphere is subjected to series of about 180 twitches, with large intervals between

them, then during the resting periods the reaction of the muscle is weaker, and finally a state of unexcitability sets in. This state is probably due to the toxic action of potassium derived from the muscle. The character of the stimuli which the muscle receives has no influence on the appearance of the state of unexcitability. The groups of twitches should be adequately large and the contractions must follow each other in quick succession to produce the state of unexcitability. Unexcitability will not appear if the muscle is placed in Ringer's solution, or if it is rinsed with the solution during the intervals between the series of twitches. The presence or absence of oxygen is of little importance in the onset of unexcitability. Unexcitability appears gradually during the resting periods between the series of twitches.

P I Ś M I E N N I C T W O .

1) *Hill A. V.* Proc. of the Roy. Soc. B. 103, s. 157, 1928. 2) *Horton.* Journal of Physiology, 70, s. 389, 1930. 3) *Dulière a. Horton.* Journal of Physiol. 67, s. 153, 1929. 4) *Fletcher.* Journal of Physiol., 28, s. 474, 1902. 5) *Hill A. V.* Proc. of the Roy. Soc., B. 104, 1926.

Wpłynęło 16.11.1937.

Z Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie. Dyr. Doc. Dr. G. Szulc.

UODPORNIANIE KONI ANATOKSYNĄ BŁONICZĄ AŁUNOWĄ.

P o d a ł

J. CELAREK

Z chwilą gdy *Glenny* 1) i inni wprowadzili strącanie anatoksyny błonicznej za pomocą ałunu, pojawił się szereg prac omawiających wszechstronnie to zagadnienie. W wyniku tych prac ustaliło się powszechnie zapatrywanie, że anatoksyna błonicza strącona ałunem ma znaczną przewagę nad zwykłą anatoksyną, jeśli chodzi o uodpornianie dzieci przeciw błonicy a to z następujących powodów: precypitat ałunowy anatoksyny przedstawia większą siłę antygenową, wysysa się powoli a wskutek tego działając przez dłuższy czas, daje możliwość stosowania mniejszych ilości anatoksyny i ograniczenia ilości zastrzyków nawet do jednego. Stwierdzono też, że preparat w dawkach stosowanych u dzieci nie jest szkodliwy.

Na podstawie tych obserwacji rozpoczęto i u nas (w Warszawie) stosować anatoksynę ałunową do szczepień ochronnych.

Zajdlówna i Mayzner 2) podali, że mieli dobre wyniki po jednokrotnym szczepieniu kilkudziesięciu dzieci anatoksyną ałunową przyrządzoną z anatoksyny oczyszczonej za pomocą ultrafiltracji.

Obecnie przeprowadza się szczepienia anatoksyną ałunową na większą skalę, ale jeszcze tytułem próby.

Doświadczenia, których wyniki podaję w niniejszej pracy, miały na celu uświadomienie sobie, czy anatoksyna ałunowa na-

da się do uodporniania koni, aby otrzymać surowicę błoniczą. Zapatrywania na tę kwestię są dotychczas podzielone. Tak np. *Solman* 3) stwierdza, że objawy po zastrzyknięciu anatoksyny ałunowej koniom są naogół szkodliwe. Występują one po paru dniach lub tygodniach, gdy ałun zniknął już zupełnie ze krwi i osadził się w komórkach. Objawy są podobne do zatrucia arszenikiem a więc: upośledzenie odżywiania, zaburzenia i paraliż czucia, zapalenie wielu nerwów, uszkodzenie ciałek krwi i krańcowa anemia.

Podobne zdanie o trującym działaniu ałunu można znaleźć i u innych autorów.

George F. Leonard 4) szczepił konie anatoksyną i toksyną błoniczą z ałunem, mieszając je z wyjałowionym 10% roztworem ałunu w takiej ilości, aby mieszanina zawierała 0,5 czystego ałunu. Do badań użył 23 koni wstrzykując im przez szereg miesięcy w odstępach 2 — 3 dniowych najpierw anatoksynę ałunową później zaś toksynę ałunową. Po upływie 6 miesięcy padło 16 koni, przy czym wiele koni wykazało typowe objawy chronicznego zatrucia ałunem, opisanego przez *Solmana*. Miano otrzymywanej surowicy było średnio tylko nieznacznie wyższe w porównaniu z koźmi szczepionymi zwykłą metodą.

W przeciwieństwie do tego *Harold W. Lyall* 5) podaje, że otrzymuje świetne rezultaty stosując toksynę tężcową ałunową do produkcji antytoksyny tężcowej.

Aczkolwiek dotychczasowe szczepienia koni w Państwowym Zakładzie Higieny w Warszawie anatoksyną błoniczą zwykłą, względnie koncentrowaną przez ultrafiltrację dawały nam w naszych warunkach zupełnie dostateczne wyniki — otrzymujemy surowice o przeciętnym mianie 300 — 400 — 600 jednostek — to jednak postanowiłem przekontrolować, czy będą jakieś widoczne korzyści przy stosowaniu anatoksyny ałunowej.

1. Przyrządzanie zawiesiny ałunowej.

A. Anatoksyna.

Do strącania anatoksyny używano stale 10% roztworu ałunu chemicznie czystego (*Merck*), w jałowej wodzie destylowanej.

Roztwór filtrowano przez Berkefelda. Tak przygotowany roztwór wykazywał średnio:

pH 2,74 (elektrometr.)
Al 0,55% (met. oxychinolin.)
Siarczany 2,07% w przeliczeniu na H_2SO_4

Proces strącania odbywał się w odpowiednich naczyniach szklanych, kalibrowanych i wyjałowionych. Do strącania brano anatoksyny błonice przyrządzone w/g Ramona, które zawierały 0,3% fenolu dla konserwacji, o przeciętnym mianie 20 — 30 A. J. R. Na jedną jednostkę przypadało przeciętnie 0,2 — 0,1 mgr. azotu. Początkowo dodawano różne ilości ałunu, zależnie od tego, ile było potrzeba ałunu do maksymalnego wytrącenia się anatoksyny. Potrzebną ilość ałunu ustalano uprzednio na małych próbkach w kalibrowanych probówkach do wirówki. Powstającą ilość strątu odczytywano po 3 minutach wirowania. Zwykle trzeba było dodawać 15 — 25% roztworu ałunu. Później na podstawie obserwacji własnych i innych dodawano stale 15% roztworu ałunu t. j. 1,5% ałunu.

Po 24 godz. oddzielano strąt od płynu i przemywano go 2 razy roztworem fizjologicznym na dużej wirówce, w możliwie jałowych warunkach. Ostatecznie przemyty strąt rozcieńczano solą fizjologiczną z 0,5% fenolu do objętości 10 razy mniejszej od użytej pierwotnie anatoksyny. Otrzymana w ten sposób zawiesina wykazuje dużą liczbę jednostek antygenowych (A. J. R.) Straty na jednostkach wynoszą podczas całego procesu strącania od 10 — 30%.

Strąt ałunowy anatoksyny zawieszony w soli fizjologicznej poddany dializie w woreczkach pergaminowych i celofanowych nie zmienia nawet po 6 dniach objętości, wyglądu oraz własności antygenowych (ilość A. J. R.). Po kilkudniowej zaś dializie w niezmiennianej wodzie destylowanej, woda nie zawiera ani siarczanów ani związków azotowych. Otrzymywany więc z anatoksyny strąt posiada charakter koloidu nieprzechodzącego przez błony pergaminowe i celofanowe i nie może być dalej oczyszczany przez dializę.

Zawarte w strącie jednostki czynne nie dają się odmywać 2,4% roztworem fosforanu sodu ($\text{Na}_2\text{PHO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$), co różni

go od strątu otrzymywanego za pomocą wodzianu glinu metodą *Schmidt'a*. Należy więc przypuszczać, że jednostki czynne anatoksyny nie są luźno adsorbowane na powierzchni tworzącego się strątu.

Strąt alunowy rozpuszcza się bez strat jednostek czynnych w mocnych roztworach cytrynianu amonowego, zwykle po upływie kilku godzin. Średnio na 100 cm³ zawiesiny trzeba było około 10 gr. cytrynianu oraz pewnej ilości H₂O. Tak przyrządzone roztwory, poddawane ultrafiltracji przez 10% kolloidium, dawały ponowne zagęszczenie jednostek, jednak ze zwykłą stratą, jak przy ultrafiltracji.

Zawiesiny „anatoksyny alunowej“ mianowano metodą Ramona. W tym celu odmierzano 10 cm³ zawiesiny do kolbki, rozcieńczano pewną ilością wody destylowanej, dodawano cytrynianu amonu *in substantia* tak, aby nastąpiło zupełne rozpuszczenie się i pozostawiano na 1 godz. i dopełniano wodą destylowaną do 100 cm³. W ten sposób rozpuszczona anatoksyna alunowa zawierała 80 — 250 A. J. R. w 1 cm³ zależnie od mocy użytej do strącania anatoksyny. Azotu przypadło na jednostkę 5 — 10 razy mniej od wyjściowej anatoksyny.

Zawiesiny przeznaczone do szczepień koni były rozcieńczane tylko tyle, aby otrzymana gęstość nie przeszkadzała przy wykonywaniu zastrzyku. Zastrzykiwano w porównaniu ze zwykłą anatoksyną odpowiednio mniejsze objętości materiału.

Dla przykładu podaję cyfrowe wyniki oznaczeń 2 zawiesin otrzymanych z anatoksyn N. 126 i 115.

Anatoksyna Nr 126.

Naturalna:

Miano 10 A. J. R.
Azotu na jednostkę. 0,324 mgr.
Dodano alunu . . 350 g.

Alunowa ¹⁾:

Miano 80 A. J. R.
Azotu na jednostkę . . 0,077 mgr.

Al.	0,6066 %
Po przeliczeniu na ałun .	10,67 %
Pozostało ałunu . . .	213,4 gr.
Usunięto	39 %
Siarczanów	śląd

(po rozpuszcz. i doprowadz. do pierw. objęt.).

Anatoksyna Nr 115.

Naturalna:

Miano	18 A. J. R.
Azotu na jednostkę .	0,196 mgr.

Ałunowa¹⁾:

Miano.	150 A. J. R.
Azotu na jednostkę .	0,036 mgr.
Al.	0,6 %
Po przeliczeniu na ałun .	10,37 %
Siarczanów	śląd

(jak wyżej).

B. Toksyna.

Przystąpiono również do strącania powyższą metodą toksyny błoniczej, spodziewając się otrzymać w postaci zawiesiny preparat oczyszczony, skoncentrowany i dokładnie wymiareczkowany o silnie wzmożonych własnościach antygenowych i toksycznych. W myśl pracy *Leonard'a* miałem zamiar stosować taką toksynę do szczepienia koni w późniejszym przebiegu immunizacji. Jednocześnie spodziewałem się, że uda się, zaobserwować w jaki sposób antytoksyna będzie wiązać toksynę z takich zawiesin.

Poddano strącaniu 5 toksyn: jedną stabilizowaną jednoroczną i 4 świeżo przyrządzone o mianie około 15 do 20 A. J. R. Niestety we wszystkich 5 przypadkach ani w strątach ani w odrzuconych płynach nie można było odnaleźć czynnych jednostek meto-

¹⁾ Obiętościowo 10-krotne stężenie.

dą flokulacji jak również i na zwierzętach. Należy przypuszczać, że pod wpływem ałunu toksyny podlegały szybkiemu, całkowitemu rozkładowi. Zresztą częściowy rozpad obserwowano i przy innych metodach zagęszczania toksyn (znaczny spadek miana po zakwaszeniu, strącaniu wodzianem glinu i t. p.). Jako przykład podaję przebieg strącania toksyny 31/36 o mianie flokulacyjnym 15 A. J. R.

	AŁUNEM (met. Glenny)		FOSFOR WAPNIA (met. Quigley'a)		WODOROTL. GLINU (met. Schmidt'a)
	toks. bez antysept.	toks. z 0,5% karb.	toks. bez antysept.	toks. z 0,5% karb.	toksyna bez antyseptyku
Ilość użyta.	500 ccm.	500 ccm.	500 ccm.	500 ccm.	400 ccm.
Strącalnik.	70 ccm.	10% roztw. ałunu	50 ccm.	10% chlorku wapnia + 100ccm 10% fosf. sod.	postęp. ściśle p/g metod. Schmidt'a
Ph usuw. płyn.	6,3	6,3	6,6	6,6	
Objętość za- wies. z osadu.)	50 ccm.	50 ccm.	100 ccm.	100 ccm.	dializat przesącz. i doprow. do 100 ccm.
Miano preparatu	0	0	15 A.J.R.	15 A.J.R.	14 A. J. R.

*) Po doprowadz. do objęt. odpowiad. ilości użytej toksyny.

Wobec powyższego nie można było przyrządzić do szczepień koni toksyny ałunowej i należało poprzestać jedynie na anatoksynie ałunowej.

2. Szczepienie koni.

Szczepienie koni przeprowadzono w dwu seriach. Pierwsza seria obejmowała 7 koni, w czym jeden był już poprzednio uodporniony anatoksyną błoniczą strącaną kwasem benzoesowym według metody *Spasowicza i Porębskiego* 6) i wykazał po pierwszym upuście 400 jedn. Druga seria składała się z 10 koni również nie-szczepionych uprzednio. Uwzględniając przewidywaną lepszą antygenowość anatoksyny ałunowej ustalono z początku następujące przeciętne dawki anatoksyny w przeliczeniu na jednostki antygenowe:

600 — 1200 — 2400 — 3600 — 4800 — 6600 — 6800 A. J. R.

Obiętościowo przedstawiały te dawki 5 razy mniej płynu niż przy użyciu anatoksyny zwykłej. Każdy koń otrzymywał więc razem 26100 A. J. R. Przy drugiej serji koni powiększono dawki do 9, wobec czego każdy koń otrzymywał przeciętnie 60.000 AJR. Przerwy między poszczególnymi dawkami wynosiły 8 — 10 dni. Konie szczepiono jak zwykle podskórnie na bokach. U wszystkich koni przed rozpoczęciem szczepień oznaczono ilość naturalnej antytoksyny we krwi względnie wykonano odczyn skórny z toksyną błoniczą według metody *Celarka i Porębskiego* 7).

Przebieg szczepień i objawy poszczepienne były na ogół u wszystkich koni więcej niepomysłne niż u koni szczepionych zwykłą metodą przy użyciu anatoksyny zwykłej względnie toksyny. Szczególnie należy zaznaczyć, że występowały większe obrzęki na podbrzuszu niż po zwykłej anatoksynie, temperatura poszczepienna była bardzo wysoka (do 40°) i utrzymywała się dłużej. Utrzymywał się również dłużej brak apetytu po szczepieniach.

I. S E R I A

Nazwa	Antytoks. naturalna	Liczba jednostek antytoksyny po dawkach					U W A G I.
		1	2	3	4	7	
Burzyca	<1/10 j.	<15	15	<15	50	<30	Po 3-ciej dawce b. du- ży obrzęk
Bałağuła	1/10 j.	15	40	50	—	100	
Buziak	1/5 j.	<15	30	—	—	—	Po 2-iej dawce duży obrzęk temp. 40°, padł po 25 dniach od pierw. szczepienia począwszy
Biedrze- niec	<1/10 j.	20	50	100	—	30	
Balwierz	1/5 j.	30	100	—	—	40	Po każdym szczepieniu duże obrzęki
Balton	1/5 j.	40	100	50	—	—	Po każdym szczep. du- że obrzęki i wysoka temp. Padł na 51 dzień po rozpoczęciu szczep.
Bezik	400 j.	200	200	200	150	100	Koń już uodporniony — ostatni upust wyka- zał 400 jedn.

II. S E R I A.

Nazwa	Odczyn skórny przed szczep.	Liczba jedn. antytoksyny po dawkach				U W A G I
		3	4	7	9	
Błyszcz.	0	—	25	—	—	Padł po 6-ej dawce
Baronet	+++	—	<15	—	<50	
Bark	+++	—	—	15	<50	
Boja	0	—	20	—	50	
Bulwa	+	—	50	—	<50	
Bera	0	—	20	—	<50	
Bagiera	++++	—	30	—	<50	
Bartnik	++	—	<15	—	100	
Brednia	++++	<15	—	—	<50	
Bambino	0	—	<15	—	<50	

W miejscach szczepień powstawały twarde zgrubienia trwające dłuższy czas (około 14 dni i więcej). Na ogólną liczbę 17 koni szczepionych padło w ciągu szczepień 3 konie co wynosi prawie 18%. Nie zaobserwowano natomiast u koni szczepionych ani postępującej anemii, ani upadku stanu ogólnego. Strata na wadze po ukończeniu całego okresu szczepiennego wynosiła od 5 — 50 klg., niektóre konie przybrały nawet nieznacznie na wadze.

Ostateczny wynik uodporniania koni tą metodą był zupełnie niepomysłny. Miano surowic po pierwszym upuście, jak wykazują tablice, było bardzo niskie. U jednego konia (Bezik) który był dawniej szczepiony anatoksyną benzoesewą i dał miano 400 jednostek po pierwszym upuście, spadło miano w trakcie szczepień anatoksyną ałunową do 100 jedn. Koń ten po odpoczynku dostał kilka dawek anatoksyny benzoesowej w płynie oleistym podskórnice, po czym miano podniosło się do 300 jednostek. Równocześnie z pierwszą serią koni szczepionych anatoksyną ałunową nastawiono jednego konia na szczepienia anatoksyną benzoesewą. Otrzymywał on proszek anatoksyny benzoesowej zawieszony w płynie oleistym podskórnice. Razem otrzymał 5 dawek = 26000 AJR.

Przed szczepieniem posiadał 1 jedn. antytoksyny naturalnej i odczyn skórny ujemny. Po 50 dniach od rozpoczęcia szczepień

zrobiono upust i stwierdzono 1500 jednostek antytoksyecznych w surowicy.

Jak widać z powyższej obserwacji, nie mogłem uzyskać danych, któreby przemawiały za tym, że stosowanie anatoksyny alunowej błoniczej do uodporniania koni jest korzystne.

Jest ono gorzej znoszone przez konie i jest bardziej kłopotliwe, jeśli wziąć pod uwagę zabiegi przy strącaniu anatoksyny, i mniej pewne pod względem aseptyki.

Institut d'Hygiene d'Etat à Varsovie. Directeur Dr. G. Szulc.

SUR L'IMMUNISATION DES CHEVAUX PAR L'ANATOXINE DIPHTE'RIQUE PRÉCIPITÉE PAR L'ALUN.

P a r

J. CELAREK

R É S U M É .

La méthode de la préparation de l'anatoxine diphtérique précipitée par l'alun est décrite. La vaccination des chevaux (en somme 17) par cette anatoxine ne présente aucun avantage notable. Par contre la préparation présente beaucoup plus d'embarras et elle est moins sûre en ce qui touche à l'aseptique. L'anatoxine précipitée par l'alun est mal supportée par les chevaux qui ont donné des sérums à titres très bas (30 — 100 unités antitoxiques).

P I Ś M I E N N I C T W O .

1) *Glenny. A. T.*: Brit. Med. Jour. Nr. 3632, str. 244. 1930. 2) *Zajdlówna R. i Mayzner M.*: Med. Dośw. i Społ. t. 19. 1935. 3) *Sollman T.*: Manuel of Pharmacology, str. 1006. 1927. 4) *George F. Leonard and James R. Varley.*: Jour. Imm. 1932. 5) *Harvey W. Lyall.*: Annual Rep. of the Div. of Labor, and Research, New-York State, str. 38. 1932. i str. 43. 1934. 6) *Spasowicz T. et Porębski W.*: C. R. Soc. Biol. t. 113, str. 1267. 1933. 7) *Celarek, J. et Porębski W.*: C. R. Soc. Biol. str. 1017. 1928.

Wpłynęło 18.II.1937.

Z Zakładu Bakteriologii Wydziału Weterynaryjnego Uniw. J. P.
Kierownik Prof. Dr. Z. Szymanowski.

PRZYCZYNKI DO SPRAWY SWOISTOŚCI RAKTARIOFAGÓW GRONKOWCOWYCH.

Doniesienie I.

Absorpcja swoistych bakteriofagów
przez różne szczepy gronkowca

Podala

HENRIETTA FISZERÓW

Pracą niniejszą stanowi przyczynek do różniczkowania bakteriofagów na podstawie ich powinowactwa do szczepów wrażliwych. Zagadnieniem tym zajmował się przede wszystkim *Burnet* i jego współpracownicy a następnie *Levine* i *Frisch*. Badania te opierały się na założeniu, że swoisty węglowodan (antygen resztkowy) bakteryj wrażliwych może ulec związaniu przez bakteriofaga działającego na dany szczep i przez to zahamować działanie bakteriofaga na inny szczep zawierający ten sam składnik chemiczny. *Burnet* posługiwał się metodą płytkową, t. j. obliczał liczbę pól jałowych na płytce, otrzymanych raz przez bakteriofaga niezwiązanego, a drugi raz po jego związaniu. Jeżeli liczba pól jałowych otrzymanych w identycznych warunkach spadła do 20% wówczas uważał związanie za dokonane, stwierdzał, że szczep wrażliwy zawiera ten sam składnik węglowodanowy jaki znajduje się w bakterii użytej do związania. *Levine* i *Frisch* posługiwali się metodą probówkową. Wychodzili oni z założenia, że związanie

bakteriofaga przez bakterie zabite ma charakter nieodwracalny. Wskutek tego świeża zawiesina bakteryj wrażliwych dodana po związaniu może wykazać pozytywne działanie bakteriofaga tylko wtedy, jeżeli ten ostatni jest wolny. Dla tych autorów miarodajny jest więc spadek miana bulionu litycznego następujący po związaniu. Badania dotychczasowe były przeprowadzone na większą skalę tylko na szczepach z grupy salmonella. Dopiero w ostatnich czasach ukazały się prace nad innymi bakteriami, a mianowicie nad gronkowcami (*Brunet i Lush, M. i T. Rakieten i Doff*).

Moja praca miała być jeszcze jedną próbą zbadania gronkowców, biorąc pod uwagę ich własności indywidualne wyrażające się w zdolnościach absorbowania swoistego bakteriofaga.

Zbadałam 7 szczepów gronkowców wyhodowanych z ropy, wobec 2 bakteriofagów. W pierwszej części pracy sprawdziłam działanie lityczne fagów wobec moich gronkowców dwiema metodami 1) na płytkach *Petriego* z 1,5% agarem i 2) w probówkach z bulionem o Ph. 7,8.

Metoda płytkowa. Na płytce rozpościelałam równomiernie świeżą 24-godz. hodowlę gronkowcową, poczym w trzech miejscach zwilżałam cienkie paseczki na płytce, przygotowanymi rozcieńczeniami bakteriofaga: rozc. 0, 1; 0,0000; 0,000001. Po 24 godz. w termostacie zaobserwowałam wyniki:

Szczepy NrNr 1, 3, 4, 5, 6 pozostawały niewrażliwe na działanie faga i płytki były równomiernie pokryte nalotem bakteriynym.

Natomiast szczepy Nr. Nr. 2 i 7 — wykazały dość znaczną wrażliwość, jak to wynika z podanego niżej zestawienia:

D l a s z c z e p u Nr 2.

W rozc. 0,1	liczne kolonie motylkowe
„ 0,00001	wzrost normalny
„ 0,000001	wzrost normalny.

D l a s z c z e p u Nr 7.

W rozc. 0,1	duże łysinki, bardzo zmienione pojedyncze kolonie
„ 0,00001	dość dużo pojedynczych dziurek
„ 0,000001	nieliczne pojedyncze dziurki.

2. Te same badania wykonane metodą próbkową dały wyniki znacznie dokładniejsze. Wykonanie miało przebieg następujący:

Do serii rozcieńczeń bakteriofaga w bulionie, o Ph. 7, 8 dodaję po 3 krople zawiesiny gronkowcowej, przygotowanej jak następuje: 1 oczko z 24-godz. hodowli na agarze skośnym rozcieram w 5 cm.³ bulionu, po czym wstawiam wszystko na 15 minut — 1/2 godz. do termostatu. Następnie jedno oczko z tej hodowli znów rozcieńczałam w 5 cm.³ bulionu.

Wyniki otrzymane po 8 godz. w cieplarni przedstawiają poniższe tabele.

BAKTERJOFAG I.

B. fag I.	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	10 ⁻¹⁰	K.
szczep 1.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
" 2.	—	—	—	—	—	+++	+++	+++	+++	+++	+++
" 3.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
" 4.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
" 5.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
" 6.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
" 7.	—	—	—	—	—	—	—	+++	+++	+++	+++

Legenda: +++ wzrost — rozpuszczenie.

BAKTERJOFAG II.

B. FAG II.	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	10 ⁻¹⁰	Kontr.
szczep 1.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
" 2.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+++
" 3.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
" 4.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
" 5.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
" 6.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+++
" 7.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+++

W dalszym ciągu doświadczeń stosowałam już tylko metodę próbkową, która pozwoliła mi na otrzymanie dokładniejszych wyników, co widać z przytoczonych w dalszym ciągu pracy tablic.

Następnie badałam zdolności absorpcyjne wszystkich zabitych szczepów.

Metodyka pracy była, jak następuje:

24-godz. hodowlę gronkowca na agarze skośnym zmywałem 10 cm.³ płynu fizjologicznego i otrzymaną zawiesinę rozcieńczałem 5-ciokrotnie; ogrzewałam ją na łaźni wodnej przez godzinę w 80° C, zaś po upływie tego czasu zawiesinę rozcieńczałam ponownie 10 razy i ogrzewałam tak jak poprzednio. Dopiero tym sposobem udało mi się zabić moje szczepy. Tak przygotowane zawiesiny dodawałam do probówek, zawierających rozcieńczenia bakteriofaga, o skontrolowanej dokładnie mocy działania. W przypadku faga I brałam rozcieńczenia od 10^{-1} do 10^{-6} , a przypadku faga II — od 10^{-1} do 10^{-7} , w ilościach 0,25 cm.³ zawiesiny na 0,25 cm.³ bfaga. Wszystko razem wstawiałam na 24-godz. do termostatu i po upływie tego czasu sprawdzałam związanie jak następuje:

Do wszystkich probówek dolewałam po 2,5 cm.³ bulionu i zaszczepiałam go trzema kroplami hodowli bulionowej gronkowców, których wrażliwość na lityczne działanie bakteriofagów była mi dokładnie znana. Sposób przyrządzenia tej zawiesiny nie różnił się niczym od podanego już powyżej.

Wyniki obserwowałam po 8 godz. inkubacji w cieplarni. O ile związanie nastąpiło — otrzymywałam normalny wzrost stafilokoków na bulionie, jeśli zaś nie — to fag znajdujący się w roztworze w stanie wolnym działał litycznie na szczepy kontrolujące.

Wyniki obserwacji zestawione są w załączonych tablicach.

Szczepy wiążące bakteriofaga I.

Wysyceno	sprawdz.	rozcieńczenia								Kontrola
		10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	
1	7	+	+	+	+	+				+
1	2	+	+	+	+	+				++
2	7	+	+	+	+	+				++
2	2	+	+	+	+	+				++
4	7	—	—	+	+	+				++
4	2	—	—	—	—	+				+
6	7	+++	+++	+++	+++	+++	+++			+++
6	2	+++	+++	+++	+++	+++	+++			+++
7	7	+	+	+	+	+				+
7	2	+	+	+	+	+				+
K	7	—	—	—	—	—	—			+
K	2	—	—	—	—	—	—			+
Szczepy niewiążące bakteriofaga I.										
5	7	—	—	—	—	—	—			+++
5	2	—	—	—	—	—	—			+++
kt.	7	—	—	—	—	—	—			+++
kt.	2	—	—	—	—	—	—			+++

Z powyższego wynika:

- Szczep Nr 1 — niewrażliwy, wiąże od rozc. 10^{-1} do 10^{-5}
 „ Nr 2 — wrażliwy, „ „ „ 10^{-1} do 10^{-5}
 „ Nr 4 — niewrażliwy, „ „ „ 10^{-2} do 10^{-5}
 „ Nr 5 — niewrażliwy, nie wiąże w żadnym rozcieńcz.
 „ Nr 6 — niewrażliwy, wiąże od rozc. 10^{-1} do 10^{-5}
 „ Nr 7 — niewrażliwy, „ „ „ 10^{-1} do 10^{-5}

(To samo doświadczenie wykonane z paratyfusem *Ktery* wykazało, że jest on niewrażliwy i nie wiąże bfga. w żadnym rozcieńczeniu).

Szczepy wiążące bakteriofaga II.

Wysyceno	sprawdz.	rozcieńczenia								kontrola
		10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	
1.	6	—	—	+	+	+	+	+		+++
	7	.	..	...	+	+	+	+		+++
	2	+	+	+	+	+	+	+		+
2.	6	+	+	+	+	+	+	+		+
	7	+	+	+	+	+	+	+		+
	2	+	+	+	+	+	+	+		+
3.	6	+++	+++	+++	+++	+++	+++			+++
	7	+	+	+	+++	+++	+++			+++
	2	—	—	+++	+++	+++	+++			+++
4.	2	—	—	—	+++	+++	+++			+
	6	+	+++	+++	+++	+++	+++			+++
	7	—	—	—	++++	—	—			+++
6.	2	+++	+++	+++	+++	+++	+++			+++
	6	+++	+++	+++	+++	+++	+++			+++
	7	—	—	—	—	+++	+++			+++
7.	2	—	+	+	+	+	+	+		+++
	6	—	—	+	+	+	+	+		+++
	7	—	—	—	+++	+++	+++	+		+++
kontrola	2	—	—	—	—	—	—			+++
	6	—	—	+	+	+	+			+++
	7	—	—	—	—	—	—			+++
Szczepy niewiążące										
5.	2	—	—	—	—	—	—	—		+++
	6	—	—	—	—	—	—	—		+++
	7	—	—	—	—	—	..	.		+++
ktery	2	—	—	—	—	—	—	—		+++
	6	—	—	+	+	+	+			+++
	7	—	—	—	—	—	—	—		+++

(.); (.. — męł ledwo widoczny.

Legenda: $\left\{ \begin{array}{l} \text{Kt.—Ktery. B. paratyphi abortus equi.} \\ + \quad \text{wzrost} \\ ++ \quad \text{„ silniejszy} \\ +++ \quad \text{„ najsilniejszy} \\ - \quad \text{rozpuszczenie (brak wzrostu).} \end{array} \right.$

Z powyższego wynika:

Szczep Nr 1 — niewrażliwy, wiąże	1.)	od 10^{-3}	do 10^{-7}
	2.)	„ 10^{-1}	„ 10^{-7}
	3.)	„ 10^{-1}	„ 10^{-7}
„ Nr 2 — wrażliwy, „	„	„ 10^{-1}	„ 10^{-7}
„ Nr 3 — niewrażliwy, „	1.)	„ 10^{-1}	„ 10^{-6}
	2.)	„ 10^{-1}	„ 10^{-6}
	3.)	„ 10^{-2}	„ 10^{-6}
„ Nr 4 — niewrażliwy, „	1.)	„ 10^{-1}	„ 10^{-6}
	2.)	„ 10^{-4}	„ 10^{-4}
	3.)	„ 10^{-3}	„ 10^{-6}
„ Nr 5 — niewrażliwy, nie wiąże w żadnym rozcieńczeni.			
„ Nr 6 — wrażliwy, wiąże	1.)	od 10^{-1}	do 10^{-6}
	2.)	„ 10^{-1}	„ 10^{-6}
	3.)	„ 10^{-5}	„ 10^{-6}
„ Nr 7 — wrażliwy, „	1.)	„ 10^{-2}	„ 10^{-7}
	2.)	„ 10^{-3}	„ 10^{-7}
	3.)	„ 10^{-4}	„ 10^{-7}

(To samo doświadczenie wykonane z paratyfusem *Ktery*, wykazało, że jest on niewrażliwy i nie wiąże w żadnym rozcieńczeniu).

W badaniach przeprowadzonych nad dwoma fagami i siedmioma szczepami gronkowcowymi napotykałam na jeden szczep. oznaczony Nr. 5 — który był niewrażliwy na działanie lityczne i nie miał zupełnie zdolności absorbowania swoistego bakteriofaga. Należy zaznaczyć, że szczep ten różnił się od pozostałych również pod względem morfologicznym, dając znacznie delikatniejszy i mniej obfity wzrost na agarze.

W dalszym ciągu pracy b. ważnym będzie zapoznanie się z tym szczepem i z pozostałymi gronkowcami z punktu widzenia ich własności serologicznych.

Reasumując wyniki mej pracy streszczam:

Napotkałam szczepy gronkowców trojakiego rodzaju:

- 1) niewrażliwe na działanie lityczne, a wiążące swoistego bakteriofaga.
- 2) wrażliwe na działanie lityczne i wiążące swoistego bakteriofaga.
- 3) niewrażliwe na działanie lityczne i nie wiążące swoistego bakteriofaga.

Na zakończenie dziękuję serdecznie Panu Prof. Drowi *Z. Szymanowskiemu* za kierownictwo i pomoc przy wykonaniu tej pracy.

Z Zakładu Bakteriologii Wydziału Weterynaryjnego Uniw. J. P.
Kierownik Prof. Z. Szymanowski.

PRZYCZYNNY DO SPRAWY SWOISTOŚCI BAKTERIOFAGÓW GRONKOWCOWYCH.

Doniesienie II.

Stosunek między zlepliwością szczepów
gronkowcowych a ich zachowaniem się
względem bakteriofagów.

Podał

P. GANC

Twort, wysiewając krowiankę na agar, zauważył, że część wyrosłych kolonii gronkowca białego posiada postać nieprawidłową; kolonie te stawały się przejrzyste, ulegały rozpuszczeniu. Po przeniesieniu cząsteczki takiej kolonii na kolonię zdrową, *Twort* stwierdził na niej podobne zmiany. Uczony ten sądził, że ma tu do czynienia z niewidzialnym droboustrojem, lub, co wydawało mu się prawdopodobniejsze, z fermentem autolitycznym, wytwarzanym przez bakterie.

D'Herelle zauważył, że przesącze kałowe rekowalescentów po przebytej czerwonce działają rozpuszczająco na pałeczki czerwoneki *Shiga*, hamują wzrost hodowli bulionowej tych bakterii. W hodowlach pałeczki *Shiga* na płytkach agarowych pod wpływem takiego przesącza powstawały plamki, czyli pola jałowe — *tâches vièrges*. Pola te w/g *d'Herelle'a* były koloniami bakteriofaga, którym jest przesączalny mikrob, pasożyt bakterii — „bacteriophaga”

gum intestinale“. Mikrob ten daje się przenosić z jednej hodowli na drugą, hodować i wzmacniać.

D'Herelle twierdził, że istnieje jeden tylko bakteriofag o zdolności przystosowania się do różnych bakterii. Wzera się on w ciało bakterii, rozmnaża się tam i wytwarza ferment rozpuszczający bakterie. Pogląd *d'Herelle'a* o jednolitości czynnika litycznego okazał się niesłusznym w miarę gromadzenia się materiału doświadczalnego. Stwierdzono mianowicie, że wśród bakteriofagów różnych szczepów: gronkowców ropotwórczych, pałeczek duru brzuszego, paratyfusu, czerwonki *Shigi* lub *Flexnera*, okrzężnicy, odmieńca, dżumy, przecinkowców cholery i innych — jedne działają na pewne tylko szczepy danego gatunku, nie działając na inne,, inne znów bakteriofagi działają na pojedyncze szczepy różnych gatunków.

Burnet zwrócił swe badania w kierunku stwierdzenia podobieństwa między szczepami tak samo reagującymi na działanie fagów. Stwierdził on różną wrażliwość na lityczne działanie bakteriofaga w szczepach z grupy *Salmonella* przy przejściu z fazy S do R. Jak wiadomo przechodzenie jednej z tych postaci w drugą uwarunkowane jest zmianami w obrębie antygeny ciepłostłego, przy czym antygen rzęskowy żadnej roli tutaj nie odgrywa. Przy przejściu od S do R zanika antygen O pierwotny i jego miejsce zajmuje nowy antygen O — kosmopolityczny. U bakterii o zróżniczkowanych antygenach H i O *Burnet* znalazł fagi działające na szczepy o wspólnym antygenie O, a także działające na obie fazy R i S razem.

W dalszym ciągu prac zaczęto się zastanawiać nad mechanizmem działania bakteriofagów. Stwierdzono, że przed rozpuszczeniem fag musi zostać zaabsorbowany przez powierzchnię bakterii. Tę własność absorpcji posiadają nie tylko bakterie żywe, ale nawet zabite przez ogrzewanie i wcale nie rozpuszczające się. W wyniku badań na tej drodze stwierdzono, że nie rozpuszczanie, ale właśnie wiązanie należy uważać za proces swoisty w działaniu fagów.

Burnet wraz z *Gough'em* wykazali, że czysty hapten węglowodanowy, wydobyty z bakterii ma zdolność wiązania faga.

Mieszanie faga z roztworem swoistego węglowodanu wykazuje na płytce zahamowanie działania faga: liczba łysinek opada wybitnie, co wskazuje na wiązanie faga przez swoiste węglowodany.

Levine i Frisch zastąpili tę metodę, metodą probówkową, wychodząc z założenia, że proces wiązania przez zabite drobnoustroje jest procesem nieodwracalnym. Do probówek wlewali zawieszinę zabitych bakterii z grupy *Salmonella* i rozcieńczonego faga w różnych ilościach. Po pewnym czasie stania w termostacie w temp. 37° C. dodawali kilka ccm bulionu i sprawdzali wiązanie przez dodatek kilku kropli młodego wrażliwego szczepu.

Uczeni ci stwierdzili, że antygen somatyczny O warunkuje absorpcję faga, albowiem bakterie o tym samym antygenie ciepłostałym wiążą tego samego faga.

Wszystkie te prace dotyczyły bakterii z grupy *Salmonella*. *Burnet i Lush* zajęli się gronkowcami.

Świeżo wyhodowane gronkowce różnią się bardzo słabo i to tylko ilościowo pod względem wrażliwości na działanie bakteriofaga. Nieliczne silne fagi działają dobrze w temp. 37° C., słabe działają lepiej w temp. 22° C. i nie namnażają się w bulionie. *Burnet i Lush* operowali metodą płytkową i stwierdzili, że jedynie szczepy o pełnej niewrażliwości nie dawały związania bakteriofaga. Te same badania przerobili metodą probówkową *M. i T. Rakieten i Doff*, nie otrzymali jednak jasnych wyników.

W pracy mojej chodziło mi o zbadanie zależności pomiędzy wrażliwością działania fagów, a cechami serologicznymi.

Zadaniem pracy niniejszej było porównanie zlepliwości szeregu szczepów gronkowcowych z ich zachowaniem się względem bakteriofagów.

Doświadczenia przerobiłem nad 7 szczepami gronkowców, zbadanymi uprzednio pod względem działania na nie 2 bakteriofagów przez *H. Fiszerowównę* oraz nad 14 innymi szczepami gronkowców wyhodowanymi z ropy. Szczepy *H. Fiszerowówny* oznaczone były nr. nr.: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, szczepy pozostałe — 23, 24, 25, 26, 28, 29, 31, 34, 35, 36, 37, 38, 41, 42.

Dla otrzymania surowicy odpornościowej szczepiłem dwa króliki. Jednemu, oznaczonemu nr. I, wstrzykiwałem szczep nr. 4,

drugiemu, oznaczonemu nr. II — szczep nr. 5. Wybrałem te dwa szczepy, gdyż według badań *H. Fiszerowówny* szczep nr. 4 wiązał oba bakteriofagi, natomiast szczep nr. 5 nie wiązał żadnego.

Przed rozpoczęciem uodporniania stwierdziłem, że surowica królika nr. I nie zawierała fizjologicznych przeciwciał, natomiast surowica królika nr. II aglutynowała szczepy nr. 1 i 2 do miana 1/320, a szczep nr. 5 do miana 1/160.

Po zastosowaniu serii zastrzyków otrzymałem surowicę anty-4 zlepiającą własny szczep do miana 1/2560 oraz surowicę anty-5 zlepiającą własny szczep do miana 1/640.

Z tymi dwiema surowicami przerobiłem aglutynacje ze wszystkimi szczepami. Aglutynacja nastawiana w normalny sposób t. j. na dwie godz. w termostacie i odczytywana po 24 godz. nie dawała jasnych wyników, to-też w dalszym toku doświadczeń pozostawiałem próbki w łaźni wodnej w temp. 50° C. w ciągu 2 — 3 godz., a odczytywałem aglutynację po 24 godz. stania w temperaturze pokojowej.

Otrzymałem wyniki aglutynacyjne z surowicą anty-4 i anty-5. Jak widać z załączonej tabeli nr. I, szczepy nr. 4 i nr. 5 różnią się antygenowo, gdyż obie surowice zlepiają nie jednakowo te same szczepy.

W celu lepszego wykazania tych różnic wysyciłem surowicę anty-4, szczepem nr. 5 i surowicę anty-5 szczepem nr. 4.

Wyniki aglutynacji ilustruje tablica nr. II.

Porównanie aglutynacji z surowicami niewysyconymi z jednej strony, a z surowicami wysyconymi z drugiej, nasuwa pewne wnioski.

Szczepy, których aglutynacja z surowicą wysyconą różni się w dużym stopniu od aglutynacji z surowicą nie wysyconą, zawierają oczywiście antygen odpowiadający szczepowi wysycającemu. Co do niektórych szczepów zarysowują się wybitne różnice w aglutynacji; a więc szczep nr. 6, zlepia się z surowicą anty-4 do miana 1/320, a po wysyceniu surowicy zawiesiną szczepu nr. 5 — do miana 1/80. Szczep ten więc musi zawierać w swoim składzie antygen odpowiadający szczepowi nr. 5. Z drugiej strony zawiera on mało antygenu odpowiadającego szczepowi nr. 4, gdyż aglutyna-

T A B L I C A 1 i I I.

Szczep nr.	miano aglutacyjne surowicy		Szczep nr.	miano aglutacyjne surowicy	
	anty 4	anty 5		anty 4 wys. 5	anty 5 wys. 4
1	1/640	1/80	1	1/160	1/20
2	1/1280	1/160	2	1/640	1/20
3	1/2560	1/640	3	1/1280	1/20
4	1/2560	1/640	4	1/320	0
5	1/40	1/1280	5	0	1/640
6	1/320	1/80	6	1/80	1/40
7	1/160	0	7	1/160	0
23	1/160	1/40	23	1/160	1/40
24	1/1280	1/80	24	1/640	0
25	0	0	25	0	0
26	1/40	0	26	0	0
28	1/20	0	28	1/40	0
29	1/160	1/160	29	1/160	1/80
31	1/40	1/160	31	1/40	0
34	1/160	1/80	34	1/160	1/40
35	1/640	1/640	35	1/160	1/40
36	1/640	1/40	36	1/160	0
37	1/160	1/320	37	1/80	1/80
38	1/160	1/80	38	1/160	1/40
41	1/160	1/40	41	1/40	0
42	1/640	1/160	42	1/80	1/160

cja jego z surowicą anty-5, wysyconą zawiesiną szczepu nr. 4, opada b. nieznacznie.

Na tej drodze możemy wyodrębnić dwa rodzaje szczepów:

- 1) — szczepy nr. 6 i 42 zawierające w swoim składzie przeważnie antygen 5.
- 2) — szczepy nr. 2, 3, 24, 31, 37 — Zawierające w swoim składzie przeważnie antygen 4.

Co do pozostałych szczepów nie możemy wysuwać żadnych wniosków, gdyż wysycenie surowic na krzyż daje dla obu aglutynacji wyniki mało różniące się między sobą. Oczywiście pochodzi to stąd, że w naszym rozumowaniu ujmujemy tylko fragment struktury antygenowej, gdyż mamy zbyt mało danych, ażeby odtworzyć z większymi szczegółami mozaikę antygenową szczepów.

Zobaczymy teraz, jak się odbija obecność dwu różnych antygenów na zachowaniu się szczepów w stosunku do bakteriofagów; czy szczepy nr. 6 i 42 zachowują się tak samo, jak szczep nr. 5,

a szczepy nr. 2, 3, 24, 31, 37, — jak szczep nr. 4. Zagadnienie to stanowiło drugą część moich doświadczeń.

Badania wykonałem następującą metodą próbowkową:

Do serii rozcieńczeń bakteriofaga w bulionie o $\text{Ph} = 7,8$ dodawałem po 2 krople zawiesiny gronkowcowej przygotowanej w nast. sposób:

Zmywałem 24 godz. hodowlę na agarze skośnym 10 cem płynu fizj.; jedną kroplę takiej zawiesiny dodawałem do 10 cem bulionu, po czym wstawiałem wszystko na 8 — 10 godz. do termostatu.

**Wyniki otrzymane po 24 godz. w temp. 22 — 28° C. wykazuje
nast. zestawienie**

Nr.	Bfg 1	Bfg 2
1	niewrażliwy	niewrażliwy
2	wrażliwy w rozc. 10^{-1} — 10^{-6}	wrażliwy w rozc. 10^{-1} — 10^{-6}
3	niewrażliwy	niewrażliwy
4	"	"
5	"	"
6	"	"
7	wrażliwy w rozc. 10^{-1} — 10^{-6}	wrażliwy w rozc. 10^{-1} — 10^{-6}
23	niewrażliwy	niewrażliwy
24	"	"
25	"	"
26	"	"
28	wrażliwy w rozc. 10^{-1} — 10^{-4}	wrażliwy w rozc. 10^{-1} — 10^{-2}
29	niewrażliwy	niewrażliwy
31	wrażliwy w rozc. 10^{-1} — 10^{-3}	wrażliwy w rozc. 10^{-1} — 10^{-4}
34	niewrażliwy	niewrażliwy
35	wrażliwy w rozc. 10^{-1} — 10^{-2}	wrażliwy w rozc. 10^{-1}
36	" 10^{-1} — 10^{-2}	" 10^{-1}
37	" 10^{-1}	" 10^{-1} — 10^{-2}
38	" 10^{-1} — 10^{-2}	" 10^{-1} — 10^{-4}
41	niewrażliwy	niewrażliwy
42	wrażliwy w rozc. 10^{-1} — 10^{-4}	wrażliwy w rozc. 10^{-1} — 10^{-4}

Z powyższego zestawienia wynika, iż w obrębie wyżej wyodrębnionych grup szczepy nie zachowują się względem bakteriofagów jednolicie. Zarówno w jednej, jak i w drugiej grupie znajdują się bowiem szczepy wrażliwe i niewrażliwe na działanie bakteriofagów.

Powyższe doświadczenie przerobiłem także metodą płytkową:

Na płytce Petriego z 1,5% agarem rozpościarałem równomiernie świeżą, 24-godzinną hodowlę gronkowca, po czym w kilku miejscach opuszczałem po

kilka kropli uprzednio przygotowanych rozcienceń bakteriofaga. Po 25 godz. — w termostacie obserwowałem wyniki, które były podobne do wyników metody probówkowej, jednakże mniej dokładne.

Wobec wyników powyższych doświadczeń, ostatnia część mej pracy, dotycząca wiązania bakteriofaga, została wykonana na niektórych tylko szczepach. Z grupy „piątki” — nad szczepami nr. 5 i 42, z grupy „czwórki” — nad szczepami nr. 2, z grupy pozostałej — nad szczepami nr. 23, 25 i 28.

Metodyka tej pracy była następująca:

24-godziną hodowlę gronkowca na agarze skośnym zmywałem 2 ccm. płynu fizjologicznego i ogrzewałem na łaźni wodnej przez godzinę w temp 70° C. Po tym czasie zawiesinę rozcieńczyłem 10-krotnie i znowu ogrzewałem przez godzinę w 70° C. W ten sposób udało mi się zabić moje szczepy.

Tak przygotowane zawiesiny w ilości 0,25 ccm dodawałem do szeregu rozcienceń bakteriofagów (o skontrolowanej dokładnie mocy działania), również w ilości 0,25 ccm. i wstawiałem do termostatu na 24 godz.

Po upływie tego czasu sprawdzałem wiązanie, jak następuje:

Do każdej z probówek dolewałem 4,5 ccm. bulionu o $\text{Ph} = 7,8$, i zaszczeptałem to 2—3 kroplami hodowli bulionowej szczepu nr. 2, którego wrażliwość na lityczne działanie bakteriofagów była mi znana. Sposób przyrządzenia tej zawiesiny był indentyczny z podanym już wyżej.

Wynik kontroli obserwowałem po ośmiu godz. inkubacji w termostacie. Gdy otrzymywałem normalny wzrost — związanie nastąpiło, jeśli zaś wzrostu nie było, świadczyło to o tym, iż fag znajdujący się w roztworze w stanie wolnym, działa litycznie na szczep kontrolny.

Doświadczenia powyższe wykazały, iż wszystkie zbadane szczepy wiążą oba bakteriofagi w rozc. 10^{-1} — 10^{-5} z wyjątkiem szczepu nr. 5, który nie wiąże bakteriofaga nr. I i nr. II w żadnym rozcienceniu.

W badaniach swych znalazłem zatem jeden tylko szczep nie absorbujący faga, to też nie miałem wystarczającego sprawdzianu dla moich doświadczeń. W dalszym ich toku w tej dziedzinie należy rozszerzyć badania przede wszystkim na większą liczbę bakteriofagów.

Reasumuję wyniki mej pracy.

Wśród szczepów gronkowcowych istnieją jedne, zawierające w swym składzie przeważnie antygen charakterystyczny dla szcze-

pu wiążącego bakteriofagi oraz inne, zawierające przeważnie antygen charakterystyczny dla szczepu nie wiążącego.

Z doświadczeń moich wynika ponadto, iż różniczkowanie aglutynacyjne w tych ramach, jakie sobie zakreśliłem w pracy niniejszej, jest niedostateczne do różniczkowania szczepów wrażliwych i nie wrażliwych na lityczne działanie bakteriofagów.

Panu Profesorowi Doktorowi Z. *Szymanowskiemu*, za cenne wskazówki i kierownictwo, które pozwoliły dojść do powyższych rezultatów, składam na tym miejscu najserdeczniejsze podziękowanie.

Laboratoire de Bactériologie Vétérinaire de l'Université Joseph Piłsudski
à Varsovie (Directeur Prof. Z. Szymanowski).

SPÉCIFICITÉ DES BACTÉRIOPHAGES STAPHYLOCOCCIQUES.

P a r

H. FISZEROW et P. GANC.

R É S U M É.

Le travail est basé sur la méthode d'absorption spécifique de Levine et Frisch.

Les staphylocoques se divisent en 3 groupes:

- 1) lysosensibles et aptes à l'absorption spécifique,
- 2) insensibles à la lyse et absorbants,
- 3) insensibles et non absorbants.

La différenciation ne peut pas être basée sur l'agglutinabilité.

P I Ś M I E N N I C T W O.

- 1) *Levine i Frisch.*: J. infect. Dis. 57. 104. 1935. 2) *Levine i Frisch.*: J. exp. Med. 59. 213. 1934. 3) *Burnet i Lush.*: J. Path. a. Bact. 40. 445. 1935. 4) *M. Rakieten. T. Rakieten i Doff.*: J. Bact. 32. 505. 1936.

Wpłynęło 15.III.1937.

Z Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie.

SUROWICA ENTEROKOKOWA.

Podał

J. CELAREK

I.

Badania, których wyniki przedstawiam w tej pracy, miały na celu wyjaśnienie kwestii przygotowywania surowicy leczniczej, zwróconej przeciw zakażeniom spowodowanym przez enterokoki.

Aczkolwiek sprawa surowicy enterokokowej nie jest nowa, to jednak ci, którzy ją przygotowywali, nie podali dokładnego opisu metod jej otrzymywania ani oznaczania jej siły.

Weinberg i Davesne 1) (1928) podają, że uodporniali konie suchą hodowlą enterokoków, którą zabijali formaliną i przygotowywali w postaci zawiesiny w soli fizjologicznej. Koń otrzymywał 1,45 gr. proszku w ciągu 13-tu tygodni i dawał po tym surowicę, której miano aglutynacyjne wynosiło 1 : 800 dla szczepu homologicznego enterokoka.

Gundel i Suessbrich 2 — 3) (1933 — 1934) podają, że używali surowicy enterokokowej przygotowanej pod kierunkiem Prof. *Bielinga*, jako składnika, który wchodził do mieszanki różnych innych surowic, używanej w leczeniu zapalenia otrzewny. Nie podają oni metody przygotowania tej surowicy.

Nie jest mi wiadomo o innych pracach, w których możnaby znaleźć jakiegokolwiek szczegóły, dotyczące się produkcji surowicy enterokokowej.

W ostatnich czasach starają się niektórzy badacze osłabić znaczenie enterokoków w patogenezie, a tym samym i surowicy enterokokowej, używanej szczególnie w mieszance surowic, którą stosuje się w zapaleniach otrzewny (*Chrysosomergis* i *Gohar* 4), *Schmiedt* 5) i *Zeissler* 6)). Mimo to, większość badaczy francuskich i niemieckich stoi w dalszym ciągu na stanowisku, że enterokok jest zjadliwy w pewnych warunkach dla człowieka i może wywołać różnorodne zakażenia złośliwe nie tylko w przewodzie jelitowym, gdzie jest jego stałą siedzibą, ale także poza przewodem względnie w bezpośrednim sąsiedztwie.

Według danych zaczerpniętych z literatury, enterokoki mogą powodować następujące sprawy chorobowe:

- a) endocarditis i różne sprawy septyczne o niejednolitych objawach chorobowych,
- b) zapalenie płuc,
- c) zapalenie opon mózgowych,
- d) polyarthritus, zajęcie gruczołów limfatycznych, perimetritis i t. d.
- e) appendicitis, peritonitis i zakażenia dróg żółciowych,
- f) schorzenia jelitowe o charakterze biegunek, nieżyty jelit, colitis ulcerosa, duru rzekomego ziarnikowego, który opisał *Karwacki* i inne.

Szczegółowy przegląd wszystkich cech enterokoków nie jest moim zadaniem. Pozwolę sobie wspomnieć, że wyczerpujące prace z tej dziedziny podali w ostatnich czasach *Dible* 7), *Lodenkaemper* i *Gleih* 8), *Ehrisman* 9), *Ehrisman* i współpracownicy 10), *Gundel* 11), *Meyer* 12), *Meyer* i *Schoenfeld* 13), i inni, jeśli chodzi o badaczy obcych. Z polskich prac należy wymienić prace *Lewkowicza* 14), *Karwackiego* 15), *Jakóbkiewiczowej* z *Przemyckim* 16), i *Lukastewicza* 17). Nazwę enterococcus wprowadził do literatury jak wiadomo *Thiercelin* w r. 1899.

Na szczególną uwagę zasługują prace *Lewkowicza* i *Karwackiego*.

Lewkowicz w pracy ogłoszonej w r. 1901 podaje, że badał w 3-ch przypadkach czerwonki i we wszystkich wykrył obecność enterokoków. Autor przeprowadził z wyhodowanymi szczepa-

mi badania na zwierzętach, u których się okazało, że enterokoki te zdolne są wywoływać zapalenia włóknikowo-błonicze rozmaitych błon śluzowych, nadto w zdolności tej przeważają zapalenia miejscowe, nie zaś ogólne zatrucie i posocznica. Autor tym śmielej twierdzi, że enterokoki wywołują czerwonkę, ponieważ *Ciechanowski i Nowak* w 16-tu przypadkach powyższej choroby również wykryli te drobnoustroje, a autor potwierdził ich wyniki szczepieniami na zwierzętach.

Karwacki podaje w swej pracy ogłoszonej w r. 1926 cechy zarazka, warunki jego bytowania, chorobotwórczość dla zwierząt i człowieka, rozpoznawanie i leczenie zmian chorobowych u ludzi. Jeśli chodzi o chorobotwórczość dla zwierząt, to stwierdza on, że enterokok jest najbardziej zjadliwy dla myszy. Mysz pada według autora po 24 godzinach wśród objawów posocznicy lub ostrego nieżytu kiszek. Autor nie podaje jednak ani drogi zakażenia, ani ilości hodowli potrzebnej do zabicia myszy. Należy przypuszczać jednak, że używał on w tym celu hodowli żywej i podawał ją podskórnie w ilościach różnych zależnie od zjadliwości szczepu.

Nie mogę tu streszczać szczegółowo tej pracy, wspomnę jednak, że chorobotwórczość enterokoka dla ludzi, podana została przez autora tak na zasadzie obcych jak i swoich licznych obserwacji.

Szczególną uwagę poświęca *Karwacki* zakażeniom obiegu krwi, spowodowanym przez enterokoka, a mającym wiele podobieństwa do duru rzekomego. Z tego też nawet powodu nazywa autor takie postacie chorobowe durem rzekomym ziarnikowym. Jeśli chodzi o toksyny enterokokowe, to autor porusza tę kwestię mimochodem, powołując się na badania *Thiercelina* 18). Autor radzi stosowanie szczepionek, sporządzonych z własnego szczepu pacjenta w celach leczniczych.

II. Badania zjadliwości szczepów i toksyn.

Szczepy do badań wybrałem z różnych przypadków chorobowych, przeważnie zaś ze zgorzeliowego zapalenia wyrostka robaczkowego w liczbie 10.

Zjadliwość ich została oznaczona na myszach, wagi 18 — 22 gr. Zastrzykiwano podskórnie i dootrzewnowo różne ilości 24 g. hodowli bulionowej (bulion zwykły, pH 7,4 — 7,6) 0,5 — 1,0 — 1,5 cm³. Wybrałem ostatecznie do dalszych badań szczepu No. No. 1, 4 i 6. Hodowla bulionowa tych szczepów zabijała mysz w ilości 1 cm³ dootrzewnowo w ciągu około 70 godzin. Sekcja padłych zwierząt wykazywała zmiany w wątrobie (mięka, zwyrodniała) i śledzionie. W jelitach zmian makroskopowych nie było. Posiewy z krwi serea dodatnie.

1. Badanie zjadliwości szczepów.

Pasaże przez myszy zwiększały zjadliwość szczepów bardzo niewiele lub wcale nie. Pasaż I zabijał mysz w ilości 1 cm³ 24-godz. hodowli bulionowej podanej dootrzewnowo, zaś pasaż I szczepu No. 6 w ciągu 48 godzin. Przy dalszych pasażach zjadliwość czasem zmniejszała się a nawet znikała. Króliki okazały się bardzo odporne na zakażenie. Zastryk podskórny 24 godz. hodowli bulionowej w ilości 10 cm³ powoduje u tych zwierząt krótkotrwały obrzęk tkanki na miejscu zastrzyku z przejściowym brakiem apetytu, biegunką i wychudzeniem. Zwierzę wraca do normy w ciągu 10 — 14 dni i przybiera na wadze.

Nie udało mi się zwiększyć zjadliwości szczepów 1, 4, 6 metodą *Thiercelin'a* przez szczepienie królików podskórną i zakażanie myszy treścią ropni. Płyn wyciągnięty strzykawką z nacieków podskórnych nie zakażał myszy. (Próba na 5-ciu królikach). Świnki morskie są jeszcze więcej odporne na enterokoki niż królik.

Próby hodowania enterokoka na innych podłożach niż bulion zwykły, mające na celu zwiększenie zjadliwości, zawiodły.

2. Badanie przesączów bulionowych.

Druga seria badań miała na celu uzyskanie z przesączów hodowli bulionowych za pomocą różnych sposobów wytrącania produktów toksycznych, w celu ewentualnego miareczkowania surowicy enterokokowej, względnie przygotowania odpowiedniego antygeny do uodporniania koni.

Przygotowano kilka *quasi* toksyn, których opis podaję:
Toksyna T. Filtrat przez Berkefelda z 5-dniowej hodowli bulionowej szczepów 1, 4, 6. Filtrat podzielono na 3 części:

500 cm³ wysolono siarczanem amonowym,

500 cm³ strącono kwasem benzoesowym,

1200 cm³ zagęszczono ultrafiltracją.

Strąty siarczanem i kwasem benzoesowym suszono w próżni. Z filtratu strąconego siarczanem otrzymano około 5 gr. proszku, kwasem benzoesowym około 0,5 gr. Przy ultrafiltracji otrzymano około 100 cm³ płynu (zagęszczenie ewentualnych toksyn 10-krotnie). Jako kontrolę przygotowano w taki sam sposób 3 próbki zwykłego bulionu.

Toksyna C. Sposób otrzymania jak wyżej, z tym, że bulion przyrządzony był metodą Ramona ze śledziony, a przez hodowlę przepuszczano przez cały czas (5 dni) mieszaninę CO₂ z powietrzem, jakiej używa się do hodowli gronkowców, w celu otrzymania toksyny.

Toksyna W. Sposób przyrządzania taki sam. Hodowlę prowadzono na bulionie Wrzaska pod parafiną (warunki bez-tlenowe).

Toksyna E. (*Endotoksyna*). Hodowla agarowa 48-godzinna, zmyta solą fizjologiczną i wysuszona w próżni, a następnie sproszkowana jałowo.

Toksyna Z. Hodowla agarowa (agar zwykły) 48-godzinna, zmyta solą fizjologiczną. Zawiesinę zamrażano i odmrażano kilkakrotnie.

Badania mające na celu oznaczenie siły tych toksyn przeprowadzono na myszach i królikach. Toksyny podawano dożylnie lub dootrzewnowo. Wyniki badań były na ogół ujemne. Żadna z wyżej opisanych toksyn nie dała rezultatów, by można było powiedzieć, że przez zabiegi koncentracyjne da się zwiększyć działanie toksyn tak, by można ich użyć do ewentualnego miareczkowania surowicy leczniczej.

W pewnych razach myszki padały, ale od ilości bardzo wielkich i to nawet nie zawsze.

Jeszcze najlepsze wyniki uzyskano z toksyną C i dlatego przyrządzono poraz drugi z tych samych szczepów ten rodzaj toksyny, spodziewając się, że rezultaty badań na zwierzętach będą podobne. Niestety, druga toksyna dała gorsze wyniki. Myszy nie padały od takiej samej ilości toksyny jak poprzednio.

Dla przekonania się, czy przypadkiem sam bulion strącony siarczanem względnie kwasem benzoesowym nie działa toksycznie, przygotowano również i z samego bulionu za pomocą tej samej metody odpowiedni proszek, którego używano do kontroli.

Dla przykładu podaję niżej kilka protokołów dotyczących się tej serii badań.

P R O T O K U Ł 1.
Toksyna T. zgęszczona ultrafiltracją.

Szczep	Liczba zwierząt	Dawka	Droga	W y n i k
1	3	0,25 cc	podskórnice	myszki żyją/obserw. 6 dni
1	3	0,5 "	"	"
1	3	1,0 "	"	"
4	3	0,5 "	"	"
4	3	0,75 "	"	1 +, 5 żyje
4	3	1,0 "	"	myszki żyją

P R O T O K U Ł 2.
Toksyna T. strącona siarczanem.

Szczep	Liczba zwierząt	Dawka	Droga	W y n i k
1	3	5 mg	dożylnie	myszki żyją
1	3	10 "	"	"
1	3	20 "	"	wszystkie padły po kilku minut.
4	3	5 "	"	wszystkie myszy żyją
4	3	10 "	"	"
6	3	10 "	"	"
kontrola bulionu strącn.	3	20 "	"	"

PROTOKUŁ 3.

Toksyna C. strącona kwasem benzoesowym.

Szczep	Liczba zwierząt	Dawka	Droga	W y n i k
1	3	15 mg.	dożylnie	padły po 24 godzinach
1	3	25 "	"	"
4	3	15 "	"	"
4	3	25 "	"	"
6	3	15 "	"	padły w ciągu 2—4 dni
Kontrola bulionu z CO ₂ strącon.	3	30 mg.	"	myszki żyją
1	1 król (3300 gr.)	0,5 gr.	"	padł po 24 godzinach
4	1 król (3325 gr.)	0,5 gr.	"	"
6	1 król (4000 gr.)	0,5 gr.	"	na 4-ty dzień porażenie tylnych kończyn — wyzdrowiał.
Kontrola bulionu z CO ₂ strącon.	1	30 mgr.	"	żyje
	1	25 "	"	"

PROTOKUŁ 4.

Toksyna E. (Szczep 1, 4, 6).

Szczep	Liczba zwierząt	Dawka	Droga	W y n i k
—	3	0,5 mgr.	dożylnie	wszystkie żyją
—	3	5 "	"	"
—	3	10 "	"	"

III. Uodpornianie koni.

Niezależnie od badań nad toksynami przystąpiłem zaraz we wrześniu 1936 r. do uodporniania koni, celem otrzymania surowicy leczniczej. Po ustaleniu szczepów zjadliwych dla myszy, przyrządzono na bulionie hodowle 24-dniowe poszczególnych szczepów, t. j. 1, 2, 4, 6, 10, do których dodano 0,5% formaliny. Po 3 dniach w cieplarni przy 40° C, enterokoki były zabite. Taką hodowlą (anakultura) rozpoczęto szczepienia podskórne. Później

do dalszych szczepień używano również zawiesiny bakterii zabitych i żywych.

Koń Nr 1 (Bachus). Otrzymał następujące dawki:

19.IX.36 r.	— 10 cm ³	anakultury podskórnice			
25.IX	— 20	"	"	"	
1.X	— 40	"	"	"	
7.X	— 60	"	"	"	
13.X	—100	"	"	"	
19.X	— 5	"	zawiesiny bakterii zabitych		
24.X	— 20	"	"	"	"
29.X	— 40	"	"	"	"
7.XI	— 50	"	"	"	"
13.XI	—100	"	"	"	"
19.XI	—150	"	"	"	"
26.XI	—150	"	"	"	"
2.XII	—100	"	"	"	"
9.XII	— upust próbny.				

Reakcje poszczepienne były łagodne, największa ciepłota po szczepieniu 38,7⁰ C. Koń przybrał na wadze w czasie szczepień 30 kg.

Koń Nr 2 (Bakałarz).

19.IX.36	— 10 cm ³	anatoksyny podskórnice			
25.IX	— 20	"	"	"	
1.X	— 40	"	"	"	
7.X	— 60	"	"	"	
13.X	—100	"	"	"	
19.X	—200	"	"	"	
23.X	— 20	"	zawiesiny bakteryjzabit.podskór.(obiawy anafil.).		
28.X	— 40	"	"	"	"
4.XI	— 5	"	"	"	padł wśród objawów anafil.

Koń Nr 3 (Ekran).

12.XI.36	— 1 cm ³	hodowli agarowej bakteryj żywych dożył.			
13.XI	— 2	"	"	"	"
14.XI	— 4	"	"	"	"

19.XI	—	4	cm ³	hodowli	agarowej	bakteryj	żywych	dożyl.
20.XI	—	6	„	„	„	„	„	„
21.XI	—	10	„	„	„	„	„	„
29.XI	—	20	„	„	„	„	(po szczepieniu	
							szok anafilakt.)	
2.XII	—	100	„	żywej	zawiesiny	bakteryj	podskórnie	(obrzęk
							długotrwały	na miejscu szczepienia).
28.XII	—	200	„	żywej	zawiesiny	bakteryj	podskór.	
18.I	—	400	„	„	„	„	„	
4.II	—	600	„	„	„	„	„	
11.II	—	upust.						

Najwyższa ciepłota w ciągu uodporniania 39,1^o C. Stracił na wadze 30 kg.

IV. Miareczkowanie surowicy.

Badanie surowic z pierwszego upustu konia I i III dało rezultaty względnie dobre, jeśli chodzi o miano aglutynacyjne. *Weinberg*, jak wspominałem na początku, otrzymał po pierwszym uodpornieniu miano aglutynacyjne dla szczepu homologicznego 1/800.

Miano aglutynacyjne surowicy z pierwszego upustu konia I-go wyniosło dla szczepów homologicznych 1/800 — 1/600, zaś konia III-go 1/600 — 1/3200. Obie surowice aglutynowały tak samo wysoko lub słabiej szczepy enterokoków nie używanych do szczepień.

Wobec takich rezultatów aglutynacyjnych przystąpiłem do prób mających na celu zbadanie własności antyinfekcyjnych surowicy.

Oznaczania neutralizującej własności surowic wobec toksyn poprzednio opisanych nie przeprowadzałem, bo toksyny te nie działały w sposób widoczny i regularny na zwierzęta. Na podstawie wyników uzyskanych pod tym względem możnaby jeszcze było przypuszczać, że toksyna C będzie mogła być użyta do oznaczania siły neutralizującej surowicy. Nastawiłem powtórnie kilka seryj myszy z tą samą toksyną i toksyną C przygotowaną

powtórnie. Wyniki jednak były nieregularne i dlatego ostatecznie zaniechałem prób w tym kierunku.

Celem oznaczenia własności antyinfekcyjnych surowicy, nastawiłem kilka seryj myszy, które otrzymywały dootrzewowo surowicę razem z hodowlą bulionową 24-godz. zjadliwego dla nich enterokoka (Szczep No. 1).

Wyniki przedstawiają protokół No. 5. i No 6.

Na każdą dawkę surowicy użyto 3 myszy.

P R O T O K O Ł 5.

Hodowla bulionowa enterokoka + surowica konia Bachus upust I.

Ilość hodowli	Ilość surowicy	R e z u l t a t d n i a							
		1	2	3	4	5	6	7	8
0,5 cm ³	0,001	+							
		+							
		0	0	0	0	0	0	0	0
0,5 cm ³	0,002	+							
		+							
		0	0	0	0	0	0	0	0
0,5 cm ³	0,005	+							
		+							
		0	+						
0,5 cm ³	0,01	+							
		+							
		0	+						
0,5 cm ³	0,02	0	0	0	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0	0	0	0
0,5 cm ³	0,05	0	0	0	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0	0	0	0
0,5 cm ³	0,1	0	0	0	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0	0	0	0
0,5 cm ³	0,25	0	0	0	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0	0	0	8
0,5 cm ³	—	+							
		+							
		+							
0,5 cm ³	0,25 sur. norm.	+							
		+							
		+							

PROTOKUŁ 6.

Hodowla bulionowa enterokoka + surowica konia Bachus upust. II.

Ilość hodowli	Ilość surowicy	R e z u l t a t d n i a							
		1	2	3	4	5	6	7	8
0,5 cm ³	0,001	+							
		+							
		+							
0,5 cm ³	0,002	+							
		0	+						
		0	+						
0,5 cm ³	0,005	+							
		0	+						
		0	+						
0,5 cm ³	0,01	0	0	0	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0	0	0	0
0,5 cm ³	0,025	0	0	0	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0	0	0	0
0,5 cm ³	0,05	0	0	0	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0	0	0	0
0,5 cm ³	0,1	0	0	0	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0	0	0	0
0,5 cm ³	0,25	0	0	0	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0	0	0	0
0,5 cm ³	—	+							
		+							
		+							
0,5 cm ³	0,25	+							
	sur. norm.	+							
		+							

Jak widać z protokołów No. 5 i No. 6 surowica enterokokowa przygotowana na koniach według metody podanej poprzednio, posiada własności antyinfekcyjne. Chroni mysz wagi 18 — 22 gr. od dawki śmiertelnej hodowli bulionowej enterokoka (0,5 cm³) w ilości od 0,02 — 0,01. Sądzę, że jeśliby chodziło o zwiększenie jej siły antyinfekcyjnej, to możnaby to uzyskać przez odpowiednie uodpornianie koni.

W n i o s k i :

- 1) Zjadliwość enterokoków dla zwierząt jest mała. Szczepy moje zabijały mysz w ilości 0,5 cm³ 24 godz. hodowli bulionowej podanej dootrzewnowo w ciągu 24 godzin.
- 2) Zwiększenie zjadliwości szczepów enterokoka różnymi metodami, jak przeprowadzanie przez zwierzęta (króliki) i przez hodowlę ich na specjalnych pożywkach nie dało rezultatów zadawalniających.
- 3) Przygotowanie toksyn enterokokowych z przesączów bulionów za pomocą ultrafiltracji, strącania siarczanem amonu i kwasem benzoesowym, również nie dało pomyslnych wyników.
- 4) Endotoksyny enterokokowe przygotowane w postaci wysuszonych ciał bakteryjnych wzgl. przez zamrażanie nie wykazują toksycznego działania w małych ilościach.
- 5) Uodpornianie koni celem otrzymania surowicy leczniczej jest względnie łatwe do przeprowadzenia za pomocą anakultury, ciał bakteryjnych zabitych lub żywych. Przy podawaniu dożylnym ciał bakteryjnych należy się liczyć z szokiem anafilaktycznym.
- 6) Używając żywej hodowli bulionowej enterokoka, można przeprowadzić miareczkowanie surowicy enterokokowej pod względem jej siły antyinfekcyjnej.

Institut d'Hygiène de l'Etat — Varsovie.

SÉRUM ENTÉROCOCCIQUE.

P a r

J. CELAREK

R É S U M É.

1. Virulence des entérocoques pour les animaux de laboratoire est peu prononcée. Les souris ont succombé 24 heures

après l'injection dans le péritoine de 0,5 ccm de la culture de 24 h. en bouillon.

2. Essais d'augmentation de la virulence des entérocoques à force de passage par les animaux (lapins) ou bien par milieux spéciaux n'ont pas donné de résultats satisfaisants.

3. Préparation des toxines concentrées des cultures filtrées des entérocoques en bouillon à l'aide de l'ultrafiltration, de la précipitation par le sulfate d'ammonium ou bien au moyen de l'adsorption par l'acide benzoïque n'a pas donné de bon résultats.

4. Endotoxines des entérocoques préparées des corps bactériens deséchés ou bien par la congélation répétée n'ont pas été toxiques en petites doses.

5. Immunisation des chevaux afin de préparer le sérum curatif est relativement facile à effectuer au moyen d'une culture totale vivante ou tuée (anaculture). Pendant les injections intraveineuses il faut tenir compte du choc anaphylactique.

6. Emploi d'une culture vivante de l'entérocoque en bouillon permet d'effectuer le titrage du sérum anti-entérococcique quant à son pouvoir anti-infectieux.

P I Ś M I E N N I C T W O.

- 1) *Weinberg et Davesne.*: C. R. Soc. Biol. t. I. str. 196. 1928. 2) *Gundel und Suessbrich.*: Dtsch. Z. Chir. **240**, str. 283—321. 1933. 3) *Gundel und Suessbrich.*: Klin. Woch. str. 1235—1238. 1934. 4) *Chryssovergis und Gohar.*: Zbl. Bak. **133**, str. 435, 1936 i **134** str. 8. 1935. 5) *Schmiedt*: Zbl. Chir. No. 50, str. 2971. 1936. 6) *Zeissler*: Zbl. Chir., str. 2975. 1936. 7) *Dible.*: Syst. of Bakt. and immun. Med. Res. Council, London, Vol. II, str. 124. 1929. 8) *Lodenkaemper und Gleih.*: Zbl. Bakt. Orig. **137**, str. 270. 9) *Ehrismun*: Zbl. Bakt. Ref. **119**, str. 97. 1935. 10) *Ehrisman i inni.*: Ztschr. f. Hyg. **117**, str. 307. 1936. 11) *Gundel*: Dtsch. med. Woch. str. 1381. 1933. 12) *Mayer.*: Zbl. f. Bakt. I. t. 118. str. 65; 1930. 13) *Mayer und Schoenfeld.*: Ztbl. f. Bakt. t. 99. str. 402. 1926. 14) *Lewkowicz.*: Przegl. Lek. No. 5, 6, 7. 1901. 15) *Karwacki.*: Lek. Woj. t. 8, str. 224, 312, 533. 1926. 16) *Jakóbkiewiczowa i Przesmycki.*: Med. Dośw. i Sp. t. 15, zesz. 5-6. 1932. 17) *Łukasiewicz.*: Lek. Woj. t. 14, str. 233. 1929. 18) *Thiercelin.*, C. R. Soc. Biol. str. 269 1899, i str. 1082. 1902.

Treść zeszytu 3-4. Sommaire.

<i>Ryszkowska M.</i> Działanie alkaloidów grzybienia na myszy decerebrowane ^a . — Sur l'action des alcaloïdes de <i>Nymphaea alba</i> et <i>lutea</i> sur les souris decerebrées	167
<i>Makower H. i Goldberg F.</i> O szybkich metodach aglutynacyjnych. — Sur quelques méthodes d'agglutination rapide.	186
<i>Berman M.</i> Związek między działaniem hemolitycznym saponin a ich farmakodynamicznym działaniem na narządy wewnętrzne — Rapport entre l'action hémolysante des saponines et leur action pharmacodynamique sur les organes internes.	200
<i>Markuze Z.</i> Wartość biologiczna białka niektórych produktów zbożowych i ich przetworów. Sur la valeur biologique de certains produits du blé	223
<i>Afremow I.</i> Przystosowanie się drobnoustrojów do wysokiej koncentracji NaCl. — Adaptation des microbes à la haute concentration de NaCl dans le milieu	234
<i>Miller J. M.</i> Wpływ proteinoterapii na układ siateczkowo-śródbłonkowy. — Influence de la protéinothérapie sur le système réticulo-endothéliale	243
<i>Seydel J.</i> Badania nad biologią maczugowców błonicy pochodzących z obecnej epidemii. Doniesienie III. W sprawie stałości typów w obrębie maczugowców błonicy. — Sur la stabilité des types des bacilles diphtériques	257
<i>Rogożnicka R.</i> Przyczynek do sprawy stosunku pomiędzy strukturą antygenową bakterii a ich wrażliwością na działanie bakteriofagów. — Sur la corrélation entre la lyso-sensibilité et l'agglutinabilité des souches du b. Flexner	274
<i>Szabuniewtch B.</i> Badania nad niepobudliwością mięśni pod wpływem wielokrotnego drażnienia — Sur l'inexcitabilité des muscles après les irritations répétées	289
<i>Celarek J.</i> Uodpornianie koni anatoksyną błoniczą alunową. — Sur l'immunisation des chevaux par l'anatoxine diphtérique précipitée par l'alun	307

<i>Fiszerów H.</i> Przyczynki do sprawy swoistości bakteriofagów gronkowcowych. Doniesienie I. Absorpcja swoistych bakteriofagów przez różne szczepy gronkowca. — Spécifité des bactériophages staphylococciques. Communication I.	316
<i>Ganc P.</i> Przyczynki do sprawy swoistości bakteriofagów gronkowcowych. Doniesienie II. Stosunek między zlepliwością szczepów gronkowcowych a ich zachowaniem się względem bakteriofagów. — Spécifité des bactériophages staphylococciques. Communication II.	323
<i>Ćelarek J</i> Surowica enterokokowa. — Sérum entéroccocque	331

