

ziarenek glikogenu w komórkach wykazane histochemicznym odczynem barwnym mogą być sprawdzone przy użyciu metod fotometrycznej i wagowej, oraz 3) że zmiennej ilości glikogenu w komórkach towarzyszą zmiany w rozmieszczeniu kwasu dezoksyrybonukleinowego w jądrach komórek wątrobowych. Wprawdzie ocena ilości glikogenu w preparatach histologicznych natrafia zwykle na trudności ze względu na niejednostajność rozmieszczenia jego w komórkach i we wszystkich płatach wątroby, jednak dokonane przeanalizowanie skrawków barwionych różnymi metodami histochemicznymi umożliwiło sporządzenie prawie dokładnych określeń. Gdy porównano otrzymane wyniki z ocenami wagowymi rzeczywistej ilości glikogenu oraz z wynikami fotometrycznymi po zastosowaniu metody antronowej, stwierdzono niemal całkowitą zgodność między histochemicznym a chemicznym oznaczaniem glikogenu. Zgodność ta znalazła pełne uzasadnienie w przeprowadzonych doświadczeniach mających na celu wykazać wpływ różnych temperatur otoczenia na ilość i rozmieszczenie glikogenu w wątrobie żab. Chcąc jednak przekonać się czy otrzymane wyniki badań są wyrazem istotnego wpływu temperatury środowiska, czy zależne od innych przyczyn należało przeprowadzić obliczenia statystyczne, które pozwoliły skontrolować uzyskane wartości i odróżnić błędy systematyczne od błędów przypadkowych.

Material i metodyka badań

Doświadczenia przeprowadzono na dorosłych jesiennych żabach wodnych (*Rana esculenta esculenta*), które przez okres 5 miesięcy pozostawały w temperaturze $+18^{\circ}\text{C}$, nie karmione. Do doświadczeń wybrano żaby jesienne wagi od 20—60 g, ponieważ wiadomym było na podstawie danych Terentjewa (1950), że najmniejszą ilość glikogenu w wątrobie obserwuje się w okresie składania jaj (wiosna), a największą ilość, prawie 3,5 razy większą w miesiącach jesiennych. W okresie snu zimowego ilość glikogenu zmniejsza się do 27%, a z przebudzeniem się żab tempo zużycia glikogenu gwałtownie wzrasta. Także na podstawie własnych obserwacji doszliśmy do przekonania, że temperatura $+18^{\circ}\text{C}$ jest optymalną, podwyższenie bowiem temperatury do $+30^{\circ}\text{C}$ powodowało zwiększenie ruchliwości, a do $+45^{\circ}\text{C}$ osłabienie ruchliwości kończące się już po upływie 45—60 min. stężeniu mięśni-

wym i śmiercią. Obniżenie natomiast temperatury do 0°C , a nawet do -4°C znosiły żaby dobrze, widziało się jednak obniżoną ruchliwość, która wyrażała się powolnym ruchem kończyn i zwolnionym biciem serca.

Po oddzieleniu żab kontrolnych pozostających w temp. $+18^{\circ}\text{C}$ (Nr 1—27), jedną grupę żab (Nr 28—49) umieszczono w naczyniach z wodą w cieplarni w temperaturze $+30^{\circ}\text{C}$, drugą grupę (Nr 50—72) w temperaturze $+45^{\circ}\text{C}$, trzecią grupę (Nr 73—94) w lodówce w temperaturze 0°C , a czwartą grupę (Nr 95—115) w -4°C . Żaby pozostawały w tych temperaturach przez 3,4 i 6 godzin. Największa śmiertelność była u żab w temperaturze $+45^{\circ}\text{C}$, dlatego też najdłuższy okres pozostawania w tej temperaturze wynosił tylko 1 godzinę. Każde doświadczenie było powtarzane kilkakrotnie, przy czym do każdego z nich używano żab jeśli nie takiej samej, to przynajmniej zbliżonej wagi ciała. Materiał do badań pobierano w godzinach przedpołudniowych tylko z żab żywych i natychmiast poddawano analizie chemicznej lub utwaleńniu dla celów histologicznych. Wyniki ujęto każdorazowo w tabele i wykresy.

Histochemiczne wykazywanie glikogenu przeprowadzano wg metod Besta, Bauer-Feulgena, Mitchell-Wisłockiego i Pritcharda. Kwas dezoksyrybonukleinowy natomiast barwiono leukofuksyną wg metody Feulgena-Rosenbecka. Do badań histochemicznych użyto żab Nr 1—10, 28—34, 50—56, 73—79 i 95—100.

Jak można się było przekonać przeprowadzając badania wstępne do naszej pracy, istnieje wielka różnica pomiędzy skrawkami utwalonymi w temperaturze pokojowej, a utwalonymi w niskiej temperaturze (Lison 1949). Różnice te, dotyczące nie tylko samego utwalania komórek, ale przede wszystkim ilości i rozmieszczenia glikogenu były niejednokrotnie duże, tak iż odnosiło się wrażenie, jak gdyby skrawki poddane badaniu pochodziły nie z tego samego zwierzęcia. W skrawkach utwalonych w temperaturze pokojowej stwierdzało się albo brak glikogenu, albo niedostateczną jego ilość, albo wreszcie rozmieszczenie grubych ziarenek na biegunach komórek i to zawsze na tych samych biegunach sąsiadujących komórek, podczas gdy przy drugim sposobie utwalania glikogen miał wygląd drobnutkich ziarenek, rozproszonych po całej cytoplazmie.

Można więc było po zastosowaniu utrwalaczy zimnych od 0° do -5°C i przeprowadzeniu postępowania ściśle wg metod Mitchell-Wisłockiego, Pritcharda, Besta i Bauer-Feulgena określić w przybliżeniu ilość i rozmieszczenie glikogenu w komórkach wątroby żab kontrolnych i doświadczalnych. Metodę Mitchell-Wisłockiego i metodę Pritcharda należy naszym zdaniem uważać za równoważące, mimo że obie te metody różnią się pomiędzy sobą sposobem utrwalania i barwienia. Bardziej ostrożnym w ocenianiu wyników należało być przy barwieniu preparatów wg metody Besta i Bauer-Feulgena. Karmin Besta barwił glikogen na kolor jaskrawo czerwony, ale również i inne struktury łącznie z jądrem i jąderkiem były zabarwione, które to przy metodzie Bauer-Feulgena pozostawały nie zabarwione. Podkreślić także należy, że odczyn Bauer-Feulgena nie jest specyficzny tylko dla samego glikogenu, ale może wykazywać także inne wielocukrowce.

W celu stwierdzenia czy w rzeczywistości zabarwione ziarenka są glikogenem zastosowano próbę glikolityczną działając na preparat kontrolny przefiltrowaną śliną przez 2—12 godzin w temperaturze $+37^{\circ}\text{C}$ i barwiąc następnie preparaty według stosowanych metod. Próba glikolityczna usuwała glikogen z komórek, a tym samym wszystkie odczyny barwne histochemiczne dawały wyniki ujemne.

Nie uzyskaliśmy dodatnich wyników przy stosowaniu metody jodowej wg Nielsena, Okkelsa i Stockholma, także próby przeniesienia na preparaty histologiczne sposobów Fehlinga i Mollischa nie dawały zadowalających wyników.

Przy ocenianiu otrzymanych barwnych wyników wzięto pod uwagę przekroje histologiczne przez całą wątrobę, a to ze względu na możliwość niejednorodnego rozmieszczenia glikogenu w komórkach różnych płatów narządu. Na obwodzie skrawków nie widziało się jednak komórek zawierających więcej glikogenu (Randphänomen), ani nie spostrzegano go w naczyniach krwionośnych oraz w przestrzeniach międzykomórkowych. Glikogen był zawsze wewnątrzkomórkowo, mniej lub więcej równomiernie rozsypany po całej cytoplazmie.

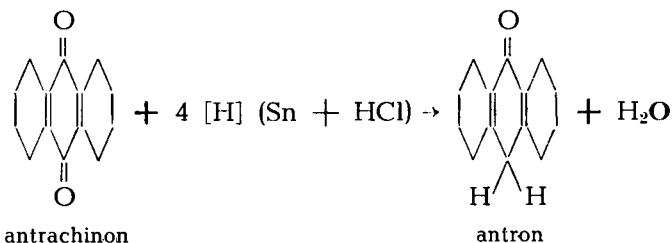
Chcąc przekonać się, czy otrzymane wyniki histologiczne można uważać za słuszne postanowiono przeprowadzić w zakresie

możliwości naszej pracowni histochemicznej badania mikrochemiczne na wątrobie żab pozostających w tych samych warunkach doświadczalnych. Dokonano więc oznaczeń ilościowych glikogenu w wątrobie żab kontrolnych i doświadczalnych wg metod antronewej w modyfikacji Luštineca (1953) i wagowej. Dla oznaczenia glikogenu w wątrobie nie użyto metody Bertranda ze względu na to, iż zawsze otrzymywaliśmy różne wyniki nawet w tych samych próbkach badanych (żaby nr 22—24, 44—46, 67—69, 89—91, 110—112). Starano się również przeprowadzić próby w polarymetrze, jednak i tutaj mała ilość glikogenu zawarta w próbkach doświadczalnych powodowała, iż uzyskane wyniki nie były zadowalające (żaby nr 25—27, 47—49, 70—72, 92—94, 113—115). Zastosowano dlatego metodę antronową wg Luštineca, a oznaczenia przeprowadzono na fotometrze Pulfricha (żaby nr 11—16, 35—38, 57—61, 80—84, 101—104).

Wątrobę świeżą natychmiast po wyjęciu ważono i poddawano hydrolizie zasadowej w 30% KOH, w czasie 10 minut, na wrzącej łaźni wodnej. Na 1 g wątroby użyto w przybliżeniu 2 ccm KOH. Hydrolizat po oziębieniu rozcieńczano wodą, przy czym, gdy waga wątroby wynosiła poniżej 0,8 g rozcieńczano hydrolizat do 500 ccm, gdy powyżej 0,8 g do 1000 ccm dla uniknięcia błędu oznaczenia.

W ten sposób przygotowane roztwory odmierzano po 1 ccm do probówek wykonując oznaczenia równoległe. Do jednej probówki odmierzono 1 ccm wody destylowanej a do osmiu probówek po 1 ccm glukozy o stężeniu: 2,5 mg^o/_o (2X), 5,5 mg^o/_o (2X), 10 mg^o/_o (2X) i 15 mg^o/_o (2X). Do wszystkich probówek dodano po 5 ccm odczynnika antronowego, który odpowiadał 150 mg^o/_o roztworowi antronu w 27,5 N/H₂SO₄. Antron w kwasie siarkowym o niższym stężeniu nie rozpuszczał się całkowicie, a poza tym z czystą wodą i wodnymi roztworami glukozy i glikogenu powodował wytrącanie białego kłaczkowatego osadu.

Antron otrzymano w naszym doświadczeniu z antrachinonu przez redukcję metaliczną cyną. Uzyskany produkt miał barwę żółtą, był krystaliczny, topił się w temp. 154—155°C.



Po dodaniu odczynnika antronowego do wszystkich probówek obserwowano zmianę barwy z żółtej na zielono-niebieską (odczynnik antronowy ma zabar-

wienie żółte), jedynie w próbówce z wodą nie zmieniła się barwa. Po podgrzaniu na wrzącej łaźni wodnej przez 5 minut następowało wyraźniejsze wysycenie zabarwienia, które nie zniknęło po ostudzeniu. Barwa w próbówce z wodą pozostawała nadal nie zmieniona. Stopień intensywności zabarwienia odpowiadała ilościowej zawartości glikogenu w próbkach badanych i glukozy w próbkach wzorcowych.

Zawartość glikogenu w badanych próbkach była oznaczana na fotometrze Pulfricha przy fali świetlnej długości 620 m μ . Jako roztworu porównawczego użyto wody + odczynnik antronowy, jako roztworów wzorcowych glukozy o stężeniu: 2,5 mg⁰%, 5,5 mg⁰%, 10 mg⁰% i 15 mg⁰% + odczynnik antronowy. Ponieważ wiemy, że z 90 mg glikogenu w drodze hydrolizy powstaje 100 mg glukozy, można było łatwo przeliczyć procentową zawartość glukozy na procentową zawartość glikogenu.

Na fotometrze Pulfricha odczytywano ekstynkcję roztworów wzorcowych. Znając stężenie i ekstynkcję roztworów wzorcowych zrobiono wykres, wyznaczając na osi rzędnych stężenie glikogenu w mg⁰%, na osi odciętych ekstynkcję roztworów. Oznaczając z kolei ekstynkcję roztworów badanych można było przy pomocy prostej wzorcowej odczytać stężenie glikogenu w badanych próbkach, a uwzględniając wagę wątroby i rozcieńczenie hydrolizatu obliczyć zawartość procentową glikogenu w całej wątrobie. Podkreślić należy, że badania wykonane były w trzech grupach doświadczalnych, przy czym do każdej grupy używano zawsze świeżo przygotowanego odczynnika antronowego i wykreślano w każdym przypadku prostą wzorcową. Przebieg każdej z prostych jest uzależniony także od stężenia odczynnika antronowego, minimalna bowiem zmiana stężenia oraz starzenie się roztworu mają wpływ na przebieg prostych.

Sprawdzianem otrzymanych wyników wg metody antronowej było również oznaczenie wagowe glikogenu w wątrobie żab pozostających w tych samych warunkach doświadczalnych (żaby nr 17—21, 39—43, 62—66, 85—88, 105—109).

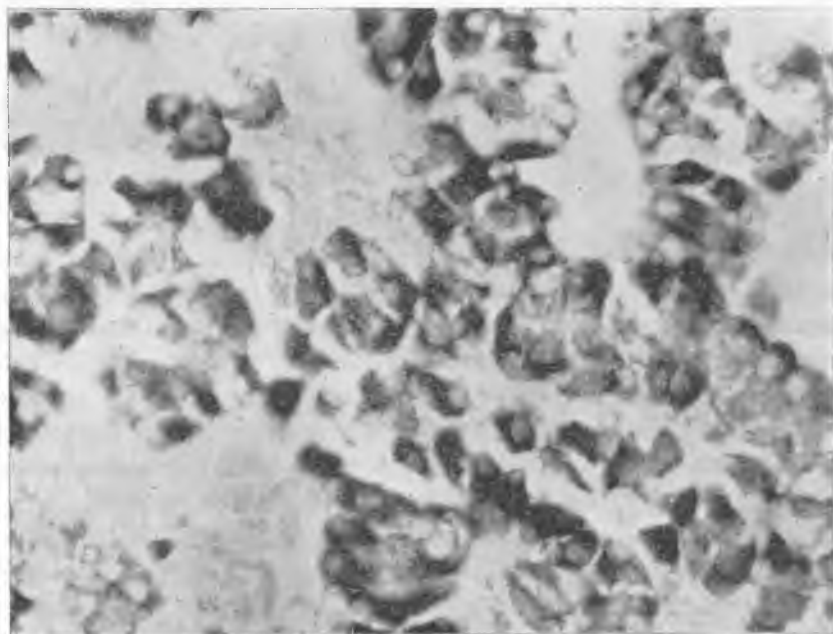
W próbkach wirówkowych ogrzewaliśmy 2 ccm 30% KOH na wrzącej łaźni wodnej, wkładaliśmy zważoną uprzednio wątróbę i mieszając ogrzewaliśmy w dalszym ciągu przez 30 minut. Po ostudzeniu dodawano 4 ccm wody destylowanej + 8 ccm 96% alkoholu i wirowano. Płyn z nad osadu zlewano, a osad przemywano kolejno 4 ccm 60%, 80% i 96% alkoholu, za każdym razem odwirowując osad, w końcu przemywano eterem. Otrzymany glikogen ważono na wadze analitycznej.

Omówienie wyników badań

Z serii preparatów histologicznych wykonanych z wątroby żab kontrolnych ($+18^{\circ}\text{C}$) i zabarwionych wg metod Besta, Bauer-Feulgena, Mitchell-Wisłockiego i Pritcharda, wybrano po dokładnym przeglądnięciu tak zwane preparaty wzorcowe, które stanowiły w dalszych obserwacjach normę porównawczą odnośnie rozmieszczenia i ilości glikogenu w komórkach.

Glikogen ma wygląd drobnych, okrągłych ziarenek zabarwionych na kolor jaskrawo czerwony według metody Besta, czerwono-fioletowy według Bauer-Feulgena, a czarno-brunatny według Pritcharda i Mitchell-Wisłockiego. Czarno-brunatne ziarenka były drobniejsze w porównaniu z ziarenkami czerwonymi lub czerwono-fioletowymi, a że te ostatnie niemal całkowicie wypełniały komórki, odnosiło się niejednokrotnie wrażenie barwnego odczynu całej cytoplazmy, szczególnie przy przeglądaniu preparatów pod małymi powiększeniami.

Spostrzegane w preparatach żab kontrolnych ($+18^{\circ}\text{C}$) rozmieszczenie i ilość glikogenu uznano za wzorcowe ponieważ



Ryc. 1. Żaba. Temp. $+18^{\circ}\text{C}$. Best. Pow. małe, mikrofot.

1) glikogen był obserwowany we wszystkich preparatach sporządzonych z wątroby żab tej grupy doświadczalnej, 2) dostrzegano równomierne rozsypanie ziarenek glikogenu po całej cytoplazmie wszystkich komórek różnych płatów narządu, 3) barwny odczyn Besta i Bauer-Feulgena wskazywał na maksymalne wypełnienie glikogenem (mikrofot. ryc. 1, 2), 4) barwny odczyn

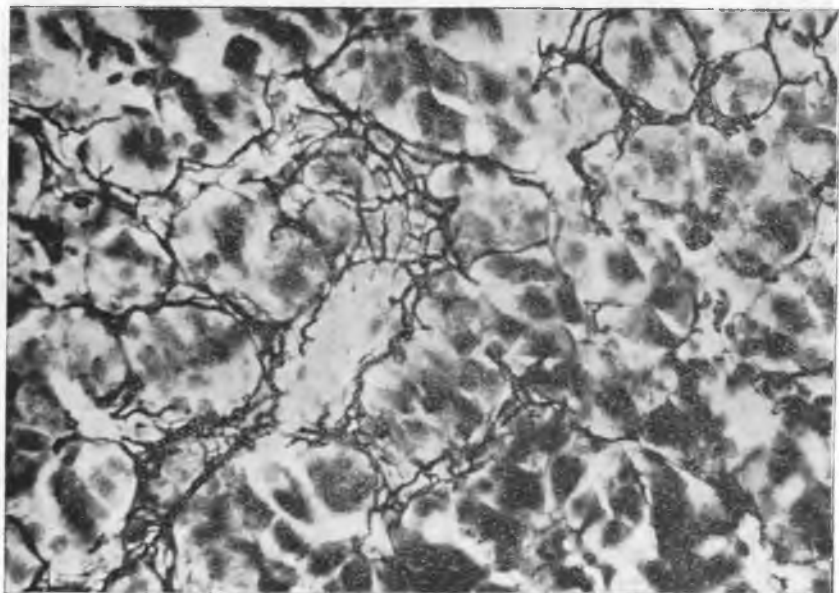


Ryc. 2. Żaba. Temp. $+18^{\circ}\text{C}$. Bauer. Pow. duże, mikrofot.

Mitchell-Wisłockiego i Pritcharda wykazywał bardzo liczne drobniutkie ziarenka, prawie jednakowej wielkości, nie skupiające się w zespoły a rozmieszczone wewnątrzkomórkowo pojedynczo i jednostajnie (mikrofot. ryc. 3, 4, 5, 6), oraz 5) przeprowadzona próba glikolityczna całkowicie usuwała z komórek obserwowane ziarenka. Na podstawie więc preparatów porównawczych można było w przybliżeniu ustalić rozmieszczenie i ilość glikogenu w komórkach wątroby żab doświadczalnych.

W temperaturze $+30^{\circ}\text{C}$ zauważono zmniejszenie ilości ziarenek glikogenu. Glikogen był również równomiernie rozłożony we wszystkich komórkach, jednak na preparatach sporządzonych wg metody Pritcharda, w niektórych komórkach ziarenka raczej grupowały się w strefie przyjądrowej i były większe.

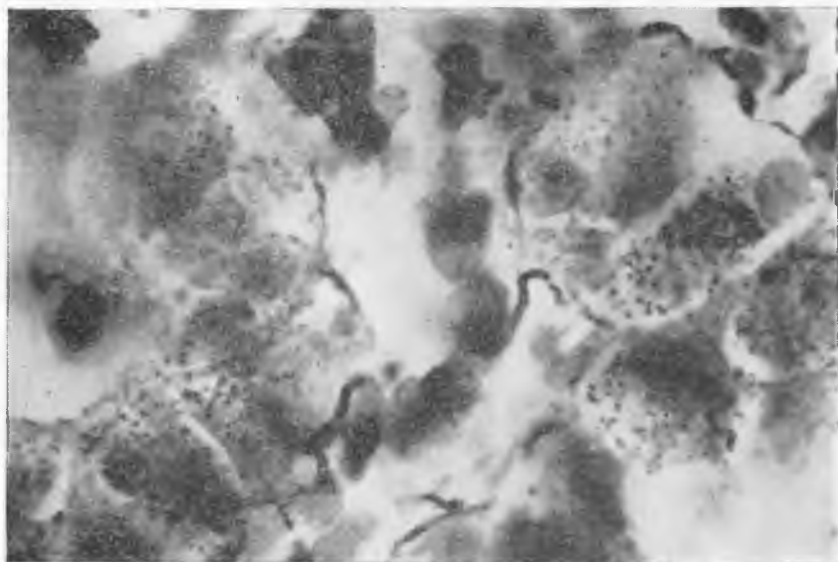
Dużo uwagi poświęciliśmy przeglądnięciu preparatów z wątroby żab, które przebywały przez okres około 1 godziny w temperaturze $+45^{\circ}\text{C}$, stwierdziliśmy bowiem w nich albo prawie całkowity brak ziarenek glikogenu, albo spadek liczby ziarenek do jednego lub kilku na jedną komórkę. W preparatach wg metody Besta cytoplazma była zabarwiona na kolor lekko różowy, jądro i jąderko na kolor czerwony, zaś pojedyncze ziarenka glikogenu na kolor jaskrawo czerwony. Odczyn barwny cytoplazmy zniknął po przeprowadzeniu próby glikolitycznej. Nieco więcej ziarenek za-



Ryc. 3. Żaba. Temp. $+18^{\circ}\text{C}$. Mitchell — Wiśłocki. Pow. małe, mikrofot.

barwiło się wg metody Bauer-Feulgena, jednak nie znajdowały się one we wszystkich komórkach, rozmieszczenie ich było nierównomierne. Zwykle skupiały się one w strefie obwodowej, która nawet w komórkach nie zawierających ziarenek glikogenu dawała słaby odczyn barwny, co mogłoby wskazywać na obecność śladów glikogenu (mikrofot. ryc. 7). Także na preparatach wykonanych wg metody Pritcharda (mikrofot. ryc. 8) i Mitchell-Wiśłockiego (mikrofot. ryc. 9) widziało się dokoła jądra ciemniejszą chmurkę, która bez wyraźnej granicy rozplątywała się

ku obwodowi komórki (mikrofot. ryc. 10). Chmurka znikła po próbie glikolitycznej, mogła więc ona być również śladem glikogenu, tym bardziej, że jak wydawało się nam, była ona prawdopodobnie utworzona z bardzo drobnutkich ziarenek, które nazwaliśmy „pyłem” glikogenowym. Pośród pyłu glikogenowego tu i ówdzie znajdowały się ziarenka większe typowe dla wzorcowych ziarenek glikogenu. Wszystkie zatem preparaty wskazywały na



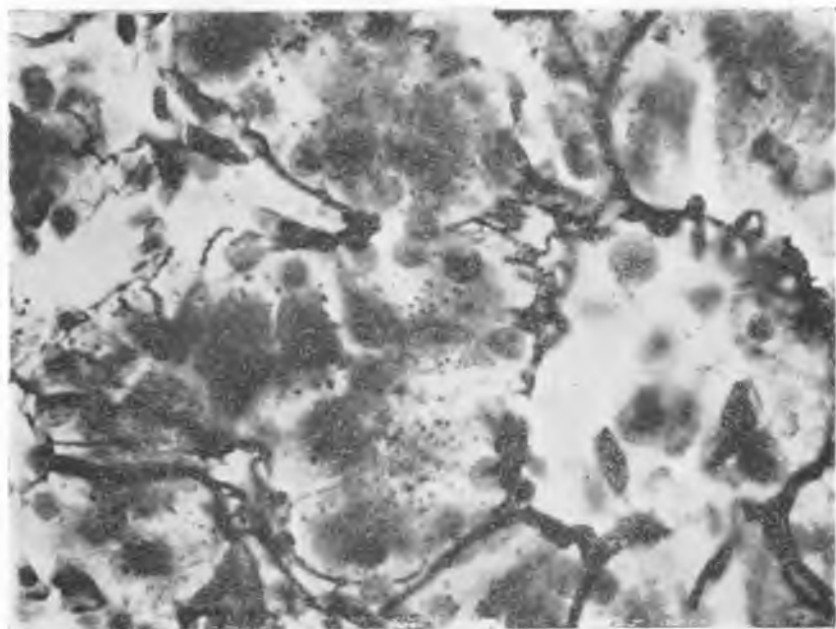
Ryc. 4. Żaba. Temp. $+18^{\circ}\text{C}$. Mitchell — Wiśłocki. Pow. duże, mikrofot.

spadek ilości glikogenu do minimum, a to zgodnie z opisanym przez Doljańskiego (1930) antagonizmem, mogło być następstwem podwyższenia aktywności przemian wewnątrzkomórkowych.

Obniżenie temperatury otoczenia do 0°C , a nawet do -4°C , dało nam nieoczekiwane wyniki. Sądziliśmy bowiem, że obniżenie temperatury, które zwalnia u żab przemianę materii wyrazi się utrzymaniem poziomu ilości glikogenu, albo nawet jego podwyższeniem. W temperaturze 0°C zauważyliśmy jednakże zmniejszenie ilości ziarenek przy równoczesnym osłabieniu odczynu barwnego. Ogólnie można powiedzieć, że barwność ziarenek glikogenu jest słaba, a rozmieszczenie i ilość ich odpowiada w przybliżeniu obniż-

ce zanotowanej w temperaturze $+30^{\circ}\text{C}$. W temperaturze -4°C natomiast, stwierdziliśmy albo nieznaczne zwiększenie ilości słabo barwiących się ziarenek, albo utrzymanie ilości na poziomie 0°C , przy równoczesnym zgrupowaniu się ich w strefach obwodowych cytoplazmy.

Wszystkie stosowane przez nas metody histochemiczne Bauer — Feulgena, Besta, Pritcharda oraz Mit-

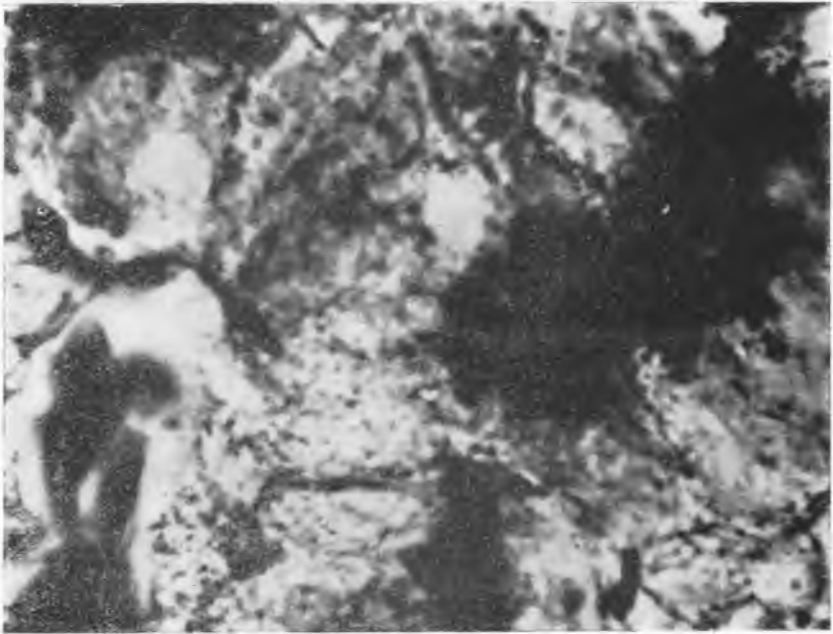


Ryc. 5. Żaba. Temp. $+18^{\circ}\text{C}$, Mitchell — Wisłocki. Pow. duże, mikrofol.

chell — Wisłockiego dały jednakowe wyniki dotyczące rozmieszczenia i ilości glikogenu w komórkach wątroby żab doświadczalnych w skali stosowanych temperatur.

Powstaje zatem pytanie, czy obserwowane w skali stosowanych temperatur wahania ilości glikogenu w wątrobie żab doświadczalnych są następstwem przemian wewnątrzkomórkowych w pojęciu antagonizmu czynnościowego Doljańskiego (1930), czy też są odczynem przystosowania ustroju regulowanym na drodze odruchowej nerwowej i humoralnej w pojęciu wstrząsowej ady-

namii układu nerwowego i głębokiego uszkodzenia metabolizmu Bogomolca (1944). W celu choćby częściowego wyjaśnienia tych zagadnień należało więc poczynić dalsze obserwacje cytologiczne, przede wszystkim nad zachowaniem się kwasu dezoksyrybonukleinowego w jądrach komórek wątrobowych. Wiadomym bowiem jest na podstawie poprzednich badań Grzyckiego (1951), że w czasie wzmożonego procesu wydzielniczego odbywa

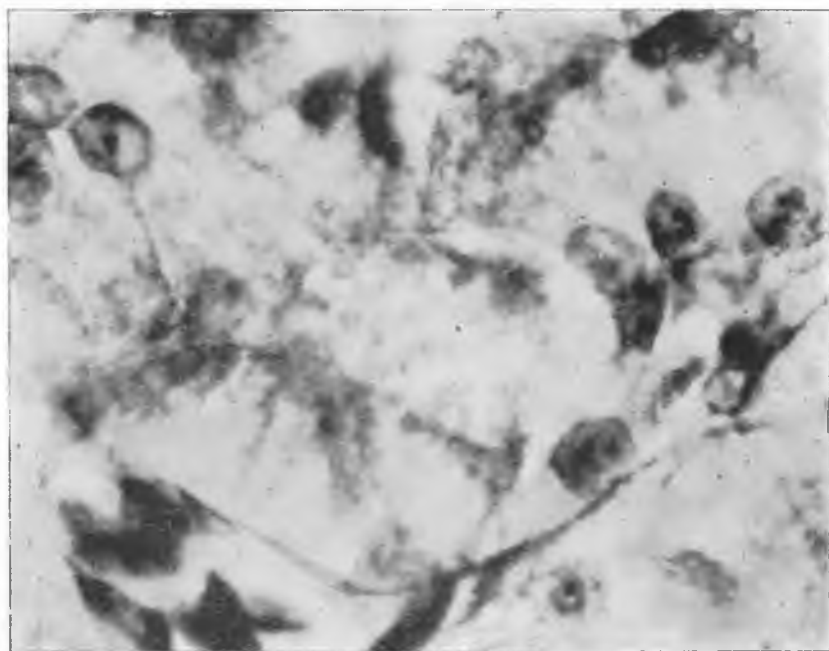


Ryc. 6. Żaba. Temp. +18°C. Pritchard. Pow. duże, mikrofot.

się prawdopodobnie stopniowe zmniejszanie się kwasu dezoksyrybonukleinowego w jądrach, które wyrażało się rozluźnieniem układu chromatyny i zmniejszeniem ilości grudek kwasu dezoksyrybonukleinowego, słabszym odczynem barwnym Feulgena — Rosenbecka i prawie całkowitym zniknięciem strefy przyjąderkowej. Wiadomym jest również z badań Grzyckiego (1951), że pod wpływem zmiany temperatury otoczenia następuje przyspieszenie przemian odbywających się w cytoplazmie i jądrze komórek zwojów mózgowych, a zatem przyspieszenie faz syntez i produkcji,

które pozostają w stosunku wprost proporcjonalnym do wzrostu temperatury.

Przeoglądnięcie preparatów żab kontrolnych pozwoliło ustalić wytyczne charakterystyczne dla temperatury $+18^{\circ}\text{C}$ i następnie porównać je z wynikami uzyskanymi w doświadczeniu. W temperaturze $+18^{\circ}\text{C}$ stwierdziliśmy, że ilość i rozmieszczenie ziarenek kwasu dezoksyrybonukleinowego w jądrach komórek wątrobowych

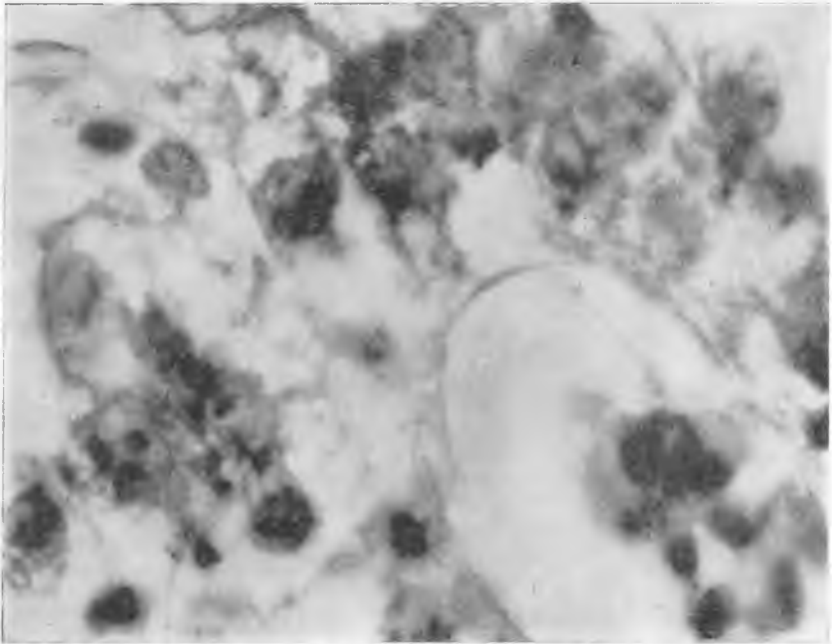


Ryc. 7. Żaba. Temp. $+45^{\circ}\text{C}$. Bauer Pow. duże, mikrofot.

są zasadniczo różne, mimo tego, do cech stale i wyraźnie występujących należy zaliczyć: 1) szeroką strefę przyjąderkową dającą intensywny odczyn barwny Feulgena — Rossenbecka, 2) równomierne rozszanie dużych i małych ziarenek Feulgen-dodatnich po całej jądroplazmie i 3) napiętą, ładnie zabarwioną na kolor fioletowo-czerwony błonę jądrową, która miejscami tylko posiada płaskowyniosłe zgrubienia.

Podniesienie temperatury otoczenia do $+30^{\circ}\text{C}$ powodowało skupianie się ziarenek Feulgen-dodatnich w częściach obwodowych jądra, a to stwarzało mniejsze lub większe przejaśnienia w jądro-

plazmie, szczególnie w jej części środkowej. Prawie wszystkie grudki układały się pod błoną jądrową albo w niewielkiej odległości od niej, przy czym większe barwiły się intensywniej, mniejsze zaś miały wygląd słabo barwionych. Ilościowo nawet przeważały te ostatnie, i jak można było zauważyć, były one zlepkiem ziarenek drobnych. Strefy przyjąderkowe były różne, jedne bowiem szerokie, inne wąskie, zawsze jednak utworzone z różnej wielkości



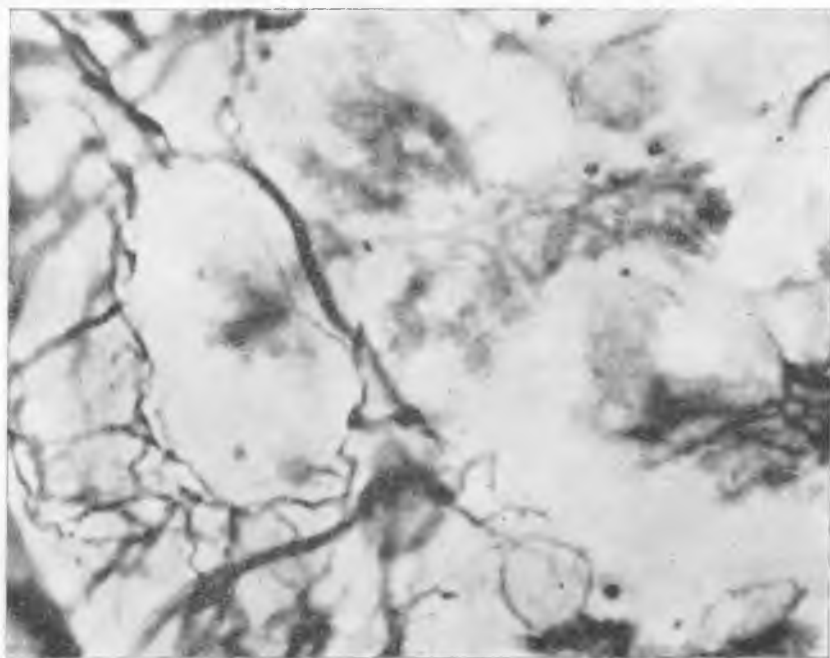
Ryc. 8. Żaba. Temp. +45°C. Pritchard. Pow. duże, mikrofot.

i ilości ziarenek dających wyraźny odczyn barwny. Błona jądrowa była gładka, w nielicznych odcinkach (segmentach) nieznacznie grubiejsza, miała mimo tego wygląd napiętej, jednolitej, wysyczonej barwnikiem linii odcinającej się od otaczającej jądro cytoplazmy.

Przybliżanie się i nagromadzenie się fioletowo czerwonych ziarenek i grudek pod błoną jądrową może świadczyć o wewnątrzjądrowym przeseregowaniu kwasu dezoksyrybonukleinowego, a to także może być wyrazem przemian jądrowo-plazmatycznych prowadzących do rozładowania jądra. Podkreślić należy, że tę

samą czynność fizjologiczną wykazywały wszystkie jądra komórek wątrobowych.

Prawie całkowity natomiast zanik ziarenek Feulgen-dodatnich obserwowano się w temperaturze $+45^{\circ}\text{C}$ i dlatego też jądra miały wygląd przezroczystych pęcherzyków. Strefa przyjąderkowa była wąska, dawała słaby odczyn Feulgena — Rossenbecka, albo nawet była całkowicie nieobecna. Słabo również barwiła się delikatna

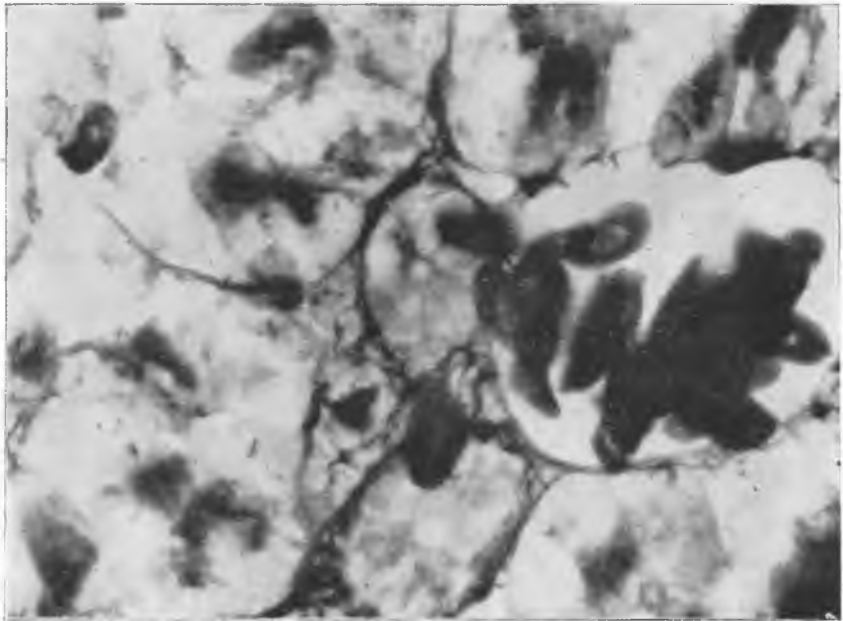


Ryc. 9. Żaba. Temp. $+45^{\circ}\text{C}$. Mitchell — Wisłocki. Pow. duże, mikrofol.

błona jądrowa, w niektórych komórkach lekko pofałdowana i posiadająca różańcowate, małe zgrubienia. Tuż pod błoną jądrową spotykało się wąski pas utworzony z bardzo drobniutkich delikatnie zabarwionych ziarenek kwasu dezoksyrybonukleinowego (mikrofol. ryc. 11 i 12). Jądra te były nieco większe w porównaniu z jądrami komórek kontrolnych ($+18^{\circ}\text{C}$) i poddanych działaniu $+30^{\circ}\text{C}$, a że wskazywały wyraźne zmniejszenie w nich ziarenek Feulgen-dodatnich (kw. DRN) można było myśleć albo o przyspieszonym procesie metabolizmu wewnątrzjądrowego, albo o rozluźnieniu układu

chromatyny względnie zanikaniu reakcji na kwas dezoksyrybonukleinowy skutkiem zachodzących przemian dezoksyrybonukleoproteidu. Należy zauważyć, że wszystkie jądra komórek wątrobowych na preparatach z tej serii doświadczalnej wykazywały ten sam stan fizjologicznej czynności.

Mniej gwałtowne „przemiany” w jądrach komórek wątrobowych można było zanotować przy obniżeniu temperatury otoczenia do 0°C i do -4°C. W jądrach komórek wątrobowych żab pod-

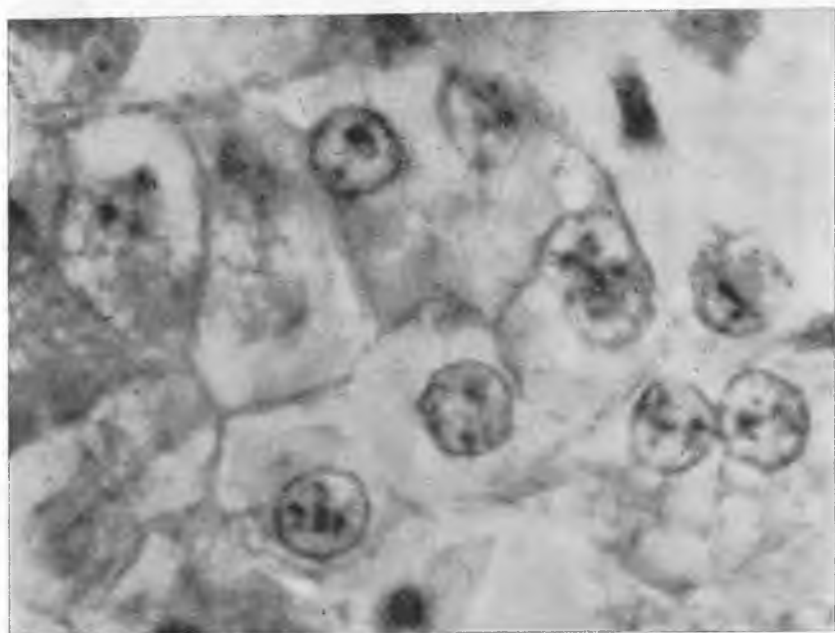


Ryc. 10. Żaba. Temp. +45°C. Mitchell — Wisłocki. Pow. duże, mikrofol.

danych działaniu temperatury 0°C ziarenka kwasu dezoksyrybonukleinowego, różnej wielkości i zabarwione na kolor fioletowo czerwony, rozsypane były równomiernie po całej jądroplazmie. Strefy przyjąderkowe były szerokie, a błona jądrowa równa, gładka i napięta. Rozmieszczenie i ilość kwasu dezoksyrybonukleinowego równomierne we wszystkich komórkach, a także dodatni odczyn barwny wskazywały raczej na fazę spoczynkową, albo na zwolnienie przemian jądrowo-plazmatycznych. Nie tylko na zwolnienie, ale nawet na zahamowanie przemian

jądrowych wskazywały obrazy jąder komórek wątrobowych żab pozostających w temperaturze -4°C .

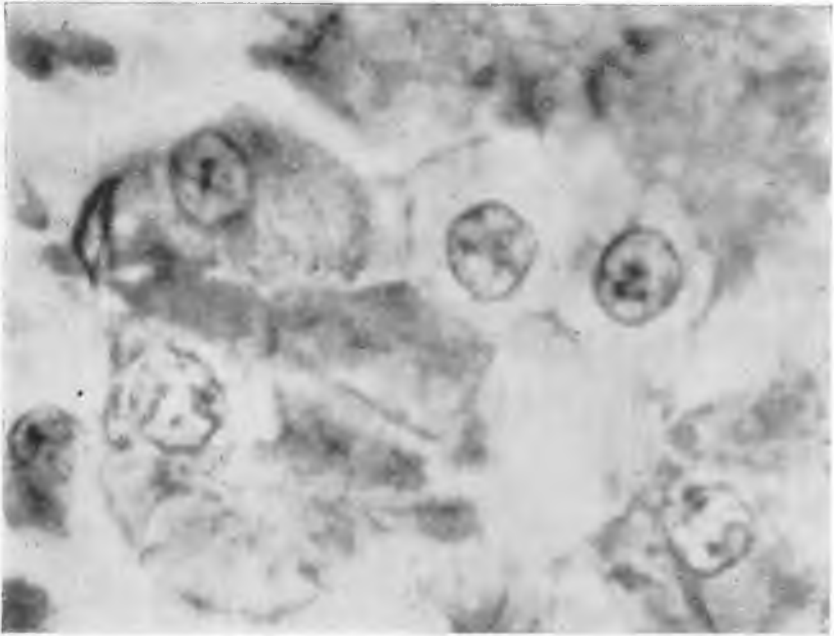
Bardzo drobne ziarenka kwasu dezoksyrybonukleinowego były równomiernie rozsypane po całej jądroplazmie, a skupień, któreby tworzyły chromocentra nie spotykano. Strefa przyjąderkowa była zawsze wąska, błona jądrowa cienka, miejscami nie zabarwiona. Wszystkie jądra barwiły się słabo, jedynie strefa przyjąderkowa dawała intensywny odczyn barwny.



Ryc. 11. Żaba. Temp. $+45^{\circ}\text{C}$. Feulgen — Rossenbeck. Pow. duże, mikrofot.

Jeśli więc teraz porównamy otrzymane obrazy zachowania się kwasu dezoksyrybonukleinowego w jądrach komórek wątrobowych żab kontrolnych i doświadczalnych z obrazami zachowania się glikogenu, zauważymy odwrotnie proporcjonalny stosunek glikogenu i kwasu dezoksyrybonukleinowego do temperatury (w granicach $+18^{\circ}\text{C}$ do $+45^{\circ}\text{C}$). Zmniejszenie ilości glikogenu w temperaturach wyższych od $+18^{\circ}\text{C}$, jak wydaje się, przebiega równolegle ze zmniejszeniem się ilości kwasu dezoksyrybonukleinowego w jądrze i na tych podstawach można dopatrywać się

słuszności założeń Warburga i Doljańskiego. Natomiast w temperaturach niższych od $+18^{\circ}\text{C}$ stwierdzone zmniejszenie ilości glikogenu nie znajduje potwierdzenia w obserwowanych obrazach rozmieszczenia i prawdopodobnie ilości kwasu dezoksyrybonukleinowego w jądrze, które mogą świadczyć o zahamowaniu względnie zwolnieniu procesów jądrowo-jąderkowo-plazmatycznych. Czy obserwowana w temperaturze poniżej $+18^{\circ}\text{C}$



Ryc. 12. Żaba. Temp. $+45^{\circ}\text{C}$. Feulgen — Rossenbeck. Pow. duże, mikrofoto.

sprzeczność z założeniami Warburga i Doljańskiego może mieć słuszność czy nie, pozostaje dla nas zagadnieniem nierozstrzygniętym do czasu ukończenia przeprowadzanych doświadczeń mających na celu oznaczenie ilościowe kwasów nukleinowych w komórkach wątrobowych żab pozostających w różnych warunkach otoczenia. Można więc na tej podstawie z jednej strony dopatrywać się słuszności założeń Warburga i Doljańskiego, a z drugiej strony przypuszczać, co zresztą nie może być na podstawie dotychczasowych badań wykluczone, że wahania ilości glikogenu w cytoplazmie komórek wątrobowych, które

mogą pozostawać w pewnej zależności do szybkości odbywających się przemian wewnątrzkomórkowych, są prawdopodobnie także regulowane na drodze układu nerwowego. W tej chwili nie mamy jeszcze żadnych dowodów, że wahania w rozmieszczeniu i ilości glikogenu w komórkach wątrobowych żab pozostających w skali stosowanych przez nas temperatur są wyrazem harmonijnego kojarzenia czynników świata zewnętrznego z ustrojem, regulowanego za pośrednictwem ośrodkowego układu nerwowego. Zdajemy sobie również sprawę z tego, że żaba, jako zwierzę zmiennocieplne ma metabolizm mało uzależniony od ośrodkowego układu nerwowego, nie wiemy także czy podobne wyniki nie wystąpiłyby w izolowanej wątrobie poddanej wahaniom temperatury, co spowodowane mogłoby być działaniem ciepłoty na układy enzymatyczne. W każdym razie jednak antagonizm obserwowany w naszych doświadczeniach wydaje się być określonym w czasie zjawiskiem o charakterze czynności odruchowej, która powstała na tle zaburzeń wzajemnej równowagi między ustrojem a otaczającym go środowiskiem i która jest wartością indywidualną dla każdego osobnika nawet w tym samym gatunku. Można więc za tym powiedzieć, że środowisko w tym lub innym stopniu kształtuje odczynowość ustroju i powoduje zdolność przystosowania i odpowiadania na bodźce, oraz że dynamika wzajemnej równowagi między ustrojem a środowiskiem jest prawdopodobnie kierowana czynnością mózgu i znajduje swoje odbicie w metabolizmie wewnątrzkomórkowym. Z ostatecznym jednak potwierdzeniem tego przypuszczenia wstrzymujemy się do czasu ukończenia badań przeprowadzanych na żabach pozbawionych ośrodkowego układu nerwowego i pozostających w doświadczalnie zmienionych warunkach otoczenia.

Chcąc się przekonać, czy uzyskane wyniki histochemiczne określające rozmieszczenie i świadczące o przypuszczalnej ilości glikogenu w komórkach wątrobowych w skali stosowanych temperatur nie są błędne, przeprowadzono analizy mikrochemiczne mające na celu ilościowo określić zawartość glikogenu w wątrobie żab pozostających w takich samych warunkach doświadczalnych. Badania uzupełniające przeprowadzono wg metod antronowej i wagowej.

Przeprowadzone doświadczenia na wątrobie żab kontrolnych ($+18^{\circ}\text{C}$) pozwoliły określić średnią zawartości procentowej gliko-

geny w wątrobie, która wynosiła dla metody antronowej 9,8%, a dla metody wagowej 10,4% (Tabela I i II). Średnia oznaczona dla żab w optymalnej temperaturze +18°C stała się dla nas wartością maksymalną a równocześnie stałą liczbą wzorcową umożliwiającą określenie wahań ilościowych glikogenu w wątrobie żab przebywających w skali stosowanych temperatur.

Poddając żaby działaniu temperatur wyższych i niższych od +18°C i określając średnią poszczególnych grup doświadczalnych można było uchwycić odmienne wartości glikogenu, które różniły się pomiędzy sobą bardzo znacznie i prawdopodobnie wyrażały przyspieszenie albo zwolnienie przemian odbywających się nie tylko w wątrobie, ale także w całym ustroju.

Tabela I

Temp. doświad.	Ilość glikogenu w wątrobie w % wg. metody antronowej						Średnia ilości glikogenu w wątrobie w %.
	I	II	III	IV	V	VI	
-4°C	1,53	1,79	2,06	1,86	-	-	1,81 ±0,1095 [*]
0°C	3,00	2,53	2,73	2,60	2,49	-	2,67 ±0,09203
+18°C	10,13	10,22	9,77	8,99	10,12	9,56	9,80 ±0,1017
+30°C	1,53	1,52	1,74	1,97	-	-	1,69 ±0,10622
+45°C	0,69	0,55	0,58	0,49	0,50	-	0,56 ±0,03599

* Średni błąd wartości średniej obliczony ze wzoru $\sqrt{\frac{\sum d^2}{n(n-1)}}$

Metoda antronowa wskazuje, że podwyższenie temperatury do +30°C powoduje zmniejszenie ilości glikogenu w wątrobie (tabela I). Na podstawie otrzymanych wyników w tej grupie doświadczalnej obliczono średnią, która wynosi 1,69% i wskazuje na spadek glikogenu o 8,11% w porównaniu ze średnią wzorcową (+18°C). Próby podniesienia temperatury do +45°C powodowały całkowite zmniejszenie ilości glikogenu do 0,56%.

Porównując uzyskane wyniki w temperaturze +18°C, +30°C i (+45°C) zauważało się odwrotnie proporcjonalny stosunek glikogenu do temperatury. Mogłoby to być również wyrazem przy-

spieszenia przemian w ustroju, a między innymi w wątrobie, na co wskazują doświadczenia Doljańskiego (1930) omawiające istnienie stałego antagonizmu pomiędzy czynnością komórki a ilością glikogenu.

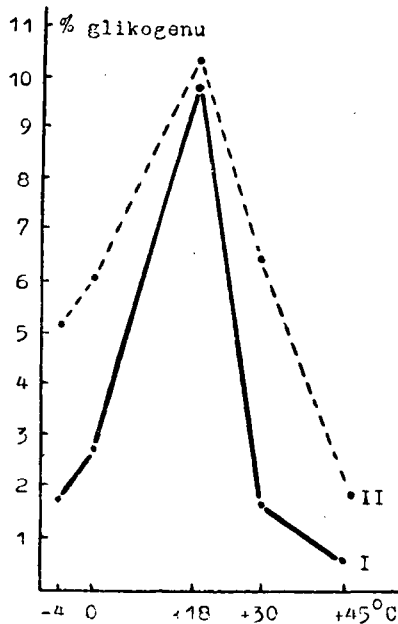
Wychodząc z założenia Terentjewa (1950), że ilość glikogenu w wątrobie żab ulega zwiększaniu w okresie przedzimowym, spodziewaliśmy się, że poddanie żab temperaturom niższym od $+18^{\circ}\text{C}$ będzie powodowało jeśli nie wyżkę ilości glikogenu to przynajmniej utrzymanie w tej samej wartości. Okazało się jednak, że obniżenie temperatury do 0°C i -4°C powoduje wyraźnie obniżkę glikogenu. Wyniki otrzymane po obniżeniu temperatury do 0°C wskazują, że obserwowana ilość glikogenu w wątrobie zmniejsza się do 2,67%, czyli że zaznacza się spadek glikogenu o 7,13% w porównaniu ze średnią wzorcową (9,8%). Nie spodziewaliśmy się, że obniżenie temperatury otoczenia do -4°C będzie powodowało jeszcze większe zmniejszenie ilości glikogenu w wątrobie. Średnia bowiem zawartość ilości glikogenu w wątrobie w tej grupie doświadczalnej wynosiła 1,81%, co w porównaniu z grupą poprzednią (0°C), wskazuje na spadek glikogenu o 0,86%, a z grupą kontrolną o 7,99%.

Tabela II

Temp. doświad.	Ilość glikogenu w wątrobie w % wg. metody wagowej					Średnia ilości glikogenu w wątrobie w %
	I	II	III	IV	V	
-4°C	5,11	4,91	5,09	5,42	-	5,13 $\pm 0,10621^*$
0°C	5,80	5,95	6,38	6,02	6,17	6,06 $\pm 0,09894$
$+18^{\circ}\text{C}$	10,41	10,86	9,90	10,16	10,68	10,40 $\pm 0,17285$
$+30^{\circ}\text{C}$	6,76	6,53	6,62	6,12	5,95	6,39 $\pm 0,15424$
$+45^{\circ}\text{C}$	1,74	2,04	2,06	2,05	1,99	1,97 $\pm 0,06028$

* Średni błąd wartości średniej obliczony ze wzoru $\sqrt{\frac{\sum d^2}{n(n-1)}}$

Potwierdzenie danych fotometrycznych znajdujemy w metodzie wagowej, a otrzymane w porównaniu z metodą antronową wyższe wartości glikogenu możnaby tłumaczyć mniejszą dokładnością metody wagowej. Największe wartości glikogenu zawierały żaby kontrolne 10,4% (tabela II). U żab pozostających w temperaturze +30°C zanotowano obniżkę ilości glikogenu do 6,39% czyli o 4,01% w porównaniu z wynikami kontrolnymi. Wykonanie doświadczeń w temperaturze +45°C wykazywało również bardzo duże zmniejszenie ilości glikogenu, które wyrażało się średnią 1,97%. Obniżenie temperatury środowiska do 0°C i -4°C znalazło także swój wyraz w zmniejszeniu glikogenu w wątrobie w porównaniu z żabami kontrolnymi. W pierwszym przypadku (0°C) zawartość procentowa glikogenu wynosiła 6,06%, czyli zauważa się spadek glikogenu o 4,34%, w drugim przypadku -4°C otrzymana wartość glikogenu wynosi 5,13%, czyli zaznacza się spadek o 5,27% w porównaniu z wynikami kontrolnymi. Różnice pomiędzy 4,34% (0°C) a 5,27 (-4°C) nie są zbyt duże, podobnie jak różnice otrzymane w metodzie antronowej po obniżeniu temperatury, czyli że w zakresie temperatur poniżej 0°C można domyślać się zahamowania przemian odbywających się w ustroju.



Ryc. 13. Wykres (objaśnienia w tekście)

Wyniki uzyskane w obydwu metodach: antronowej i wagowej przedstawia ryc. 13 (wykres), określająca zależność między temperaturą w jakiej przebywają żaby, a ilością glikogenu zawartego w wątrobie tych żab. Krzywa pierwsza uzyskana z wyników metody antronowej wskazuje, że żaby kontrolne tj. przebywające w temperaturze $+18^{\circ}\text{C}$ posiadają największą ilość glikogenu w wątrobie, średnio $9,8\%$. Żaby pozostające w wyższych i niższych temperaturach posiadają mniejsze ilości glikogenu. W temperaturze $+30^{\circ}\text{C}$ średnia wynosi $1,69\%$, w temp. $+45^{\circ}\text{C}$ — $0,56\%$, w 0°C — $2,67\%$, a w temperaturze -4°C — $1,81\%$. Podobny przebieg krzywej otrzymano z wyników uzyskanych w metodzie wagowej (krzywa II). Ze względu na większe wartości glikogenu w porównaniu z metodą antronową przebiega ona powyżej krzywej I. Na krzywej II obserwujemy także największą zawartość glikogenu w wątrobie żab kontrolnych — $10,4\%$. Żaby w temperaturze $+30^{\circ}\text{C}$ posiadają średnią $6,39\%$, w temp. $+45^{\circ}\text{C}$ — $1,97\%$ w temp. 0°C — $6,06\%$, a w temperaturze -4°C — $5,13\%$.

W celu sprawdzenia czy otrzymane wyniki można tłumaczyć działaniem przypadkowości, czy też mają charakter nieprzypadkowy zastosowano sprawdzian (test) statystyczny t „Studenta” na różnicę średnich:

$$t = \frac{(\bar{\chi}_1 - \bar{\chi}_2) \cdot \sqrt{\nu} \cdot \sqrt{(1/n_1 + 1/n_2)}}{\sqrt{n_1 s_1^2 + n_2 s_2^2}}$$

przy ilości stopni swobody $\nu = n_1 + n_2 - 2$. We wzorze tym $\bar{\chi}_1$ jest średnią próby pierwszej zmiennej, $\bar{\chi}_2$ średnią próby drugiej zmiennej, s_1 wariancją w próbie pierwszej zmiennej, s_2 wariancją w próbie drugiej zmiennej, a n_1 i n_2 są liczebnościami odpowiadającymi tym zmiennym.

Zastosowanie zatem sprawdzianu statystycznego t „Studenta” pozwoliło otrzymać następujące wyniki:

Metoda antronowa

Dla temperatur $+18^{\circ}\text{C}$ i 0°C $t = 12,64$ przy $\nu = 9$. Prawdopodobieństwo przekroczenia tej wielkości jest dużo mniejsze od $0,001$ ($t_{0,001} = 4,478$). Uzyskany wynik jest wybitnie nieprzypadkowy, co wskazuje, że zaobserwowanej tutaj różnicy nie można tłumaczyć wahaniem przypadkowymi.

Dla temperatur 0°C i -4°C $t = 2,925$ przy $\nu = 7$. Prawdopodobieństwo przekroczenia tej wartości jest zawarte między 0,02 a 0,05 ($t_{0,05} = 2,365$, $t_{0,02} = 2,998$).

Dla temperatur $+18^{\circ}\text{C}$ i $+30^{\circ}\text{C}$ $t = 14,74$ przy $\nu = 8$ ($t_{0,01} = 3,36$), co wskazuje również na to, że otrzymane wyniki są wybitnie nieprzypadkowe.

Dla temperatur $+30^{\circ}\text{C}$ i $+45^{\circ}\text{C}$ $t = 4,90$ przy $\nu = 7$. Prawdopodobieństwo przekroczenia tego wyniku waha się między 0,01 a 0,001 ($t_{0,01} = 3,499$, $t_{0,001} = 5,409$).

Metoda wagowa

Dla temperatur $+18^{\circ}\text{C}$ i 0°C $t = 4,884$ przy $\nu = 8$, co wskazuje, że prawdopodobieństwo przekroczenia tej wielkości jest większe niż 0,01 ($t_{0,01} = 3,36$).

Dla temperatur $+18^{\circ}\text{C}$ i $+30^{\circ}\text{C}$ $t = 4,953$ przy $\nu = 8$, co wskazuje, że prawdopodobieństwo przekroczenia tej wielkości jest także większe niż 0,01.

Dla temperatur $+30^{\circ}\text{C}$ i $+45^{\circ}\text{C}$ $t = 8,589$ przy $\nu = 8$. Wynik ten jest wybitnie nieprzypadkowy.

Dla temperatur 0°C i -4°C $t = 1,764$ przy $\nu = 7$ ($t_{0,05} = 2,365$), nasz wynik jest już przypadkowy przy błędzie 5%, czyli że nie możemy stwierdzić różnicy dla tych temperatur.

Ocenę istotności różnic wartości średnich przeprowadzono również na podstawie wzoru:

$$t = \frac{M_1 - M_2}{\sqrt{\sigma_{M_1}^2 + \sigma_{M_2}^2}}$$

a zakres wahań przypadkowych odczytywano z tablic Kollera (1943). Wyniki sprawdzenia otrzymane tą metodą okazały się zgodne z poprzednimi.

Porównawcze zobrazowanie wyników w grupach doświadczalnych i kontrolnych stało się udokumentowaniem istotnej wartości naszych badań, podniosło znaczenie czynnika eksperymentalnego (temperatury środowiska), a równocześnie pozwoliło wykluczyć błąd przypadkowości.

Na podstawie dotychczas uzyskanych wyników możemy stwierdzić jak wielki jest wpływ temperatury otoczenia na ustrój. Najbardziej sprzyjające warunki w odkładaniu glikogenu są

w temperaturze $+18^{\circ}\text{C}$. W innych temperaturach ilości glikogenu są znacznie mniejsze, w temperaturze $+45^{\circ}\text{C}$ obserwujemy tylko ślady glikogenu.

Porównanie uzyskanych wyników metodami analitycznymi z histochemicznymi pozwoliło stwierdzić niemal całkowitą zgodność między chemicznym a histochemicznym oznaczaniem glikogenu w wątrobie.

Na podstawie wyników chemicznych i histochemicznych doszliśmy do przekonania, że wykazana stosowanymi metodami antronową i wagową minimalna ilość glikogenu, która jest dostrzegalna mikroskopowo po zabarwieniu preparatów wg metod Mitchell-Wisłockiego, Pritcharda, Besta i Bauera wynosi 1,69%, podczas gdy ilość 0,56% była już przez nas mikroskopowo niedostrzegalna (pył glikogenowy), a chemicznie dawała dodatni odczyn barwny. Istnieje więc pomiędzy końcowymi wynikami metody chemicznej i histochemicznej różnica, która jest zarazem wskaźnikiem wartości jednej i drugiej metody.

Wydaje się nam, że stwierdzona w wątrobach ilość glikogenu, która wzrasta, maleje albo prawie całkowicie zanika pod wpływem różnych temperatur otoczenia, może być wyrazem zaburzeń równowagi między ustrojem, a otaczającym go środowiskiem, a przy tym wyrazem zdolności przystosowania się organizmu. Zdolność przystosowania się, którą Postnikow-Frenkiel (1949) i inni uważają za jedną z zasadniczych cech ustroju i którą nazywają odczynowością zależy, jak można się było przekonać, od siły bodźca działającego i prawdopodobnie od właściwości organizmu.

Wnioski

Jeśli badania Nysa, Auberta i de Duvea (1949), następnie Bergmana i Kleina (1943), Reineckea i Kendall (1942—1943), oraz Drilla, Overmana i Shaffera (1942), którzy omawiają zmiany ilościowe glikogenu w wątrobie zwierząt poddanych różnym warunkom doświadczalnym, uzupełni się badaniami Boettigera (1946), Bo i Atkinsona (1952), a także Ottowicza (1951), wówczas zarysowują się bardzo wyraźnie wahania ilości glikogenu w komórkach i tkankach. Jest to prawdopodobnie uzależnione, jak mogliśmy stwierdzić na podstawie uzyskanych wyników z naszych doświadczeń, nie tylko od bodźców zewnętrznych i nie tylko od procesów wewnętrznych,

które potrafią przyspieszać lub zwalniać przemiany wewnątrzkomórkowe, na co zresztą wskazują również prace Doljańskiego (1930), Jakowlew (1953) i innych, ale także od dynamiki wzajemnej równowagi pomiędzy ustrojem a otaczającym go środowiskiem. Ilość glikogenu zatem w komórkach i tkankach nie stanowi wartości stałej, zmienia się ona i może być zmieniana, a także, jak wydaje się nam, może być ilustracją przemian odbywających się w ustroju.

Zadaliśmy sobie pytanie, czy zmiana czynników środowiska (zmiana temperatury otoczenia) posiada jakiś wpływ na ustrój? Czy zmiana temperatury otoczenia może być bodźcem przyspieszającym lub zwalniającym przemiany zachodzące w ustroju, oraz czy zwykle zbyt jednostronne interpretowanie wyników doświadczalnych uzyskiwanych przez różnych autorów, da się sprowadzić do wspólnego mianownika, który pozwoli zaproponować nieco inne tłumaczenie obserwowanych zjawisk, nie na drodze izolacji zjawisk, ale na drodze istnienia harmonijnego skojarzenia czynników świata zewnętrznego, regulowanego za pomocą ośrodkowego układu nerwowego?

Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń na żabach wodnych (*Rana esculenta esculenta*) doszliśmy do przekonania, że:

1) Czynniki środowiska zewnętrznego (temperatury $+18^{\circ}\text{C}$, $+30^{\circ}\text{C}$, $+45^{\circ}\text{C}$, 0°C i -4°C) mogą wywierać wpływ na przemiany odbywające się w narządach wewnętrznych (wątroba), czyli, że istnieje zależność pracy narządu od czynnika zewnętrznego (środowiska), z którym narząd ten zasadniczo nie ma bezpośredniego morfologicznego związku. Jest jednak, jak mogliśmy zauważyć, związek, który kojarząc świat zewnętrzny ze środowiskiem wewnętrznym ustroju, przekształca się w bodźce pobudzające względnie hamujące przemiany wewnątrzkomórkowe, a równocześnie warunkujące wzajemną równowagę pomiędzy ustrojem a środowiskiem. Skojarzenie czynników zewnętrznych z przemianami wewnątrzustrojowymi może zachodzić, jak przypuszczamy, na drodze nerwowej i humoralnej, a głównym regulatorem tych skomplikowanych czynności jest ośrodkowy układ nerwowy. Z ostatecznym jednak potwierdzeniem tego przypuszczenia wstrzymujemy się do czasu ukończenia dalszych badań.

2) Wahanie ilości glikogenu w komórkach wątrobowych żab wodnych może pozostawać w pewnej zależności do szybkości od-

bywających się przemian wewnątrzkomórkowych, które są uzależnione od temperatury środowiska. W miarę podwyższenia względnie obniżenia temperatury otoczenia spostrzegano się bowiem: a) stopniowy spadek ilości glikogenu w wątrobie, sprawdzony metodami histochemicznymi i chemicznymi, b) przyspieszenie przemian jądrowo-plazmatycznych wyrażające się, być może, stopniowym zmniejszaniem się ilości kwasu dezoksyrybonukleinowego w jądrze, sprawdzone metodą histochemiczną. Można zatem powiedzieć, że środowisko kształtuje odczynowość ustroju i wyzwała zdolność przystosowania i odpowiadania na bodźce.

3) Antagonizm powstały na tle zaburzeń wzajemnej równowagi między ustrojem a otaczającym go środowiskiem wydaje się być określonym w czasie zjawiskiem o charakterze czynności odruchowej, która jest zależna od siły i charakteru bodźca, a zatem od jakości bodźca działającego, czego dowodem są wahania ilości glikogenu w wątrobie i przemiany jądrowo-plazmatyczne obserwowane w skali stosowanych temperatur. Jak wynika więc z naszych histofizjologicznych doświadczeń rytm procesów wewnątrzustrojowych i wewnątrzkomórkowych wiąże się ściśle z rytmicznymi procesami środowiska zewnętrznego.

PIŚMIENICTWO

1. Bauer H.: Zeitsch. f. mikr. anat. Forsch. 33, 143—160, 1933.
2. Bergman H. C., Klein D.: Endocrinol. 33, 174—176, 1943.
3. Bo W. J., Atkinson W. B.: Anat. Rec. 113, 91—96, 1952.
4. Boettiger E. G.: J. Cell. a. Comp. Physiol. 27, 9—14, 1946.
5. Cori C. F., Cori G. F.: Journ. Biolog. Chem. 100, 323—332, 1933.
6. Doljański L.: Cpt. rend. hebdom. Seanc. Soc. Biol. 105, 504—506, 1930.
7. Drill V. A., Overman R., Shaffer C. B.: Endocrinol. 31, 145—248, 1942.
8. Good C. A., Kramer H., Somogyi M.: Journ. Biol. Chem. 100, 485—491, 1933.
9. Grzycki S.: Annales UMCS. Sec. D, 6, 223—249, 1951.
10. Grzycki S.: Bull. Acad. Pol. Cl. Sc. Math. Nat. Ser. B, II, 451—468, 1951.
11. Holmgren H.: Zeitsch. f. mikr. anat. Forsch. 32, 306—331, 1933.
12. Jakowłewa T. M.: Dokł. Akad. Nauk SSSR. 89, 347—350, 1953.
13. Koller S.: Graphische Tafeln zur Beurteilung statistischer Zahlen. Ed. Steinkopff, Dresden — Leipzig, 1943.
14. Lison L.: Cpt. rend. seanc. Soc. Biol. 143, 117—118, 1949.
15. Lison L.: Cpt. rend. seac. Soc. Biol. 143, 115—116, 1949.
16. Luštinec K.: Čas. Lek. Českých, 92, 20—24, 1953.
17. Mitchell A. J., Wisłocki G. B.: Anat. Rec. 90, 261—266, 1944.
18. Nielsen A., Okkels H., Stockholm C.: Act. path. microb. scand. 9, 258—263, 1932.
19. Nys A., Aubert X., de Duve C.: Biochem. Journ. 45, 245—246, 1949.
20. Ottowicz J.: Endokrynologia Polska 2, 281—287, 1951.
21. Pritchard J. J.: Journ. Anat. 83, 30—31, 1949.
22. Reinecke R. M., Kendall E. C.: Endocrinol. 31, 573—577, 1942.
23. Reinecke R. M., Kendall E. C.: Endocrinol. 32, 505—508, 1943.
24. Terentjew P. W.: Laguska. Hos. Izd. Sow. Nauka. Moskwa, 1950.

Р Е З Ю М Е

Если к исследованиям Nys'a, Aubert'a и de Duve'a (1949), Bergman'a и Klein'a (1943), Reinecke'a и Kendall'a (1942—1943), а также Drill'a, Overman'a Shaffer'a (1942), рассматривающих изменения в количестве гликогена в печени животных, подвергнутых разным экспериментальным условиям, добавить еще исследования Boettiger'a (1946), Во и Atkinson'a (1952), а также Ottowicza (1951), то тогда выступят ясно выраженные колебания в содержании гликогена в клетках и тканях. Это, повидимому, зависит, в чем мы могли убедиться на основании наших исследований, не только от внешних импульсов и не только от внутренних процессов, будущих в состоянии ускорять либо замедлять внутриклеточный метаболизм, о чем также свидетельствуют работы Дольянского (1930), Яковлевой (1953) и других, но также и от динамики взаимного равновесия между организмом и окружающей его средой. Следовательно количество гликогена в клетках и тканях не постоянно, а изменяется и может изменяться под влиянием разных факторов, а также, кажется, эти изменения могут служить иллюстрацией для процессов обмена веществ, протекающих в организме.

Возникает теперь вопрос, имеют ли какое-нибудь влияние на организм изменения факторов внешней среды (напр. изменения температуры), может ли изменение температуры окружающей среды вызвать ускорение или замедление процессов обмена веществ, протекающих в организме, и наконец можно ли привести к общему знаменателю зачастую слишком одностороннее интерпретирование экспериментальных результатов, получаемых разными авторами, что позволило бы выдвинуть несколько иную интерпретацию наблюдаемых процессов, не на основе их изоляции, но на основании возможности существования гармоничного сочетания факторов внешней среды, регулируемого центральной нервной системой.

На основании произведенных над лягушками (*Rana esculenta esculenta*) исследований можно сделать следующие выводы:

1. Условия внешней среды (температуры $+18^{\circ}$, $+30^{\circ}$, $+45^{\circ}$, 0° и -4°) могут оказывать влияние на процессы обмена веществ,

протекающие во внутренних органах (печень), т.е. существует зависимость между деятельностью органа и факторами внешней среды, хотя данный орган не остается с ней в какой либо непосредственной морфологической связи. Однако, как легко в этом убедиться, существует взаимосвязь, которая, соединяя внешнюю среду с внутренней средой, играет роль импульсов побуждающих или тормозящих внутриклеточный метаболизм и одновременно обуславливающих взаимное равновесие между организмом и внешней средой. Сочетание внешних факторов с протекающими внутри организма метаболическими процессами может происходить, по мнению авторов, под влиянием нервной и гуморальной систем, причем главным регулятором этих очень сложных процессов является центральная нервная система. Однако окончательное подтверждение этого предположения может быть получено лишь после окончания предпринятых дальнейших исследований.

2. Колебания в содержании гликогена в печеночных клетках у лягушек может оставаться в некоторой зависимости от быстроты протекающих внутриклеточных метаболических процессов, зависящих от температуры окружающей среды. И так при повышении или снижении температуры среды можно было заметить: а) постепенное уменьшение количества гликогена, проверенное гистохимическими и химическими методами, б) ускорение ядерно-плазматических метаболических процессов, выражающееся, быть может, в постепенном снижении количества дезоксирибонуклеиновой кислоты в ядре, что было проверено цитохимическим методом. Следовательно можно предположить, что среда формирует реакцию организма и вызывает способность организма приспособиться и соответственно реагировать на возможные импульсы.

3. Антагонизм, возникший на фоне нарушения взаимного равновесия между организмом и окружающей средой представляет собой как будто определенное во времени явление, имеющее характер рефлекторного процесса, зависящего от силы и характера импульса, стало быть, от качества действующего импульса, о чем свидетельствуют колебания в содержании гликогена в печени и ядерно-плазматические, метаболические процессы наблюдаемые при применяемых разных температурах.

Как следует из гистофизиологических экспериментов, произведенных авторами, ритм процессов выступающих внутри организма, а также и внутриклеточных процессов, тесно связан с ритмическими процессами внешней среды.

SUMMARY

If studies of Nys, Aubert and de Duve (1949), next also studies of Bergman and Klein (1943), Reinecke and Kendal (1942—1943) and Drill's, Overman's and Shafiers (1942), who discuss the quantitative changes of glycogen in the liver of animals submitted to various experimental conditions, be supplemented by studies of Boettiger (1946), Bo and Atkinson (1952) and also Ottowicz's (1951), then the picture of variable values of glycogen in the cells and tissues is outlined very distinctly. This is dependend, as we were able to confirm on the basis of the results obtained in our experiments, not only on the external stimules, and not only on the internal processes, which can accelerate or inhibit the intracellular metabolism, a fact illustrated also by works of Doljański (1930), Jakowlewa (1953) and others, but also on the dynamics of the mutual equilibrium between an organism and the environment it surrounding. Therefore the quantity of glycogen in the cells and tissues is not a constant value, it is variable and may be varied and also, as it appeared to us, it may be an illustration of metabolic processes taking place in the organism, processes which are defined as the glycogenic economy.

We tried to answer the question, whether a change of environmental factors, as e. g. a change of the temperature of the environment has any influence on the glycogenic economy of the organism? Can a change of the temperature of the environment be a stimulus accelerating or inhibiting the glycogenolytic process and can the usually one-sided interpretation of the results of experiments obtained by various authors be reduced to a common denominator, which will allow to propose a somewhat different interpretation of the observed phenomena, not by isolation of the phenomena, but by accepting the existence of a harmonious

association of factors of the external environment and the internal environment, regulated by the central nervous system?

On the basis of the experiments conducted on *Rana esculenta* esculenta we have been convinced that:

(1) Factors of the external environment (temperatures $+18^{\circ}\text{C}$, $+30^{\circ}\text{C}$, $+45^{\circ}\text{C}$, 0°C and -4°C) may exert an influence on processes taking place in the internal organs (the liver), that is, there is a dependence of the activity of an organ on the external factor (the environment), with which the given organ has fundamentally no direct morphologic relation. However, there is, as we have observed a relation, which while associating the external environment with the internal environment of the organism is transformed into impulses accelerating or inhibiting the intracellular processes and simultaneously conditioning the equilibrium between the organism and its environment. The association of external factors with internal processes of the organism takes, as we suppose, place due to neural and humoral pathways, whereby the central nervous system is the main regulator of those complex activities. With final confirmation of this supposition we are waiting till the conclusion of further studies.

(2) The deviation of the content of glycogen in the liver cells of *Rana* can remain in a certain relation to the velocity of the intracellular metabolism, which is dependent on the temperature of the environment. As the temperature of the environment was raised or lowered there could be observed: a) gradual decrease of the quantity of glycogen in the liver, confirmed by histochemical and chemical methods, b) acceleration of nucleo-plasmatic processes expressed by a gradual unloading of the nuclei of their desoxyribonucleic acid, confirmed by histochemical method. It can be, therefore, said, that the environment modulates the reaction of the organism and liberates the property of adaptation and response to impulses.

(3) The antagonism, which is the result of disorders of mutual equilibrium between the organism and the environment it surrounding seems to be a limited in time phenomenon of a nature of a reflex activity. This activity is dependent on the intensity and character of the impulses, therefore it is dependent on the quality

of the acting impuls, as evidenced by the deviations of the content of glycogen in the liver and nucleo-plasmatic processes observed in the scale of the applied temperatures. Our histophysiologic experiments permit, therefore, to conclude, that the rhythm of the internal processes in the organism and the intracellular processes are closely connected with the rhythmic processes of the external environment.

