
Z Zakładu Histologii i Embriologii Wydziału Lekarskiego Akademii Medycznej w Lublinie
Kierownik: prof. kontr. doc. dr med. Stanisław Grzycki.

Stanisław GRZYCKI

Zmiany w barwnikochłonności żywych komórek nerwowych zwojów mózgowych ślimaków po podrażnieniu krótkotrwałymi słabymi prądami elektrycznymi o różnych natężeniach

Изменения во вхлещенности красок живых нервных клеток мозговых ганглев улиток после раздражения слабыми, кратковременными электрическими токами разных напряжений

Changes in the chromatophilia of living nerve cells of cerebral ganglia of snails after the stimulation by means of electric currents of short duration and various intensities

Bethe wykazał, że pod wpływem prądu elektrycznego stałego występują w tkance nerwowej zmiany chemiczne, w wyniku których włókienka nerwowe przyjmują barwnik błękit toluidynowy w okolicy katody chętniej, natomiast koło anody słabiej, albo wcale nie. W w edensky j, Nernst i inni zaś stwierdzili, że w tkance, a może nawet i w cytoplazmie komórek powstają na skutek przepływu prądu zmiany w stężeniu jonów, które prowadzą do wytworzenia na obu biegunach różnic skupienia jonów, a tym samym różnic wartości chemicznej, które wyrażają się zwiększonym lub zmniejszonym powinowactwem do barwników.

Nassonow, Aleksandrow, Uszakow i Romanow przekonali się, że istnieje zależność właściwości protoplazmy od czynnościowego stanu komórki, oraz że tkanki nerwowa i mięsna

odpowiadają zwiększonym powinowactwem do barwników nie tylko po uszkodzeniu, ale także i po odpowiednim podrażnieniu. Romanow, Smitten i Kamnew po zastosowaniu metody kolorymetrycznej zauważyli, że istnieje nawet bezpośrednia i wprostproporcjonalna zależność między ilością związanego barwnika, a siłą i czasem trwania drażnienia.

W doświadczeniu Smittena współzależność ta wyrażała się wskaźnikiem 29,3% do 56,7%, a więc podrażnienie włókna nerwowego prądem indukcyjnym powodowało gwałtowne zwiększenie barwności komórek zwojowych, przy czym uzyskane wyniki były uzależnione od siły podrażnienia. Zbyt wielkie jednak natężenie prądu charakteryzowało się zawsze obniżeniem wskaźnika barwnikochłonnych wartości komórek nawet do 4,3%, średnio do 7,7% w porównaniu z wartościami uzyskanymi po optymalnym podrażnieniu.

Smitten wykonał także badania nad wpływem temperatury otoczenia na barwnikochłonność komórek zwojowych i stwierdził, że w temperaturze od +9 do +11°C wskaźnik nagromadzenia barwnika w zwojach wynosił 29,3%, natomiast przy podwyższeniu temperatury od +17 do +20°C opadła wartość jego do 5%.

Seyderhelm uważa że tylko komórki uszkodzone i martwe posiadają zdolność barwienia się barwnikami w roztworach koloidowych. W obserwacjach więc swoich poczynionych nad leukocytami ropy, wycieków zapalnych z cewki moczowej, pęcherza moczowego lub pochwy, przekonał się o niebarwności komórek żywych i nieuszkodzonych, oraz o tym, że w miarę przedłużenia się czasu odosobnienia komórek i występowania obumierania protoplazmy i jądra, zwiększała się ilość zabarwionych komórek. W okresie katabiozy powinowactwo do barwników okazywała przede wszystkim protoplazma, zaś o śmierci komórki świadczyło zabarwienie jądra. Jądro zatem najdłużej opierało się działaniu barwników.

W naszych poprzednich badaniach mieliśmy możliwość zauważyć, że ilość związanego barwnika również zależała od stężenia roztworu barwnika, oraz od czasu działania barwnika. Używany bowiem roztwór 1:100000 błękitu metylenowego, jeśli przyżyciowo działał na komórki nerwowe przez krótki okres czasu, wówczas okazywał powinowactwo wyłącznie do struktur cytoplazmatycznych podobnych do elementów Golgiego. Przedłużenie zaś czasu barwienia od 1 do 2 godz., oraz zwięks-

szenie stężenia roztworu barwnika np. 1:20000, powodowało zabarwienie cytoplazmy i jądra na kolor niebieski, przy czym struktury cytoplazmatyczne albo niewiele tylko różniły się zabarwieniem od otoczenia, albo były zupełnie niedostrzegalne. Zabarwienie komórki pozostawało więc w stosunku wprostproporcjonalnym do stężenia roztworu barwnika i do czasu działania barwnika. Zabarwienie pozostawało także w wprostproporcjonalnym stosunku do okresu życia odosobnionej komórki *in vitro*. Cytoplazma i jądro odosobnionych komórek nerwowych ślimaków początkowo po 30—40 minutach okazywały zwiększone powinowactwo do barwnika, a następnie barwiły się jednostajnie i w końcu mętniały zacierając swoją strukturę.

Biorąc więc pod uwagę różnice w zabarwieniu występujące po zastrzyku i po odosobnieniu, można i jedną i drugą czynność uznać za bodziec drażniący i uzależnić zabarwienie cytoplazmy i jądra od sposobu i trwania drażnienia.

Wykorzystując szczególne powinowactwo błękitu metylenowego w roztworze 1:100000 do elementów Golgiego oraz ziarenek i wodniczek neurowydzielniczych, postanowiliśmy przebadać zmiany w barwnikochłonności tych elementów w komórkach zwojowych ślimaków po zadziałaniu na nie słabymi prądami elektrycznymi, które dawałyby tylko wynik drażnienia, a nie niszczyły i zabijały komórek.

Materiał i metodyka badań

Badania cytologiczne przeprowadzone były nad żywymi, dużymi, motorycznymi neuronami Hanströma, które znajdują się w *postcerebrum*, *lobus dorsalis* i *lobus lateralis* zwojów mózgowych ślimaków *Limnaea*. Polegały one na drażnieniu zwojów mózgowych krótkotrwałymi elektrycznymi prądami stałymi i następnie na przyżyciowym barwieniu tych zwojów błękitem metylenowym.

Ślimaki *Limnaea* na kilka minut przed doświadczeniem wyjmowano z wody, osuszano szmatką i umieszczano na grubej płycie szklanej. Po wyprostowaniu nogi ślimaka, małą płaską elektrodę przykładano do skóry głowy pomiędzy czułkami, drugą zaś, ostro zakończoną wbijano od strony stopy w okolicę zwojów mózgowych (*gangl. cerebralia*), nożnych (*gangl. pedalia*) i bocznych (*gangl. pleuralia, parietalia, abdominalia* etc.), przy czym starano się, by odległość pomiędzy

elektrodami była jak najmniejsza i pole elektryczne obejmowało możliwie jak najdokładniej wszystkie zwoje.

Prąd stały o natężeniu 50, 100 i 150 miliamperów przepuszczano jednorazowo w czasie 1 sekundy, 30 sekund, 2 minut i 5 minut. Po upływie 15 minut od chwili przzerwania drażnienia prądem wstrzykiwano podskórnice w okolicę głowy, jednorazowo w ilości $\frac{1}{2}$ ccm, błękit metylenowy rozpuszczony w roztworze fizjologicznym 1:100000. Komórki odosobniono po 10—15 minutach barwienia i oglądano w 0,7% wodnym roztworze chlorku sodowego z dodatkiem 10% chlorku wapnia w ilości 0,2%.

Drugą grupę ślimaków podrażniano jednorazowo przez 1 sekundę prądem stałym o natężeniu 150 miliamperów, a zastrzyk podskórny błękitu metylenowego otrzymały one dopiero po 5, 15, 30 i 60 minutach od chwili przepuszczenia prądu.

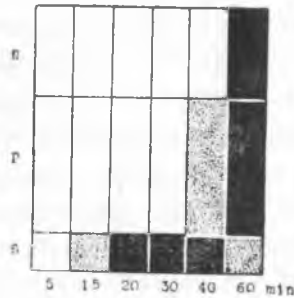
Trzeciej grupie ślimaków natomiast naprzód wstrzyknięto jednorazowo, podskórnice w okolicę zwojów po $\frac{1}{2}$ ccm roztworu barwnika 1:100000 i dopiero po upływie 10, 20, 30 i 40 minut od chwili zastrzyku drażniono je przez 1 sekundę prądem stałym o natężeniu 150 miliamperów.

Czwartą grupę stanowiły ślimaki kontrolne, którym wstrzykiwano $\frac{1}{2}$ ccm barwnika w roztworze 1:100000, a komórki nerwowe odosobniono po 5, 15, 20, 30, 40 i 60 minutach barwienia przyżyciowego. Barwnik w roztworze 1:100000 nie był trujący ani dla komórek nerwowych ani dla ślimaków. Odosobnione komórki nerwowe można było utrzymywać przy życiu przez około 40 minut. Po tym czasie spostrzegaliśmy zmętnienie protoplazmy, rozplywanie się barwnika i wodniczkowatość jądra.

Badania własne

I.

Badania doświadczalne przeprowadzone nad ślimakami *Limnaea stagnalis* (Nr 1—30) polegały na jednorazowym podskórnym wstrzykiwaniu w okolicę zwojów głowowych po $\frac{1}{2}$ ccm roztworu 1:100000 błękitu metylenowego i odosobnieniu dużych komórek nerwowych ze zwojów mózgowych w różnym czasie przyżyciowego barwienia.

Tabl. I.

Błękit metylenowy 1:100000, 1/2 ccm, 5 minut

Ślimakom Nr 1--5 wstrzyknięto podskórnice po 1/2 ccm roztworu 1:100000 błękitu metylenowego, a komórki odosobniono po 5 minutach barwienia przyżyciowego. Komórki oglądano w płynie fizjologicznym natychmiast po zrobieniu preparatu.

O b r a z c y t o l o g i c z n y: Cytoplazma, jądra, jąderka i struktury cytoplazmatyczne nie zabarwione, mimo tego przy obniżonym aparacie oświetleniowym w mikroskopie widoczne były drobne błyszczące ziarenka i wodniczki różnej wielkości, nagromadzone szczególnie obficie w strefie przyjądrowej i w stożku aksonowym. Karioplazma i neuroplazma więc miały wygląd drobnoziarnisty, przy czym ziarenka i wodniczki były w ciągłym ruchu bezładnym.

Wynik przyżyciowego barwienia — ujemny.

Błękit metylenowy 1:100000, 1/2 ccm, 15 minut

Ślimakom Nr 6—10 wstrzyknięto podskórnice 1/2 ccm barwnika, a neurony odosobniono po 15 minutach barwienia przyżyciowego.

O b r a z c y t o l o g i c z n y: Cytoplazma, jądra i jąderka nie zabarwione. Widoczne drobne błyszczące ziarenka i niewielka ilość różnej wielkości matowych ziarenek, oraz wodniczek. I jedno i drugie wprawdzie rozsypane po całej cytoplazmie, jednak zgrupowały się przeważnie w strefie przyjądrowej i w stożku aksonowym. Dużo ziarenek zabarwionych na kolor niebieski. Widoczne były także ciemno

niebieskie, grubsze lub cieńsze, otoczki dokoła nie zabarwionych wodniczek. Obraz typowy dla kompleksów sferoidalnych Thomasa i ciałek Golgiego. Różańcowate nierówności widoczne na powierzchni zewnętrznej otoczki, oraz mniejsze lub większe przerwy w ciągłości otoczek wskazywały na ich ziarnistą lub odcinkową budowę.

Kompleksów sferoidalnych w jednej komórce przeważnie mało, umiejscowione w stożku aksonowym. Ziarenek natomiast dużo, najwięcej w stożku aksonowym i dokoła jądra. Nie brak było neuronów, w których można było obserwować tylko małe i duże ziarenka bez kompleksów sferoidalnych. W tym typie komórek największe nagromadzenie ziarenek było raczej dokołajądrowe. Zabarwienie ziarenek nierówne. Obok ciemno niebieskich widoczne ziarenka blado niebieskie. Obraz przypominający komórki w okresie nieczynnym, tzw. komórki rozładowane.

Nasycenie barwnikiem struktur cytoplazmatycznych dość dobre, w niektórych neuronach słabe.

Błękit metylenowy 1:100000, 1/2 ccm, 20 minut

Komórki nerwowe zwojów mózgowych odosobniono ze ślimaków Nr 11—15 po 20 minutach barwienia przyżyciowego 1:100000 roztworem błękitu metylenowego.

O b r a z c y t o l o g i c z n y: Cytoplazma, jądra i jąderka nie zabarwione. Ziarenka Golgiego i kompleksy sferoidalne Thomasa bardzo wyraźne. Ziarenka różnej wielkości: małe, średnie i duże. Średnie i duże wykazywały większe powinowactwo do barwnika w porównaniu z ziarenkami małymi i otoczkami zewnętrznymi ciałek sferoidalnych. W tych ostatnich zaznaczona struktura ziarnista, a nawet w niektórych ciałkach otoczki utworzone były wyłącznie z kilku lub kilkunastu drobnych ziarenek przylegających w różnych miejscach do obwodu wodniczki.

Ziarenka, ciała sferoidalne i wodniczki wyznaczały dynamiczne pole czynnościowe cytoplazmy we wszystkich oglądanych neuronach. Mimo jednak widocznych ruchów tych elementów prowadzących do stałej, chociaż powolnej zmiany obrazów cytologicznych, ani przemian jednych w drugie, ani wzrostu jednych i drugich, oraz łączenia się i jednych i drugich w większe jednostki nie udało się zaobserwować.

Nasylenie barwnikiem struktur cytoplazmatycznych bardzo dobre, optymalne.

Błękit metylenowy 1:100000, 1/2 ccm, 30 minut

Barwienie przyżyciowe komórek nerwowych trwało 30 minut. Ślimaki Nr 16—20 otrzymały podskórnie w okolicę głowy pomiędzy czułkami górnymi po 1/2 ccm 1:100000 roztworu błękitu metylenowego.

O b r a z c y t o l o g i c z n y: Cytoplazma, jądra i jąderka nie zabarwione. Ziarenka i ciała sferoidalne Golgi—Thomasa bardzo wyraźne. Umieszczeniem, strukturą i zabarwieniem przypominały preparaty poprzednie. Można było stwierdzić w nielicznych neuronach jak gdyby zwiększenie liczby wodniczek i ciałek kompleksowych. Za małą jednak ilość preparatów nie upoważniała nas do przedstawienia jakichkolwiek wniosków dotyczących wzmożenia lub przyspieszenia procesu wydzielniczego pod wpływem wstrzykniętego barwnika.

Nasylenie barwnikiem wszystkich struktur cytoplazmatycznych bardzo dobre.

Błękit metylenowy 1:100000, 1/2 ccm, 40 minut

Ślimakom Nr 21—25 podano podskórnie 1/2 ccm 1:100000 roztworu błękitu metylenowego. Komórki nerwowe odosobniono po 40 minutowym barwieniu przyżyciowym.

O b r a z c y t o l o g i c z n y: Jądra i jąderka nie zabarwione. Cytoplazma posiadała lekki odcień niebieski. Struktury ziarniste i systemu Golgiego ciemnoniebieskie, prawie czarne. Zatarła się ziarnista budowa otoczek zewnętrznych w ciałkach sferoidalnych. Wodniczki wewnętrzne systemów Golgiego i wodniczki neurowydzielnicze bezbarwne, ostro odcinały się od otaczającej cytoplazmy. Można więc było sądzić o ich odmiennej budowie i niezależności od otoczenia. Nie zauważyliśmy łączenia się ich w grupy względnie w kompleksy większe. Ilość wodniczek i ciałek sferoidalnych zawsze niewielka, ziarenek zaś dużo, najwięcej w strefie przyjądrowej. Pojedyncze wodniczki neurowydzielnicze na obwodzie komórki.

Nasylenie barwnikiem w porównaniu z wynikami poprzednimi — nadmierne.

Błękit metylenowy 1:100000, 1/2 ccm, 60 minut

Ślimaki Nr 26—30 otrzymały po 1/2 ccm barwnika podskórnie, komórki nerwowe ze zwojów mózgowych odosobniono po 60 minutach barwienia przyżyciowego.

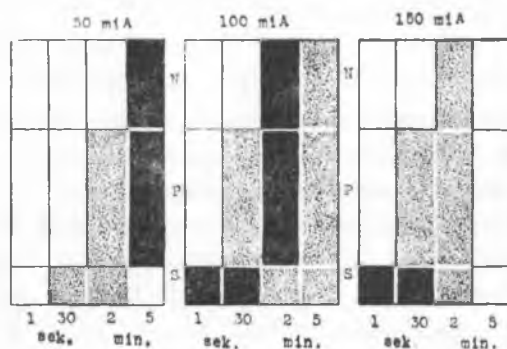
O b r a z c y t o l o g i c z n y: Cytoplazma, jądra, jąderka i struktury cytoplazmatyczne zabarwione jednostajnie na kolor niebieski. Cytoplazma okazywała zwykle wybitniejsze zabarwienie, dlatego też ziarenka i ciała sferoidalne albo były słabo dostrzegalne, albo zupełnie niewidoczne. Wodniczki wewnętrzne kompleksów Thomasa zabarwiły się również na kolor niebieski. Wodniczki neurowydzielnicze zwykle na obwodzie komórki, mniej lub więcej zabarwione, zawsze jednak widoczne i łatwe do utożsamienia i odróżnienia od sferoidów Thomasa.

Nasylenie barwnikiem komórek nerwowych nadmierne, przebarwienie.

II.

W drugiej grupie doświadczalnej znajdowały się ślimaki Nr 31—100, drażnione przez 1 sekundę, 30 sekund, 2 minuty i 5 minut prądem stałym o natężeniu 50, 100 i 150 miliamperów. Po 15 minutach od chwili

Tabl. II.



przerwania drażnienia prądem elektrycznym wstrzykiwano podskórnice po $\frac{1}{2}$ ccm barwnika błękitu metylenowego w roztworze 1:100000. Barwienie przyżyciowe trwało 10—15 minut, po czym komórki odosobniono i oglądano w roztworze chlorku sodu z dodatkiem chlorku wapnia w świetle przepuszczonym i w ciemnym polu

Prąd elektr. 50 miliamper. 1 sek. Błękit metylenowy 10 min.

Slimaki Nr 31—35 podrażniono przez 1 sekundę prądem stałym o natężeniu 50 miliamperów, a po 15 m.inutach zrobiono zastrzyk podskórny roztworu 1:10000 błękitu metylenowego. Komórki odosobniono po 10 minutach barwienia przyżyciowego.

O b r a z c y t o l o g i c z n y: Cytoplazma, jądra i jąderka nie zabarwione. Ziarenka i struktury Golgiego także nie zabarwione. Ruch elementów cytoplazmatycznych zachowany, a w niektórych neuronach wzmożony.

Wynik przyżyciowego barwienia — ujemny.

**Prąd elektr. 50 miliamper. 30 sek.
Błękit metylenowy 10 minut**

Slimaki Nr 36—40 drażniono przez 30 sekund prądem stałym o natężeniu 50 miliamperów. Zastrzyk błękitu metylenowego w roztworze 1:100000 zrobiono po 15 minutach od chwili przerwania prądu elektrycznego. Barwienie przyżyciowe komórek nerwowych trwało 10—15 minut.

O b r a z c y t o l o g i c z n y: Cytoplazma, jądra i jąderka nie zabarwione. Ziarenka w strefie przyjądrowej zabarwiły się na kolor niebieski, nasycenie jednak barwnikiem słabe. Otoczki zewnętrzne w ciałkach sferoidalnych i wodniczki neurowydzielnicze nie zabarwione. Ruch elementów cytoplazmatycznych słaby. Przejrzystość żywych komórek bardzo dobra.

Wynik przyżyciowego barwienia słabo dodatni.

**Prąd elektr. 50 miliamper. 2 min.
Błękit metylenowy 10 minut**

Drażnienie ślimaków Nr 41—45 prądem stałym o natężeniu 50 miliamperów trwało 2 minuty. Po 15 minutach od chwili przerwania prądu elektrycznego wykonano zastrzyk podskórny barwnika, a następnie po 10 minutach odosobniono komórki nerwowe ze zwojów mózgowych i oglądano w płynie fizjologicznym.

O b r a z c y t o l o g i c z n y: Jądro i jąderko nie zabarwione. Cytoplazma jednostajnie zabarwiona na kolor jasno niebieski. W niektórych tylko neuronach widziało się w jednych mniej, w drugich wyraźniej podkreślone niebieskie zaciemnienie dokoła jądra, albo na bie-

gunie aksonowym jądra i komórki. Struktury ziarniste w strefie przyjądrowej wprawdzie widoczne, ale zabarwieniem tylko niewiele różniły się od otoczenia. Raczej jednak należało myśleć o zwiększonym powinowactwie do barwnika cytoplazmy dokołajądrowej, a nie ziarenek. Ruch elementów w cytoplazmie słaby. Przejrzystość komórek przeważnie dobra.

Wynik przyżyciowego barwienia struktur cytoplazmatycznych niezadowolający.

Prąd elektr. 50 miliamper. 5 min.

Błękit metylenowy 10 minut

Prądem stałym o natężeniu 50 miliamperów drażniono przez 5 minut ślimaki Nr 46—50, a następnie po 15 minutach od chwili przzerwania prądu rozpoczęto barwienie przyżyciowe zwojów mózgowych, które trwało 10 minut. Odosobnione komórki natychmiast po wypreparowaniu oglądano w płynie fizjologicznym.

O b r a z c y t o l o g i c z n y: Jąderka i jądra blado niebieskie, cytoplazma niebieska. Ziarenka i ciała sferoidalne oraz ziarenka i wodniczki neurowydzielnicze niewidoczne. W strefie czynnościowej i na obwodzie kilku zaledwie komórek zauważyliśmy jaśniejsze cienie wodniczek. Przejrzystość komórek przeważnie dobra. Powinowactwo komórek do barwnika zwiększone.

Wynik przyżyciowego barwienia komórek — dobry, struktur cytoplazmatycznych natomiast — ujemny.

Prąd elektr. 100 miliamper. 1 sek.

Błękit metylenowy 10 minut

Ślimaki Nr 51—55 drażniono przez 1 sekundę prądem elektrycznym o natężeniu 100 miliamperów. Po 15 minutach od chwili zadrażnienia barwiono komórki nerwowe przyżyciowo przez 10 minut błękitem metylenowym w roztworze 1:100000.

O b r a z c y t o l o g i c z n y: Cytoplazma, jądra i jąderka nie zabarwione. Pojedyncze ziarenka i otoczki zewnętrzne ciałek sferoidalnych zabarwione na kolor niebieski. Widoczna struktura ziarnista otoczek. Spostrzegaliśmy również niejednakowe powinowactwo wszystkich ziarenek do błękitu. Jedne z nich bowiem zabarwione były bardzo dobrze, inne zaś blado. Różnice te mogły wskazywać na możliwości metaboliczne względnie metaplastyczne ziarenek. Wodniczki

neurowydzielnicze i wodniczki wewnętrzne systemów Golgiego nie zabarwione.

Wynik barwienia bardzo dobry.

Prąd elektr. 100 miliamper, 30 sek.

Błękit metylenowy 10 minut

Drażnienie prądem elektrycznym o natężeniu 100 miliamperów przedłużyliśmy do 30 sekund. Po 15 minutach od chwili przzerwania prądu elektrycznego wstrzyknięto ślimakom Nr 56—60 po 1/2 ccm błękitu metylenowego w roztworze 1:100000. Komórki nerwowe odosobniono po 10 minutach barwienia przyżyciowego.

O b r a z c y t o l o g i c z n y: Cytoplazma miała delikatny odcień niebieski, jądra i jąderka pozostawały nie zabarwione. Ziarenka, ciała systemowe Hirscha—Golgiego, systemy sferoidalne Thomasa, „mulberry spheroids“ Thomasa oraz wodniczki optymalnie zabarwione i bardzo wyraźne. Przemian metaplastycznych jednych w drugie, a przede wszystkim tworzenia się wodniczki wewnętrznej w dużych ziarnach systemowych, albo „rodzenia się“ wodniczki połączonego z pękaniem osłonki zewnętrznej nie obserwowaliśmy. Zawsze jednak skutkiem ustawicznego, bezładnego i dość szybkiego ruchu wszystkich elementów w cytoplazmie, obraz zmieniał się ukazując mniejszą lub większą ilość wodniczek, kompleksów sferoidalnych, względnie ziarenek.

Wynik barwienia struktur Golgiego bardzo dobry.

Prąd elektr. 100 miliamper, 2 min.

Błękit metylenowy 10 minut

Czas drażnienia prądem o natężeniu 100 miliamperów przedłużyliśmy do 2 minut. Błękit metylenowy w roztworze 1:100000 wstrzykiwaliśmy ślimakom Nr 61—65 podskórnie dopiero po 15 minutach od chwili przzerwania prądu. Zwoje mózgowe barwiono przyżyciowo przez 10 minut.

O b r a z c y t o l o g i c z n y: Cytoplazma, jądra i jąderka zabarwione na kolor niebieski. Struktur Golgi—Thomasa nie można było zaobserwować. W nielicznych neuronach widzieliśmy tylko na obwodzie nieruchome cienie wodniczek różnej wielkości i w różnej ilości. Nie miały one wyglądu wodniczek neurowydzielniczych, ani dużych kompleksów sferoidalnych. Być więc może, że powstały one w cytoplazmie w wyniku zbyt długiego drażnienia prądem i barwienia błęki-

tem metylenowym. Barwniki zasadowe bowiem, jak stwierdził *Dustin*, mają przecież zdolność w pewnych warunkach wytwarzania wodniczek w cytoplazmie obfitującej w substancje zasadochłonne.

Wynik barwienia struktur cytoplazmatycznych — ujemny, komórek — dobry.

Prąd elektr. 100 miliamper. 5 min.

Błękit metylenowy 10 minut

Ślimaki Nr 66—70 drażniono przez 5 minut prądem elektrycznym o natężeniu 100 miliamperów. Dwa ślimaki zdechły w pierwszych minutach drażnienia prądem. Błękit metylenowy w roztworze 1:100000 wstrzykiwano podskórnie żywym ślimakom po 15 minutach od chwili zaprzestania drażnienia. Barwiono przyżyciowo przez 10 minut. Odosobnione komórki oglądaliśmy w płynie fizjologicznym z dodatkiem chlorku wapnia.

O b r a z c y t o l o g i c z n y: Całe komórki lekko podbarwione na kolor niebieski. Struktur Golgiego nie mogliśmy odróżnić. Na obwodzie komórek dość liczne wodniczki różnej wielkości, przeważnie jednak drobne. Wyglądem przypominały wodniczki *Dustina* obserwowane w poprzednich preparatach.

Wynik barwienia struktur cytoplazmatycznych i komórek—ujemny.

Prąd elektr. 150 miliamper. 1 sek.

Błękit metylenowy 10 minut

Podwyższono natężenie bodźca do 150 miliamperów i drażniono nim ślimaki Nr 71—75 tylko przez 1 sekundę. Po 15 minutach wstrzyknięto podskórnie po 1/2 ccm barwnika. Komórki odosabniano po 10 minutowym przyżyciowym barwieniu.

O b r a z c y t o l o g i c z n y: Cytoplazma, jądra i jąderka nie zabarwione, tylko w strefie przyjądrowej dawało się zauważyć zabarwienie jasno niebieskie. Struktury cytoplazmatyczne, szczególnie te, które znajdowały się w obrębie pola czynnościowego, zabarwione na kolor ciemno niebieski. Dobrze widoczne, mniej lub więcej grube pierścienie otoczki zewnętrznej kompleksów Thomasa. W otoczkach grubych zatarła się budowa ziarnista, w cienkich zaś obecne były zwykłe przerwy, stąd odcinkowość i ziarnistość otoczki. Na obwodzie komórek pojedyncze małe wodniczki, jednak nie we wszystkich neuronach.

Wynik barwienia przyżyciowego struktur cytoplazmatycznych bardzo dobry.

Prąd elektr. 150 miliamper. 30 sek.**Błękit metylenowy 10 minut**

Ślimaki Nr 76—80 podrażniono prądem stałym o natężeniu 150 miliamperów przez 30 sekund. Zwoje mózgowe barwiono przez 10 minut roztworem błękitu metylenowego 1:100000. Barwnik wstrzyknięto w 15 minucie po zaprzestaniu drażnienia. Jeden ślimak zdechł niemal natychmiast po przyłożeniu elektrod.

O b r a z c y t o l o g i c z n y: Cytoplazma, jądra i jąderka jasno niebieskiego koloru. Ziarenka i ciała systemowe Golgiego ciemno niebieskim zabarwieniem wyraźnie odznaczają się od otoczenia. Dużo ziarenek w streiie przyjądrowej i w stożku aksonowym. Na obwodzie komórek małe wodniczki nie zabarwione, podobne wodniczki także w stożku aksonowym. Beładny ruch elementów cytoplazmatycznych wydaje się być przyspieszonym w porównaniu z preparatami poprzednich doświadczeń.

Wynik barwienia przyżyciowego struktur cytoplazmatycznych bardzo dobry.

Prąd elektr. 150 miliamper. 2 min.**Błękit metylenowy 10 minut**

Prądem stałym o natężeniu 150 miliamperów drażniliśmy ślimaki Nr 81—85 przez 2 minuty. Trzy ślimaki zdechły w pierwszej minucie działania prądu. Powtórzyliśmy więc doświadczenie na ślimakach Nr 86—90. Z tej serii tylko jeden ślimak zdechł w przerwie pomiędzy drażnieniem a zastrzykiem. Podskórny zastrzyk błękitu metylenowego w roztworze 1:100000 otrzymały ślimaki po 15 minutach od chwili przerwania drażnienia. Komórki odosobniono po 10 minutowym przyżyciowym barwieniu.

O b r a z c y t o l o g i c z n y: Cytoplazma, jądra, jąderka i struktury Golgiego prawie nie zabarwione. Komórki oglądane w ciemnym polu wykazywały drobnoziarnistą cytoplazmę i karioplazmę, lecz ziarenka te były raczej matowe. Ruch elementów powolny. Uzyskane wyniki zmienionej barwnikochłonności komórki i jej struktur cytoplazmatycznych powstały prawdopodobnie na skutek drażnienia, które musiało spowodować osłabienie przemian cytoplazmatycznych, a tym samym przemianę chemiczną cytoplazmy. Przypominają się zatem wyniki uzyskane przez S e y d e r h e l m a, S m i t t e n a i innych.

Wynik przyżyciowego barwienia komórek i ich struktur ujemny.

Prąd elektr. 150 miliamper. 5 min.

Błękit metylenowy 10 minut

Pierwsza grupa ślimaków Nr 91—95 zdechła w czwartej i piątej minucie drażnienia prądem elektrycznym o natężeniu 150 miliamperów. Z drugiej grupy Nr 96—100 zdechły tylko dwa w piątej minucie. Ślimaki żywe otrzymały zastrzyk błękitu metylenowego w roztworze 1:100000 po 15 minutowej przerwie po 5 minutowym drażnieniu. Barwienie przyżyciowe trwało 10 minut. Odosobnione komórki nerwowe oglądano w płynie fizjologicznym.

O b r a z c y t o l o g i c z n y: Cytoplazma, jądra, jąderka i struktury Golgiego nie zabarwione. Komórki oglądane w ciemnym polu wykazują wprawdzie drobnoziarnistą budowę, są jednak matowe, a ruchliwość ziarenek jest bardzo mała. Porównując uzyskane obrazy z poprzednimi, można było utwierdzić się w przekonaniu, że pod wpływem prądu elektrycznego zaszły wyraźne zmiany w cytoplazmie, które prowadzą nie tylko do osłabienia przejawów życiowych, ale równocześnie zmieniają powinowactwo do barwników.

Wynik przyżyciowego barwienia komórek i ich struktur ujemny.

III.

Trzecią grupę doświadczalną stanowiły ślimaki Nr 101—120, które podrażniono jednorazowo przez 1 sekundę prądem stałym o na-

Tabl. III.

N				
P				
S	5	15	30	60 min

tężeniu 150 miliamperów, i którym następnie po 5, 15, 30 i 60 minutach wstrzyknięto podskórnie w okolice głowy roztwór 1:100000 błękitu me-

tylenowego. Komórki odosobniono po 10 minutach barwienia przyżyciowego.

**Prąd elektr. 150 miliamper. 1 sek.
Błękit metylenowy 10 minut**

Ślimaki Nr 101—105 podrażniono przez 1 sekundę prądem stałym o natężeniu 150 miliamperów, a po 5 minutach wstrzyknięto im podskórnio po $\frac{1}{2}$ ccm błękitu metylenowego w roztworze 1:100000. Zwoje mózgowe barwiono przyżyciowo przez 10 minut, odosobnione komórki nerwowe oglądano w płynie fizjologicznym.

O b r a z c y t o l o g i c z n y: Cytoplazma, jądra i jąderka nie zabarwione. W miejscu pola czynnościowego cytoplazma ma raczej delikatny odcień niebieski, nie we wszystkich jednak neuronach poddanych obserwacji z łatwością dostrzegalny. Struktury Golgiego i ziarenka zabarwione na kolor niebieski lub jasno niebieski, we wszystkich neuronach przeważnie dobrze widoczne.

Wynik barwienia przyżyciowego — dodatni.

**Prąd elektr. 150 miliamper. 1 sek.
Po 15 min. błękit metyl. 10 min.**

Błękit metylenowy o roztworze 1:100000 wstrzyknięto podskórnio ślimakom Nr 106—110 po 15 minutach od chwili podrażnienia prądem elektrycznym o natężeniu 150 miliamperów przez 1 sekundę. Po 10 minutowym barwieniu przyżyciowym odosobniono komórki nerwowe.

O b r a z c y t o l o g i c z n y: Cytoplazma, jądra i jąderka nie zabarwione, w polu dynamicznym jednak zabarwienie niebieskie wyraźniejsze w porównaniu z preparatami poprzednimi. Struktury Golgiego koloru ciemnoniebieskiego. Zwróciły naszą uwagę grube otoczki zewnętrzne obejmujące bezbarwne wodniczki wewnętrzne ciałek sferoidalnych. Pojedyncze małe wodniczki na obwodzie komórki przeważnie nie zabarwione, niektóre z nich posiadały ledwie dostrzegalną barwę niebieską, przy czym ich granice zewnętrzne były nieostre.

Wynik barwienia przyżyciowego bardzo dobry.

**Prąd elektr. 150 miliamper. 1 sek.
Po 30 min. błękit metyl. 10 min.**

Po 30 minutach od chwili jednorazowego podrażnienia przez 1 sekundę prądem elektrycznym o natężeniu 150 miliamperów wstrzyk-

nięto ślimakom Nr 111—115 roztwór 1:100000 błękitu metylenowego. Komórki odosobniono po 10 minutowym barwieniu przyżyciowym.

O b r a z c y t o l o g i c z n y: Cytoplazma, jądra i jąderka nie zabarwione. Nie widzieliśmy podbarwienia strefy czynnościowej. Ziarenka Golgiego i ciała sferoidalne Thomasa ciemno niebieskie, wyraźnie zarysowały się. Osłonki zewnętrzne (externum) grube, brak w nich struktury ziarnistej. W częściach obwodowych komórki obserwowaliśmy drobne wodniczki różnej wielkości o niewyraźnych obrysach zewnętrznych.

Wynik barwienia przyżyciowego bardzo dobry.

Prąd elektr. 150 miliamper. 1 sek.

Po 60 min. błękit metyl. 10 min.

Podrażnione przez 1 sekundę prądem elektrycznym o natężeniu 150 miliamperów ślimaki Nr 116—120, i następnie po przerwie 60 minutowej wstrzyknięto im po $\frac{1}{2}$ ccm roztworu błękitu metylenowego. Barwienie przyżyciowe trwało 10 minut.

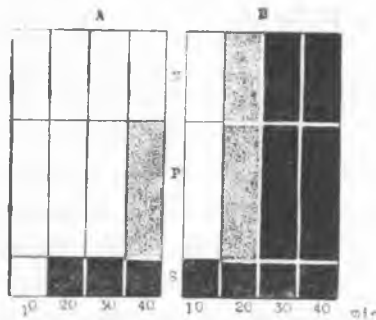
O b r a z c y t o l o g i c z n y: Cytoplazma, jądra i jąderka we wszystkich oglądanych komórkach nie zabarwione. Ziarenka i otoczki zewnętrzne zaś w jednych neuronach zabarwione dość dobrze, natomiast w większej liczbie innych prawie niezabarwione. Komórki nerwowe oglądane w ciemnym polu nie okazują odchyień od obrazów zwykle spostrzeganych przez nas w żywych neuronach w poprzednich obserwacjach. Ruch elementów ziarnistych zwolniony, raczej widoczne drgania miejscowe. W częściach obwodowych komórki zwracają uwagę drobne, nieruchome wodniczki.

Wynik barwienia przyżyciowego przeważnie ujemny.

IV.

W czwartej grupie doświadczalnej umieściliśmy ślimaki Nr 121—140, którym wstrzyknięto podskórnie po $\frac{1}{2}$ ccm roztworu błękitu metylenowego 1:100000, a następnie po upływie 10, 20, 30 i 40 minut od chwili zastrzyku drażniono je przez 1 sekundę prądem elektrycznym o natężeniu 150 miliamperów. Komórki nerwowe odosobniono i oglądano natychmiast po podrażnieniu.

Tabl. IV.



Błękit metylenowy 10 minut
Prąd elektr. 150 miliamper. 1 sek.

Po 10 minutach od chwili zastrzyku $\frac{1}{2}$ ccm barwnika drażniono ślimaki Nr 121—125 przez 1 sekundę prądem elektrycznym o natężeniu 150 miliamperów. Komórki nerwowe odosobniono natychmiast po podrażnieniu.

O b r a z c y t o l o g i c z n y: Cytoplazma, jądra i jąderka nie zabarwione. Ziarenka i struktury układu Golgiego podbarwione na kolor niebieski. Ziarenka okazywały większe powinowactwo do barwnika aniżeli osłonki ciałek kompleksowych, stąd też i różnice w zabarwieniu, które niejednokrotnie były bardzo wyraźne. Ruch elementów cytoplazmatycznych zwolniony, ziarenka drgały w miejscu, wodniczki natomiast były nieruchome.

Wynik barwienia przyżyciowego mimo krótkiego czasu działania barwnika — dobry.

Błękit metylenowy 20 minut
Prąd elektr. 150 miliamper. 1 sek.

Slimaki Nr 126—130 dopiero w 20 minucie barwienia przyżyciowego błękitem metylenowym podrażniono przez 1 sekundę prądem elektrycznym o natężeniu 150 miliamperów. Komórki odosobniono natychmiast po podrażnieniu.

O b r a z c y t o l o g i c z n y: Cytoplazma, jądra i jąderka zabarwione jednostajnie na kolor jasno niebieski, przy czym w strefie przyjądrowej odcień zabarwienia wybitniejszy. Elementy Golgiego i neurowydzielnicze łatwe do różnicowania. Ziarenka neurowydzielnicze tuż przy jądrze i w stożku aksonowym były mniejsze od ziarenek Golgiego, które nawet związując więcej barwika miały kolor ciemno niebieski. Wodniczki wewnętrzne ciałek kompleksowych Thomasa otoczone różnej grubości osłonką zewnętrzną również koloru ciemno niebieskiego. Wodniczki neurowydzielnicze bezbarwne, ostrą linią obwodu odcinały się od otoczenia. Ruch elementów cytoplazmatycznych powolny.

Wynik barwienia przyżyciowego bardzo dobry.

Błękit metylenowy 30 minut

Prąd elektr. 150 miliamper. 1 sek.

Po 30 minutach od chwili wstrzyknięcia barwnika ślimakom Nr 131—135 podrażniono je prądem elektrycznym o natężeniu 150 miliamperów przez 1 sekundę. Komórki odosobniono natychmiast po podrażnieniu.

O b r a z c y t o l o g i c z n y: Cytoplazma, jądra, jąderka i struktury układu Golgiego zabarwione na kolor niebieski. Nieco jaśniejsze w kolorze pozostały wodniczki ciałek Thomasa i neurowydzielnicze, które nawet mogą być całkowicie nie zabarwione. Ruch ziarenek cytoplazmatycznych powolny.

Wynik barwienia komórek dobry, struktur Golgiego — ujemny.

Błękit metylenowy 40 minut

Prąd elektr. 150 miliamper. 1 sek.

Ślimaki Nr 136—140 w 40 minucie po wstrzyknięciu barwnika były podrażnione przez 1 sekundę prądem elektrycznym o natężeniu 150 miliamperów. Komórki odosobniono natychmiast po podrażnieniu.

O b r a z c y t o l o g i c z n y: duże podobieństwo w zabarwieniu komórek do preparatów poprzednich.

Wynik barwienia komórek dobry, struktur Golgiego — ujemny.

Omówienie wyników badań

Cytofizjologiczne badania nad okresem starzenia się i śmierci komórki, a przede wszystkim nad zmianami zachodzącymi w cytoplazmie i jądrze przed śmiercią wprowadziły pojęcie parabiozy (W w e d e n s k y j) paranekrozy (N a s s o n o w, A l e k s a n d r o w), okresu starzenia się komórki (S e y d e r h e l m) i wreszcie katabiozy (D e R o b e r t i s, N o w i ń s k i). Wszystkie te pojęcia bez względu na nazwę wyrażają zatem stan fizjologiczny komórki, który jest wstępem do zatrzymania wszelkich procesów fizycznych i chemicznych, oraz do spadku napięcia dynamicznego cytoplazmy i jądra.

Okres przejściowy komórki obserwowany przez licznych badaczy charakteryzował się nagromadzeniem w protoplazmie drobnitkich ziarenek brunatnego barwnika, wodniczkwatością protoplazmy, zmianą lepkości, a także zmianami stanu koloidalnego i stężenia jonów wodorowych protoplazmy. Wreszcie okres ten, jak podaje W w e d e n s k y j, odznacza się również zmianami powinowactwa do barwników łącznie z podwyższeniem zdolności chłonnych i zakwaszeniem protoplazmy.

C h a m b e r s, L e v i, M e y e r, P e t e r f i, K e d r o w s k y, M a k a r o w, N a s s o n o w, A l e k s a n d r o w, S m i t t e n, K a m n e w, R o m a n o w, U s z a k o w i inni poddawali cytofizjologicznym obserwacjom żywe odosobnione komórki nerwowe i włókna nerwowe stosując odpowiednie metody badania, które pozwoliły wykazać zmiany występujące w neuroplazmie podczas drażnienia różnymi czynnikami. I tak np. N a s s o n o w, S m i t t e n i inni zauważyli, że mechaniczne, elektryczne lub termiczne drażnienie neuronów i włókien nerwowych powodowało zmianę powinowactwa tych elementów do barwnika. Zwiększenie barwnikochłonności komórki obserwowali oni przy podrażnieniach słabych, natomiast zmniejszenie lub nawet całkowity zanik barwnikochłonności przy podrażnieniach silniejszych. S m i t t e n oprócz tego dodaje, że widoczność jąder i jąderek zależy od stopnia uszkodzenia komórki podczas odosobniania. W świeżych bowiem, ostrożnie odosobnionych komórkach jądra i jąderka były niewidoczne, a uszkodzone komórki charakteryzowało się przede wszystkim zabarwieniem jednego i drugiego. Stopień zaś uszkodzenia komórki był wyrażony wskaźnikiem nagromadzenia barwnika uzyskanym metodą kolorymetryczną.

Podobnie R u z i c k a i S e y d e r h e l m uważali, że stopień zabarwienia komórki uzależniony jest od stanu fizjologicznego proto-

plazmy i jądra. Komórki nieżywe bowiem barwiły się natychmiast, a komórki uszkodzone barwiły się mniej lub więcej szybko w zależności od stopnia uszkodzenia. Zabarwione jądro było zawsze dowodem śmierci komórki.

W naszych doświadczeniach mieliśmy możliwość zauważyć, że ilość związanego barwnika zależy także od stężenia roztworu barwnika, od czasu działania barwnika i od okresu życia komórki. Roztwór błękitu metylenowego 1:100000, jeśli przyżyciowo działał na komórki przez 5—10 minut, nie zabarwiał cytoplazmy, jądra i jąderka, barwiąc zaś przez 15—30 minut wykazywał tylko struktury cytoplazmatyczne, a po 40—60 minutach widziało się już stopniowe, przepojeniowe zabarwienie się cytoplazmy i jądra. W komórkach nerwowych odosobnionych i oglądanych w świetle przepuszczonym względnie w ciemnym polu znajdowały się drobne ziarenka i wodniczki rozsypane po całej cytoplazmie. Największe nagromadzenie tych struktur obserwowaliśmy zwykle w strefie przyjądrowej i w stożku aksonowym. Błękit metylenowy barwił jedno z ziarenek na kolor niebieski, inne zaś na kolor jasno niebieski. Wodniczki natomiast pozostawały niezabarwione, były jednak objęte wybitnie barwnikochłonną otoczką zewnętrzną, która miała wygląd otoczki ciągłej odcinkowej albo ziarnistej. Wodniczka wspólnie z otoczką zewnętrzną przypominała zespół sferoidalny Golgi—Thomasa, obserwowane więc różnice morfologiczne mogły być prawdopodobnie uzależnione od stanu czynnościowego komórki. Nie można jednak było zaobserwować przemian jakie powinny odbywać się czy to w ziarenkach, czy w systemach Golgiego, przedłużanie bowiem czasu barwienia błękitem, albo przedłużanie czasu obserwacji komórek w płynie fizjologicznym prowadziło do przepojeniowego zabarwienia całej cytoplazmy i jądra, a wówczas struktury cytoplazmatyczne stawały się mało widoczne albo całkowicie niedostrzegalne. W ten sposób uzyskaliśmy niejako tabelaryczne ujęcie współzależności stopnia nasycenia barwnikiem struktur cytoplazmatycznych i cytoplazmy od czasu działania barwnika (Tablica I).

Wiedząc, że działanie barwnika przez 5 i 10 minut nie zabarwiała cytoplazmy, jądra i struktur cytoplazmatycznych, postanowiliśmy na-przód podrażnić komórki prądem elektrycznym o różnych natężeniach a następnie barwić je przyżyciowo błękitem metylenowym tylko przez 10 minut.

W wyniku tych doświadczeń okazało się, że drażnienie prądem o natężeniach 50, 100 lub 150 miliamperów skróciło czas potrzebny

do zabarwienia struktur cytoplazmatycznych i cytoplazmy, a równocześnie wpłynęło na zmianę powinowactwa cytoplazmy i jej struktur do barwnika.

Drażnienie prądem elektrycznym stałym o natężeniach 50, 100 i 150 miliamperów przez 1 sekundę i następowe barwienie przyżyciowe komórek zwojowych przez 10 minut było wystarczające by wykazać strukturę Golgiego w niezabarwionej cytoplazmie, przy czym uzyskany wynik równał się wynikom po zabarwieniu błękitem metylenowym przez 20—30 minut bez drażnienia. Drażnienie prądem elektrycznym o natężeniu 50, 100 i 150 miliamperów przez 30 sekund i następowe barwienie przez 10 minut wyrażało się lekkim zabarwieniem cytoplazmy wzrastającym w miarę wzrostu natężenia prądu, przy czym struktury Golgiego były zawsze dobrze widoczne. Drażnienie natomiast prądem elektrycznym o natężeniu 50 i 100 miliamperów przez 2 minuty i następowe barwienie błękitem metylenowym przez 10 minut powodowało przepojeniowe zabarwienie cytoplazmy i jądra, zaś drażnienie prądem 150 miliamperowym w tym samym czasie zmniejszyło powinowactwo cytoplazmy i jej struktur do barwnika i te pozostawały po największej części nie zabarwione. Podobnie ujemny wynik barwienia uzyskaliśmy po podrażnieniu komórek przez 5 minut prądem elektrycznym o natężeniu 100 i 150 miliamperów (Tablica II).

Najlepsze zabarwienie struktur cytoplazmatycznych mogliśmy więc obserwować po podrażnieniu zwojów mózgowych przez 1 sekundę prądem elektrycznym stałym o natężeniu 150 miliamperów i następowym zabarwieniu przyżyciowym roztworem błękitu metylenowego przez 10 minut. Wynik ten upoważnił nas do robienia dalszych doświadczeń, których celem miała być odpowiedź na pytanie: jak długo zatrzymują komórki zdolność optymalnego barwienia struktur cytoplazmatycznych po podrażnieniu prądem elektrycznym.

Drażnienie zwojów mózgowych prądem o natężeniu 150 miliamperów trwało 1 sekundę, a wstrzyknięcie barwnika dokonaliśmy po 5, 15, 30 i 60 minutach od chwili podrażnienia. Czas przyżyciowego barwienia wynosił 10 minut (Tablica III). W ten sposób można było dojść do bardzo ciekawych wyników, które wskazywały, że „pamięć“ komórek nerwowych trwa przez 30 minut, zdolność bowiem optymalnego barwienia struktur była zadowalająca po 5, 15 i 30 minutach. Po 60 minutach natomiast widziało się już tylko w niewielkiej liczbie komórek zabarwione dość dobrze ziarenka i otoczki zewnętrzne systemów Golgiego, przeważnie jednak struktury te, podobnie jak i cytoplazma oraz

jądro, były nie zabarwione. Otrzymany obraz po 60 minutach przypominał więc komórki barwione błękitem metylenowym przez 10 minut bez drażnienia prądem, czyli że w 60 minucie od chwili podrażnienia komórka wyrównywała swoją barwnikochłonność, a tym samym nastąpiła w niej prawdopodobnie odnowa fizjologicznych przemian cytoplazmy.

Dalszym dowodem wpływu drażnienia prądem elektrycznym o natężeniu 150 miliamperów na barwnikochłonność protoplazmy, jądra i struktur Golgiego komórek nerwowych były obserwacje czwartej grupy doświadczalnej. Otóż okazało się, że zadziaływanie prądem elektrycznym na zwoje mózgowe w chwili gdy one barwiły się przyżyciowo błękitem metylenowym powodowało zwiększenie powinowactwa do barwnika, a tym samym szybsze zabarwienie struktur Golgiego, cytoplazmy i jądra. Podrażnienie prądem w 10 minucie barwienia dało wynik uzyskiwany zwykle w 20—30 minucie barwienia bez drażnienia. Podrażnienie prądem w 20 minucie barwienia przypominało wynik z 40 minuty, a podrażnienie w 30—40 minucie barwienie z 60 minuty barwienia kontrolnego (Tablica IV).

Uzyskiwane obrazy barwne były wyraźne i dawały możliwość dokładnej oceny powinowactwa do błękitu metylenowego, mimo tego metoda kolorymetryczna wydawała się być niezastąpioną dla określenia wartości wskaźnika nagromadzenia barwnika w komórce. Badania kolorymetryczne są prowadzone przez nas na żywym i utrwalonym materiale tkanek zwierzęcych i być może, że pozwolą rzucić pewne światło na zagadnienie przyżyciowego barwienia i na ocenę wartości życiowej protoplazmy, jądra i struktur cytoplazmatycznych. Przeglądając nasze preparaty mieliśmy także możność zauważyć w niektórych neuronach zwiększenie liczby ziarenek i wodniczek neurowydzielniczych, szczególnie po podrażnieniu komórek krótkotrwałym prądem elektrycznym o małym natężeniu. Wskazywać by to miało na przyspieszenie czynności wydzielniczej komórek i na nadprodukcję elementów neurowydzielniczych. Obserwacje porównawcze jednak prowadzone w tym kierunku dawały wyniki po największej części niezadowolające, i jak stwierdza S m i t t e n, albo wątpliwe, albo prawie niemożliwe. Zagadnienie to zatem pozostaje w dalszym ciągu otwarte i wymaga dalszych badań cytofizjologicznych.

Wnioski

Badania doświadczalne przeprowadzone nad żywymi komórkami nerwowymi ślimaków *Limnaea stagnalis* polegały na podrażnieniu zwojów mózgowych krótkotrwałymi elektrycznymi prądami stałymi o natężeniach 50, 100 i 150 miliamperów i następnie na przyżyciowym barwieniu tych zwojów błękitem metylenowym w roztworze 1:100000. Na podstawie przeprowadzonych obserwacji powiedzieć można, że:

- 1) Powinowactwo cytoplazmy, struktur cytoplazmatycznych oraz ziarenek i wodniczek neurowydzielniczych do błękitu metylenowego i stopień nasycenia ich barwnikiem wzrastały w stosunku wprostproporcjonalnym do czasu barwienia (Tablica I).
 - 2) Zwiększenie natężenia prądu elektrycznego z równoczesnym przedłużaniem czasu drażnienia pozostawało początkowo w stosunku wprostproporcjonalnym, a następnie w stosunku odwrotnie proporcjonalnym do stopnia nasycenia barwnikiem struktur cytoplazmatycznych, cytoplazmy i jądra. Drażnienie komórek nerwowych prądem elektrycznym o natężeniu 50, 100 i 150 miliamperów przez 1—30 sekund powodowało wzrost powinowactwa struktur cytoplazmatycznych i cytoplazmy do barwnika. Przedłużenie zaś czasu drażnienia do 2 minut wyrażało się po zadziałaniu prądem 50 i 100 miliamperowym przepojeniowym zabarwieniem cytoplazmy i jądra, a po przedłużeniu czasu drażnienia do 5 minut, i to szczególnie prądem 100 i 150 miliamperowym, całkowitą lub prawie całkowitą niebarwliwością struktur Golgiego łącznie z cytoplazmą i jądrem (Tablica II).
 - 3) Komórki nerwowe podrażnione prądem elektrycznym zachowują zwiększone powinowactwo do błękitu metylenowego przez około 30 minut. Po 60 minutach od chwili podrażnienia powinowactwo do barwnika zmniejszało się, komórka wyrównywała swoją barwnikochłonność, a tym samym następowała w niej prawdopodobnie odnowa fizjologicznych przemian cytoplazmy (Tablica III).
 - 4) W komórkach nerwowych podrażnionych prądem elektrycznym o małym natężeniu można było obserwować zwiększenie ilości ziarenek barwiących się wybiórczo błękitem metylenowym.
-

OBJAŚNIENIA DO TABLIC

Tablica I. Współzależność zabarwienia cytoplazmy, jądra i struktur cytoplazmatycznych komórek nerwowych zwojów mózgowych ślimaka *Limnaea stagnalis* od czasu działania błękitu metylenowego podawanego przyżyciowo w roztworze 1:100000. Objasnienia: N — jądro, P — cytoplazma, S — struktury Golgiego i ziarenka neurowydzielnicze.

Tablica II. Wpływ natężenia prądu elektrycznego i czasu drażnienia na zabarwienie cytoplazmy, jądra i struktur cytoplazmatycznych w komórkach nerwowych zwojów mózgowych ślimaka *Limnaea stagnalis*. Objasnienia: N — jądro, P — cytoplazma, S — struktury Golgiego i ziarenka neurowydzielnicze.

Tablica III: Okres zwiększonego powinowactwa do błękitu metylenowego po podrażnieniu przez 1 sekundę żywych komórek nerwowych zwojów mózgowych ślimaka *Limnaea stagnalis* prądem elektrycznym o natężeniu 150 miliamperów. Objasnienia: N — jądro, P — cytoplazma, S — struktury Golgiego i ziarenka neurowydzielnicze.

Tablica IV: Wpływ drażnienia prądem elektrycznym o natężeniu 150 miliamperów na barwnikochłonność protoplazmy, jądra i struktur cytoplazmatycznych w żywych komórkach nerwowych zwojów mózgowych ślimaka *Limnaea stagnalis*. Objasnienia: A — komórki kontrolne. B — komórki doświadczalne, N — jądro, P — cytoplazma, S — struktury Golgiego i ziarenka neurowydzielnicze.

P I S M I E N N I C T W O

1. Aleksandrow W. — Protoplasma. Vol. 77, str. 162, 1932.
2. Dustin P. — Symp. Soc. Exper. Biol. Nr 1. Cambridge. At the Univers. Press., str. 114, 1947.
3. Kamnew I. — Protoplasma. Vol. 1, str. 169, 1934.
4. Kamnew I. — Sbornik statej pamiaty akad. A. A. Zawarzina. Izdatelstw. Akad. Nauk SSSR. Moskwa, str. 493, 1948.
5. Levi G. — Arch. exper. Zellforsch. Vol. 11, str. 3, 1925.
6. Levi G. — Meyer H. — Anat. Anzeiger. Vol. 83, str. 28, 1937.
7. Nassonow D. — Zeitsch. Zellforsch. mikr. Anat. Vol. 11, str. 179, 1930.
8. Nassonow D. — Aleksandrow W. — Reakcja żywego wieszczestwa na wnesznye wozdejstwa. Izdatelstwo Akad. Nauk SSSR. Moskwa, 1940.
9. Peterfi T. — Williams C. — Arch. f. exper. Zellforsch. Vol. 14, str. 2, 1933.
10. Romanow S. N. — Dokl. Akad. Nauk SSSR. Vol. 61, str. 909, 1948.
11. Ruzicka V. — Pflug. Arch. Vol. 107, 1905.
12. Smitten N. A. — Sbornik statej pamiaty akad. A. A. Zawarzina. Izdatelstwo Akad. Nauk SSSR. str. 452. Moskwa, 1948.
13. Seyderhelm R. — Deutsch. med. Wochenschrift. Vol. 51, str. 180, 1925.
14. Uszakov P. — cyt. wg Romanowa Nr 10

Р Е З Ю М Е

Экспериментальные исследования проведенные над большими нервными клетками улиток *Limnaea stagnalis* состояли в раздражении мозговых ганглиев, кратковременными электрическими токами, постоянными, с напряжением 50, 100, 150 миллиамперов и впоследствии на прижизненном окрашивании этих ганглиев метиленовой синькой в растворе 1 : 100000. На основании проведенных наблюдений можно сказать что:

1. Повиновательство цитоплазмы, цитоплазматических структур, а также зерен и нейровыделительных вакуолей к метиленовой синьке и степень насыщения их краской возрастал в прямопропорциональном соотношении к времени окрашивания. (Табл. 1).
2. Повышение напряжения электрического тока с одновременным продлением времени раздражения оставалось вначале в обратнопропорциональном отношении к степени насыщения краской цитоплазматических структур, цитоплазмы и ядра. Раздражение нервных клеток электрическим током с напряжением 50, 100, 150 миллиамперов от 1—30 секунд, способствовало росту повиновательства цитоплазматических структур и цитоплазмы к краске, а продление времени раздражения до 2 минут выражалось, после воздействия током 50 и 100 миллиамперовым, насыщенной окраской цитоплазмы и ядра, а после продления времени раздражения до 5 минут и то особенно током 100 и 150 миллиамперным, совершенной или почти совершенной неокрашиваемостью Гольджиевых структур вместе с цитоплазмой и ядром. (Табл. 2).
3. Нервные клетки раздраженные электрическим током сохраняют повышенное повиновательство к метиленовой синьке почти до 30 минут. Через 60 минут от времени раздражения повиновательство к краске уменьшалось, клетка выравнивала свою краскохлонность, а тем самым наступало в ней возобновление физиологических изменений в цитоплазме. Табл. 3).
4. В нервных клетках раздраженных электрическим током постояннго напряжения, можно было наблюдать увеличение числа зерен красящихся однородно метиленовой синькой.

ОБЪЯСНЕНИЯ К ТАБЛИЦАМ:

Таблица 1. Созависимость окраски цитоплазмы, ядра и цитоплазматических структур нервных клеток мозговых ганглиев улитки *Limnaea stagnalis* от времени действия метиленовой синьки подаваемой прижизненно в растворе 1 : 100000. Объяснения: N — ядро, P — цитоплазма, S — структура Гольджи и нейровыделительные зерна.

Таблица 2. Влияние напряжения электрического тока и времени раздражения на окраску цитоплазмы, ядра и цитоплазматических структур в нервных клетках мозговых ганглиев улитки *Limnaea stagnalis*. Объяснения: N — ядро, P — цитоплазма, S — структура Гольджи и нейровыделительные зерна.

Таблица 3. Период повышенного повиновательства к метиленовой синьке после раздражения через одну секунду живых нервных клеток, мозговых ганглиев улиток электрическим током при напряжении 150 миллиамперов. Объяснения N — ядро, P — цитоплазма, S — структура Гольджи и нейросекреторные зернышки.

Таблица 4. Влияние раздражения электрическим током при напряжении 150 миллиамперов на красохлонность протоплазмы, ядра и цитоплазматических структур в живых нервных клетках мозговых ганглиев улитки *Limnaea stagnalis*. Объяснения А — контрольные клетки, Б — экспериментальные клетки; N — ядро, P — цитоплазма, S — структура Гольджи и нейросекреторные зернышки.

S U M M A R Y

Experimental investigations were conducted on living nerve cells of snails *Limnaea stagnalis* and were based on the stimulation of the cerebral ganglia by means of a constant electric current of short duration of the following intensities: 50, 100 and 150 miliamperes, and next the ganglia were supravitaly stained with methylene blue in a solution of 1:100000. On the basis of our observations it may be concluded that:

- 1) The affinity of the cytoplasm, cytoplasmatic structures, granules and neurosecretory vacuoles to methylene blue and the degree of saturation with the stain increased in direct proportion to the time of staining. (Table I).
 - 2) The increase of the intensity of the electric current with the simultaneous prolongation of the time of stimulation remained initially directly proportional and next inversely proportional to the degree of saturation with the stain of the cytoplasmatic structures, the cytoplasm and the nucleus. The excitation of nerve cells by means of an electric current of the intensity of 50, 100 and 150 miliamperes per 1—30 seconds caused an increase of the affinity of the cytoplasmatic structures and the cytoplasm to the stain, and the prolongation of the time of stimulation up to 2 minutes resulted after the action of 50 and 100 miliamperes currents in saturated staining of the cytoplasm and nucleus, and after the prolongation of the stimulation time to 5 minutes, and particularly by a current of 100 and 150 miliamperes, caused a total, or almost total lack of staining of the Golgi structures together with the cytoplasm and the nucleus (Table II).
 - 3) Nerve cells stimulated by means of an electric current maintain an increased affinity to methylene blue for about 30 minutes. After 60 minutes from the moment of stimulation the affinity to the stain decreased, the cell balanced its chromatophilia, and thus, most likely, there followed the regeneration of the physiological metabolism of the cytoplasm (Table III).
 - 4) In nerve cells stimulated by an electric current of a low intensity an increase of the number of granules, selectively stained with methylene blue, was observed.
-

EXPLANATION OF THE TABLES

Table I: Dependence of the staining of the cytoplasm, nucleus and cytoplasmatic structures of nerve cells of cerebral ganglia of snails *Limnaea stagnalis* on the time of action of methylene blue administered supravitaly in solution 1:100000. Explanations: N — nucleus, P — cytoplasm, S — Golgi structures and neurosecretory granules.

Table II: The influence of the intensity of the electric current and the duration of stimulation on the staining of the cytoplasm, nucleus and cytoplasmatic structures in nerve cells of cerebral ganglia of the snails *Limnaea stagnalis*. Explanations: N — nucleus, P — cytoplasm, S — Golgi structures and neurosecretory granules.

Table III: The period of prolonged affinity to methylene blue after the stimulation for 1 second of living nerve cells of cerebral ganglia of snails *Limnaea stagnalis* by means of an electric current of the intensity of 150 miliamperes. Explanations: N — nucleus, P — cytoplasm, S — Golgi structures and neurosecretory granules.

Table IV: The influence of stimulation by means of an electric current of the intensity of 150 miliamperes on the chromatophilia of the protoplasm, nucleus and cytoplasmatic structures in living nerve cells of cerebral ganglia of snails *Limnaea stagnalis*. Explanations: A — control cells, B — experimental cells. N — nucleus, P — cytoplasm, S — Golgi structures and neurosecretory granules.