

ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN—POLONIA

VOL. XXIII, 3

SECTIO D

1968

Katedra i Zakład Histologii i Embriologii. Wydział Lekarski. Akademia Medyczna w Lublinie
Kierownik: prof. dr med. Stanisław Grzycki

K r y s t y n a C Z E R N Y

**Badanie komórkowego układu enterochromafinowego w nabłonku jelit
w warunkach doświadczalnych**

Экспериментальные исследования энтерохромафиновой системы в эпителии
кишечника

Investigations of Enterochromaffin Cells of the Intestinal Epithelium
under Experimental Conditions

W r. 1954 Erspamer, jeden z twórców pojęcia komórkowego układu enterochromafinowego, zakwalifikował do niego wszystkie komórki, w których cytoplazmie po utrwaleniu w formalinie można wykazać ziarnistości odznaczające się pewnymi stałymi cechami. Ziarnistości te barwią się przy pomocy reakcji chromafinowej, redukują sole srebra z ich amoniakalnego roztworu, wchodzą w reakcję z barwnikami dwuazowymi i fluoryzują pod wpływem UV (21). Podkreśla się często, że zakres komórkowego układu enterochromafinowego jest ciągle otwarty i nowe odkrycia przyczynić się mogą do jego rozszerzenia (72). Wspólną cechą komórek układu enterochromafinowego jest zawartość w ziarnistościach związku mającego określone cechy i wchodzącego w charakterystyczne reakcje chemiczne. Wiadomo dziś, że związkiem tym jest 5-hydroksytryptamina, zwana inaczej enteroaminą. Została ona po raz pierwszy izolowana w 1937 r. przez Vialliego i Erspamera (74). Budowę chemiczną enteroaminy wyjaśniono na początku lat pięćdziesiątych (24). W 1948 r. ukazała się praca Rapporta i wsp. (61), którzy izolowali z płytek krwi pochodną serotoniny i ustalili, że serotonina jest to 5-hydroksytryptamina (5-HT). W ustroju zwierząt wyższych 5-HT powstaje przede wszystkim w komórkach enterochromafinowych (zwanymi w dalszym ciągu k. e.) przewodu pokarmowego (22). Są to elementy nabłonka, na które po raz pierwszy w r. 1870 zwrócił uwagę Heidenhain (36). Dokładniejszy opis zawdzięczamy Nicolasiowi (53). Wg danych z monografii Barryego (3), w r. 1897 Kultschitskiy opisał występujące w nabłonku przewodu pokarmowego psa komórki barwiące się pod wpływem płynu Ehrlich-Blondi. Na uwagę w historii odkrycia k. e. zasługują też prace Blocha z r. 1903, który doniósł o ich istnieniu u człowieka. W 1906 r. Ciaccio (14) nadał im po raz pierwszy nazwę komórek enterochromafinowych. W 1914 r. Masson (50) stwierdził, że ziarnistości Nicolasa redukują sole srebra i tak powstały nazwy „komórki redukujące” „komórki argentafinowe”.

„komórki chromoargentafinowe”. W dyskusji na temat rozwoju k. e. spotykamy różne poglądy. Według Massona powstają one przez podział entodermalnych komórek nabłonka jelit. Danish (17) uważa, że powstają w zwojach sympatycznych i stąd migrują do nabłonka przewodu pokarmowego. Kull (43) wiązał pochodzenie k. e. z mezenchymatyczną tkanką łączną. Dawne poglądy, identyfikujące zawartą w ziarnistościach substancję z adrenaliną, zostały poddane krytyce przez Vialliego (70, 71). Następnie Erspamer i wsp. (23, 25) wykazali, że enteramina jest tym samym związkiem chemicznym, występującym w komórkach wielu układów i tak powstało pojęcie komórkowego układu enterochromafinowego.

5-HT jest obok catecholamin zaliczana do amin biogennych. Zmiany w ich metabolizmie mają wpływ na wiele procesów, a mechanizm działania jest dotychczas często niewyjaśniony (m. in. 31, 45, 62). W centralnym układzie nerwowym dużo 5-HT spotyka się zwłaszcza w okolicach podwzgórza (67, 76), gdzie leżą m. in. ośrodki termoregulacyjne. Podanie w iniekcji 5-HT lub jej biologicznego prekursora — 5-hydroktryptofanu (5-HTP) powoduje zmiany w temperaturze ciała zwierząt (27, 47, 42, 38, 39, 34, 63, 44, 18). Również substancje takie, jak rezerpina czy inhibitory MAO zmieniają temperaturę ustroju (56, 57). Na zjawiska przypisywane działaniu 5-HT mają wpływ leki obniżające temperaturę ciała, m. in. chlorpromazyna (4, 50). Wg Uuspää zawartość 5-HT w mózgu jeża wzrasta w okresie hibernacji (69). Czynność nadnerczy (29) oraz tarczycy (78), zaangażowanych w regulacji temperatury, związana jest z metabolizmem 5-HT. Te wszystkie zjawiska nasuwają myśl o udziale serotoniny w gospodarce termicznej (20, 28, 36). Z drugiej strony wielokrotnie podkreślana (22, 30, 73) rola k. e. przewodu pokarmowego w produkcji i magazynowaniu 5-HT każe się spodziewać udziału tych komórek w termoregulacyjnych procesach. Powyższe fakty skłoniły do badania k. e. w ustroju znajdującym się w stanie sztucznej hibernacji. Skutki skojarzonego działania środków farmakologicznych, mających wpływ na metabolizm 5-HT i zimna wydały się interesującym, godnym opracowania zagadnieniem.

MATERIAŁ I METODY BADAŃ

Do doświadczeń wybrano świnki morskie, w których jelitach znajduje się obfita ilość k. e. (37). Wyodrębniono 3 grupy: A. Zwierzęta kontrolne (16 świnek morskich). B. Zwierzęta, którym podawano środki farmakologiczne (24 świnki). C. Po podaniu środków farmakologicznych, temperaturę ciała obniżano do około 21°C (24 świnki). Część zwierząt tej grupy (podział na serie) budzono następnie w temperaturze 37°C.

Zwierzętom grup B i C wstrzykiwano jednorazowo w godzinach porannych dootrzewnowo 0,5 mg largactilu, 1 mg feneganu i 5 mg dolantyny na 100 g wagi ciała. Po 10 min. podawano 0,075 g/100 g uretanu. Grupę B pozostawiono w temperaturze pokojowej, grupę C umieszczano w temp. 4°C i po 1 godz. temperatura ich ciała obniżała się do ok. 21°C. Tę temperaturę ciała utrzymywano przez 4 godz. Część zwierząt (patrz podział na serie) dekapitowano po 2 godz. od chwili obniżenia temperatury do 21°C. Inne dekapitowano po 4 godz., pozostałe budzono umieszczając w temperaturze 37°C. Po obudzeniu zwierzęta przebywały w temperaturze pokojowej. Materiał do badań pobierano w różnym czasie doświadczenia, w 8 seriach, z których każda zawierała 2 zwierzęta grupy A, 3 z grupy B i 3 z grupy C. Serie ustalono w następujący sposób: Seria I. Materiał pobrany po 2 godz. trwającym obniżeniu temperatury ciała do 21°C u zwierząt C. Seria II. Po 4-godzinym obniżeniu temperatury ciała do 21°C zwierząt grupy C. Seria III.

Tuż po obudzeniu zwierząt grupy C. Seria IV. Po 24 godz., seria VI po 48 godz., seria VII po 3 dobach, seria VIII po 7 dobach od chwili początku doświadczeń.

Temperaturę ciała mierzono w prostnicy, przed iniekcją środków farmakologicznych, następnie co 20—30 min. przez 12 godz. oraz tuż przed pobraniem materiału. Do badań użyto część dwunastnicy pomiędzy odźwiernikiem a ujściem przewodu żółciowego. Wykonano klasyczne reakcje dla prześledzenia zmian ilości wykrywanych k. e. oraz reakcje histochemiczne wybrane jako markery struktur cytoplazmatycznych. Zastosowano następujące metody:

1. Reakcja protargolowa argentofilowa wg B o d i a n a (v. 73).
2. Reakcja argentafinowa wg M a s s o n H a m p e r l (v. 73).
3. Reakcja dwuazowa — barwienie przy pomocy Fast Red B (v. 16).
4. Reakcja na aktywność fosfatazy zasadowej wg B u r s t o n a (v. 59).
5. Reakcja na aktywność fosfatazy zasadowej wg G o m o r i e g o (v. 59).
6. Reakcja na aktywność fosfatazy kwaśnej — metoda dwuazowa (48).
7. Reakcja na aktywność fosfatazy kwaśnej wg G o m o r i e g o (v. 6).
8. Reakcja na aktywność esteraz niespecyficznych — metoda dwuazowa (34).
9. Reakcja na aktywność esteraz niespecyficznych — metoda dwuazowa z zastosowaniem ezeryny dla inaktywacji esterazy cholinowej (v. 59).
10. Reakcja na aktywność esteraz niespecyficznych, przy użyciu octanu 5-bromindoksyli (v. 59).
11. Reakcja na E-600 odporne esterazy (v. 59).
12. Reakcje na aktywność ATP-azy, AMP-azy i fosfataz niespecyficznych aktywnych w pH 7,2 (v. 59) wg W a c h s t e i n M e i s e l.
13. Reakcja na aktywność ATP-azy mitochondrialnej. Metoda wg P a d y c u l a H e r m a n (v. 59).
14. Reakcja na aktywność TPP-azy wg N o v i k o f f G o l d f i s c h e r (54).
15. Reakcja na aktywność dehydrogenazy zredukowanego NAD (v. 59).
16. Reakcja na aktywność dehydrogenazy bursztynianowej (N a c h l a s, v. 59).
17. Reakcja na aktywność glukozy-6-fosfatazy (W a c h s t e i n M e i s e l v. 59).
18. Reakcja na aktywność oksydazy monoaminowej (G l e n n e r v. 59).
19. Reakcja na mukopolisacharydy obojętne wg metody PAS-diałaza (v. 59).
20. Reakcja na mukopolisacharydy kwaśne — barwienie błękitem alcjanowym (v. 8).
21. Reakcja na glikogen wg metody PAS-dimedon (v. 8).
22. Reakcja na DNA wg F e u l g e n a (v. 59).
23. Reakcja na DNA i RNA wg B r a c h e t a (v. 59).
24. Reakcje na tłuszcze — barwienie przy pomocy czerwieni tłuszczowej oraz czerwieni oleistej 0 (v. 77).

Wykonano też preparaty zabarwione hematoksyliną i eozyną.

Wszędzie, gdzie materiał utrwalano w mieszaninach zawierających formol i nie stosowano soli dwuazowych, podbarwiano ziarnistości w k. e. przy pomocy Fast Red B.

Po reakcji wg M a s s o n H a m p e r l u 10 zwierząt kontrolnych i wszystkich doświadczalnych, na 3 seryjnych poprzecznych skrawkach dwunastnicy liczono wykazane k. e. Uzyskane dane poddano analizie statystycznej. Na podstawie wyników grupy kontrolnej oszacowano:

1. Średnią populacji wg wzoru $\bar{x} \pm tm$, gdzie \bar{x} oznacza średnią arytmetyczną w badanej grupie kontrolnej, t = wartość funkcji testowej t Studenta (dla $P = 0,05$), zaś m = błąd średniej arytmetycznej.

2. Normę, to jest zasięg wartości u 95% zwierząt w populacji kontrolnej obliczoną wg wzoru $x \pm t\delta$, gdzie δ oznacza odchylenie standardowe.

Istotność różnic średniej liczby k. e. między osobnikami i między grupami B i C w obrębie każdej z 8 serii sprawdzono za pomocą dwuczynnikowej analizy wariancji dla klasyfikacji hierarchicznej (55). Systematyczność zmian liczby k. e. w okresie 8 serii sprawdzono za pomocą testu v. Neumanna (51, 79). Po stwierdzeniu zmian w ilości wykrywanych k. e., przeprowadzono badania biochemiczne. Wybrano te okresy, w których zmiany były najbardziej istotne. Oznaczono więc zawartość 5-HT w tkankach dwunastnicy zwierząt kontrolnych, przygotowanych wg warunków serii II i serii V. Zawartość 5-HT oznaczano wg Bogdańskiego i wsp. (9), posługując się spektrofluorymetrem firmy Farran. Stosowano długość fali światła pobudzającego 295 milimikr., intensywność fluorescencji mierzono przy długości fali 560 milimikr. Wyniki obliczano wg każdorazowo sporządzonego wykresu kalibracyjnego: przeprowadzono całą procedurę oznaczania z próbkami wzorca zawierającymi 5, 10, 15 mikrog. kreatyninosiarczanu 5-HT. Wyniki przeliczano na wolną 5-HT.

BADANIA WŁASNE

Seria I

Grupa A.

Temperatura ciała wynosiła stale 37,5—38,5°C. Preparaty przegładowe oraz zabarwione samym Fast Red B wykazały obecność w nabłonku komórek zawierających ziarnistości diazopozytywne. Komórki te mają w kryptach kształt najczęściej trójkątny, na kosmkach wrzecionowaty i beczkowaty. Wierzchołek komórki dosięga powierzchni zewnętrznej nabłonka, często tworzy się tu lekkie wgłębienie. Jądro w komórkach trójkątnych leży bliżej podstawy, we wrzecionowatych i beczkowatych — w najszerszym miejscu komórki. W kryptach zdarzają się k. e. dwujędrzaste. Zrąb chromatynowy jąder jest dość rzadki, widoczne są zwykle 2—3 większe grudki przy błonie jądrowej. Ziarnistości diazopozytywne występują dookoła jądra, czasami wypełniają całą cytoplazmę. W wielu k. e. ponad jądrem widoczne są pęcherzykowate przestrzenie nie zawierające ziarnistości. Cytoplazma k. e. na preparatach nie podbarwionych Fast Red B jest silnie eozynochłonna. Po wykonaniu reakcji wg Bodiana stwierdzono, że ziarnistości znajdują się często w zewnętrznej wypustce komórki i przy samej powierzchni nabłonka tworzy się większa grudka, rozszerzająca wypustkę. Reakcja wg Masson Hamperla uwidoczniała ziarna redukujące sole srebra. Obliczenia k. e. wykazały u 1 zwierzęcia 932, 900 i 820 a u 2 — 1001, 914 i 984 komórek na przekrojach dwunastnicy. Reakcja na fosfatazę zasadową lokalizuje się w błonie komórkowej i jest dość żywa. Na szczycie k. e. nie spotykano rąbka szczoteczkiowego. Znaczna aktywność fosfatazy zasadowej występuje w śródbłonku naczyń w pobliżu podstawy k. e. Reakcja na fosfatazę kwaśną wykazała obecność ziaren i pęcherzyków ponad jądrami komór-

kowymi. Pęcherzyki były obecne w k. e. ubogich w ziarnistości specyficzne. Między ziarnistościami specyficznymi wykryto dyfuzyjny odczyn na esterazy niespecyficzne. Po inaktywacji esterazy cholinowej intensywność odczynu zmniejszyła się nieco. Reakcja na esterazy odporne na E-600 była umiejscowiona najczęściej ponad jądrem komórkowym. Dodatkowo odczyny na ATP-azę, AMP-azę i esterazy niespecyficzne aktywne w pH 7,2 spotykano w błonie komórkowej i jądrowej. Można mówić o odwrotnej proporcjonalności w intensywności odczynów: tam, gdzie silniejszą reakcję spotyka się u podstawy k. e., słabiej rysują się szczyty, zarówno w wypadku odczynów na ATP-azę jak i AMP-azę. Ziarnisty odczyn na ATP-azę aktywną w pH 9,4 zlokalizowany był wokół jądra. Reakcja na dehydrogenazę zredukowanego NAD wykazuje obecność ziarnistych i pałeczkowatych mitochondrii przede wszystkim u podstawy komórki. Podobne wyniki uzyskano wykonując reakcję na dehydrogenazę bursztynianową. Reakcja na TPP-azę pozwoliła na wykrycie w ponadjądrowych okolicach k. e. zespołu Golgiego, bardziej rozwiniętego w k. e. z mniejszą ilością ziaren specyficznych. Po wykonaniu reakcji na glukozo-6-fosfatazę obserwowano silnie rozwiniętą sieć włóknisto-ziarnistą w cytoplazmie. Odczyn na oksydazę monoaminową występował w postaci drobnoziarnistej przede wszystkim pod i ponad jądrem komórkowym. Barwiąc metodą PAS wykryto pomiędzy ziarnistościami specyficznymi mukopolisacharydy obojętne, odporne na działanie diastazy. Zlokalizowane były one przede wszystkim ponad jądrem k. e. Po działaniu dimedonu odczyn PAS był tu ujemny. Błękitem alcjanowym wykazano w k. e. mukopolisacharydy kwaśne. Dodatni odczyn występował między ziarnistościami specyficznymi i w okolicy jądra k. e. Metylacja usuwała tylko odczyn między ziarnistościami. Na preparatach barwionych wg metody Feulgen a zrąb jąder k. e. jest dość rzadki, 1—2 grudki większe leżą zwykle wewnątrz jądra a 3—4 przy błonie. Po wykonaniu reakcji Bracheta stwierdzono, że wewnątrz jądra znajdują się 1—2 duże jąderka. Cytoplazma wykazuje dużą pyroninochłonność, zwłaszcza w częściach przypodstawnych. W k. e. nie wykryto obecności tłuszczów.

Grupa B

Pomiary temperatury ciała wykazały średnio: po 15 min. od podania środków farmakologicznych 35°C, po 30, 45 i 60 min. oraz po 3 godz. 21°C. K. e. na preparatach przeglądowych nie różniły się wyglądem od spotykanych w warunkach kontrolnych. Na przekrojach poprzecznych dwunastnicy u 3 zwierząt znaleziono: 1005, 985, 998; 831, 916, 889 oraz 1017, 925, 953 k. e. Obserwując odczyny histochemiczne zauważono zmiany w porównaniu z obrazami kontrolnymi. Osłabieniu uległa aktywność fosfatazy zasadowej na błonie k. e. oraz w śródbłonkach naczyń

przebiegających w pobliżu podstawy tych komórek. Aktywność ATP-azy była zmniejszona zwłaszcza na szczytach k. e. (ryc. 7). W cytoplazmie obniżyła się aktywność ATP-azy mitochondrialnej oraz enzymów oddechowych (ryc. 12).

Grupa C

Pomiary temperatury ciała wykazały po 15 min. od chwili podania leków 35°C, po 30 min. 28°C, po 45 min. 26°C, po 60 i 3 godzinach 21°C. W k. e. wokół jąder obserwować można jasną, bezziaarnistą przestrzeń — „halo” różnej szerokości (ryc. 1). Spotyka się więcej niż zazwyczaj komórek dwujądrowych. Na preparatach barwionych wg Masson Hamperl znaleziono u 3 badanych zwierząt 1098, 1080, 1111; 1072, 1135, 1129; 1015, 1038, 1102 k. e. odczyny histochemiczne wykazały osłabienie aktywności fosfatazy zasadowej, ATP-azy i AMP-azy, przy czym odczyn na AMP-azę był szczególnie słaby na szczytach k. e. Aktywność fosfatazy kwaśnej uległa również zmniejszeniu (ryc. 5). Zmniejszyła się też aktywność ATP-azy mitochondrialnej, dehydrogenazy zredukowanego NAD i dehydrogenazy bursztynianowej. Zauważono w wielu k. e. znaczny spadek aktywności glukozy-6-fosfatazy w cytoplazmie (ryc. 14) oraz oksydazy monoaminowej. W pozostałych odczynach histochemicznych nie zauważono różnic w porównaniu z obrazami kontrolnymi.

Seria II

Grupa A.

Temperatura ciała i odczyny histochemiczne nie różniły się od opisanych w grupie A serii I. Po wykonaniu reakcji wg Masson Hamperl znaleziono na przekrojach dwunastnicy u 2 badanych zwierząt: 945, 905, 894 oraz 1012, 954, 978 k. e.

Grupa B

W ciągu pierwszych 3 godzin temperatura ciała zwierząt kształtowała się podobnie jak w serii I grupie B. Po dalszych 30 min., wynosiła średnio 32°C. To samo wykazały pomiary następne aż do 5 godz. od chwili podania środków farmakologicznych, kiedy to temperatura podniosła się do 33°C. Na preparatach przeglądowych nie stwierdzono zmian w porównaniu z grupą A. Po wykonaniu reakcji wg Masson Hamperl znaleziono u 3 badanych zwierząt: 1120, 1145, 1090; 1103, 1065, 1138 oraz 1085, 1010, 1051 k. e. Ziarna specyficzne były w nich duże, bryłowe. Na błonie komórkowej spotykano często słaby odczyn na fosfatazę zasadową i ATP-azę. W cytoplazmie zmniejszyła się aktywność na fosfatazę

kwaśną esterazy niespecyficzne. Reakcja na TPP-azę uległa osłabieniu (ryc. 9). Także aktywność ATP-azy mitochondrialnej oraz enzymów oddechowych była niska. Obserwowano zmniejszenie intensywności odczynów na glukozo-6-fosfatazę i oksydazę monoaminową. W wielu k. e. wzrosła intensywność odczynu PAS. Mniej niż w warunkach kontrolnych spotykano natomiast mukopolisacharydów kwaśnych.

Grupa C.

Temperatura ciała zwierząt wynosiła przeciętnie 20—21°C. W kryptach znajdowano liczne zespoły składające się z paru k. e., które często przylegały do siebie (ryc. 2). Na obwodzie niektórych komórek występowała homogenna, bezziańska przestrzeń. W innych podobne zjawisko obserwowano dookoła jądra komórkowego. Często spotykano komórki dwujądrowe (ryc. 18). Po zabarwieniu wg *Bodiana* obserwowano znaczne wypełnienie ziarnistości szczytów komórek (ryc. 3). Liczenie k. e. na przekrojach poprzecznych dwunastnicy u 3 badanych zwierząt dało wyniki następujące: 1218, 1290, 1254; 1207, 1183, 1196 oraz 1270, 1254, 1182. Odczyny histochemiczne wykazały różnice w porównaniu z grupą A. Zmniejszyła się aktywność fosfatazy zasadowej, ATP-azy i AMP-azy. Dotyczyło to komórek wypełnionych grubymi ziarnami. Lizosomy przeważnie były drobne, nieliczne. W cytoplazmie k. e. odczyny na esterazy niespecyficzne oraz po inaktywacji cholinoesterazy zmniejszyły swą intensywność zwłaszcza tam, gdzie było dużo ziarnistości specyficznych. Osłabieniu uległa aktywność ATP-azy mitochondrialnej oraz enzymów oddechowych. System Golgiego był pyławy, często niewidoczny. W wielu k. e. aktywność oksydazy monoaminowej oraz glukozo-6-fosfatazy była niewielka. Obserwowano znaczną akumulację substancji PAS dodatnich (ryc. 15) oraz w wielu k. e. drobne ziarenka glikogenu (ryc. 16). Natomiast odczyn na mukopolisacharydy kwaśne był często zmniejszony. Po zabarwieniu wg *Bracheta* zauważono zwiększenie pyroninochłonności cytoplazmy k. e. (ryc. 18).

Seria III

Grupa A.

Temperatura ciała zwierząt i obrazy odczynów histochemicznych nie różniły się od grupy A poprzednich serii. U 2 badanych zwierząt po zabarwieniu wg *Masson Hamperl* znaleziono na przekrojach dwunastnicy 895, 913, 937; 785, 768, 724 k. e.

Grupa B

Po 5 godz. od chwili iniekcji temperatura ciała wynosiła 33°C, po 6 godz. 34°C, a po 8 godz. 37,5°. Liczenie k. e. na przekrojach dwunastnicy 3 badanych zwierząt przyniosło następujące wyniki: 1080, 1012, 1119; 1102, 1082, 1125; 1015, 1000, 1068. Błona komórkowa wykazywała niską aktywność fosfatazy zasadowej, ATP-azy i AMP-azy. W cytoplazmie k. e. obserwowano małą aktywność fosfatazy kwaśnej i TPP-azy. Aktywność ATP-azy mitochondrialnej oraz enzymów oddechowych była niewielka. Osłabieniu uległ odczyn na glukozo-6-fosfatazę. Natomiast w przypadkowych częściach k. e. występował silny odczyn na oksydazę monoaminową, a ponad jądrem gromadziły się mukopolisacharydy obojętne.

Grupa C

Temperatura ciała po 5 godz. wynosiła 21°C, potem mierząc co 30 min. odnotowano kolejno 27, 29, 32, 33, 36 i 37°C. Obserwowano często zespoły składające się z kilku k. e. przylegających do siebie. Ziarnistości specyficzne były grube, bryłowate. Często komórki były słabo wypełnione ziarnistościami. Liczne k. e. zawierały po 2 jądra. Po wykonaniu reakcji Masson Hamperl u 3 zwierząt znaleziono na przekrojach dwunastnicy: 1285, 1201, 1294; 1215, 1205, 1190 oraz 1230, 1255 k. e. W komórkach zawierających większe ziarnistości specyficzne obserwowano słabą aktywność fosfatazy zasadowej, ATP-azy i AMP-azy (ryc. 8) oraz fosfataz niespecyficznych aktywnych w pH 7,2. Zmniejszenie aktywności AMP-azy dotyczyło zwłaszcza szczytów k. e. W cytoplazmie obserwowano niewielką aktywność fosfatazy kwaśnej i TPP-azy, enzymów oddechowych i ATP-azy mitochondrialnej. Aktywność esteraz niespecyficznych była zmniejszona, zwłaszcza w k. e. bogatych w ziarnistości specyficzne. Reakcje na aktywność oksydazy monoaminowej i glukozo-6-fosfatazy były zlokalizowane przeważnie ponad jądrami, tam gdzie gromadziły się mukopolisacharydy obojętne. W k. e. występowały często ziarenka glikogenu. Odczyn na mukopolisacharydy kwaśne był słaby, zwłaszcza w okolicy jąder (ryc. 17). Po zabarwieniu wg Bracheta cytoplazma k. e. wykazywała silną pyroninochłonność.

Seria IV

Grupa A.

Temperatura ciała i wyniki odczynów histochemicznych nie różniły się od spotykanych w grupach A poprzednich serii. U 2 badanych zwierząt znaleziono na przekrojach dwunastnicy następujące k. e.: 940, 990, 912 i 924, 888, 945.

Grupa B

Temperatura ciała zwierząt wynosiła średnio 38°C. Liczenie k. e. po wykonaniu reakcji *Masson Hamperl* u 3 badanych zwierząt dało następujące wyniki: 902, 914, 852, 821, 870, 820 i 956, 1013, 1048. W wielu k. e. wystąpił żywy odczyn na oksydazę monoaminową, esterazy niespecyficzne i TPP-azę. Między ziarnistościami specyficznymi spotykano mukopolisacharydy obojętne.

Grupa C

Temperatura ciała zwierząt wynosiła średnio 37°C. K. e. często tworzyły zespoły, grube ziarnistości przypominały strąty, zwłaszcza po zabarwieniu wg metody *Bodiana*. Komórki dwujądrowe były dość liczne. Po zabarwieniu wg *Masson Hamperl* spotykano komórki słabo wypełnione, przypominające cienie. Liczenie k. e. na przekrojach dwunastnicy 3 badanych zwierząt wykazało następujące ilości komórek: 1250, 1200, 1184, 1218, 1100 oraz 1207, 1120, 1194. Odczyny histochemiczne wykazały niewielką aktywność fosfatazy zasadowej i ATP-azy. Dotyczyło to szczytów i błon podstawowych k. e. Osłabione były też odczyny na fosfatazę zasadową i esterazy niespecyficzne w ścianach naczyń włosowatych. W cytoplazmie k. e. bogatych w ziarnistości specyficzne zauważono niską aktywność fosfatazy kwaśnej i glukozy-6-fosfatazy. Aktywność oksydazy monoaminowej była w k. e. dość żywa (ryc. 10). Osłabieniu uległy odczyny na esterazy niespecyficzne, zmniejszyło się też zabarwienie błękitem alcjanowym.

Seria V

Grupa A.

Temperatura ciała zwierząt i odczyny histochemiczne nie różniły się od spotykanych w innych seriach grupy A. Na przekrojach dwunastnicy 2 zwierząt znaleziono: 950, 979, 914 oraz 846, 880, 899 k. e.

Grupa B

Temperatura ciała zwierząt wahała się około 38°C. Liczenie komórek na przekrojach poprzecznych dwunastnicy 3 badanych zwierząt wykazało: 888, 956, 920, 1110, 990, 954 oraz 820, 891, 838 k. e. Na błonie komórkowej występowała żywa aktywność ATP-azy i AMP-azy, a w cytoplazmie widoczne były ziarnistości i pęcherzyki bogate w fosfatazę kwaśną i TPP-azę. W komórkach ubogich w ziarnistości wzmożeniu uległy odczyny na esterazy niespecyficzne, enzymy oddechowe, oksydazę monoaminową.

Grupa C

Temperatura ciała wynosiła średnio 38°C. Znalaziono wiele komórek dwujądrazastych. Spotykano k. e. z niewielką ilością ziaren specyficznych. Ziarnistości te były drobne, pyłowate. Ponad jądrami występowały przestrzenie pęcherzykowate. Liczenie k. e. na przekrojach dwunastnicy przyniosło wyniki: 1090, 1113, 1017, 1019, 1057, 1101 oraz 995, 1002, 984. Na uwagę zasługiwała żywa aktywność fosfatazy zasadowej na błonie wielu k. e. (ryc. 4), zwłaszcza słabo wypełnionych ziarnistościami. Także żywe były odczyny na ATP-azę i AMP-azę. Obserwowano wzmożoną aktywność fosfatazy kwaśnej (ryc. 6), TPP-azy i fosfataz niespecyficznych aktywnych w pH 7,2. Intensywna była aktywność enzymów oddechowych i ATP-azy mitochondrialnej, glukozy-6-fosfatazy i oksydazy monoaminowej. Prawdopodobnie dotyczyło to k. e. wypełnionych niewielką ilością ziarnistości specyficznych.

Seria VI

Grupa A.

Temperatura ciała zwierząt i odczyny histochemiczne nie wykazały różnic w porównaniu z grupą A poprzednich serii. Nie liczono k. e., bo obserwacja ich liczby u 10 zwierząt kontrolnych jest wystarczająca.

Grupa B

Temperatura ciała wynosiła około 38°C. Po wykonaniu metody Mason Hamperl znalaziono u 3 zwierząt na przekrojach dwunastnicy 870, 915, 997, 825, 890, 855 oraz 800, 885, 824 k. e. Odczyny histochemiczne, za wyjątkiem silnej reakcji na fosfatazę kwaśną, nie różniły się od grupy A.

Grupa C

Temperatura ciała zwierząt wynosiła 38°C. W k. e. obserwowano w okolicach ponadjądrowych wakuole. Nie znalaziono zespołów k. e. ani komórek dwujądrazastych. Ziarnistości specyficzne były drobne. Liczenie k. e. na przekrojach poprzecznych dwunastnicy wykazało u 3 zwierząt: 820, 891, 878; 816, 859, 872 i 893, 813, 855. Na błonie komórkowej, gdzie występowało mało ziarnistości, wzmożona była aktywność fosfatazy zasadowej, ATP-azy, AMP-azy i esteraz niespecyficznych aktywnych w pH 7,2. W okolicach ponadjądrowych spotykano często duże lizosomy i ziarnisty odczyn na TPP-azę. Aktywność enzymów oddechowych była

dość żywa (ryc. 13), podobnie ATP-azy w pH 9,4 (ryc. 11). Często występował silny odczyn na glukozo-6-fosfatazę oraz oksydazę monoaminową, zwłaszcza przy podstawach k. e.

Seria VII

Grupa A.

Temperatura ciała i odczyny histochemiczne nie wykazały różnic w porównaniu z pozostałą grupą A.

Grupa B

Temperatura ciała zwierząt wynosiła przeciętnie 38,5°C. Metody histochemiczne nie wykazały różnic w porównaniu z grupą A. U 3 zwierząt znaleziono na przekrojach dwunastnicy 813, 885, 910, 922, 907, 942 i 917, 824, 895 k. e.

Grupa C

Temperatura ciała zwierząt wynosiła 38°C. Liczenie k. e. na przekrojach poprzecznych dwunastnicy u 3 badanych zwierząt wykazało: 835, 890, 858; 802, 965, 905; 913, 898, 867 komórek. Na błonie k. e. spotykano niejednokrotnie silny odczyn na fosfatazę zasadową, ATP-azę, a w cytoplazmie obecność znacznej ilości mukopolisacharydów obojętnych i kwaśnych. Silną aktywność enzymów spotykano w komórkach słabo wypełnionych ziarnistościami, a reakcja PAS oraz zabarwienie błękitem alcjanowym były intensywne w komórkach zawierających liczne ziarnistości.

Seria VIII

Grupa A.

Temperatura ciała i wyniki odczynów histochemicznych były takie, jak w innych seriach grupy A.

Grupa B

Temperatura ciała wynosiła około 38,5°C. K. e. nie różniły się od k. e. grupy A. U 3 badanych zwierząt znaleziono na przekrojach dwunastnicy: 887, 824, 895, 875, 835, 848 oraz 890, 910, 984 k. e.

Grupa C

Temperatura ciała i badania histochemiczne nie wykazały różnic z grupą A. Na przekrojach dwunastnicy 3 zwierząt znaleziono: 825, 894, 910, 815, 803, 898 oraz 946, 978, 997 k. e.

Badania biochemiczne zawartości 5-HT w tkankach dwunastnicy zwierząt kontrolnych i wybranych serii doświadczalnych dały następujące wyniki:

U 3 zwierząt kontrolnych wykryto średnio 13,1 mikrog. 5-HT na 1 g tkanek dwunastnicy.

W serii II grupie B — średnio 12,4 mikrog./g, w grupie C — średnio 12,5 mikrog./g.

W serii V grupie B — średnio 13,8 mikrog./g, w grupie C — średnio 12,4 mikrog./g.

Na podstawie przeprowadzonej analizy wariancji można stwierdzić, że obserwowane różnice między średnimi mają wybitnie losowy charakter ($P > 0,50$).

Wyniki przeprowadzonej analizy statystycznej (ryc. 19) wskazują na:

1. Istotny wzrost liczby k. e. w II i III serii grupy B oraz od I do V serii w grupie C.

2. Wzrost ilości k. e. trwał nie tylko dłużej, ale był w istotny sposób większy w grupie C w porównaniu z grupą B.

3. Brak istotnych różnic w zawartości badanej biochemicznie 5-HT między grupami doświadczalnymi i grupą kontrolną.

OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ

W zakresie badań nad serotoniną, spotyka się najczęściej prace dotyczące centralnego układu nerwowego (monografie: 67, 31, 76). Tymczasem wiadomy jest fakt, że poza centralnym układem nerwowym 5-HT jest syntetyzowana i magazynowana w k. e. przewodu pokarmowego (22). Przemawia za tym zwłaszcza to, że krew w żyłach wrotnej zawiera więcej 5-HT niż w innych miejscach ustroju (26). Hydroksylaza tryptofanowa biorąca udział w tworzeniu serotoniny, poza przewodem pokarmowym nie występuje na ogół w tkankach (wyjątek stanowi nerka). W jelicie przy pomocy metod histochemicznych wykrywamy k. e. zawierające ziarnistości specyficzne magazynujące 5-HT. Ciężar właściwy tych ziarnistości jest większy niż ciężar właściwy chondriomu komórek nabłonka przewodu pokarmowego, ale mniejszy niż ciężar właściwy mitochondrium komórek nerwowych (60), różni się też od ciężaru ziaren zawierających histaminę (13) i acetylocholinę (7). U wielu gatunków zwierząt serotonina przewodu pokarmowego jest, podobnie jak w układzie nerwowym, łatwo uwalniana przez rezerpinę (5). Ilość ziaren specyficznych k. e. zmienia się w różnych stanach fizjologicznych i patologicznych ustroju (49, 16, 30). Przemawia to za istnieniem w k. e. serotoniny w czynnej formie „wolnej”.

W obecnej pracy, ilość wykrywanych przy pomocy metod histochemicznych k. e. oraz ich wygląd ulegały widocznym zmianom. Zjawiska

te występować mogą na wielu drogach: 1) zmiany syntezy 5-HT w komórkach, 2) zmiany rozkładu 5-HT, i 3) zmiany w transporcie przez błony komórkowe.

Na procesy te w przebiegu doświadczenia wpływ mogą mieć stosowane czynniki farmakologiczne oraz termiczne, w takich aspektach zachodzące zjawiska zostaną przeanalizowane.

Prekursorem serotoniny w organizmie żywym jest tryptofan (58). Ulega on hydroksylacji do 5-hydroksytryptofanu, a następnie dekarboksylacji. K. e. są miejscem, gdzie zachodzi przyłączenie grupy hydroksylowej do tryptofanu. Hydroksylazę 5-tryptofanową wyizolowano z jelita świnki morskiej oraz nerki świnki i szczura (30).

Inna hipoteza głosi, że tryptofan jest najpierw pozbawiony grupy karboksylowej i następnie tryptamina ulega hydroksylacji. Tryptamina nie jest jednak biologicznym poprzednikiem 5-HT (30).

Dla histochemicznego wykazania syntezy 5-HT byłoby najwłaściwsze wykrycie w k. e. jej prekursorów lub enzymów katalizujących syntezę. Metod takich dotychczas nie opracowano. F r e e l a n d i w s p. (56) wykazali, że 5-HT powstaje w obecności NAD i tlenu. Na powstawanie 5-HT w k. e. miałyby więc wpływ utlenianie tkankowe. Dlatego w badaniach naszych, różpatrując syntezę 5-HT, bierzemy pod uwagę odczyny na dehydrogenazę zredukowanego NAD, dehydrogenazę bursztynianową i ATP-azę mitochondrialną, które pośrednio mogą wykazać zmiany w syntezie serotoniny, oraz ilościowe badania biochemiczne.

Podanie środków farmakologicznych miało wpływ na aktywność enzymów mitochondrialnych w k. e. Równoczesne stosowanie niskiej temperatury powodowało jeszcze większy spadek aktywności dehydrogenazy zredukowanego NAD oraz dehydrogenazy bursztynianowej. Czynność dehydrogenazy NADH₂ zmniejszyła się szczególnie po 4-godzinnym stosowaniu niskiej temperatury. Jeśli przyjmiemy aktywność enzymów oddechowych i ATP-azy mitochondrialnej za współczynnik syntezy 5-HT w k. e., to należy przypuszczać, że hibernacja wpływa hamująco na tę syntezę. Wzrost wykrywanych w przebiegu doświadczenia ilości k. e. nie wynika więc ze zwiększonej syntezy serotoniny.

W katabolicznej części komórkowego metabolizmu 5-HT bierze między innymi udział oksydaza monoaminowa (MAO). Enzym ten jest związany strukturalnie z mitochondriami (2). Zawiera miedź i jest prawdopodobnie flawoproteidem. Aktywność MAO zależy od ciśnienia parcjalnego tlenu. W doświadczeniu naszym obserwuje się spadek aktywności MAO. Podanie środków farmakologicznych powoduje zmniejszenie intensywności odczynu w k. e. Natomiast po powrocie temperatury ciała wzrzą do normy, aktywność MAO ulega zwiększeniu, zwłaszcza na drugi

dzień po hibernacji. Ponieważ zmniejszenie aktywności MAO łączy się ze wzrostem ilości obserwowanych k. e., można się spodziewać, że dochodzi do hamowania rozkładu serotoniny. Zmniejszeniu ilości wykrywanych k. e. towarzyszy wzrost aktywności MAO. Kiedy temperatura ciała zwierząt jest już od kilku godzin normalna, a ilość k. e. zmniejsza się, szczególnie intensywna czynność MAO znajduje swe odbicie w morfologii k. e. Obok wypełnionych ziarnami specyficznymi spotyka się dużo „cieni”, komórek z niewielką zawartością 5-HT. Możemy przypuszczać, że nie wszystkie k. e. odznaczają się tą samą aktywnością enzymu: te, w których aktywność MAO jest szczególnie żywa, szybko tracą ziarnistości specyficzne, inne — nie odznaczające się tą aktywnością — pozostają wypełnione, stąd brak komórek w fazie pośredniej.

Na podstawie tej części badań można stwierdzić, że wzrost ilości wykrywanych k. e. łączy się ze zmniejszeniem rozkładu 5-HT przy udziale MAO. Natomiast duża aktywność enzymu pozostaje w związku z równoczesnym zmniejszeniem się ilości 5-HT w k. e.

Przez błonę komórkową 5-HT przechodzi na zasadzie pompy aminowej przy udziale ATP, analogicznie do pompy wapniowej (12). Wahania zawartości 5-HT w cytoplazmie powinny łączyć się z równoczesnymi zmianami aktywności enzymów w błonach komórkowych. W przebiegu doświadczenia aktywność ATP-azy na błonie komórkowej zmienia się znacznie. Podanie samych środków farmakologicznych zmniejsza czynność enzymów już w serii I, po 3 godzinach od chwili iniekcji. Zjawisko dotyczy zwłaszcza błony podstawowej k. e., równoczesne zastosowanie niskiej temperatury obniża jeszcze bardziej aktywność ATP-azy. W dalszych okresach czynność enzymu zwiększa się. Równolegle z wahaniami ATP-azy zmienia się czynność AMP-azy. Na uwagę zasługuje też zmniejszenie się w pierwszych i wzrost w dalszych okresach aktywności fosfatazy zasadowej, enzymu, który odgrywa dużą rolę w transporcie przez błonę komórkową (65). Obniżenie aktywności enzymów hydrolitycznych na błonie komórkowej dotyczyło szczególnie k. e., w których ziarnistości specyficzne były grube, bryłowate. Obserwacje zdają się wykazywać, że w procesie hibernacji dochodzi do zaburzeń w transporcie 5-HT przez błonę komórkową. Na podstawie samych badań histochemicznych można by wyprowadzić następujące wnioski: w procesie hibernacji dochodzi do zahamowania* metabolizmu k. e. Zmniejsza się synteza serotoniny, zmniejsza jej rozkład przez MAO oraz zahamowaniu ulega transport przez błonę komórkową.

Z drugiej strony — w wyniku badań biochemicznych stwierdzono, że zawartość 5-HT w tkance dwunastnicy w procesie hibernacji nie różni się od wyników otrzymanych u zwierząt kontrolnych. Można więc przy-

puszczać, że zahamowanie różnych czynności układu enterochromafinowego jelit jest proporcjonalne, procesy równoważą się i stąd — poziom 5-HT w tkance jest utrzymany.

W doświadczeniu obserwowano zwiększenie ilości wykrywanych metodami histochemicznymi k. e. Można by przez to myśleć o wzroście syntezy 5-HT lub zahamowaniu jej rozkładu lub wydalania z komórki. Wobec jednak wyników badań aktywności enzymów przy równoczesnym braku zmian w zawartości 5-HT wykrywanej biochemicznie w ekstraktach tkankowych zastrzeżenia takie możemy wykluczyć.

Zjawisko zwiększenia ilości wykrywanych k. e. można częściowo tłumaczyć podziałami istniejących komórek. K. e. tworzą często w przebiegu doświadczenia zespoły komórek leżących obok siebie, bliźniaczych, często też spotyka się komórki dwujądrzaste. Zahamowanie produkcji może być bodźcem uruchamiającym jako mechanizm wyrównawczy podziały k. e. Jonek (51), badając nadnercza królic w czasie sztucznej hibernacji opisał zmiany objawiające się przerostem tych gruczołów. Podobnie obserwuje się przerost tarczycy (7). W przewodzie pokarmowym zimującej żaby wykrywa się więcej k. e. niż w warunkach kontrolnych (16).

W obecnym doświadczeniu, w procesie sztucznej hibernacji, k. e. miały ziarnistości specyficzne grube, przypominające strąty. Być może przy zahamowanym metabolizmie 5-HT, ziarnistości tworzą konglomeraty i przez to zwiększa się możliwość wykazania w metodzie Masson Hamperl k. e. Większą wykrywalność k. e. w czasie zahamowania ich czynności wiązać też można ze zwolnieniem cyklu wydzielniczego, co sprawia, że większa ilość komórek wypełniona jest formą związaną 5-HT, zmagazynowaną w wykrywalnych histochemicznie ziarnistościach.

Na podstawie przeprowadzonych obserwacji stwierdzić można, że w czasie hibernacji w nabłonku przewodu pokarmowego świnki morskiej zmienia się wygląd k. e. Już po 2 godz. obniżenia temperatury ciała do 21°C występuje duża ilość komórek dwujądrzastych, zaś po 4 godz. spotyka się zespoły przylegających do siebie k. e. Rozwój k. e. nabłonka przewodu pokarmowego był przedmiotem wielu badań. Prace lat ostatnich, zwłaszcza z zakresu embriologii eksperymentalnej (1), zdają się przemawiać za hipotezą Massona z r. 1914 (50), według której k. e. w przewodzie pokarmowym rozwijają się z nabłonka entodermalnego. Powstają one oraz dojrzewają w nabłonku krypt Lieberkühna (15) i następnie przemieszczają się na powierzchnię kosmków (33). Dotychczas nie obserwowano nigdy podziału mitotycznego k. e., nawet po użyciu kolchicyny (75). Nasze badania, w których obserwuje się dużą ilość komórek dwujądrzastych oraz zespoły przylegających do siebie komórek, zdają się świadczyć o możliwości ich podziałów. Podziałowi ulegają prawdopodobnie elementy już wyspecjalizowane, ziarnistości specyficzne komórki

macierzystej są obecne w elementach potomnych, stąd podobny stopień wypełnienia ziarnistościami przylegających do siebie k. e. Interesującą rzeczą wydaje się też być obecność na preparatach jasnych, bezziernistych przestrzeni, „halo”, dookoła jąder oraz na obwodzie wielu k. e. Bezziernista przestrzeń występuje często od strony podstawy komórki. Zjawiska te nie występują na drugi dzień po hibernacji. O istnieniu „halo” dookoła jądra k. e. wspomina B a r r y (3). Opisuje on też wakuole u podstawy komórki, traktując to jako dowód czynności wydzielniczej, a nawet polaryzacji czynnościowej. Pisząc o polaryzacji czynnościowej, autorzy zgadzają się, że aktywny biegun k. e. leży u jej podstawy (73). I w obecnej pracy, u podstawy k. e. często spotyka się sieć naczyń włosowatych, a w ich ścianach żywe odczyny enzymatyczne. Jednocześnie ziarnistości impregnujące się solami srebra sięgają do powierzchni zewnętrznej nabłonka i często k. e. zakończona jest buławką z dużym ziarnem specyficznym, które uwypukla się do światła przewodu pokarmowego. Nie spotykamy tego w wypadku reakcji dwuazowej oraz w metodzie M a s s o n H a m p e r l. Możemy przypuszczać, że w k. e. są dwa rodzaje ziarnistości: argentafinowe, dające typowe odczyny na 5-HT (redukują sole srebra i impregnują się nimi oraz barwią się w metodzie dwuazowej), położone blisko jądra i podstawy komórki oraz argentofilowe, wykazujące tylko pozytywną reakcję B o d i a n a, ziarnistości, które być może wydzielane są do światła przewodu pokarmowego. O tym, że dotyczy to tych samych komórek, świadczą seryjne preparaty, jakie wykonano dla reakcji B o d i a n a i M a s s o n H a m p e r l. Podkreśla się często, że k. e. nie dosięgają powierzchni zewnętrznej nabłonka (30, 73). Nasze badania, zwłaszcza wyniki reakcji B o d i a n a nie potwierdzają tego wniosku.

Wykonane odczyny histochemiczne mogą być markerami struktur komórkowych. Reakcje na enzymy oddechowe wykazały, że w k. e. w czasie obniżenia temperatury ciała mitochondria są niewielkie, często rozfragmentowane. Po powrocie do warunków normalnych, chondriom ulega rozwojowi. Podobnie odczyn na TPP-azę, lokalizujący się w strukturach Golgiego, zmniejsza się, a po powrocie do normalnej temperatury ciała, podobnie jak mitochondria, zespoły Golgiego rozwijają się. W pierwszych dniach po powrocie temperatury ciała do normy występuje też rozwój struktur ergastoplazmatycznych (wzrost aktywności glukozo-6-fosfatazy). Podobnie zachowywały się lizosomy: w czasie obniżenia temperatury ciała odczyn na fosfatazę kwaśną był drobnoziarnisty, słaby, a potem w k. e. intensywność jego była niejednokrotnie wyższa niż w warunkach normalnych. Rozwój organoidów w k. e. po powrocie temperatury ciała do normy może być traktowany jako wyraz ogólnie wzmożonej aktywności komórek ustroju w procesie odnowy czynności życiowych.

Wzrost intensywności odczynu na mukopolisacharydy po 2 dniach od czasu hibernacji może łączyć się z powrotem do sprawności fizjologicznej komórki. Rozwój struktur cytoplazmatycznych po powrocie temperatury ciała do normy świadczy, że w procesie sztucznej hibernacji nawet 4-godzinne obniżenie temperatury ciała do 21°C nie uszkodziło metabolizmu wewnątrzkomórkowego k. e., lecz go tylko zahamowało.

Wśród zastosowanych w doświadczeniu leków znajdują się largactil oraz fenegan — pochodne fenotiazyny, które mają wpływ na metabolizm serotoniny (68) oraz działają porażająco na ośrodki sympatyczne międzymózgowia i zwoje wegetatywne. Już S u o m a l a i n e n w r. 1938 (69) sądził, że istotą hibernacji jest niedoczynność układu sympatycznego. Także Lyman i Chatfield (68, 35) sugerują duży wpływ centralnego układu sympatycznego w mechanizmie hibernacji. Zastosowane leki działają na układ śródmózgowia i podwzgórza. Organizm traci zdolność homeostazy. Przez to largactil w temperaturze otoczenia 39°C powoduje wzrost temperatury ciała, a w 30°C jej spadek, podczas gdy w temp. 36°C temperatura ciała nie ulega zmianom (64). Zgodnie z tym u zwierząt, którym podano mieszanekę lityczną i pozostawiono w temperaturze pokojowej (grupa B), wystąpiło obniżenie temperatury ciała.

Z badań G i a j a (32) wynika, że hibernacja ma wpływ na fizjologię przewodu pokarmowego. Celem obecnej pracy było badanie wpływu sztucznej hibernacji na komórkowy układ enterochromafinowy, dlatego opisy histochemiczne dotyczą tylko k. e. Jednakże zwrócono też uwagę na zachowanie odczynów w sąsiednich, cylindrycznych komórkach nabłonka. Odczyny te ulegały także zmianom. Podobnie jak w k. e. obserwowano obniżenie aktywności fosfataz niespecyficznych i specyficznych oraz enzymów oddechowych. Natomiast do zmian dotyczących wyłącznie k. e. zaliczyć można wystąpienie jasnej, homogennej przestrzeni dookoła jądra i na obwodzie komórek, częste występowanie komórek dwujądrazstych, większą pyroninochłonność cytoplazmy oraz gromadzenie ziaren glikogenu. Po powrocie temperatury ciała do normy w k. e. wystąpiła żywsza, w porównaniu z innymi komórkami nabłonka, aktywność MAO w cytoplazmie oraz fosfatazy zasadowej na błonie komórkowej. Świadczyć to może raz jeszcze o szczególnie dużym udziale tych enzymów w metabolizmie k. e.

Działanie samych środków farmakologicznych, bez stosowania niskiej temperatury wykazuje wpływ na k. e. przewodu pokarmowego. Podobnie J o n e k (41) obserwował w nadnerczach zmiany po hibernoterapii, bez działania zimna. Wpływ środków farmakologicznych w naszym doświadczeniu jest także na ogół zgodny z wynikami otrzymanymi po równoczesnym stosowaniu zimna. Jak przy pełnej hibernacji, pod wpływem samych

środków farmakologicznych wzrasta ilość wykazywanych k.e., choć w mniejszym stopniu. Aktywność enzymów ulega zmniejszeniu później i trwa krócej niż przy równoczesnym stosowaniu zimna. Zmniejsza się aktywność enzymów oddechowych, dochodzi prawdopodobnie do zahamowania syntezy 5-HT. Spadek aktywności MAO wskazuje na mniejszy rozkład 5-HT, a zmniejszenie intensywności odczynów na fosfatazę zasadową i ATP-azę — na zahamowanie transportu przez błony. Porównując wpływ środków farmakologicznych z pełną hibernacją, można sądzić, że zjawiska te interferują pogłębiając się wzajemnie. Leki poprzez działanie na układ sympatyczny pogłębiają wpływ niskiej temperatury, zimno — hamując procesy metaboliczne — przedłuża i pogłębia działanie środków farmakologicznych na układ enterochromafinowy.

Badanie związku między temperaturą ciała a czynnością 5-HT było przedmiotem wielu prac. *Dubnick* (20) stwierdził, że u myszy inhibicja MAO i równoczesny wzrost poziomu 5-HT zależy od temperatury otoczenia. W 39°C poziom 5-HT wzrasta o 200%, a w 30°C tylko o 150%. Wg tego autora temperatura wpływa na szybkość syntezy 5-HT. Mobilizująca zapasy komórkowe serotoniny rezerpina wykazuje działanie sedatywne, co zależy od uwolnionej serotoniny (11). To działanie sedatywne rezerpiny znoszone jest przez zimno, które wg *Sulzera* (66) utrudnia mobilizację serotoniny, nie wpływając na katecholaminy. *Feldberg* (28) stoi na stanowisku, że temperatura ciała zależy od równowagi między poziomem adrenaliny, noradrenaliny i serotoniny w podwzgórzu. Podniesienie temperatury ciała zależy może od zahamowania działania adrenaliny i noradrenaliny oraz od równoczesnego wzrostu czynności 5-HT. Podkreśla się też obwodowy wpływ 5-HT na temperaturę ciała (27), wpływ ten zależy prawdopodobnie od niespecyficznego działania 5-HT na mięśnie naczyń. Duże dawki 5-HTP, zwłaszcza po podaniu inhibitorów MAO, powodują wazodilatację. Zmiany temperatury ciała po iniekcji 5-HT zależą od temperatury otoczenia. W niskiej temperaturze 5-HT powoduje spadek temperatury ciała, powyżej 32°C — hipertermię (46, 64). Podobnie obniżenie temperatury ciała powoduje rezerpina i *largactil*. *Largactil* w dawkach leczniczych nie obniża w mózgu zawartości amin biogennych, jest jednak ich farmakologicznym antagonistą. Hamuje on rozpad ATP w centralnym układzie nerwowym, co znaczy proces dostarczający energii do powstawania 5-HT. W świetle wszystkich powyższych faktów możemy przypuszczać, że stosowanie pochodnych fenotiazyny oraz niskiej temperatury ma hamujący wpływ na metabolizm obwodowego układu enterochromafinowego. Ponieważ zmiany zachodzące w k.e. wydają się być proporcjonalne, a równocześnie uruchomione zostają mechanizmy wyrównawcze, homeostaza ustroju odnośnie 5-HT tkankowej jest zachowana, co może mieć wpływ na stan organizmu.

Na podstawie przeprowadzonych obserwacji można wyprowadzić następujące wnioski:

1. Pod wpływem sztucznej hibernacji ilość wykrywanych przy pomocy metod histochemicznych k. e. w dwunastnicy świnki morskiej oraz ich wygląd ulega widocznym zmianom.

2. Odczyny histochemiczne wykazują zahamowanie metabolizmu 5-HT zarówno w fazie syntezy, jak i rozkładu oraz transportu przez błonę komórkową.

3. Wydaje się, że procesy te zachowują równowagę, co powoduje, że zawartość 5-HT wykrywanej w tkankach dwunastnicy przy użyciu metody biochemicznej, nie zmienia się w porównaniu z warunkami kontrolnymi.

4. Obserwowany wzrost ilości wykrywanych k. e. tłumaczyć można podziałami istniejących komórek, zmianami fizyko-chemicznymi ziaren specyficznych, które na preparatach po wykonaniu stosowanych metod stają się grube, bryłowate, a przez to łatwiej wykrywalne oraz magazynowaniu w k. e. formy cytologicznie związanej 5-HT.

5. Zachodzące zjawiska są odwracalne.

OBJASNIENIA RYCIN

Ryc. 1. Preparat z serii I grupy C, barwiony hematoksyliną-eozyną i Fast Red B. Wokół jądra komórki enterochromafinowej jasny, bezzziarnisty pas cytoplazmy. Pow. 1200 ×.

Ryc. 2. Preparat z serii II grupy C. Reakcja wg Massona Hamperl. Zespół komórek enterochromafinowych, ziarnistości specyficzne grube, bryłowate. Na obwodzie niektórych komórek — bezzziarnista przestrzeń. Pow. 1200 ×.

Ryc. 3. Preparat z serii II grupy C. Reakcja wg Bodiána. Znaczne wypełnienie ziarnistościami szczytów komórek, które demonstrują kształty: trójkątny, wrzecionowaty i baryłkowaty. Pow. 1200 ×.

Ryc. 4. Preparat z serii V grupy C. Reakcja na aktywność fosfatazy zasadowej wg Burstona. W komórce ubogiej w ziarnistości specyficzne, silna aktywność enzymu na błonie komórkowej. Pow. 1200 ×.

Ryc. 5. Preparat z serii I grupy C. Reakcja na aktywność fosfatazy kwaśnej wg Gomoriego i barwienie Fast Red B. Widoczne są drobne, nieliczne lizosomy. Pow. 1200 ×.

Ryc. 6. Preparat z serii V grupy C. Reakcja na aktywność fosfatazy kwaśnej wg Gomoriego i barwienie Fast Red B. Wzrost aktywności enzymu. Pow. 1200 ×.

Ryc. 7. Preparat z serii I grupy B. Reakcja na aktywność ATP-azy wg Wachstein Meisel i barwienie Fast Red B. Słaby odczyn, zwłaszcza w części ponadjądrowej komórki enterochromafinowej. Pow. 1200 ×.

Ryc. 8. Preparat z serii III grupy C. Reakcja na aktywność AMP-azy wg Wachstein Meisel i barwienie Fast Red B. Niska aktywność enzymu na błonie komórkowej. Pow. 1200 ×.

Ryc. 9. Preparat z serii II grupy B. Reakcja na aktywność TPP-azy wg No-

vikoff Goldfischer i barwienie Fast Red B. W cytoplazmie komórek mała aktywność enzymu. Pow. 1200 ×.

Ryc. 10. Preparat z serii IV grupy C. Reakcja na aktywność MAO wg Glennera. W komórkach enterochromafinowych intensywny odczyn. Pow. 1200 ×.

Ryc. 11. Preparat z serii VI grupy C. Reakcja na aktywność ATP-azy wg Pacycula Herman. W cytoplazmie żywy ziarnisty odczyn. Pow. 1200 ×.

Ryc. 12. Preparat z serii I grupy B. Reakcja na aktywność dehydrogenazy bursztynianowej wg Nachlasy. Mała aktywność enzymu. Pow. 1200 ×.

Ryc. 13. Preparat z serii VI grupy C. Reakcja na aktywność dehydrogenazy zredukowanego NAD, barwienie Fast Red B. Intensywny odczyn w komórkach enterochromafinowych. Pow. 1200 ×.

Ryc. 14. Preparat z serii I grupy C. Reakcja na aktywność glukozy-6-fosfatazy wg Wachstein Meisel. W cytoplazmie słaby odczyn enzymatyczny. Pow. 1200 ×.

Ryc. 15. Preparat z serii II grupy C, barwienie metodą PAS-diastraza i Fast Red B. Nagromadzenie mukopolisacharydów obojętnych w cytoplazmie komórek enterochromafinowych. Pow. 1200 ×.

Ryc. 16. Preparat z serii II grupy C. Reakcja PAS-dimedon i barwienie Fast Red B. Drobnodziarnisty odczyn między ziarnistościami specyficznymi. Pow. 1200 ×.

Ryc. 17. Preparat z serii III grupy C. Barwienie błękitem alcjanowym i Fast Red B. W komórkach enterochromafinowych słaby odczyn między ziarnistościami w okolicy jąder. Pow. 1200 ×.

Ryc. 18. Preparat z serii II grupy C, barwiony wg Bracheta i Fast Red B. Intensywną pyroninochłonność cytoplazmy w dwujądźrzastej komórce enterochromafinowej. Pow. 1200 ×.

Ryc. 19. Liczba komórek enterochromafinowych w grupie B (linia ciągła) i w grupie C (linia przerywana) wszystkich serii. Oszacowany z 5% ryzykiem błędu zasięg średniej zaznaczono pasem kreskowanym, a średnią arytmetyczną \pm dwa odchylenia standardowe (norme) pasem kropkowanym.

PISMIENICTWO

1. Andrew A.: *J. Embryol. exp. Morph.* **11**, 307—324, 1963
2. Arioka J., Tanimukai H.: *J. Neurochem.* **1**, 311—315, 1957.
3. Barry J.: *La cellule argentaffine*. Thèse med. Lyon 1943, 169.
4. Benditt E. P., Rewley D. A.: *Science* **123**, 24, 1956.
5. Benditt E. P., Wong R. L.: *J. exp. Biol.* **105**, 509—519, 1957.
6. Benes K., Lojda Z., Horavka B.: *Histochemie* **2**, 313—321, 1961.
7. Bielegow W. G., Sidlofsky S.: *Br. med. Bull.* **17**, 56—60, 1961.
8. Bilski R.: *Budowa, własności ogólne i metody wykrywania polisacharydów*. Skrypt metod histochemicznych. PTHC, Warszawa 1963, 47—67.
9. Bogdański D. F., Pletscher A., Brodie B. B., Udenfriend S.: *Pharmac. exp. Ther.* **117**, 82—88, 1956.
10. Bogdański D. F., Weisbach H., Udenfriend S.: *Pharm. Pharmacol.* **122**, 182—194, 1958.
11. Brodie B. A., Shore P. A., Pletscher A.: *Science* **123**, 992—993, 1956.
12. Brodie B. B.: *Hormones, Brain Functions and Behaviour*. Ed. Academic Press Inc. N. Y. 1957, 146—154.
13. Carlini E. A., Green J. P.: *Br. Pharmac. Chemother.* **20**, 264—277, 1963.
14. Ciaccio C.: *Anat. Anz.* **29**, 597—600, 1906.

15. Czech K.: *Przegl. Lek.* **4**, 556, 1948.
16. Czerny K.: *Folia morph.* (Warszawa), **25**, 200—204, 1966.
17. Danisch F.: *Beitr. path. Anat.* **72**, 687—709, 1924.
18. Davidson J., Sjoerdsma A., Loomis L. N., Udenfriend S.: *J. clin. Invest.* **36**, 1594—1599, 1957.
19. Davis B. J., Ornstein L.: *J. Histochem. Cytochem.* **7**, 297—298, 1959.
20. Dubnick B., Leesen H. A., Chessin M., Scolt C. C.: *Arch. int. Pharmacodyn. Ther.* **12**, 194—202, 1960.
21. Erspamer V.: *Rc. Sci. Farniat.* **1**, 1—193, 1954.
22. Erspamer V.: *The Biological Significance of 5-hydroxytryptamine.* XXI Congr. Intern. de Ciencias Fisiologicas, Buenos Aires 1959, 216—222.
23. Erspamer V., Boretti G.: *Experientia* **6**, 348—349, 1950.
24. Erspamer V., Asero B.: *Ric. Sci.* **21**, 2132—2136, 1951.
25. Erspamer V., Boretti G.: *Arch. int. Pharmacodyn. Ther.* **88**, 296—332, 1951.
26. Erspamer V., Testini A.: *J. Pharmacol.* **11**, 618—623, 1959.
27. Fastier F. N., Spenen R. N., Waal H.: *Br. J. Pharmac. Chemother.* **12**, 251—266, 1957.
28. Feldberg W., Myers R. D.: *Nature* **200**, 1325, 1963.
29. Fiore-Donati L., Pollice L., Chiaco-Bianchi L.: *Experientia* **15**, 193—195, 1959.
30. Garattini S., Valzelli L.: *Serotonin.* Elsevier Publishing Company Amsterdam, London, New York 1965.
31. George G.: *C. r. Séanc. Soc. Biol.* **151**, 692—695, 1957.
32. Giaja J., Rajevski V.: *C. r. Séanc. Soc. Biol.* **149**, 449—452, 1955.
33. Górski M.: *Pol. tyg. lek.* (Warszawa) **10**, 661, 1955.
34. Grandjean E., Bättig K.: *Helv. Physiol. et Pharmacol. Acta* **15**, 366—370, 1957.
35. Harrison M.: *Br. med. Bull.* **17**, 9—14, 1961.
36. Heidenhain A.: *Arch. mikroskop. Anat. Entw. Mech.* **6**, 368—406, 1870.
37. Hoeschen T.: *Z. Zellforsch.* **27**, 711—719, 1938.
38. Horita A., Gogerty J. H.: *J. Pharmac. exp. Ther.* **122**, 194—200, 1958.
39. Horita A., Gogerty J. H.: *Fedn. Proc.* **16**, 308, 1967.
40. Igenito A. J., Bonnycastle D. D.: *Can. J. Physiolog. Pharmac.* **45**, 723—732, 1967.
41. Jonek J.: *Folia morphol.* (Warszawa) **10**, 251—263, 1959.
42. Kärjä J., Kärki N. T., Tala E.: *Acta pharmac. tox.* **18**, 255—262, 1961.
43. Kull H.: *Z. mikr.-anat. Forsch.* **2**, 163—200, 1925.
44. Kulkarni A. S.: *Int. J. Neuropharmacol.* **6**, 333—335, 1967.
45. Kuriaki K., Inouye A.: *C. R. Séanc. Soc. Biol.* **150**, 1835—1837, 1956.
46. Lessin A. W., Parkes M. W.: *J. Pharm. Pharmac.* **9**, 657—662, 1957.
47. Lessin A. W., Parkes M. W.: *Br. J. Pharmac. Chemother.* **12**, 245—250, 1957.
48. Lojda Z., Ereš B., Pelichova H.: *Histochemie* **3**, 428—454, 1964.
49. Lojda Z., Fric P.: *Histochemie* **3**, 455—461, 1964.
50. Masson P.: *C. R. Sci. (Paris)* **158**, 59—61, 1964.
51. Nakazawa T.: *Tex. Rep. Biol. Med.* **18**, 52—65, 1960.
52. Neumann J., Hart B. J.: *Ann. math. Statistic. USA.* **13**, 207—214, 1942.
53. Nicolas A.: *Mschr. Anat. Physiol* **9**, 1—62, 1891.

54. Novikoff A. B., Goldfischer S.: *Proc. natn. Anat. Aci (Wash.)* **47**, 8C2—810, 1961.
55. Oktaba W.: *Roczn. Nauk. roln.* **82**, 417—435, 1963
56. Opieńska-Blauth J., Charęziński M.: *Postępy Biochem.* **10**, 215—243, 1964.
57. Paasonen M. K.: *Biochem. Pharmacol.* **5**, 389—391, 1961.
58. Paasonen M. K., Giarmann N. J.: *Arch. int. Pharmac. Ther.* **114**, 189—200, 1958.
59. Pearse A. G. E.: *Histochemistry*, Churchill Ltd, London 1961.
60. Prusoff W. H.: *Br. J. Pharmac. Chemother.* **15**, 520—524, 1960.
61. Rapport M. M., Green A. A., Page J. H.: *J. biol. Chem.* **176**, 1243—1253, 1948
62. Resnick R. H., Smith G. T., Gray S. J.: *Am. J. Physiol.* **201**, 571—573, 1961.
63. Rowe R. P., Bloom B. M., Plan S. Y., Finger K.: *Fedn. Proc.* **18**, 441, 1959.
64. Shemano I., Nickerson M.: *Can. J. Biochem. Physiol.* **36**, 1243—1249, 1958.
65. Smyth D. H.: *Membrane Transport and Metabolism. Symposia C. S. A. V.* Praha 1961.
66. Sulser F., Brodie B. B.: *Nature* **131**, 1440—1441, 1960.
67. Tissot R.: *Monoamines et systeme nerveux central.* Ed. G. Doin, Paris 1961.
68. Udenfriend S., Weissbach H., Bogdański D. F.: *Pharmac.* **120**, 255—260, 1957.
69. Uuspää V. J.: *Experientia* **19**, 156—158, 1963.
70. Vialli M.: *Boll. Soc. Ital. Sper.* **3**, 1, 1933.
71. Vialli M.: *Boll. Soc. Ital. Sper.* **9**, 1, 1934.
72. Vialli M.: *Riv. Anat. Patol.* **21**, 392—438, 1962.
73. Vialli M.: *Handbook of Experimental Pharmacology XIX, 5-hydroxytryptamine and Related Indolealkylamines*, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, N. Y. 1966, 1—55.
74. Vialli M., Erspamer V.: *Boll. Soc. med.-chir. Pavia* **355—361**, 1937.
75. Vialli M., Ghiringhelli F.: *Arch. int. Pharmacodyn.* **129**, 438—454, 1960.
76. Way E. L., Sutherland V. C.: *Anesthesiology* **24**, 543—557, 1963.
77. Zawistowski S.: *Technika histologiczna, histologia oraz podstawy histopatologii.* PZWL, Warszawa 1965.
78. Zizine L.: *C. r. Séanc. Soc. Biol.* **153**, 1156—1158, 1959.
79. Young L. C.: *Ann. math. Statist.* **12**, 193—300, 1941.

Otrzymano 27 XI 1968.

РЕЗЮМЕ

Целью работы было исследование энтерохромафиновых клеток эпителия кишечника морских свинок в процессе искусственного охлаждения. Животные были разделены на три группы: А — контрольная, В — группа морских свинок, получавших различные фармакологические средства (долантин, ларгактил, фенерген), С — группа

животных, температура тела которых после подачи фармакологических средств на 4 часа понижалась до 21°C. Материал для исследований брался в различные периоды эксперимента. Были проведены гистохимические реакции и биохимические исследования. Установлено, что в энтерохромафиновых клетках активность энзимов понижается, что может указывать на торможение метаболизма. Можно предположить, что торможению подвергаются также процессы синтеза, распада и процесс переноса 5-гидрокситриптамина через клеточную оболочку. Неизменившееся содержание биохимически обнаруженного 5-гидрокситриптамина позволяет сделать предположение о равномерности торможения метаболических процессов. Во время понижения температуры тела наблюдалось статистически подтвержденное явление роста числа энтерохромафиновых клеток. Одновременно число двуядерных клеток возрастало и появлялись группы прилегающих клеток. Можно предположить, что энтерохромафиновые клетки подверглись делению. Снижение температуры тела может привести к тому, что большая часть 5-гидрокситриптамина содержится в энтерохромафиновых клетках в связанной форме (в гранулах) и отсюда вытекает его большая обнаруживаемость при помощи примененных методов. Фармакологические средства и холод взаимодействуют. Спустя неделю после начала эксперимента разницы по сравнению с контрольной группой не встречаются. Таким образом, можно сделать вывод об обратимости наблюдаемых процессов.

S U M M A R Y

Investigations of enterochromaffin cells of the intestinal epithelium were carried out on guinea pigs under conditions of experimental hibernation. The animals were divided into 3 groups: A, B, C. Group A was control. The animals of group B were treated with Pethidin, Largactil and Phenergan. The animals of group C were treated with the same drugs but in addition their body temperature was decreased to 21°C for 4 hrs. Some animals were sacrificed and some were aroused at 37°C. The tissue material was examined at various times following the experiment. Histochemical examinations showed a decreased enzymatic activity in the enterochromaffin cells, which suggests a reduced metabolism. Synthesis, catabolism and transport of serotonin by the cellular membrane were found to be slowed down at a regular rate. A biochemical examination of serotonin revealed no changes. The increase of the enterochromaffin cells was statistically confirmed. The

investigations resulted in finding an increased number of binuclear cells and agglomerations of cells, which suggests their division. Under conditions of artificial hibernation serotonin occurs in the enterochromaffin cells in a bound form, i. e. in granulations. The above pharmacological drugs and the lowering of the body temperature affected concomitantly the enterochromaffin cells. In a week or so, the changes due to hibernation receded.

EXPLANATION OF FIGURES

Fig. 1. Section from stage I, group C. Staining with haematoxylin-eosin and Fast Red B. Around nuclear enterochromaffin cells a light band of a cytoplasm lacks granulations. Magn. 1200 ×.

Fig. 2. Section from stage II, group C. Staining with the Masson Hamperl method. Aggregations of the enterochromaffin cells. Large specific granulations. In the peripheral zone of some cells — areas lacking granulations are visible. Magn. 1200 ×.

Fig. 3. Section from stage II, group C, stained with the Bodian method. The apex of the cells filled with grains. Triangular, fusiform and barrel-like shapes of the cells. Magn. 1200 ×.

Fig. 4. Section from stage V, group C. Reaction for alkaline phosphatase with the Burstone method. Strong enzymatic activity in the cell membrane which is filled with a small number of grains. Magn. 1200 ×.

Fig. 5. Section from stage V, group C. Reaction for acid phosphatase according to the Gomori method and staining with Fast Red B. In the cytoplasm — a small number of lysosomes. Magn. 1200 ×.

Fig. 6. Section from stage V, group C. Reaction for acid phosphatase according to the Gomori method and staining with Fast Red B. Strong enzymatic activity. Magn. 1200 ×.

Fig. 7. Section from stage I, group B. Reaction for ATP-ase according to the Wachstein Meisel method and staining with Fast Red B. Low enzymatic activity in the apical part of the enterochromaffin cell. Magn. 1200 ×.

Fig. 8. Section from stage II, group C. Reaction for AMP-ase according to the Wachstein Meisel method and staining with Fast Red B. Low enzymatic activity in the basal membrane. Magn. 1200 ×.

Fig. 9. Section from stage II, group B. Reaction for TPP-ase according to the Novikoff Goldfischer method and staining with Fast Red V. Low enzymatic activity in the cytoplasm. Magn. 1200 ×.

Fig. 10. Section from stage IV, group C. Reaction for MAO with the Glenner method. Strong activity in the enterochromaffin cells. Magn. 1200 ×.

Fig. 11. Section from stage VI, group C. Reaction for ATP-ase with the Pacyula Herman method. Strong reaction in the cytoplasm of the cells. Magn. 1200 ×.

Fig. 12. Section from stage I, group B. Reaction for succinic dehydrogenase with the Nachlas method. Low enzymatic activity. Magn. 1200 ×.

Fig. 13. Section from stage VI, group C. Reaction for NADH₂ dehydrogenase according to the Nachlas method and staining with Fast Red B. Strong reaction in the enterochromaffin cells. Magn. 1200 ×.

Fig. 14. Section from stage I, group C. Reaction for glucose-6-phosphatase

with the Wachstein Meisel method. Low enzymatic activity in the cytoplasm. Magn. 1200 X.

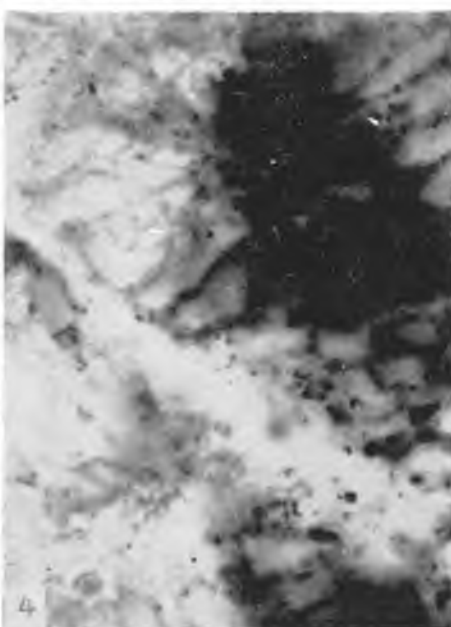
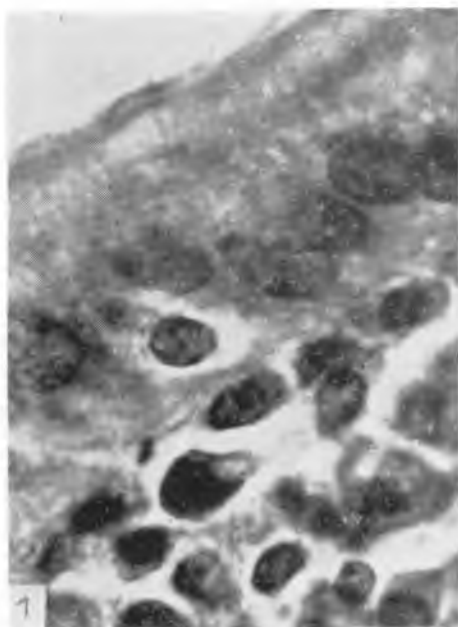
Fig. 15. Section from stage II, group C. PAS-diestase reaction and staining with Fast Red B. Neutral mucopolysaccharides collected in the cytoplasm of the enterochromaffin cells. Magn. 1200 X.

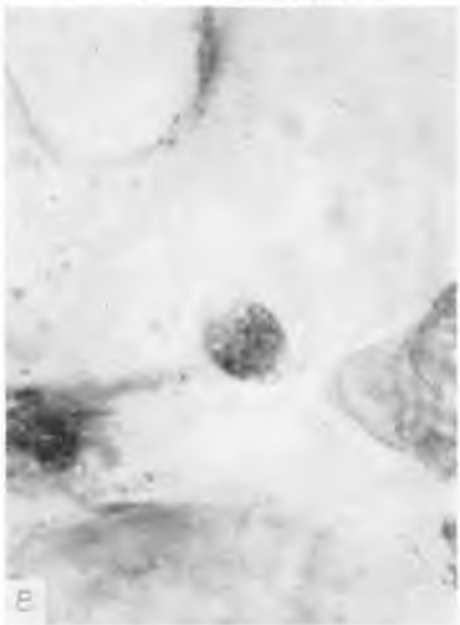
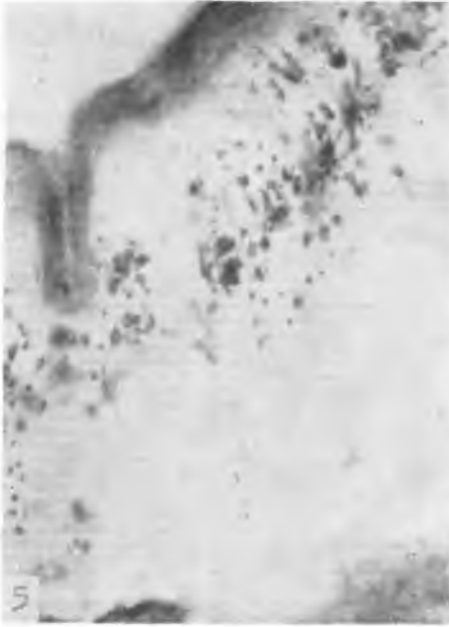
Fig. 16. Section from stage II, group C. PAS-dimedon reaction and staining with Fast Red B. Fine-grained reaction among specific granulations. Magn. 1200 X.

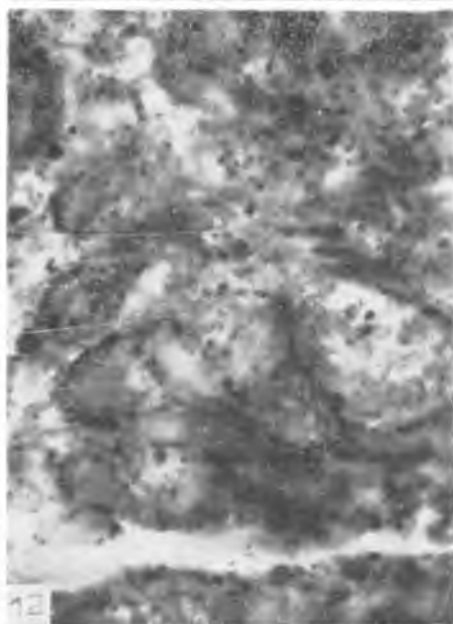
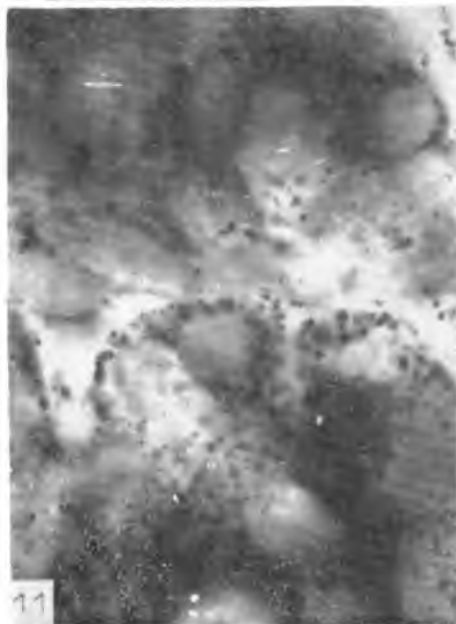
Fig. 17. Section from stage III, group C. Staining with Alcian blue and Fast Red B. Low reaction in the enterochromaffin cells among specific grains and around the nuclear zone. Magn. 1200 X.

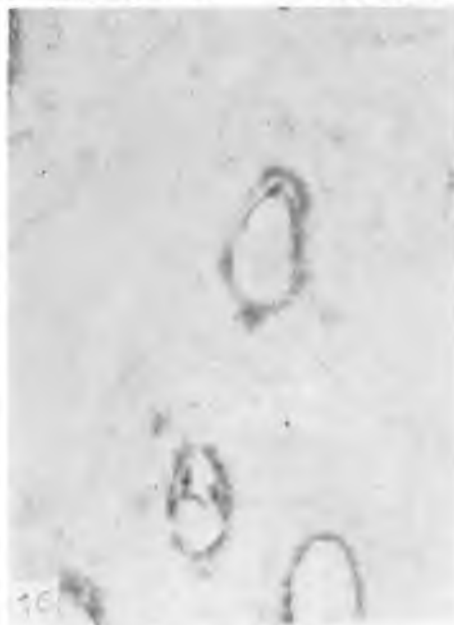
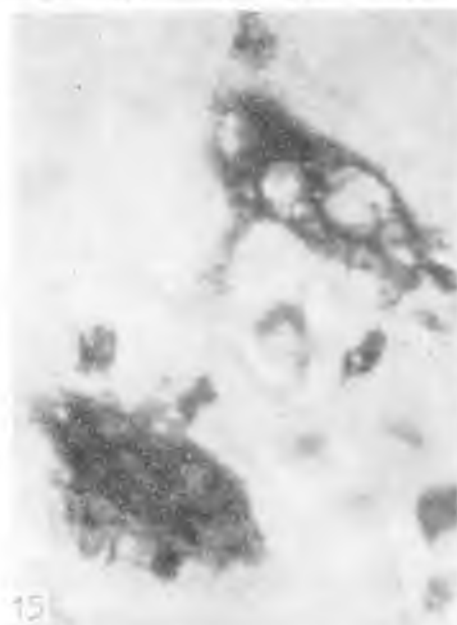
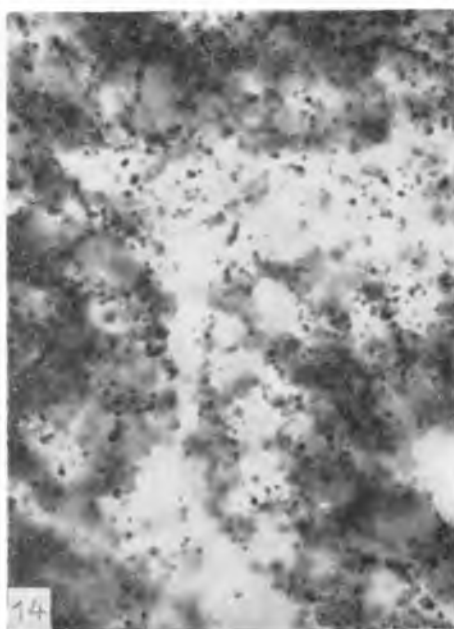
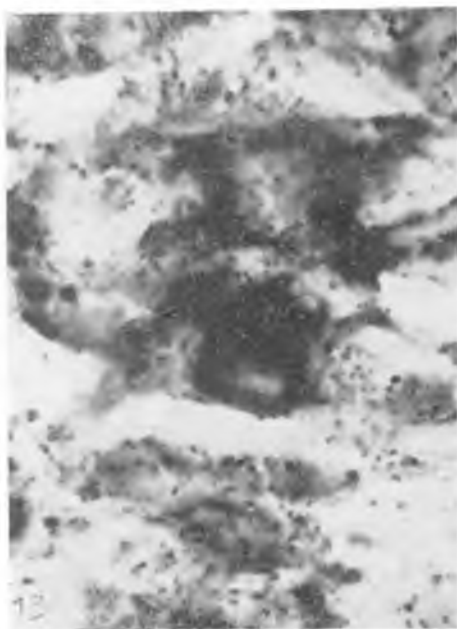
Fig. 18. Section from stage II, group C. Staining with the Brachet method and Fast Red B. Strong pyroninophile reaction in the cytoplasm of a binuclear cell. Magn. 1200 X.

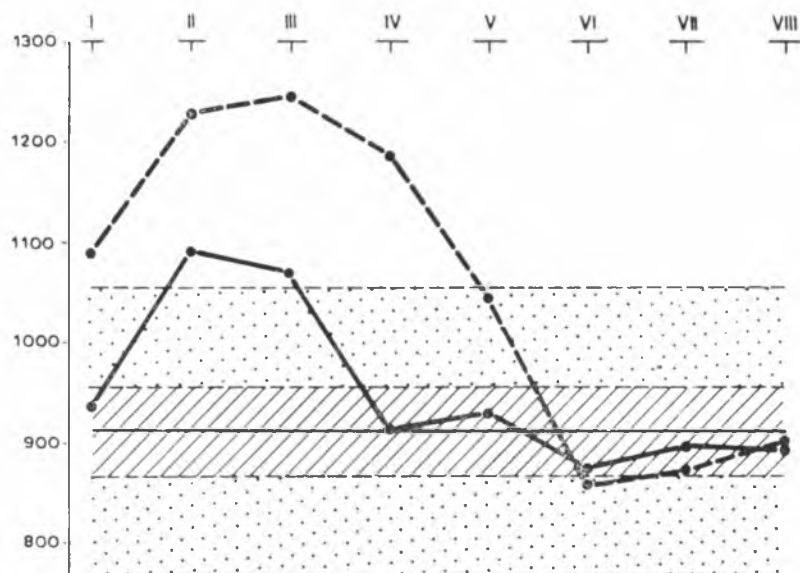
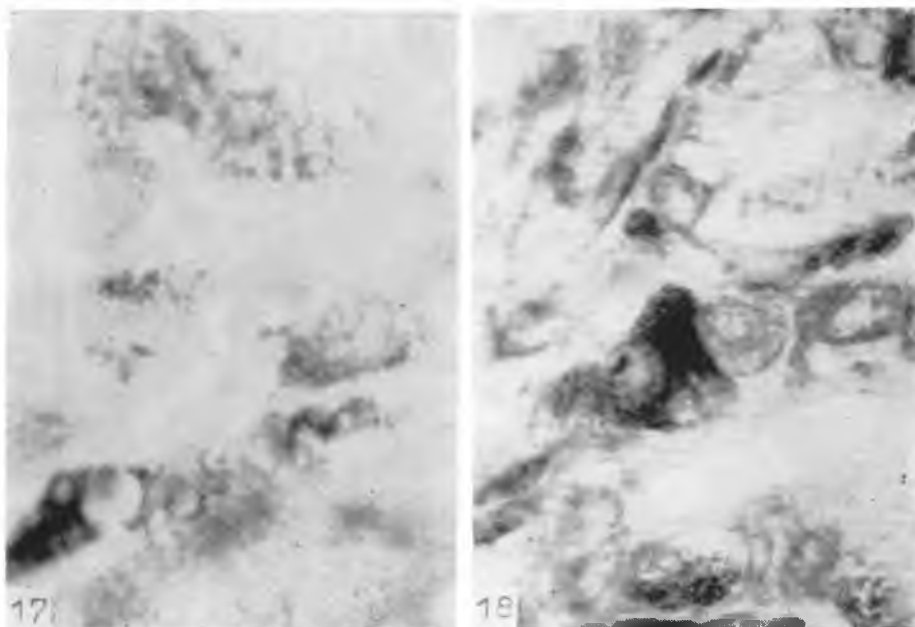
Fig. 19. The number of the enterochromaffin cells in group B (continuous line) and in group C (broken line) in all stages. Broken line belt indicates 95% confidence interval for mean number of cells in group B or C. Dotted line belt indicates interval made by mean number of cells \pm two standard deviations — for groups B or C.











Ryc. 19

