

DANUTA DZIEKANOWSKA, ANDRZEJ NOWAK

BADANIA NAD REGULACJĄ AKTYWNOŚCI MITOTYCZNEJ U MYSZY BIAŁEJ

CZ. I. DOBOWA ZALEŻNOŚĆ POMIĘDZY POZIOMEM CUKRU WE KRWI
A AKTYWNOŚCIĄ MITOTYCZNĄ NABŁONKA ROGÓWKI OKA

Z Zakładu Biologii Ogólnej Śląskiej A. M. w Zabrze-Rokitnicy
Kierownik: doc. dr R. Wróblewski

Problem aktywności mitotycznej jest niezmiernie istotny dla całego szeregu procesów leżących u podstawy istnienia organizmu i jego samozachowania. Od ilości dzielących się komórek zależy tempo wzrostu organizmu w embriogenezie oraz zachowanie kształtów i proporcji między narządami w organizmie definitywnym. Związane jest z nim tempo fizjologicznej wymiany komórkowej, a więc regeneracji fizjologicznej jak również przebieg procesów reparatywnych, w tej liczbie i regeneracji pourazowej. Nadmierne ilości dzielących się komórek mogą doprowadzić do bujania tkanek, może wystąpić proces nowotworzenia.

Poznano dotąd szczególnie dokładnie morfologię podziału pośredniego, poznano cały arsenał czynników nań wpływających, dużo także wiemy dziś o czynnikach działających mitogennie czy antymitotycznie, natomiast nieporównanie skromniejsze są nasze dane o fizjologii podziału komórkowego, czy też o problemie regulacji odnowy komórkowej organizmu i stosunku aktywności mitotycznej do mechanizmów korelacyjnych ustroju.

Szerzej zagadnienie to opracowali m. in. *Bullough* [2, 3, 4], *Zalkind* i *Utkin*, *Utkin*, *Kosiczenko* i *Butniew*, *Utkin* i *Mowczan*. Stwierdzili oni występowanie rytmu dobowego aktywności mitotycznej poszczególnych tkanek i narządów. Autorzy ci — celem ustalenia przyczyn warunkujących owe dobowe wahania — zajmowali się ustaleniem powiązań pomiędzy aktywnością mitotyczną, a różnymi procesami fizjologicznymi zachodzącymi w organizmie oraz fizjologicznymi czynnikami środowiska. Obserwacje wspomnianych badaczy wskazują na ścisłe powiązania pomiędzy rytmem dobowym aktywności mitotycznej, a dobowymi wahaniami natężenia procesów energetycznych organizmu. Ponieważ substancją ener-

godajną są przede wszystkim węglowodany, zwrócono uwagę na związek pomiędzy ilością cukru w organizmie, a ilością dzielących się komórek.

Zależność między poziomem cukru we krwi, a aktywnością mitotyczną w warunkach fizjologicznych jak i eksperymentalnych (np. iniekcje glikozy) badał zwłaszcza Bullough [4], używając jako tkanek testową naskórek małżowiny usznej. Wyniki uzyskane na tej tkance nie dają się w pełni uogólnić, ponieważ niektóre tkanki mogą ujawniać indywidualną rytmiczność dobową aktywności mitotycznej — np. węzły limfatyczne [1, 2]. W związku z tym otwarty jest nadal problem zależności między poziomem cukru we krwi, a aktywnością mitotyczną w innych tkankach i narządach. Ponieważ wielu badaczy od dawna uważa za szczególnie dobry test mitotyczny nabłonek rogówki oka, postanowiliśmy zbadać zależność tę w tym narządzie.

W naszych badaniach użyliśmy samca myszy białej dla wykluczenia wahań w natężeniu aktywności mitotycznej związanych ze zmiennym poziomem hormonów płciowych w cyklu rujowym samic [6].

METODYKA

Doświadczenia przeprowadziliśmy w marcu 1959 r. W tym czasie dzień trwał od godziny 6 do 18, a od 18 do 6 zwierzęta przebywały w ciemności. Temperatura pomieszczenia wynosiła przez cały czas ok. 18°C. Zwierzęta karmione były typowo (owies, pszenica, bułki, mleko) stale między godziną 14 a 15. Do badań użyliśmy 60 sześciomiesięcznych samców myszy białej z długoletniej hodowli naszego Zakładu. Myszkę podzielono na 12 grup po 5 zwierząt w każdej. Poszczególne grupy dekapitowano co dwie godziny.

Poziom cukru we krwi oznaczaliśmy metodą Hagedorna-Jensena. Z rogówek utrwalanych przez półtorej godziny płynem Carnoy wykonaliśmy preparaty totalne, barwiono je hematoksyliną żelazistą wg Heidenhaina. Ilość mitoz liczone na powierzchni 1 mm².

WYNIKI

Jakkolwiek w czasie doświadczenia staraliśmy się zapewnić jednakowe warunki środowiskowe dla wszystkich zwierząt, stwierdziliśmy dość dużą zmienność indywidualną u poszczególnych osobników, co w zasadzie zgadza się z wynikami innych autorów [2, 10]. W obrębie poszczególnych grup (dane od 5 zwierząt) obliczano średnią arytmetyczną zarówno dla poziomu cukru we krwi jak i dla ilości podziałów komórkowych. Otrzymane wartości przedstawia tab. 1 i ryc. 1.

Największą ilość podziałów komórkowych obserwowano w godzinach porannych (szczyt aktywności mitotycznej o godz. 6), najmniejszą ilość dzielących się komórek — w godzinach wieczornych (18—20).

Krzywa poziomu cukru we krwi posiada dwa szczyty — o godz. 8 i o 16 oraz dwa minima — o 6 i o 12.

Tabela 1. Dobowa zmienność aktywności mitotycznej w nabłonku rogówki oka oraz poziom cukru we krwi u samca myszy białej. Dane są średnimi wartościami obliczonymi dla 5 zwierząt w każdej grupie,

Table 1. Diurnal mitotic activity changes in the corneal epithelium and the level of blood sugar in male white mice. The data represent mean values calculated for groups of five animals.

Godz. 1)	Średnia ilość mitoz na pow. 1mm ² 2)					Średni poziom cukru we krwi w mg% ± średni błąd 8)
	Profaza 3)	Metafaza 4)	Anafaza 5)	Telofaza 7)	Razem ± średni błąd 7)	
02	43	82	22	16	113 ± 13,10	80 ± 6,16
04	80	68	14	18	180 ± 21,00	70 ± 3,60
06	90	62	40	31	223 ± 22,40	67 ± 4,58
08	44	51	25	16	136 ± 11,90	142 ± 11,50
10	54	53	12	16	135 ± 14,70	135 ± 6,70
12	34	27	16	20	97 ± 6,08	93 ± 8,90
14	19	17	14	6	56 ± 11,60	135 ± 5,83
16	11	6	4	3	24 ± 6,25	177 ± 10,60
18	5	2	0	0	7 ± 4,12	142 ± 7,80
20	4	3	1	1	9 ± 6,78	81 ± 7,28
22	16	11	6	5	38 ± 7,87	70 ± 9,10
24(0)	21	8	5	4	38 ± 6,63	76 ± 8,06

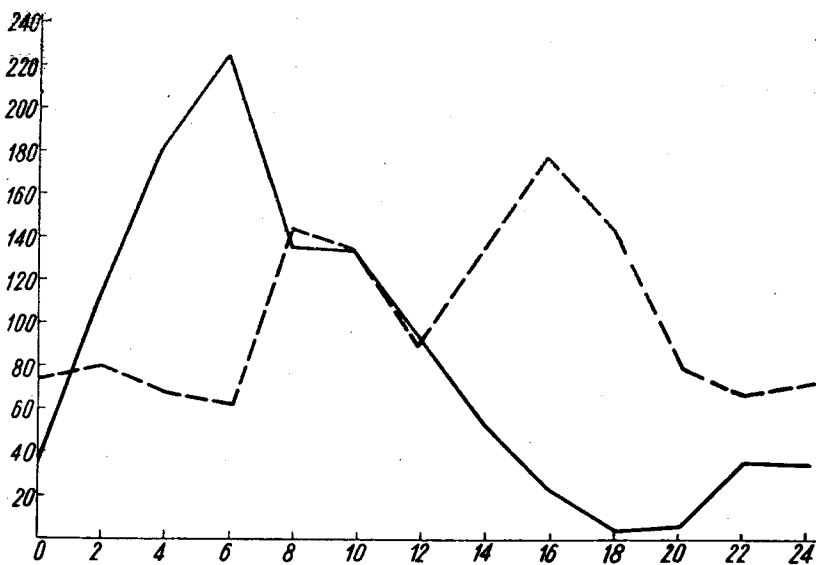
Hours 1); Average number of mitosis in 1sqmm 2); Prophase 3); Metaphase 4); Anaphase 5); Telophase 6); Total ± average error 7); Mean blood sugar level in mg% — ± average error 8).

Przeprowadzone obserwacje aktywności życiowej badanych zwierząt wykazały, że w ciągu doby dwukrotnie objawiały wzmożoną ruchliwość (rano po przebudzeniu — godz. 6—8 i w porze karmienia).

OMÓWIENIE WYNIKÓW

W szeregu prac poświęconych problemowi rytmiczności dobowej podziałów komórkowych spotyka się duże niezgodności pomiędzy wynikami poszczególnych badaczy. Tak np. w interesującej nas rogówce oka myszy *Ortiz-Picon* stwierdza maksimum aktywności mitotycznej w południe

(szczyt o 12 godz.), *Carleton* — maksimum w nocy, *Blumenfeld* — maksimum przed południem (między 8 a 12), *Cooper* i *Franklin* — maksimum o 10 (wg *Zatkinda* i *Utkina* 1951). Badacze fińscy [9] obserwują maksimum po północy i rano, minimum po południu i wieczorem. Badania swoje przeprowadzili oni w czerwcu, kiedy w Finlandii noc ogranicza się tylko do krótkich zmierzchów — czyli w warunkach oświetlenia zupełnie innych niż u nas. Wyniki autorów fińskich mimo tak odrębnych warunków eksperymentalnych, zwłaszcza oświetlenia zwierząt, są najbardziej zbliżone do



Ryc. 1. Dobowa krzywa aktywności mitotycznej w nabłonku rogówki oka (linia ciągła) w porównaniu z dobową krzywą poziomu cukru we krwi (linia przerywana).

Fig. 1. Curve of diurnal mitotic activity in the corneal epithelium (continuous line) compared with that of diurnal changes in blood sugar level (broken line).

naszych obserwacji. Podać można by w wątpliwość twierdzenie *Carletona*, który uważa, że rytm dobowy aktywności mitotycznej zależy od długości dnia i ilości światła. *Bullough* [2, 3] oraz *Vasama* i *Vasama* wskazali na odwrotną proporcjonalność ilości podziałów komórkowych do aktywności życiowej zwierząt doświadczalnych. Wyniki nasze zdają się przemawiać raczej za tym stanowiskiem. Istotnie bowiem w okresie snu nocnego obserwujemy zwiększenie ilości dzielących się komórek. Natomiast od momentu przebudzenia się zwierząt poprzez cały dzień ilość mitoz w rogówce wyraźnie spada. *Bullough*, który najintensywniej z badaczy analizował tempo pojawiania się mitoz stwierdza jednakże dwa maksima aktywności mitotycznej: o godz. 6 i 14 oraz dwa minima: o 10 i 22, tak że kształt krzy-

wej aktywności mitotycznej w jego pracach jest znacznie odbiegający od naszej krzywej. Nie przypuszczamy, by różnice w wynikach *Bullough'a* i naszych spowodowane były użyciem innej tkanki do badań, ponieważ *Bullough* [2] interesując się przede wszystkim naskórkiem małżowiny usznej uzyskał podobną dwuszczytowość maksimów i dwuszczytowość minimumów również dla szeregu innych narządów (nabłonek przełyku, nabłonek skóry grzbietu, nabłonek cewek najądrza, błona śluzowa dwunastnicy) przy czym minima i maksima przypadają o tej samej porze dnia i nocy. Różnice pomiędzy wynikami *Bullough'a* i naszymi wynikają najprawdopodobniej z różnych pór karmienia zwierząt. W naszym przypadku między godz. 14 a 15, *Bullough* — między 9 a 10, co z kolei wpływa na ich aktywność życiową. Zwierzęta *Bullough'a* po okresie większej ruchliwości w czasie karmienia śpią ponownie, co wpływa pobudzająco na ich aktywność mitotyczną i stąd naszym zdaniem drugi szczyt. Nasze zwierzęta natomiast czuwają cały dzień.

Aktywność życiowa związana jest bezpośrednio z poziomem cukru we krwi, tak że ruchliwości zwierzęcia towarzyszy wzrost ilości cukru we krwi, w okresie spoczynku natomiast ilość cukru we krwi spada [4]. Związek ten wyraźnie i dobitnie występuje na naszym wykresie. W godzinach od 6 do 8 zwierzęta po przebudzeniu przejawiają większą ruchliwość i — jak widać — poziom cukru wyraźnie się podnosi. To samo obserwujemy w godzinach popołudniowych, kiedy zwierzęta biegają po klatce w poszukiwaniu pokarmu oraz w czasie karmienia. Następnie wraz ze zmniejszeniem ruchliwości obniża się poziom cukru we krwi, osiągając minimum podczas snu. W warunkach fizjologicznych dobowa zmienność poziomu cukru we krwi jest więc w pewnym przybliżeniu odwróceniem dobowej zmienności aktywności mitotycznej.

WNIOSKI

1. W doświadczeniach stwierdzono istnienie rytmu dobowego aktywności mitotycznej w nabłonku rogówki oka ze szczytem o godz. 6 i minimum w godz. 18—20.

2. Jednoszczytowa krzywa uzyskana przez nas dla aktywności mitotycznej zgadza się z wynikami *Carletona* oraz *Vasama* i *Vasama*, natomiast nie pokrywa się z wynikami *Bullough'a*, który otrzymał krzywą dwuszczytową, naszym zdaniem spowodowaną innym okresem karmienia.

3. Obserwacje wykazały związek pomiędzy poziomem cukru we krwi a aktywnością mitotyczną w nabłonku rogówki oka. Zależność ta jest w pewnym przybliżeniu odwrotnie proporcjonalna, co zgadza się z wynikami badań *Bullough'a* przeprowadzonych na naskórku małżowiny usznej.

4. Stwierdziliśmy, że poziom cukru we krwi i aktywność mitotyczna nabłonka rogówki oka są powiązane z aktywnością życiową zwierząt. Poziom cukru we krwi jest wprost proporcjonalny do aktywności życiowej zwierząt, natomiast aktywność mitotyczna jest odwrotnie proporcjonalna do ich aktywności życiowej.

Д. Дзекановска, А. Новак

ИССЛЕДОВАНИЯ РЕГУЛЯЦИИ МИТОТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ У БЕЛОЙ МЫШИ

Ч. I. Зависимость между уровнем сахара в крови и митотической активностью эпителия роговицы глаза в течение суток

Содержание

Проведенные исследования имели в виду установить зависимость между суточной изменчивостью митотической активности эпителия роговицы самца белой мыши и суточными колебаниями уровня сахара в его крови. Опыты проводились на шестидесяти шестимесячных самцах. В течение суток через каждые два часа были декапитированы по пять животных. Уровень сахара в крови исследовался по методу Гагендорна Енсена. Тотальные препараты роговиц окрашивались железистым гематоксилином Гайденгайна.

Самое большое количество митозов наблюдалось утром (наибольшее в 6 часов утра), самое меньшее — вечером (в 18—20 часов), что соответствует результатам аналогичных исследований Карлетона, а также Васамы и Васамы. Разница между результатами проведенных исследований и исследований Белефа (2), который получил два максимума и два минимума митотической активности, объясняется, как полагают авторы, вероятно тем, что животные получали у него корм в разное время дня. Сравнивая суточные колебания митотической активности с суточными колебаниями уровня сахара в крови, авторы установили зависимость, приближающуюся к обратному пропорциональному соотношению.

Авторы связывают ритмичность митотической активности в течение суток прежде всего с двигательной активностью животных, а не с временем дня. В данном случае они основываются на том, что в проведенных опытах самый низкий показатель митотической активности приходился на время наибольшей активности животных (после пробуждения и во время кормления) и наоборот, наибольшее количество митозов наблюдалось во время сна.

D. Dziekanowska, A. Nowak

STUDIES ON MITOTIC-ACTIVITY CONTROL IN WHITE MICE

Part I. Diurnal relation between the blood-sugar level and the mitotic activity in the corneal epithelium

Summary

The investigations were designed to determine the relation between the diurnal changes as of mitotic activity in the corneal epithelium and blood sugar level in male white mice. The animals, 6 months old, were decapitated in groups of five every

two hours (from 02 to 24 o'clock). Blood sugar level was determined after the method of Hagedorn-Jensen, and mitotic activity in cornea preparations stained in toto with iron haematoxylin after Heidenhain.

The number of mitosis was highest in the morning (peak at 6 a. m.) and lowest in the evening (6—8 p. m.), which accords with the results of Carleton and Vasama and Vasam. The difference between our results and those of Bullough, who recorded two peaks and two lows of mitotic activity, are likely to be attributable to differences in feeding time. By comparing mitotic activity with blood-sugar level, changes of the two were found to be roughly inversely proportionate.

The diurnal rhythm of the mitotic activity probably depends not so much on the time of the day as on the animal's motor activity, for in our experiments it was least when the animals were most active (after waking and after feeding), and highest during sleep.

PIŚMIENICTWO

1. *Bogojawlenskij J. K.*: Dokł. A. N. S. S. R. 1957, 113, 428.
2. *Bullough W. S.*: Proc. Soc. Roy. Soc. B. 1948, 135, 212.
3. *Bullough W. S.*: Proc. Roy. Soc. B. 1948, 135, 234.
4. *Bullough W. S.*: J. Exp. Biol. 1949, 26, 83.
5. *Bullough W. S.*: Nature, London 1949, 163, 680.
6. *Lane Davis*: Anat. Rec. 1939, 73, 429.
7. *Utkin J. A., Kosiczenko Ł. P., Butniew J. P.*: Biułł. eks. biol. i med. 1956, 42, 60.
8. *Utkin J. A., Mowczan O. T.*: Biułł. eks. biol. i med. 1958, 45, 107.
9. *Vasama R., Vasama R.*: Acta Anat. 1958, 33, 230.
10. *Załkind S. J., Utkin J. A.*: Usp. Sowr. Biol. 1951, 31, 23.

Otrzymano: 29. 3. 1960.

Adres autorów: Zabrze 8-Rokitnica, Śl. A. M., ul. Karola Marksa 19.