

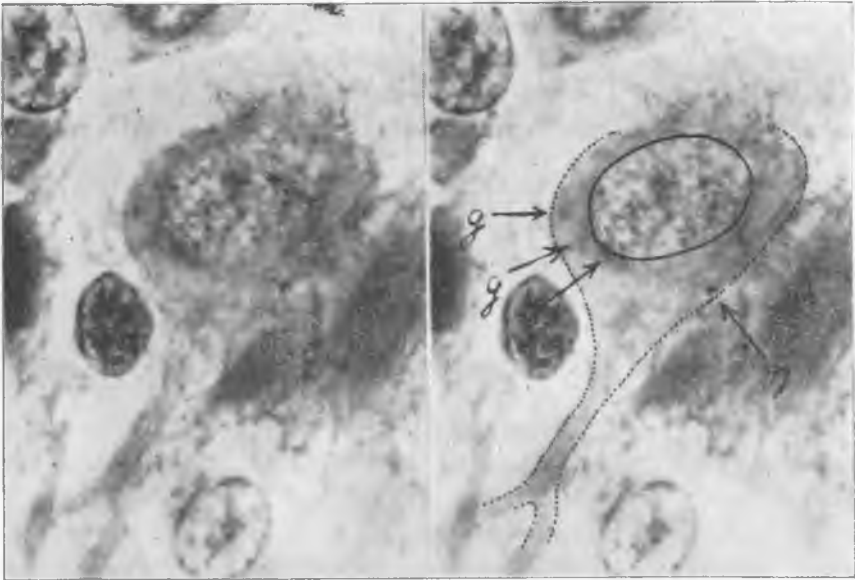
lobus dorsalis, lobus lateralis) u ślimaków *Limnaea stagnalis* L., *Paludina vivipara* L. i *Planorbis corneus* L., doszliśmy do przekonania, że ziarenka i wodniczki znajdujące się w cytoplazmie są wydzieliną i mogą świadczyć o czynności gruczołowej komórek nerwowych. Ilość i wielkość ziarenek oraz wodniczek w różnych komórkach była różna, co mogło być wyrazem stanu czynności wydzielniczej neuronów. Nie można było jednak stwierdzić współzależności czynnościowej pomiędzy grudkami zasadochłonnymi Nissla a substancją neurowydzieliny. Istniało natomiast wielkie podobieństwo pomiędzy układem sferoidalnym Golgiego a ziarenkami i wodniczkami neurowydzieliny. Tak bowiem ziarenka, jak i wodniczki stanowiły najprawdopodobniej jedną z faz czynnościowych układu Golgiego, co nie wykluczało również możliwości udziału jądra w wytwarzaniu neurowydzieliny. Przeprowadzone badania cytochemiczne nie określiły charakteru chemicznego ziarenek i wodniczek. Nie były one kuleczkami tłuszczowców prostych, a także próby na tłuszczowce złożone, cholesterol i glikogen dawały wyniki ujemne. Również odczyn Feulgena na kwas dezoksyrybonukleinowy dawał zawsze wynik ujemny.

W 1941 roku G o m o r i opracował sposób barwienia umożliwiający wykazanie w komórkach zwojowych międzymózgowia drobnych ziarenek, które, jak późniejsze obserwacje potwierdziły, są neurowydzieliną, a może nawet i neurohormonem. B a r g m a n n (1949), B a r g m a n n i H i l d (1949) oraz H i l d (1950, 1951) przeprowadzając badania na mózgach psów, kotów, żab (*Bufo vulgaris*, *Rana esculenta*, *Rana fusca*) i ryb (*Tinca vulgaris*) wykazali, że ziarenka zabarwione wg metody G o m o r i e g o w cytoplazmie komórek nucleus praeopticus, nucleus supraopticus i nucleus paraventricularis są wytworem grudek zasadochłonnych Nissla, które są z kolei odprowadzane drogą włókien nerwowych tractus praeoptico-hypophyseus względnie tractus supraoptico-hypophyseus do tylnego płata przysadki mózgowej. Wymienieni badacze dodatni odczyn barwny Gomoriego obserwowali, albo w samych nerwach, albo wzdłuż ich powierzchni zewnętrznej, przy czym zauważyli, że nerwy te tworzą gęstą siatkę w obrębie tylnego płata przysadki. Hild na podstawie wykonanych doświadczeń stwierdził, że nerwy zawierające neurowydzielinę pozostają w czynnościowej współzależności z pituicytami, które pośredniczą w odpływie neurowydzieliny z przysadki do naczyń krwionośnych włosowatych.

S c h i e b l e r (1951, 1952) przeprowadził obserwacje histochemiczne nad ziarenkami neurowydzieliny w komórkach zwojowych mózgu człowieka, psa, kota, królika, wołu, szczura i ryby (*Esox lucius*) i doszedł do przekonania, że są one prawdopodobnie połączeniami białek z cukrowcami i ciałami tłuszczowymi, o charakterze glikolipoproteidów zgromadzonych w tzw. strefie neurowydzielniczej komórki. S c h i e b l e r podkreśla także, że strefa neurowydzielnicza dawała dodatni odczyn na fosfatazę zasadową, kwas l'askorbinowy (witamin C), odczyn Millona i odczyn Hotchkissa z kwasem nadjodowym charakterystyczny dla wielocukrowców.

Cytologiczne i cytochemiczne badania przeprowadzone dotychczas przez różnych autorów nie omawiają stosunku czynności-

wego jaki zachodzi pomiędzy ziarenkami neurowydzieliny a 1) grudkami zasadochłonnymi Nissla, 2) kwasami dezoksyrybonukleinowym jądra i rybonukleinowym jąderka oraz protoplazmy. Określenie tego stosunku postanowiliśmy przeprowadzić w komórkach nerwowych międzymózgowia żaby wodnej (*Rana esculenta*), posługując się dostępnymi do wykonania w naszej



Ryc. 1. **Nucleus praeopticus żaby wodnej.** Komórka zwojowa, w której wykazano jedno ziarenko neurowydzieliny (n), oraz duże grudki Nissla (g) na obwodzie. Jądro komórki posiada luźny zrąb chromatynowy, chromatyna przyjąderkowa i jąderko wyraźne. Barw. hematoksylina chromowa. Mikrofot. ROW. pow. ca 2400 ×.

pracowni metodami histochemicznymi. Oznaczenie czynnościowej współzależności pomiędzy kwasami nukleinowymi a chondriomem oraz aparatem Golgiego i fosfatazami prowadzące do bliższego poznania dynamiki przejawów życiowych komórki, znalazło już wyraz w otrzymanych wynikach badań prowadzonych na surowicznych i śluzowych komórkach gruczołowych (Grzycki 1953).

Material i metodyka badań

Badania przeprowadzono na komórkach zwojowych nucleus praeopticus międzymózgowia dorosłych żab wodnych (*Rana esculenta esculenta*), samicach, wagi od 40—60 g:

1) z okresu kopulacji i składania jaj (maj, czerwiec — żaby Nr 4—6, 109—113, 149—153, 189—193 i 229—233);

2) z okresu snu zimowego (grudzień, styczeń — osobniki przebywały w terarium przy możliwie dokładnie zachowanych warunkach naturalnych, żaby Nr 7—9, 44—53, 114—118, 154—158, 194—198 i 234—238);

3) poddanych działaniu temperatury $+ 20^{\circ}$ C (żaby Nr 10—12, 54—63, 119—123, 159—163, 199—203, 239—243) i

4) poddanych działaniu temperatury $+ 30^{\circ}$ C (żaby Nr 13—15, 64—73, 124—128, 164—168, 204—208 i 244—248) w termostacie przez 1—8 godzin, a nawet 10 godzin;

5) poddanych działaniu temperatury 0° C (żaby Nr 16—18, 74—83, 129—133, 169—173, 209—213 i 249—253);

6) poddanych działaniu temperatury $- 2^{\circ}$ C (żaby Nr 19—21, 84—93, 134—138, 174—178, 214—218, 254—258) oraz

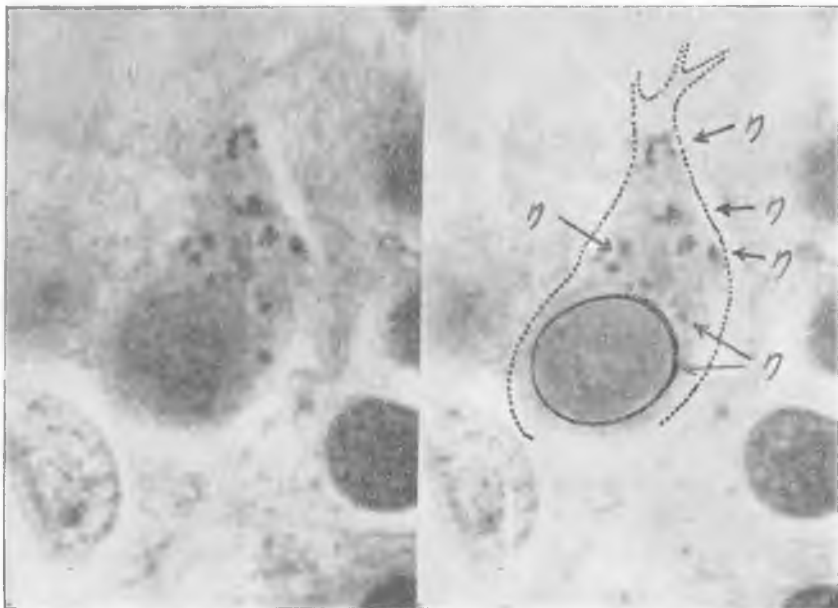
7) poddanych działaniu temperatury $- 5^{\circ}$ C (żaby Nr 22—23, 94—103, 139—143, 179—183, 219—223 i 259—263) w lodówce przez 3—6 godzin;

8) pozostających w temperaturze $+ 18^{\circ}$ C, jako żab kontrolnych (żaby Nr 1—3, 24—33, 104—108, 144—148, 184—188 i 224—228).

Mózgi utrwalano w alkoholu bezwodnym, w alkoholu 96%, formolu obojętnym 1:9, w płynie Zenker-formolu, w mieszaninach Bouina, Carnoya, Krallingera, oraz w sublimacie 6% z dodatkiem kwasu octowego. Skrawki seryjne każdego mózgu (międzymózgowia), grubości 8—10 mikronów, ułożone obok siebie na szkiełku podstawowym, barwiono hematoksyliną + eozyną, hematoksyliną żelazistą wg Regauda (barwienie kontrolne, żaby Nr 1—23), błękitem tołuidyny wg Nissla (żaby Nr 104—143), oraz hematoksyliną chromową Gomoriego wg Bargmanna i Schieblera (żaby Nr 24—103).

Kwasy nukleinowe w jądrach, jąderkach i cytoplazmie komórek zwojowych międzymózgowia wykazano wg metody Feulgen-Rossenbecka używając odczynnika Schiffa i podbarwiając zielenią jasną (żaby Nr 144—183) oraz wg metody Unny barwiąc preparaty

zielenią metylową i pyroniną (żaby Nr 224—263). Ponieważ pyroninochłonność, jak podaje Lis on (1953), nie jest wyłączną cechą kwasu rybonukleinowego, sporządzono dodatkowo preparaty barwiąc skrawki barwnikami May-Grünwalda i Giemzy wg metody Jacobsona i Webba (żaby Nr 184—223). Metoda ta pozwala zabarwić na kolor purpurowo czerwony struktury jądra zawierające kwas dezoksyrybonukleinowy, podczas gdy jąderko (niezawsze dobrze barwiące się) i cytoplazma, które zawierają kwas rybonu-



Ryc. 2. **Nucleus praeopticus żaby wodnej.** W komórce zwojowej widoczne są ziarenka Gomori-dodatnie (n), które nagromadzają się w stożku aksonowym i w strefie przyjąderkowej. Jądro komórki posiada strukturę włóknisto ziarnistą, chromatyna przyjąderkowa i jąderko wyraźne. Barw. hematoksylina chromowa. Mikrofot. ROW. pow. ca 2400 ×.

kleinowy barwią się na niebiesko. Kontrolę obecności i umiejscowienia kwasu rybonukleinowego przeprowadzono poddając skrawki działaniu rybonukleazy w ciągu 1 godziny w temperaturze + 37° C. Rybonukleazę otrzymywano z trzustek wołowych wg przepisu Br a c h e t a (1941):

1 kg świeżej trzustki wołowej (3—4 trzustki, średnia waga jednej wynosi około 350 g) oczyszczonej bardzo starannie z tłuszczu i tkanki łącznej, prze-

puszczono przez maszynkę do mięsa i ucierano w móżdżiezu z 2 objętościami 1/10 N kwasu octowego. Pozostawiono przez noc i następnie mieszając pałeczką szklaną gotowano przez 10 minut na łaźni wodnej. Przesączono, a filtrat zobojętniono stężonym NaOH, po czym powtórnie przesączono i dializowano 15 godzin w wodzie destylowanej. Płyn dializowany odwirowano i odpipetowano do szklanego naczynia uprzednio wyjałowionego. Płyn był barwy żółtawej. Przechowywano go w lodówce na lodzie, szybko traci swoją wartość.

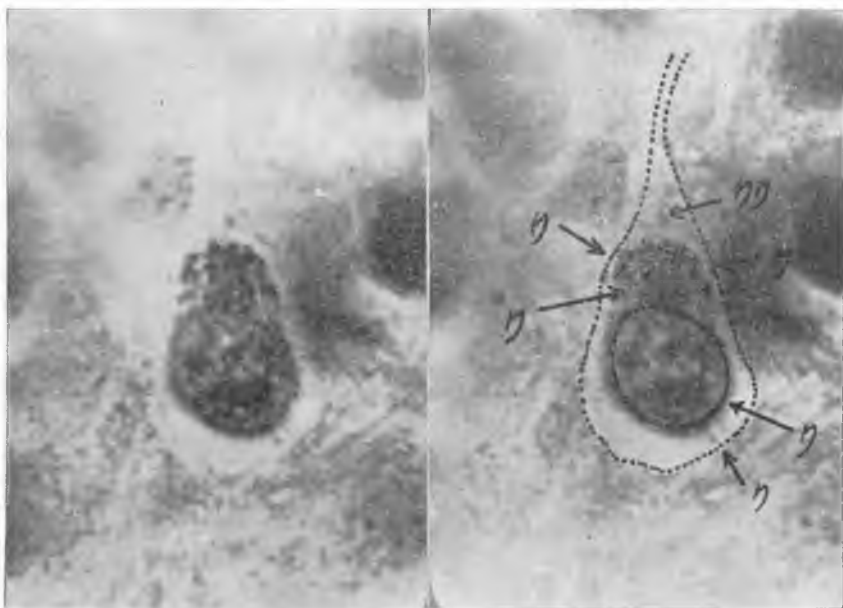
Po zadziałaniu rybonukleinazą i następowym barwieniu wg metody Unny pozostawał w jądrach komórek zabarwiony tylko kwas dezoksyrybonukleinowy na kolor zielony względnie zielony z odcieniem niebiesko fioletowym. To niejednakowe zabarwienie jąder, jak wydaje się nam, mogło być powodowane albo obecnością innych jeszcze składników jądra występujących obok kwasu DRN, jak np. kwasu RN, albo nieodpowiednio dobranym okresem trawienia rybonukleinazą (tylko 60 minut) i nieodpowiednią temperaturą (+ 37° C). Dla wyjaśnienia tego prowadzone są badania w naszej pracowni. Zdajemy sobie jednak sprawę, że dla dokładniejszych badań należy używać wyłącznie rybonukleinazy krystalicznej przygotowanej wg metody Mc Donald a (J. Gen. Physiol. 32, str. 39—42, 1948) pozbawionej innych fermentów proteolitycznych.

Kontrolę obecności i rozmieszczenia kwasu dezoksyrybonukleinowego przeprowadzono na skrawkach niehydrolizowanych ale barwionych fuksyną przez 15—20 minut. W skrawkach tych nie stwierdzono nigdy dodatniego odczynu Feulgena.

Badania własne

Wybiórcze barwienie ziarenek neurowydzieliny (Gomori — dodatnich) według zmodyfikowanej metody Gomoriego wymaga: 1) unikania alkoholowych płynów utrwalających, 2) utleniania odparafinowanych skrawków mikrotomowych w roztworze nadmanganianu potasu z dodatkiem małej ilości kwasu siarkowego, oraz 3) barwienia hematoksyliną chromową Gomoriego sporządzoną w wodnym roztworze ałunu potasowo-chromowego i dwuchromianu potasowego po dodaniu kwasu siarkowego. Utlenianie skrawków przed barwieniem okazało się nieodzowne dla uzyskania zadowalających wyników, natomiast bejcowanie w mieszaninie formolu, nasyconego roztworu wodnego kwasu pikrynowego, kwasu octowego lodowatego i ałunu potasowo chromowego, przez 12—14 godzin, w temperaturze stałej + 36° C — + 37° C, jakoteż

odbarwienie w 2% wodnym pirosiarczynie potasowym względnie 5% kwasie fosfomolibdenowym nie są konieczne. Najlepsze wyniki w naszych badaniach uzyskano po utrwaleniu materiału w płynie Bouina, bejcowaniu przez 20—24 godzin w temperaturze $+ 35^{\circ} \text{C}$, utlenianiu przez 10—15 minut, barwieniu hematoksyliną chromową przez 20—24 godzin i różnicowaniu 5% kwasem fosfomolibdenowym.



Ryc. 3. **Komórka zwojowa nucleus praeropticus żaby wodnej.** Ziarenka Gomori dodatnie (n) nagromadzone w strefie przyjądrowej, a przede wszystkim w stożku aksonowym. Kilka ziarenek (nn) zsunęło się do wypustki nerwowej. Jądro komórki posiada grubą, ziarnistą zgrubienie chromatynowe, przy czym niektóre z ziarenek przypominają chromocentra. Strefa chromatyny przyjądrowej bardzo szeroka, zasłania całkowicie jąderko. Barw. hematoksylina chromowa. Mikrofot. ROW. pow. ca 2400 \times .

Ziarenka neurowydzieliny barwiły się na kolor czarny lub niebiesko czarny, grudki zasadochłonne Nissla na kolor fioletowy, a jądra komórek na kolor czerwony, przy czym niektóre odcinki zrębu jądrowego miały zabarwienie fioletowe, ciemno fioletowe, a nawet niebieskie. Ta wielobarwność jąder, jak można się było później przekonać, uzależniona była prawdopodobnie od faz cyklu

wydzielniczego, a tym samym potwierdzała nasze przypuszczenia, że w procesie wydzielniczym uczestniczy obok cytoplazmy, także jądro komórkowe.

Ilość czarnych ziarenek Gomori — dodatnich w różnych komórkach zwojowych nucleus praeopticus była różna (żaby kontrolne + 18° C Nr 24—33). Widziało się bowiem obok komórek bezzziarnistych, także i takie, w których zabarwione były jedno, dwa, trzy i więcej ziarenek (mikrofot. Nr 1, 2 i 3), oraz komórki, w których ziarenka zgrupowane były tylko na jednym biegunie, albo całkowicie wypełniały komórkę przysłaniając jądro i wciskając się do wypustek cytoplazmatycznych (mikrofot. Nr 3 i 4).

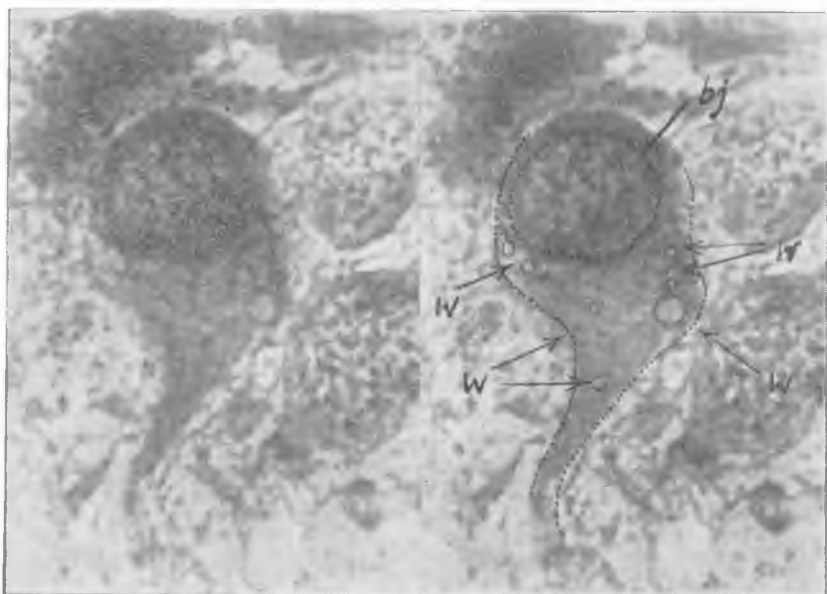
W komórkach bezzziarnistych substancja Nissla występowała w postaci dużych, nieregularnych ziarn lub grudek. Zabarwiała się ona barwnikami zasadowymi bardzo wyraźnie na kolor ciemno niebieski. Słaba barwliwość grudek Nissla, albo nawet całkowity ich brak, spostrzegano w komórkach zawierających duże ilości ziarenek zabarwionych wybiórczo hematoksyliną chromową. W tych ostatnich komórkach oprócz ziarenek neurowydzieliny można było zauważyć występowanie mniejszej lub większej ilości wodniczek, wykazujących słabe zabarwienie przy użyciu metody Gomoriego (mikrofot. Nr 4).

Podkreślić należy, że ziarenka i wodniczki Gomori — dodatnie umiejscowione były, albo w bezpośredniej bliskości jądra, albo na obwodzie komórki, to jest w strefie występowania grudek zasadochłonnych Nissla, albo wreszcie w stożku aksonowym. Ze względu na częstość występowania ziarenek i wodniczek właśnie w stożku aksonowym, wydaje się, iż nie będzie błędem gdy określać go będziemy nazwą bieguna wydzielniczego komórki zwojowej, tym bardziej, że w poprzednich własnych badaniach przeprowadzonych na komórkach nerwowych zwojów mózgowych *Limnaea*, *Faludina*, *Helix* i *Planorbis* zwróciłem również uwagę na występowanie w stożku aksonowym nie tylko ziarenek i wodniczek, ale także strefy czynnościowej Golgiego (Grzycki 1951).

Ziarenka i wodniczki nagromadzające się w stożku aksonowym, okazywały dążność do przesuwania się w kierunku wypustki. Obserwując bowiem przebieg aksonu komórek wypełnionych ziarenkami oraz komórek bezzziarnistych widziało się niejednokrotnie, jak neurowydzielina przesunęła się prawdopodobnie drogą tej wypustki, która dając dodatni odczyn barwny Gomoriego

stała się jak gdyby przewodem wyprowadzającym. Bargmann i Hild (1949) nawet na tej podstawie wykreślają drogi nerwowe śródmózgowo-przysadkowe, łączące komórki zwojowe nucleus praeopticus z tylnym płatem przysadki mózgowej.

Dokonując licznych zdjęć z seryjnych skrawków między-mózgowia można było ułożyć szereg komórek zwojowych będących w różnych fazach wydzielniczych, ilustrujący stopniowe tworzenie się ziarenek i wodniczek Gomori - dodatnich. Szereg ten



Ryc. 4. Komórka zwojowa nucleus praeopticus żaby wodnej całkowicie wypełniona ziarenkami neurowydzieliny, które nawet przeszły już do początkowego odcinka wypustki nerwowej. Zwracają uwagę różnej wielkości wodniczki (w) dające również dodatni odczyn Gomoriego. Błona jądrowa (bj) lekko pomarszczona, zrąb jądrowy grubo ziarnisty. Chromocentra przeważnie zgrupowane tuż pod błoną jądrową. Strefa chromatyny przyjąderkowej szeroka, na zdjęciu mało widoczna. Barw. hematoksylina chromowa. Mikrofot. ROW. pow. ca 2400 X.

rozpoczął się obrazem komórki zawierającej jedno ziarno wydzielnicze, następne dwa, trzy i więcej (mikrofot. Nr 1 i 2), a dalsze obrazy skupianie się grupowe ziarenek w stożku aksonowym (mikrofot. Nr 3), całkowite wypełnienie komórki ziarenkami i wodniczkami (mikrofot. Nr 4) i wreszcie przejście neurowydzie-

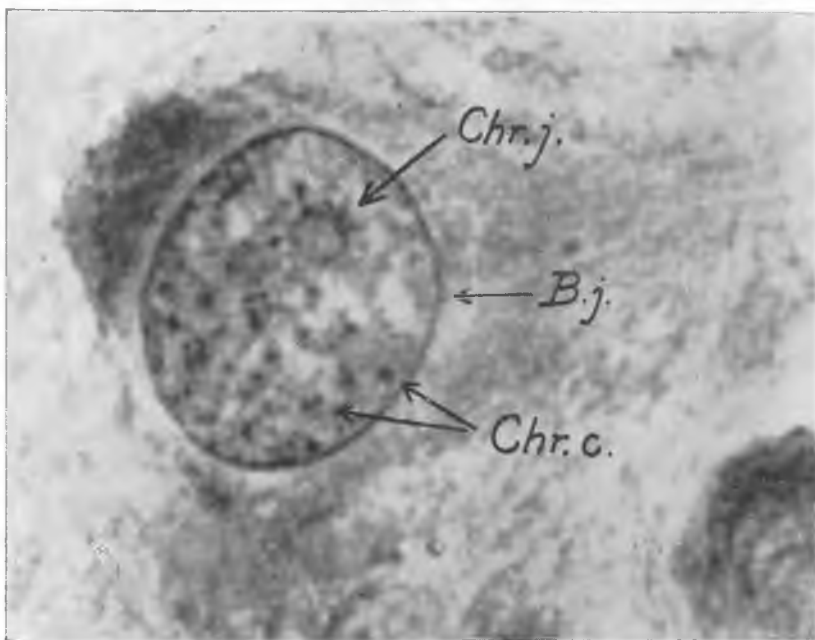
liny do aksonów. Wydawało się, że ten ostatni okres powinien zamykać cykl wydzielniczy, przy czym należało uznać komórki bezzziarniste za pozostające w okresie spoczynkowym, względnie przygotowawczym do nowego cyklu wydzielniczego. Okres spoczynkowy kończył się zatem z chwilą zjawienia się pierwszego ziarenka wydzielniczego w komórkach bezzziarnistych posiadających już „pełny zestaw” grudek zasadochłonnych Nissla. Poddanie więc dokładnej obserwacji grudek Nissla okazało się konieczne ze względu na to, że stanowią one materiał zapasowy (rybonukleoproteidy) biorący udział w metabolizmie komórki i występują zwykle w dużych ilościach w komórkach będących w stanie spoczynku. Za tym przemawiają także wyniki doświadczeń *Hydena* (1947), *Scharrera E.* i *Scharrera B.* (1937), *Lenette i wsp.* (1946) oraz *Scharrera E., Palaya i Nilgesa* (1945), którzy przypisują im bezpośredni udział w procesie neurosekrecji.

Wielkość ziarenek i wodniczek *Gomori* — dodatnich była bardzo różna nawet w jednej i tej samej komórce. Nie była ona uzależniona, jak wydawało się, od ilości, a także od zwartości zespołów grupowych, jakoteż od umiejscowienia bliższego względnie dalszego od jądra komórki. Nie byliśmy w możności stwierdzić, czy większe ziarenka i wodniczki powstają przez wzrost, czy też przez połączenie się w jedną całość małych ziarenek lub wodniczek. Także nie byliśmy w możności stwierdzić czy wodniczki są jedną z faz przemian ziarenek, albo czy są one innym produktem wydzielniczym, nie związanym z ziarenkami, a jednak posiadającym prawdopodobnie podobną budowę chemiczną (dodatni odczyn *Gomoriego*) i stanowiącym konieczny dodatek dla utworzenia pełnowartościowej wydzieliny. Wreszcie nie można dać jeszcze wyjaśniającej odpowiedzi odnośnie powstawania ziarenek i wodniczek neurowydzieliny, a mianowicie czy tworzą się one przy współdziałaniu chondriomu, aparatu siateczkowego *Golgiego*, czy też powstają wyłącznie z grudek Nissla.

Współdziałanie aparatu *Golgiego* w procesie wytwarzania ziarenek neurowydzieliny był obserwowany w poprzednich naszych badaniach prowadzonych na komórkach nerwowych zwojów mózgowych u ślimaków. Dokładne bowiem porównanie umiejscowienia ziarenek i wodniczek neurowydzieliny oraz ziarenek i ciałek sferoidalnych aparatu *Golgiego* pozwoliło sądzić, że neurowydzielina powstaje najprawdopodobniej w wyniku przemian odbywających się w polu *Golgiego*. Uważaliśmy nawet, że ziarenka

neurowydzieliny, podobnie jak ciała sferoidalne, są jedną z faz czynnościowych aparatu Golgiego (Grzycki 1951).

W miarę nagromadzenia się ziarenek Gomori — dodatknych w komórkach zwojowych zmieniały się również obrazy błony jądra. Błona jądra w komórkach przeładowanych ziarenkami i w komórkach bezziarnistych była pomarszczona. Zmarszczki były nierównej wielkości i wysokości, a grubość błony i barwność raczej nie uległy zmianie (mikrofot. Nr 5). Natomiast kario-



Ryc. 5. Jądro komórki zwojowej nucleus praeopticus żaby wodnej. Bj — pomarszczona błona jądrowa. Chr. c. — chromocentra. Chr. j. — chromatyna przyjąderkowa, jąderko duże, słabo barwiące się. Ze względu na skupienie się chromocentrów na obwodzie jądro ma wygląd zbliżony do pustego pęcherzyka. Barw. hematoksyliną chromową, różnicowanie kwasem fosforomolibdenowym. Mikrofot. ROW. pow. ca 4000 ×.

plazma w jednych jądrach wykazywała budowę delikatnej pianki, a w innych posiadała strukturę włóknisto ziarnistą, przy czym grube ziarna przypominające chromocentra występowały zwykle w różnych ilościach i w różnych miejscach. Na ogół układały się one w niewielkiej odległości od błony jądrowej, a przede wszyst-

kim w strefie przyjąderkowej (mikrofot. Nr 5) i okazywały wielobarwność wyrażającą się zmianą zabarwienia czerwonego na fioletowe, ciemno fioletowe lub niebieskie.

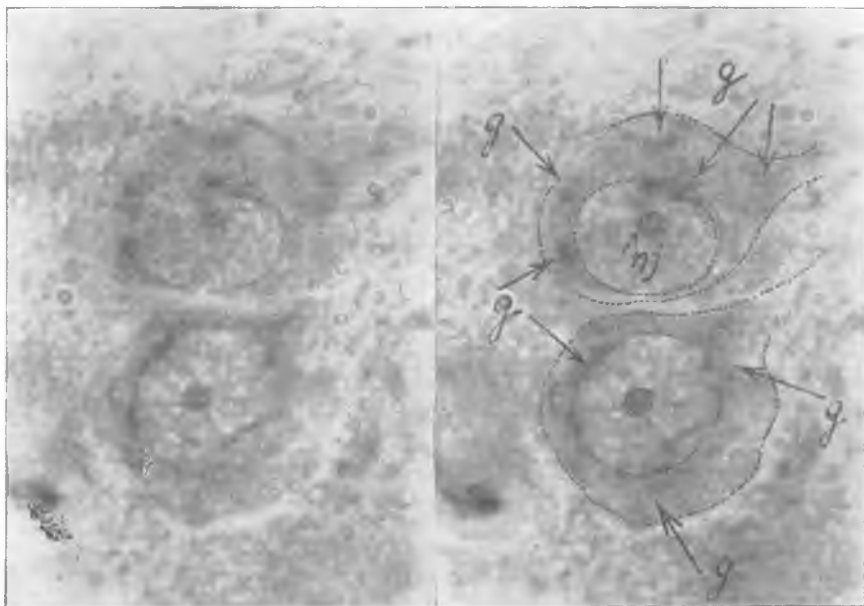
Nie można było doszukać się zasadniczych różnic morfologicznych oraz zmiennej intensywności barwienia hematoksyliną chromową pomiędzy komórkami zwojowymi nucleus praeopticus żab wiosenno-letnich (żaby Nr 34—43), w okresie snu zimowego (żaby Nr 44—53) i żab kontrolnych + 18° C (żaby Nr 24—33). Wyraźne różnice natomiast wystąpiły u żab pozostających w warunkach różnych temperatur. W wypadku bowiem, gdy żaby przebywały w termostacie w temperaturze + 20° C (żaby Nr 54—63) i + 30° C (żaby Nr 64—73) przez krótki okres czasu np. 1/2—2 godzin, to obserwowano się w nucleus praeopticus międzymózgowia znacznie większą ilość komórek wypełnionych ziarenkami Gomori — dodatnimi aniżeli w preparatach żab kontrolnych (temp. + 18° C, żaby Nr 24—33). Jeśli natomiast żaby pozostawały w termostacie w tej samej temperaturze co poprzednie (+ 20° i + 30° C), ale przez 3—8 godzin, wówczas występowały różnej wielkości wodniczki na obwodzie komórek, w stożkach aksonowych i w początkowych przykomórkowych odcinkach wypustek. Barwliwość wodniczek nie była jednakowa, zawsze jednak odczyn po hematoksylinie chromowej był dodatni, mimo, że jedne z nich barwiły się intensywniej, a drugie słabiej. Zmniejszona zasadochłonność chromatyny mogła być wyrazem, albo zmniejszenia ilości kwasu dezoksyrybonukleinowego, albo rozluźnienia struktur chromatyny.

Przetrzymywanie żab w obniżonej temperaturze (0° C — żaby Nr 74—83, — 2° C — żaby Nr 84—93 i — 5° C — żaby Nr 94—103) przez kilka godzin nie powodowało zmian w komórkach zwojowych. Proces wydzielniczy jednak był nieco opóźniony, o czym zresztą świadczyły liczne komórki zawierające małą ilość ziarenek rozrzuconych pomiędzy grudkami Nissla i prawie całkowity brak komórek przeładowanych ziarenkami i wodniczkami.

II

Barwienie wg metody Gomoriego było całkowicie wystarczające dla wykazania grudek zasadochłonnych Nissla i pozwalało przeprowadzić obserwacje porównawcze pomiędzy nimi a ziarenkami i wodniczkami neurowydzieliny. Wykonano także dodatkowo kilka serii preparatów z żab wiosenno-letnich (żaby Nr 109—

113), zimowych (żaby Nr 114—118), i pozostających w skali stosowanych temperatur: $+20^{\circ}\text{C}$ (żaby Nr 119—123), $+30^{\circ}\text{C}$ (żaby Nr 124—128), 0°C (żaby Nr 129—133), -2°C (żaby Nr 134—138), -5°C (żaby Nr 139—143) i kontrolnych $+18^{\circ}\text{C}$ (żaby Nr 104—108), które zabarwiono 0,1% błękitem tełuidynowym wg uproszczonej metody Nissla. Przy pomocy tej metody uzyskano potwierdzenie otrzymanych dotychczas wyników barwienia i przekonano się, że grudki Nissla oprócz tego, że stanowią materiał



Ryc. 6. Komórki zwojowe nucleus praecipuus żaby wodnej. Grudki Nissla (g) zabarwione wg metody Nissla wypełniają prawie całkowicie komórkę. Zwraca na siebie uwagę jąderko (nj) barwiące się również na kolor niebieski. Mikrofot. ROW. pow. ca $2600\times$.

zapasowy biorą także czynny udział w ogólnym metabolizmie i procesach wydzielniczych komórek. Sądzymy bowiem, że zmienność kształtu, rozmieszczenia i ilości grudek Nissla obserwowana w komórkach zwojowych w okresie zwiększania się ilości ziarenek Gomori — dodatnich może być dowodem nie tylko istnienia zależności czynnościowej pomiędzy substancją Nissla a ziarenkami neurowydzieliny, ale nawet może pozwolić na wyrażenie przypuszczenia, że procesy wydzielnicze odbywające się w obser-

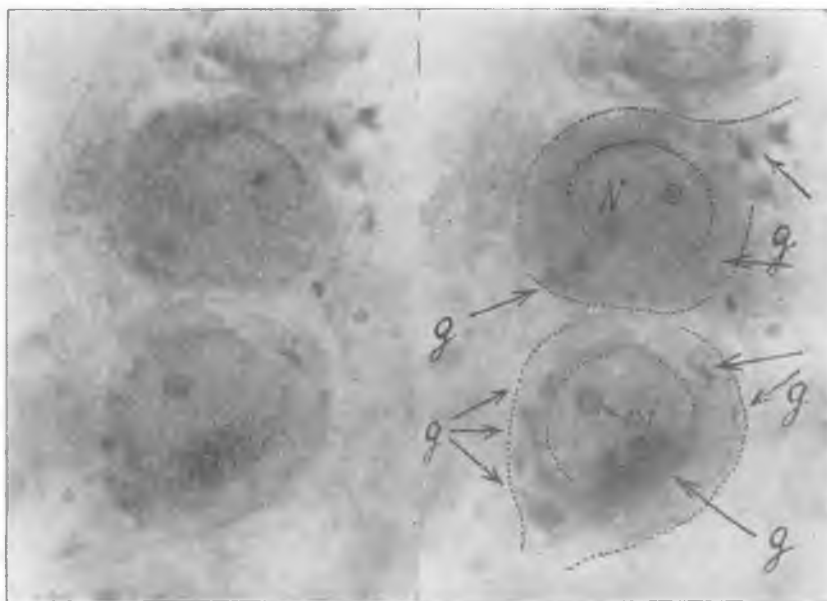
wowanych komórkach charakteryzują się fazowością i cyklicznością. Widziało się bowiem komórki całkowicie wypełnione dużymi i drobnymi grudkami Nissla, które pokrywały jądro i wciśkały się do wypustek. W innych natomiast komórkach grudki Nissla skupione były na obwodzie i tworzyły jak gdyby strefę zasadochłonną, przy czym w strefie tej znajdowało się, albo kilka gruboziarnistych nieregularnych grudek, albo większa ilość złogów drobnoziarnistych. Wreszcie znaleziono także komórki, w których grudki Nissla były pojedyncze, a nawet i takie, w których grudek Nissla nie było. Grudki duże i liczne występowały przeważnie w komórkach, których jądra miały delikatny i słabo barwiący się zrąb chromatynowy. Natomiast grudki nieliczne duże lub drobnoziarniste odpowiadały jądrum, w których włóknistoziarnisty zrąb utworzony był z cienkich ziarnistych nitek i chromocentrow zgrupowanych w strefie przyjądrowej i pod błoną jądrową. Można więc było utrwalić na filmie obrazy komórek, z których, biorąc pod uwagę ilość i rozmieszczenie grudek zasadochłonnych, łatwo ułożyć szereg ilustrujący zmienność obrazów morfologicznych powstałych prawdopodobnie w wyniku przemian fizjologicznych (tabl. ryc. 10).

Grudki Nissla wykazywały zawsze duże powinowactwo do barwników zasadowych. Zmniejszenia zasadochłonności grudek nie spotykano na żadnym preparacie, a tylko ich kształt i wielkość uległy zmianom. Istota chemiczna substancji Nissla jest szeroko dyskutowana w ostatnich dziesięcioleciach przez Gersha i Boddiana, Landströma, Casperssona i Wohlfahrta (1941) i innych.

W komórkach zwojowych nucleus praeopticus ilość i wielkość grudek Nissla pozostawały w odwrotnie proporcjonalnym stosunku do ilości i wielkości ziarenek Gomori — dodatnich (ryc. 10). Stosunek ten był również łatwy do stwierdzenia na wszystkich preparatach barwionych wg metody Gomoriego nie tylko u żab wiosenno-lętnich i zimowych, ale także i u żab pozostających w różnych temperaturach otoczenia. Należało więc w rozpatrywaniu zagadnień wytwarzania neurowydzieliny uwzględnić pośredni lub bezpośredni udział grudek zasadochłonnych Nissla.

Obserwując czarne ziarenka wydzielinę wciśniętą w duże, ciemno fioletowe grudki Nissla, albo ziarenka ściśle otoczone przez grudki, można sądzić, że substancja Nissla ulegając przeróbkom wydziela względnie odłącza od siebie składnik neurowydzie-

liny, a tym samym bierze w jej produkcji udział bezpośredni z pominięciem chondriomu i systemu Golgiego, którym, jak wiadomo, przypisuje się powszechnie znaczny udział w procesach wydzielniczych. W innych natomiast przypadkach stwierdza się tylko podobieństwo umiejscowienia i odwrotnie proporcjonalny stosunek ilościowy. Stąd można myśleć raczej o pośrednim udziale grudek Nissla w wytwarzaniu wydzieliny, która, jak wykazały cytochemiczne badania Schieblera (1952) jest utworzona



Ryc. 7. **Komórki zwojowe nucleus praeropticus żaby wodnej.** Grudki Nissla (g) nieliczne, ułożone przeważnie na obwodzie komórki. Jąderko (nj) duże i wyraźne, daje odczyn barwny podobnie jak grudki Nissla. Barw. błękit toluidyny. Mikrofot. ROW. pow. ca 2600 X.

z glikolipoproteidów, podczas gdy w grudkach Nissla przy pomocy analizy widmowej (światło pozafioletkowe) stwierdzono obecność nukleoproteidów.

Grudki zasadochłonne Nissla mogą być więc prawdopodobnie całkowicie albo prawie całkowicie zużywane względnie przetwarzane przez komórkę w okresie produkcji ziarenek neurowydzieliny. Po ukończonym natomiast procesie wydzielniczym i po przesunięciu się wydzieliny do wypustki, a przed ponownym zja-

wieniem się grudek Nissla, komórki zwojowe nie powinny posiadać ani grudek ani ziarenek. Przypisać się jednak musimy, że takich komórek w obrębie nucleus praeopticus na naszych preparatach nie udało się odnaleźć mimo bardzo dokładnych poszukiwań. Zawsze bowiem po ukończonym procesie wydzielniczym, gdy wydzielina przesunęła się do wypustek, można już było wykazać kilka lub kilkanaście grudek Nissla. Ta obserwacja mogłaby wskazywać, że faza spoczynkowa w komórkach zwojowych wydzielających jest bardzo krótka.

III

Odczyn Feulgena-Rossenbecka, jak podają Stowell (1942, 1946, 1947, 1948) i Stowell i Lee (1950) jest jednym z najbardziej swoistych odczynów histochemicznych dla kwasu dezoksyrybonukleinowego, który wybarwia się na kolor czerwony lub fioletowy. A wg Stacey'a i Hong Fu Li (1949) zmienność intensywności zabarwienia jąder w metodzie Feulgena-Rossenbecka uważać można za powstałą w wyniku zmian ilościowych kwasu dezoksyrybonukleinowego. Biorąc pod uwagę specyficzność odczynu Feulgena-Rossenbecka i możliwość orientowania się w ilościowych zmianach kwasu dezoksyrybonukleinowego poddaliśmy równoległym obserwacjom porównawczym mózgi żab wiosenno-letnich (żaby Nr 149—153), zimowych (żaby Nr 154—158), pozostających w temperaturach $+20^{\circ}\text{C}$ (żaby Nr 159—163), $+30^{\circ}\text{C}$ (żaby Nr 164—168), 0°C (żaby Nr 169—173), -2°C (żaby Nr 174—178), -5°C (żaby Nr 179—183) i kontrolnych $+18^{\circ}$ (żaby Nr 144—148).

Feulgen — dodatnie ziarenka kwasu dezoksyrybonukleinowego występowały w obserwowanych komórkach nerwowych nucleus praeopticus wszystkich badanych mózgow tyko i wyłącznie w jądrach. Ziarenka te w jednych jądrach były równomiernie rozproszone, a w innych stanowiły grudkowate skupienia, zwane chromocentrami, zgrupowane przy błonie jądrowej i przy jąderku (chromatyna przyjąderkowa). Zwracały uwagę trzy typy jąder komórkowych:

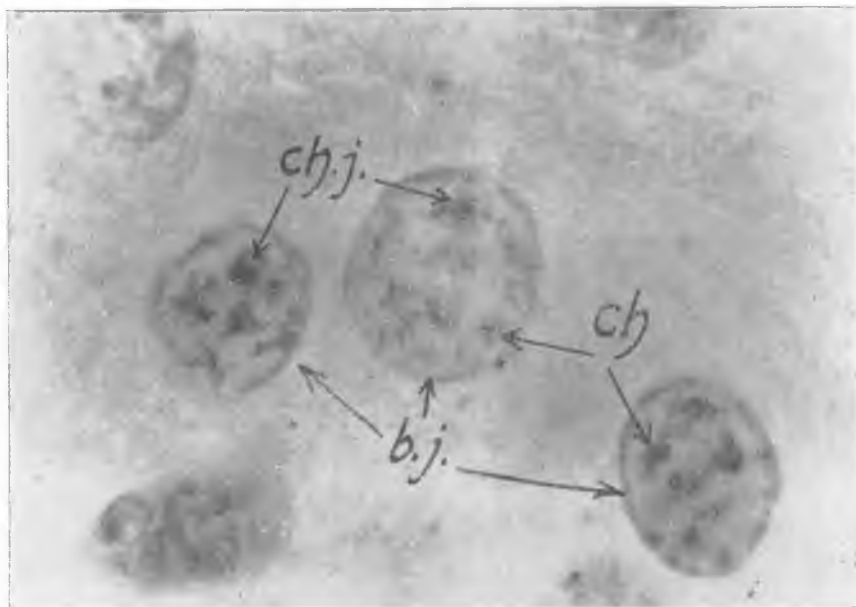
- 1) w których stwierdzało się równomierne rozproszenie kwasu dezoksyrybonukleinowego w karioplazmie, brak dużych grudek Feulgen — dodatnich, błonę jądrową wyraźną, cienką, napiętą, wykazującą zabarwienie delikatne;

- 2) jądra, w których kwas dezoksyrybonukleinowy tworzył małe skupienia przypominające chromocentra Kollera (1947)

rozrzucone nierównomiernie po karioplazmie, strefa chromatyny przyjąderkowej była wyraźna ale wąska, błona jądrowa gładka, cienka, barwiąca się wyraźnie, oraz

3) jądra, w których chromocentra skupione były przy błonie jądrowej i przy jąderku. W ostatnim typie jądro ma wygląd pęcherzyka, którego błona jądrowa jest pomarszczona, a jąderko duże.

Porównanie obrazów tych właśnie jąder z obrazami jąder



Ryc. 8. Jądra komórek zwojowych nucleus praeropticus żaby wodnej. Strefa przyjąderkowa (ch. j.), chromocentra (ch) i błona jądrowa (bj) wyraźne. Barw. wg Feulgena-Rossenbecka. Mikrofit. ROW. pow. ca 2400 ×.

uzyskanymi po zabarwieniu hematoksyliną chromową, hematoksyliną żelazistą, hematoksyliną + eozyną, względnie błękitem toluidynowym, wskazywało na to, że pierwszy typ jądra odpowiada komórce obfitującej w grudki Nissla przed początkiem okresu wydzielniczego, drugi typ występował w komórkach będących w okresie wytwarzania wydzieliny, trzeci zaś cechował komórki wypełnione ziarenkami Gomori — dodatnimi, a zatem po ukończonym procesie produkcyjnym (ryc. 10). Zmniejszenie ilości kwasu dezoksyrybonukleinowego w okresie wytwarzania neuro-

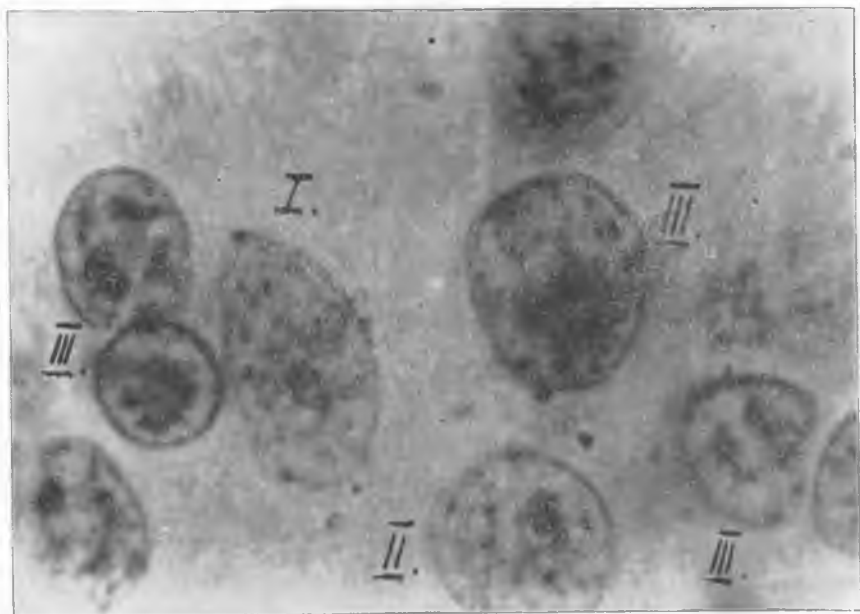
wydzieliny i zanikanie grudek Nissla obfitujących w nukleoproteidy upoważnia do podkreślenia, że ziarenka neurowydzieliny są prawdopodobnie wytworem jądra i grudek Nissla, oraz, że głównym składnikiem chemicznym ziarenek Gomori — dodatnich są białka tworzące kompleksowe połączenia, określone przez Schieblera nazwą glikolipoproteidów.

Zdajemy sobie jednak sprawę, że opierając się wyłącznie na obserwacjach mikroskopowych, nawet gdyby one były najbardziej wnikliwe, można popełnić błędy, ale nie mając w tej chwili innych dowodów, przypuszczamy na podstawie uzyskanych wyników, iż w procesie wydzielniczym komórki nerwowej bierze udział jądro, podobnie, jak w komórkach gruczołowych (Grzycki, Skalska-Vorbrodt i inni). Po zastosowaniu natomiast innych metod uzupełniających i sprawdzających metodę Feulgena odnośnie rozmieszczenia i ilości kwasu dezoksyrybonukleinowego, np. po zastosowaniu metody Unny oraz Jacobsona i Webba, można było również otrzymać odpowiedź, która określa z jednej strony współzależność pomiędzy kwasem dezoksyrybonukleinowym jądra a kwasem rybonukleinowym cytoplazmy, a z drugiej strony pomiędzy kwasem nukleinowym jądra a nukleoproteidami grudek Nissla i glikolipoproteidami ziarenek Gomori — dodatnich.

Do badań uzupełniających i równocześnie sprawdzających zastosowano metodę Unny i metodę Jacobsona i Webba. Do pierwszych użyto mózgi żab wiosenno-letnich (żaby Nr 229—233), zimowych (żaby Nr 234—238), umieszczonych w termostacie w temperaturze $+20^{\circ}\text{C}$ (żaby Nr 239—243) i $+30^{\circ}\text{C}$ (żaby Nr 224—248), w lodówce w temperaturze 0°C (żaby Nr 249—253), -2°C (żaby Nr 254—258), i -5°C (żaby Nr 259—263), oraz kontrolnych $+18^{\circ}\text{C}$ (żaby Nr 224—228). Do drugich badań mózgi żab z tych samych okresów i warunków doświadczalnych (żaby Nr 189—193, 194—198, 199—203, 204—208, 209—213, 214—218, 219—223 i 184—188).

Rozmieszczenie kwasu dezoksyrybonukleinowego warunkujące powstawanie obserwowanych trzech typów jąder w komórkach zwojowych zostało całkowicie potwierdzone wszystkimi stosowanymi przez nas metodami (mikrofot. Nr 8 i 9). Kwas rybonukleinowy natomiast występował w jąderku i cytoplazmie komórek zwojowych, a przede wszystkim w grudkach Nissla. Także w strefie przyjądrowej widziało się jednolite zabarwienie, co mogłoby wskazywać na obecność w tym miejscu drobnitkich mikrosomów

zawierających nukleoproteidy typu rybozy. W miarę zmniejszania się ilości grudek Nissla i zjawiania się ziarenek Gomori — dodatnich zwracało naszą uwagę jak gdyby nasilenie odczynu barwnego przy błonie jądrowej. Odczyn ten zanikał, względnie stawał się bledszy pod wpływem rybonukleinazy. W komórkach zaś wypełnionych ziarenkami wydzieliną po ukończonym procesie wydzielnym jąderko oraz strefa przyjądrowa cytoplazmy wykazywały słabą barwnikochłonność, która bez wyraźnej granicy przechodziła



Ryc. 9. Różne typy jąder komórek zwojowych *nucleus praeopticus* żaby wodnej. Typ I: kwas dezoksyrybonukleinowy równomiernie rozproszony po karioplazmie, błona jądrowa cienka, napięta, rysunek zrębu delikatny. Typ II: kwas dezoksyrybonukleinowy tworzy małe skupienia rozsypane po karioplazmie. Strefa chromatyny przyjądrowej wyraźna, błona jądrowa gładka, barwi się wyraźnie. Typ III: chromocentra skupione przy błonie jądrowej i przy jąderku, błona jądrowa pomarszczona, jąderko duże. Barw. wg Feulgen-Rossenbecka. Mikrofot. ROW. pow. ca 2400 \times .

w cytoplazmę obwodową. Po zastosowaniu rybonukleinazy jąderko nie zabarwiało się, podczas gdy w strefie przyjądrowej utrzymywała się delikatna pyroninochłonność cytoplazmy. Strefa przyjądrowa może być więc uważana za strefę wzmoczonych procesów

metabolizmu cytoplazmy' określającą dynamikę zespołu plazmo-jądrowego. Wzrost kwasu rybonukleinowego w cytoplazmie, i to w najbliższym otoczeniu jądra upewnił nas w przekonaniu, że poprzez lipidowo-białkową błonę jądrową następuje wymiana substancji pomiędzy jądrem a cytoplazmą, i że wymiana ta jest szczególnie wyraźna w okresie wydzielniczym (ryc. 10).

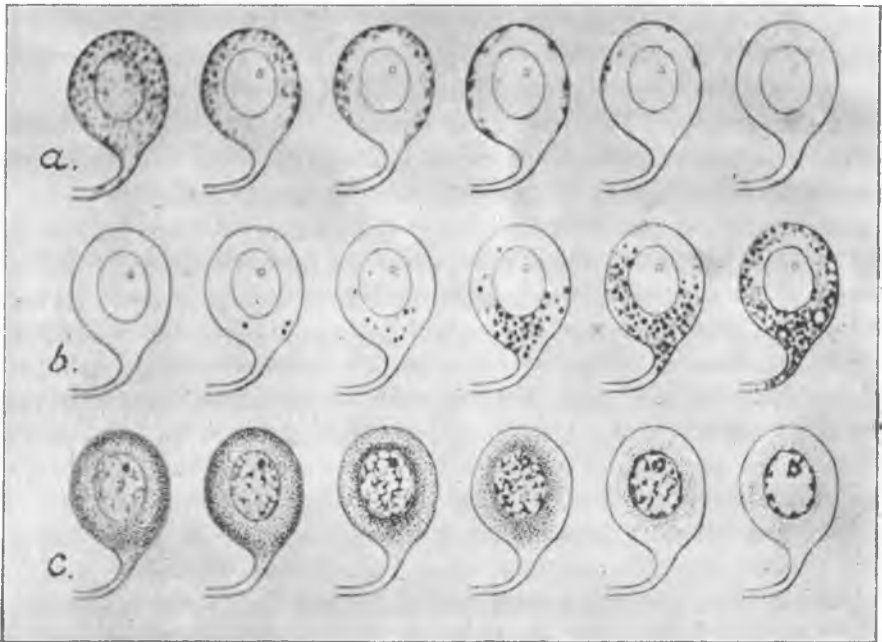
Obrazy rozmieszczenia kwasów nukleinowych w komórkach zwojowych międzymózgowia żab wiosenno-letnich, zimowych i pozostających w różnych temperaturach otoczenia ($+20^{\circ}$, $+30^{\circ}$, 0° , -2° , -5° i $+18^{\circ}$ C) były bardzo charakterystyczne dla każdej fazy cyklu wydzielniczego. Obserwowany odwrotnie proporcjonalny stosunek pomiędzy kwasem dezoksyrybonukleinowym a kwasem rybonukleinowym, a także odwrotnie proporcjonalny stosunek pomiędzy kwasami nukleinowymi komórki a ziarenkami Gomori — dodatnimi pozwalają przypuszczać, że w wytwarzaniu wydzieliny odgrywa ważną rolę zespół plazmo-jądrowo-jąderkowy. Szczególną uwagę należy zatem poświęcić procesom i przemianom odbywającym się w strefie przyjądrowej i w stożku aksonowym.

Omówienie wyników

Badania morfologiczne miały na celu przeanalizowanie umiejscowienia i struktury ziarenek neurowydzieliny (Gomori — dodatnich) wytwarzanych przez komórki zwojowe ośrodkowego układu nerwowego (nucleus praeopticus, nucleus supraopticus, nucleus paraventricularis, nucleus lateralis tuberis). Dalsze prace dotyczyły powstawania i budowy chemicznej tych ziarenek, a także omawiały stosunek ich do jądra, układu Golgiego, chondriomu i grudek Nissla, a nawet do pituicytów przysadki mózgowej (Hild, Schiebler, Dixon i Herbertson — 1950 i inni).

Brambell, Scharrer, Lennette, Nigles, Bargmann oraz Hild są zdania, że wytwarzanie neurowydzieliny łączy się ściśle z grudkami Nissla, istnieje bowiem pomiędzy jednymi i drugimi ścisły związek 'topograficzny i ilościowy. Thomas, Scharrer, Hyden, Bertram i Barr obserwowali także zmniejszenie ilości kwasu rybonukleinowego w grudkach Nissla po intensywnej czynności komórki, a zatem grudki Nissla mogą stanowić nie tylko materiał zapasowy, ale biorą bezpośredni względnie pośredni udział w metabolizmie i procesach wydziel-

nicznych. Grudki Nissla zawierając kwas rybonukleinowy (Bodian i Gersh, Landström, Caspersson i Wohlfahrt) stanowią prawdopodobnie znaczną ilość materiału, który może być tworzywem przyszłej wydzieliny, albo może brać udział w procesach syntezy nowego białka. Dawidson bowiem zwrócił uwagę, że kwas rybonukleinowy pozostaje w związku z gromadzeniem się białka w komórce. Badania Bensleya i Claudea wskazują na występujące w cytoplazmie tworzy,



Ryc. 10. Schematyczne określenie współzależności morfologiczno-fizjologicznej pomiędzy grudkami Nissla (a), ziarenkami neurowydzieliny (b) i kwasami nukleinowymi DRN i RN (c) w komórkach zwojowych nucleus praeropticus żaby wodnej. Rysunek wykonano na podstawie mikrofotografii. Objasnienia w tekście.

które zawierają kwas rybonukleinowy, białko i duże ilości ciał tłuszczowatych, przeważnie fosfolipidów. Jak wynika więc z badań licznych autorów kwas rybonukleinowy występuje w cytoplazmie jako składnik kompleksu o charakterze liponukleoproteidu, nie wyklucza to jednak możliwości występowania tego kwasu w połączeniach mniej złożonych (Brachet).

Współudział grudek zasadochłonnych Nissla w wytwarzaniu ziarenek neurowydzieliny wyrażał się na naszych preparatach odwrotnie proporcjonalnym stosunkiem ilościowym obu tych substancji. Zwiększaniu się ilości ziarenek neurowydzieliny odpowiadało zmniejszanie się ilości grudek Nissla. W komórkach całkowicie wypełnionych neurowydzieliną nie obserwowano zupełnie lub prawie zupełnie grudek Nissla. Odnosiło się wrażenie, że omal cały materiał, z którego zbudowane były grudki Nissla łącznie z kwasem rybonukleinowym został przerobiony na neurowydzielinę, albo włączony do jej kompleksu. W ziarenkach neurowydzieliny nie można było wykazać ani kwasu rybonukleinowego, ani kwasu dezoksyrybonukleinowego. Metody używane przez nas, jak np. metody Feulgena-Rossenbecka, Unny oraz Jacobsona zawsze dawały wyniki negatywne. Należałoby więc przypuszczać, że neurowydzielina, o ile tak nazywać będziemy ziarenka Gomori — dodatnie, nie jest nukleoproteidem, i że jej komponentą prostetyczną nie jest ani kwas rybonukleinowy, ani dezoksyrybonukleinowy. Być więc może, iż tylko komponenta białkowa grudek Nissla zostaje zużyta w procesie wytwarzania neurowydzieliny. W takim razie powstaje pytanie: co dzieje się z kwasem rybonukleinowym lub z innymi składnikami połączenia kompleksowego grudek Nissla? W tej chwili odpowiedzią może być tylko przypuszczenie, że kwas rybonukleinowy prawdopodobnie zużywa się w procesie syntezy białek cytoplazmy. Grudki Nissla w każdym razie biorą udział w procesie tworzenia neurowydzieliny.

Drugim ważnym zagadnieniem było stwierdzenie czy istnieje czynnościowy związek pomiędzy jądrem a cytoplazmą, a zatem czy można mówić o udziale jądra w wytwarzaniu ziarenek neurowydzieliny? Ciekawe wyniki badań Lewynsona, Plattonowej, Utyny i Polenowa skłaniają raczej do stwierdzenia, że ziarenka neurowydzieliny są pochodzenia jądrowego, a nawet cytowani autorzy obserwowali przechodzenie sekretu z jądra do cytoplazmy. Można by jednak te zagadnienia rozpatrzyć, albo na drodze przeanalizowania związku jaki zachodzi między kwasem rybonukleinowym zawartym w cytoplazmie i kwasem dezoksyrybonukleinowym występującym w jądrze, albo na drodze cytochemicznych badań strefy przyjądrowej cytoplazmy.

W badaniach naszych obserwowano zwykle oprócz odwrotnie proporcjonalnego stosunku pomiędzy kwasem rybonukleinowym cytoplazmy a kwasem dezoksyrybonukleinowym jądra, także od-

wrotnie proporcjonalny stosunek pomiędzy rybonukleoproteidami cytoplazmy a ziarenkami neurowydzieliny. Nie można więc było w rozpatrywaniu zagadnienia powstawania neurowydzieliny pominąć znaczenia mikrosomów i mitochondrów nagromadzonych dokoła jądra. Zachowanie się bowiem histochemicznych odczynów barwnych zasadochłonnej plazmy dokołajądrowej wyraźnie wskazywało na jej udział w omawianym procesie przemian. Z ostatecznym jednak potwierdzeniem tego przypuszczenia wstrzymujemy się do czasu ukończenia badań, w których posługujemy się metodami wybiórczymi umożliwiającymi wybarwienie mitochondrów i aparatu Golgiego w komórkach zwojowych międzymózgowia żab pozostających w podobnych i najbardziej zbliżonych warunkach do świadczalnych.

Bensley uważa, że mitochondria i mikrosomy utworzone są co najmniej z dwu białek o różnym punkcie izoelektrycznym. Claude natomiast oprócz białek wymienia tłuszczowce, a przede wszystkim fosfatydy (ca 80%). Mitochondria i mikrosomy są zatem kompleksami liponukleoproteidów, albo lipoproteidów, a stwierdzone w naszych badaniach nasilenie odczynu barwnego strefy przyjądrowej cytoplazmy na początku procesu wydzielniczego i zmniejszanie się jego w miarę nagromadzania się ziarenek neurowydzieliny pozwala się domyślać, że cała przyjądrowa cytoplazma bierze udział w procesie wydzielniczym. Ziarenka wydzieliny (Gomori — dodatnie) są bowiem rozpuszczalne w alkoholu, a to świadczy o ich lipidowym charakterze. Kwasy nukleinowe związane w płazmie dokołajądrowej, jak wydaje się, nie przechodzą więc i tutaj do neurowydzieliny. Zagadnienie losu kwasów nukleinowych w produkcji neurowydzieliny pozostaje nadal nierozwiązane, być może, że są one włączane w procesy syntetyczne składników jądrowych na drodze polimeryzacji kwasów nukleinowych typu rybozowego.

Występowanie odczynu barwnego w strefie przyjądrowej towarzyszące zjawieniu się pierwszych ziarenek neurowydzieliny upoważnia do wyrażenia przypuszczenia, że wytwarzanie neurowydzieliny rozpoczyna się prawdopodobnie w strefie przyjądrowej. Z kompleksu liponukleoproteidu zostaje oddzielona komponenta rybonukleoproteidowa albo kwas rybonukleinowy, a pozostała część lipoproteidowa jest właściwym składnikiem neurowydzieliny. Być może, że wyprodukowane lipoproteidy stanowią

tylko niedojrzały jeszcze wstępny produkt wydzieliny, który w okresie dojrzewania zużywa proteidy grudek Nissla. Stąd też obserwuje się nie tylko morfologiczne, ale także i chemiczne połączenie pomiędzy jednymi a drugimi. Przebieg wytwarzania neurowydzieliny przez komórki zwojowe byłby dwufazowy, przy czym I faza ograniczałaby się tylko do wytwarzania wydzieliny niedojrzałej, a II faza do produkcji dojrzałej wydzieliny.

Wreszcie należało jeszcze zwrócić uwagę na dalsze losy wytworzonej wydzieliny i na zachowanie się komórki po ukończonym procesie wydzielniczym. Dostateczne naświetlenie tego zagadnienia znajdujemy w pracach Bargmanna (1949, 1951), Hilda (1952), Hanströma (1952) i innych, którzy na podstawie dodatniego odczynu barwnego włókien nerwowych wyznaczają drogi prowadzące od komórek zwojowych w kierunku tylnego płata przysadki mózgowej. Wprawdzie w naszej pracy tym zagadnieniem nie zajmowaliśmy się szczegółowo, jednak na podstawie niektórych obserwacji możemy potwierdzić wyniki wspomnianych autorów. Nagromadzone w dużej ilości ziarenka neurowydzieliny przesuwają się drogami wypustek i włókien nerwowych (tractus praeoptico-hypophyseus) zdążającymi do tylnego płata przysadki mózgowej. W ten sposób wyrażała się więc III faza czynności komórki, którą można określić nazwą fazy wydzielniczej. Po usunięciu wydzieliny komórka przechodzi w okres spoczynkowy, który jest prawdopodobnie bardzo krótki i łączy się z fazą IV, a mianowicie z fazą odnowy „pełnego zestawu” grudek Nissla i chromatyny jądra. Być więc może, że właśnie w tej fazie duże znaczenie posiadają nie zużyte kwasy nukleinowe cytoplazmy, dzięki którym dokonuje się w komórce nie tylko ilościowa, ale także jakościowa odbudowa kompleksów białkowych.

Wnioski

Badania cytotopochemiczne komórek zwojowych międzymózgowia (nucleus praeopticus) żab wodnych (*Rana esculenta esculenta*) pozwoliły przeanalizować przebieg procesu wydzielniczego w warunkach biologicznych i doświadczalnych. Opierając się na dotychczasowych wynikach obserwacji można powiedzieć, że:

- 1) Hematoksyliną chromową wg zmodyfikowanej metody Gomoriego można zabarwić ziarenka i wodniczki neurowydzieliny

w cytoplazmie komórek zwojowych. Ziarenka te można również łatwo usunąć z komórki używając alkoholowych płynów utrwalających, co wskazywałoby na ich lipoproteidowy charakter.

2) Ilość i rozmieszczenie ziarenek neurowydzieliny wskazywały na fazowość cyklu wydzielniczego komórki zwojowej. Widziało się bowiem komórki: a) zawierające jedno, dwa, trzy i więcej ziarenek (mikrofot. Nr 1 i 2), b) w których ziarenka skupione były w stożku aksonowym (mikrofot. Nr 3), c) które całkowicie wypełnione były ziarenkami i wodniczkami neurowydzieliny (mikrofot. Nr 4), i d) z których wydzielina przesuwiała się do aksonów.

3) W miarę nagromadzenia się ziarenek neurowydzieliny w komórkach zwojowych zmniejszała się ilość grudek Nissla, oraz zmieniały się obrazy struktury karioplazmy i błony jądrowej. Można więc na tej podstawie przypuszczać, że w wytwarzaniu neurowydzieliny biorą udział grudki Nissla i karioplazma.

4) Kształt, ilość i rozmieszczenie grudek Nissla w komórkach zależały od różnych faz stanu czynnościowego komórek (mikrofot. Nr 6 i 7). Ilość i wielkość grudek pozostawały w stosunku odwrotnie proporcjonalnym do ilości i wielkości ziarenek neurowydzieliny (ryc. 10). Grudki Nissla były więc prawdopodobnie całkowicie zużywane względnie przerabiane przez komórkę w okresie produkcji ziarenek neurowydzieliny.

5) Obrazy rozmieszczenia kwasów nukleinowych w komórkach zwojowych były charakterystyczne dla każdej fazy cyklu wydzielniczego i wskazywały na odwrotnie proporcjonalny stosunek pomiędzy kwasem dezoksyrybonukleinowym jądra a kwasem rybonukleinowym cytoplazmy i jąderka, oraz na odwrotnie proporcjonalny stosunek pomiędzy rybonukleoproteidami cytoplazmy a ziarenkami neurowydzieliny. Obrazy te pozwalają przypuszczać, że w wytwarzaniu wydzieliny odgrywa ważną rolę zespół plazmojądrowo-jąderkowy. Na szczególną uwagę zasługują procesy i przemiany odbywające się w strefie przyjądrowej i w stożku aksonowym.

6) Histochemiczne odczyny barwne zasadochłonnej plazmy dokołajądrowej towarzyszące zjawieniu się ziarenek neurowydzieliny zwracają uwagę na możliwość udziału mitochondriów i mikrosomów w tym procesie. Prawdopodobnie z liponukleoproteidowego kompleksu mitochondriów i mikrosomów zostaje oddzielony

rybonukleoproteid albo kwas rybonukleinowy, bo lipoproteid stanowi właściwy składnik neurowydzieliny. Neurowydzielina nie jest nukleoproteidem i komponentą prostetyczną nie jest ani kwas rybonukleinowy, ani kwas dezoksyrybonukleinowy. Z ostatecznym jednak potwierdzeniem tych przypuszczeń wstrzymujemy się do czasu ukończenia dalszych badań.

7) Na podstawie dotychczasowych obserwacji można przypuszczać, że cykl wydzielniczy komórki zwojowej przebiega prawdopodobnie w czterech etapach (fazach):

I faza: powstawanie wstępnego produktu wydzieliny, w której liponukleoproteidy mitochondriów i mikrosomów strefy przyjądrowej przypuszczalnie odgrywają pierwszorzędną rolę.

II faza: powstawanie wydzieliny dojrzałej, w czasie której są zużywane względnie przerabiane grudki zasadochłonne Nissla.

III faza: wydzielanie, podczas którego ziarenka (wodniczki) nagromadzone w stożku aksonowym komórki przesuwiają się w kierunku wypustek (aksonów) i włóknami nerwowymi (tractus praeoptico-hypophyseus) doprowadzane są do tylnego płata przyśadki mózgowej.

IV faza: reprodukcja grudek zasadochłonnych Nissla i chromatyny jądra.

PIŚMIENNICTWO

1. Bargmann W.: *Zeitsch. Zellforsch. mikrosk. Anat.*, Vol. 34. str. 610—634, 1949.
2. Bargmann W., Hild W.: *Acta Anatom.*, Vol. 8. str. 264—280, 1949.
3. Barr M. L., Bertram E. G.: *Nature London*, Vol. 163. str. 676—677, 1949.
4. Bensley R. R., Gersh I.: *Anat. Rec.*, Vol. 57. str. 369, 1933.
5. Bourne G.: Oxford. At the Clarendon Press. str. 99—138, 1945.
6. Brachet J.: *Enzymol.*, Vol. 10. str. 87, 1941.
7. Brachet J.: *C. R. Soc. Biol. Paris*, Vol. 142. str. 1241—1252, 1948.
8. Brasze Z.: *Nukleinowyje kistoły w kletke i w zarodysze. Sbornik statej. Nekotoryje problemy sowremennoj embryofizjologii.* Izd. Innostran. Liter. Moskwa, 1951. str. 255—277.
9. Brachet J.: *Quart. J. Microsc. Scien.*, Vol. 94. str. 1—10, 1953.
10. Brambell F. W. R.: *J. Physiol.*, Vol. 57. str. 413—423, 1923.
11. Cain A. J.: *Quart. J. Microsc. Scien.*, Vol. 89. str. 421—428, 1948.
12. Caspersson T.: *Zeitsch. wissenschaft. Mikrosk. u. mikr. Techn.*, Vol. 53. str. 403—419, 1936.
13. Caspersson T.: *Proc. Ser. Inter. Genet. Congr. Edinbourgh.* Vol. 85. 1939.
14. Caspersson T., Schultz J.: *Proc. Nat. Acad. Scien.*, Vol. 26. str. 507—509, 1940.
15. Caspersson T.: *Symp. Exp. Biol.* str. 135—159, 1947.
16. Davidson J. N., Waymouth C.: *Nature*, Vol. 154. str. 207, 1944.
17. Davidson J. N.: *Soc. Exp. Biol. Symp. Cambridge.* str. 77—85, 1947.
18. Davidson J. N.: *The biochemistry of the nucleic acids.* London, 1950.
19. Dawson A. B.: *Federat. Proc. Baltimore*, Vol. 1. str. 233—240, 1942.
20. Dixon K. C., Herbertson B. M.: *Journ. Path. Bacteriol.*, Vol. 62. str. 335—339, 1950.
21. Dixon K. C., Herbertson B. M.: *Journ. Physiol.*, Vol. 111. str. 244—247, 1950.
22. Gaupp jr., Scharrer E.: *Zeitsch. Neurol.*, Vol. 135. str. 327—331, 1935.
23. Gaupp R.: *Zeitsch. ges. Neurol. Psychiatr.*, Vol. 160. str. 357—360, 1938.
24. Gaupp R.: *Zeitsch. ges. Neurol. Psychiatr.*, Vol. 165. str. 273—278, 1939.
25. Gersh J.: *Amer. Journ. Anat.*, Vol. 64. str. 407—444, 1939.
26. Gersh J., Bodian D.: *J. Cell. Comp. Physiol.*, Vol. 21. str. 253, 1943.
27. Gomori G.: *Amer. J. Pathol.*, Vol. 17. str. 395, 1941.
28. Gomori G.: *J. Cell. Comp. Physiol.*, Vol. 17. str. 71—83, 1941.
29. Grzycki S.: *Bull. Acad. Polon. Ser. B. Sc. Naturel.* II. str. 1—16, 1951.
30. Grzycki S.: *Bull. Acad. Polon. Ser. B. II. Cl. Math. Nat.* str. 451—468, 1951.
31. Grzycki S.: *Annales UMCS. Sec. D.*, Vol. 6. str. 223—249, 1951.
32. Grzycki S.: *Annales UMCS. Sec. D.*, Vol. 6. str. 285—300, 1951.
33. Grzycki S.: *Annales UMCS. Sec. C.*, Vol. 8. str. 193—231, 1953.
34. Hanström B.: *Kungl. Fysiogr. Sällskapets: Lund Förhandl.*, Vol. 22. str. 1—5. 1952. (cyt. wg *Excerpta Medica. Sec. I.*, Vol. 7. str. 165. Nr 714, 1953).
35. Herzog E.: *Beitr. pathol. Anat.*, Vol. 101. str. 390—

- 409, 1938. 36. Hild W.: Zeitsch. Zellforsch. mikrosk. Anat, Vol. 35. str. 33—46, 1950. 37. Hild W.: Virchows Arch. Vol. 319. str. 526—546, 1951. 38. Hild W.: Zeitsch. Zellforsch. mikrosk Anat., Vol. 37. str. 301—316, 1952. 39. Hyden H.: Symp. Soc. Exp. Biol. Cambridge. str. 152—161, 1947. 40. Hyden H.: Symp. Soc. Exp. Biol. Cambridge. str. 162—169, 1947. 41. Ito T., Nagahiro K.: Okajimas Fol. Anat. Japon., Vol. 15. str. 609—634, 1937. 42. Koller P. C.: Symp. Soc. Exp. Biol. Cambridge, str. 270—278, 1947. 43. Landström H., Caspersson W., Wohlfahrt G.: Zeitsch. mikr. anat. Forsch, Vol. 49, 1941. 44. Lennette E. H., Scharrer E.: Anat. Rec., Vol. 94. str. 85—92, 1946. 45. Lewynson L. B., Platonowa G. N.: Dokł. Akad. Nauk. SSSR, Vol. 58. str. 1769—1772, 1947. 46. Lewynson L. B., Platonowa G. N.: Dokł. Akad. Nauk. SSSR, Vol. 60. str. 129—132, 1948. 47. Lewynson L. B., Utyna J. A.: Dokł. Akad. Nauk. SSSR, Vol. 66. str. 269—272, 1949. 48. Lison L.: Histochemie et cytochemie animales. Chap. XIII. Ed. Gauthier-Villars. Paris, 1953. str. 255—300. 49. Palay S. L.: Journ. Comp. Neurol, Vol. 79. str. 247—275, 1943. 50. Polenow A. L.: Dokł. Akad. Nauk. SSSR, Vol. 73. str. 1023—1028, 1950. 51. Roussy G., Mosinger M.: C. R. Soc. Biol. Paris, Vol. 126. str. 1066—1067, 1937. 52. Scharrer E., Scharrer B.: Biol. Rev. Cambridge, Vol. 12. str. 185—216, 1937. 53. Scharrer E., Scharrer B.: Physiol. Rev, Vol. 25. str. 171—181, 1945. 54. Scharrer E., Palay S. L., Nilges R. G.: Anat. Rec, Vol. 92. str. 23—31, 1945. 55. Schieblier T. H.: Acta Anatom, Vol. 13. str. 233—255, 1951. 56. Schieblier T. H.: Acta Anatom, Vol. 15, str. 393—416, 1952. 57. Skalska-Vorbrodt J.: Annales UMCS. Sec. D, Vol. 7. str. 1—22, 1952. 58. Stacey M., Hong Fu Li: Nature, Vol. 163. str. 538, 1949. 59. Stowell R. E.: Science, Vol. 96. str. 165—166, 1942. 60. Stowell R. E.: J. Nat. Canc. Inst. Canc. Res, Vol. 6. str. 426—435, 1946. 61. Stowell R. E.: Symp Soc. Exp. Biol. Nr 1. str. 190—206, 1947. 62. Stowell R. E.: Arch. Path, Vol. 46. str. 164—178, 1948. 63. Stowell R. E., Lee C. S.: Arch. Path, Vol. 50. str. 319—537, 1950. 64. Thomas O. L.: Quart. Journ. Microsc. Scien, Vol. 88. str. 445—462, 1947. 65. Thomas O. L.: Quart. Journ. Microsc. Scien, Vol. 88. str. 269—273, 1947. 66. Thomas O. L.: Quart. Journ. Microsc. Scien, Vol. 89. str. 333—350, 1948. 67. Thomas O. L.: Journ. Comp. Neurol, Vol. 95. str. 73—101, 1951.



Р Е З Ю М Е

Цитотопохимические исследования ганглиозных клеток промежуточного мозга (*nucleus praeopticus*) у водной лягушки (*Rana esculenta esculenta*) позволили проанализировать ход выделительного процесса в биологических и экспериментальных условиях. Опираясь на полученные до сих пор результаты можно сказать, что:

1. Хромовым гематоксилином по видоизменному методу Гомори можно окрасить зернышки и вакуоли невросекрета в цитоплазме ганглиозных клеток. Зернышки можно тоже легко удалить из клетки, используя для этой цели спиртовые фиксирующие жидкости, что указывало бы на их липопротеидный характер.

2. Количество и размещение зернышек невросекрета характеризовали стадию секреторного цикла ганглиозной клетки, так как можно было видеть клетки: а) содержащие одно, два, три и больше зернышек (микрофот. 1 и 2), б) в которых наступало скопление зернышек в осевом конусе (микрофот. 3), в) которые были совершенно заполнены зернышками и вакуолями невросекрета (микрофот. 4) и г) из которых секрет подвергался перемещению в осевые цилиндры.

3. По мере увеличения числа зернышек невросекрета в ганглиозных клетках уменьшалось количество глыбок Ниссля, а также изменялась картина структуры кариоплазмы и ядерной оболочки. Можно следовательно, на этом основании думать, что в процессе продукции невросекрета принимают участие глыбки Ниссля и кариоплазма.

4. Формы, количество и размещение глыбок Ниссля в клетках можно было поставить в зависимость от различных стадий функционального состояния клеток (микрофот. 6 и 7). Количество и величина глыбок оставалась в обратнопропорциональном отношении к количеству и размерам зернышек невросекрета (рис. 10). Следовательно глыбки Ниссля, по всей вероятности,

были полностью использованы или переработаны клеткой в период продукции зернышек секрета.

5. Картины размещения нуклеиновых кислот в ганглиозных клетках были весьма характерны для каждой стадии секреторного цикла и указывали на обратнопропорциональное отношение между дезоксирибонуклеиновой кислотой ядра — с одной стороны, и рибонуклеиновой кислотой цитоплазмы и ядрышка — с другой, а также на обратнопропорциональное отношение между рибонуклеопротеидами цитоплазмы и зернышками певросекрета. Эти факты позволяют выдвинуть предположение, что в продукции секрета играет важную роль плазматическо-ядерно-ядрышковый комплекс. Особое внимание, стало быть, следовало бы обратить на процессы и перемены, протекающие в околоядерной зоне и в осевом конусе.

6. Гистохимические красящие реактивы базофильной околоядерной плазмы, сопровождающие появление зернышек невросекрета, указывают на участие в секреторном процессе митохондрий и микросом. Из липо-нуклеопротеидного комплекса митохондрий и микросом отделяется, повидимому, рибонуклеопротеид либо рибонуклеиновая кислота, так как липопротеид является существенным составным элементом невросекрета. Невросекрет — это не нуклеопротеид, и простетическим компонентом не является ни рибонуклеиновая кислота, ни дезоксирибонуклеиновая кислота.

7. На основании до сих пор произведенных наблюдений можно предполагать что в секреторном цикле ганглиозной клетки можно по всей вероятности, выделить четыре стадии:

I стадия: Продукция просекрета. В этой стадии липо-нуклеопротеиды митохондрий и микросом околоядерной зоны играют, вероятно, первостепенную роль.

II стадия: Продукция зрелого секрета. В этой стадии используются или перерабатываются глыбки Ниссля.

III стадия: Секреция, во время которой зернышки (вакуоли), накопившиеся в осевом конусе клетки перемещаются через отростки и нервные волокна (*tractus praeoptico-hypophysaeus*) по направлению к задней доле гипофиза.

IV стадия: Репродукция глыбок Ниссля и ядерного хроматина.

SUMMARY

Cytochemical studies of ganglion cells of the mid-brain of *Rana esculenta esculenta* permitted to analyze the course of the secretory process under biological conditions and experimental conditions. On the basis of the present results of observations it can be said that:

1. It is possible to stain with chromic haematoxylin according to modified method of Gomori granules and vacuoles of the neurosecretion in the cytoplasm of ganglion cells. These granules may be easily removed from the cell by using alcohol fixative fluids that indicates their lipoproteid character.

2. The amount and distribution of granules of neurosecretion indicated the phase of the secretory cycle of the ganglion cell. Cells were seen: a) containing one, two, three and more granules (microphotos. 1 and 2) b) in which the granules were accumulated in the axon cone (microphoto, 3) c) which were completely filled up by granules and vacuoles of neurosecretion microphoto, 4) and d) from which the neurosecretion was removed to axons

3. In proportion as granules of neurosecretion accumulated in the ganglion cells the number of Nissl bodies decreased and the pictures of the structure of the karyoplasm and nuclear membrane changed. On this basis it can be postulated that in the production of the neurosecretion participate Nissl bodies and the karyoplasm.

4. It was possible to establish a dependence of the form, number and distribution of Nissl bodies in cells in the various phases of the functional state of cells (microphotos. 6 and 7) The number and size of bodies remained inversely proportional to the number and size of granules of the neurosecretion (fig. 10). Nissl's bodies were then most likely used up or transformed by the cell during the period of production of granules of neurosecretion.

