

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

Stanisław GRZYCKI i Irena KRÓLIKOWSKA

**Glikogen, kwas dezoksyrybonukleinowy i sole
wapnia w komórkach gruczołu wątrobowego ślimaka
(*Helix pomatia* L.)**

**Гликоген, дезоксирибонуклеиновая кислота и соли кальция
в железистых клетках печени улитки
(*Helix pomatia* L.)**

**Glycogen, Desoxyribonucleinic Acid and Calcium Salts in Cells
of the Digestive Gland of the Snail
(*Helix pomatia* L.)**

Komórki gruczołu wątrobowego ślimaka (*Helix*), mimo że pod względem cytologicznym mają budowę urozmaiconą, nie były tematem dokładnych analiz, szczególnie gdy weźmie się pod uwagę badania histochemiczne dotyczące rozmieszczenia w nich kwasu dezoksyrybonukleinowego, glikogenu i soli wapnia. Te zagadnienia stały się więc tematem naszych obecnych badań, których wyniki rejestrowaliśmy dokonując zdjęć fotograficznych filmowym aparatem szeroko-
taśmowym ROW i aparatem Practiflex.

MATERIAŁ I METODYKA BADAŃ

Obserwacje przeprowadzono na prawym gruczole wątrobowym ślimaków *Helix pomatia* L. zebranych w miesiącu wrześniu i karmionych przez okres około dwóch tygodni wyłącznie liśćmi *Brassica oleracea capitata*. Po usunięciu spiralnych, górnych, zakrętów muszli pobierano materiał do badań i utrwalano w sublimacie, w alkoholu formolu i w formolu 1 : 4. Skrawki mikrotomowe po odparafinowaniu barwiono wg metody B e s t a w celu wykazania glikogenu, wg

metody Feulgen a-Rossenbecka, która wybiórczo barwi leukofuksyną kwas dezoksyrybonukleinowy w jądrach komórkowych, oraz wg metody von Kossa i metody Cretina w celu wykrycia soli wapnia. Preparaty kontrolne otrzymano barwiąc skrawki mikrotomowe hematoksyliną i eozyną, oraz przeprowadzając próbę glikolityczną i próby odwapniające. Część skrawków mikrotomowych utrwalonych w formalinie, po odparafinowaniu, poddano działaniu roztworu fluoresceiny, 1:10000 przez 3 sekundy i oglądano w mikroskopie fluorescencyjnym. Dokonano także obserwacji w mikroskopie fluorescencyjnym bez podbarwiania fluorochromami.

Chcąc potwierdzić nasze badania histologiczne dotyczące obecności glikogenu pobierano również ten sam materiał z tych samych ślimaków, poddawano hydrolizie zasadowej w 30% KOH, a ilościową zawartość glikogenu w hydrolizacie oznaczano kolorymetrycznie na fotometrze Pulfricha wg metody antronowej Lustineca. Do potwierdzenia natomiast obecności i ilości soli wapniowych użyto metody kolorymetrycznej mikroanalitycznej Altena, Weiland a i Knippenberga (Biochem. Z. 265. 85. 1933) polegającej na tworzeniu się soli wapniowych kwasu pikrolonowego.

OBSERWACJE WŁASNE

I

Skrawki mikrotomowe gruczołu wątrobowego ślimaka *Helix* (mikrofot. Nr 1) zabarwione karminem wg metody Besta pozwoliły stwierdzić w cytoplazmie obecność czerwonych ziarenek, rozrzuconych nierównomiernie i grupujących się przeważnie na biegunie wydzielniczym komórki. Wielkość ziarenek prawie zawsze jednokowa, zabarwienie intensywnie czerwone, ilość ich natomiast różna w różnych komórkach. Obserwowaliśmy bowiem komórki przeładowane ziarenkami, inne zaś posiadały ich mało (mikrofot. Nr 2, 3 i 4). W komórkach o małej ilości ziarenek czerwonych można było zauważyć zwiększenie innych utworów w cytoplazmie, łącznie z jasnymi, błyszczącymi ziarenkami zgrupowanymi przy podstawie komórek i zachowującymi się barwnikoopornie (mikrofot. Nr 2).

Dla upewnienia się, czy oglądane czerwone ziarenka są w rzeczywistości glikogenem, przygotowano preparaty kontrolne przez zastosowanie próby glikolitycznej polegającej na działaniu przefiltrowanej śliny przez 2—10 godzin w temperaturze pokojowej i barwiąc na-

stępnie wg metody Besta. Próba glikolityczna usuwała glikogen z komórek, a tym samym histochemiczny odczyn barwny dawał wynik ujemny. Można więc było na tej podstawie uznać preparaty jako technicznie dobrze wykonane, a czerwone ziarenka widoczne w cytoplazmie badanych komórek określać jako ziarenka glikogenu.

Na podstawie naszych preparatów można podzielić komórki wątrobowe na trzy grupy: 1) komórki wypełnione całkowicie ziarenkami glikogenu, 2) komórki, w których glikogen przeważnie gromadził się w strefie obwodowej cytoplazmy, oraz 3) komórki, w których glikogen występował tylko w małej ilości, rozsypany pomiędzy innymi utworami cytoplazmy. Te obrazy przypominały fazy czynnościowe komórek i dlatego raczej skłonni jesteśmy do powiedzenia, że w rozmieszczeniu ziarenek glikogenu główną rolę odgrywa stan fizjologiczny komórki. Zmienność obrazu umiejscowienia, jakoteż różnice ilościowe mogą być potwierdzeniem naszego zapatrywania.

Badania histologiczne uzupełniliśmy badaniami ilościowymi kolorymetrycznymi, które, jak mieliśmy możliwość niejednokrotnie się przekonać, stanowią nieodłączną część badań histochemicznych. W zastosowanej przez nas metodzie antronowej wg Lustineca użyto jako płynu standardowego glukozy, odczytywano ekstynkcję na fotometrze Pulfricha i wykreślano krzywą ekstynkcji. Wykonane próby na materiale pochodzącym z kilkunastu ślimaków wykazały, że ilość glikogenu zawarta w gruczole wątrobowym wahała się w granicach od 2,5—4,5%. Wydaje się nam, że ta duża rozpiętość w zawartości glikogenu może być również potwierdzeniem różnego stanu fizjologicznego komórek gruczolowych użytych do badań ślimaków, tym bardziej, że przeprowadzone przez nas obserwacje są wynikami badań porównawczych. W tym gruczole, w którym metodą kolorymetryczną wykazaliśmy małą ilość glikogenu w preparacie mikroskopowym pobranym z tego samego gruczolu ziarenek glikogenu w komórkach było rzeczywiście mało.

II

Następnie poddaliśmy obserwacjom skrawki mikrotomowe barwione leukofuksyną wg metody Feulgena-Rossenbecka w celu wykrycia barwnego obecności kwasu dezoksyrybonukleinowego w komórkach. Dodatni odczyn Feulgena-Rossenbecka wystąpił wyłącznie w jądrach komórek, przy czym zabarwieniem swoim oraz rozmieszczeniem przypominał obrazy wielokrotnie już

obserwowane przez nas w jądrach komórek innych narządów innych zwierząt (mikrofot. Nr 5, 6 i 7). W jednych jądrach bowiem można było zauważyć wyraźne skupienie się struktur jądrowych, szczególnie w obszarze strefy przyjąderkowej, a tym samym nagromadzenie dużej ilości kwasu dezoksyrybonukleinowego (mikrofot. Nr 6 i 7). W innych natomiast jądrach spostrzegano się rozluźnienie układu chromatyny i zmniejszenie ilości grudek kwasu dezoksyrybonukleinowego, przy całkowitym lub prawie całkowitym zniknięciu strefy przyjąderkowej (mikrofot. Nr 7). Kwas dezoksyrybonukleinowy w tych jądrach tworzył małe skupienia, jedno słabiej i drugie silniej barwiące się, przypominające chromocentra K o l l e r a, rozrzucone nierównomiernie po karioplazmie, względnie nagromadzające się przy błonie jądrowej. Błona jądrowa we wszystkich jądrach komórek jednego i drugiego typów była zawsze gładka, cienka i wyraźna.

Porównanie opisywanych obrazów jąder z obrazami jąder uzyskanymi po zabarwieniu hematoksyliną + eozyną, a także po podbarwieniu jąder hematoksyliną w preparatach B e s t a, wskazywało, że pierwszy typ jąder odpowiadał komórkom zawierającym duże ilości glikogenu, podczas gdy drugi typ był charakterystyczny dla komórek o małej ilości glikogenu, a dużej ilości utworów cytoplazmatycznych.

Na podstawie naszych obserwacji przypuszczamy zatem, że jądro bierze udział w procesach fizjologicznych komórek, a zmiany w rozmieszczeniu, zabarwieniu i prawdopodobnie ilości kwasu dezoksyrybonukleinowego nie pozwalają wykluczyć nawet bezpośredniego udziału jądra i być może samego kwasu dezoksyrybonukleinowego w procesach wytwórczych komórki wątrobowej.

III

Już w poprzednich opisach zwróciliśmy uwagę, że w przypadkowych strefach komórek gruczołu wątrobowego znajdują się barwnikooporne, błyszczące ziarenka (mikrofot. Nr 2). Nie we wszystkich komórkach gruczołu były one obecne, mogły być pojedyncze, albo zebrane w mniejsze lub większe grupy, mogły nawet prawie całkowicie wypełniać komórkę i wówczas jądro i inne składniki cytoplazmy bywały zepchnięte na biegun wydzielniczy (mikrofot. Nr 8 i 9).

Barwnikooporność oraz zmienność ilościowa barwnikoopornych ziarenek skłoniły nas do oglądnięcia ich w mikroskopie fluorescencyjnym (mikrofot. Nr 11 i 12). Skrawki mikrotomowe utrwalone w formolu 1 : 4, po dokładnym odparafinowaniu, zamykano w glicerolu

i oglądano w mikroskopie. Okazało się, że ziarenka posiadają własną fluorescencję i świecą zielonym kolorem na tle blado niebieskim cytoplazmy, w której widoczne były jądra i inne składniki cytoplazmy skupione lub rozproszone, nie wykazujące różnic zabarwienia. Podobne skrawki mikrotomowe podbarwiono także roztworem fluoresceiny 1 : 10000 przez 3 sekundy. Obserwowane ziarenka na tych preparatach świeciły zdecydowanym kolorem jasno zielonym, a inne składniki cytoplazmy wyróżniały się kolorem brunatno ceglastym na tle jasno niebieskim (mikrofot. Nr 11 i 12).

Zastosowano również do barwienia preparatów metodę von K o s s a i wówczas można było wyczernić bezbarwne ziarenka. Dodatkowo wykonano preparaty stosując metodę C r e t i n a. Okazało się więc, że ziarenka są prawdopodobnie solami wapnia (fosforan wapnia) nagromadzonymi w różnych ilościach w komórkach gruczołu wątrobowego (mikrofot. Nr 8, 9 i 10). Mimo, że kształt ziarenek był zawsze okrągły, jednak wielkość ich była różna. Nie byliśmy w możności stwierdzić, czy duże ziarenka powstają przez połączenie się mniejszych, wydaje się nam jednak, że tego rodzaju zjawisko nie ma miejsca w komórkach gruczołu wątrobowego (mikrofot. Nr 10). Raczej przyjąć należy, że sole wapnia nagromadzone w różnych ilościach w cytoplazmie, i to właśnie u podstaw komórek, są substancją zapasową, którą zwierzę może w razie potrzeby odprowadzić do krwioobiegu.

Preparaty kontrolne upewniające nas, że wyczernione ziarenka należy utożsamiać z solami wapnia, otrzymaliśmy po zastosowaniu prób odwapniających. Roztwór wodny 2% kwasu azotowego albo roztwór wodny 6% kwasu sulfosalicylowego działając na preparaty przez 1—2 dni w temperaturze pokojowej, powodowały całkowite usunięcie soli wapnia z preparatów, a następowe barwienie wg stosowanych metod dawało zawsze wyniki ujemne.

Potwierdzenie naszych wyników histologicznych otrzymaliśmy w mikroanalizy metodzie kolorymetrycznej A l t e n a, W e i l a n d a i K n i p p e n b e r g a. Polega ona na wytrącaniu soli wapnia kwasem pikrolonowym w hydrolizacie wątroby. Pikrolonian wapnia po odwirowaniu i przemyciu bezwodnym eterem rozpuszcza się w wodzie. Dalsze działanie wodą bromową i wodorotlenkiem sodu powoduje wystąpienie czerwono-żółtej barwy roztworu. Zależnie od stężenia jonów Ca uzyskujemy różne natężenie barwy, dzięki czemu możliwe jest przeprowadzenie kolorymetrycznej analizy

ilościowej. W metodzie tej, jako roztworu wzorcowego użyliśmy szczawianu wapnia. Uzyskane wyniki przedstawione będą w dalszych naszych doniesieniach dotyczących wykrywania jonów innych metali występujących w badanym materiale.

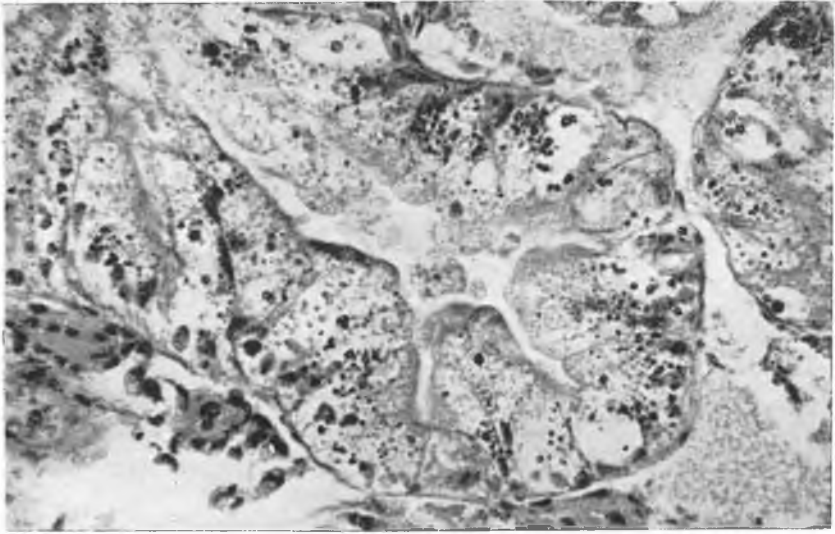
Dotychczasowe wyniki naszych badań nad komórkami gruczołowymi wątroby ślimaka (*Helix*) wskazały na obecność w cytoplazmie ziarenek glikogenu i soli wapniowych, oraz kwasu dezoksyrybonukleinowego w jądrach. Ilość i rozmieszczenie poznanych składników komórki zależą, jak wydaje się nam na podstawie obecnych wyników, od stanu fizjologicznego komórek gruczołowych. W dalszym ciągu prowadzone badania histochemiczne prawdopodobnie będą mogły przedstawić inne składniki komórek gruczołowych wątroby ślimaka, a tym samym uzupełnić dotychczasowe wiadomości cytologii samej komórki.

РЕЗЮМЕ

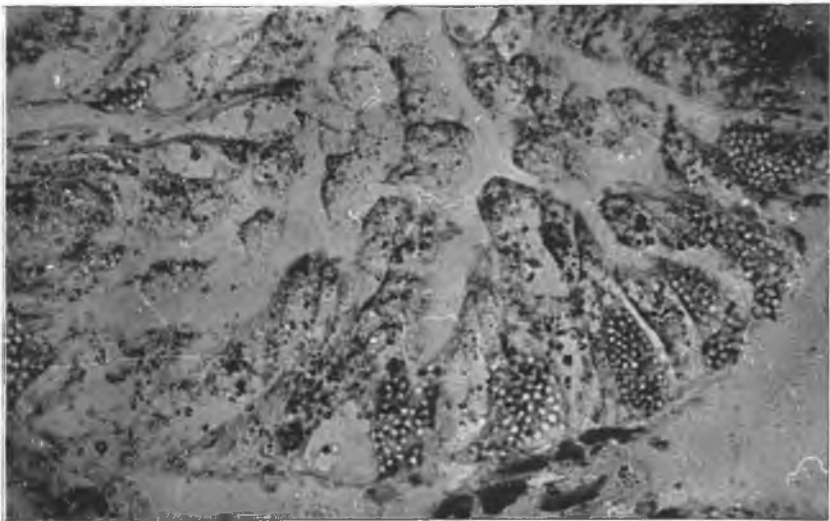
Результаты наших исследований над железистыми клетками печени улитки (*Helix pomatia L.*), полученные до настоящего времени, показали наличие в цитоплазме гликогена и кальциевых солей, а также дезоксирибонуклеиновой кислоты в клеточных ядрах. Количество и размещение указанных выше составных элементов клетки зависят, кажется, судя по полученным сейчас результатам, от физиологического состояния железистых клеток. На основании дальнейших гистохимических исследований будут, по всей вероятности, обнаружены еще и другие составные элементы железистых клеток печени улитки, а тем самым будут дополнены наши теперешние сведения по цитологической структуре самой клетки. Результаты наших гистохимических исследований нашли полное подтверждение в производимых одновременно на этом же материале исследованиях при помощи колориметрического микроанализа и частично при помощи флуоресцентной микроскопии.

SUMMARY

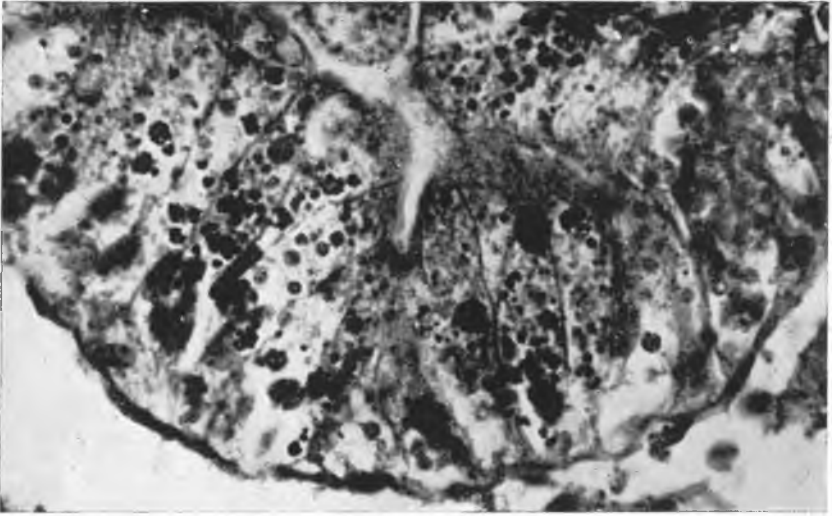
The up-to-date results of the authors' investigations on the gland cells of the right digestive gland of the snail (*Helix pomatia* L.) revealed the presence of glycogen granules and calcium salts in their cytoplasm, and the presence of desoxyribonucleinic acid in their nuclei. The present results seem to suggest a dependence of the amount and distribution of the components found in the cell from the physiological state of the gland cells. Histochemical investigations, which are still going on, will probably result in determining other components of the gland cells of the right digestive gland of the snail, thus adding to the knowledge of the cytology of the cell itself. The authors' histochemical investigations were fully confirmed by attempts at colorimetric microanalysis made simultaneously on the same material, and partly by fluorescence microscopy.



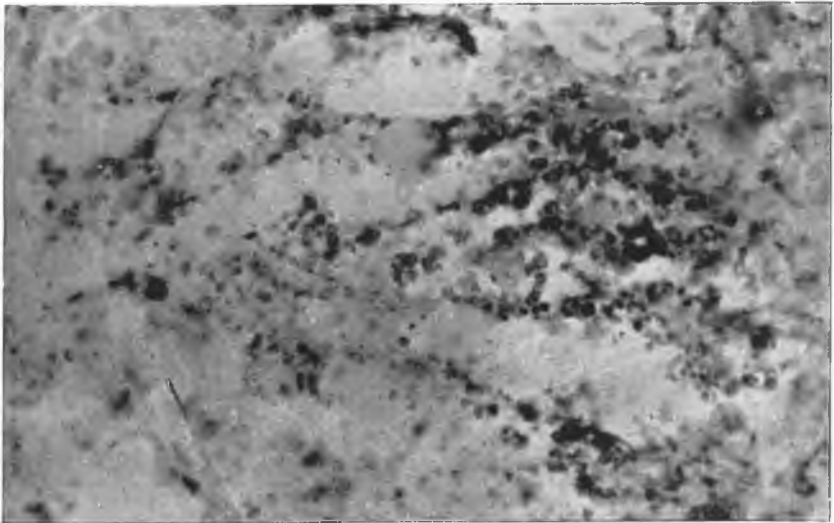
Ryc. 1. **Gruzoł wątrobowy ślimaka *Helix pomatia* L.** Utrwalony w formolu 1 : 4, barw.: hematoksylina + eozyna. ROW. mikrofot. Pow. ca 820 x



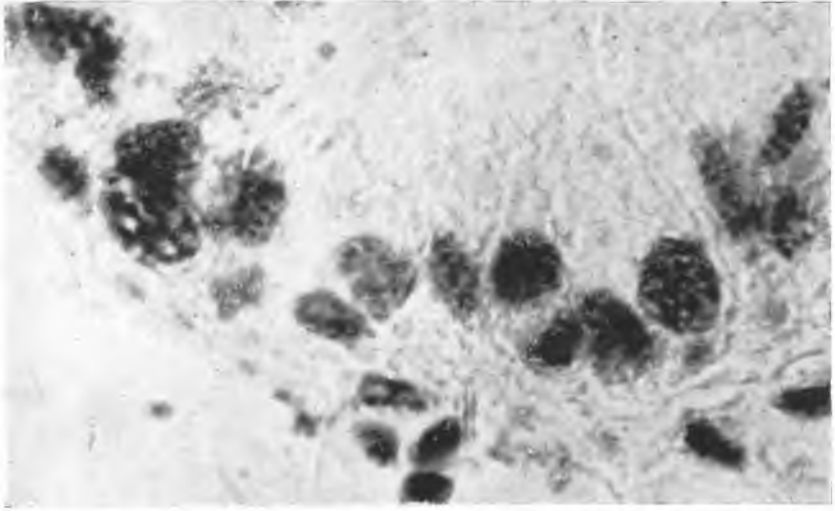
Ryc. 2. **Gruzoł wątrobowy ślimaka *Helix pomatia* L.** Barwienie karminem według metody Besta. Ziarenka glikogenu skupione w strefach obwodowych komórek. Zwracają uwagę bezbarwne błyszczące ziarenka zgrupowane w odcinkach przypodstawnych cytoplazmy. Preparat podbarwiony hematoksylina. ROW. mikrofot. Pow. ca 820 x.



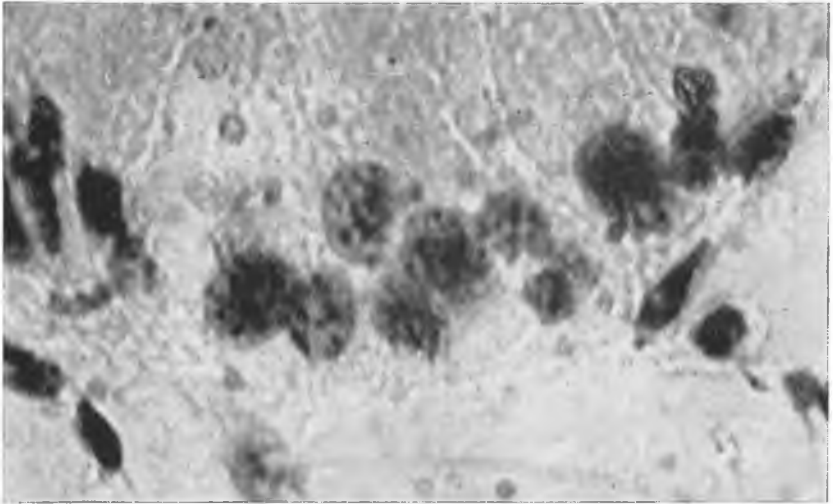
Ryc. 3. **Gruzoł wątrobowy ślimaka *Helix pomatia* L.** Barwienie karminem według metody Besta. Ziarenka glikogenu zgrupowane na biegunie wydzielniczym komórek. Preparat podbarwiony hematoksyliną. ROW mikrofot. Pow. ca 1200 x.



Ryc. 4. **Gruzoł wątrobowy ślimaka *Helix pomatia* L.** Barwienie karminem według metody Besta bez podbarwienia. Ziarenka glikogenu różnej wielkości rozmieszczone przeważnie w obwodowych strefach komórek. ROW mikrofot. Pow. ca 2000 x.

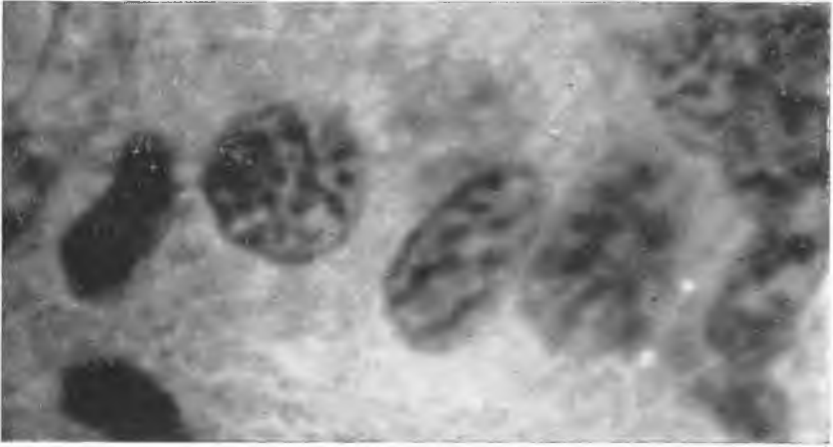


Ryc. 5. **Gruzoł wątrobowy ślimaka *Helix pomatia* L.** Barwienie wg metody Feulgena - Rossenbecka. W jądrach komórek widoczne chromocentra Kollera. Różne rozmieszczenie kwasu dezoksyrybonukleinowego w jądrach warunkuje powstawanie różnych typów jąder komórkowych. ROW mikrofot. Pow. ca 1200 x.

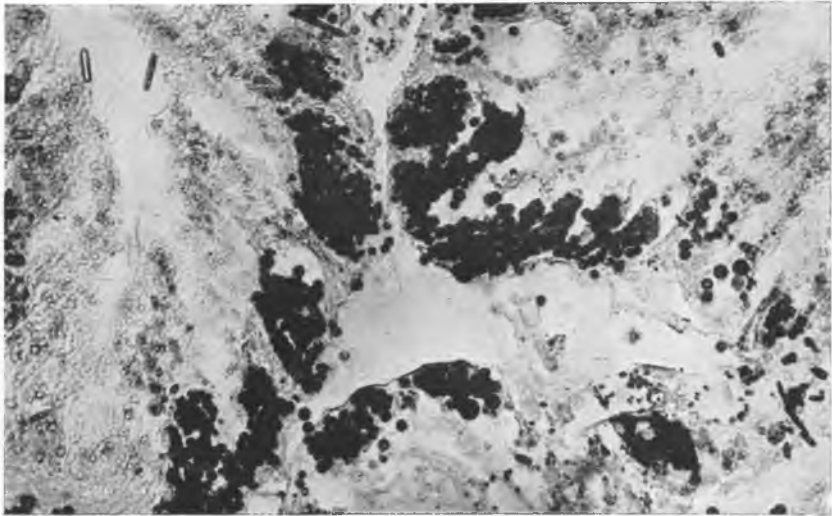


Ryc. 6. **Gruzoł wątrobowy ślimaka *Helix pomatia* L.** Barwienie wg metody Feulgena - Rossenbecka. Obecność kwasu dezoksyrybonukleinowego stwierdza się wyłącznie w karyoplazmie. ROW mikrofot. Pow. ca 1200 x.

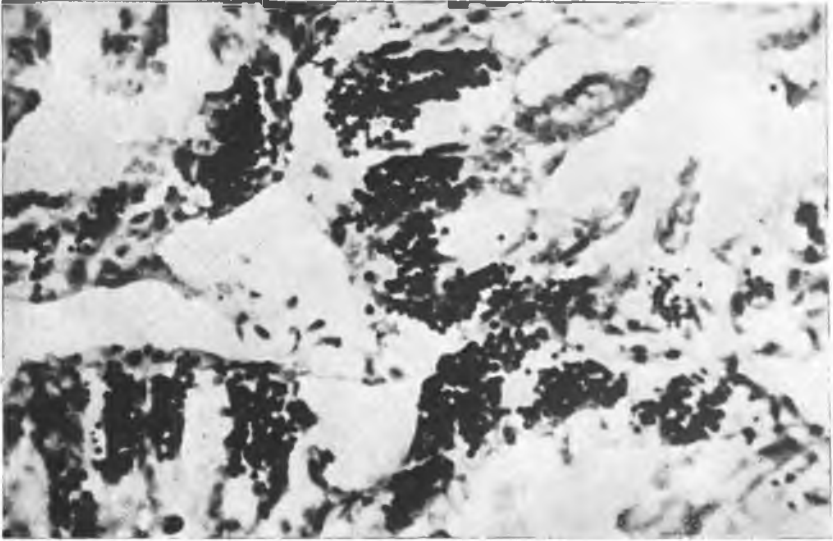
Stanisław Grzycki i Irena Królikowska



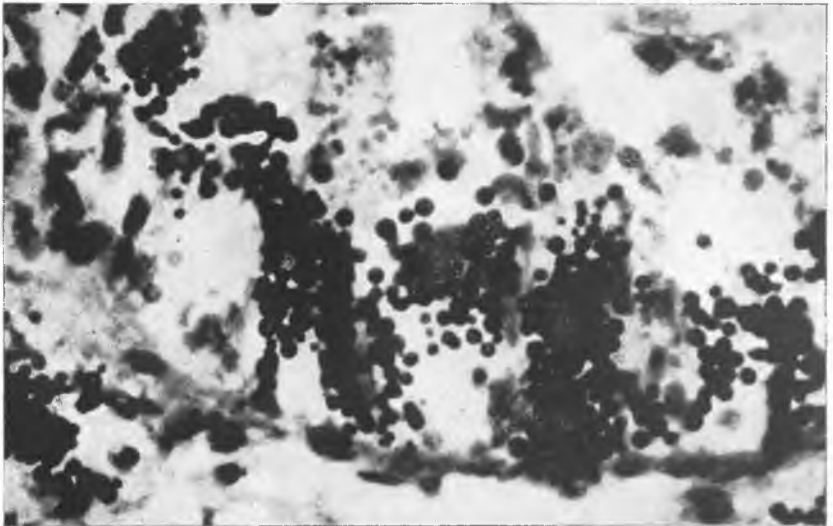
Ryc. 7. **Gruzoł wątrobowy ślimaka *Helix pomatia* L.** Barwienie wg metody Feulgen a - Ros sen be c k a. Dwa zasadnicze typy jąder komórkowych: 1) o skupionych strukturach szczególnie w strefach przyjąderkowych i 2) o rozluźnionym układzie chromatyny. Widoczne chromocentra Kollera. ROW mikrofoto. Pow. ca 3000 x.



Ryc. 8. **Gruzoł wątrobowy ślimaka *Helix pomatia* L.** Ziarenka soli wapnia (fosforan wapnia) w komórkach, wyczernione według metody von K o s s a. Preparat niepodbarwiony. ROW mikrofoto. Pow. ca 820 x.

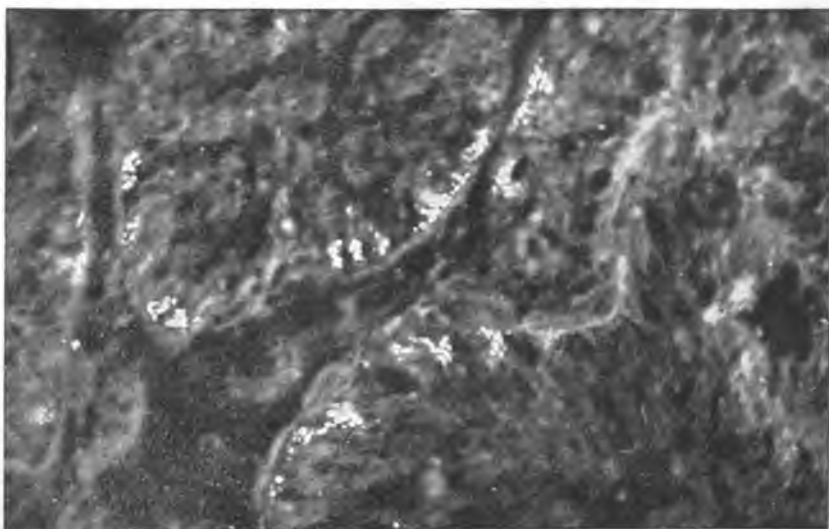


Ryc. 9. **Gruzoł wątrobowy ślimaka *Helix pomatia* L.** Ziarenka soli wapnia (fosforan wapnia) w komórkach, wyczerńione według metody von Koss a. Zwraca uwagę zmienna ilość ziarenek w komórkach. Preparat podbarwiony hematoksyliną, ROW mikrofot. Pow. ca 820 x.

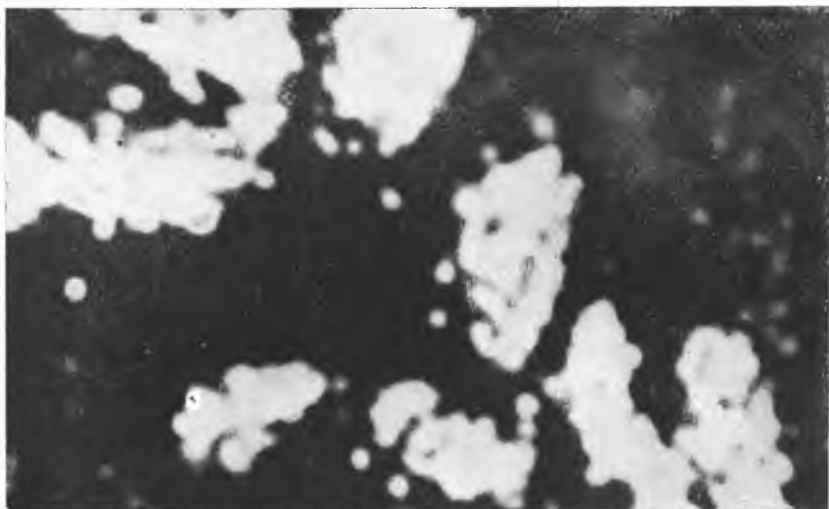


Ryc. 10. **Gruzoł wątrobowy ślimaka *Helix pomatia* L.** Ziarenka soli wapnia (fosforan wapnia) w komórkach, wyczerńione według metody von Koss a. Preparat niepodbarwiony, ROW mikrofot. Pow. ca 1600 x.

Stanisław Grzycki i Irena Królikowska



Ryc. 11. **Gruzoł wątrobowy ślimaka *Helix pomatia* L.** w mikroskopie fluorescencyjnym. Ziarenka soli wapnia (fosforan wapnia) świecą jasno zielonym kolorem. Preparat niepodbarwiony, fluorescencja rodzima. Practiflex mikrofol. Pow. ca 820 x.



Ryc. 12. **Gruzoł wątrobowy ślimaka *Helix pomatia* L.** Ziarenka soli wapnia (fosforan wapnia) świecą kolorem jasno zielonym w mikroskopie fluorescencyjnym. Preparat podbarwiony roztworem fluoresceiny 1 : 10000 przez 3 sekundy. Practiflex mikrofol. Pow. ca 1600 x.