#### ANNALES

# UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA LUBLIN-POLONIA

Vol. XV, 5

SECTIO D

1960

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

### Irena PTASZYŃSKA

### Badania refraktometryczne elementów Golgiego w komórkach nabłonkowych jelita żaby (Rana esculenta L.)

### Рефрактометрические исследования элементов Гольджи в эпителианых клетках кишечника лягушки (Rana esculenta L.)

### Refractometric Examinations of the Golgi Elements in the Epithelial Cells of the Intestine of a Frog (Rana esculenta L.)

Morfofizjologiczne badania struktur Golgiego w nabłonku jelita różnych zwierząt zostały przeprowadzone przez A o y a m a (1931), C h o d n i k a (1947) i C a i n a (1947). Badacze ci zgodnie podkreślają, że struktury Golgiego splatające typową siatkę aparatu Golgiego umiejscowione są zwykle w strefie nadjądrowej i biorą udział w procesie wydzielniczym komórki. Siatkę aparatu Golgiego tworzą różnej grubości pałeczki i niteczki, posiadające ziarniste różańcowate zgrubienia. Elementy te są zwykle ułożone równolegle do długiej osi komórki, przy czym grubość ich, wielkość i umiejscowienie zależą od fazy przemian czynnościowych zachodzących w obrębie bieguna wydzielniczego komórki.

W ostatnich latach do badań struktur Golgiego, oprócz metod srebrowych, została wprowadzona przez Kruszyńskiego (1957) i Grzyckiego (1958) metoda refraktometryczna w oświetleniu fazowo-kontrastowym. Autorzy ci posługują się w badaniach skrawkami mikrotomowymi utrwalonymi, ale nie barwionymi i cieczami przeźroczystymi o znanym współczynniku załamania światła (RI). Kruszyński (1957) obserwował struktury Golgiego w  $\alpha$ -komórkach przedniego plata przysadki mózgowej, Kruszyński i Ostrowski (1959) w nabłonku jelita myszy, Grzycki (1958—1960) w komórkach kanalików głównych nerki żaby, a Ptaszyńska (1959) w nabłonku naskórka dżdżownicy.

W badaniach naszych posługiwaliśmy się i jednymi i drugimi metodami, a celem ich było przeanalizowanie zachowania się struktur Golgiego w nabłonku jelita żaby wodnej pozostającej pod wpływem długotrwałego głodu.

#### MATERIAŁ I METODY

Wycinki jelita cienkiego głodzonej przez 9 miesięcy żaby wodnej (*Rana esculenta L.*) utrwalono — jedne w płynach Schaffera i Hellyego, a drugie wg metod uranowo-srebrowej Cajala i Da Fano z azotanem kobaltu w celu wykazania struktur Golgiego w komórkach nabłonka.

Wycinki jelita utrwalonego w płynach Schaffera i Hellyego po odwodnieniu w alkoholach i ksylenie zamykano w parafinie. Skrawki mikrotomowe grubości 3 mikronów po odparafinowaniu w ksylenie, nie barwione, oglądano w świetle przepuszczonym mikroskopu fazowo-kontrastowego C. Zeiss Jena, Lumipan, używając obiektywu immersyjnego Ph HI 90/1.25. Skrawki odparafinowane zamykano w cieczach przeźroczystych o znanych współczynnikach załamania światła (RI) a mianowicie: p-ksylenie (1,4968), benzenie (1,4983), nitrobenzenie (1,5523) i anilinie (1,5828), postępując ściśle wg przepisu podanego w pracach Kruszyńskiego i Grzyckiego.

Skrawki mikrotomowe jelita utrwalonego wg metod srebrowych po odparafinowaniu, nie podbarwione zamykano w balsamie kanadyjskim.

#### BADANIA WŁASNE

Jak wynika z badań C h o d n i k a (1957), przeprowadzonych na różnych odcinkach przewodu pokarmowego kura domowego (Gallus domesticus) głodzonego przez 24 godziny, struktury Golgiego w nabłonku jelita cienkiego umiejscowione były pośrodku pomiędzy jądrem komórki a jej powierzchnią wydzielniczą. Były one bardzo małe i utworzone z cienkich pałeczek i niteczek posiadających ziarniste zgrubienia różnej wielkości, nie większej jednak od podwójnej grubości pałeczki lub niteczki. Struktury Golgiego miały zwykle wygląd wydłużonej siateczki, przy czym mogły one nawet nie posiadać zdolności impregnacyjnej solami srebra. C h o d n i k uważa, że tylko zastosowanie metody osmowej Mann-Kopscha w modyfikacji L u d f o r d a może dać zadowalające wyniki.

W badaniach naszych zastosowaliśmy tylko metody srebrowe Cajala i Da Fano. Pierwsza dała wyniki niezadowalające, ponieważ nie we wszystkich komórkach nabłonka impregnowały się dostatecznie elementy Golgiego. Natomiast azotan kobaltu wg metody Da Fano we wszystkich komórkach nabłonka jelita wyczernił struktury Golgiego i wszystkie ich elementy (ryc. 1 i 2).

Grube, różańcowato-ziarniste pałeczki umiejscowione były nad górnym biegunem jądra komórki i tworzyły układ siatkowaty, który oglądany w małym powiększeniu mikroskopowym przedstawiał obraz typowego aparatu Golgiego. Pałeczki Golgiego miały budowę ziarnistą, przy czym wielkość ziarenek była różna. Największe ziarenka widoczne były na końcach pałeczek, stąd też miały one wygląd buławkowaty. Buławki swoimi grubymi końcami zwrócone były zwykle w kierunku bieguna wydzielniczego komórki. Wydaje się nam, że duże ziarenka mogą oddzielać się od zespołu pałeczki jeszcze przed przeorganizowaniem się w system ciałka sferoidalnego. Duże ziarenka i ciałka sferoidalne z doskonale wytworzoną otoczką zewnętrzną i wakuolą wewnętrzną były bowiem widoczne nad siatką strukturalną Golgiego na biegunie wydzielniczym komórki. Ilość ziarenek i ciałek sferoidalnych była w różnych komórkach różna. Niewątpliwie zależy to od fazy czynnościowej komórki i w równej mierze od dynamiki przemian elementów Golgiego.

Obserwowane struktury Golgiego w komórkach nabłonka jelita żaby głodzonej przez 9 miesięcy nie wskazują, jak wydaje się nam, na wyraźne zahamowanie przemian metabolicznych, które opisywał C h o dn i k już po upływie 24-godzinnego głodu u ptaków. Obecność bowiem wszystkich elementów Golgiego, a przede wszystkim ciałek sferoidalnych, które są końcowym etapem przemian w cyklu wydzielniczym struktur Golgiego, mogą dowodzić istnienia braku fizjologicznego spoczynku komórki.

Struktury Golgiego były również dobrze widoczne w preparatach utrwalonych i nie barwionych, oglądanych w mikroskopie fazowo-kontrastowym po zastosowaniu techniki refraktometrycznej. Użycie odpowiednich cieczy przeźroczystych o znanym współczynniku RI pozwoliło uzyskać zmianę kontrastu faz wszystkich struktur komórkowych, a tym samym umożliwiło uwidocznienie fazowo ujemnych i fazowo dodatnich tworów, odpowiadających umiejscowieniem, wielkościa i kształtem elementom Golgiego wyczernionym solami srebra. Fazowości ujemna i dodatnia elementów Golgiego zależą w pierwszym rzędzie od wartości współczynnika RI użytej w badaniach refraktometrycznych cieczy oraz cd wypełnienia tymi cieczami pustych wakuoli i kanalików tworzących negatyw struktur Golgiego. Także umiejscowienie, wielkość i kształt poszczególnych elementów jak wykazały badania Grzyckiego (1960) są bardzo zależne od rodzaju utrwalacza użytego do utrwalania badanej tkanki. Podobnie jak Grzycki mieliśmy bowiem możność zauważyć, że wakuole i kanaliki struktur Golgiego w komórkach utrwalonych w płynie Schaffera były szersze i większe, podczas gdy utrwalone w płynie Hellyego były cieńsze i delikatniejsze.

W badaniach naszych uwzględniliśmy zasadniczo cztery ciecze, których współczynnik RI wynosił: 1,4968 (p-ksylen), 1,4963 (benzen), 1,5523 (nitrobenzen) i 1,4828 (anilina). Zamknięcie odparafinowanych skrawków mikrotomowych w p-ksylenie i benzenie pozwoliło oglądać struktury Golgiego jako wakuole, kanaliki, buławki, i delikatne niteczki fazowo ujemne (jasne), umiejscowione w strefie nadjądrowej komórki. Protoplazma, błona jądrowa, chromatyna i jąderka natomiast były fazowo dodatnie (ciemne), (ryc. 3 i 4). Odwrócenie faz nastąpiło po użyciu nitrobenzenu, a przede wszystkim aniliny. Otrzymaliśmy więc całkowicie podobny obraz struktur Golgiego, z tą tylko różnicą, że były one fazowo dodatnie (ciemne), a błona jądrowa, jąderka i protoplazma fazowo ujemne (jasne), (ryc. 5 i 6).

Dokładna analiza struktur Golgiego przeprowadzona w mikroskopie fazowo-kontrastowym przy użyciu techniki refraktometrycznej, a przede wszystkim zmienna ilość w różnych komórkach małych i dużych wakuoli, oraz różańcowato zgrubiałych kanalików utwierdziły nas w przekonaniu, że w komórkach jelita żaby mimo wielomiesięcznego głodu odbywają się procesy metaboliczne, wydzielnicze, i że struktury Golgiego biorą w tych procesach bezpośredni udział.

### OBJAŚNIENIA RYCIN

Ryc. 1. Nabłonek jelita cienkiego żaby wodnej głodzonej (*Rana esculenta* L.). Struktury Golgiego wyczernione azotanem kobaltu wg metody Da Fano. Grube, różańcowate pałeczki ułożone w różnych kierunkach splatają typową siatkę aparatu Golgiego w strefie nadjądrowej. Ziarenka Golgiego i ciałka sferoidalne umiejscowione są na biegunie wydzielniczym komórki. Mikroskop Nf, C. Zeiss. Jena. Obiektyw planachromat 40/0,65, 160/0,17. Okular K 10 x T. Mikrofot. Practina FX. Pow. ca 1200  $\times$ .

Ryc. 2. Nabłonek jelita cienkiego żaby wodnej głodzonej (*Rana esculenta* L.). Struktury Golgiego wyczernione azotanem kobaltu wg metody Da Fano. Mikroskop Nf. C. Zeiss. Jena. Obiektyw planachromat 40/0,65, 160/0,17. Okular K  $10 \times T$ . Mikrofot. Practina FX. Pow. ca 1200  $\times$ .

Ryc. 3. Nabłonek jelita cienkiego żaby wodnej głodzonej (*Rana esculenta* L.). Fazowo ujemne delikatne kanaliki i wakuole struktur Golgiego umiejscowione w strefie nadjądrowej komórki. P-ksylen (1,4968). Mikroskop fazowo-kontrastowy Lumipan C. Zeiss. Jena. Obiektyw immersyjny Ph HI 90/1,25. Okular K  $10 \times T$ . Mikrofot. Practina FX. Pow. ca  $2000 \times$ .

Ryc. 4. Nabłonek jelita cienkiego żaby wodnej głodzonej (*Rana esculenta* L.). Struktury Golgiego fazowo ujemne układem swoich elementów przypominają typowy aparat Golgiego. Benzen (1,4983). Mikroskop fazowo-kontrastowy Lumipan C. Zeiss, Jena. Obiektyw immersyjny Ph HI 90/1,25. Okular K  $10 \times T$ . Mikrofot. Practina FX. Pow. ca 2000 ×.

Ryc. 5. Nabionek jelita cienkiego żaby wodnej głodzonej (Rana esculenta L.). Fazowo dodatnie elementy Golgiego skupione są w strefie nadjądrowej komórki. Nitrobenzen (1,5523). Mikroskop fazowo-kontrastowy Lumipan C. Zeiss, Jena. Obiektyw immersyjny Ph HI 90/1,25. Okular K  $10 \times T$ . Mikrofot. Practina FX. Pow. ca  $2000 \times$ .

Ryc. 6. Nabłonek jelita cienkiego żaby wodnej głodzonej (*Rana esculenta* L.). Fazowo dodatnie różnej wielkości wakuole i cienkie różnej długości różańcowate kanaliki umiejscowione w strefie nadjądrowej komórki. Anilina (1,5828). Mikroskop fazowo-kontrastowy Lumipan C. Zeiss, Jena. Obiektyw immersyjny Ph HI 90/1,25. Okular K 10 × T. Mikrofot. Practina FX. Pow. ca 2000 ×.

#### PIŚMIENNICTWO

- 1. Aoyama F.: Experimentelle Untersuchungen über den Golgischen Binnennetzapparat in Auskleidungsepithel — und Drüsenzellen des Magens. Zeitsch. Zellforsch. mikr. Anat. 12, 179—206, 1931.
- Cain A. J.: Demonstration of Lipine in the Golgi Apparatus in Gut Cells of Glossiphonia. Q. J. Micr. Sci. 88, 151-157, 1947.
- 3. Chodnik K. S.: A Cytological Study of the Alimentary Tract of the Domestic Fowl (Gallus domesticus). Q. J. Micr. Sci. 88, 419-443, 1947.
- Grzycki S.: Badania refraktometryczne struktur Golgiego przy użyciu mikroskopu fazowo kontrastowego. Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska Sec. D. 13, 335–340, 1958.
- 5. Grzycki S.: The Effect of Different Fixatives on the Golgi Structure Examined by Immersion Refractometry in Phase Contrast Illumination. J. Cytologia. Tokyo. Japan. 25, 108-111, 1960.
- 6. Grzycki S.: The Morphology of the Golgi Element Examined Refractometrically by Phase Contrast Microscopy. Proc. Zool. Soc. Calcutta India. 12, 59-69, 1959.
- 7. Kruszyński J.: Golgi structure of adenopituitary cells revealed by refractometry and microincineration. Exp. Cell. Res. 13, 189-193, 1957.
- 8. Kruszyński J., Ostrowski K.: Golgi Structure of Mouse Intestinal Epithelium Examined by Refractometry and Interferometry. Exp. Cell. Res. 16, 358—363, 1959.
- Ptaszyńska I.: The Golgi Elements in the Epithelial Cells of the Epidermis of Lumbricus terrestris L. Examined Refractometrically by Phase Contrast Microscope. Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska. Sec. D. 14, 13-17, 1959.

## РЕЗЮМЕ

Автором произведены рефрактометрические исследования структур Гольджи в эпителианых клетках кишечника водной лягушки, моримой голодом в течение 9 месяцев. Названные клетки фиксировались в жидкостях Шаффера и Гелли. Погружение очищенных от парафина и неокрашенных микротомических срезов в р-ксилоле (1,4968) и бензоле (1,4983) позволило наблюдать в фазовоконтрастирующем освещении фазовоотрицательные элементы Гольджи, как вакуоли, канальцы, булавовидные и нитевидные образования расположенные в околоядерной зоне (рис. 3 и 4). Фазовоположительные элементы Гольджи были выявленны после применения нитробензола (1.5523) и анилина (1.5828) (Рис. 5 и 6). Локализация, величина и форма фазовоотрицательных и фазовоположительных структур Гольджи вполне отвечали аналогичным структурам, выявленным в эпителиальных клетках кишечника водной лягушки после применения методов серебрения по Кахалу и Да Фано (рис. 1 и 2).

Произведенный автором анализ структур Гольджи, насыщенных солями серебра и обнаруженных также под фазовоконтрастным микроскопом с применением рефрактометрической техники, а прежде всего непостоянное количество в разных клетках кишечника лягушки малых и крупных вакуолей, зернышек, а также чётко утолщенных канальцев, палочек и нитевидных элементов, позволяют выдвинуть предположение, что в клетках кишечника лягушки, несмотря на длившееся несколько месяцев морение голодом, протекают метаболические и выделительные процессы, и что структуры Гольджи принимают в этих процессах непосредственное участие.

Рис. 1. Эпителий тонких кишок водной лягушки (Rana esculenta L.) моримой голодом. Структуры Гольджи вычерненные азотнокислым кобальтом по методу Да Фано. Толстые чётковидные палочки, пробегающие в разных направлениях образуют типичную сетку аппарата Гольджи в надъядерной зоне. Зернышка Гольджи и сфероидные тельца расположены на выделительном полюсе клетки. Микроскоп Nf. K. Цейс, Иена. Планахромат. Объектив 40/0,65, 160/0,17. Окуляр К 10 х Т. Микрофот. Практина FX. Увелич. около 1200 х.

Рис. 2. Эпителий тонких кишок водной лягушки (Rana esculenta L.) моримой голодом. Структуры Гольджи вычерненные азотнокислым кобальтом по методу Да Фано. Микроскоп Nf. K. Цейс, Иена Планохроматич. Объектив 40/0,65, 160/0,17. Окуляр К 10 х Т. Микрофот. Практина FX. Увелич. около 1200 х.

Рис. 3. Эпителий тонких кишок водной лягушки (Rana esculenta L.) моримой голодом. Фазовоотрицательные очень тонкие канальцы и вакуоли расположены в наядерной зоне клетки. Р — ксилол (1,4968). Фазовоконтрастный макроскоп Люмипан К. Цейс, Иена. Иммерсионный объектив Ph HI 90/1,25. Окуляр К 10 х Т. Микрофот. Практина FX. Урелич. ок. 2000 х.

Рис. 4. Эпителий тонких кишок водной лягушки (Rana esculenta L.) моримой голодом. Фазовоотрицательные структуры Гольджи размещением своих элементов напоминают типичный аппарат Гольджи. Бензол (1,4983). Фазовоконтрастный микроскоп Люмипан К. Цейс, Иена. Иммерсионный объектив Ph HI 90/1,25. Окуляр К 10 х Т. Микрофот. Практина FX. Увелич. около 2000 х.

Рис. 5. Эпителий тонких кишок водной лягушки (Rana esculenta L.) моримой голодом. Фазовоположительные элементы скопляются в надъядерной зоне клетки. Нитробензол (1,5523). Фазовоконтрастный микроскоп Люмипан К. Цейс, Иена. Иммерсионный объектив Ph H1 90/1,25. Окуляр К 10 х Т. Микрофот. Практина FX. Увелич. около 2000 х.

Рис. 6. Эпителий тонких кишок водной лягушки (Rana esculenta L.) моримой голодом. Фазовоположительные разной величины вакуоли и тонкие разной длины чёт-ковидные канальцы расположены в надъядерной зоне клетки. Анилин (1,5878). Фазовоконтрастный микроскоп Люмипан К. Цейс, Иена. Иммерсионный объектив Ph HI 90/1,25. Окуляр К 10 х Т. Микрофот. Практина FX. Увелич. ок. 2000 х.

### SUMMARY

Refractometric examinations were made of the Golgi structure in the epithelial cells of the intestine of a frog (*Rana esculenta* L.), which was starved for eight months. The cells were fixed in Schaffer's and Helly's fluids. Mounting of deparaffinized and unstained slices in p-xylene (l. 4968) and benzene (1.4983) made it possible to examine the phase negative Golgi element, in phase contrast illumination, as vacuoles, canaliculi, rods and filaments, which were situated in the supranuclear region (Figs. 3 and 4). Phase positive elements however located in the supranuclear region were examined by mounting in nitrobenzene (1.5523) and aniline (1.5878) (Figs. 5 and 6). The distribution, size and shape of the phase positive and phase negative Golgi structure corresponded to a similar structure obtained in the epithelial intestinal cells by using Cajal's and Da Fano's silver methods (Figs. 1 and 2).

Two sets of evidence led the author to the conclusion that, in spite of long-lasting starvation, in the intestinal cells of the frog metabolic and secretory processes take place, the Golgi structure taking a direct part in them. The first was the analysis of the Golgi structure obtained by silver salts impregnation and demonstrated also in the phase contrast microscope by using refractometric technique. The second was the variable number in various cells of small and big vacuoles and granules, crenated canaliculi, rods and filaments.

Fig. 1. The epithelium of the small intestine of a starved frog (Rana esculenta L.). The Golgi structure blackened with cobalt nitrate according to Da Fano's method. Thick crenated dispersed rods make a typical net of the Golgi apparatus in the supranuclear region. Golgi granules and spheroid bodies are placed on the secretory pole of the cell. C. Zeiss (Jena) Nf microscope Planachromat objective 40/0.65, 160/0.17, ocular K  $10 \times T$ . Practina FX camera.  $1200 \times$ .

Fig. 2. The epithelium of the small intestine of a starved frog (Rana esculenta L.). The Golgi structure blackened with cobalt nitrate according to Da Fano's method. C. Zeiss (Jena) Nf microscope. Planachromat objective 40/0.65, 160/0.17, ocular K  $10 \times T$ . Practina FX camera.  $1200 \times .$ 

Fig. 3. The epithelium of the small intestine of a starved frog (*Rana esculenta* L.). Phase negative delicate canaliculi and vacuoles of the Golgi structure are situated in the supranuclear region. P-xylene (1.4968). C. Zeiss (Jena) Lumipan phase contrast microscope, oil immersion objective Ph HI 90/1.25, ocular K  $10 \times T$ . Microphot. Practina FX camera. 2000  $\times$ .

Fig. 4. The epithelium of the small intestine of a starved frog (*Rana esculenta* L.). The phase negative Golgi structure by the distribution of its elements resembles a typical Golgi apparatus. Benzene (1.4983). C. Zeiss (Jena) Lumipan phase contrast microscope, oil immersion objective Ph HI 90/1.25, ocular K  $10 \times$ )T. Microphot. Practina FX camera. 2000  $\times$ .

Fig. 5. The epithelium of the small intestine of a starved frog (*Rana esculenta* L.). Phase positive Golgi elements are gathered in the supranuclear region of the cell. Nitrobenzene (1.5523). Lumipan C. Zeiss (Jena) phase contrast microscope, oil immersion objective Ph HI 90/1.25, ocular K  $10 \times T$ . Microphot. Practina FX camera. 2000  $\times$ .

Fig. 6. The epithelium of the small intestine of a starved frog (*Rana esculenta* L.). Phase positive vacuoles and thin crenated rods, both variable in length, are located in the supranuclear region. Aniline (1.5878). Lumipan C. Zeiss (Jena) phase contrast microscope, oil immersion objective Ph HI 90/1.25, ocular K  $10 \times T$ . Microphot. Practina FX camera. 2000  $\times$ .

Papier druk-sat III kl 8.5 gr	70 x 100	Dauku 7 stron + 3 tablic
Annales U.M.C.S. Lublin 1960.	Lub. Druk. Pras.—Lublin Unicka 4	L. Zam. 516 2.11 61.
800 + 125 egz. W-4	Data otrzymania manuskryptu 2.1161 r.	Data ukończenia druku 30.VIII.61.



Ryc. 1.



Ryc. 2.

Irena Ptaszyńska



Ryc. 3.



Ryc. 4.

Irena Ptaszyńska



Ryc. 5.



Ryc. 6.

Irena Ptaszyńska