

Samodzielną Pracownią Mikroskopii Elektronowej. Instytut Biologiczno-Morfologiczny
Akademia Medyczna w Lublinie
Kierownik: doc. dr hab. Maciej Latański

Maciej LATALSKI, Janina HALLIOP,
Daniela OBUCHOWSKA

**Obserwacje struktur autofagocytarnych w komórkach nabłonka
kanalików proksymalnych nerki szczura**

Наблюдения за аутофагоцитарными структурами в клетках эпителия проксимальных канальцев почки у крыс

Observations of Autophagosomes in the Epithelial Cells of a Rat Kidney Proximal Tubules

Według Ericssona, Trumpa i Weibla (2) w komórkach kanalików proksymalnych nerki kwaśna fosfataza występuje m.in. w dwu typach wrętowych: cytosegresomach i cytosomach. Różnią się one pod względem morfologicznym. Cytosegresomy (wakuole autofagowe, autofagosomy) otoczone są pojedynczą, a niekiedy podwójną błoną i zawierają w swym wnętrzu rozpoznawalne struktury cytoplazmatyczne, jak mitochondria czy siatkę śródplazmatyczną. Zawarte w cytosegresomach struktury często wykazują zmiany degeneracyjne, a ciała te wydają się być przestrzeniami cytoplazmy przeznaczonymi do wewnątrzkomórkowego trawienia. Cytosomy (lizosomy wtórne) są zawsze otoczone błoną pojedynczą. Posiadają różną wielkość i bardzo zróżnicowaną zawartość. W ich wnętrzu można zauważyć zwykle gęsty materiał błoniasty lub włóknisty, gęste elektronowo ziarna, cząstki o wyglądzie ferrytyny, figury mielinowe, pęcherzyki, a niekiedy materiał krystaliczny.

Jest rzeczą stwierdzoną, że cytosomy mogą powstawać z cytosegresomów, co jednak nie znaczy, że te ostatnie są jedynym źródłem w procesie tworzenia się cytosomów. Natomiast w powstawaniu cytosegresomów przypisywano udział aparatowi Golgiego, błonie komórkowej oraz gładkiej siatce śródplazmatycznej. Celem naszej pracy było przeanalizowanie ultrastruktury i cytochemii obu rodzajów tych struktur w komórkach kanalików proksymalnych nerki szczura w warunkach doświadczalnych, ze szczególnym uwzględnieniem obrazów, które mogły rzucić światło na proces formowania się cytosegresomów.

MATERIAŁ I METODYKA

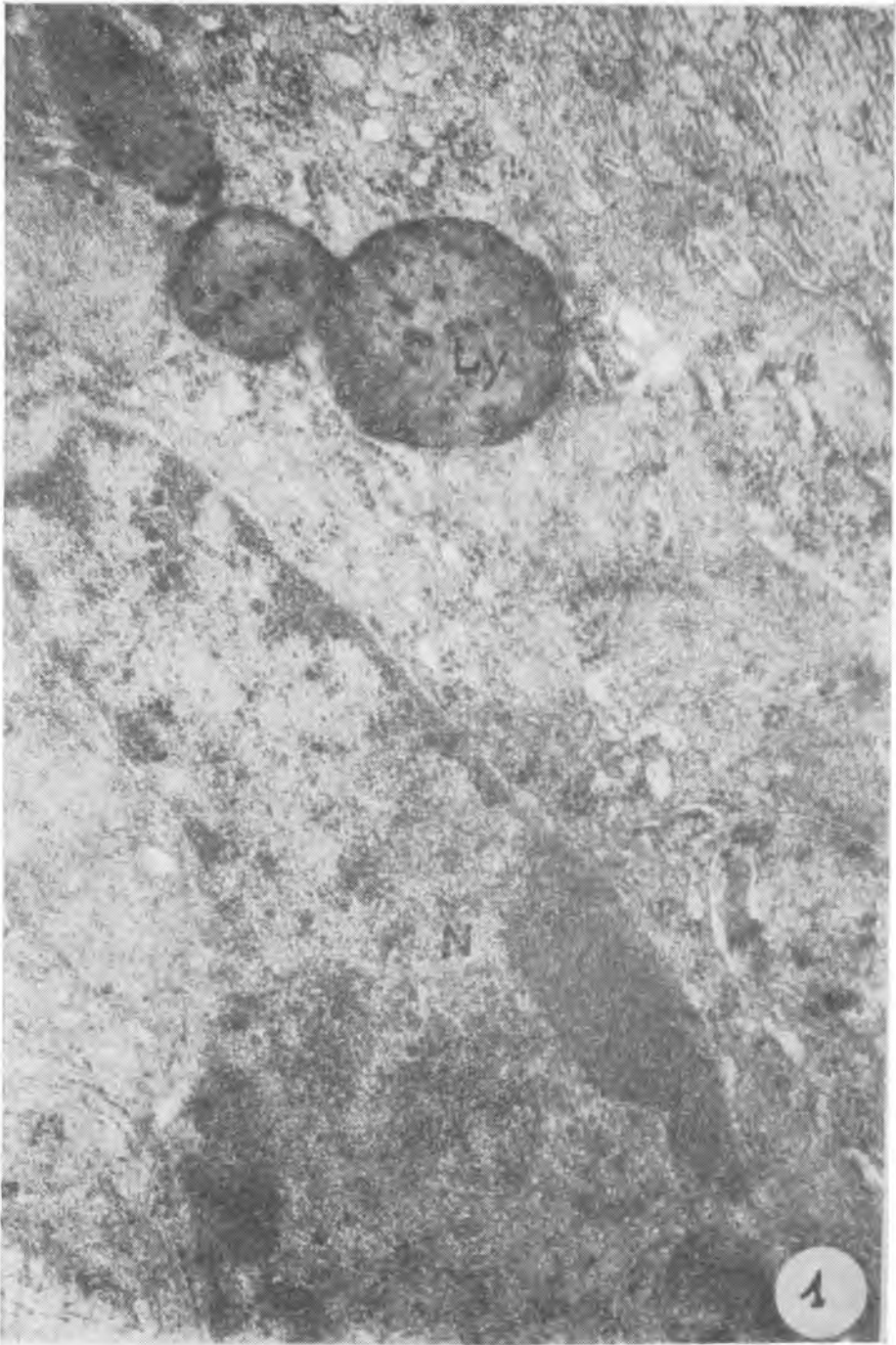
Wcześniejsze nasze obserwacje (4) wykazały, że zatrucie insektycydem Sevin

(*n*-metylokarbaminian-naftolu) powoduje m.in. wzrost liczby ciał wtrętowych w komórkach nabłonkowych kanalików proksymalnych nerki szczura. Preparat ten zastosowano również w obecnym doświadczeniu, gdyż większa liczba tych ciał stwarzała lepsze warunki zaobserwowania stadiów ich powstawania. Badania przeprowadzono na szczurach białych, samcach, o ciężarze ciała 170—180 g., którym podawano dożołądkowo Sevin w postaci emulsji 1 raz dziennie w ilości 10 mg/kg przez okres 3 miesięcy. Wycinki nerek (prawych) pobierano w następnym dniu po zakończeniu podawania preparatu. Materiał do badań ultrastrukturalnych przygotowywano w typowy sposób dla techniki mikroskopowo-elektronowej, utrwalając go w aldehydzie glutarowym i czterotlenku osmu i zatapiając w Eponie. Badania morfologiczne uzupełniono cytochemicznymi, wykonując odczyn na kwaśną fosfatazę (wg Gomoriego) występującą zarówno w cytosegresomach, jak i cytosomach. Preparaty oglądano i fotografowano w mikroskopie elektronowym Tesla BS 613.

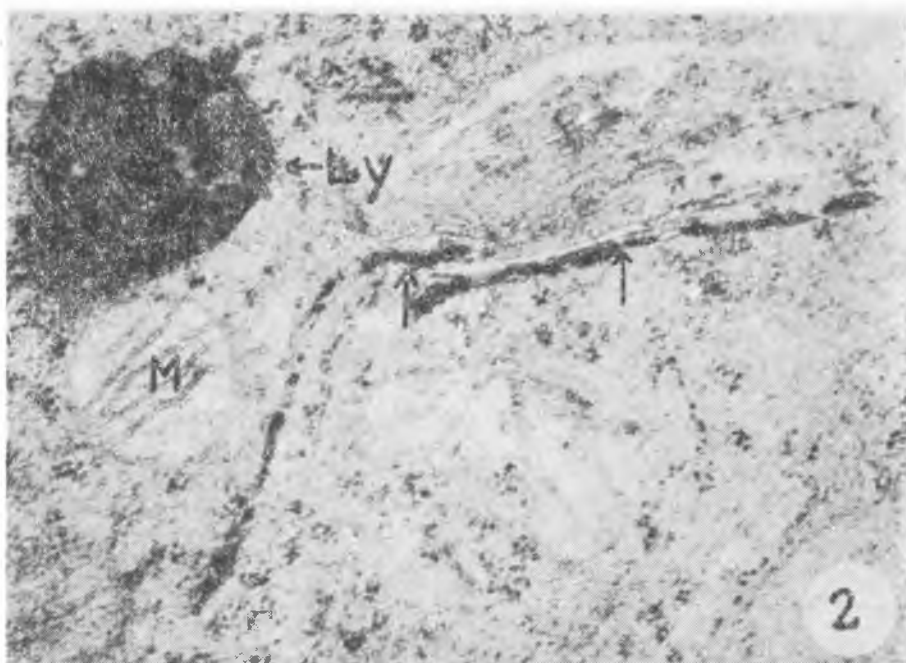
BADANIA WŁASNE

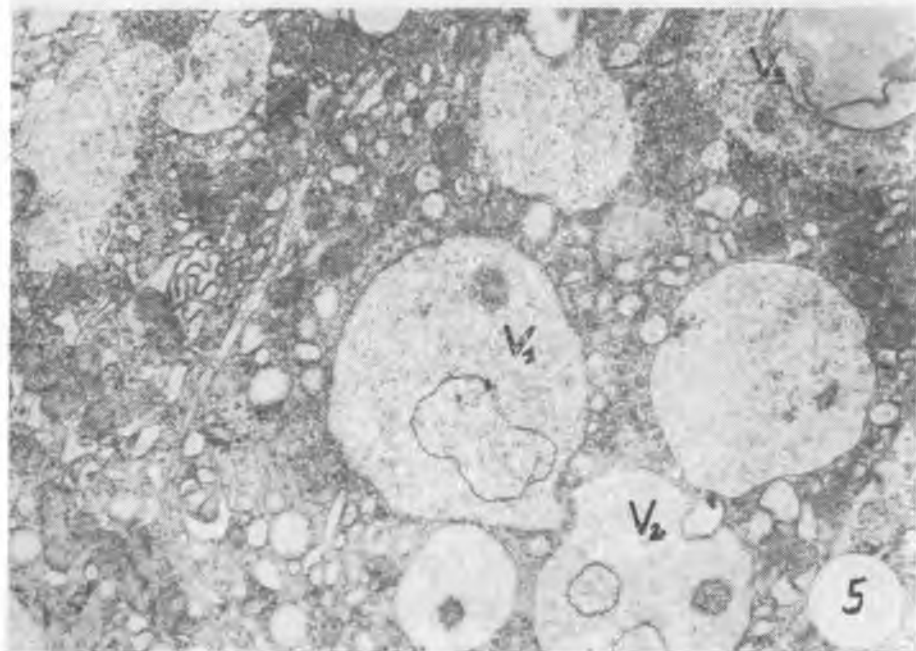
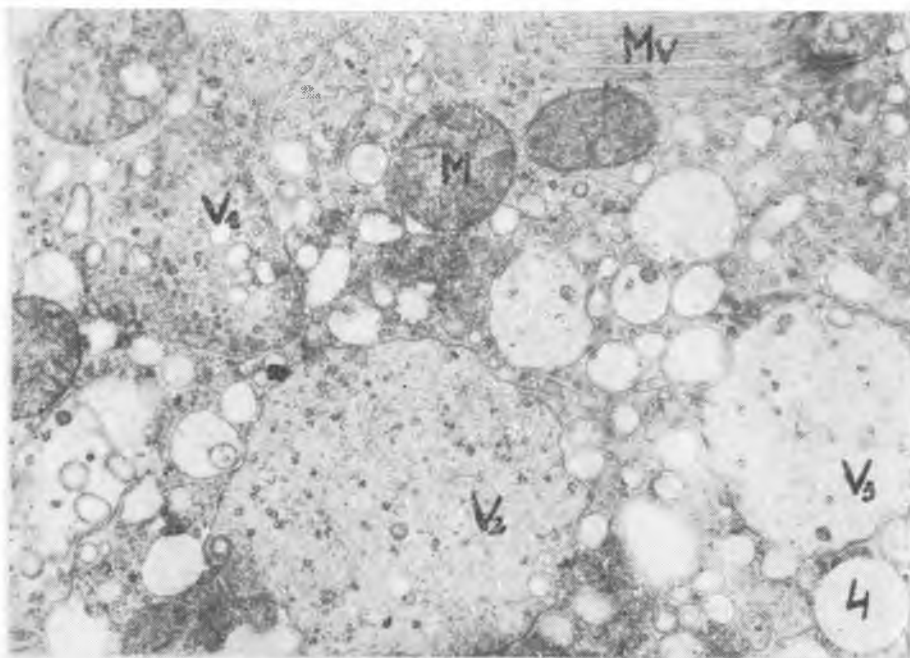
Na preparatach cytochemicznych w cytoplazmie komórek kanalików proksymalnych stwierdzono dużą liczbę struktur zawierających produkt reakcji. Najliczniej reprezentowaną formą spośród ciał wykazujących odczyn na kwaśną fosfatazę były lizosomy (ryc. 1). Ale obecność odczynu obserwowano też w obrębie niektórych błon, zaliczanych przez nas do układu gładkiej siatki śródplazmatycznej. Produkt reakcji widoczny był między dwoma równolegle ułożonymi błonami, które posiadały przebieg prosty, lub zaginały się łukowato na jednym ze swych końców (ryc. 2) Łukowate zagięcia wyraźnie się pogłębiały (ryc. 3), wykazując tendencję do łączenia się z przeciwnym końcem tej pary błon i tym samym zamykania określonej przestrzeni cytoplazmy (ryc. 3). Często w obrębie izolowanej przestrzeni widoczne były struktury wewnątrzkomórkowe (mitochondria) lub drobne ziarnistości będące prawdopodobnie śladami odczynu na kwaśną fosfatazę.

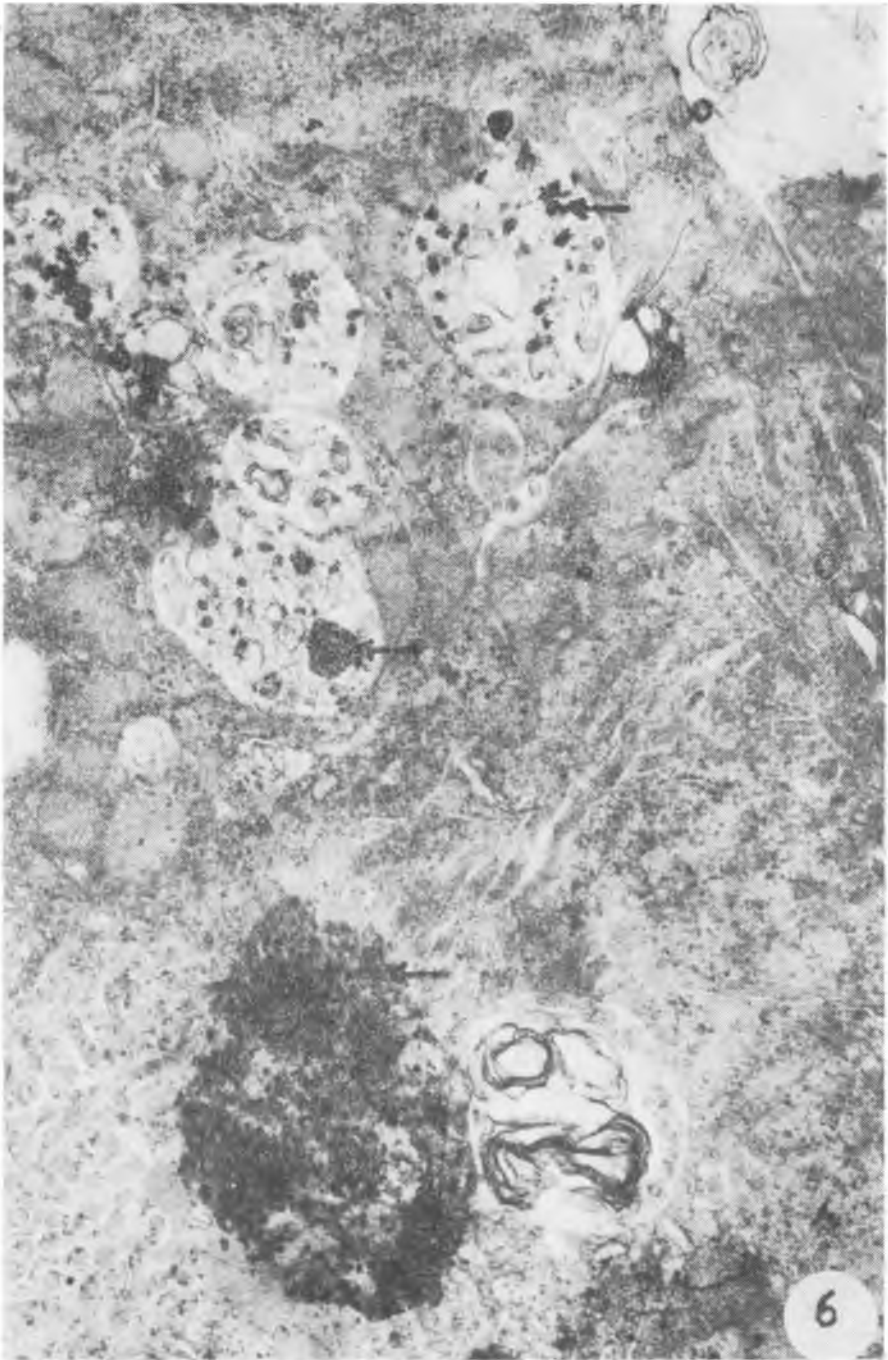
Otoczone błoną przestrzenie cytoplazmy w komórkach nabłonkowych kanalików proksymalnych nerki widoczne też były w wykonanych przez nas preparatach morfologicznych, bez odczynu specyficznego dla kwaśnej fosfatazy (ryc. 4). W ich obrębie stwierdzano niekiedy oprócz drobnoziarnistego materiału i pojedynczych rybosomów obecność pęcherzyków, prawdopodobnie pinocytarnych pęcherzyków apikalnych, charakterystycznych dla tych komórek (V_1). W innych pozostawał tylko drobnoziarnisty materiał i rybosomy (V_2), a w jeszcze innych — wewnątrz ulegało dalszemu przejaśnieniu, stając się bardziej „puste” elektronowo (V_3). Część spośród ostatnio wymienionych tworów zawierała pojedyncze formy włókniste lub zarysy struktur mielinowych (ryc. 5), tworząc morfologiczne obrazy różnych stadiów lizosomów wtórnych. Po wykonaniu badań cytochemicznych stwierdzono obecność produktu reakcji na kwaśną fosfatazę we wszystkich tych rodzajach ciał wtrętowych (ryc. 6), co definityw-



M. Latałski, J. Halliop, D. Obuchowska







nie pozwala na określenie ich mianem autofagosomów lub lizosomów wtórnych.

OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ

Wprowadzone przez Ericssona i wsp. (1, 2) pojęcie cytosomów i cytosegresomów wydaje się być w pełni uzasadnione. Autorzy definiują pod względem morfologicznym różne formy ciał wtrętowych, tak licznie występujących w komórkach nabłonka kanalików nerkowych, szczególnie ich odcinków proksymalnych. Odrębne zagadnienie stanowi proces formowania się tych struktur. Wiele przemawia za tym, że cytosomy powstają z cytosegresomów. Stwierdzone w cytosegresomach organelle ulegają stopniowo degeneracji, powstają liczne formy mielinowe, dochodzi do dezorganizacji struktur błonistych włącznie z rozplywaniem się błon. Tak dochodzi do utworzenia elementów pośrednich pomiędzy cytosegresomami a cytosomami. Były one stwierdzone przez licznych badaczy (2, 3). Widoczne na ryc. 4 formy ciał wtrętowych spotykane w naszym materiale również mogą przemawiać za tą drogą powstawania cytosomów, chociaż nie są one w pełni przekonujące. Prawdopodobnie nie wszystkie cytosomy powstają na tej drodze. Możliwe jest powstawanie podobnych struktur w procesie pinocytozy i fagocytozy (2), niezależnie od istniejących cytosegresomów.

Nie został natomiast całkowicie wyjaśniony sposób tworzenia cytosegresomów i nie można jednoznacznie odpowiedzieć na pytanie, jak dochodzi do wyizolowania z otoczenia pewnego obszaru cytoplazmy wraz ze znajdującymi się tam organellami. Najwięcej zwolenników posiada koncepcja przypisująca w tym procesie główną rolę gładkim błonom śródplazmatycznym. Potwierdzają to również wyniki naszych obserwacji. Sądzimy, że błony gładkiej siatki śródplazmatycznej są tym elementem, który stopniowo zamyka pewien obszar cytoplazmy i w ten sposób formułuje przyszyły cytosegresom.

Cytosegresomy wykazują obecność kwaśnej fosfatazy. Dotychczas przyjmuje się dwa sposoby przechodzenia wymienionego enzymu lizosomalnego do tych struktur: 1) fosfataza kwaśna jest obecna w układzie błon już w czasie powstawania cytosegresomów i 2) enzymy hydrolityczne dostarczane są do cytosegresomów na drodze fuzji z lizosomami pierwotnymi (3). Przyjmując ten drugi sposób należy założyć, że cytosegresomy reprezentują ciała „prelizosomalne”, które w trakcie tworzenia się nie wykazują obecności enzymów. W naszych obserwacjach w czasie formowania się cytosegresomu produkt reakcji na kwaśną fosfatazę widoczny był nie tylko w układzie ER, ale prawdopodobnie także w obrębie otaczanej cytoplazmy. W oparciu o powyższe wydaje się nam prawdopodob-

ne, że dla dostarczenia enzymów hydrolitycznych do cytosegresomów nie jest konieczna ich fuzja z lizosomami, co oczywiście nie wyklucza możliwości takich połączeń. Należy jednak podkreślić, że obserwacje nasze prowadzone były w warunkach eksperymentalnych, gdzie podawany preparat powodował wzrost liczby ciał zawierających kwaśną fosfatazę.

PIŚMIENNICTWO

1. Ericsson J. L. E., Trump B. F.: Lab. Invest. **13**, 1427—1456, 1964.
2. Ericsson J. L. E., Trump B. F., Weibel J.: Lab. Invest. **14**, 1341—1465, 1965.
3. Ericsson J. L. E.: Mechanism of Cellular Autophagy in Lysosomes in Biology and Pathology II. Amsterdam—London 1969.
4. Latałski M., Sokołowska J.: Pamiętnik XIII Zjazdu Urologów Polskich. Lublin 1972.

Otrzymano 5 I 1974.

OBJAŚNIENIA DO RYCIN

Ryc. 1. Komórka nabłonka kanalika proksymalnego nerki szczura. N — jądro, Ly — lizosomy. Pow. ok. 25 000×.

Ryc. 2. Komórka nabłonka kanalika proksymalnego nerki szczura. Ly — lizosomy, M — mitochondria, strzałki — odczyn w błonach gładkich. Pow. ok. 35 000×.

Ryc. 3. Komórka nabłonka kanalika proksymalnego nerki szczura. Ly — lizosomy, M — mitochondria, strzałki — odczyn w błonach gładkich. Pow. ok. 35 000×.

Ryc. 4. Komórka nabłonka kanalika proksymalnego nerki szczura. M — mitochondria, Mv — mikroosmki, V₁—V₃ — otoczone błoną fragmenty cytoplazmy. Pow. ok. 17 000×.

Ryc. 5. Komórka nabłonka kanalika proksymalnego nerki szczura. V₁—V₃ — ograniczone błonami przestrzenie cytoplazmy z pojawiającymi się formami włóknistymi i zarysami struktur mielinowych. Pow. ok. 17 000×.

Ryc. 6. Komórka nabłonka kanalika proksymalnego nerki szczura. Strzałki — produkt reakcji na kwaśną fosfatazę w wakuolach autofagowych. Pow. ok. 25 000×.

РЕЗЮМЕ

С целью усиления процесса образования вторичных лизосомов в клетках эпителия проксимальных канальцев в течение 3 месяцев крысам подавался препарат Sevin в дозе 10 мг/кг в сутки. Процесс формирования аутофагоцитарных структур исследовался при помощи проведения цитохимической реакции на кислую фосфатазу. Установлено участие гладких мембран в формировании этих структур.

SUMMARY

For the purpose of intensifying the genesis of secondary lysosomes in the epithelial cells of the proximal tubules of a kidney Sevin in a dose of 10 mg/kg was administered to rats for 3 months. While performing the

cytochemical reaction to acid phosphatase the genesis process of outophagosomes was analysed. The participation of the smooth endoplasmic reticulum was confirmed in the genesis of these structures.

EXPLANATION OF FIGURES

Fig. 1. Epithelial cell of the proximal tubule of rat kidney. N — nucleus, Ly — lysosomes. Magnif. ca 25 000×.

Fig. 2. Epithelial cell of the proximal tubule of a rat kidney. Ly — lysosomes, M — mitochondria. Arrows — reaction in smooth endoplasmic reticulum. Magnif. ca 35 000×.

Fig. 3. Epithelial cell of the proximal tubule of a rat kidney. Ly — lysosomes, M — mitochondria. Arrows — reaction in smooth endoplasmic reticulum.

Fig. 4. Epithelial cell of the proximal tubule of a rat kidney. M — mitochondria, Mv — micrivilli, V_1 — V_3 — cytoplasm surrounded by membrane. Magnif. ca 17 000×.

Fig 5. Epithelial cell of the proximal tubule of a rat kidney. V_1 — V_3 — cytoplasm surrounded by membrane with fibrylar and myelin structures. Magnif. ca 17 000×.

Fig. 6. Epithelial cell of the proximal tubule of a rat kidney. Arrows — reaction to acid phosphatase in autophagosomes. Magnif. ca 25 000×.

