

Kierownik: prof. dr med. Stanisław Grzycki

Badania refraktometryczne struktur Golgiego przy użyciu mikroskopu fazowo-kontrastowego

Refractometry of the Golgi Structure by Phase - Contrast Microscopy

W badaniach naszych nad umiejscowieniem struktur Golgiego w komórkach kanalików głównych nerki żaby ograniczyliśmy się do cieczy przeźroczystych, których RI wynosiły od 1,4417 do 1,5791. Wykorzystując różne wartości współczynników załamania światła (RI) użytych do badań cieczy można było uzyskać zmianę kontrastu faz struktur komórkowych, a tym samym ustalić ich zróżnicowanie i wartość refraktryczną.

Nerki żab płowych (*Rana temporaria* L.) głodujących przez 9 miesięcy, utrwalano jedne w alkoholu-formalinie, a drugie wg metody uranowo-srebrowej Cajala dla wykazania struktur Golgiego w komórkach kanalików głównych. Czas impregnacji solami srebra wynosił od 1/2 do 2 godzin.

Z nerek utrwalonych w alkoholu-formalinie i zamkniętych w parafinie sporządzano skrawki mikrotomowe grubości 2 mikronów, które przyklejano białkiem do cienkich szkiełek podstawowych. Skrawki odparafinowane w ksylieie i niebarwione oglądano w świetle przepuszczonym mikroskopu fazowo-kontrastowego C. Zeiss Lumipan używając obiektywu immersyjnego Ph 90/1,25 i olejku immersyjnego (20°C) $n_D = 1,515$.

Struktury Golgiego były dobrze widoczne po zamknięciu skrawków w cieczach przezroczystych o odpowiednich współczynnikach załamania światła (RI), a mianowicie: glicerolu (1,4417), parafinie płynnej (1,4669), p-xylene (1,4951), benzenie (1,4983), nitrobenzenie (1,5508), bromobenzenie (1,5600) i anilinie (1,5791). Pomiarów wartości RI dokonano w refraktometrze Fmy C. Zeiss (Abbe-Refraktometer model G) w świetle elektrycznym (żarówki 40 W i 150 W, 220 V) w temp. otoczenia +20°C. Pomiary refraktometryczne wykonano w Zakładzie Fizyki Doświadczalnej Wydziału Lekarskiego Akademii Medycznej przy cennej pomocy mgr Stefana Wieluńskiego.

Preparaty kontrolne otrzymano z nerek, z których jedno utrwalono w czystym acetonie przez 1 godzinę i przez benzen zatopiono w parafinie, a następnie skrawki mikrotomowe, grubości 5 mikronów, poddano działaniu 1% roztworu azotanu srebra i zredukowano w płynie z hydrochinonem. Drugie zaś nerki kontrolne utrwalono w formalinie 1:4, a skrawki barwiono hematoksyliną + eozyną. Preparaty kontrolne otrzymano także po zastosowaniu metody odsrebrzania wg Adamstone'a.

BADANIA WŁASNE

W preparatach wykonanych wg metody Cajala struktury Golgiego miały w jednych komórkach wygląd siateczki o nierównych oczkach, obejmującej górny biegun jądra, w innych zaś były ograniczone do kilku różańcowato zgrubiałych pałeczek lub pojedynczych ciałek sferoidalnych, rozproszonych w strefie Golgiego nad górnym biegunem jądra (ryc. 1 i 2). Impregnowanie 0,5% i 1% roztworem azotanu srebra przez 1/2 do 2 godzin i odpowiednio krótki czas redukowania w formalinie z hydrochinonem wyraźnie rysowały w ciałkach sferoidalnych układ systemu: *internum* i *externum*, przy czym *internum* stanowiło zawsze część chromofobną optycznie pustą, a *externum* upodabniało się do cienkiej chromofilnej błonki optycznie zróżnicowanej (ryc. 1). Można było także zauważyć, że grube niteczki lub pałeczki spletające siatkę Golgiego utworzone są z dwóch chromofilnych błonek, oddzielonych od siebie wążutką przestrzenią, optycznie pustą (ryc. 2).

Przedłużenie czasu impregnacji solami srebra do 2 godzin i więcej powodowało zatarcie wielu szczegółów, niteczki i ciała były zwykle grube i dokładnie wycernione, co zasadniczo zmieniało jakość struktur Golgiego.

Potwierdzenia otrzymanych wyników dotyczących szczególnie kształtu, ilości i rozmieszczenia struktur Golgiego szukaliśmy w preparatach kontrolnych uzyskanych po utrwaleniu nerek w acetonie i formalinie. Są to metody stosowane przez Holmgrena, Studnickę,

Weigla i innych badaczy, prowadzące do wykazania w komórce negatywu aparatu Golgiego. Poddawano także skrawki odsrebrzaniu za pomocą JKJ wg Adamstone'a. W wyniku tych wszystkich metod otrzymano w miejscach, w których znajdowały się struktury Golgiego jasne ciała i kanaliki mniej lub więcej optycznie puste.

Cienkie skrawki mikrotomowe utrwalone w alkoholu-formalinie, odparafinowane w ksylenie i niebarwione oglądano w mikroskopie fazowo-kontrastowym używając obiektywu immersyjnego Ph 90/1,25 i okularu K 10 $\times$ T. Skrawki zamykano w cieczach przezroczystych, których wartości RI wynosiły 1,4417 (glicerol), 1,4669 (parafina płynna), 1,4951 (p-xylen), 1,4983 (benzen) i 1,5508 (nitrobenzen). Struktury Golgiego na tych preparatach miały wygląd ciałek, pałeczek lub pierścieni rozsypanych po protoplazmie albo skupionych nad górnym biegunem jądra komórki (ryc. 3 i 4). Wszystkie te twory były jaśniejsze od podłoża, ostro odcinały się od otaczającej protoplazmy, a tym samym przypominały puste kanaliki lub wakuole. Struktury Golgiego zatem obserwowane w komórkach kanalików głównych nerki żaby dają obrazy fazowo ujemne, a protoplazma, błona jądrowa, chromatyna, jąderka i mitochondria — obrazy fazowo dodatnie. W rąbku szczoteczkowym widoczne są dwie fazy dodatnia i ujemna (ryc. 3).

Należy zaznaczyć, że najlepsze wyniki fazowo ujemne uzyskaliśmy dla struktur Golgiego po zastosowaniu glicerolu (RI = 1,4417) i p-xyleny (RI = 1,4951), a w miarę zwiększania się współczynnika załamania światła do RI = 1,5508 (nitrobenzen) obraz stawał się mniej wyraźny, co wskazywałoby na możliwość zaniku faz kontrastujących a tym samym na prawdopodobną zgodność RI struktur Golgiego z RI podłoża komórki.

Dopiero zamknięcie skrawków w cieczach, których RI wynosiło 1,5600 (bromobenzen) i 1,5791 (anilina) spowodowało odwrócenie faz kontrastujących, a zatem struktury Golgiego były fazowo dodatnie, a podłoże fazowo ujemne (ryc. 5 i 6). I na tych preparatach widziało się w rąbku szczoteczkowym dwie fazy ujemną i dodatnią (ryc. 5 i 6).

Fazowo ujemne albo dodatnie struktury Golgiego, obserwowane w mikroskopie fazowo-kontrastowym na skrawkach utrwalonych i nie barwionych odpowiadają w zupełności strukturom otrzymanym po impregnacji solami srebra oraz kanalikom Holmgrena i Adamstone'a.

PIŚMIENNICTWO

1. Adamstone F. B.: J. of Morphol. Vol. 90. 1945, 2. Hancox N. M. i J. Kruszyński: Exp. Cell Research Vol. 11, s. 327—339. 1956, 3. Kruszyński J.: Exp. Cell Research Vol. 13, s. 189—193, 1957.

Р Е З Ю М Е

Опираясь на разные величины рефракторных индексов (RI) жидкостей, употребленных для микроскопических исследований при помощи фазо-контрастного микроскопа, автору удалось получить изменение контраста фаз клеточных структур и благодаря этому установить их дифференциацию и определить рефрактометрическую величину. Самые хорошие фазо-негативные результаты для структур Гольджи в клетках главного отдела нефрона почки у лягушки автором получены при применении глицерина ($RI=1,4417$) и п-ксилола ($RI=1,4951$), а с увеличением рефракторного индекса до $RI=1,5508$ (нитробензол) картина становилась менее отчетливой, что указывало бы на возможность исчезания контрастирующих фаз и на правдоподобную соразмерность RI структур Гольджи с RI основания клетки. Заключение срезов в жидкостях, рефракторный индекс которых равнялся 1,5600 (бромобензол) и 1,5791 (анилин), вызвало обратность контрастирующих фаз, следовательно структуры Гольджи оказались фазо-позитивными, а основания — фазо-негативными. Фазо-негативные или фазо-позитивные структуры Гольджи, наблюдаемые при помощи фазо-контрастного микроскопа на срезах, фиксированных в алкоголь-формалине и неокрашиванных вполне соответствуют структурам, полученным после импрегнации серебром, а также канальцам Гольмгрена и Адамстона.

О Б Ъ Я С Н Е Н И Я К Р И С У Н К А М

- Рис. 1. Главный отдел нефрона почки у лягушки. Структуры Гольджи окрашены солями серебра (1/2%) по методу Кахаля. Системы Гольджи, и четковидные, утолщенные палочки образуют поле Гольджи, занимающее надядерный участок клетки. Ядро неокрашенное. Lumipan Zeiss. Об. иммерсионный, апохромат HI 90/1,30. Окуляр К 10x. Т. Микрофот. Practina FX.
- Рис. 2. Главный отдел нефрона почки у лягушки. Структуры Гольджи окрашенные солями серебра (1%) по методу Кахаля находятся в надядерном участке клетки. Единичные системы Гольджи и хромофильные мембраны, укладывающиеся попарно образуют поле Гольджи. Ядра неокрашены. Lumipan Zeiss. Об. иммерсионный, апохромат HI 90/1,30. Окуляр К 10x Т. Микрофот. Practina FX.
- Рис. 3. Главный отдел нефрона почки у лягушки. Структуры Гольджи в виде вакуолей, канальцев и колец фазо-негативны. Протоплазма, ядерная оболочка, хроматин и ядрышка фазо-положительны. В щеточной каемке видны две фазы: положительная и негативная. Глицерин $RI = 1,4417$. фазо-контрастный микроскоп Lumipan Zeiss. Об. иммерсионный Ph 90/1,25 Окуляр К 10x Т. Микрофот. Practina FX.

- Рис. 4. Главный отдел нефрона почки у лягушки. Структуры Гольджи образуют сетчатую систему фазо-негативных канальцев в надядерном участке клетки. п — ксилол $RI = 1.4951$. Фазо-контрастный микроскоп Lumipan Zeiss. Объект. иммерсионный Ph 90/1,25. Окуляр К 10х Т. Микрофот. Practina FX.
- Рис. 5. Главный отдел нефрона почки у лягушки. Фазо-положительные структуры Гольджи в надядерном участке клетки имеют вид темных зерен четко-видных утолщенных палочек резко отграниченных от фазо-негативной протоплазмы. Ядерная оболочка, хроматин и ядрышка тоже фазо-негативны. В щеточной каемке видны две фазы: негативная и положительная. Бромобензол $RI = 1,5600$. Фазо-контрастный микроскоп Lumipan Zeiss. Объект. иммерсионный Ph 90/1,25. Окуляр К 10х Т. Микрофот. Practina FX.
- Рис. 6. Главный отдел нефрона почки у лягушки. Фазо-положительные палочки, кольца и зерна структуры Гольджи локализуются в надядерном участке клетки. Протоплазма, ядерная оболочка, хроматин и ядрышка фазо-негативны. В щеточной каемке видны две фазы: негативная и положительная. Анилин $RI = 1,5791$. Фазо-контрастный микроскоп Lumipan Zeiss. Объект. иммерсионный Ph 90/1,25. Окуляр К 10х Т. Микрофот. Practina FX.

SUMMARY

Taking into consideration different refractive indices (RI) of the media examined in phase-contrast illumination the author has succeeded in changing the phase-contrast of cell structure, determining their differentiation and their refractive indices. The author obtained the best phase-negative results for the Golgi structure in the cells of proximal convoluted tubules of the kidney of frog by mounting them in glycerol ($RI = 1,4417$) and p-xylene ($RI = 1,4951$). In case of mounting them in nitro-benzene, of which the refractive index is as high as $RI = 1,5508$, the cells and their Golgi structure become less pronounced. That indicates to the possibility of disappearing the phase-contrast and the possible correspondence of RI of the Golgi structure to RI of the background. The mounting of the sections in bromo-benzene ($RI = 1,5600$) and aniline ($RI = 1,5791$) showed reversed contrast, that means that the Golgi structure is phase-positive and the background is phase-negative. The phase-negative or phase-positive Golgi structure examined by phase-contrast microscopy on the sections, fixed in alcohol-formalin and unstained, correspond to the Golgi structure blackened by silver salts and to canaliculi described by Holmgren and Adamstone.

EXPLANATIONS TO THE FIGURES

Fig. 1. Proximal convoluted tubulus of the kidney of frog. The Golgi structure blackened with silver-salts (half a per cent) by Cajal's method. The Golgi spheroids and thick crenated rods form the Golgi field in the supranuclear protoplasm. The nuclei are not counterstained. Lumipan Zeiss apochromatic oil

immersion objective, HI = 90/1,30, ocular K 10× T. Photomicrograph camera: Practina FX.

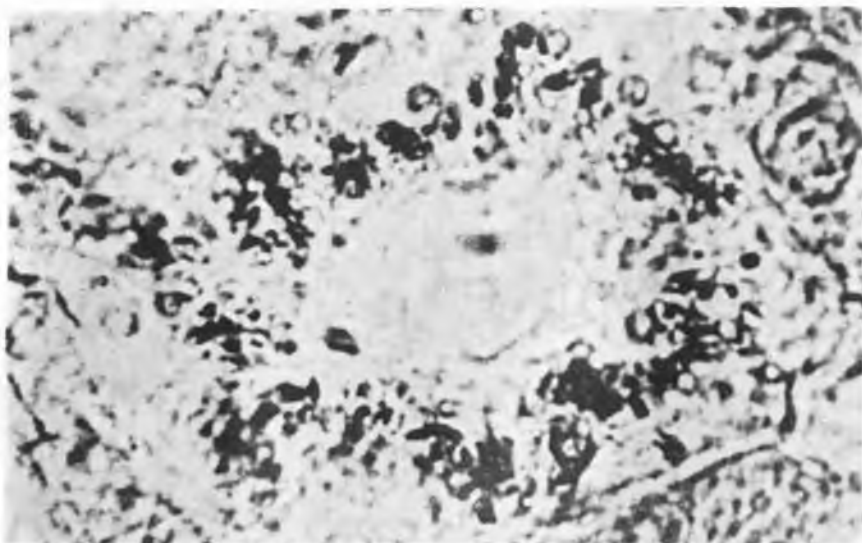
Fig. 2. Proximal convoluted tubulus of the kidney of frog. The Golgi structure blackened with silver salts (1 per cent) by Cajal's method are located in the supranuclear protoplasm. Single Golgi spheroids and duplex chromophilous thin rods form the Golgi field. The nuclei are not counterstained. Lumipan Zeiss microscope, apochromatic oil immersion objective, HI 90/1,30, ocular K 10× T. Photomicrograph camera: Practina FX.

Fig. 3. Proximal convoluted tubulus of the kidney of frog. The Golgi structure seen as phase-negative vacuoles, canaliculi and rings. Protoplasm, nuclear membrane, chromatin and nucleoli are phase-positive. Two phases: positive and negative are visible in the brush border. Glycerol RI = 1,4417. Lumipan Zeiss phase-contrast microscope, oil immersion objective, Ph 90/1,25, ocular K 10× T. Photomicrograph camera: Practina FX.

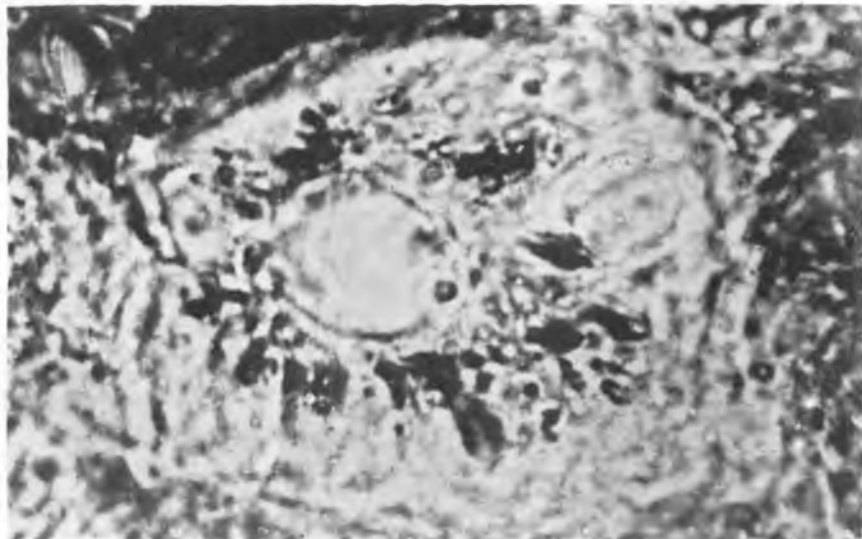
Fig. 4. Proximal convoluted tubulus of the kidney of frog. The Golgi structure seen as phase-negative canalicular network in the supranuclear protoplasm. P-xylene RI = 1,4951. Lumipan Zeiss phase-contrast microscope, oil immersion objective, Ph 90/1,25, ocular K 10× T. Photomicrograph camera: Practina FX.

Fig. 5. Proximal convoluted tubulus of the kidney of frog. Phase-positive Golgi structure in the supranuclear protoplasm seen as dark granules and thick, short crenated rods showing striking difference on comparison with the phase-negative background. Nuclear membrane, chromatin and nucleoli are also phase-negative. In the brush border one may see two phases: negative and a positive one. Bromo-benzene RI = 1,5600. Lumipan Zeiss microscope, oil immersion objective, Ph 90/1,25, ocular K 10× T. Photomicrograph camera: Practina FX.

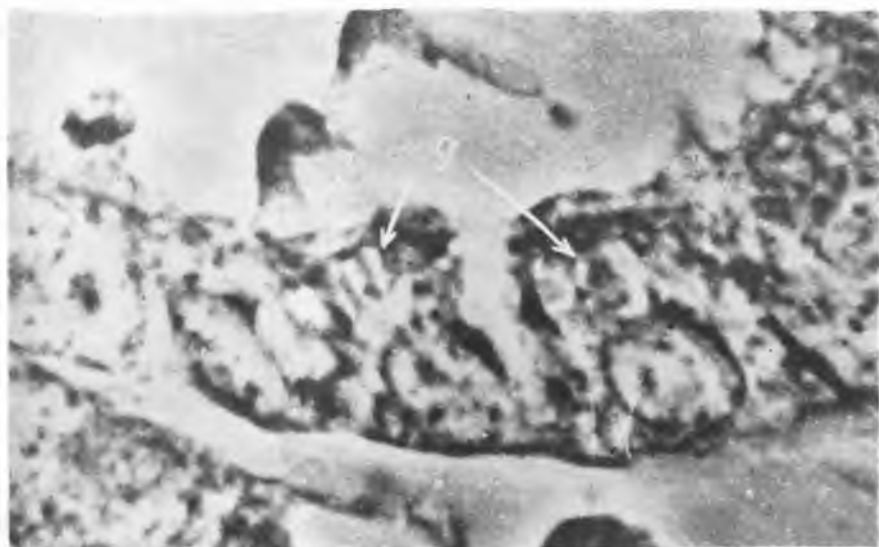
Fig. 6. Proximal convoluted tubulus of the kidney of frog. Phase-positive rods, rings and granules of the Golgi structure are located in the supranuclear protoplasm. Protoplasm, nuclear membrane, chromatin and nucleoli are phase-negative. Two phases: negative and positive are visible in the brush border. Aniline RI = 1,5791. Lumipan Zeiss phase-contrast microscope, immersion objective Ph 90/1,25, ocular K 10× T. Photomicrograph camera: Practina FX.



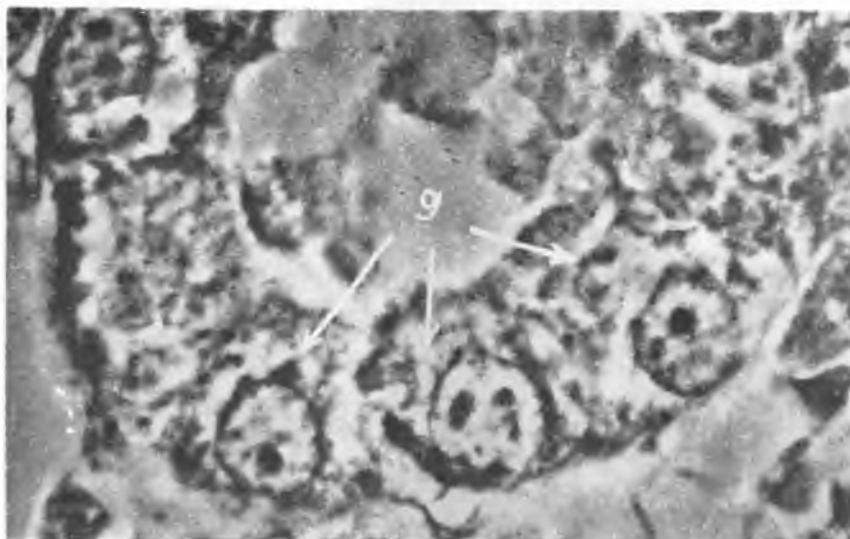
Ryc. 1. Kanalik główny nerki żaby. Struktury Golgiego wyczernione solami srebra (0,5%) wg metody Cajala. Systemy Golgiego i różańcowato zgrubiałe niteczki tworzą pole Golgiego zajmujące strefę nadjądrową komórki. Jądra niepodbarwiane. Lumipan Zeiss. Ob. immersyjny Apochrom HI 90/1,30. Okul. K 10 × T. Mikrofot. Practina FX.



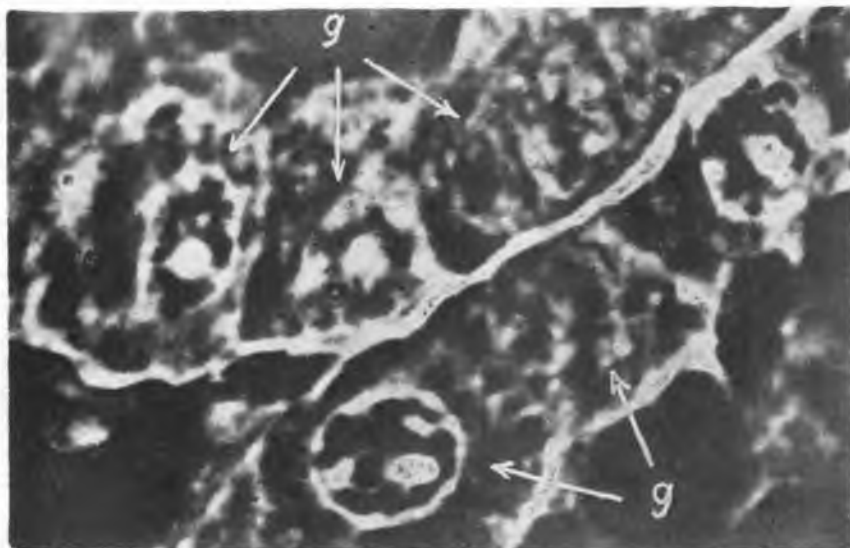
Ryc. 2. Kanalik główny nerki żaby. Struktury Golgiego wyczernione solami srebra (1%) wg metody Cajala znajdują się w strefie nadjądrowej komórki. Pojedyncze systemy Golgiego i chromofilne błonki układające się parami tworzą pole Golgiego. Jądra niepodbarwiane. Lumipan Zeiss. Ob. immersyjny Apochrom HI 90/1,30. Okul. K 10 × T. Mikrofot. Practina FX.



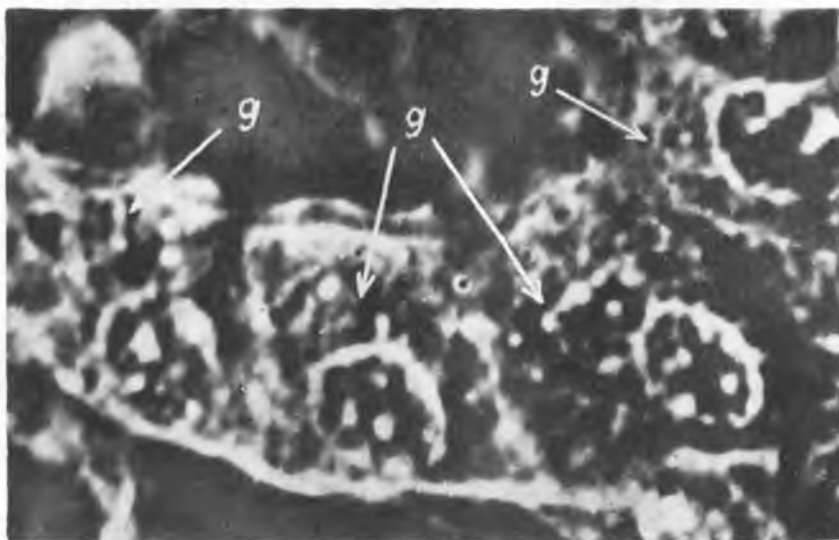
Ryc. 3. Kanalik główny nerki żaby. Struktury Golgiego jako wakuole, kanaliki i pierścienie fazowo ujemne. Protoplazma, błona jądrowa, chromatyna i jąderka są fazowo dodatnie. W rąbku szczoteczkowym widoczne są dwie fazy dodatnia i ujemna. Glicerol RI = 1,4417. Mikroskop fazowo-kontrastowy Lumipan Zeiss. Ob. immersyjny Ph 90/1,25. Okul. K 10 × T. Mikrofot. Practina FX.



Ryc. 4. Kanalik główny nerki żaby. Struktury Golgiego tworzą siatkowaty układ fazowo ujemnych kanalików w strefie nadjądrowej komórki. P-xylene RI = 1,4951. Mikroskop fazowo-kontrastowy Lumipan Zeiss. Ob. immersyjny Ph 90/1,25. Okul. K. 10 × T. Mikrofot. Practina FX.



Ryc. 5. Kanalik główny nerki żaby. Fazowo dodatnie struktury Golgiego w strefie nadjądrowej komórki mają wygląd ciemnych ziarenek i różańcowato zgrubiałych pałeczek ostro odgraniczonych od fazowo ujemnej protoplazmy. Błona jądrowa, chromatyna i jąderka dają również fazę ujemną. W rąbku szczoteczkowym widoczne są dwie fazy ujemna i dodatnia. Bromobenzen $RI = 1,5600$. Mikroskop fazowo-kontrastowy Lumipan Zeiss. Ob. immersyjny Ph 90/1,25. Okul. K 10 $\times$ T. Mikrofot. Practina FX.



Ryc. 6. Kanalik główny nerki żaby. Fazowo dodatnie pałeczki, pierścienie i ziarenka struktur Golgiego umiejscowione są w strefie nadjądrowej komórki. Protoplasma, błona jądrowa, chromatyna i jąderka są fazowo ujemne. W rąbku szczoteczkowym widoczne są dwie fazy ujemna i dodatnia. Anilina $RI = 1,5791$. Mikroskop fazowo-kontrastowy Lumipan Zeiss. Ob. immersyjny Ph 90/1,25. Okul. K 10 $\times$ T. Mikrofot. Practina FX.

