

Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Wydział Lekarski,
Akademia Medyczna w Lublinie

i

Pracownia Mikroskopii Elektronowej, Akademia Medyczna w Lublinie
Kierownik: prof. dr med. Stanisław Grzycki

Maciej LATALSKI

**Wpływ głodzenia i działania różnych temperatur na ultrastrukturę
mitochondriów w komórkach wątrobowych żab**

**Влияние голодания и действие различных температур на ультра-
структуру митохондрий в клетках печени у лягушек.**

**The Effect of Starvation and Different Temperatures
on the Ultrastructure of the Mitochondria in the Liver Cells of the Frog**

Oberling (5), Gansler (1) i Rouiller (6) opisali widoczne w mikroskopie elektronowym zmiany w strukturze mitochondriów, spowodowane działaniem wysokich temperatur. Zmiany te polegały na nabrzmieniu i rozluźnieniu struktur wewnętrznych. Podobne obrazy obserwowali Mölbert i wsp. (4), przy czym przyczyną zmian w mitochondriach był brak tlenu w komórce.

Wpływ wysokiej temperatury na ultrastrukturę mitochondriów u *Paramecium caudatum* badał również Wohlfarth-Bottermann (7). Wyniki, jakie otrzymał, nie odbiegały od spostrzeżeń autorów cytowanych wyżej. Ten sam autor nie stwierdził widocznego wpływu na mitochondria letalnej dawki promieni Roentgena. Podobne wyniki w działaniu promieni X na mitochondria otrzymał Glauser (2), przeprowadzając badania na wątrobie szczura, a Hirsch (3) po zadziaaniu promieniowania jonizującego zauważył znikanie mitochondriów.

MATERIAŁ I METODY BADAŃ

Badania przeprowadzono na żabach (*Rana temporaria*) samcach: 1. kontrolnych, 2. głodzonych (przez okres zimowy), 3. oziębianych w temp. -7°C przez 8 godzin i 4. ogrzewanych w temp. $+40^{\circ}\text{C}$ przez 8 godzin. Wycinki wątroby, wielkości około $0,5\text{ mm}^3$, utrwalano w temp. $+4^{\circ}\text{C}$, przez okres 30 min. w 1% roztworze czterotlenku osmu, buforowanym do pH 7,4 buforem octanowo-weronalowym z dodatkiem 7,2% cukrozy jako osłony. Utrwalony materiał odwadniano w alkoholach etylowych o wzrastających stężeniach i zatapiano w metakrylanie n-butylu z dodatkiem 1% nadtlenu benzoilu jako katalizatora. Polimeryzowano w temp. 45°C

przez 14—20 godzin. Ultracienkie skrawki sporządzano nożem szklanym na ultramikrotomie Sitte OmU (C. Reichert, Wiedeń). Elektromikrofotogramy wykonano przy użyciu mikroskopu elektronowego Elmi D2 (C. Zeiss, Jena).

BADANIA WŁASNE

Komórki wątrobowe żab kontrolnych (ryc. 1)

W plazmie podstawowej oprócz drobnych ziarenek elektronowo jasnych znajdowały się zgrupowania ziarenek elektronowo gęstych oraz twory pęcherzykowe, otoczone elektronowo gęstą otoczką, które mogły być albo przecięciem poprzecznym kanalika cysterny ergastoplazmatycznej (**RE**), albo były drobnymi pęcherzykami struktur Golgiego.

W drobnoziarnistej plazmie podstawowej obserwowano się układ błon ergastoplazmatycznych z ziarnami Palada (**RE**) oraz liczne mitochondria (**M**) o klasycznej budowie Sjöstranda. Również w plazmie podstawowej widoczne były duże, różnokształtne, elektronowo gęste ziarna, które rozpoznawaliśmy jako ziarna ciał lipidowych (**L**). Jądra (**Nu**) i jąderka (**Ncl**) przedstawiały typową budowę.

Błona plazmatyczna międzykomórkowa (**B**) wyraźnie rozdzielała komórki, przy czym nie stanowiła ona jednolicie ciągłej linii, ale posiadała wpuklenia do sąsiednich komórek (ryc. 1. strzałki). Wydaje się, że dzięki temu wpuklaniu połączenia międzykomórkowe były ściśle. Błony plazmatyczne dwóch sąsiednich komórek zwykle przylegały do siebie, a w miejscach wpukleń obserwowano się rozdział błony na dwie blaszki, co utwierdzało nas w przekonaniu, że pomiędzy jedną i drugą komórką znajdowały się wolne, pęcherzykowate przestrzenie.

Komórki wątrobowe żab głodzonych (ryc. 2)

Na elektrofotogramach obserwowano się rozluźnienie siatki endoplazmatycznej (**RE**). W plazmie komórek można było wyróżnić dwa typy ziarenek: większe, elektronowo gęste i mniejsze, jasne. Te drugie wielkością swoją odpowiadały ziarnom Palada i pokrywały błony endoplazmatyczne. Błony te były krótkie, poprzerywane.

Mitochondria (**M**) w komórkach wątrobowych żab głodzonych wydają się być nieco większe niż u żab kontrolnych. Zmiana wielkości nie pociągała za sobą zmian w strukturze mitochondriów i ich rysunek pozostał zachowany.

W plazmie obserwowano się też duże, wielokształtne, gęste elektronowo ziarna, nie posiadające osłonki zewnętrznej, które mogły odpowiadać lipidom (**L**). W jądrach (**Nu**) i jąderkach komórek nie obserwowano się różnic w porównaniu z komórkami wątrobowymi opisywanymi poprzednio.

Komórki wątrobowe zab oziębianych (ryc. 3)

W plazmie komórek i w tych przypadkach widoczne były dwa typy ziarenek, a mianowicie gęste elektronowo (większe) i jasne (mniejsze). Błony ergastoplazmatyczne (**RE**) były krótkie, poskręcane, posiadały ziarna Palada i znajdowały się w bezpośredniej bliskości mitochondriów.

Mitochondria (**M**) wszystkie były bardzo duże, spęczniałe. W większości posiadały zburzoną strukturę wewnętrzną, choć w nielicznych przypadkach można było dopatrzeć się zachowania grzebieni mitochondrialnych. Szczególnie na typach pałeczkowatych mitochondriów błona zewnętrzna nie była gładka, lecz pofałdowana, zmarszczona.

W obrębie jąder (**Nu**) widoczne były duże, ciemne ziarna powstałe prawdopodobnie na skutek zbijania się karioplazmy. Ziarna te układały się w pobliżu błon jądrowych, a w jądrach powstawały jasne pola.

Komórki wątrobowe zab ogrzewanych (ryc. 4)

W komórkach obserwowano się całkowite zniszczenie budowy wewnętrznej plazmy. Występujące dotychczas w plazmie komórkowej dwa typy ziaren miały tutaj wygląd drobnych pęcherzyków, co mogłoby świadczyć o ich spęcznieniu. Kanały między błonami ergastoplazmatycznymi były poszerzone, a ziarna Palada ściśle przylegały do powierzchni zewnętrznej tych błon (**RE**).

Największe jednak zmiany dotyczyły ultrastruktury mitochondriów (**M**). Wszystkie one miały niecałkowitą błonę zewnętrzną. Struktura wewnętrzna mitochondriów była zatarta. W tych mitochondriach, które zupełnie nie posiadały błony zewnętrznej, struktura wewnętrzna była gruboziarnista. Słuszne wydaje się stwierdzenie, że w komórkach wątrobowych zab ogrzewanych do temperatury 40°C mitochondria ulegały rozpadowi. Błony niektórych jąder komórkowych były poprzerwane.

OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ I WNIOSKI

Analiza uzyskanych elektrofotogramów wykazuje, że największe różnice w porównaniu z kontrolnymi komórkami wątrobowymi dotyczyły tej grupy, w której żaby podgrzewano do temperatury 40°C. W o h l f a r t h—B o t t e r m a n n (7) stwierdził w wyniku działania wysokiej temperatury nabrzmienie mitochondriów i rozluźnienie ich wewnętrznej struktury. W naszych doświadczeniach poza tymi zmianami mitochondria miały poprzerwaną osłonkę zewnętrzną, ich struktury wewnętrzne były zupełnie zatarte, a niektóre ulegały rozpadowi.

Zmiany dotyczyły poza mitochondriami również plazmy komórkowej, której budowa wewnętrzna była całkowicie zniszczona. Mniejszy stopień nasilenia zmian obserwowano się w komórkach wątrobowych żab oziębianych do -7°C . W tych przypadkach widoczne było spęcznienie mitochondriów i zatarcie ich wewnętrznej struktury, które to zmiany były zasadnicze. Przerwanie ciągłości błon zewnętrznych dotyczyło tylko nielicznych mitochondriów, podobnie jak i pofałdowanie osłonek. Błony ergastoplazmatyczne były krótkie i poskręcane.

Najmniej odbiegały od normy obrazy komórek wątrobowych żab głodzonych. Jedynie krótsze, poprzerywane błony ergastoplazmatyczne i większe mitochondria z zachowaną strukturą wewnętrzną były uchwytynymi różnicami na tych elektrofotogramach.

Brak danych w dostępnej literaturze nie pozwolił na porównanie wyników uzyskanych w przypadku oziębienia i głodzenia żab. W przypadku stosowania wysokiej temperatury zmiany powstałe w komórkach wątrobowych żab były bardziej nasilone niż obserwowali to Oberling, Gansler, Rouiller i Wohlfarth—Bottermann. Być może, że pewną rolę odegrały tu zarówno rodzaj materiału, na którym przeprowadzono badania, jak i czas ogrzewania oraz wysokość temperatury.

PIŚMIENNICTWO

1. Gansler H., C. Rouiller: Modifications physiologiques et pathologiques du chondriome. *Schweiz. Z. Path. Bakter.* **19**, 217—243, 1956.
2. Glauser O.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Rattenlebern nach Röntgenbestrahlung. *Schweiz. Z. Path. Bakter.* **19**, 150—161, 1956.
3. Hirsch G. C.: Allgemeine Stoffwechselformologie des Cytoplasmas. In: *Hdb. allg. Pathologie 2, Teil 1*, 92—212, 1955.
4. Mölbert E., D. Guerritore: Elektronenmikroskopische Untersuchungen am Leberparenchym bei akuter Hypoxie. *Beitr. path. Anat.* **117**, 32—49, 1957.
5. Oberling C., Rouiller C.: Les effets de l'intoxication aiguë au tetrachlorure de carbone sur le foie du rat. *Ann. Anat. pathol.* **1**, 401—427, 1956.
6. Rouiller C.: Les canalicules biliares. *Acta Anat.* **26**, 49—109, 1956.
7. Wohlfarth—Bottermann K. E.: Feinstrukturveränderungen des Cytoplasmas und der Mitochondrien von Paramecium nach Einwirkung letaler Temperaturen und Röntgendosen. *Protoplasma.* **50**, 82—92, 1958.

OBJAŚNIENIA RYCIN

Ryc. 1. Komórki wątrobowe żab kontrolnych. **RE** — błony ergastoplazmatyczne. **M** — mitochondria. **L** — ciała lipidowe. **Nu** — jądro. **Ncl** — jąderko. **B** — błona międzykomórkowa. Powiększenie ca 12 000 \times .

Рис. 2. Komórki wątrobowe żab głodzonych. **RE** — błony ergastoplazmatyczne. **M** — mitochondria. **L** — ziarna lipidów. **Nu** — jądro. Powiększenie ca 12 000 ×.

Рис. 3. Komórki wątrobowe żab oziębianych. **RE** — błony ergastoplazmatyczne. **M** — mitochondria. **L** — ziarna lipidów. **Nu** — jądro. Powiększenie ca 12 000 ×.

Рис. 4. Komórki wątrobowe żab ogrzewanych. **RE** — błony ergastoplazmatyczne. **M** — mitochondria. Powiększenie ca 12 000 ×.

РЕЗЮМЕ

Анализ электрофотограмм обнаруживает самые большие различия по сравнению с контрольными клетками печени у тех лягушек, которые подогревались до темп. +40°C. Внутреннее строение плазмы клеток было полностью разрушено. Митохондрии имели перерывистую внешнюю оболочку, внутренняя их структура нечетко выражена. Некоторые из них подвергались распаду.

Действие темп. —7°C и голодания приводили к изменениям в цитоплазме, выражающимся в разрывах и скручивании эргастоплазматических оболочек. Митохондрии сохраняли внутреннюю структуру, и при охлаждении их оболочка была сморщенной и разрывалась лишь в немногочисленных случаях. При голодании митохондрии становились несколько более крупными.

Рис. 1. Клетки печени контрольных лягушек. **RE** — эргастоплазматические оболочки. **M** — митохондрии. **L** — липидные тела. **Nu** — ядро. **Nci** — ядрышко. **B** — межклеточная мембрана. Увеличение 12.000×.

Рис. 2. Клетки печени лягушек подвергнутых голоданию. **RE** — эргастоплазматические оболочки. **M** — митохондрии. **L** — липидные зерна. **Nu** — ядро. Увеличение 12.000×.

Рис. 3. Клетки печени лягушек, подвергнутых действию пониженной температуры. **RE** — эргастоплазматические оболочки. **M** — митохондрии. **L** — липидные зерна. **Nu** — ядро. Увеличение 12.000×.

Рис. 4. Клетки печени подогретых лягушек. **RE** — эргастоплазматические оболочки. **M** — митохондрии. Увеличение 12.000×.

SUMMARY

As the analysis of electromicrophotograms shows the greatest differences in the cells of the frogs occur when heated to 40°C in comparison with the controls. The internal structure of the cytoplasm was then completely destroyed. The outer membranes of mitochondria

were broken, their inner structure completely destroyed, some mitochondria desintegrated.

The effect of temperature -7°C and starvation brought about changes in the cytoplasm, breaking or twisting the ER membranes. The mitochondria preserved their inner structure, their outer membranes being occasionally creased or broken when submitted to cooling. The mitochondria of starved frogs seemed to be slightly larger.

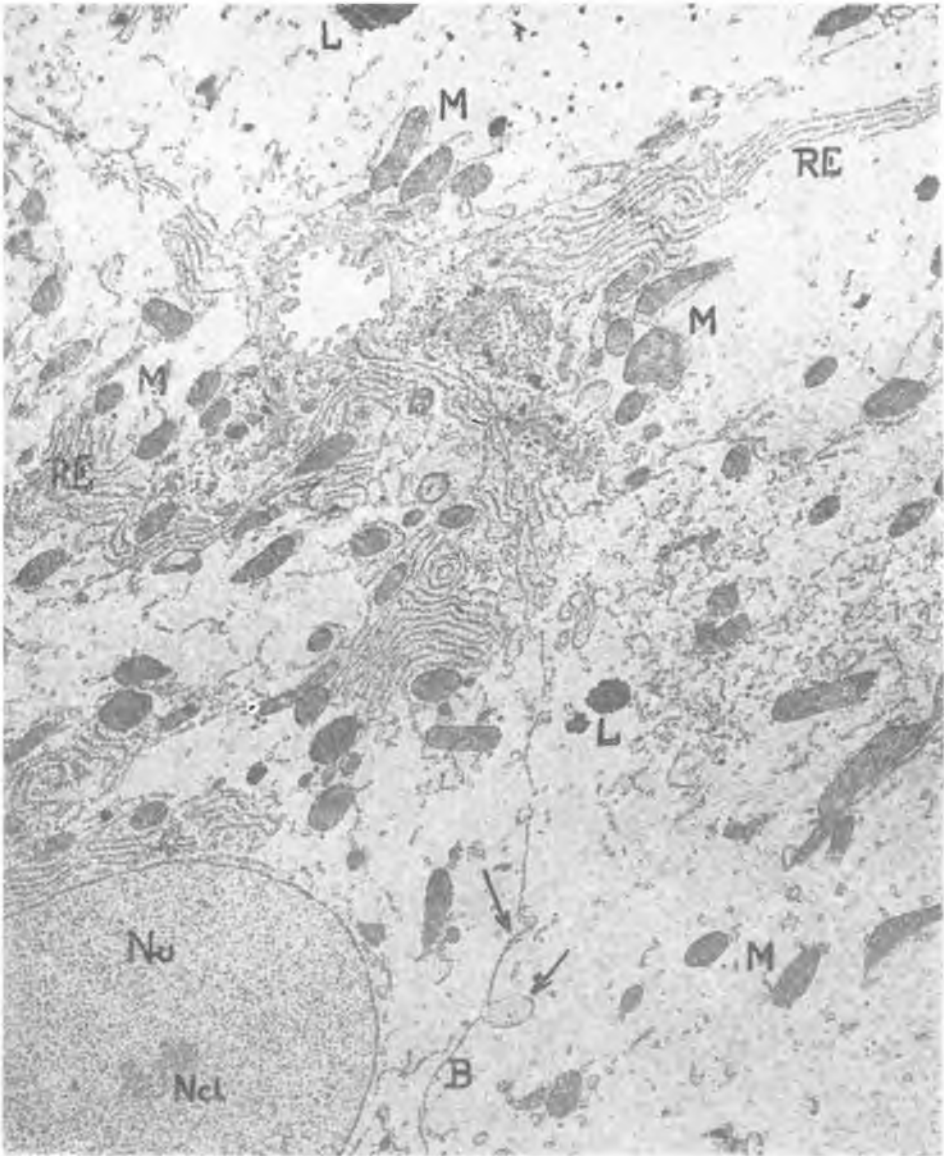
EXPLANATION OF FIGURES

Fig. 1. Control liver cells. RE — ergastoplasmic membranes. M — mitochondria, L — lipids, Nu — nucleus, Ncl — nucleolus, B — intercellular membrane. Magn. ca. 12 000 \times .

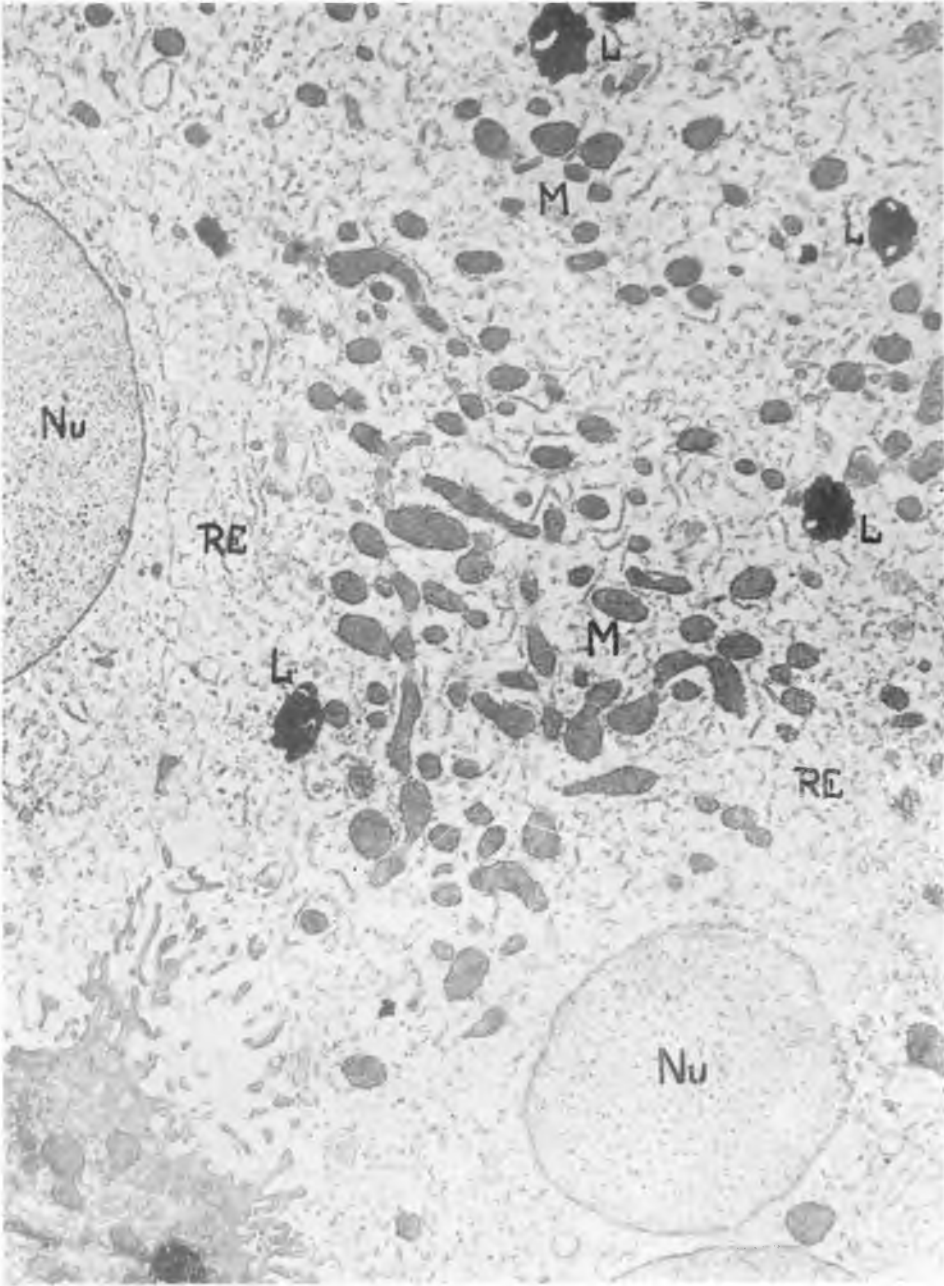
Fig. 2. Liver cells of starved frogs. RE — ergastoplasmic membranes. M — mitochondria, L — grains of lipids, Nu — nucleus. Magn. ca 12 000 \times .

Fig. 3. Cooled liver cells. RE — ergastoplasmic membranes, M — mitochondria, L — grains of lipids, Nu — nucleus, Magn. ca. 12 000 \times .

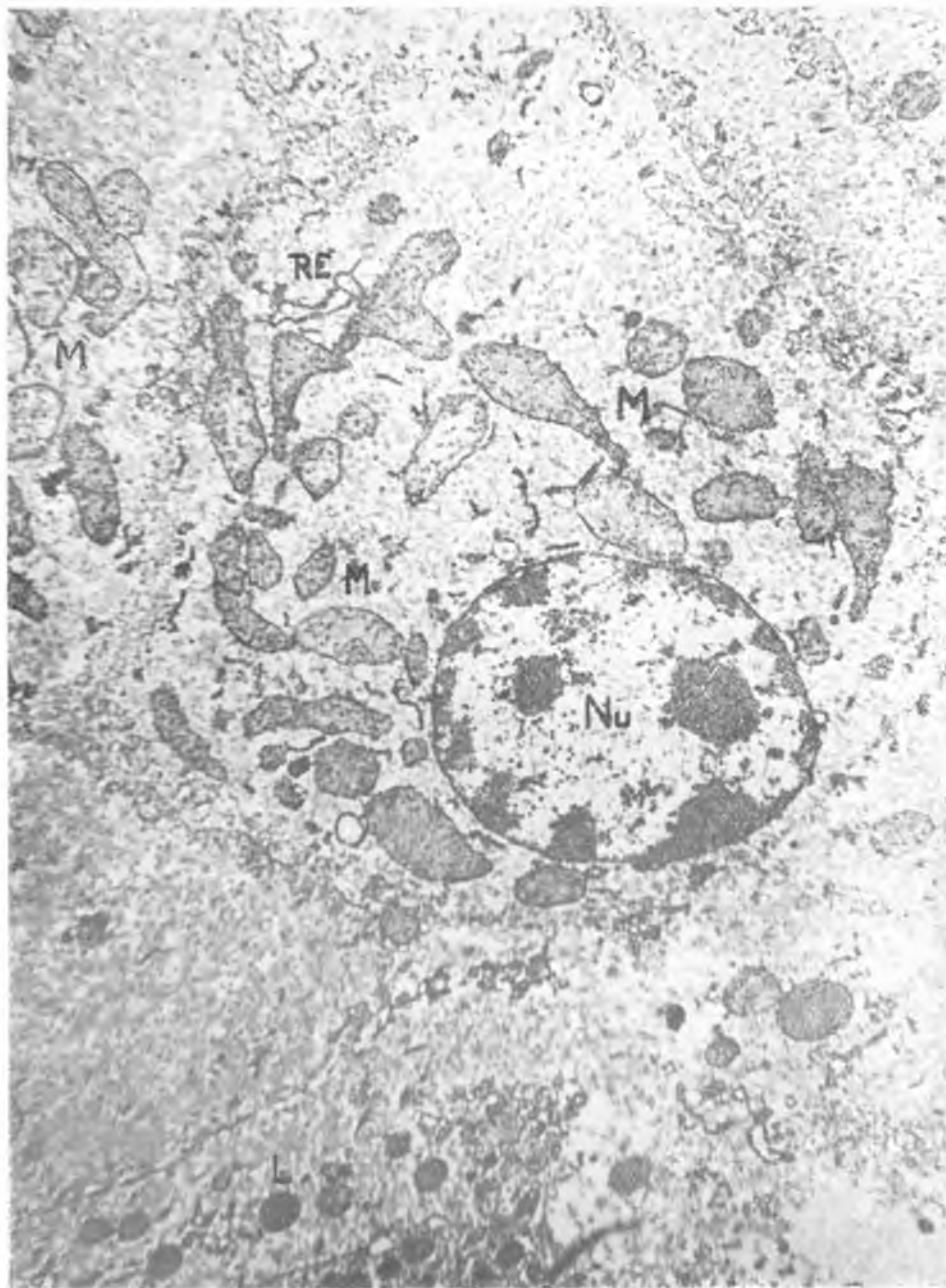
Fig. 4. Heated liver cells. RE — ergastoplasmic membranes, M — mitochondria. Magn. ca. 12 000 \times .



Ryc. 1

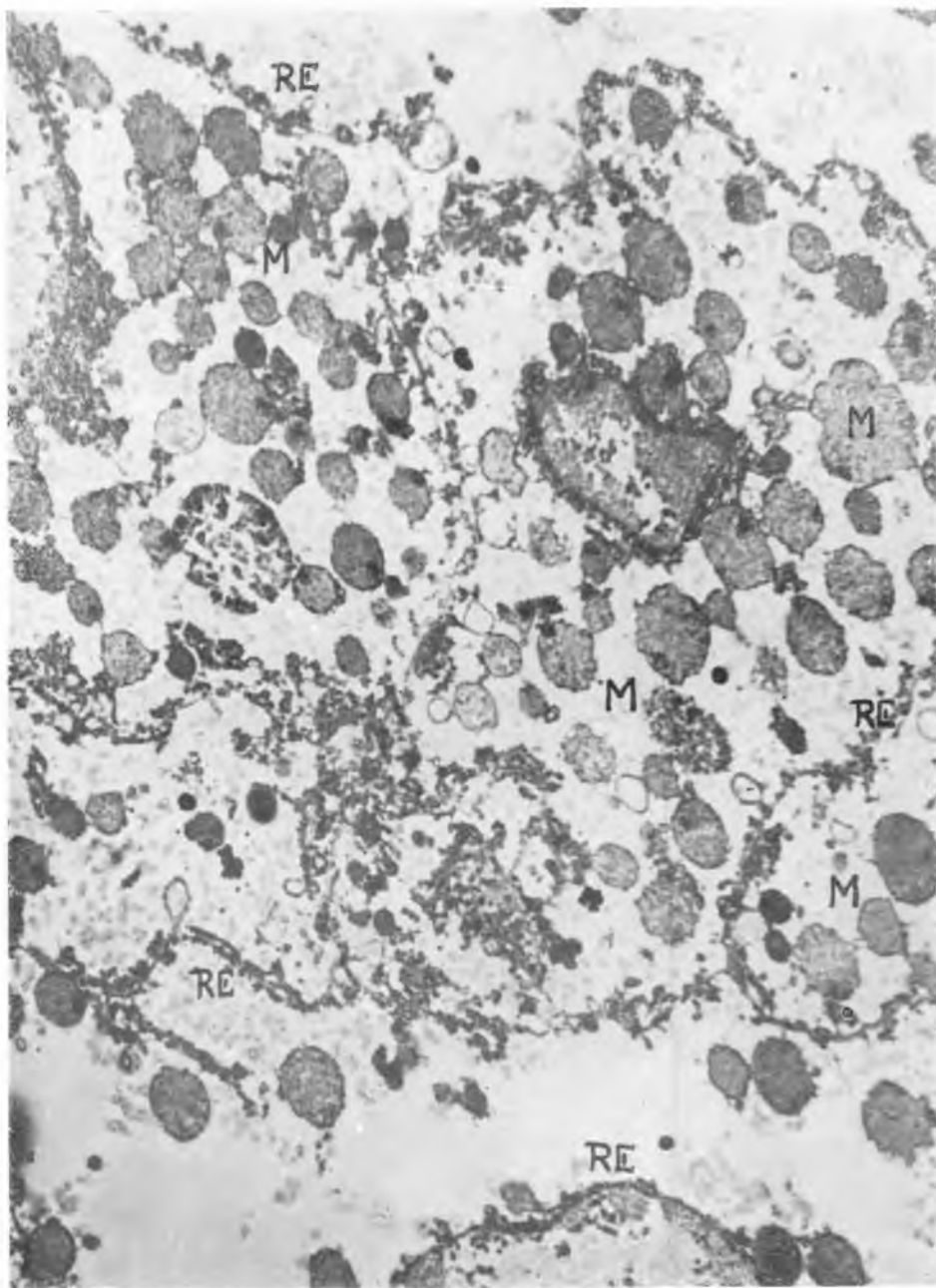


Ryc. 2



Ryc. 3

Maciej Latański



Ryc. 4