

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

Stanisław GRZYCKI

Connective Tissue Fibres Examined by Phase Contrast Refractometry

Badania refraktometryczne włókien tkanki łącznej przy użyciu
mikroskopu fazowo-kontrastowego

Рефрактометрические исследования волокон соединительной ткани
с помощью фазовоконтрастного микроскопа

The examinations carried out by Hancock and Kruszyński (1956) and especially by Kruszyński (1958)¹ allowed them to reach a conclusion about the possibility of demonstrating selectively the connective tissue stroma in the organ they were examining.

On the strength of my previous examinations (1958—1959), I observed that, if the RI difference between the examined material and a mounting medium was large, then the contrast of phases was large too. If, however, this difference was small, then the contrast was slight. In this latter case the structure under examination became invisible and the contrast might be as low as 0.

Consequently, I decided to apply the refractometric technique in my present investigations which aimed at the selective demonstration of peritubular connective tissue fibres of proximal convoluted tubuli in the kidneys of the frog, by mounting the sections in media of known RI.

The kidneys of the frog (*Rana temporaria* L.) were fixed in Schaffer's fluid (alcohol and formalin), then dehydrated. After being embedded in paraffin they were cut into thin sections (2—3 μ). The unstained, in p-xylene deparaffinized sections were mounted in the following media: glycerol (RI = 1.4417), benzene (RI = 1.4983), acetophenone (RI = 1.5328), o-nitrotoluene (RI = 1.5459), di-methyl-aniline (RI = 1.5569), and bromobenzene (RI = 1.5600), and examined under phase contrast microscope.

¹ Examinations of fixed and unstained connective tissue fibres in phase contrast illumination by refractometric technique.

RESULTS

On the strength of my previous examinations I concluded that the refractive index of fixed cells ranged from 1.5328 to 1.5459; using media which had the same RI, I observed that the cells and their structure became more or less invisible and the phase contrast was even 0. The neutral phase appeared in my examinations after using *o*-nitrotoluene (RI = 1.5459) and concerned the cells and their structure only. This was not observed in peritubular connective tissue fibres. It may indicate that the connective tissue fibres possess an RI different from that of the cell structure and, therefore, they are visible as a bright, glistening phase negative framework. It is impossible, in the picture obtained, to make any differentiation among collagen, elastic and reticular fibres, although some details concerning their width may be detected (Fig. 1).

The use of mountants with a high RI e. g. di-methylaniline (RI = 1.5569) and bromobenzene (RI = 1.5600), although it enabled the differentiation of the cell structure, resulted in preserving the phase negative picture of the connective tissue fibres (Figs 2 and 3).

The use of mountants with a low RI, as it was in the case of acetophenone (RI = 1.5328), benzene (RI = 1.4983) and glycerol (RI = 1.4417), affected the change of the contrast phases in the fibres which became phase positive, the difference among them being hardly visible (Figs 4, 5 and 6).

The change of the phase for the connective tissue fibres, fixed in Schaffer's fluid, took place between RI = 1.5328 and RI = 1.5459, the RI for the neutral phase being determined approximately at 1.5400. The RI values changed if other fixatives (Helly, formalin 10%, picric acid) were used during examinations. These examinations confirmed the results obtained by Kruszyński, who proved that the RI of connective tissue fibres depended on the fixative. And so it was proved that the RI for formalin, alcohol, picric acid and alcohol varied between 1.548 and 1.550, while that for osmic acid varied between 1.565 and 1.568.

EXPLANATION OF FIGURES

Fig. 1. Peritubular framework seen in the kidneys of the frog. Phase negative glistening fibres. Schaffer fixation. **O-nitrotoluene (RI = 1.5459)**. Zeiss Lumipan phase contrast microscope with oil immersion objective Ph 90/1.25, ocular K 10x T. Photomicrograph camera: Practina FX.

Fig. 2. Peritubular framework seen in the kidneys of the frog. Phase negative fibres. Schaffer fixation. **Di-methylaniline (RI = 1.5569)**. Zeiss Lumipan phase contrast microscope with oil immersion objective Ph 90/1.25, ocular K 10x T. Photomicrograph camera: Practina FX.

Fig. 3. Peritubular framework seen in the kidneys of the frog. Phase negative fibres of different width. Schaffer fixation. **Bromobenzene (RI = 1.5600)**. Zeiss

Lumipan phase contrast microscope with oil immersion objective Ph 90/1.25, ocular K 10x T. Photomicrograph camera: Practina FX.

Fig. 4. Peritubular framework seen in the kidneys of the frog. Phase positive fibres. Schaffer fixation. **Acetophenone** (RI = 1.5328). Zeiss Lumipan phase contrast microscope with oil immersion objective Ph 90/1.25, ocular K 10x T. Photomicrograph camera: Practina FX.

Fig. 5. Peritubular framework seen in the kidneys of the frog. Phase positive fibres. Schaffer fixation. **Benzene** (RI = 1.4983). Zeiss Lumipan phase contrast microscope with oil immersion objective Ph 90/1.25, ocular K 10x T. Photomicrograph camera: Practina FX.

Fig. 6. Peritubular framework seen in the kidneys of the frog. Phase positive fibres. Schaffer fixation. **Glycerol** (RI = 1.4417). Zeiss Lumipan phase contrast microscope with oil immersion objective Ph 90/1.25, ocular K 10x T. Photomicrograph camera: Practina FX.

REFERENCES

1. Grzycki S.: Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, sectio D, **13**, 335—340, 1958.
2. Grzycki S.: Intern. J. of Cytology, Cytologia, Tokyo, Japan, 1959.
3. Grzycki S.: Proc. Zool. Soc., Calcutta, India, 1959.
4. Hancox N. M., Kruszyński J.: Exper. Cell Research., **11**, 327—339, 1956.
5. Kruszyński J.: Acta Anat., **35**, 277—284, 1958.

STRESZCZENIE

Cienkie skrawki (2—3 μ) nerek żaby (*Rana temporaria* L) utrwalone w alkoholu formalinie, odparafinowane w ksylenie, niebarwione i zamknięte w cieczach przezroczystych o znanym współczynniku RI oglądano w mikroskopie fazowo-kontrastowym. Zanik faz kontrastujących wystąpił po użyciu o-nitrotoluenu (RI = 1.5459) i dotyczył tylko komórek i ich struktur, nie dotyczył natomiast włókien tkanki łącznej dokołakanalikowych. Wskazywać to mogło, że włókna tkanki łącznej posiadają inny współczynnik RI aniżeli komórki. Włókna tkanki łącznej miały wygląd jasnych, błyszczących, fazowo ujemnych pasemek, co nie pozwoliło na zróżnicowanie ich na włókna klejorodne, sprężyste i retikulinowe.

Zastosowanie cieczy o wyższym RI, jak np. 1.5569 i 1.5600, mimo że powodowało zróżnicowanie struktur komórkowych zawsze jednak utrzymywało fazowo ujemny obraz włókien tkanki łącznej. Użycie natomiast cieczy o niższym RI, jak np. 1.5328, 1.4983 i 1.4417 powodowało zmianę kontrastu włókien, które stawały się fazowo dodatnie.

Zmiana kontrastu fazy dla włókien tkanki łącznej utrwalonych w płynie Schaffera wystąpiła pomiędzy RI = 1.5328 a RI = 1.5459, zaś fazę zerową określono w przybliżeniu w RI = 1.5400. Wartości te ulegały zmianie, gdy obserwacje robione były na skrawkach utrwalonych w innych utrwalaczach (Helly, formalina 10% i kwas pikrynowy).

OBJAŚNIENIA RYCIN

Ryc. 1. Nerka żaby. Dokołakanalikowa siatka fazowo ujemnych, błyszczących włókien. Utrwalacz Schaffera. **O-nitrotoluen** ($RI = 1.5459$). Mikroskop fazowo-kontrastowy Lumipan Zeiss. Obiektyw immersyjny Ph 90/1.25. Okular K 10x T. Mikrofot. Practina FX.

Ryc. 2. Nerka żaby. Dokołakanalikowa siatka fazowo ujemnych włókien. Utrwalacz Schaffera. **Di-metylanilina** ($RI = 1.5569$). Mikroskop fazowo-kontrastowy Lumipan Zeiss. Obiektyw immersyjny Ph 90/1.25. Okular K 10x T. Mikrofot. Practina FX.

Ryc. 3. Nerka żaby. Dokołakanalikowa siatka fazowo ujemnych włókien. Utrwalacz Schaffera. **Bromobenzen** ($RI = 1.5600$). Mikroskop fazowo-kontrastowy Lumipan Zeiss. Obiektyw immersyjny Ph 90/1.25. Okular K 10x T. Mikrofot. Practina FX.

Ryc. 4. Nerka żaby. Dokołakanalikowa siatka fazowo dodatnich włókien. Utrwalacz Schaffera. **Acetofenon** ($RI = 1.5328$). Mikroskop fazowo-kontrastowy Lumipan Zeiss. Obiektyw immersyjny Ph 90/1.25. Okular K 10x T. Mikrofot. Practina FX.

Ryc. 5. Nerka żaby. Dokołakanalikowa siatka fazowo dodatnich włókien. Utrwalacz Schaffera. **Benzen** ($RI = 1.4983$). Mikroskop fazowo-kontrastowy Lumipan Zeiss. Obiektyw immersyjny Ph 90/1.25. Okular K 10x T. Mikrofot. Practina FX.

Ryc. 6. Nerka żaby. Dokołakanalikowa siatka fazowo dodatnich włókien. Utrwalacz Schaffera. **Glicerol** ($RI = 1.4417$). Mikroskop fazowo-kontrastowy Lumipan Zeiss. Obiektyw immersyjny Ph 90/1.25. Okular K 10x T. Mikrofot. Practina FX.

Р Е З Ю М Е

Тонкие срезы (2—3 микрона) почек лягушки (*Rana temporaria* L) фиксированные в смеси спирта с формалином, лишённые парафина при воздействии ксилола, неокрашенные и заключённые в прозрачных жидкостях с известным рефракторным индексом изучались автором под фазовоконтрастным микроскопом. Исчезновение контрастных фаз выступило при употреблении о-нитротолуола ($RI = 1,5459$) и коснулось лишь клеток и их структурных элементов. Околочанальцевые же волокна соединительной ткани этим явлением не были охвачены. Этот факт мог указывать на то, что волокна соединительной ткани имеют иной коэффициент RI , чем клетки.

Волокна соединительной ткани, с виду представляли собой светлые блестящие, фазово отрицательные полосы, что не позволило дифференцировать их на клейдающие, эластические и ретикулиновые волокна.

Применение жидкости с более высоким рефракторным индексом напр. 1,5569 и 1,5600, хотя вызывало дифференцировку клеточных структур, однако всегда удерживало фазово отрицательную картину волокон соединительной ткани. Употребление же жидкости, харак-

теризующейся более низкими рефракторным индексом напр. 1,5328, 1,4983 и 1,4417 вызывало изменение контраста волокон, которые оказывались фазово положительными.

Перемена контраста фазы по отношению к волокнам соединительной ткани, фиксированным в жидкости Шаффера выступила при рефракторным индексе между 1,5328 и 1,5459, а нулевая фаза была установлена, с некоторым приближением, при $RI = 1,5400$. Эти величины подвергались некоторым изменениям, если наблюдения производились на срезах, фиксированных в других фиксаторах (Гелли, 10⁰/₀-ый формалин и пикриновая кислота).

ОБЪЯСНЕНИЯ К РИСУНКАМ

Рис. 1. Почка лягушки. Околоканальцевая сетка фазово отрицательных, блестящих волокон. Фиксатор Шаффера. **O-нитротолуол** ($RI = 1,5459$). Фазовоконтрастный микроскоп Люмпан Цейс. Иммерсионный объектив Ph 90/1,25. Окуляр К 10 x Т. Микрофот. Practina FX.

Рис. 2. Почка лягушки. Околоканальцевая сетка фазово отрицательных волокон. Фиксатор Шаффера. **Ди-метиланилин** ($RI = 1,5569$). Фазовоконтрастный микроскоп Люмпан Цейс. Иммерсионный объектив Ph 90/1,25. Окуляр К 10 x Т. Микрофот. Practina FX.

Рис. 3. Почка лягушки. Околоканальцевая сетка фазово отрицательных волокон. Фиксатор Шаффера. **Бромбензол** ($RI = 1,5600$). Фазовоконтрастный микроскоп Люмпан Цейс. Иммерсионный объектив Ph 90/1,25. Окуляр К 10 x Т. Микрофот. Practina FX.

Рис. 4. Почка лягушки. Околоканальцевая сетка фазово положительных волокон. Фиксатор Шаффера. **Ацетофенон** ($RI = 1,5328$). Фазовоконтрастный микроскоп Люмпан Цейс. Иммерсионный объектив Ph 90/1,25. Окуляр К 10 x Т. Микрофот. Practina FX.

Рис. 5. Почка лягушки. Околоканальцевая сетка фазово положительных волокон. Фиксатор Шаффера. **Бензол** ($RI = 1,4983$). Фазовоконтрастный микроскоп Люмпан Цейс. Иммерсионный объектив Ph 90/1,25. Окуляр К 10 x Т. Микрофот. Practina FX.

Рис. 6. Почка лягушки. Околоканальцевая сетка фазово положительных волокон. Фиксатор Шаффера. **Глицерол** ($RI = 1,4417$). Фазовоконтрастный микроскоп Люмпан Цейс. Иммерсионный объектив Ph 90/1,25. Окуляр К 10 x Т. Микрофот. Practina FX.

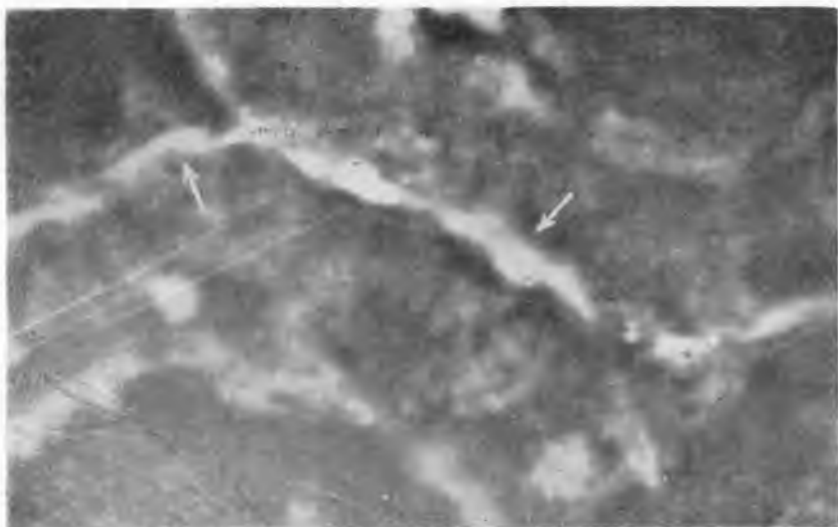


Fig. 1.

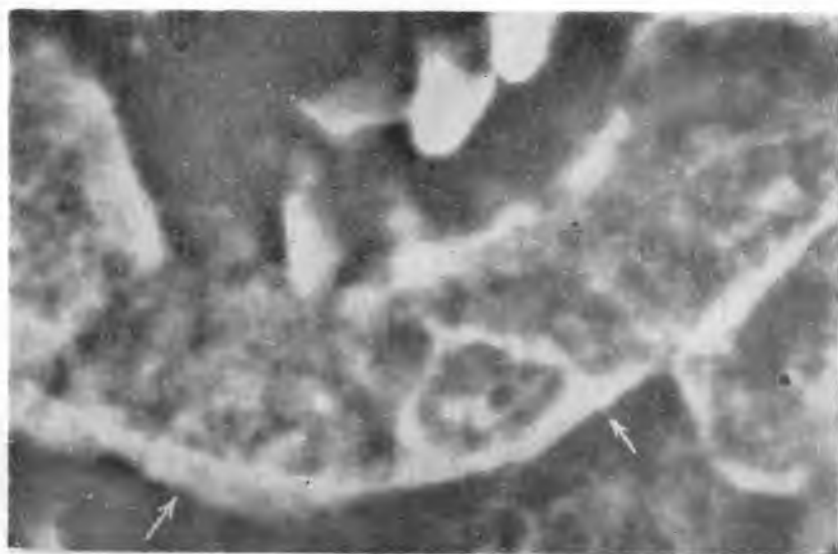


Fig. 2.

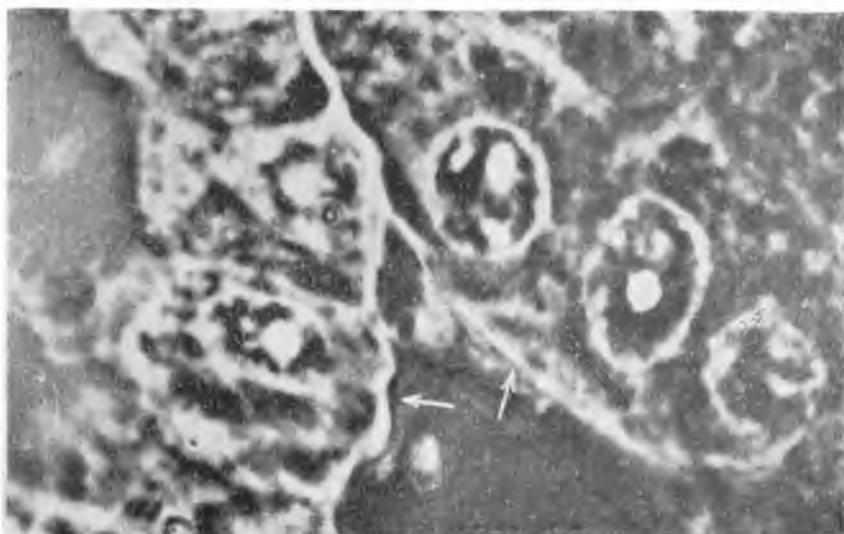


Fig. 3.

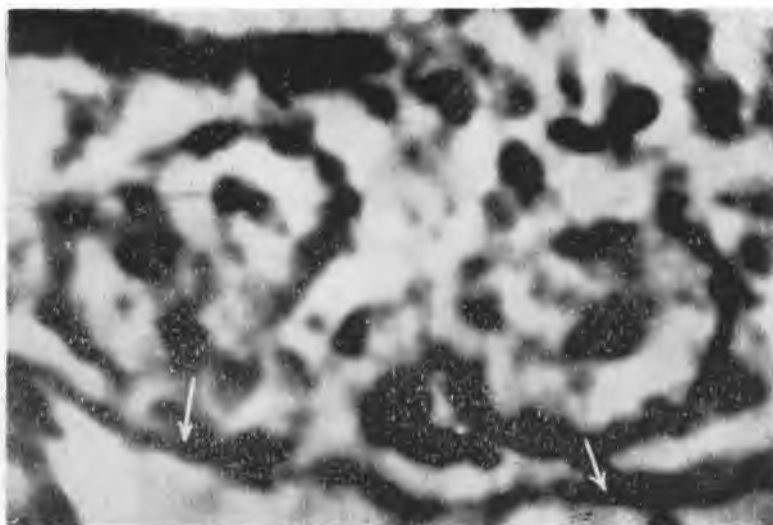


Fig. 4.

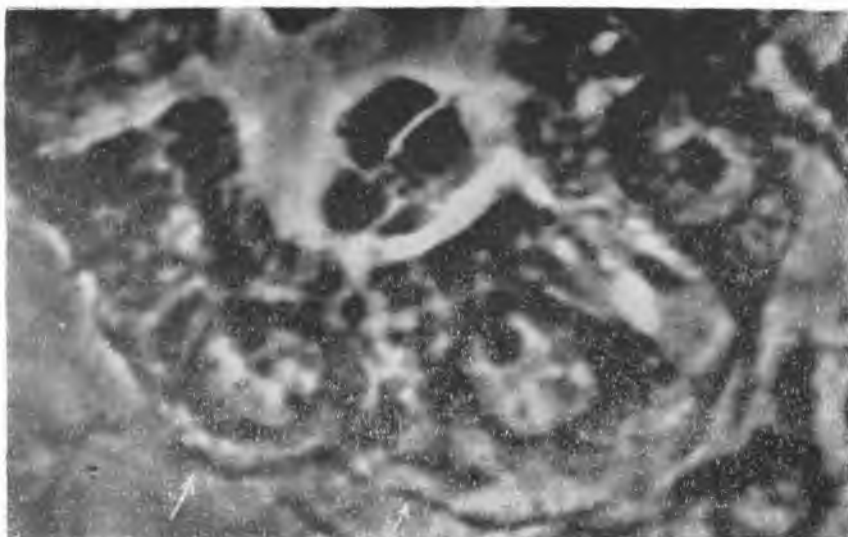


Fig. 5.

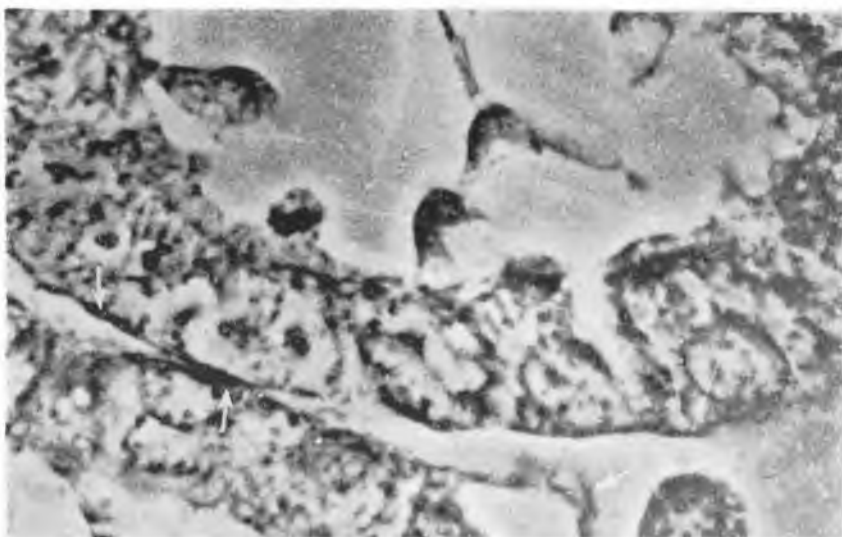


Fig. 6.

