

Zofia Pelc

Komórki Leydiga w regeneratach kończyny i ogona aksolotla (*Ambystoma mexicanum* Cope)*

Wstęp

Gruczoły śluzowe skóry płazów występują na całej powierzchni ciała tych zwierząt, natomiast gruczoły jadowe grupują się głównie w pewnych miejscach skóry, tworząc np. parotydy u ropuch i salamander lub fałdy grzbietowe u żab. Śluz jest produkowany przez dwa rodzaje gruczołów skórnych płazów. Jednym rodzajem są wielokomórkowe gruczoły znajdujące się w warstwie skóry właściwej (corium), które funkcjonują u dorosłych płazów. Drugim rodzajem są gruczoły jednokomórkowe występujące w naskórku (epidermis) larw tych zwierząt. U larw płazów ogoniastych (*Caudata*) komórki te noszą nazwę komórek Leydiga (*KL*).

Funkcja gruczołów skórnych płazów przedstawia się odmiennie w różnych okresach życia. Podczas przeobrażenia *KL* zostają odrzucone razem z wylinką, nowe zaś *KL* nie wytwarzają się, gdyż komórki nabłonkowe przestają się różnicować w tym kierunku. Inaczej zachowują się gruczoły wielokomórkowe. Gruczoły te leżą w skórze właściwej i w okresie larwalnym tylko gromadzą wydzielinę w swoim świetle, a u zwierząt przeobrażonych wydalają one zawartość przez kanał wyprowadzający, który tworzy się w nabłonku.

Jednokomórkowe gruczoły naskórka zostały opisane po raz pierwszy przez Leydiga u odmieńca jaskiniowego i larwy salamandry w 1853 roku i znalezione później przez wielu autorów. Gruczoły śluzowe zostały wyróżnione jako osobna grupa wielokomórkowych gruczołów skóry płazów już przez Paulickiego (1885). Jednak ja kpodaje Eggeling (1931), ich podział na ziarniste i śluzowe wprowadził jako jadowe. Gruczoły ziarniste są tak duże, że dostrzec je można z łatwością dopiero Gaupp w 1904 roku. Autor ten zidentyfikował zarazem gruczoły ziarniste gołym okiem, zwłaszcza u albinotycznego aksolotla. W zasadzie są to twory kuliste, ale mogą być też wyraźnie wydłużone lub nieco przyplaszczone. Między nimi obserwuje się formy mniejsze; są to młodsze stadia rozwojowe owych gruczołów.

Jak już wspomniano, gruczoły jednokomórkowe występują u larw płazów ogoniastych. U aksolotla *KL* występują w naskórku na całej powierzchni ciała z wyjątkiem brzegu płetwy ogonowej, palców, warg i szczęki dolnej. Występują one w warstwie Malpighiego oraz w leżących nad nią kilku warstwach naskórka. Nigdy jednak nie obserwowano *KL* na samej powierzchni naskórka larw (Paulicki 1885). Komórki te są 4—6 razy większe niż komórki nabłonkowe. Ley-

* Przedstawione badania stanowiły temat pracy doktorskiej, wykonanej w Zakładzie Zoologii WSP w Krakowie. Częściowe wyniki były publikowane w *Acta Biologica Cracoviensia*, 1965, str. 225 i nast.

dig określa je jako twory pęcherzykowate. W zasadzie kształt *KL* jest pęcherzykowaty, ale w zależności od miejsca występowania może być też inny. Bliżej powierzchni *KL* są przyplaszczone; w warstwach środkowych zaokrąglone. Bardzo często obserwuje się komórki wydłużone w kierunku prostopadłym do powierzchni nabłonka. Takie obrazy występują w miejscu, gdzie nabłonek tworzy wypukłości i wgłębienia. W niektórych miejscach nabłonka mogą się nie tylko znacznie wydłużyć, ale i otwierać na zewnątrz.

W komórce Leydiga najczęściej występuje jedno jądro. Zdarzają się jednak komórki o dwu, trzech, czterech, a nawet pięciu jądrach (Seeger 1933). Kształt jądra bywa różny. W żywej komórce jest ono zaokrąglone, ale bywają jądra innego kształtu. Na preparatach mogą być niekiedy widoczne jądra jakby pogniecione lub gwiazdkowate. Te ostatnie występują na skutek użycia niewłaściwego utrwalacza (Paulicki 1885). Jądro w komórce Leydiga nie leży nigdy w centrum komórki (Gersch 1942).

W dojrzałej *KL* jądro otoczone jest gęstą cytoplazmą przyjądrową. W młodych komórkach występuje ona w postaci półksiężyca. Resztę komórki wypełnia cytoplazma o innej budowie. W najmłodszych *KL* nie obserwuje się zupełnie takiego zróżnicowania cytoplazmy. Barwiona metodą azan cytoplazma przyjądrowa jest lekko fioletowa, natomiast hematoksylina Heidenhaina barwi ją w odcieniu granatowym. W dojrzałej *KL* z cytoplazmą przyjądrową graniczy zewnętrzna część cytoplazmy o strukturze siateczki, zwana spongioplazmą (Seeger 1933). W metodzie azan barwi się w odcieniu niebieskofioletowym a hematoksylina Heidenhaina zabarwia ją na kolor jasnogranatowy. W oczkach siatki spongioplazmy mieszczą się ziarenka wydzieliny. Jej ilość w poszczególnych komórkach jest różna. Zależy to od wieku *KL* i od jej stanu czynnościowego. Zupełnie młode *KL* posiadają zaledwie jedno, dwa lub kilka ziarenek wydzieliny. Owe nieliczne ziarna formują się w młodej komórce początkowo tylko po jednej stronie jądra, a następnie w miarę ich przybywania rozmieszczają się dookoła niego. Ziarna mają różną wielkość. Mniejsze leżą bliżej jądra, większe na obwodzie komórki. Ziarnistości wydzielone i leżące poza komórką zmieniają barwliwość. Na przykład w czasie metamorfozy *KL*, które znajdują się w trzecim stadium (według Seegera), barwione czerwinią obojętną wykazują bladożółte ziarenka. Te same ziarnistości wydzielone poza komórkę są czarnobrazowe (Seeger 1933). Gersch (1942) podaje, że przy barwieniu *KL* mucikarminem ich ziarnistości są czerwone, a więc dają typową reakcję na śluz. W komórce żywej, niebarwionej, ziarnistości są także dobrze widoczne. Są więc rzeczywistym składnikiem komórki, a nie artefaktem. Między ziarnistościami występują bezbarwne kropelki tłuszczu, które barwią się sudanem III. Powyższe wyniki uzyskane przez tę autorkę są sprzeczne z wynikami wcześniejszych, ale dokładnych badań Seegera (1933). Według tego autora badania mikrochemiczne na śluz, tłuszcz i substancje tłuszczowe, a także na żelazo, glikogen i kwas tłuszczowy — dały wynik negatywny. Natomiast dodatni wynik dała próba na białko i produkty jego rozpadu.

Eggeling referuje poglądy autorów dawniejszych prac na temat pochodzenia wydzieliny w komórkach Leydiga. Zdania na ten temat były podzielone. Według jednych ziarnistości komórki pochodziłyby z jądra. Inni twierdzili, że pochodzą z cytoplazmy, np. z rozpadu mitochondriów, które w ten sposób dawały początek ziarenkom. Przyjmowano, że wakuole cytoplazmatyczne powstają przed ziarnami. Oddzielają się od błony komórkowej, a następnie odrywają się od niej i przechodzą do wewnątrz. (Eggeling 1931). W związku z tymi zapatrywaniami warto wymienić obserwację nad barwieniem żywych komórek Leydiga czerwinią

obojętną. Przebieg wybarwienia się ziaren wydzielinę świadczy o tym, że ich zawartość jest produkowana przez cytoplazmę. Według Seegera (1933) w komórce Leydiga w stadium II barwionej przyżyciowo czerwienią obojętną ziarnistości barwią się czerwono-fioletowo, silniej na obwodzie komórki. Spogiolplazma barwi się natomiast bladeżółto. Według Gerscha w komórce Leydiga zabarwionej przyżyciowo spongioplazmy nie można zobaczyć, gdyż ziaren wydzielinę jest dużo i wypełniają całą komórkę. Obecnie wiemy, że wydzielinę jest produkowana w komórce przez ergastoplazmę, która pochodzi z siateczki endoplazmatycznej (reticulum endoplazmaticum). Hay (1961) wykazała, że w *KL* siateczka ta jest dobrze wykształcona w cytoplazmie przyjądrowej (juxtannuclear cytoplasm).

Poglądy na temat funkcji i znaczenia *KL* w przeszłości różniły się dość zasadniczo. Jak podaje Eggeling, niektórzy przypisywali im rolę usztywniającą dzięki zdolności gromadzenia wody, co miało powodować napięcie komórki, podobne do turgoru komórek roślinnych. Seeger referuje poglądy, według których ziarnistości w cytoplazmie komórki Leydiga miałyby pełnić rolę przenośnika tlenu, przyczyniając się do natlenienia limfy przepływającej obok tych komórek. Charakterystyczny dla tamtych czasów sposób dyskusowania o tym zagadnieniu można znaleźć w cytowanych przez Eggelina wypowiedziach Dennerta, według którego taka rola ziarnistości *KL* nie zgadza się z ilością tych komórek u larw salamander. Mianowicie w skórze larw *Salamandra atra* powinno być więcej *KL* niż w skórze larw *S. salamandra*, które rozwijają się w silnie natlenionej wodzie górskich strumieni. Jednak tak nie jest (Eggeling 1931). Obecnie gruczołowy charakter omawianych komórek jest powszechnie przyjęty, jednak poza dawnymi pracami Seegera i Gerscha oraz poza pracą Hay (1961), posługującą się metodyką histochemiczną raczej ubocznie, w dostępnej mi nowszej literaturze nie znalazłam prac nad tymi komórkami, wykonanych przy pomocy metod histochemicznych.

Inny rodzaj gruczołów jednokomórkowych, tzw. komórki kubkowe, opisał Sarasin u *Coecilia* (Eggeling 1931). Autor ten wspomina, że są one odpowiednikiem *KL* u płazów ogoniastych. Prawdopodobnie owe komórki należą do tej samej kategorii, do której zaliczamy też tzw. komórki połączeniowe występujące u *Salientia*. O komórkach kubkowych wspomina również Paulicki. Autor ten znalazł je w naskórku fałdu skórniego u nasady skrzela u aksolotla, gdzie występują one pod postacią tworów kolbowatych, które tkwią częścią rozszerzoną w głębszych warstwach, a szyjki ich wychodzą na powierzchnię naskórka i tu się otwierają.

Eggeling podaje, że według Maurera i Weniger *KL* występują również u płazów bezogonowych. Rabl zaprzeczał temu twierdzeniu, a opisywane przez tych autorów komórki, nazwał komórkami łączącymi, utożsamiając je z komórkami wykrytymi przez Pfitznera. Własne badania Rabla również nie dały rezultatu co do występowania *KL* u *Salientia* (Eggeling 1931).

A więc u płazów bezogonowych *KL* nie występują, a według niektórych autorów ich odpowiednikiem są prawdopodobnie komórki połączeniowe. Owe komórki zostały opisane przez Pfitznera w 1880 roku w nabłonku jamy gębowej kijanki. Mają one kształt kolbowaty i tkwią rozszerzoną częścią w głębszych warstwach nabłonka, a ich szyjka dochodzi do kutikuli i otwiera się na zewnątrz. Nie posiadają pigmentu. Mogą być wielojądrowe. Występują u młodszych larw, a u starszych ich liczba zmniejsza się, jakoby przez przekształcenie w komórki nabłonkowe. Miałyby one pełnić swoją rolę mechanicznie spajając warstwy nabłonka (Eggeling 1931).

Powstawanie *KL* było przedmiotem licznych prac. Piśmiennictwo dotyczące tego

zagadnienia znajduje się w pracy Eggelinga (1931) i Theisa (1932). Z nowszych autorów można tu wymienić Gersch (1942). Carriere (1885) podaje że aksolotl po wylęgnięciu się z jaja nie posiada *KL*. Powstają one z komórek nabłonkowych u larwy o długości 2,2 cm. Według Brunsta (1955) dopiero u aksolotla w wieku 4—13 dni *KL* są wykształcone. Seeger podaje, że komórki te pojawiają się najpierw na grzbiecie w dwóch szeregach, a stamtąd rozprzestrzeniają się na boczne powierzchnie ciała w kierunku kończyn i ogona. Wspomniany autor nie określa jednak dokładnie, w jakim okresie larwalnym rozwijają się gruczoły jednokomórkowe.

Gersch na podstawie swoich badań twierdzi, że komórki *KL* powstają u aksolotla w okresie embrionalnym. Pierwsze *KL* pojawiają się u zarodka długości 8—10 mm w dwuwarstwowym nabłonku i już wówczas ich ziarnistości zabarwiają się czerwienią obojętną na kolor czerwony. U zarodka 15-milimetrowego pojawiają się centra twórcze *KL*. Takie skupienia występują przy odbycie, w okolicy serca i między oczami. W miarę wzrostu i rozwoju zwierzęcia rozprzestrzeniają się na całą powierzchnię ciała. Według tej autorki *KL* we wczesnych stadiach różnicowania się posiadają ziarenka pigmentu. Z chwilą pojawiania się wydzieliny w komórce pigment stopniowo zanika. W miarę dalszego rozwoju i różnicowania się *KL* wzrasta ilość ziarnistości wydzieliny. Cytoplazma owych komórek jest jeszcze nadal jasna. Ziarnistości *KL* są doskonale widoczne w świeżym preparacie. Natomiast w materiale utrwalonym przedstawiają się jako pokurczone twory. Często mogą też zostać zniszczone w czasie utrwalania. Być może, że właśnie to zjawisko było przyczyną, iż w starych pracach brak jest wzmianek na temat wczesnych stadiów różnicowania się *KL* (Gersch 1942).

Obraz mikroskopowy *KL* we wczesnych stadiach rozwojowych różni się od obrazu komórek dojrzałych. W młodych *KL* ziarnistości skupione są po jednej stronie komórki, a jądro znajduje się na biegunie przeciwnym. Cytoplazma jest jasna. W nieco starszych komórkach jądro przemieszcza się w okolice środkową, a ziarnistości układają się dookoła niego. Następnie w sąsiedztwie jądra wykształca się cytoplazma przyjądrowa w postaci półksiężyca. W komórkach jeszcze starszych cytoplazma przyjądrowa obejmuje jądro jakby pierścieniem przypominającym sygnet. W komórkach dojrzałych obok cytoplazmy widoczna jest spongio-plazma (Saeger 1933). W tych komórkach obserwuje się również nieregularną, rzadszą siatkę utworzoną przez beleczkowate twory leżące w zewnętrznej części cytoplazmy, opisanej jako tzw. krata Langerhansa. Komórki Leydiga posiadające wszystkie wymienione składniki są komórkami całkowicie dojrzałymi, tzn. komórkami, w których różnicowanie dobiegło końca. Dalsze ich przekształcanie związane jest już z wydzielaniem i ewentualnym obumieraniem.

We wszystkich pracach poświęconych gruczołom skóry płazów uderza brak obszerniejszego opisu odnowy. Nawet regeneracja fizjologiczna tych gruczołów nie jest wyczerpująco opracowana. Rozwój gruczołów skórnych poznano tylko w ontogenezie płazów, a o mechanizmie rozwoju wtórnego podczas regeneracji amputowanych narządów pokrytych skórą niemal nic nie jest wiadomo. Jest to tym bardziej zastanawiające, że regeneracja narządów zewnętrznych, tj. kończyn i ogona płazów, była przedmiotem wielkiej liczby prac i nadal jest intensywnie badana. Jedynym wyjątkiem, jaki można tu wymienić, jest praca Hadorna i Chena (1953), którzy jednak nie badali odtwarzania się skóry i regeneracji narządowej. U larw traszek wycinali oni na tułowiu kawałeczki skóry różnej wielkości i badali jej regenerację. Dookoła rany występował znaczny ubytek *KL*, które wędrowały na jej powierzchnię. A więc zróżnicowane komórki gruczołowe

razem z komórkami nabłonkowymi przewędrowały na powierzchnię gojącej się rany i wzięły udział w odtworzeniu nabłonka. Autorzy ci podają, że w wyniku tej wędrowki na powierzchni rany nagromadziło się nawet więcej *KL* niż w normalnym nabłonku tej części ciała. Stwierdzili oni, że wędrowka komórek trwa do szóstego dnia, a co dzieje się po ósmym dniu, w ogóle nie badali.

Przebadanie procesu odtwarzania się gruczołów początkowo w nabłonku, a następnie w skórze regenerujących narządów płazów powinno dostarczyć danych, które można by porównać ze znanym rozwojem tych gruczołów w okresie zarodkowym i larwalnym. Chociaż zjawiska regeneracji rzeczywiście wykazują duże podobieństwo do embriogenezy, to jednak należy pamiętać o istnieniu pewnych istotnych różnic (Needham 1952, Brunst 1961).

Odtwarzanie się tkanek w regeneracji zachodzi w bezpośrednim związku z tkankami kikuta, a więc pod wpływem już zróżnicowanych komórek. Także źródło komórek dla narządów tworzących się w rozwoju zarodkowym i odtwarzających się w regeneracji jest odmienne. W tym drugim przypadku mamy do czynienia z wysoko zróżnicowanymi komórkami tkanek kikuta, które najczęściej muszą przejść proces odróżnicowania, aby następnie ulec wtórnemu różnicowaniu w obrębie regeneratu. Od razu więc wyłania się całkiem nowe zagadnienie nie istniejące przy rozpatrywaniu ontogenezy; czy istnieje i jak przebiega odróżnicowanie komórek gruczołowych, które należą przecież do najbardziej zróżnicowanych elementów.

Drugim interesującym problemem jest sprawa powstawania nowych komórek gruczołowych z nabłonka regeneratu. Zjawisko to obserwowało wielu badaczy, ale swoje spostrzeżenia traktowali oni marginesowo, zajmując się głównie procesem odtwarzania narządów. Przegląd prac nad regeneracją można znaleźć w monografii Przibrama (1909) i Korschelta (1927), a z nowszych opracowań u Needhama (1952) i w referacie Brunsta (1961). Jeżeli komórki gruczołowe rzeczywiście różnicują się w regeneracie, to odbywałoby się to u zwierząt, które już dawno przeszły odpowiednie dla tego procesu stadium rozwojowe. Byłyby to więc zarazem przykład wtórnego powstawania komórek gruczołowych u płazów.

Wydaje się bardzo prawdopodobne, że odtwarzanie gruczołów u płazów przeobrażonych będzie się odbywać inaczej niż u larw. Gruczoły są bowiem wówczas nieco inaczej wykształcone, a np. gruczoły wielokomórkowe już funkcjonują. Jednak budowa gruczołów skórnych zaczyna zmieniać się już u larw. U starszych larw płazów można więc także spodziewać się istnienia znacznych różnic w regeneracji i rozwoju ontogenetycznym gruczołów. Także zmniejszenie zdolności regeneracyjnych tkanek, charakterystyczne dla okresu przeobrażania, rozpoczyna się o wiele wcześniej, u stosunkowo młodych larw (Komala 1957). Nie wydaje się jednak, aby to zjawisko dotyczyło nabłonka, z którego przecież powstają gruczoły skórne. Wiemy bowiem, że rana zostaje stosunkowo szybko pokryta nabłonkiem nawet u starych zwierząt i że dzieje się tak również u gatunków, które nie odznaczają się bynajmniej dużymi zdolnościami odtwórczymi, np. u ssaków. Ta skłonność nabłonka do proliferacji może warunkować względnie dobre odtwarzanie się gruczołów, nawet przy bardzo ograniczonej regeneracji całego uszkodzonego narządu.

W świetle powyższych uwag można sądzić, że dokładne przebadanie odtwarzania się komórek gruczołowych w regeneracji narządowej dostarczy interesujących danych, które mogą się przyczynić do pełniejszego zrozumienia różnicowania tych elementów w rozwoju ontogenetycznym. Przedstawione niżej badania są próbą takiego opracowania, opartego na śledzeniu losów komórek Leydiga po amputacji kończyny i ogona u aksolotla.

Materiał i metody

Obserwacje wykonano na 70 rocznych aksolotlach (*Ambystoma mexicanum* Cope) pochodzących z laboratoryjnej hodowli Zakładu Zoologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie. Do badań nad pochodzeniem *KL* występujących w regeneratach kończyn użyto 52 aksolotle rasy czarnej i 10 aksolotli należących do rasy białej. Zachowanie się *KL* w regeneracji ogona było badane na 16 czarnych aksolotlach.

Amputacje tylnych kończyn wykonano w połowie podudzia, trzymając potem operowane zwierzę przez dwie doby w wodzie z dodatkiem penicyliny o stężeniu 20 j. m./ml. Amputację ogona wykonano w połowie jego długości. Regeneracja tych narządów była obserwowana i badana przez 10 miesięcy. W tym czasie zwierzęta przebywały w wodzie wodociągowej o temperaturze około 18—20°C. Karmiono je skrawkami z serc wołowych.

Materiał do badań histologicznych utrwalano także w płynie Zenkera, Schaffera, w sublimacie i w formalinie. Te ostatnie utrwalače okazały się nieodpowiednie i powodowały silne kurczenie się *KL* i zniekształcenie ich budowy.

Utrwalony materiał po odwodnieniu w szeregu alkoholi zatapiano w parafinie. Wykonano podłużne przekroje regenerujących kończyn i pewną ilość skrawków o grubości 6 mikronów. Wypróbowano barwienie mucikarminem według Besta, według Mayera, fioletem Lautha, błękitem celestynowym, hematoksyliną Delafielda i żelazistą oraz metodą azan. Ostatnia metoda okazała się szczególnie przydatna. Pewną wartość przedstawiało także barwienie hematoksyliną Delafielda oraz żelazistą (intensywnie wybarwiająca krąę Langerhansa). Pozostałe metody barwienia nie posiadały większego znaczenia.

Zachowanie się *KL* w regeneratach kończyn badano na materiale utrwalonym po 12, 24, 48, 72 godzinach i po 5, 11, 16, 22 dniach, a dalej po 1, 1½, 2, 3, 3½, 4, 5, 6, 7, 8, 9½ i po 10 miesiącach od momentu amputacji. W przypadku regenerujących ogonów materiał do badania histologicznego utrwalano po 24, 48, 72 godzinach i po 4 i 7 tygodniach, a następnie po 4, 5, 7 i 10 miesiącach.

Ponieważ obserwacje oparte są głównie na przeglądzie preparatów histologicznych barwionych metodą azan, podane w tej pracy opisy barwliwości struktur komórkowych odnoszą się do powyższej metody. We wszystkich innych przypadkach, gdy opis dotyczy preparatów barwionych odmienną metodą, w tekście poczyniono odpowiednie wzmianki.

Przegląd preparatów wykazał, że wśród komórek Leydiga pojawiających się w nabłonku regeneratu można rozróżnić poszczególne stadia ich różnicowania się. Po określeniu tych stadiów, bliżej opisanych w następnym rozdziale, dokonano obliczenia ilości poszczególnych form *KL* i ich procentowego udziału w stosunku do wszystkich liczonych *KL* (tab. 1—3). W każdym regeneracie liczono od 30 do 380 komórek. Ustalenie określonego w ten sposób składu procentowego poszczególnych form *KL* pozwoliło na liczbowe przedstawienie progresywnych zmian tego składu w przebiegu regeneracji kończyn. Jednak duże wahania losowe uzyskanego szeregu liczb zaciemniają ogólny kierunek zmian procentowego składu różnych form *KL*. W celu wyeliminowania owych wahań losowych, utrudniających graficzne przedstawienie głównej tendencji badanego procesu, zastosowano wzór:

$$p'_3 = (p_1 + 2p_2 + 3p_3 + 2p_4 + p_5) : 9 \quad (1)$$

zaczepnięty z podręcznika F. A. Schilder i M. Schilder (1959), w którym

p'_3 — obliczana wartość rzędnej danego dla wyrazu szeregu, oznaczonego jako p_3

- p_2, p_1 — wyrazy szeregu kolejno poprzedzające dany wyraz p_3
 p_4, p_5 — wyrazy szeregu kolejno następujące po danym wyrazie p_3

Wzór ten pozwala na wyrównanie nieregularności krzywej wykresu, jeżeli są one spowodowane losową zmiennością danych liczbowych. Jednocześnie nie ulega zmianie zasadnicza tendencja, którą ilustruje przebieg uzyskanej w ten sposób krzywej wyrównawczej. Załączony wykres przedstawia krzywe wyrównawcze dla poszczególnych form *KL*, zebranych w trzech grupach. Grupa pierwsza obejmuje komórki młode, oznaczone jako *ML1* i *ML2*. Druga grupa to komórki bardziej zróżnicowane, *ML2b* i *ML2c*, które jednak także zaliczamy do form młodych. Trzecia grupa jest grupą zbiorczą, tzn. zawierającą wszystkie, poprzednio wymienione formy *KL*.

Wyniki

Komórki Leydiga w regeneracji kończyny

Na podstawie przeglądu preparatów histologicznych wyróżniono dwa główne stadia rozwojowe niedojrzałych *KL* występujących w nabłonku młodych regeneratów, a później w naskórku regeneratów starszych. Dojrzałe komórki Leydiga oznaczono skrótem *DL*.

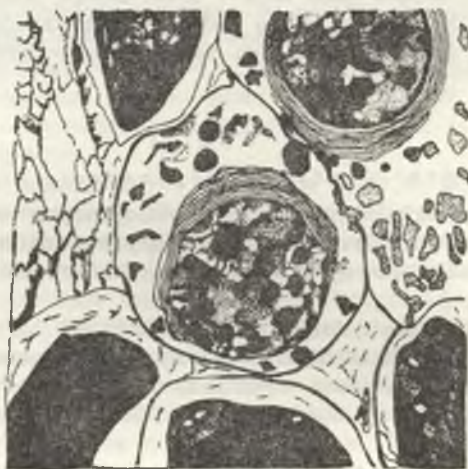
Do pierwszego stadium różnicowania zaliczono *KL* bardzo podobne do nabłonkowych, które u czarnych aksolotli zawierały w cytoplazmie drobne ziarenka melaniny, a obok nieliczne ziarna wydzieliny barwiące się blado-niebiesko metodą azan. Jądro najczęściej leży ekscentrycznie. Oznaczono je symbolem *ML1* (ryc. 1.)



Ryc. 1. Młoda komórka Leydiga (*ML*). Widoczne dwa ziarenka wydzieliny, jądro wieloboczne, przesunięte na prawą stronę komórki. Barwienie metodą azan, pow. 1500 x

Stadium drugie obejmuje pozostałe młode formy *KL*. Wśród nich wyróżniono trzy fazy rozwoju młodych *KL*. Pierwszą, oznaczoną jako *ML2a*, stanowią komórki, które nie posiadają w cytoplazmie pigmentu, ale po jednej stronie jądra występuje już kilka ziaren wydzieliny o niebieskim zabarwieniu. Czasami ziarna te barwią się na kolor czerwony. Ich cytoplazma jest jasna i nie barwi się. Jądro jest przesunięte na bok, wyraźnie powiększone w stosunku do jąder komórek nabłonkowych.

Do drugiej fazy tego stadium zaliczono komórki nieco starsze, oznaczone jako *ML2b* o cytoplazmie tak jasnej jak w stadium poprzednim, zawierającej niebieskie i czerwone ziarenka wydzieliny, rozrzucone jednak już dookoła jądra. Bardzo istotną nową cechą jest występowanie małej ilości cytoplazmy przyjądrowej, wykształconej w formie półksiężyca obejmującego jądro (ryc. 2). Te komórki są nieco większe niż komórki *ML2a*.



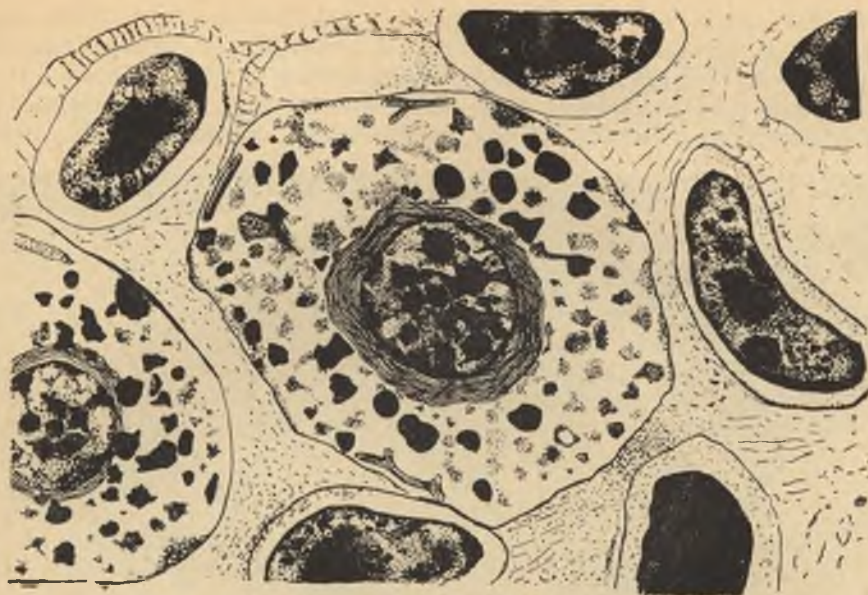
Ryc. 2. Wytwarzanie cytoplazmy przyjądrowej. Młoda KL w stadium *ML2b*. Barwienie metodą azan, pow. 1500 X

Ostatnia faza rozwoju zaliczonych do drugiego stadium *KL* charakteryzuje się wystąpieniem stosunkowo dużej ilości cytoplazmy przyjądrowej, która znajduje się po jednej stronie jądra w formie półksiężyca albo tworzy już wąski pierścień (ryc. 3). Ziarenka wydzieliny występują w dużej ilości w pozostałej, obwodowej cytoplazmie i często wybarwiają się na kolor czerwony. Na obwodzie pojawiają się belecзки, tzw. kraty Langerhansa. Komórki te oznaczono symbolem *ML2c*.

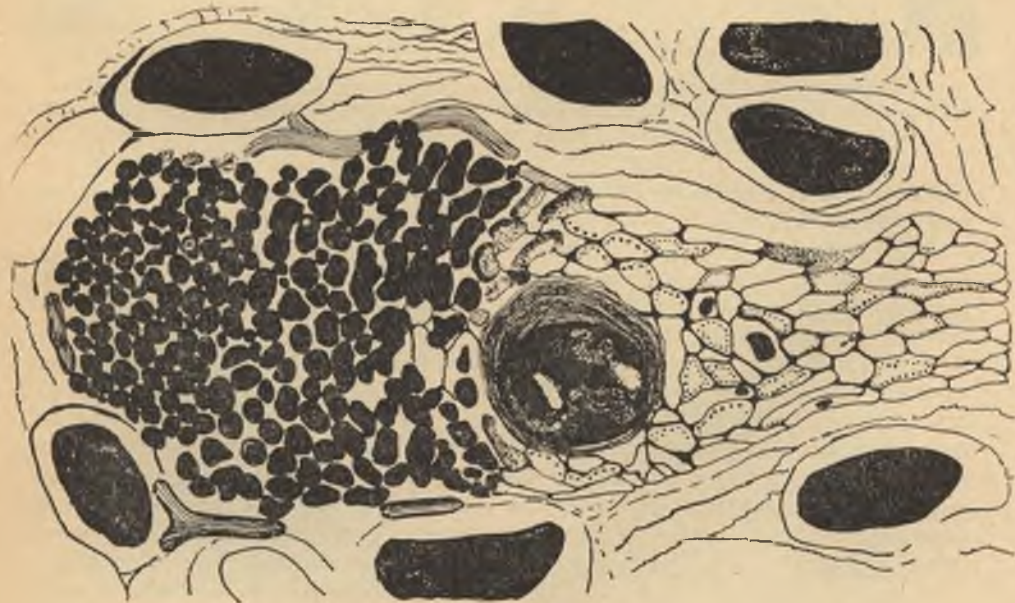
Do ostatniego, trzeciego stadium zaliczono bardzo duże, dojrzałe komórki Leydiga (*DL*), znajdujące się w różnych stanach fizjologicznych. Mogą one posiadać bardzo dużą liczbę ziaren wydzieliny barwiącej się na czerwono lub granatowo z odcieniem fioletowym (ryc. 4). Niekiedy ziarenek może brakować. Wówczas szczególnie wyraźnie zaznacza się spongioplazma, która jest silnie rozwinięta we wszystkich dojrzałych *KL*. Często w tych komórkach jądro pozbawione jest wyraźnego rysunku chromatyny i jest wypełnione zbitą silnie barwiącą się substancją. W tym stadium jądro otacza skąpa ilość cytoplazmy przyjądrowej.

W komórkach Leydiga, zarówno w stadium drugim (*ML2b* i *ML2c*), jak i w stadium trzecim (*DL*), w cytoplazmie przyjądrowej często można zaobserwować ziarna wydzieliny (ryc. 5a, b). Taki obraz sugeruje jej tworzenie się w tej części komórki i wydalanie do cytoplazmy obwodowej o innej budowie.

Wśród *DL* a także wśród *ML2c* można napotkać komórki o dwóch jądrach pograżonych we wspólnej cytoplazmie przyjądrowej. W przypadkach gdy dwujądrowa komórka jest komórką w stadium *ML2c*, zwrócone ku sobie powierzchnie obu jąder są często wzajemnie odkształcone i powyginane. Czasami jedno jądro

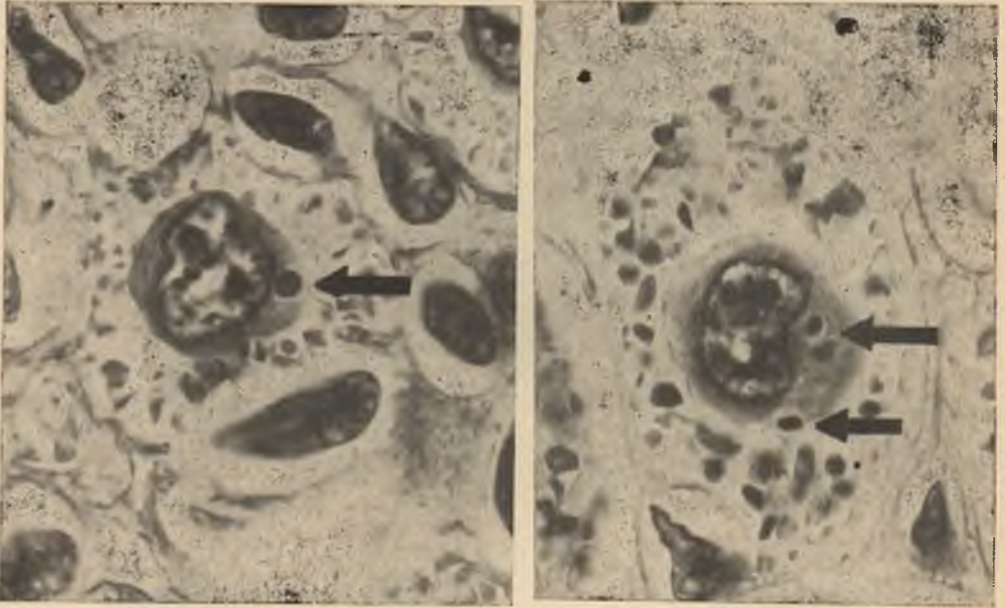


Ryc. 3. Cytoplazma przyjądrowa tworzy wąski pierścień. Widoczna jej charakterystyczna budowa wewnętrzna w postaci układu jakby włóknistych struktur otaczających jądro. Młoda komórka Leydiga w stadium *ML2c* w 1-miesięcznym regeneracie. Barwienie metodą azan, pow. 1500 X



Ryc. 4. Dojrzała komórka Leydiga. Szczytowa część komórki zajęta czerwono wybarwionymi ziarnami wydzieliny (na rysunku czarne). Dookoła cytoplazmy przyjądrowej blade, niebiesko zabarwione ziarna. Dolny biegun komórki zajmuje spongioplazma. Regenerat 11 miesięczny. Barwienie metodą azan, pow. 1500 X

wykazuje zupełnie inny stan. W przypadkach występowania dwóch jąder w *DL* jądra te są zazwyczaj bardziej zaokrąglone. Tworzenie się ziaren wydzieliny w cytoplazmie przyjądrowej w takich dwujądrowych komórkach może niekiedy mieć miejsce pomiędzy jądrami. Takie dwujądrowe *KL* powstają na drodze podziałów mitotycznych. Pomimo silnego zróżnicowania, wyrażającego się zupełnie



Ryc. 5. Tworzenie się wydzieliny w cytoplazmie przyjądrowej w stadium *ML2c*. Cytoplazma ta jest silnie zasadochłonna. Widoczna dość duża, pojedyncza kropelka wydzieliny w cytoplazmie przyjądrowej. Regenerat 3-miesięczny. Barwienie metodą azan, pow. 1500 X

odrębną budową cytoplazmy obwodowej (granoplazma) i cytoplazmy przyjądrowej, nawet formy zaliczane do stadium *ML2c* mogą dzielić się mitotycznie (ryc. 6a, b). Podczas podziału nie ustaje produkcja wydzieliny w cytoplazmie przyjądrowej (ryc. 6b). Jednak podział obejmuje tylko substancję jądrową, a silnie zróżnicowana cytoplazma przyjądrowa nie dzieli się. W ten sposób w jej obrębie powstają dwa jądra potomne. Dojrzałe komórki Leydiga podlegają nadal powolnemu zróżnicowaniu. Wyraża się ono stopniowym pogrubianiem i wzmacnianiem powierzchni struktury cytoplazmatycznej, tzn. kraty Langerhansa. Krata ta zaczyna się tworzyć już w stadium *ML2c*. Jednak dopiero w starszych, wielomiesięcznych *DL* tworzy bardzo masywne grube struktury (ryc. 7). Wiemy, że po wydaleniu na zewnątrz nagromadzonej wydzieliny *KL* kurczą się i rozpoczynają nowy cykl sekrecyjny, upodabniając się trochę do małych *ML*. Wówczas obok nielicznych zachowanych dużych ziaren wydzieliny oraz grubej kraty Langerhansa można spostrzec tworzenie w cytoplazmie przyjądrowej drobnych ziarenek wydzieliny nowej.

W parę godzin po amputacji kończyny daje się zauważyć lekkie zagięcie skóry na brzegach rany. Na preparatach można tu zauważyć zmiany w naskórku kikuta. Rozpoczyna się też napełnianie komórek nabłonkowych na powierzchnię rany amputacyjnej. Po dwunastu godzinach znaczna część powierzchni rany zostaje pokryta nabłonkiem, ale o innym uwarstwieniu niż naskórek reszty kończyny. Tuż

przy miejscu przecięcia gromadzą się komórki nabłonkowe, tworząc zgrubienie sięgające trzynastu warstw, podczas gdy w warunkach normalnych jest ich w tym miejscu 8—10. Ku środkowi rany nabłonek staje się coraz cieńszy aż do jednowarstwowego, a komórki wyraźnie spłaszczają się. Pomiedzy nimi występują już wówczas *KL*, które jednak znacznie różnią się pod względem kształtu od tych



a

b



Ryc. 6. Podział mitotyczny jądra komórki w stadium *ML4*. Zachowana cytoplazma przyjądrowa i obwodowa granoplazma. Regenerat 1-miesięczny. Barwienie metodą azan. Pow. 1500 X
 a — widoczne grube chromosomy w stadium późnej profazy. b — inny skrawek tej samej komórki, w cytoplazmie przyjądrowej widoczne tworzenie ziaren wydzieliny.

Tabela 1 c. d.

1	2	3	4	5	6	7	8
2 m	23 p	—	9	30	151	38	228
	d	—	4	—	172	34	210
	24 p	—	—	7	123	70	200
	d	—	1	48	133	19	201
3 m	25 p	—	3	—	73	146	222
	d	1	—	5	70	124	200
	26 p	—	—	8	89	125	222
	d	—	5	1	56	224	286
	27 p	2	—	21	40	137	200
d	14	16	30	117	23	200	
3,5 m	28 p	—	9	7	96	112	224
	d	—	—	40	66	73	179
	29 p	—	—	7	30	107	144
	d	—	1	72	78	49	200
	30 p	—	—	2	48	150	200
	d	1	4	90	71	34	200
4 m	31 p	—	—	100	24	92	216
	d	3	46	88	108	72	317
5 m	32 p	—	2	15	54	129	200
	d	—	28	91	56	33	208
6 m	33 p	—	3	3	6	191	203
	d	2	11	19	34	94	160
7 m	34 p	—	—	1	13	186	200
	d	4	16	27	19	134	200
8 m	35 p	—	—	—	2	198	200
	d	—	—	—	55	145	200
9,5 m	36 p	—	—	4	6	370	380
	d	—	—	9	19	293	321
10 m	37 p	—	—	2	10	188	200
	d	1	—	7	11	181	200

p — proksymalna
d — distalna

spłaszczone lub wydłużone. Obserwuje się także formy odpowiadające pod względem kształtu *KL* znajdującym się w pozostałej części kończyny. W nabłonku pokrywającym ranę najczęściej występują *DL* (tab. 2). Ilość form młodych (*ML2c*, *ML2b*, rzadko *ML2a*) jest niewielka i nie przekracza kilku procent, a więc tyle, ile ich jest zazwyczaj w normalnym nabłonku kończyny.

TABELA 2
Procentowe zmiany różnych form *KL* w regeneracji kończyny

Wiek regeneratów g-godz. d-dni m-mies.	Niedojrzałe komórki Leydiga				Dojrzałe, duże <i>KL</i> mają bardzo dużo ziaren wydzieliny, ułożonej biegunowo (<i>DL</i>)
	Bardzo młode z pojedynczymi ziarnami wydzieliny; mogą mieć ziarenka pigmentu (<i>ML1</i>)	Młode, mają liczne ziarna wydzieliny, brak ziarenek pigmentu			
		ziarna głównie po jednej stronie (<i>ML2a</i>)	ziarna dookoła jądra (<i>ML2b</i>)	z cytoplazmą przyjądrową w formie półksiężyca (<i>ML2c</i>)	
1	2	3	4	5	6
12 g	0,50	0,50	—	—	99,00
24 g	0,50°	1,50	0,17	0,33	97,50
48 g	—	0,35	—	0,35	99,30
72 g	0,26	—	0,78	1,00	97,97
5 d	—	—	0,50	1,00	98,50
11 d	2,72	1,53	3,73	5,94	86,14
16 d	5,64	1,53	1,02	2,78	89,04
22 d	22,62	4,32	4,76	22,19	46,11
1 m	17,83	20,96	10,20	7,65	43,30
1,5 m	5,77	8,88	8,22	9,37	67,76
2 m	—	1,65	10,02	68,26	20,05
3 m	1,28	1,80	4,88	33,46	58,58
3,5 m	0,08	1,08	18,74	33,17	46,93
4 m	0,56	8,57	35,01	24,58	31,28
5 m	—	6,73	21,81	26,96	44,44
6 m	0,01	3,80	6,70	11,02	78,51
7 m	1,00	4,00	7,00	8,00	80,00
8 m	—	—	—	14,25	85,75
9,5 m	—	—	1,85	3,57	94,58
10 m	0,25	—	2,25	5,25	92,25

Zauważyłam, że nawet w tych nielicznych przypadkach, w których było dużo form młodych, ich ilość odpowiadała ilości takich form w kikucie. Zjawisko to występuje na przykład po obcięciu kończyn młodych aksolotli lub też po powtórnej amputacji wielomiesięcznych regeneratów kończyn zwierząt starszych, u których kikut zawiera bardzo dużo młodych form *KL*. W tym ostatnim przypadku dopiero obraz histologiczny ujawnia fakt amputacji regeneratu zamiast pierwotnej kończyny. Takie przypadki nie były brane pod uwagę przy dokonywaniu obliczeń ilości różnych form *KL*.

Obraz po 24 godzinach przedstawia się nieco inaczej. Nabłonek pokrywa już całą

powierzchnię amputacji dość grubą warstwą. Na brzegach rany składa się on aż z 20—30 warstw komórek. Pod nabłonkiem występuje nieraz znaczna ilość płynu tkankowego, który w bezpośrednim sąsiedztwie komórek nabłonkowych tworzy na preparatach cienką warstwę o zabarwieniu niebieskim. Później w tym miejscu stopniowo wytworzy się błona podstawowa. Procentowy skład różnych form *KL* w tym czasie nadal jest taki sam jak w obrębie reszty kończyny. Także ich barwność nie różni się na obszarze regeneratu i w kikucie. Ziarnistości w komórkach Leydiga barwione metodą azan są czerwone. Wydaje się jednak, że więcej *DL* niż poprzednio nie posiada w ogóle ziarnistości. Zgrupowanie takich opróżnionych komórek może np. wystąpić w miejscu amputacji, gdzie nowy nabłonek łączy się z resztą kończyny. Podobnie jak poprzednio, *DL* w regeneracie mają odmienną kształt; są one spłaszczone i znacznie wydłużone. Podobne formy obserwuje się w naskórku kikuta ale tylko w bliskim sąsiedztwie regeneratu.

Po 48 godzinach powierzchnia amputacji pokryta jest wielowarstwowym nabłonkiem, który w miejscu graniczącym z kikutem jest nadal nieco grubszy. Grubość nabłonka bliżej środka rany równa jest grubości naskórka kikuta, ale na samym środku tworzy on znaczne zgrubienie w formie czopa. W tym miejscu liczbą warstw nabłonka sięga piętnastu. W nabłonku występują liczne *DL*, nieco zaokrąglone, ale często jeszcze zniekształcone. W tym stadium przeważają *DL*. Jest ich około 99% (tab. 2).

Po trzech dobach na środku rany widoczny jest niewielki wzgórek. Jest on pokryty nabłonkiem nadal nieco grubszym niż nabłonek kikuta. Utrzymuje się też zgrubienie nabłonkowe w miejscu połączenia kikuta z regeneratem. Przy brzegu rany pod nabłonkiem widać jakby jednolitą błonkę. Jaj barwność jest zupełnie inna niż błony podstawowej w reszcie kończyny, gdyż błona ta pochodzi z włókienek skrzepu. Procent *DL* obecnych w nowo utworzonym nabłonku jest nadal bardzo duży. Dużo takich *DL* nie zawiera ziarnistości, a spongioplazma jest dobrze widoczna. Komórki są przeważnie silnie zniekształcone. Młode formy występują nielicznie. I tak form oznaczonych jako *ML2c* jest około 1%, 0,8% jest form *ML2b*, a 0,3% form *ML1* (tab. 2).

Po pięciu dniach regeneracji nadal jeszcze zaznacza się czop nabłonkowy. Utrzymują się także włókienka skrzepu pod nabłonkiem (ryc. 8ab). W nabłonku obserwuje się przeważnie *DL*. Występują one w 3—5 szeregu. Znaczną ilość tych elementów obserwuje się w czopie nabłonkowym. Młodsze formy *KL* są nieliczne formy *ML2c* stanowią 1%, a *ML2b* — 0,5% (tab. 2). W zasadzie procent *ML* w obrębie regeneratu nie różni się jeszcze wyraźnie od procentu tych komórek w nabłonku kikuta. W tym czasie zaczyna się degeneracja *KL*, które nawędrowały z reszty kończyny.

Regenerat 11-dniowy wykształcony jest w postaci dużego pączka. Na wierzchołku tego pączka utrzymuje się wyraźny czop komórek nabłonkowych. W tym okresie dostrzega się już zaawansowane tworzenie się błony podstawowej. Młoda błona podstawowa wytwarza się w części proksymalnej. Poza tym w distalnej części regeneratu pod nabłonkiem na niewielkich odcinkach dostrzega się delikatne włókienka przylegające do warstwy nabłonkowej. Zaznacza się wyraźne zmniejszenie procentu *DL* (86,1%) i odpowiedni wzrost procentu *ML1* (2,7%), *ML2* (1,5%), *ML2b* (3,7%), *ML2c* (5,9%). Proces degeneracji obejmuje już znaczną liczbę *DL*.

W regeneracie 16-dniowym obserwuje się dalsze tworzenie błony podstawowej. I tak w części proksymalnej jest ona podobna do błony podstawowej w kikucie, w części zaś distalnej ma nieco odmienną budowę, a mianowicie występuje tu w postaci bardzo cienkiej warstewki o budowie włóknistej. Na samym wierzchołku

regeneratu brak jej zupełnie. Jednak mimo zróżnicowania błony podstawowej, w tym okresie nie występują jeszcze jakiegokolwiek zawiązki gruczołów wielokomórkowych, nawet w proksymalnej części regeneratu. Młodsze stadia *KL* są nadal



Ryc. 8. Przekrój wzdłuż osi kikuta kończyny po pięciu dniach regeneracji. W środkowej części przekroju widoczne nagromadzenie włókien skrzepu oraz płynu podnoszącego w tym miejscu nabłonek pokrywający ranę. Widoczne ciemno zabarwione *KL*. Ich pozorny brak w środkowej części nabłonka jest spowodowany wydalaniem ciemno zabarwionej wydzieliny, tak że komórek tych nie można rozróżnić przy użyciu zastosowanego powiększenia. Barwienie metodą azan, pow. 25 X

niezbyt liczne (*ML1* — 5,6%, *ML2a* — 1,5%, *ML2b* — 1,0%, *ML2c* — 2,8%), ale podobnie jak w regeneracji 11-dniowym jest ich już więcej niż w pierwszych kilku dniach po amputacji.

Natomiast wśród *DL* proces degeneracji obejmuje coraz więcej komórek. W niektórych degenerujących *KL* cytoplazma ulega wakualizacji, tak że komórki posiadają liczne puste przestrzenie w cytoplazmie (ryc. 9a). Następnie rozpoczyna się stopniowe odstawianie cytoplazmy od powierzchni sąsiednich komórek z równoczesnym jej kurczeniem się. Obrazy te przypominają plazmolizę komórki (ryc. 9b). Obserwowane pod małym powiększeniem dają wrażenie sieci o nierównych oczkach. Zmiany degeneracyjne zachodzą również w jądrze. Substancja jądrowa ulega zagęszczeniu i następuje zanik rysunku chromatynowego. Cytoplazma także skurcza się i skupia w środku przestrzeni zajmowanej poprzednio przez komórkę.

Ostatecznie składniki cytoplazmy ulegają stopniowemu rozpuszczeniu, przestrzeń zaś po zdegenerowanej *KL* zostaje zajęta przez sąsiednie komórki nabłonka.

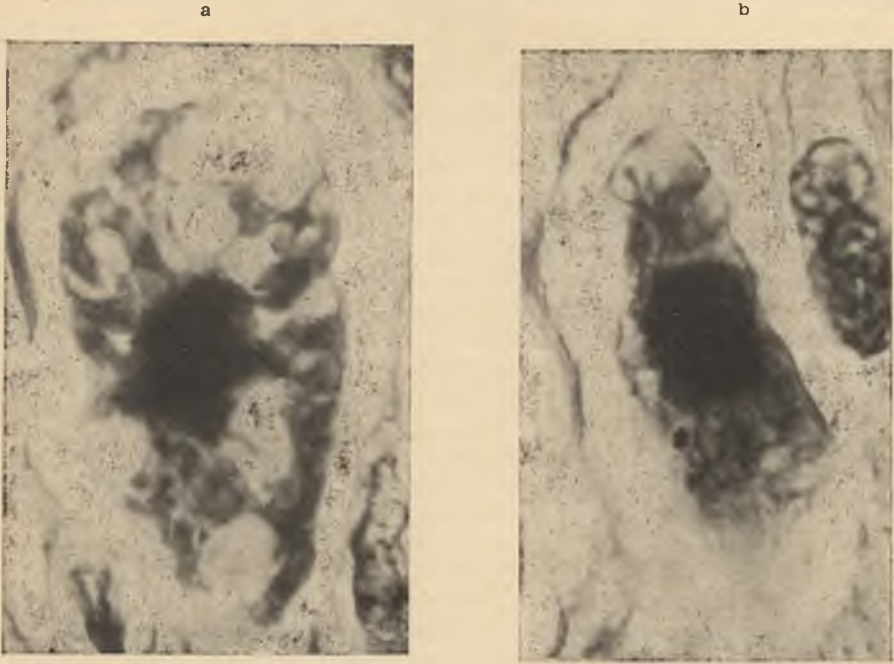
W regeneracji 22-dniowym typowa błona podstawowa jest już wykształcona na obszarze całego regeneratu. Procent młodych form *KL* wzrósł tu wielokrotnie w porównaniu z okresem 16-dniowym. Znaczny wzrost procentu *ML* zaznacza się w obrębie stadiów wczesnych. I tak *ML1* równa się 22,6%, *ML2a* — 4,3%, *ML2b* — 4,8%, zaś procent *ML2c* osiąga liczbę 22,2% (tab. 2). Zaznacza się także odpowiednie obniżenie procentu *DL*: z 89% dla okresu 16-dniowego do 46,1% dla okresu 22-dniowego. W tym stadium regeneracji można również zauważyć, że procent *DL* jest większy w części proksymalnej niż w części distalnej (tab. 3).

TABELA 3

Procentowe zmiany różnych form KL w proksymalnej i distalnej części regeneratu

Wiek re- generatów g-godz d-dni m-mies.	Bardzo młode		Niedojrzałe komórki Leydiga						Dojrzałe duże KL, mają bardzo dużo ziaren wydzielniny uo- żonej biegunowo (DL)	
	z pojedynczymi ziarnami wydzie- liny; mogą mieć ziarenka pig- mentu (ML1)		ziarna głównie po jednej stronie (ML2a)		ziarna dookoła jądra (ML2b)		z cytoplazmą przyjądrową w formie pół- księżyca (ML2c)			
	proks.	dist.	proks.	dist.	proks.	dist.	proks.	dist.		
1			3		4		5		6	
22 d	4,94	44,66	2,34	6,79	3,12	6,79	23,63	20,38	65,97	21,36
1 m	9,90	27,33	19,79	22,36	7,80	13,04	8,34	6,83	54,16	30,43
1 1/2 m	0,50	11,03	3,03	14,75	9,09	7,35	4,04	14,71	83,31	52,20
2 m	—	—	2,10	1,22	8,65	11,66	64,11	74,12	25,26	12,88
3 m	0,31	2,19	0,47	3,07	4,50	5,26	31,35	35,38	63,32	54,07
3 1/2 m	—	0,17	1,33	0,86	3,01	34,90	29,24	37,13	66,43	26,94
4 m	—	0,93	—	14,33	46,40	27,41	11,00	33,64	42,60	23,71
5 m	—	—	—	13,46	—	43,70	27,00	26,92	73,00	15,88
6 m	—	1,25	1,48	6,88	1,48	11,88	2,96	21,25	94,08	58,75
7 m	—	2,00	—	8,00	0,50	13,50	6,50	9,50	93,00	67,00
8 m	—	—	—	—	—	—	1,00	27,50	99,00	72,50
9 1/2 m	—	—	—	—	1,86	2,81	3,56	5,92	94,57	91,21
10 m	—	0,50	—	—	1,00	3,50	5,00	5,50	94,00	90,50

Jak już wspomniano, degeneracja *KL* w nabłonku pokrywającym ranę zaznacza się już w 11 dniu po obcięciu i stopniowo się nasila, osiągając maksimum około 16 dnia. Wydaje się, że procesowi temu podlegają głównie te *KL*, które nawędrowały z kikuta do regeneratu. Kończy się on około 22 dnia, ale pojedyncze degenerujące *KL* można napotkać w każdym okresie wzrostu regeneratu.



Ryc. 9. Degeneracja komórki Leydiga. Poszczególne stadia degeneracji pochodzą z 16-dniowego regeneratu, gdyż w tym okresie występuje najwięcej degenerujących *KL*. Barwienie metodą azan, pow. 1500 X

a — dojrzała *KL* po wydzieleniu dużej ilości sekretu. Widoczne duże wakuole tworzące się w cytoplazmie na miejscu wydalonych ziaren wydzieliny. Jądro zagęszczone, o zatartym zrzebie chromatynowym. b — silne kurczenie się spongioplazmy opróżnionej z wydzieliny, przypominające plazmolizę.

Regeneraty 22-dniowe cechuje, jak już wiemy, dość duża liczba najmłodszych form, *ML1* (około 23%). Dlatego ten okres regeneracji kończyn białych aksolotli został obrany jako najdogodniejszy dla zbadania związku pomiędzy początkowymi fazami różnicowania się *KL* (młode formy, tj. *ML1* i *ML2a*) i syntezą czarnego pigmentu w ich cytoplazmie. Dokładny przegląd preparatów histologicznych wykazał, że w przeciwieństwie do regeneratów pochodzących z czarnych aksolotli, u zwierząt białych nawet bardzo młode *KL* nie zawierały ziarenek czarnego pigmentu.

Jednomiesięczny regenerat pokryty jest nabłonkiem nieco cieńszym niż naskórek kończyny. Nabłonek regeneratu liczy wówczas od 5 do 8 warstw, naskórek zaś kończyny 8—10. Rozmieszczenie *KL* obejmuje tu niemal całą grubość nabłonka. Form dojrzałych (*DL*) jest tu 43,3%, przy czym większość występuje w części proksymalnej (tab. 3). Stosunkowo dużo jest natomiast młodych form *KL*. Komórek *ML1* — 17,8%, *ML2a* — 21%, *ML2b* — 10,2%, *ML2c* — 7,7%. Wśród młodszych form

większość stanowią więc nadal stadia wczesne. Między *DL* występują także formy degenerujące.

Po 6 tygodniach w odrastającej kończynie wyraźnie zaznaczają się palce. Rozmieszczenie *DL* jest podobne do rozmieszczenia w regeneratach z poprzedniego okresu, a mianowicie występuje więcej *DL* w części proksymalnej niż w distalnej (tab. 3). W całym regeneracie procent *DL* jest większy niż w poprzednim okresie i równa się 67,8%. Udział różnych stadiów *ML* w ich ogólnej ilości w szczegółach jest odmienny w porównaniu ze stanem po jednym miesiącu. Uwagę zwraca zmniejszenie się procentu form najmłodszych (tab. 3).

Regenerat 2-miesięczny posiada już wykształcone palce. Nabłonek wielowarstwowy w miejscu połączenia kończyny z regeneratem wypełnia zagłębienie przy brzegu skóry. Nabłonek ten otacza najbardziej proksymalną część regeneratu. Obserwuje się i takie miejsca w skórze, gdzie naskórek kończyny przechodzi stopniowo w nabłonek regeneratu, nie tworzy zgrubienia i składa się z takiej samej ilości warstw jak na kończynie. W 2-miesięcznym regeneracie skład procentowy *KL* uległ dużej zmianie w porównaniu ze stadium poprzednim. Dojrzałych komórek Leydiga jest około 20% z tym, że nadal jest ich więcej w części proksymalnej w porównaniu z częścią distalną. W nabłonku regeneratu dużo jest form młodych. Jednak udział poszczególnych stadiów *ML* jest tu już inny niż w poprzednim okresie regeneracji, zdecydowanie przeważają formy w stadium *ML2c*, a mało jest form w stadium *ML2b* i *ML2a*.

W *regeneracie 3-miesięcznym* obserwuje się nadal, podobnie jak w poprzednim okresie, zgrubienie nabłonka w miejscu połączenia kończyny z regeneratem. Nabłonek regeneratu ma nieco mniej warstw niż naskórek reszty kończyny. Procent *DL* zwiększył się aż do 58,6%. Wśród *ML* występują niemal wszystkie stadia. Komórek *ML2c* jest około 33,5%, *ML2b* — 4,9%, *ML2a* — 1,8% *ML1* — 1,3%. Tak jak to było w poprzednim okresie regeneracji, wśród *ML* przeważają więc stadia starsze.

W nieco późniejszym okresie (3,5 miesiąca po amputacji) obserwuje się podobny obraz. Naskórek kończyny przechodzi stopniowo w nabłonek regeneratu lub też tworzy tu wyraźne zgrubienie. Procent *DL* oraz różnych form *ML* jest w zasadzie podobny do procentu tych komórek w okresie poprzednim.

Dalszą regenerację cechuje brak większych zmian jakościowych w naskórku. Natomiast zmienia się nadal procentowy skład różnych form *KL*. W obrębie *ML* występują wahania dotyczące zmiennego procentu różnych stadiów dla kolejnych miesięcznych regeneracji. Można jednak zauważyć, że procent wszystkich *ML* stopniowo się zmniejsza. Odpowiednio wzrasta procent *DL*, chociaż obserwuje się znaczne oscylacje dookoła stałej tendencji wzrostu. Od piątego miesiąca procent *DL* wzrasta i w 9,5 miesiącu po amputacji wynosi ok 95% (tab. 2). Wydaje się, że taki procent *DL* jest granicą, tzn. odpowiada udziałowi *DL* wśród wszystkich form *KL* w normalnej kończynie 21-miesięcznego aksolotla.

Różnica w procesie *ML* pomiędzy distalną i proksymalną częścią regeneratu w piątym miesiącu jest nadal wyraźna. W części distalnej jest wówczas około 84% *ML*, a w części proksymalnej 27% (tab. 3). A więc w części distalnej jest trzy razy więcej form młodych *KL* niż w części proksymalnej. W następnych miesiącach ta przewaga *ML* w części distalnej nie wiele się zmniejsza, mimo że procent *ML* w obu częściach regeneratu szybko maleje. Nawet w 10 miesiącu procent *ML* w części distalnej (9,5%) jeszcze prawie półtorakrotnie przewyższa procent tych form w części proksymalnej (6%).

Tabela 4 daje uproszczony obraz powyżej przedstawionych zmian dotyczących procentowego udziału różnych rodzajów *KL* w przebiegu regeneracji kończyn

aksolotli. Kolumny 2 i 3 tej tabeli zawierają sumy procentów odpowiednio dla *ML1* i *ML2* oraz dla *ML2b* i *ML2c*. Kolumny 4 i 5 — to wartości rzędnych krzywych wyrównawczych odpowiednio dla kolumny 2 (*ML1* i *ML2a*) oraz dla kolumny 3 (*ML2b* i *ML2c*). Wartości te zostały obliczone na podstawie wzoru (1).

TABELA 4

Rzeczywiste zmiany procentu różnych form *KL* i wartości rzędnych dla krzywych wyrównawczych przedstawiających te zmiany

Wiek regeneratów	Procentowy skład różnych form <i>KL</i>		Wartości procentowe z kolumn 2—3 wyrównane według wzoru: $p'_3 = (p_1 + 2p_2 + 3p_3 + 2p_4 + p_5) : 9$			
	<i>ML1</i> i <i>ML2c</i>	<i>ML2b</i> i <i>ML2c</i>	<i>ML1</i> i <i>ML2c</i>	<i>ML2b</i> i <i>ML2c</i>	<i>ML</i>	<i>DL</i>
1	2	3	4	5	6	7
12 g	1,00	0,00	0,8	0,2	1,0	99,0
24 g	2,00	0,50	1,0	0,4	1,4	98,6
48 g	0,35	0,35	0,8	0,8	1,6	98,4
72 g	0,26	1,78	0,9	2,1	3,0	97,0
5 d	0,00	1,50	1,8	3,5	5,3	94,7
11 d	4,25	9,67	6,0	7,6	13,6	86,4
16 d	7,17	3,80	13,6	11,6	25,2	74,8
22 d	26,94	26,95	21,3	16,8	38,1	61,9
1 m	38,79	17,85	23,2	25,0	48,2	51,8
1 1/2 m	14,65	17,59	16,9	34,5	51,4	48,6
2 m	1,65	78,28	8,9	46,3	55,2	44,8
3 m	3,08	38,34	4,3	50,3	54,6	45,4
3 1/2 m	1,16	51,91	4,0	53,2	57,2	42,8
4 m	9,13	59,59	5,7	48,6	54,3	45,7
5 m	6,73	48,77	6,0	41,1	47,1	52,9
6 m	4,82	18,86	5,2	28,7	33,9	66,1
7 m	5,00	15,00	3,5	18,4	21,9	78,1
8 m	0,00	14,25	1,7	12,2	13,9	86,1
9 1/2 m	0,00	5,42	0,6	8,3	8,9	91,1
10 m	0,25	7,50	0,1	5,3	5,4	94,6

g — godziny
d — dni
m — miesiące

Stadia *ML1* i *ML2* zostały połączone, gdyż mają one wiele cech wspólnych. Cytoplazma *KL* jest jeszcze słabo zróżnicowana, nie można więc dostrzec wyodrębnionej cytoplazmy przyjądrowej. Obecność tej ostatniej w dwóch następnych stadiach rozwojowych *KL*, tj w komórkach określonych jako *ML2b* i *ML2c* jest znowu cechą łączącą oba te stadia

Z kolumny 4 tab. 4 można odczytać stopniowy wzrost procentowego udziału najmłodszych form *ML1* i *ML2* aż do jednego miesiąca po amputacji. W tym samym czasie procentowy udział nieco starszych form, tj. *ML2b* i *ML2c*, nie osiągnął jeszcze swojego maksimum. Pojawia się dopiero po 3 1/2 miesiącach po amputacji.

Jednak rozpatrując kolumnę 3 tej tabeli widzimy, że wysoki procent *ML2b* i *ML2c* występuje już po 2 miesiącach (78,2%), a więc cały ten okres od 2—3½ miesięcy należy traktować jako czas występowania największego procentu dla tych form *KL*.

W późniejszych okresach regeneracji procent młodych *KL* szybko się zmniejsza (kol. 6, tab. 4). Odwrotnie zachowuje się procentowy udział *DL*, początkowo jest on bardzo wysoki, następnie w okresie od 2 i 3½ miesięcy osiąga minimum (por. tab. 2, kol. 6 oraz tab. 4, kol. 7, a następnie wzrasta, zbliżając się po 10 miesiącach regeneracji do stanu wyjściowego. Zmiany te ilustruje załączony wykres (ryc. 10).

Przedstawione na tym wykresie główne tendencje zmian nie muszą ściśle pokrywać się co do czasu i wartości ze zmianami rzeczywistymi, gdyż dotyczą wartości rzędnych dla krzywych wyrównawczych.

b) Komórki Leydiga w regeneracji ogona

W czasie regeneracji amputowanego ogona zaobserwowano występowanie różnych form *KL*, opisanych bliżej w przypadku regeneracji kończyn. Można więc wyróżnić tu cztery kolejne stadia rozwojowe *ML*, tj. *ML1*, *ML2a*, *ML2b*, *ML2c* oraz stadium *DL*.

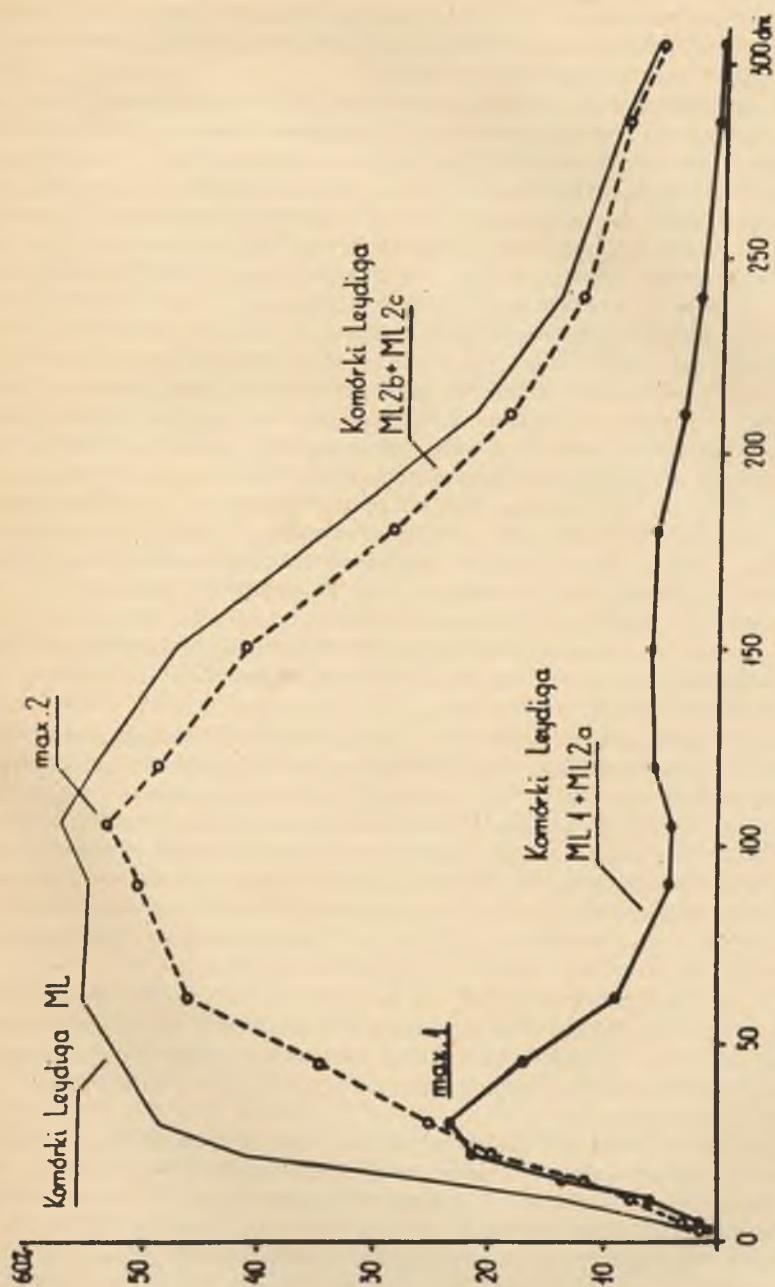
Regeneracja ogona u aksolotli jest procesem analogicznym do odtwarzania się amputowanych kończyn. Podobnie jak w przypadku regenerujących kończyn, tworzenie się blastemy regeneracyjnej ogona jest poprzedzone nagromadzeniem dużej liczby komórek nabłonkowych na powierzchni amputacji. Tworzy się więc charakterystyczny czop komórkowy.

Zachowanie się *KL* w pierwszych okresach regeneracji, tj. podczas pokrywania powierzchni rany nabłonkiem i podczas stopniowego formowania czopa nabłonkowego przypomina dość dokładnie zachowanie się tych komórek w regeneracji kończyny. Dojrzałe *KL* spłaszczają się i wydłużają wędrując razem z nabłonkiem na powierzchnię rany, gdzie gromadzą się stopniowo w miarę tworzenia wielowarstwowego czopa nabłonkowego.

Porównując układ *KL* w nabłonku pokrywającym powierzchnię rany 1—2 dni po amputacji ogona i kończyny, można zauważyć, że rozmieszczenie *KL* w nabłonku na powierzchni amputacji ogona jest mniej regularne. Po kilku dniach w kikucie amputowanego narządu *KL* wykazują zmiany kształtu, przy czym obszar tych zmian rozciąga się dalej w kierunku proksymalnym niż to obserwujemy w amputowanej kończynie. Naskórek kikuta ogona na brzegu rany staje się cieńszy, a *KL* ulegają spłaszczeniu. Jest to strefa migracji zarówno komórek nabłonkowych, jak i *KL* wędrujących ku ranie.

Liczba *KL* na preparatach histologicznych z regeneratów ogonów nie była dokładnie oznaczona, ale udało się zauważyć, że i w tym przypadku występują zmiany w procentowym składzie różnych form *KL*, bardzo podobne do zmian opisanych przy regeneracji kończyn. Regeneracja ogona odbywa się nieco szybciej niż odrastanie kończyn, jednak największa liczba najmłodszych form *KL* i w tym przypadku występuje dopiero po 7 tygodniach. Prawdopodobnie więc szybkość różnicowania się *KL* nie jest uzależniona od szybkości wzrostu regeneratu, tak że w szybko rosnącym regeneracie ogona różnicowanie *KL* odbywa się z taką samą szybkością jak i w regeneracie kończyny.

W późniejszych okresach regeneracji ogona procentowy udział *ML* szybko zmniejsza się, a po 10 miesiącach *DL* przeważają, tak jak w regenerującej kończynie z tego samego okresu po amputacji.



Ryc. 10. Krzywe wyrównawcze przedstawiające główne tendencje zmian procentowego składu KL w czasie re-generacji kończyny. Procent form młodych KL wzrasta stopniowo aż do osiągnięcia maksimum około 3 1/2 mie-sięcy po amputacji (krzywa dla komórek ML). Maksimum dla najmłodszych form (ML1 i ML2a) pojawia się wcześ-niej niż maksimum (2) dla form nieco starszych (ML2b i ML2c)

Omówienie wyników

Przedstawione zachowanie się *KL* w przebiegu regeneracji kończyn i ogona aksolotli oraz zmiany procentowego składu tych komórek w nabłonku regeneratów opisanych narządów nasuwają szereg problemów.

Pierwszym zagadnieniem jest sprawa pochodzenia *KL* w ontogenezie i regeneracji. Wiemy, że komórki Leydiga tworzą się z komórek nabłonka, który ma nieco inne właściwości i budowę u zarodka lub bardzo młodej larwy i w regeneracji kończyny paromiesięcznego aksolotla. Nabłonek takiego regeneratu z reguły jest wielowarstwowy, chociaż we wczesnym okresie regeneracji składa się z dwóch warstw, tak jak i nabłonek zarodkowy. Jednak zawsze jest on zbudowany z komórek pochodzących ze zróżnicowanego, wielowarstwowego naskórka kończyny (Godlewski 1928, Kołodziejski 1928, Poleżajew i Faworina 1935, Needhan 1952). Komórki nabłonkowe nasuwają się na powierzchnię rany, przy czym ich migracja rozpoczyna się w krótkim czasie po amputacji (Godlewski 1928, Chalkley 1954, 1959). Jak wykazano w tej pracy, już po kilku godzinach wśród wędrujących komórek nabłonkowych występują *KL*. Te wędrujące *KL* — to formy stare, wypełnione dużą ilością ziaren wydzieliny. Jeżeli jednak w naskórku kikuta amputowanego narządu znajduje się pewna niewielka ilość form młodych, to przedostają się one również na teren regeneratu. Układ i kształt *KL* wyraźnie wykazuje kierunek ich przemieszczania się. Liczba *KL* w nabłonku regeneratu stale wzrasta, ale pojedyncze podziały mitotyczne nielicznych młodych form tych komórek, które obserwowałam, już po 12 godzinach zdają się nie odgrywać większej roli. Zgodnie bowiem z obserwacjami Hadorna i Chena (1953) mitozy są rzadkie, natomiast ilość gromadzących się *KL* jest znaczna. Wspomniana migracja jest więc głównym mechanizmem odpowiedzialnym za wytworzenie zespołu *KL* w młodym regeneracie.

Wydaje się także, że przynajmniej w znacznej liczbie przypadków mechanizm mitozy obejmuje tylko jądro *KL*. Silnie zróżnicowana cytoplazma tych komórek, a zwłaszcza jej część obwodowa (tj. spongioplazma, wypełniona bardzo dużą ilością ziaren wydzieliny, nie bierze udziału w podziale. W ten sposób powstają dwujądrowe formy *KL*, które można bardzo często obserwować. Obecność mniej licznych wielojądrowych (aż do 5 jąder w jednej komórce) dojrzałych *KL* wskazuje na możliwość dokonania się nawet paru podziałów jądra. Tworzenie się dwu- lub wielojądrowych *KL* w wyniku podziałów mitotycznych jeszcze bardziej ogranicza znaczenie tego sposobu pomnażania liczby *KL* dla regeneracji.

Hadorn i Chen stwierdzili, że dojrzałe *KL*, które nawędrowały razem z nabłonkiem na teren ubytku w skórze, wytwarzają ostateczny zespół tych komórek. Natomiast w moich oświadczeniach dłużej prowadzone obserwacje wykazują, że pochodzenie tego zespołu *KL*, tworzącego się w późniejszych okresach regeneracji kończyny aksolotla, jest inne.

Zauważyłam, że dojrzałe *KL*, które przedostały się do regeneratu, wydalały ziarna wydzieliny, zmniejszają się i degenerują. Jednocześnie pojawiają się coraz liczniejsze młode formy *KL*. Należy zaznaczyć, że nie udało mi się zaobserwować obrazów świadczących o przekształcaniu się *DL* w formy młode. Opisane w tej pracy obserwacje nie popierają więc poglądu o możliwości odróżnicowania dojrzałych *KL*, co postulowali autorzy starszych prac, przyjmując możliwość przekształcania się *KL* w komórki nabłonkowe (Pfitzner 1880, Paulicki 1885, Fischel 1915, Dennert cyt. Theis 1932, Opacki 1927). Możliwość przemiany *KL* w inny rodzaj komórek podczas metamorfozy z nowszych autorów sygnali-

zuje Andrew (1959): „It is interesting that the Leydig cells in most cases completely vanish at the time of metamorphosis, either by degeneration or transformation into other cell types”. Oczywiście brak podobnego przekształcania się *KL* w regenerującej kończynie nie wyklucza możliwości przemian tych komórek w innych warunkach.

Wydaje się więc prawdopodobne, że *KL*, które nawędrowały wraz z nabłonkiem na teren regeneratu, nie są materiałem wyjściowym dla wytworzenia dostatecznego ich zespołu. Taki ostateczny zespół *KL* występujący w nabłonku regeneratu po kilku miesiącach cechuje się bardzo dużą liczbą tych komórek. Gdyby miały one pochodzić z nielicznych *KL*, które nawędrowały w początkowym okresie, to oczywiście ich pojawienie się musiałoby poprzedzić okres intensywnych podziałów. Takich licznych dzielących się *KL* nie udało się zaobserwować. Można by wprowadzić dodatkowo przyjąć, że przed podziałami dojrzałe *KL* przebyły proces odróżnicowania, tak że dzielią się komórki do nich już nie podobne i nie dające się odróżnić od komórek nabłonka. Jak już jednak wspomniałam, przegląd preparatów nie dostarczył spostrzeżeń przemawiających za zdolnością dojrzałych *KL* do odróżnicowania się.

Ostatecznie więc trzeba przyjąć, że bardzo liczne *KL* występujące w starszych regeneratach nie powstały ani przez podziały pierwotnych *DL* ani też przez ich odróżnicowanie i następcze podziały. W regeneracji zasadniczą rolę odgrywa różnicowanie się *KL* z komórek nabłonkowych, podobnie jak to ustaliła dla rozwoju ontogenetycznego Gajewska (1933).

Przedstawione w wynikach dane liczbowe i ich analiza mogą posłużyć nie tylko do wykazania różnicowania się *KL* z komórek nabłonkowych regeneratu, ale mogą także pośrednio określić szybkość tego procesu.

Znaczna ilość form młodych występuje od 11 dnia po amputacji kończyny. Procent *ML1* i *ML2a* wzrasta, osiągając swoje maksimum, tj. 38,8% ogólnej ilości *KL*, około jednego miesiąca po amputacji. Następnie odsetek tych form zmniejsza się, spadając po dwóch miesiącach regeneracji do niskich wartości. Natomiast właśnie wówczas występuje po raz pierwszy bardzo duży procent form nieco starszych, tj. *ML3* i *ML4* (tab. 4. kol. 3). Wydaje się, że okres czasu, który upływa od wystąpienia maksimum dla form najmłodszych *ML1* i *ML2* do wystąpienia maksimum dla pozostałych młodych form *ML3* i *ML4* można uważać za większą część okresu różnicowania się *KL*. W tym czasie duża liczba form młodych różnicuje się, dając po upływie dalszych 30 dni owe 78,3% form starszych (*ML3* i *ML4*). Jeżeli rozumowanie to jest słuszne, to można przyjąć, że w tym czasie w młodych *KL* występują takie zmiany, jak: silny wzrost masy cytoplazmatycznej, zwiększenie się ilości zmagazynowanej wydzieliny, powstawanie spogiolplazmy i cytoplazmy przyjądrowej oraz wykształcenie się kraty Langerhansa.

Cały okres różnicowania się *KL* jest oczywiście dłuższy od owych 30 dni i obejmuje także pierwsze zmiany w komórce nabłonkowej, które prowadzą do postaci określonej jako stadium *ML1*. Trudno jest wskazać, jak długi jest czas potrzebny do wykształcenia tego najmłodszego, wyróżnionego przez mnie stadium *KL*. Pierwsze wyraźne zwiększenie się ilości *ML1* zaobserwowałam po 11 dniach regeneracji kończyny (tab. 2). można więc przypuszczać, że przekształcanie się komórki nabłonkowej w *ML1* wynosi około 11 dni. Dodając te 11 dni do poprzednio wyznaczonych 30 dni, otrzymujemy dla całego okresu różnicowania co najmniej 41 dni.

Różnicowanie się *KL* w ontogenezie prawdopodobnie zachodzi w czasie krótszym niż owe 41 dni. Opacki (1927) i Theis (1932) u *Salamandra salamandra*,

a Gersch (1942) u aksolotla stwierdzili, że *KL* tworzą się przed zakończeniem embriogenezy, chociaż ich różnicowanie odbywa się jeszcze u młodej larwy. Według Brunsta (1955) *KL* wykształcają się po paru lub nawet po kilkunastu dniach życia larwy.

Natomiast rozmiary komórek nabłonkowych różnicujących się w kierunku *KL* są większe w regeneracie kończyny niż w kończynie rozwijającej się u zarodka. W nabłonku regeneratu komórki są bowiem znacznie większe, co zarazem umożliwia bardzo dokładne badanie zróżnicowań cytoplazmatycznych. Dzięki temu udało się bardzo wyraźnie wykazać obecność pojedynczych ziaren wydzieliny leżących wewnątrz wakuol w cytoplazmie przyjądrowej. Właśnie w tej specjalnej cytoplazmie występuje dobrze rozwinięte retikulum endoplazmatyczne widoczne na elektronogramach (Hay 1961). Widoczny na ryc. 6 obraz świadczy więc o produkowaniu ziaren wydzieliny w cytoplazmie przyjądrowej, a magazynowaniu ich w spongioplazmie, pozbawionej retikulum endoplazmatycznego.

Jeżeli pomimo dużych wymiarów *KL* nie udało się dostrzec w regeneracji cech ich odróżnicowania, to można przyjąć, że przynajmniej pod względem morfologicznym komórki te odróżnicowaniu rzeczywiście nie podlegały. Jednocześnie jednak wiemy, że komórki nabłonkowe, które pokryły zranione tkanki kończyny, wykazują odróżnicowanie opisane u aksolotla przez Godlewskiego (1928). Zmiany histochemiczne towarzyszące odróżnicowaniu komórek nabłonkowych badali w regeneracji Orechowitsch i Bromley (1935) i wielu innych (Niweliński 1959, Barakina 1951, Jakowlewa 1952). Prawdopodobnie dopiero po takim odróżnicowaniu komórki nabłonkowe mogą wtórnie różnicować się, dając między innymi *KL*.

W ontogenezie aksolotla wyróżniamy dwa sposoby różnicowania się *KL*: 1) różnicowanie w dwuwarstwowym nabłonku młodziutkiej larwy, 2) różnicowanie w nabłonku wielowarstwowym larwy wyrosniętej (Gersch 1942). Ten drugi sposób różnicowania charakteryzuje się według Gerscha wystąpieniem kraty Langerhansa przed pojawieniem się cytoplazmy przyjądrowej i ziaren wydzieliny. Badając powstanie *KL* w wielowarstwowym nabłonku regenerującej kończyny nigdy nie zaobserwowałem, aby tworzenie się kraty Langerhansa poprzedzało produkcję ziaren wydzieliny. Z drugiej strony różnicowanie *KL* w tych przypadkach odpowiadało przebiegowi tego procesu u bardzo młodych larw. Natomiast opisane przez Gersch (1942) występowanie kraty Langerhansa w pozornie młodych, małych komórkach można tłumaczyć pomyleniem takich form ze starymi *KL* opróżnionymi z wydzieliny, które rozpoczynają jej powtórna produkcję.

Przynajmniej różnicowania *KL* według schematu właściwego bardzo młodej larwie można upatrywać w odzyskaniu rozwojowych właściwości przez komórki nabłonkowe regeneratu. Odróżnicowanie tych komórek oznaczałoby więc ich prawdziwe odmłodzenie, związane z nabyciem takich możliwości rozwojowych, które charakteryzują komórki zarodka.

Obok opisanego podobieństwa dotyczącego różnicowania się *KL* w regeneracji i we wczesnej ontogenezie zaobserwowałam także wyraźne różnice. W ontogenezie różnicowanie się *KL* dotyczy wczesnych stadiów rozwojowych, w których komórki nabłonka zawierają ziarenka czarnego pigmentu, bądź to stanowiącego resztę pierwotnego pigmentu cytoplazmy komórki jajowej, bądź też produkowanego przez komórki zarodka.

Obok opisanego podobieństwa dotyczącego różnicowania się *KL* w regeneracji i we wczesnej ontogenezie zaobserwowałam także wyraźne różnice. W ontogenezie różnicowanie się *KL* dotyczy wczesnych stadiów rozwojowych, w których komórki

nabłonka zawierają ziarenka czarnego pigmentu, bądź to stanowiącego resztę pierwotnego pigmentu cytoplazmy komórki jajowej, bądź też produkowanego przez komórki zarodka.

Natomiast w regeneracji komórki Leydiga mogą powstawać z komórek nabłonkowych zupełnie nie zawierających pigmentu. Udało się to stwierdzić śledząc różnicowanie *KL* w nabłonku regenerujących kończyn białych aksolotli, u których komórki nabłonkowe bardzo rzadko mają ziarenka melaniny. W tym wypadku *KL* powstały z komórek nabłonkowych zupełnie pozbawionych pigmentu, które w żadnej fazie różnicowania nie wytworzyły tej substancji. Jeżeli więc w regeneratach kończyn czarnych aksolotli młode *KL* zawierają w cytoplazmie ziarenka pigmentu, to fakt ten możemy uznać za zjawisko nie związane z samym mechanizmem swoistego różnicowania się *KL*. Odnosząc te spostrzeżenia do rozwoju *KL* w ontogenezie, można sądzić, że i wówczas ciemny pigment nie jest przyczynowo związany z różnicowaniem się *KL*, lecz jest niezależnym wytworem cytoplazmy licznych komórek nabłonkowych w tym okresie rozwoju zarodka lub bardzo młodej larwy. Wiadomo, że takie młode larwy aksolotla są dość silnie pigmentowane, nawet u zwierząt należących do rasy białej.

Śledząc występowanie ziarenek pigmentu w początkowych fazach różnicowania się *KL* w regeneratach kończyn czarnych aksolotli, stwierdziłam, że pigment ten bardzo szybko zanika. Zaobserwowała to także Gersch (1942), badając początek różnicowania się *KL* we wczesnym okresie życia larwy. Być może więc, że różnicowanie *KL* blokuje zarazem dalszą syntezę pigmentu i jednocześnie powoduje szybki zanik poprzednio wytworzonych ziarenek tej substancji.

Reasumując powyższe omówienie wyników badań można stwierdzić, że udało się ustalić przebieg i przybliżoną szybkość różnicowania się *KL*. Jakkolwiek brak ścisłych danych, wydaje się, że szybkość ta nie jest zależna od tempa wzrostu regeneratu. Dlatego w szybko odrastającym ogonie największa liczba młodych *KL* pojawia się w tym samym czasie, w jakim zjawisko to występuje w przypadku bardziej powolnej regeneracji kończyny.

Szybkość różnicowania się *KL* w regeneracji jest mniejsza niż we wczesnym okresie ontogenezy, można więc przypuszczać, że zależy ona od stanu komórek nabłonkowych, gdyż jak wiemy, komórki te posiadają niecc inną budowę i właściwości we wczesnych i późnych okresach życia.

Wnioski

1. Wyróżniono 5 stadiów różnicowania się komórek Leydiga w regeneracji kończyn i ogonów aksolotli. *ML1*, *ML2a*, *ML2b*, i *ML2c* — to różne stadia form niecałkowicie dojrzałych, *DL* — to formy dojrzałe.

2. Pierwsze *KL* migrują do regeneratu wraz z nabłonkiem. Komórki te w większości degenerują około 11—16 dni po amputacji kończyny. Jednocześnie liczne nowe *KL* różnicują się z komórek nabłoka regeneratu, wytwarzając w ten sposób ostateczny zespół tych komórek.

3. W regeneracji, podobnie jak we wczesnej ontogenezie, *KL* powstają głównie na drodze różnicowania się komórek nabłonkowych. Jednak niektóre *KL* zawierające już ziarnistości i cytoplazmę przyjądrową mogą dzielić się mitotycznie. Gdy taki podział nie obejmuje cytoplazmy, powstają *KL* dwujądrowe.

4. Występowanie pigmentu w cytoplazmie młodych form *KL* nie jest zjawiskiem charakterystycznym dla ich swoistego różnicowania się, które może przebiegać niezależnie od obecności pigmentu w komórce nabłonkowej. Natomiast już początkowa faza różnicowania *KL* hamuje dalszą syntezę pigmentu.

5. Widoczne wewnątrz cytoplazmy przyjądrowej (juxtannuclear cytoplasm) ziarna wydzieliny świadczą o jej tworzeniu się w tej części komórki, gdyż właśnie tam jest dobrze rozwinięte retikulum endoplazmatyczne (Hay 1961).

LITERATURA

1. Andrew W. 1959. *Textbook of Comparative Histology*. Oxford Univ. Press, New York, 114.
2. Barakina N.F. 1951. Raspriedielenije ribonukleinowej kisloty pri riegienieraczi koniecznosti u aksolotla. Dokl. Akad. Nauk SSSR, 79.
3. Barakina N.F. 1951. Raspriedielenije ribonukleinowej kisloty pri riegienieraczi nastupajuszczej posle amputaczi koniecznosti u bieschwostrych amfibij. Dokl. Akad. Nauk SSSR, 81, 293.
4. Brunst VV. 1955. *The axolotl (Siredon mexicanum) Laboratory Investigation*, 437.
5. Brunst VV. 1961. Some problems of Regenerations. Quar. Rev. Biol., 36, 178.
6. Carriere J. 1885. Postembryonale Entwicklung der Epidermis des Siredon pisciformis. Arch. mikr. Anat. 24, 19.
7. Chalkley D.T. 1954. A quantitative histological analysis of forelimb regeneration in *Triturus viridescens* J. Morph. 94, 21.
8. Chalkley D. T. 1959. *The cellular basis of limb regeneration W: Regeneration i Vertebrates*. Wyd. Ch. S. Thornton, Univ. Chicago Press. 34.
9. Eggeling H. 1931. *Hautdrusen. W: Bolk L. Goppert E. Handbuch der Vergleichenden Anatomie der Wirbeltiere*. 1, 641.
10. Fischel A. 1915. Über rückläufige Entwicklung. Arch. Entw. Mech., 42, 1.
11. Gajewska H. 1933. Architektonika skóry aksolotla — Über die Architektonik der Haut des Axolotls. Bull. Int. d. Acad. Pol. d. SC. et Let., S. B. 2, 141.
12. Gersch H. 1942. Aufbau und Differenzierung des Integuments vom Axolotl auf Grund einer vergleichenden Untersuchung mit vitalen und histologischen Farbenmethoden. Z. mikr.-anat. Forsch., 51, 513.
13. Godlewski E. 1928. Untersuchungen über Auslösung und Hemmung der Regeneration beim Aksolotl. Arch. Entw.-Mech., 114, 108.
14. Hadorn E., Chen P.S. 1953. Beobachtungen über die Wanderung der Leydigischen von Triton alpestris. Roux. Archiv., 146, 513.
15. Hay D. 1961. Fine structure of an unusual intracellular supporting network in the Leydig cells of Amblystoma epidermis. Biophys. Biochem. 10, 457.
16. Jakowlewa T.M. 1952. Citochemičeskie priznaki riegienieraczi kletki Dokl. Akad. Nauk SSSR, 83, 469.
17. Komala Z. 1957. Porównawcze badania nad przebiegiem ontogenezy i regeneracji kończyn kijanek *Xenopus laevis* w różnych okresach rozwojowych. Fol. Biol., 5, 1.
18. Ko'odziejski Z. 1928. Untersuchungen über die Beteiligung der transplantierten Haut an der Regeneration. Bull. Int. d. l'Acad. Sc. Cracovie, 2, 1.
19. Korschelt E. 1927. *Regeneration und Transplantation*, Regeneration. Borntraeger, Berlin.
20. Leydig F. 1853. Anatomisch-histologische Untersuchungen über Fische und Reptilien, Berlin.
21. Needham A.E. 1952. *Regeneration and Wound-Healing*. Wyd. Methuen Co, London.
22. Niweliński J. 1959. An enzymologic study of the newt *Triturus vulgaris* L, Fol. Biol., 8, 1.
23. Opacki J. 1927. Rozwój skóry larwalnej płazów ogoniastych normalnych i przy zmienionych warunkach otoczenia. Rozpr. biol. z zakresu medycyny weterynaryjnej rolnictwa i hodowli 5, 46.
24. Orechowitsch W.N., Bromley N.W., Koźmin N. 1935. Über die Proteolyse in regenerierenden Geweben. III. Die Veränderung der Aktivität der Gewebeprotease während des Regenerationsprozesses der Organe von Amphibien. Biochem., 277, 186.
25. Paulicki D. 1885. Über die Haut des Axolotls. Arch. Mikr. Anat., 24, 120
26. Pfitzner W. 1880. Die Epidermis der Amphibien. Morph. Jahrg., 6, 46.
27. Poleżajew L.W. Faworina W.N. 1935. Über die Rolle des Epithels in den anfänglichen Entwicklungsstadien einer Regenerationsanlage der Extremität beim Axolotl. Arch. Ent. Mech. 133, 701.
28. Przibram H. 1909. *Regeneration*. T. Deuticke, Leipzig-Wien, 146.

29. Schilder F. A. Schilder M. 1951. Anleitung zu biostatistischen Untersuchungen. N. Niemeyer, Halle (Saale).
30. Seeger P. G. 1933. Untersuchungen an den Leydig'schen Zellen der Urodelenhaut. Z. Zellforsch., 19, 441.
31. Theis A. 1935. Histologische Untersuchungen über die Epidermis im Individualcyclus von *Salamandra maculosa* Laur. Zeitschr. F. wiss. Zool., 140, 335.

Зофья Пельц

КЛЕТКИ ЛЕЙДИГА В РЕГЕНЕРАТАХ КОНЕЧНОСТИ И ХВОСТА АКСОЛОТЛЯ (*Ambystoma mexicanum* Cope)

Содержание

Автор описала миграцию и дальнейшую судьбу клеток Лейдига изучая процесс регенерации задней конечности аксолотля в течение 10 месяцев. Можно выделить 5 стадий развития клеток Лейдига. Констатировано, что большинство клеток Лейдига, которые перебрались в регенерат исчезает, а окончательный их комплекс образуется главным образом путём дифференциации эпителиальных клеток. Доказано, что дифференциация клеток Лейдига не связана с предшествующем производством зёрнышек пигмента в цитоплазме этих клеток. Подтверждаются также наблюдения Герш (1942), которая заметила, что клетки содержащие уже приядерную цитоплазму и зёрнышка выделения могут ещё делиться митотически независимо от очень большой степени дифференциации. Наблюдалось производство зёрнышек выделения в цитоплазме, что согласовано с констатированным уже выступанием *reticulum endoplazmaticum* именно в этой части клетки Лейдига (Хэй 1961).

LEYDIG'S CELLS IN LIMB AND TAIL REGENERATES OF THE AXOLOTL (*Ambystoma mexicanum* Cope)

Summary

A description is given of the migration and further fate of Leydig's cells in studies on the course of regeneration of the hind limb of the axolotl during 10 months. Five developmental stages of Leydig's cells were distinguished. It was found that most of the Leydig's cells penetrating the regenerate disappear, and that the final complex of these cells is mainly formed by the differentiation of epithelial cells. It was shown that the differentiation of Leydig's cells is not connected with the previous production of pigment granules in the cytoplasm of these cells. Gersch's observations (1942) were also confirmed. She considered that cells already possessing juxtannuclear cytoplasm and secretion granules could still undergo mitotic division, in spite of so high a degree of differentiation. The formation of secretion granules in the cytoplasm was observed, which agrees with the finding that *reticulum endoplazmaticum* occurs just in this part of the Leydig cell. (Hay 1961).