

Zofia Pelc

POWSTANIE GRUCZOŁÓW WIELOKOMÓRKOWYCH
W REGENERATACH KOŃCZYNY I OGONA AKSOLOTLA /AMEYSTOMA MEXICANUM COPE/

Wstęp

Budowę i rozwój powłok ciała płazów opisywało wielu autorów. Obszerne omówienie wyników uzyskanych przez dawniejszych autorów znajduje się w pracy Biedermanna /1930/ i Eggelinga /1931/. Dużo jest jednak zagadnień spornych, bądź nie uzgodnionych nawet i w nowszych pracach zajmujących się chemizmem oraz fizjologiczną rolą gruczołów skórnych /Seeger 1933 i Gersch 1942/. Do nie rozstrzygniętych należy zaliczyć występowanie, względnie brak włókien mięśniowych bezpośrednio oplatających gruczoły wielokomórkowe Raymann /1942/ i Le Quang Trong Y /1967/. Nie opisano dotychczas wyczerpująco procesu odnowy tych gruczołów, tj. fizjologicznej regeneracji gruczołów skóry płazów. Tworzenie tych gruczołów poznano w ontogenezie, jednak niemal nic nie wiemy o ich odtwarzaniu się podczas traumatycznej regeneracji skóry. W dostępnej mi literaturze, poza jednym wyjątkiem /Hadorn i Chen, 1953/ nie znalazłem prac poświęconym opisom odtwarzania gruczołów skóry w czasie regeneracji. Jest to tym bardziej zastanawiające, że regeneracja narządów pokrytych skórą była przedmiotem wielkiej liczby prac wykonanych na płazach.

Hadorn i Chen /1953/ badali odtwarzanie się skóry larw traszek. Wycinali oni kawałeczki skóry tułowia różnej wielkości i badali jej regenerację tylko przez osiem dni. Przedmiotem obserwacji tych autorów były wyłącznie losy gruczołów jednokomórkowych.

Wyniki dotyczące procesu odtwarzania się gruczołów skórnych w regenerujących narządach powinny dostarczyć danych, które można by porównać z rozwojem tych gruczołów w ontogenezie. Chociaż badania na temat regeneracji dostarczają wielu przykładów podobieństwa embriogenezy i regeneracji to jednak należy uwzględnić także istnienie pewnych różnic /Brunst 1962/.

Dlatego interesującym będzie zbadanie procesu różnicowania się komórek gruczołowych w nabłonku regeneratu. Nabłonek ten w przeciwieństwie

do nabłonka bardzo młodej larwy, pochodzi ze zróżnicowanych komórek wielowarstwowego naskórka pokrywającego kikut amputowanego narządu.

Materiał i metody

Obiektem moich badań było pięćdziesiąt rocznych aksolotli, pochodzących z laboratoryjnej hodowli Zakładu Zoologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie. Do badań nad powstaniem gruczołów wielokomórkowych w regeneratach tylnej kończyny aksolotla użyto trzydzieści aksolotli, zaś do badań w regeneratach ogona dwadzieścia aksolotli. Wszystkie zwierzęta należały do rasy czarnej.

Tylne kończyny amputowano w połowie podudzia, ogon w $1/3$ długości tego narządu, licząc od końca. Operowane zwierzęta trzymano przez dwie doby w wodzie z dodatkiem penicyliny o stężeniu 20 j.m/ml. Odtwarzanie amputowanych narządów obserwowano przez około 10 miesięcy. Zwierzęta trzymano w wodzie wodociągowej $18 - 20^{\circ}\text{C}$, karmiąc je kawałkami mięsa.

Materiał do badań histologicznych utrwalano w płynie Bouina i w 10% formalinie. Po odwodnieniu w alkoholu następnie sporządzono bloczki parafinowe. Przekroje regeneratów wykonano podłużnie, uzyskując serie skrawków o grubości 6 mikronów. Skrawki barwiono hematoksyliną Delafielda oraz metodą azan. Materiał do sporządzania preparatów pobierano w następujących okresach regeneracji: po 22 dniach, 5, 6, 7 tygodniach, 3, 3 $1/2$, 4, 5, 8 i 10 miesiącach od momentu amputacji. Badania histologiczne dotyczące regeneratów ogona przeprowadzono na materiale utrwalonym po 6 tygodniach, 2, 3, 3 $1/2$, 4 i 9 $1/2$ miesiącach regeneracji. Z każdego okresu utrwalano po 3 do 4 regeneratów.

Odtwarzanie się wielokomórkowych gruczołów skóry w regeneratach tylnej kończyny i regeneratach ogona opisano kolejno dla każdego okresu regeneracji tego narządu.

Tyniki

Powstawanie gruczołów wielokomórkowych w regeneratach kończyny

Regenerat trzytygodniowy

Powstawanie zawiązków gruczołów wielokomórkowych jest anatomicznie związane z błoną podstawową odgraniczającą nabłonek regeneratu od skóry właściwej. Błona podstawowa pozbawiona komórek zbudowana jest z włókien

tkanki łącznej. Występowanie tej błony obserwuje się pod nabłonkiem 22-dniowego regeneratu. W tym okresie jest ona w regeneracie jeszcze cieńsza niż w reszcie kończyny, ale jej barwliwość jest niemal taka sama jak w skórze kikuta. Jaskrawo niebieskie zabarwienie metodą azan świadczy o udziale w niej włókien klejodajnych. W tym okresie na jej poprzecznym przekroju nie można jeszcze dostrzec choćby pojedynczych włókienek, które odchodziłyby od niej w głąb tkanki podnabłonkowej. Również nie pojawiają się jakiegokolwiek zawiązki gruczołów wielokomórkowych.

R e g e n e r a t j e d n o m i e s i ę c z n y

W regeneracie jednomiesięcznym pod nabłonkiem obserwuje się pewne zmiany. W części proksymalnej grubość błony podstawowej jest znacznie większa niż w okresie poprzednim, i nie różni się od grubości tej błony w kikucie. W części dystalnej błona podstawowa staje się coraz cieńsza. W wierzchołkowej części regeneratu błona podstawowa tworzy bardzo cienką warstwę, która jednak stanowi wyraźną granicę pomiędzy nabłonkiem i tkanką podnabłonkową.

U podstawy regeneratu pod błoną tworzy się delikatna siateczka włókienek tkanki łącznej. W jej oczkach leżą liczne komórki tej tkanki. Ich ułożenie jest przeważnie równoległe do błony podstawowej. Jest to początek tworzenia się skóry właściwej. U czarnych aksolotli w owej siateczce łącznotkankowej występują początkowo nieliczne melanofory. Cała ta tkanka podnabłonkowa jest jeszcze bardzo słabo rozwinięta w dystalnej części regeneratu, a w okolicy jego wierzchołka brak jej zupełnie. Zawiązków gruczołów nadal brak, nawet w proksymalnej części regeneratu, gdzie tworzy się już skóra właściwa.

R e g e n e r a t p i ę c i o t y g o d n i o w y

W regeneracie pięcioletniowym dostrzega się po raz pierwszy zawiązki gruczołów wielokomórkowych. Występują one między komórkami nabłonka przy błonie podstawowej, w proksymalnej części regeneratu. Zawiązki te nie mają jeszcze własnej otoczki włóknistej i składają się z wielu koncentrycznie ułożonych komórek, z których nieliczne widać na przekroju poprzecznym. Układ komórek o dużych jądrach wyodrębnia takie skupienia wśród komórek nabłonkowych /ryc. 1/.

R e g e n e r a t p ó ł t o r a m i e s i ę c z n y

W regeneracie sześciotygodniowym skóra właściwa występuje w części proksymalnej regeneratu na odcinku nieco dłuższym niż w regeneracie pię-

ciotygodniowym. Związki gruczołów wielokomórkowych w proksymalnej części regeneratu są nadal nieliczne. Są one jednak większe od związków w regeneracie pięcioletniowym, a ponadto niektóre z nich posiadają już własną otoczkę i częściowo wgłębiają się w błonę podstawową, do której przylegają. Tworzy się ona w ten sposób, że od błony podstawowej oddzielają się pojedyncze włókienka, które wnikają pomiędzy komórki nabłonka otaczając zawiązek gruczołu. W pojedynczym regeneracie można zaobserwować różne stadia tego procesu /ryc. 2/. Wszystkie te zawiązki nadal pozostają nie zróżnicowane.

Regenerat siedmioletniowy

Znaczne różnice w budowie warstwy subepitelialnej występują dopiero w regeneracie siedmioletniowym. W części proksymalnej regeneratu powstająca skóra jest około dziesięć razy cieńsza od skóry właściwej w reszcie ogona. W części dystalnej błona podstawowa i cienka w tej okolicy warstwa zbita skóry właściwej występują bezpośrednio obok siebie. Występowanie niezróżnicowanych związków gruczołów wielokomórkowych ogranicza się w tym okresie tylko do nabłonka, gdzie są one większe niż poprzednio. Barwliwość tych komórek odpowiada barwliwości komórek nabłonka.

Inne zawiązki gruczołów częściowo tkwią w nabłonku, a częściowo w corium. Jeszcze inne leżą całkowicie w skórze właściwej. Dwie ostatnie formy związków wykazują już wyraźne różnicowanie. Zawiązki gruczołowe leżące pomiędzy warstwami włókien błony podstawowej najczęściej wyglądają inaczej niż zawiązki znajdujące się jeszcze w nabłonku. Ta odmienna budowa głębiej leżących związków odnosi się także do samych komórek gruczołowych. Jedne z nich podobne są do komórek nabłonka. Inne są nieco większe, mają jaśniejszą cytoplazmę i duże jądra. Ich plazma może zawierać nieliczne niebiesko barwiące się ziarenka wydzieliny. W jednym zawiązku gruczołu można znaleźć kilka takich dużych komórek. Niekiedy tylko jedna wyróżnia się większymi rozmiarami i dużym jądrem. Tutaj więc po raz pierwszy można mówić o różnicującym się gruczole jadowym. Na przekroju takiego gruczołu można zauważyć, że te komórki, które podobne są do nabłonkowych mają tu układ jakby promienisty. Ich plazma w części przylegającej do miejsca, gdzie tworzy się światło gruczołu czasem zawiera ziarnistości o niebieskim zabarwieniu. W innych zawiązkach gruczołów taki promienisty układ mniejszych komórek nie występuje. Bywają zawiązki, w których występują komórki jeszcze bez ziarenek wydzieliny, ale odróżniające się już od innych większymi jądrami. Wszystkie te młode jadowe gruczoły składają się z kilkunastu komórek, a niektóre z nich posiadają małe światło. W obrębie błony podstawowej zdarzają się niekiedy zawiązki niezróżnicowane, podobne do związków leżących w naskórku regeneratu.

Jak już wspomniano, zawiązki gruczołów leżące w naskórku są jeszcze

niezróżnicowane. Różnicowanie zaczyna się dopiero wówczas, gdy przemieszczają się one w kierunku tworzącej się warstwy skóry właściwej. Oprócz opisanych młodych gruczołów ziarnistych można tu wyróżnić gruczoły o charakterze śluzowym. W tym okresie regeneracji są one jeszcze małe, lecz układ komórek i brak charakterystycznej dla gruczołów ziarnistych wydzieliny pozwalają na ich rozpoznanie. Komórki takich młodych gruczołów śluzowych układają się dookoła tworzącego się w nich światła. Brak tu także jakichś większych komórek, tak charakterystycznych dla różnicujących się gruczołów ziarnistych. W zawiązkach gruczołów śluzowych wszystkie jądra komórek są podobnej wielkości. Leżą one raczej u podstawy, układając się w ten sposób na obwodzie gruczołu, ale nie przylegają ściśle do jego otoczki. Tuż przy owej włóknistej otoczce można zaobserwować wydłużone mniejsze jądra komórek otaczających nabłonek gruczołowy. W części zwróconej do nabłonka regeneratu występują skupienia komórek o jądrach nie różniących się zasadniczo od jąder komórek nabłonkowych. Niekiedy jednak ich jądra są nieco spłaszczone. W tym okresie regeneracji wszystkie komórki nabłonka wydzielniczego są najczęściej jednakowe. Ich plazma jest jasna i widać w niej delikatne, bładoniebieskie ziarenka. Ta wydzielina jest także widoczna na powierzchni komórki zwróconej do światła gruczołu i w samym jego świetle.

Oprócz wyżej opisanych zawiązków w różnych stadiach różnicowania dostrzega się już w tym okresie regeneracji młode, całkowicie zróżnicowane gruczoły, a mianowicie śluzowe i jadcwe /typ ziarnisty/. Młode gruczoły ziarniste występujące w warstwie skóry właściwej są często dość podobne do zawiązków umiejscowionych wśród włókien błony podstawowej. Obok tych form występują tu również i późniejsze stadia rozwojowe cechujące się większymi rozmiarami. Na przekroju poprzecznym można wówczas zauważyć, że jedna, dwie lub trzy komórki gruczołowe są znacznie większe od pozostałych. Mają też one jaśniejszą plazmę i duże jądra z bardzo wyraźnym zrebem chromatynowym, zabarwionym metocą azan na intensywnie czerwony kolor. Plazma tych dużych komórek zawiera niebiesko barwiące się ziarenka wydzieliny i duże okrągłe wakuole. Granice między nimi są wyraźne. Jeżeli na przekroju takiego gruczołu widoczna jest tylko jedna duża komórka, to zajmuje najczęściej połowę jego powierzchni. Pozostałe komórki w takim przypadku zepchnięte są na drugi biegun i tworzą tam nieregularne skupienie. Wśród nich można zaobserwować dość liczne figury podziałowe. Takie młode gruczoły są więc podobne do zawiązków występujących wśród warstw błony podstawowej, lecz mają zazwyczaj kilka znacznie większych komórek o daleko silniejszym zróżnicowaniu cytoplazmy. Z tych młodych gruczołów wykształcają się w nieco późniejszym okresie regeneracji wielkie gruczoły jadowe typu ziarnistego.

Gruczoły ziarniste leżą niekiedy w tworzącej się skorze właściwej. W takim miejscu, w którym leżą one w młodej skórze, błona podstawowa i warstwa zbite są rozsunięte, a grubość skóry właściwej równa się niemal wysokości tych gruczołów. Młode gruczoły zajmują więc całą grubość skóry właściwej i często powodują nawet wpuklenia jej warstwy zbitej do tkanki podskórnej.

R e g e n e r a t t r z y m i e s i ę c z n y

W warstwie skóry właściwej trzymiesięcznego regeneratu oprócz różnych zawiązków gruczołów obserwuje się także gruczoły już wykształcone /ryc. 3a, b/. Młode gruczoły śluzowe w tym regeneracie zajmują całą grubość skóry właściwej. Gruczoł śluzowy otoczony jest od zewnątrz błoną łącznotkankową. Do tej błony przylegają tu i ćwdzie melanofory i komórki o wydłużonych wyraźnych jądrach i znikomej ilości cytoplazmy. W wielu miejscach można przyrównać do komórek mięśni gładkich. Niektóre gruczoły śluzowe są połączone z naskórkiem na wąskiej przestrzeni odpowiadającej mniej więcej kilku komórkom tworzącym jakby szyjkę tego gruczołu, łączącą go z naskórkiem regeneratu. Są one nieco spłaszczone i różnej wielkości. W okolicy dna gruczołu są wyższe, zaś komórki leżące po bokach są mniejsze. Jedne i drugie mają jądra u podstawy. Jądra komórek znajdujących się w bocznych ścianach gruczołu są mniejsze od jąder komórek nabłonka. Mają charakter jąder pęcherzykowatych z wyraźnym zrębem chromatynowym. Komórki dna gruczołu mają odmienny wygląd. Cytoplazma tych komórek przypomina delikatną siateczkę. Po zabarwieniu hematoksyliną Delafielda cytoplazma jest bladoniebieska. Ich jądra są silnie spłaszczone i leżą tuż przy zewnętrznej błonie gruczołu. Są zbite i wykazują silną barwliwość.

W tym okresie obok młodych gruczołów śluzowych występują już dobrze rozwinięte gruczoły jadowe /typ ziarnisty/. Zbudowane są przeważnie z kilku bardzo dużych komórek /ryc. 4a, b/. Komórki te mają kształt ostrosłupów przylegających podstawą do ściany gruczołu lub nieregularnych brył. Kształt ten jest spowodowany uciskiem sąsiednich komórek. Jądra takich olbrzymich komórek są bardzo duże i mają ziarnistą strukturę. Niekiedy na przekroju widać w tych komórkach kilkanaście wakuoli. Ich ilość zwiększa się w późniejszych okresach regeneracji.

Bardzo interesująco przedstawia się budowa błonki odgraniczającej te wakuole, a która była dostrzegalna już w siedmiotygodniowym regeneracie. W opisywanym trzymiesięcznym regeneracie błonka ta ma nieco inną budowę. Jest ona grubsza i usiana drobnymi ziarenkami wydzieliny, które skupiają się wewnątrz wakuoli w większe kropelki /ryc. 4b/. Jądro komórki jest dobrze widoczne. Większość jąder przylega do ściany gruczołu i są one

lekką spłaszczoną. Cytoplazma niektórych komórek jest jasna i zawiera liczne drobne kropelki wydzieliny, gromadzące się w opisanych wakuolach. Niektóre z tych kropelek-ziarenek są zabarwione na jaskrawo czerwony kolor, zaś inne na niebieski. Ich wielkość jest różna. Wśród małych niebieskich ziarenek leżą większe czerwone. W innych dużych komórkach tego samego gruczołu obserwuje się część cytoplazmy o różowo-niebieskim zabarwieniu. Czasem można także widzieć jakby wydzielanie jakiejś zawartości z jądra cytoplazmy. Może to być jednak obraz spowodowany działaniem utrwalacza. Komórki olbrzymie zajmują przeważnie 3/4 gruczołu. Na drugim biegunie gruczołu, w części cytoplazmy tych komórek zwróconej do światła znajdują się liczne ziarenka wydzieliny o intensywnie niebieskim kolorze.

Ułożenie młodych gruczołów bywa inne niż gruczołów starszych. Młode gruczoły ziarniste leżą często swoją osią długą równoległą do nabłonka i w takim wypadku ich światło otoczone mniejszymi komórkami znajduje się z boku gruczołu, a nie na biegunie zwróconym ku nabłonkowi.

Opisywane stadium regeneracji cechuje się więc przede wszystkim rozwojem młodych gruczołów śluzowych i ziarnistych, zasadniczo zróżnicowanych już wcześniej. Jednocześnie jednak nadal spotyka się jeszcze niezróżnicowane zawiązki gruczołów leżące w błonie podstawowej i skórze właściwej. Bardzo mało jest natomiast najmłodszych zawiązków gruczołów, znajdujących się nad błoną podstawową w naskórku regeneratu.

W okresie nieco późniejszym /reg. trzy i pół miesiąca/ obserwuje się jeszcze zawiązki gruczołowe w nabłonku distalnej części regeneratu. W tej części regeneratu liczne niezróżnicowane zawiązki gruczołów występują również między włóknami błony podstawowej. Natomiast w części proksymalnej obserwuje się występowanie młodych gruczołów śluzowych i ziarnistych o takiej samej budowie jak w okresie poprzednim. W tej części regeneratu niemal zupełnie brak jest wczesnych zawiązków. W następnym okresie regeneracji aż do piątego miesiąca rozmieszczenie zawiązków i młodych gruczołów nie ulega zasadniczym zmianom. Zwiększa się tylko nieco ilość gruczołów obu typów w części proksymalnej. Zawiązki natomiast nadal występują w części distalnej, gdzie mniej jest młodych gruczołów. Rozwinięte gruczoły są trochę większe niż w regeneracie trzy i pół miesięcznym. W gruczołach ziarnistych silniej zaznacza się wakuolizacja olbrzymich komórek. Poszczególne wakuole stykają się, tak że niemal nie widać między nimi cytoplazmy. Grubość warstwy skóry właściwej stopniowo wzrasta, co jest szczególnie widoczne w części proksymalnej.

Regenerat ośmiomiesięczny

W ośmiomiesięcznym regeneracie zaznacza się znaczny wzrost gruczołów wielokomórkowych i zmniejszenie liczby ich zawiązków w części di-

stalnej. Ułożenie niektórych młodych gruczołów w warstwie skóry właściwej regeneratu jest nadal odmienne w porównaniu z normalną kończyną. W olbrzymich komórkach gruczołów ziarnistych zaznacza się dalsza wakuolizacja cytoplazmy. Jądra tych komórek są więcej zbite i silniej się barwią niż w okresie poprzednim.

R e g e n e r a t d z i e s i ę c i o m i e s i ę c z n y

W regeneracie dziesięciomiesięcznym obserwuje się znaczne różnice w porównaniu ze stadiami młodszymi. Skóra właściwa jest już tylko półtora raza cieńsza od skóry reszty kończyny. Ma ona tutaj nieco inny wygląd, a mianowicie błona podstawowa i warstwa zbita tworzą dość zwięzłą warstwę /ryc. 5/. Jedynie nad niektórymi gruczołami nabłonek tworzy nieduże wpuklenie zagłębiające się w skórę. W normalnej kończynie takie wpuklenia nabłonka są o wiele większe.

Niektóre gruczoły śluzowe leżące w skórze właściwej połączone są pasmami włókien tkanki łącznej z warstwą zbitą /ryc. 6/. Początkowo takie pojedyncze pasmo łączy dno gruczołu z wspomnianą warstwą. Nieco później rozdziela się ono na szereg włókienek, które obejmują gruczoł jednolitym mankietem w części równikowej i łączą się z warstwą zbitą. W dziesięciomiesięcznym regeneracie kończyny można zaobserwować różne stadia tego procesu.

W tym stadium nabłonek gruczołowy przedstawia się również nieco inaczej. Komórki dna gruczołu śluzowego mają piankową cytoplazmę barwiącą się jasnioletowo. Granica tych komórek jest zupełnie niewidoczna lub tworzy niewyraźną przerywaną linię. Brak takiej granicy obserwuje się również od strony światła gruczołu. Jądra tych komórek były już opisywane poprzednio. Są to komórki śluzowe.

Komórki leżące w wierzchołkowej części gruczołu, sąsiadujące z jego szyjką, mają zupełnie inny wygląd. Plazma jest jasna i zawiera duże, barwiące się na niebiesko ziarna wydzieliny. Granice tych komórek są również niewyraźne. Ich jądra, podobnie jak w komórkach śluzowych leżą u podstawy komórki. Najczęściej nie są one spłaszczone lecz zaokrąglone. W świetle gruczołu znajduje się duża ilość wydzieliny. Wydzielina ta składa się z dużych, niebiesko barwiących się ziaren zamurzonych w niebieskawo zabarwionej treści. Obok wydzieliny gruboziarnistej w świetle gruczołu występuje wydzielina drobnoziarnista. Leży ona w sąsiedztwie komórek śluzowych dna gruczołu. Do komórek wierzchołkowej części gruczołu zawierających ziarna wydzieliny, przylegają komórki szyjki gruczołu, podobne do nabłonkowych.

Gruczoły ziarniste w tym okresie są już znacznie większe, jednak nadal składają się z kilku olbrzymich komórek /ryc. 7a, b/. Ich cytoplazma jest więcej zwakuolizowana. Niektóre wakuole są znacznie większe, ścianki wakuoli są jeszcze wyraźniej zaznaczone. Nadal występują na nich ziarenka wydzieliny. W niektórych wakuolach ziarenka wydzieliny występują również luźno w ich świetle, jednak większość z nich leży bliżej ścianek wakuoli. Wielkie jądra tych komórek są trochę spłaszczone i znajdują się przy ścianie gruczołu. Są one znacznie więcej zbite niż w okresach wcześniejszych. Granice komórek olbrzymich są wyraźne. Wszystkie takie komórki przylegają swoją podstawą do ściany gruczołu. Światło gruczołu, widoczne na niektórych przekrojach, leży zawsze asymetrycznie. Granice mniejszych komórek otaczających światło są mniej wyraźne niż w okresie poprzednim. Ich cytoplazma nadal wypełniona jest w całości dużymi ziarnami wydzieliny. Drobne ziarenka wydzieliny dostrzega się już także w świetle takiego gruczołu.

Powstawanie gruczołów wielokomórkowych w regeneracji ogona

Regenerat czterotygodniowy

Powstawanie zawiązków gruczołów wielokomórkowych jest analogicznie związane z powstawaniem błony podstawowej. Miesięczny regenerat ogona posiada taką błonę podstawową. Budowa i barwność jej są podobne do tych cech w kikucie. Powstawanie warstwy skóry właściwej obserwuje się w regeneracji w okolicy najbliższej miejsca amputacji. Tworzy ona tu pod błoną podstawową delikatną, włóknistą siateczkę, podobną do takiej siateczki w regeneracji kończyny.

Regenerat sześciotygodniowy

W regeneracji sześciotygodniowym corium jest znacznie lepiej wykształcone niż w okresie poprzednim i tworzy tu warstewkę około trzy razy grubszą od tej warstwy w regeneracji kończyny znajdującym się w tym samym okresie po amputacji. W tym czasie obserwuje się po raz pierwszy zawiązki gruczołowe. Niektóre z nich znajdują się częściowo w nabłonku, a częściowo w warstwie skóry właściwej. Inne, mieszczące się całkowicie w corium, posiadają na przekroju centralnym 10 do 15 komórek. W całości są one zbudowane z kilkudziesięciu komórek, których barwność odpowiada barwności komórek nabłonka. W cytoplazmie tych komórek nie zauważa się

ziarenek wydzieliny, zarówno na preparatach barwionych metodą azan jak i hematoksyliną Delafielda z eozyną.

Wiadomo, że wydzielina komórek dna gruczołu śluzowego zabarwia się hematoksyliną Delafielda na kolor fioletowy, zaś w metodzie azan na kolor jasnoniebieski. W regeneratach sześciotygodniowych powyższe metody nie wykryły nawet małych ilości wydzieliny w komórkach zawiązków gruczołów. Jednak można wykazać, że zawiązki o koncentrycznym układzie komórek z bardzo małym światłem wewnątrz przekształcają się w gruczoły śluzowe, gdyż taki układ komórek nie występuje w żadnej fazie tworzenia się gruczołów jadowych. Morfologiczne różnicowanie zawiązków gruczołowych wyprzedza tu różnicowanie funkcjonalne.

R e g e n e r a t d w u m i e s i ę c z n y

W regeneracie dwumiesięcznym zawiązki gruczołowe są liczne, ale dużo w nich tkwi jeszcze między komórkami nabłonka i nie wykazuje oznak różnicowania. Te, które znajdują się częściowo w skórze, ulegają różnicowaniu i można w nich zauważyć gromadzenie się ziarenek wydzieliny.

R e g e n e r a t t r z y i p ó ł m i e s i ę c z n y

W regeneratach starszych warstwa skóry właściwej jest znacznie grubsza. W okresie trzy i półmiesięcznym corium tworzy warstwę już tylko trzy razy cieńszą niż w kikucie. Inaczej również wyglądają elementy gruczołowe. Zawiązki gruczołowe są tu bardzo nieliczne, zaś ich miejsce zajmują gruczoły śluzowe i jadowe. Te ostatnie są duże i zajmują całą grubość skóry właściwej regeneratu. Na centralnych przekrojach zawierają 15 do 20 komórek, a więc odpowiadają pod względem ilości komórek gruczołom, nie amputowanej części ogona. Komórki te posiadają w cytoplazmie ziarna wydzieliny. Wspomniane komórki są w gruczołach regeneratu 2 do 4 razy mniejsze niż w gruczołach reszty ogona. Podobna ilość tych komórek w gruczołach regeneratu i w reszcie ogona świadczy, że wzrost gruczołów jadowych w dalszych okresach regeneracji będzie polegał prawdopodobnie na wzroście komórek, a nie na ich pomnażaniu. Przemawia również za tym brak figur mitotycznych w tych i późniejszych okresach regeneracji. Jak już wspomniano, cytoplazma tych dużych komórek zawiera wydzielinę. Jest ona wykształcona w postaci ziarenek różnej wielkości. Wśród ziarenek drobnych występują duże kuliste kropelki. W zasadzie wydzielina w tej ostatniej postaci występuje w wierzchołkowej części gruczołu, zaś ziarenka drobne

mieszczą się w komórkach zajmujących drobną część gruczołu. Jednak w niektórych gruczołach jest inaczej, komórki zawierające duże kuleczki wydzieliny mieszczą się między komórkami z drobnymi ziarenkami wydzieliny. Te dwie postacie wydzieliny zachowują się odmiennie wobec barwików. Duże kuliste krople barwione hematoksyliną Delafielda i eożyną są intensywnie różowe, zaś drobne ziarenka są fioletowe. Metoda azan duże krople zabarwia na kolor czerwono-pomarańczowy, ziarenka mniejsze barwią się w kolorze fioletowym. Jądra komórek tych, nieraz bardzo dużych komórek, mają kształt nieco inny niż jądra komórek jadowych gruczołów w kończynie. Są one pęcherzykowate i leżą wewnątrz cytoplazmy ogromnych komórek. Inne są spłaszczone i leżą przy ścianie gruczołu. Opisane komórki zajmują trzy czwarte gruczołu. Na drugim biegunie znajdują się komórki zawierające ziarenka wydzieliny. Gruczoły jadowe są więc zasadniczo tego samego typu, który występuje w skórze kończyny, lecz różnią się od ostatnich większymi rozmiarami i nieco bardziej zaokrąglonymi kształtami. Młode gruczoły śluzowe w tym okresie występują bardzo rzadko.

Regenerat czteromiesięczny

W regeneracie czteromiesięcznym zawiązki gruczołowe jeszcze występują obok młodych gruczołów. Gruczoły jadowe są większe. Wśród nich bardzo rzadko występują gruczoły śluzowe. Są one bardzo nieliczne zarówno w regeneracie jak i w reszcie ogona i nie różnią się w zasadzie od gruczołów tego rodzaju w kończynie.

Regenerat dziewięcio- i półmiesięczny

W późniejszym okresie, aż do dziewięć i pół miesięcy, nie obserwuje się zasadniczych zmian. W regeneracie ogona wzrasta tylko ilość gruczołów, podobnie jak w regeneracie kończyny. Po dziewięciu i pół miesiącach nie spotyka się już zawiązków gruczołów. Gruczoły jadowe zajmują niemal całą, ciągle zwiększającą się grubość skóry właściwej. Cytoplazma olbrzymich komórek jest coraz silniej zwakuolizowana tak, że po dziewięciu i pół miesiącach wakuole te leżą obok siebie oddzielone zaledwie cienkimi ściankami cytoplazmatycznymi. Ziarna wydzieliny są bardzo liczne i leżą bądź na obwodzie wakuolek, bądź też w środku. Między nimi znajdują się duże krople. Te ostatnie posiadają wewnątrz drobne puste wakuole. Drobne ziarenka wypełniają niemal całą cytoplazmę olbrzymich komórek. Odmiennie wyglądają również jądra tych komórek, w porównaniu z gruczołami w młod-

szym regeneracie. Leżą one przy ścianie gruczołu i są spłaszczone. Wypełnione są zbitą, silnie barwiącą się substancją o niewyraźnym rysunku chromatynowym.

Gruczoły śluzowe leżą w górnej warstwie skóry właściwej tak jak w regeneracie kończyny. Zróznicowanie ich komórek jest już bardzo wyraźne. Cytoplazma komórek dna gruczołu jest piankowata i barwi się na fioletowo. Granice między tymi komórkami i ich ograniczenie od strony światła gruczołu są niewyraźne /ryc. 6/. Jądra tych komórek leżą przy zewnętrznej ścianie gruczołu i są wypełnione zbitą, silnie barwiącą się substancją. Ponad komórkami znajduje się pojedynczy szereg komórek opasujących światło gruczołu. Ich cytoplazma zawiera duże ziarna wydzieliny barwiącej się metodą azan w kolorze intensywnie niebieskim, a hematoksyliną De-lafielda w kolorze różowym. Komórki leżące ponad tym wieńcem, w kierunku szyjki są duże, dochodzą niemal do światła gruczołu. Posiadają jasną cytoplazmę, zawierającą duże, blade ziarna wydzieliny, które z powodu słabej barwliwości trudno dostrzec. Jądra tych komórek leżą również przy zewnętrznej ścianie gruczołu. Kilka warstw komórek tworzy szyjkę łączącą gruczoł z nabłonkiem. Jakkolwiek wewnątrz szyjki jest światło, to jednak brak jest dalszego przewodu wyprowadzającego wydzielinę poprzez nabłonek skóry na zewnątrz. Niekiedy można zauważyć tylko początkowy, ślepo kończący się odcinek takiego przewodu, leżący tuż ponad błoną podstawową nabłonka.

Wyniki

U płazów regeneracja rozpoczyna się od zmian ogarniających komórki kikuta amputowanego narządu. Zmiany te przypominają embrionalizację komórek i są ogólnie określane jako odróżnicowanie. Komórki odróżnicowane są materiałem dla zaczątku regeneratu /Kiortsis, Trampusch, 1964/.

Powszechny dla tkanek kikuta proces odróżnicowania nie objął nabłonka gruczołowego. Stwierdziłam, że gruczoły wielokomórkowe, choćby położone bardzo blisko płaszczyzny amputacji, nie odróżnicowują się. Takie zachowanie się ich komórek jest zgodne z zachowaniem się w tych warunkach komórek Leydiga /Pelc Z., 1967/. Gruczoły regeneratu zarówno jedno- jak i wielokomórkowe nie pochodzą więc z odróżnicowanego nabłonka gruczołowego kikuta, lecz tworzą się z komórek nabłonka regeneratu. Ten nabłonek pochodzi z migrującego nabłonka kikuta /Brunst V., 1961/.

Różnicowanie się wielokomórkowych gruczołów regeneratu następuje dopiero po wykształceniu wielowarstwowego nabłonka podścielonego błoną podstawową. W regeneracie kończyny aksolotla proces ten występuje po pięciu

tygodniach, a w regeneracie ogona już po miesiącu. Wydaje się więc, że podobnie jak i w rozwoju larwalnym, również w regeneracji kończyn warunkiem powstawania gruczołów jest wykształcenie błony podstawowej. Związki gruczołów tworzą się bowiem w bezpośrednim sąsiedztwie tej błony. Być może, że chodzi tu o indukcyjne oddziaływanie samej błony lub bezpośrednio pod nią leżącej tkanki. Wyraźnych wskazówek w tym kierunku dostarczają obserwacje Łagana /1961/. Wykazał on, że nabłonek kikuta kończyny aksolotla jest zdolny do wytworzenia zupełnie swoistych, cewkowatych gruczołów pod wpływem oddziaływania specyficznej tkanki łącznej. Autor uzyskał taką tkankę w warunkach doświadczalnych implantując do kończyny zawieszinę komórek mięśni i tkanki łącznej głowy. Łagan /1961/ wykazał, że w jego doświadczeniach regeneraty tworzyły się z wszczepionych komórek, ale były pokryte nabłonkiem pochodzącym z kikuta amputowanego po wszczepieniu kończyny. Analogicznie do rozwoju ontogenetycznego także i w regeneracji, zagłębiający się w błonę podstawową a następnie w skórę właściwą związek wykształca bądź to gruczoł śluzowy, bądź też ziarnisty. Początkowo jednak związek nie wykazuje jakichkolwiek cech, które by pozwalały określić kierunek różnicowania. Determinacja dalszego kierunku rozwoju gruczołu jest prawdopodobnie ustalona w pierwszej fazie, to jest w stadium niezróżnicowanego związka. To przypuszczenie wymaga jednak dalszych doświadczeń.

LITERATURA

- B i e d e r m a n n W., Vergleichende Physiologie des Integuments der Wirbeltiere, Ergebnisse, der Biologie, b VI, Berlin 1930.
- B r u n s t W., Some problems of Regenerations. Quar. Rev. Biol. 1961, 36, 178.
- E g g e l i n g H., Hautdrüsen [w:] B o l k L., G o p p e r t E., Handbuch der Vergleichenden Anatomie der Wirbeltiere I. 1931, 641.
- G e r s c h H., Aufbau und Differenzierung Integuments vom Axolotl auf Grund einer vergleichenden Untersuchungen mit vitalen und histologischen Farbenmethoden. Z. mikr.-anat. Forsch. 1942, 51, 513.
- H a d o r n E., C h e n P. S., Beobachtungen über die Wanderung der Leydigischen Drüsenzellen bei Regenerations vorgängen in der Larvenhaut von Triton alpestris. Roux. Archiv. 1953, 146, 513.
- K i o r t s i s V., T r a m p u s c h H. A. L., Regeneration in Animals and Related Problems. Amsterdam 1964.
- L e Q u a n g T r o n g Y., Histogeneze et histochemie des glandes cutanées de l'axolotl /Ambystoma tigrinum Green/. Archiv.Zool. Exp. Gen. 1967. 108, 49-73.
- Ł a g a n M., Regeneration from implanted cells. II. Regenerates pro-

- duced by dissociated cells derived from different organs. *Fol. Biol.* 1961, vol. 9, 3-26.
- Р е л с З., Комірки Leydiga в регенератах кінцівки і огона аксолотля /*Ambystoma mexicanum* Cope/. *Rocz. Nauk-Dydakt. WSP w Krakowie*, z. 29: *Prace z Zoologii I.* Kraków 1967.
- Р а у м а н н Г., Untersuchungen über die Schleimdrüsen in der Haut von *Ambystoma mexicanum*. *Z. mikrosk-anat.* 1942, 51, 513.
- С e e g e r P. G., Untersuchungen an den Leydig'schen Zellen der Urodelenhaut. *Z. Zellforsch.* 1933, 19, 441.

Zofia Felc

THE GROWTH OF MULTILOCULAR GLANDS IN THE LIMB AND TAIL REGENERATES OF AXOLOTL
/AMBYSTOMA MEXICANUM COPE/

The author has described the development of multilocular glands in the limb and tail regenerates of axolotl, within ten months after the amputation of these organs. The growth of glands is anatomically connected with the formation of the basilar membrane which is to be found already in a 22-day regenerate of limb and tail. On the other hand, the first nuclei of multilocular glands in the limb regenerate develop somewhat later, five weeks after the amputation. They are located upon the basilar membrane, between the epithelial cells, from which they differ by their size and disposition. The differentiation of the young nuclei into mucuous and venomous /granular type/ glands occurs later in the limb regenerate /7 weeks after the amputation/. This differentiation consists in the occurrence of mucuous or venomous secretion, and in a characteristic configuration of the glandular epithelial cells. The young glands are translocated into the forming layer of skin proper and gradually are surrounded with a thin layer of the connective-tissues fibres.

Зофія Пелц

ОБРАЗОВАНИЕ МНОГОКЛЕТОЧНЫХ ЖЕЛЕЗ В РЕГЕНЕРАТАХ КОНЕЧНОСТЕЙ И ХВОСТА
АКСОЛОТЛЯ /AMBYSTOMA MEXICANUM COPE/

В статье описывается развитие многоклеточных желез в регенератах конечности и хвоста аксолотля в период 10 месяцев после ампутации этих органов.

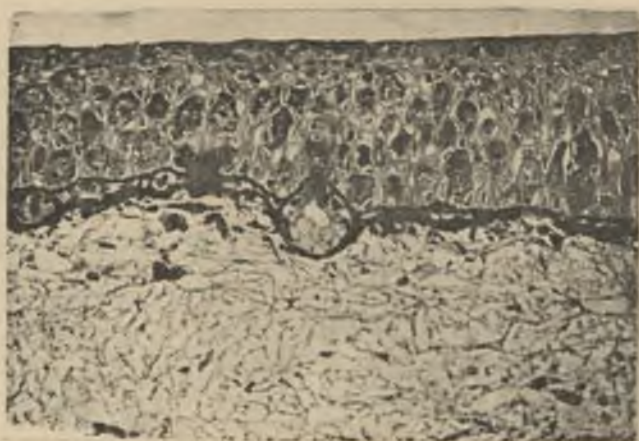
Появление желез анатомически связано с возникновением основной перепонки, наблюдающимся уже в 22-дневном регенерате конечности и хвоста. В регенерате конечности первые завязи многоклеточных желез развиваются несколько позднее, а именно в 5 недель после ампутации. Они помещены на основной перепонке, между клетками эпителия, от которых они отличаются величиной клеток и их структурой. Дифференциация молодых завязей, возникновение желез слизистых и ядовитых /зернистый тип/ в регенерате конечности наступает позже /в 7 недель после ампутации/. Оно заключается в появлении слизистого или ядовитого секрета и в характерной структуре эпителия желез. Молодые железы перемещаются в образующийся слой подлинной кожи и постепенно обводятся тонким слоем волокон соединительной ткани.



Ryc. 1. Związek gruczołu. Pod nim widoczna błona podstawowa. Regenerat pięcioletniowy. Barwienie metodą azan. Pow. 500 x



Ryc. 2. Starsze stadium zawiązka gruczołu leżącego już częściowo w skórze właściwej. Regenerat sześciotygodniowy. Barwienie metodą azan. Pow. 500 x



Ryc. 3. Gruczoł śluzowy. a - gruczoł rozpychający błonę podstawową i warstwę zbitą skóry. Pow. 315 x



Ryc. 3b



Ryc. 4a



Ryc. 4b

Ryc. 3b - w górnej części ryciny widoczna szyjka z komórkami o dużych jądrach. Dno gruczołu zajmują komórki o małych pyknotycznych jądrach. Regenerat trzymiesięczny. Barwienie metodą azan. Pow. 1100x

Ryc. 4a - Gruczoł ziarnisty - widoczne cztery zwakuolizowane komórki olbrzymie. W komórce z dwoma jądrami wakuolki usiane są drobnymi ziarenkami na obwodzie. Pow. 1100 x

Ryc. 4b - struktura zwakuolizowanych komórek, widoczne drobne ziarenka wydzieliny na obwodzie wakuoli. Regenerat trzymiesięczny. Barwienie metodą azan. Pow. 2850 x



Ryc. 5. Budowa skóry, widoczne 3 gruczoły śluzowe i 1 ziarnisty. Regenerat dziesięciomiesięczny. Barwienie metodą azan. Pow. 200 x

Ryc. 6. Gruczoł śluzowy. W dolnej części gruczołu widoczne komórki śluzowe dna gruczołu. Światło wypełnione wydzieliną. Regenerat dziesięciomiesięczny. Barwienie metodą azan. Pow. 1000 x





Ryc. 7. Gruczoł ziarnisty. a - w górnej części gruczołu widoczne światło, w dolnej trzy duże komórki o silnie zwakuclizowanej cytoplazmie



Ryc. 7b - struktura silnie zwakuclizowanej cytoplazmy komórek gruczołu ziarnistego. Regenerat dziesięciomiesięczny. Barwienie metodą azan. Pow. 1100 x