

Katedra i Zakład Histologii i Embriologii. Wydział Lekarski.
Akademia Medyczna w Lublinie
Kierownik: prof. dr med. Stanisław Grzycki

Grażyna RZESZOWSKA

**Próba oceny histochemicznych metod barwnych kwaśnych
mukopolisacharydów w świetle pomiarów cytofotometrycznych**

**Попытка оценки гистохимических цветных методов определения
кислых мукополисахаридов в свете цитوفотометрических
исследований.**

**An Attempt to Evaluate Histochemical Staining Methods of Acid
Mucopolysaccharides in the Light of Cytophotometric Measurements**

Histochemia rozporządza kilkoma metodami w wykrywaniu barwnym kwaśnych mukopolisacharydów, a ich czułość i wybiórczość jest dotychczas przedmiotem rozważań. Posługując się wyłącznie odczynami barwnymi, trudno jest jednak wnioskować o zmianach ilościowych obserwowanych składników komórki, a w każdym razie wnioski mogą być bardzo nieścisłe. Wydaje się więc celowe przeprowadzenie oceny wykrywanych histochemicznie substancji przy pomocy pomiarów cytofotometrycznych, które są cennym uzupełnieniem badań jakościowych. Pomiar cytofotometryczny znalazł szerokie zastosowanie głównie przy oznaczaniu poziomu kwasów nukleinowych zawartych w komórkach. Używa się ich również do określania zawartości cystyny, cysteiny, fosfataz. Delarue, Mignot, Paven (1955) stosowali pomiary cytofotometryczne do oznaczania ilości kwaśnych mukopolisacharydów w istocie podstawowej tkanki łącznej, barwiąc skrawki błękitem toluidyny. Holle i Siedschlag (1958) w podobny sposób badali zmienność ilościową kwaśnych mukopolisacharydów w aorcie w związku z procesem starzenia się. Stojalowski i Krygier (1956) posługiwali się także pomiarami cytofotometrycznymi przy oznaczaniu zmiennej zawartości kwaśnych mukopolisacharydów w chorobie reumatycznej, a Krygier (1956) uważa, że pomiary cytofotometryczne są dokładną metodą porównawczą względnych poziomów badanych substancji, ponieważ odczyny histochemiczne, polegające na powinowactwie barwnika do danego składnika komórki nie mogą być uważane za bezwzględnie ścisłe.

Rzeszowska (1962), posługując się różnymi metodami obserwowała zmiany w zawartości kwaśnych mukopolisacharydów w nabłonku macicy kastrowanych

samic szczurów białych pod wpływem różnych dawek estrogenów. Przeprowadzając pomiary cytofotometryczne w skrawkach barwionych błękitem Astra, zauważono wahania wartości ekstynkcji zależne od dawki podanego benzoesanu oestradiolu, jak również od czasu, który upłynął od chwili iniekcji hormonu.

Biorąc pod uwagę możliwość występowania różnic wyników ilościowych w zależności od sposobu barwienia, a przede wszystkim od rodzaju barwnika użytego do badań histochemicznych, postanowiono przeprowadzić analizę porównawczą barwień: błękitem alcjanowym wg Steedmana (1950), błękitem Astra według Piocha (1957) oraz metodą żelazową Hale w modyfikacji Müllera (1955).

MATERIAŁ I METODYKA BADAŃ

Mikrofotometrem II C. Zeiss (Jena), zachowując stałą wielkość szczeliny, oznaczano wartości ekstynkcji według wzoru Sandrittera w skrawkach barwionych błękitem alcjanowym, błękitem Astra i według metody Müllera na zawartość kwaśnych mukopolisacharydów w komórkach nabłonka błony śluzowej macicy. Kastrowanym samicom szczurów białych podawano domięśniowo, jednorazowo benzoesan oestradiolu w dawkach 1,2 µg, 2,5 µg, 5 µg, 10 µg dzieląc zwierzęta na cztery grupy doświadczalne (po 20 sztuk w każdej) i piątą grupę kontrolną, liczącą cztery szczury. Materiał do badań pobierano po 12, 24, 48, 72, 96 godzinach od chwili iniekcji hormonu. Skrawki utrwalano w mieszaninie alkoholu 95% i formolu obojętnego w stosunku 9:1.

BADANIA WŁASNE

Dotychczasowe nasze obserwacje pozwoliły zauważyć, że istnieje wyraźne podobieństwo odczynów barwnych, uzyskanych przy użyciu błękitu alcjanowego i błękitu Astra, a różnice w barwieniu wg metody Müllera. Błękit alcjanowy i Astra dawały jednak zwykle odczyny barwne różnie nasilone w komórkach nabłonka, umiejscawiające się głównie w częściach szczytowych w postaci barwnego obrzeża. Zabarwienie wg metody Müllera było bardziej intensywne, obejmowało prawie całą komórkę, ale nie występowały różnice w nasileniu zabarwienia między komórkami nabłonka. Można więc było obserwować wahania natężenia odczynu barwnego, obrazujące niewątpliwie zmiany zawartości kwaśnych mukopolisacharydów w komórkach nabłonka, uzależnione od dawek benzoesanu oestradiolu. Różnice w nasileniu zabarwienia kwaśnych mukopolisacharydów w komórkach nabłonka, szczególnie w pierwszych godzinach po iniekcji hormonu były uchwytne tylko po barwieniu błękitem alcjanowym i Astra, natomiast bardzo trudne lub wręcz niemożliwe przy użyciu metody Müllera.

Wartości ekstynkcji przy barwieniu błękitem Astra wykazywały różnice w zależności od dawki podanego hormonu i od czasu, który upłynął od chwili iniekcji (tab. 1). Podwyższenie się ekstynkcji wystąpiło w grupie zwierząt, które otrzymały 2,5 µg benzoesanu oestradiolu

Tab. 1. Wartości ekstynkcji w skrawkach barwionych błękitem Astra, uzyskane od zwierząt, którym podawano benzoosan oestradiolu w dawkach 1,2 μg , 2,5 μg , 5 μg , 10 μg , a materiał do badań pobierano po 12, 24, 48, 72, 96 godzinach od chwili iniekcji hormonu

Extinction values in sections stained with Astra blue obtained from animals treated with oestradiol benzoate in doses of 1.2 μg , 2.5 μg , 5 μg , 10 μg . The material was obtained after 12, 24, 48, 72, 96 hours following the injection of the hormone

Odczyty po godz.	Wartości ekstynkcji przy dawkach			
	1,2 μg	2,5 μg	5 μg	10 μg
12	1,37	2,08	2,13	2,10
24	1,39	2,15	2,23	2,25
48	1,47	2,83	2,94	2,93
72	1,42	2,79	2,63	2,84
96	1,36	1,93	1,98	2,01
Kontrola: 1,62				

Tab. 2. Wartości ekstynkcji w skrawkach barwionych błękitem alcjanowym uzyskane od zwierząt, którym podawano benzoosan oestradiolu w dawkach 1,2 μg , 2,5 μg , 5 μg , 10 μg , a materiał do badań pobierano po 12, 24, 48, 72, 96 godzinach od chwili iniekcji hormonu

Extinction values in sections stained with alcian blue obtained from animals treated with oestradiol benzoate in doses of 1.2 μg , 2.5 μg , 5 μg , 10 μg . The material was taken 12, 24, 48, 72, 96 hours after the injection of the hormone

Odczyty po godz.	Wartości ekstynkcji przy dawkach			
	1,2 μg	2,5 μg	5 μg	10 μg
12	1,31	2,17	2,10	2,14
24	1,35	2,14	2,21	2,19
48	1,40	2,81	2,83	2,85
72	1,37	2,60	2,75	2,76
96	1,32	2,01	2,00	2,11
Kontrola: 1,02				

w porównaniu ze zwierzętami, którym wstrzyknięto 1,2 μg . Dawki 5 μg i 10 μg nie wywołały już znamiennych różnic w wartościach ekstynkcji w porównaniu do dawki 2,5 μg . Wartości ekstynkcji uzyskane dla błękitu alcjanowego minimalnie różniły się od poprzednio podanych i ograniczały się tylko do niewielkich wahań liczbowych (tab. 2). W metodzie Müllera natomiast wartości ekstynkcji okazały się znacznie wyższe w porównaniu z poprzednimi (tab. 3). Zaznaczała się wyraźna różnica w stężeniu kwaśnych mukopolisacharydów w komórkach nabłonka

u zwierząt, które otrzymały 1,2 μg i 2,5 μg benzoesanu oestradiolu. Natomiast różnice w wartościach ekstynkcji, występujące po 12, 24, 48, 72, 96 godz. od wstrzyknięcia hormonu w poszczególnych grupach doświadczalnych nie były charakterystyczne i nie upoważniały do wyciągnięcia wniosku o istnieniu jakiejś określonej zmienności w zawartości kwaśnych mukopolisacharydów.

Tab. 3. Wartości ekstynkcji w skrawkach barwionych wg metody żelazowej Müllera, uzyskane od zwierząt, którym podawano benzoesan oestradiolu w dawkach 1,2 μg , 2,5 μg , 5 μg , 10 μg , a materiał do badań pobierano po 12, 24, 48, 72, 96 godzinach od chwili iniekcji hormonu

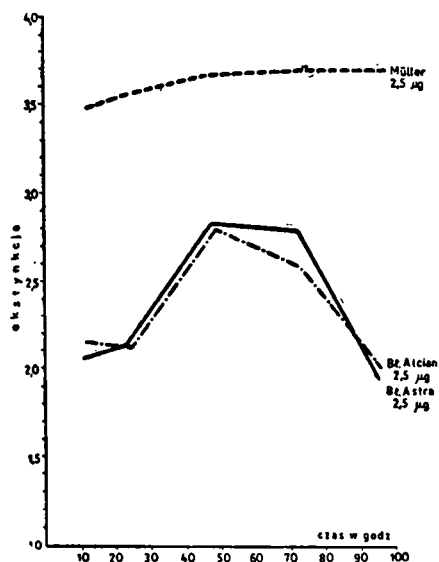
Extinction values in sections stained by Müller's iron method, from animals treated with oestradiol benzoate in doses of 1.2 μg , 2.5 μg , 5 μg , 10 μg . The material was obtained after 12, 24, 48, 72, 96 hours following the injection of the hormone

Odczyty po godz.	Wartości ekstynkcji przy dawkach			
	1,2 μg	2,5 μg	5 μg	10 μg
12	2,04	3,50	3,72	3,12
24	2,50	3,57	3,70	3,44
48	2,95	3,68	3,78	3,76
72	2,92	3,70	3,60	3,78
96	2,89	3,70	3,62	3,56
Kontrola : 1,02				

OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ I WNIOSKI

Porównanie wartości ekstynkcji uzyskanych po zastosowaniu metod barwienia błękitem alcjanowym i błękitem Astra zwraca uwagę na duże podobieństwo wyników. Wahanie wartości ekstynkcji były bardzo nie wielkie, tak że trudno uważać je za istotne. W metodzie Müllera zaś ekstynkcja wykazała znacznie wyższe wartości zarówno w grupie kontrolnej, jak i w doświadczeniach.

Najbardziej charakterystyczną okazała się dawka 2,5 μg benzoesanu oestradiolu (najmniejsza dawka rujowa), której wykres został przedstawiony na ryc. 1. Krzywe obrazujące wyniki barwienia błękitem alcjanowym i błękitem Astra w dużym stopniu pokrywały się, natomiast krzywa metody Müllera odbiegała, była prawie płaska, co mogło wskazywać na zatarcie różnicy w zawartości kwaśnych mukopolisacharydów w zależności od upływu czasu po iniekcji hormonu w poszczególnych grupach doświadczalnych. W przeprowadzonych doświadczeniach najwyższe wartości ekstynkcji uzyskano po upływie 48 godzin od podania benzoesanu oestradiolu niezależnie od wysokości dawki. Wartości ekstynkcji wyższe w metodzie Müllera w porównaniu z wy-



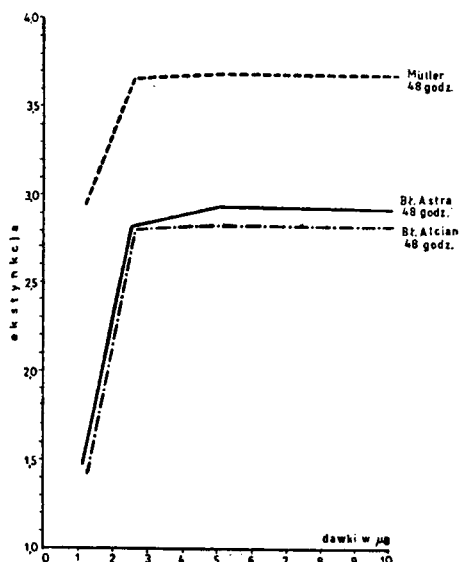
Ryc. 1. Zależność ekstynkcji od dawki benzoesu oestradiolu (1.2 µg, 2.5 µg, 5 µg, 10 µg) po upływie 48 godzin od chwili iniekcji w trzech metodach barwienia (błękit alcjanowy, Astra, metoda Müllera)

Relation of the extinction to the dosage of oestradiol benzoate (1.2 µg, 2.5 µg, 5 µg, 10 µg) after 48 hours following injection. Three staining methods (alcian blue, Astra, Müller's method)

nikami barwień: błękitami alcjanowym i Astra na wykresie dały zbliżony kształt krzywych (ryc. 2). Świadczyć to może, że uzyskane wartości liczbowe w metodzie Müllera są w tym wypadku tylko proporcjonalnie wyższe.

Metoda żelazowa Hale jak również jej modyfikacje m. in. Müllera mają bardzo ostrożną ocenę w literaturze. Braun-Falko (1960) uważa ją za czułą i specyficzną w przeciwieństwie do Lisona (1960), który odmawia jej jakichkolwiek wartości, uważając, że wybarwia szereg innych substancji poza kwaśnymi mukopolisacharydami. Zugibe i Brown (1960) oraz Winogradow (1962) uważają, że przy wykrywaniu kwaśnych mukopolisacharydów należy używać kilku metod barwnych, jako że specyficzność używanych barwników jest dyskusyjna.

Pomiary cytofotometryczne wskazywały wg naszych obserwacji, że barwienie błękitami alcjanowym i Astra na zawartość kwaśnych mukopolisacharydów wykazują znaczne podobieństwo, a również w oparciu o wyniki badań: Fasske (1957), Steedman (1950), Pioch (1957)



Ryc. 2. Zależność ekstynkacji od czasu (12, 24, 48, 72, 96 godz.), jaki upłynął od chwili podania $2.5 \mu\text{g}$ benzoesu oestradiolu w trzech metodach barwienia (błękit alcjanowy, Astra, metoda Müllera)

Relation of the extinction to time (12, 24, 48, 72, 96 hours) elapsed from the injection of $2.5 \mu\text{g}$ of oestradiol benzoate. Three staining methods (alcian blue Astra, Müller's method)

i Godlewskiego (1960) można uważać je za najbardziej specyficzne. Wartości ekstynkacji w barwieniu wg metody Müllera okazały się wyższe i nie wykazywały tak delikatnych różnic jak metody wyżej wymienione.

PIŚMIENICTWO

1. Braun-Falko: cyt. wg Godlewskiego (3).
2. Fasske E.: Zur Darstellung der säuren Mukopolisaccharide im Bereich der Zwischensubstanz mezenchymaler Gewebe. Zentralbl. f. Allgem. Path. u. Path. Anat. 97, 174—179, 1957.
3. Godlewski H.: Histochemiczne metody wykrywania wielocukrów i ich ocena. Post. Hig. i Med. Dośw. 14, 155—177, 1960.
4. Holle G., Siedschlag W. D.: Quantitative photometrische Bestimmung der Aortenmukopolisaccharide auf verschiedenem Altersshefen. Acta Histochem. 5, 369—384, 1958.
5. Lison L.: Histochemie et cytochemie animales. Gauthier-Villars 1960.
6. Krygier A.: Zastosowanie mikrofotometru w badaniach histochemicznych i cytochemicznych. Rocznik POM Akad. Med. 2, 381—389, 1956.

7. Müller G.: Über eine Vereinfachung der Reaktion nach Hale (1946). *Acta Histochem.* 2, 68—70, 1955.
8. Pioch W.: Über die Darstellung saurer Mukopolisaccharide mit dem Kupfer-phthalocyaninfarbstoff Astrablau. *Virch. Arch. Ant. Phys. Klin. Med.* 3, 337—346, 1957.
9. Rzeszowska G.: Histochemiczne badania nad kwaśnymi mukopolisacharydami w nabłonku i gruczołach błony śluzowej macicy szczurów białych w warunkach doświadczalnych. *Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska. Sec. D.* 17, 303—318, 1962.
10. Steedman H.: Alcian Blue 8GS a New Stain for Mucin. *Quart. J. Micr. Sci.* 91, 477—479, 1950.
11. Stojalowski K., Krygier A.: Z badań histochemicznych nad tkanką łączną w układzie sercowo naczyniowym w przebiegu choroby reumatycznej u dzieci. *Rocznik POM Akad. Med.* 2, 353—380, 1956.
12. Winogradow B. B., Donski N. B., Subotkin M., Czeretnych L. A.: Strawinitielnaja ocenka gistochemiczeskogo wyjawlenia mukopolisaccharidow w tkaniach prowizornych organow czolowieka i mlekopitajuszczych. *Arch. Anat. Gist. i Embr.* 1, 103—109, 1962.
13. Zugibe F. Z., Brown K. D., Last J. H.: A New Technique for the Simultaneous Demonstration of Lipid and Acid Polysaccharides on the Same Tissue Section. *Jour. of Hist. Cyt.* 7, 135—137, 1960.
14. Delarue J., Mignon J., Pawen J., Roussel A.: Les lesions degeneratives des tissus tendineux et aponeurotiques. *Presse Med.* 63, 608, 1955.

РЕЗЮМЕ

Цитофотометрические измерения, проведенные на клетках эпителия матки, окрашенных альциановым синим и синим Астра, дают весьма сходные результаты. Расхождения получены в отношении окрашивания по методу Мюллера. Кастрированным самкам белых крыс внутримышечно вводились следующие дозы бензоата эстрадиола: 1,2 мкг, 2,5 мкг, 5 мкг, 10 мкг и материал для исследований отбирался после истечения 12, 24, 48, 72 и 96 часов с момента инъекции гормона. Измерения содержания кислых мукополисахаридов выявили изменение их содержания в зависимости от дозы при всех методах окрашивания, причем наиболее высокая величина экстинкции соответствовала методу Мюллера. Различия, обнаруженные в связи с периодом времени, истекшим с момента инъекции гормона в отдельных опытных группах отчетливо проявлялись при окрашивании альциановым синим и синим Астра; подобных различий не наблюдалось в случае окрашивания по методу Мюллера.

Табл. 1. Величины экстинкции срезов, окрашенных синим Астра. Животным вводили следующие дозы эстрадиола: 1,2 μ г, 2,5 μ г, 5 μ г, 10 μ г; материал для исследований отбирался после истечения 12, 24, 48, 72 и 96 часов с момента инъекции гормона.

Табл. 2. Величины экстинкции срезов, окрашенных альциановым синим. Препараты получены от животных которым вводились следующие дозы бензоата эстрадиола: 1,2 μ г, 2,5 μ г, 5 μ г, 10 μ г; материал для исследований отбирался после истечения 12, 24, 48, 72 и 96 часов с момента инъекции гормона.

Табл. 3. Величины экстинкции срезов, окрашенных по методу Мюллера. Препараты соответствуют животным, которые получили следующие дозы бензоата эстрадиола: 1,2 μ г, 2,5 μ г, 5 μ г, 10 μ г; материал для исследований отбирался после 12, 24, 48, 72, 96 часов с момента инъекции гормона.

Рис. 1. Зависимость величины экстинкции от дозы бензоата эстрадиола (1,2 μ г, 2,5 μ г, 5 μ г, 10 μ г) после 48 часов с момента инъекции для трех методов окрашивания (альциановый синий Астра, метод Мюллера).

Рис. 2. Зависимость величины экстинкции от времени (12, 24, 48, 72, 96 часов) истекшего с момента введения дозы 2,5 μ г, бензоата эстрадиола при трех методах окрашивания (альциановый синий, синий Астра, метод Мюллера).

SUMMARY

Cytophotometric measurements made of cells of the uterus epithelium, stained with alcian blue and Astra to determine the content of acid mucopolisaccharide showed considerable similarity in the results, but differences when stained with Müller's iron method. Castrated white female rats were given intramuscular single injections of oestradiol benzoate in doses of: 1.2 μ g, 2.5 μ g, 5 μ g, 10 μ g, and the material for inspection was taken after 12, 24, 48, 72 and 96 hours following the injection of the hormone. Changes in the amount of acid mucopolisaccharides depending upon the dosage could be seen in all the methods of staining employed, while the transmittance value in Müller's method was considerably higher. However, differences caused by the lapse of time from the moment of injection clearly appeared in the various experimental groups where alcian blue and Astra were used, and were blurred when Müller's method was applied.