

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

Maciej LATALSKI

**Badania nad kwasem rybonukleinowym i białkowymi grupami SH
w wątrobie szczurów przy stosowaniu różnej diety**

**Исследование РНК и SH — групп в печени крыс при различном
питании.**

**An Investigation into SH Groups and RN Acid in the Liver of Rats Fed
with Different Amounts of Protein**

Histochemiczne i histofotometryczne badania kwasów nukleinowych (RNA, DNA) w komórkach wątroby w różnych warunkach doświadczalnych zwróciły uwagę na możliwość występowania zmian w rozmieszczeniu i ilości tych kwasów (Lowe (5), Gershbein (1), Królikowska (2), Petrakis (6) i inni).

Badania nad kwasem rybonukleinowym i grupami sulfhydrylowymi w dojrzewającej komórce jajowej (Latański 3) wykazały, że w miarę procesu dojrzewania ze wzrostem komórki wzrastała ilość białkowych grup SH do wartości ekstynkcji 4,5 w komórkach największych, a ilość RNA jednocześnie malała, osiągając wartość ekstynkcji w odpowiednich komórkach równą 1,0. W nabłonku pęcherza moczowego natomiast odczyny barwne na białkowe grupy SH i kwas rybonukleinowy były najwyraźniejsze w warstwach górnych tego nabłonka, a w komórkach warstw przypodstawnych mniej wyraźne (Latański 4). Możliwość współzależności między zawartością RNA i grupami SH w komórce skłoniła nas do badań nad obu tymi substancjami w komórce wątrobowej przy stosowaniu diety białkowej i głodzeniu.

MATERIAŁ I METODYKA BADAŃ

Badania przeprowadzono na szczurach białych (*Rattus rattus* L. *albino*) hodowli wsobnej, samcach w wieku 4—5 miesięcy. Zwierzęta doświadczalne podzielono na 3 grupy. Jedną grupę stanowiły zwierzęta kontrolne, drugą karmione przez 7 dni wyłącznie produktami o dużej zawartości białka (ser, mleko), zaś trzecią zwierzęta głodzone przez 3 dni. Wycinki wątroby utrwalano: jedne w płynie

Serra (RNA), a drugie w 1% roztworze kwasu tróchlorooctowego w 80% etanolu (SH). Skrawki mikrotomowe grubości 5 μ po odparafinowaniu barwiono wg metody Bracheta i pyroniną dla wykazania obecności kwasu rybonukleinowego. Dla wybarwienia białkowych grup SH stosowano metodę Barnetta i Seligmana, używając jako barwnika czerni K.

Względą zawartość kwasu rybonukleinowego i grup SH w komórkach wątrobowych określano ilościowo na cytofotometrze C. Zeiss (Jena). Pomiarów tych dokonywano przy stałej szczeliny, a więc zawsze na tę samą powierzchnię komórki. Wartość ekstynkcji obliczano stosunkiem Sandrittera.

BADANIA WŁASNE

Grupa kontrolna. Na preparatach histologicznych, sporządzonych z wycinków wątrobowych tej grupy zwierząt odczyn pyronino-chłonny był równomiernie rozmieszczony w całej cytoplazmie. Nasilenie odczynu było intensywne i wyrażało się ekstynkcją równą 1,9. Jądra komórek pozostawały nie zabarwione, natomiast w jąderkach obserwo-wało się odczyn barwny z pyroniną silniejszy niż w cytoplazmie (ryc. 2).

Preparaty zabarwione czernią K wg metody Barnetta i Seligmana wykazywały wyraźne zabarwienie całej cytoplazmy komórki wątrobowej. Jądra barwiły się słabo i na skutek tego kontrastowały z cytoplazmą (ryc. 3). Wartość ekstynkcji mierzona w cytoplazmie komórki równała się 2,1.

Grupa zwierząt będących na diecie białkowej. Preparaty histologiczne tej grupy, zabarwione dla wykazania kwasu rybonukleinowego mało różniły się od obserwowanych w grupie kontrolnej. Odczyn barwny zajmował całą cytoplazmę, a rozmieszczony był równomiernie. W nie zabarwionych jądrach komórkowych widoczne były mocno różowe jąderka (ryc. 4). Wartość ekstynkcji w cytoplazmie również niewiele odbiegała od wartości w grupie kontrolnej i wynosiła 2,0.

W porównaniu z grupą kontrolną większe różnice dało się zauważyć na preparatach zabarwionych w celu wykrycia grup SH. Zabarwienie cytoplazmy komórek wątrobowych było bardziej wyraźne i wyrażało się ekstynkcją 2,4. Jądra komórek również zabarwiały się silniej. W wielu wypadkach zróżnicowanie w zabarwieniu jądra i cytoplazmy było niewielkie (ryc. 5).

Grupa zwierząt głodzonych. Preparaty barwione wg metody Bracheta i pyroniną wykazywały nierównomierny odczyn barwny w obrębie cytoplazmy. Odczyn ten, choć występował w całej cytoplazmie, był wyraźnie silniejszy wokół jąder komórkowych w porównaniu z częścią obwodową cytoplazmy. Bardzo intensywnie zabarwiały się

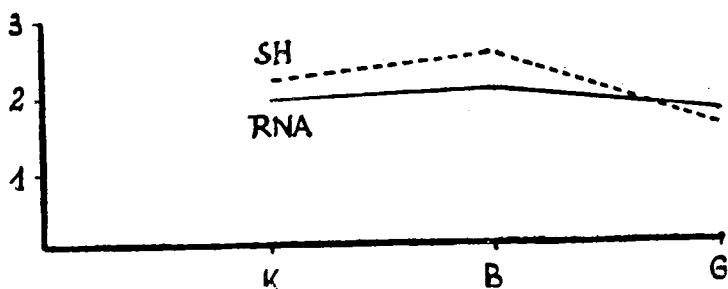
także jąderka (ryc. 6). Wartość ekstynkcji mierzona w cytoplazmie komórek wątrobowych wynosiła 1,7.

Zabarwienie uzyskiwane przy pomocy czerni K., świadczące o obecności białkowych grup SH, w komórkach wątrobowych tej grupy zwierząt było mało nasilone i równomierne w obrębie całej cytoplazmy (ryc. 7), a wartość ekstynkcji równała się 1,5. Na tle słabo zabarwionej cytoplazmy obserwowano się zupełnie nie zabarwione jądra komórek wątrobowych.

OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ I WNIOSKI

Analizując wykonane preparaty histologiczne, można zaobserwować różnice między grupą kontrolną a dwoma pozostałymi grupami. Różnice te dotyczyły zarówno RNA jak i białkowych grup SH. W komórkach wątrobowych szczurów będących na diecie białkowej minimalnie zwiększała się ilość kwasu rybonukleinowego (w wartościach ekstynkcji od 1,9 do 2,0). Rozmieszczenie RNA w komórce zmianom nie ulegało i pozostawało takie, jak w grupie kontrolnej. Kwas rybonukleinowy zajmował całą powierzchnię cytoplazmy i jąderka. Zmniejszenie natomiast ilości RNA obserwowano się w komórkach wątrobowych zwierząt głodzonych. W tych przypadkach zmniejszeniu ilości kwasu rybonukleinowego towarzyszyło inne jego rozmieszczenie w cytoplazmie komórki. Większa ilość RNA gromadziła się wokół jąder komórkowych w porównaniu z częścią obwodową cytoplazmy. Jąderka i na tych preparatach były silnie zabarwione (ryc. 1).

W porównaniu z grupą kontrolną u zwierząt pozostających na diecie bogatobiałkowej w komórkach wątrobowych wzrastała ilość białkowych grup SH. Ilość ta natomiast wyraźnie zmniejszała się u zwierząt głodzonych.



Ryc. 1. Na osi rzędnych wartości ekstynkcji, na osi odciętych grupy zwierząt; K — grupa kontrolna, B — zwierzęta na diecie białkowej, G — zwierzęta głodzone. On the ordinate there are given values of extinction, on the abscissa — groups of animals; K — controls, B — animals fed with products rich in protein, G — starved animals

Rozmieszczenie odczynu barwnego Barnetta i Seligmana świadczącego o obecności grup SH nie ulegało zmianie i u wszystkich trzech grup zwierząt było ono równomierne w obrębie całej cytoplazmy komórek wątrobowych.

Obserwowane przez nas zmiany ilościowe kwasu rybonukleinowego były niewielkie i wyrażały się różnicą ekstynkcji rzędu 0,1—0,2. Wahania ilościowe grup SH równały się różnicy ekstynkcji 0,3—0,6. Wydaje się być cechą charakterystyczną, że ze wzrostem ilości kwasu rybonukleinowego u zwierząt będących na diecie białkowej wzrasta ilość grup SH, ale w sposób bardziej wyraźny. Wyraźniejsze jest również zmniejszenie ilości grup SH w komórkach wątrobowych zwierząt głodzonych niż podobny proces, obserwowany u tych zwierząt, dotyczący kwasu rybonukleinowego.

W przypadku głodzenia na potrzeby ustroju częściowo zużyte zostało prawdopodobnie białko znajdujące się w komórkach wątrobowych, co wyrażało się zmniejszeniem ilości grup SH (od wartości ekstynkcji 2,1 u zwierząt kontrolnych do 1,5 u głodzonych). Zmniejszenie ilości białek mogło spowodować ich syntezę, a co za tym idzie — zmniejszenie ilości kwasu rybonukleinowego, który do tej syntezy jest zużywany. Zużycie kwasu rybonukleinowego do syntezy białek strukturalnych i zapasowych zostało wykazane w dojrzewającej komórce jajowej (Latański 3).

W komórkach wątrobowych zwierząt, które otrzymywały duże ilości białka w pożywieniu obserwowano się bardzo nieznaczny wzrost ilości RNA (od 1,9 do 2,0 wartości ekstynkcji) i bardziej wyraźny wzrost grup SH (w wartościach ekstynkcji od 2,1 do 2,4). Być może, że otrzymujący dużo białka ustrój nie zużytkowuje takich ilości białek komórkowych, jak w przypadku głodzenia. Przebiegająca w komórkach wątrobowych synteza białek prowadziła do nagromadzenia się zapasowych produktów syntezy, co było wyrażone większą ilością grup SH. Kwas rybonukleinowy nie był zużywany do syntezy białek w takich ilościach, jak w przypadku głodzenia i stąd ilość jego utrzymywała się prawie na poziomie kontroli.

Nasze obserwacje zdają się wskazywać, że stan całego organizmu, wywołany określonym rodzajem diety czy też głodem, znajduje wyraźne odbicie w komórkach wątrobowych, a szczególnie w ilości i rozmieszczeniu RNA w tych komórkach oraz w ilości grup SH.

PIŚMIENNICTWO

1. Gershbein L. L., Krotoszynski K.: Nucleic Acid and Succinic Dehydrogenase of the Liver Rat after X-Irradiation. *Science*, **124**, 81—82, 1956.
2. Królikowska-Prasał I.: Wpływ napromieniania ośrodkowego układu nerwowego promieniami X na kwasy nukleinowe komórek wątroby. *Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska. Lublin. Sec. D.* **15**, 73—86, 1960.
3. Latański M.: Badania nad kwasem rybonukleinowym i grupami sulfhydrylowymi w komórce jajowej. *Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska. Lublin. Sec. D.* **16**, 27—46, 1961.
4. Latański M.: Histochemiczne badania grup SH i kwasu RN w nabłonku pęcherza moczowego. *Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska. Lublin. Sec. D.* **17**, 319—323, 1962.
5. Love C. E., Rand R. N., Venkataraman P. R.: Effect of Cortisone and X-radiation of RNA and Glycogen Content of Rat Hepatocytes. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **98**, 692—696, 1958.
6. Petrakis N. J., Ashler P. M., Ferkel R. L.: Histochemical Studies of the Effect of Total Body X-irradiation in the Alkaline Phosphates, Ribonucleic Acid and Desoxyribonucleic Acid Content of Rat Liver Cells. *Neval Radiol. Def. Lab. Report. AD.* **126**, 1949.

OBJAŚNIENIA RYCIN

Ryc. 2. Grupa kontrolna. Komórki wątrobowe. Odczyn pyroninochłonny równomiernie rozmieszczony w całej cytoplazmie i w jąderkach. Jądra komórek niezabarwione. Mikroskop Lumipan C. Zeiss, Jena. Obiektyw 20 ×. Okular 12,5 ×. Mikrofot. Practina FX.

Ryc. 3. Grupa kontrolna. Komórki wątrobowe. Cała cytoplazma komórek zabarwiona czernią K. Odczyn barwny w obrębie jąder słaby. Mikroskop Lumipan C. Zeiss, Jena. Obiektyw 20 ×. Okular 12,5 ×. Mikrofot. Practina FX.

Ryc. 4. Zwierzęta na diecie białkowej. Komórki wątrobowe. Odczyn barwny z pyroniną równomiernie rozmieszczony w cytoplazmie. Nasilenie odczynu intensywne. W nie zabarwionych jądrach widoczne jąderka. Mikroskop Lumipan C. Zeiss, Jena. Obiektyw 20 ×. Okular 12,5 ×. Mikrofot. Practina FX.

Ryc. 5. Zwierzęta na diecie białkowej. Komórki wątrobowe. Odczyn Barnetta i Seligmana bardzo intensywny w obrębie cytoplazmy. Jądra komórek również zabarwione. Mikroskop Lumipan C. Zeiss, Jena. Obiektyw 20 ×. Okular 12,5 ×. Mikrofot. Practina FX.

Ryc. 6. Zwierzęta głodzone. Komórki wątrobowe. Nierównomierny odczyn barwny z pyroniną w obrębie cytoplazmy, wyraźny wokół jąder. Jąderka silnie zabarwione. Mikroskop Lumipan C. Zeiss, Jena. Obiektyw 20 ×. Okular 12,5 ×. Mikrofot. Practina FX.

Ryc. 7. Zwierzęta głodzone. Komórki wątrobowe. Zabarwienie czernią K mało nasilone, równomierne w obrębie całej cytoplazmy. Jądra nie zabarwione. Mikroskop Lumipan C. Zeiss, Jena. Obiektyw 20 ×. Okular 12,5 ×. Mikrofot. Practina FX.

РЕЗЮМЕ

Микроскопический анализ гистологических препаратов, приготовленных из печени крыс, остающихся на белковой диете и подвергнутых голоданию, обнаруживает изменения в содержании SH — групп, а также в содержании и размещении RNA. При белковом питании отмечается увеличение содержания обоих компонентов. В случае голодания в клетках печени крыс происходит отчетливое понижение относительно содержания RNA и SH — групп, причем изменяется также размещение RNA состоящее в том, что она преимущественно накапливается около ядер клеток печени.

Рис. 1. На оси ординат отложены величины экстинкции, на оси абсциса — группы животных. К — контрольная группа, В — животные, кормимые белком, G — животные голодающие.

Рис. 2. Контрольная группа. Клетки печени. Реакция поглощения пиронита равномерно распределена по всей цитоплазме и в ядрышках. Клеточные ядра неокрашенные. Микроскоп Lumipan C. Zeiss, Jena. Объектив — 20 х, окуляр 12,5 х, микрофото Practina FX.

Рис. 3. Контрольная группа. Клетки печени. Вся цитоплазма клеток окрашена черным К. Цветная реакция в пределах ядер слабо заметная. Микроскоп Lumipan C. Zeiss, Jena. Объектив 20 х, окуляр 12,5 х, микрофото Practina FX.

Рис. 4. Животные, которых кормили белком. Клетки печени. Интенсивная цветная реакция с пиронином равномерно размещена в цитоплазме. В неокрашенных ядрах заметны ядрышки. Микроскоп Lumipan C. Zeiss, Jena. Объектив 20 х, окуляр 12,5 х, микрофото Practina FX.

Рис. 5. Животные, которых кормили белком. Клетки печени. Реакция по Барнетту и Зелигману очень интенсивная в пределах цитоплазмы. Клеточные ядра также окрашены. Микроскоп Lumipan C. Zeiss, Jena. Объектив 20 х, окуляр 12,5 х. Микрофото Practina FX.

Рис. 6. Животные, подвергнутые голоданию. Клетки печени. Неравномерная цветная реакция с пиронином в цитоплазме, более интенсивная в окооядерной зоне. Ядрышки интенсивно окрашенные. Микроскоп Lumipan C. Zeiss, Jena. Объектив 20 х, окуляр 12,5 х, микрофото Practina FX.

Рис. 7. Животные, подвергнутые голоданию. Клетки печени. Окраска, вызванная черным К, мало интенсивна, но равномерная по всей цитоплазме. Ядра неокрашенные. Микроскоп Lumipan C. Zeiss, Jena, объектив 20 х, окуляр 12,5 х, микрофото Practina FX.

SUMMARY

A microscopic analysis of histochemical preparations of the liver of rats kept on protein diet and starved, shows some changes in the number of SH groups and in the number and distribution of RNA in cells, both being increased if the animals were given products containing

protein. In the cells of the liver of starved rats a decrease in the relative content of RNA and the number of SH groups was observed. A decrease in the amount of RNA is accompanied by some changes in its distribution: RNA aggregates round the nuclei of liver cells.

EXPLANATION OF FIGURES

Fig. 2. Control group. Liver cells. Reaction with pyronine uniformly distributed in the whole cytoplasm and nucleoli. The nuclei of cells unstained. Microscope Lumipan C. Zeiss, Jena. Objective 20 ×. Ocular 12.5 ×. Microphot. Practina FX.

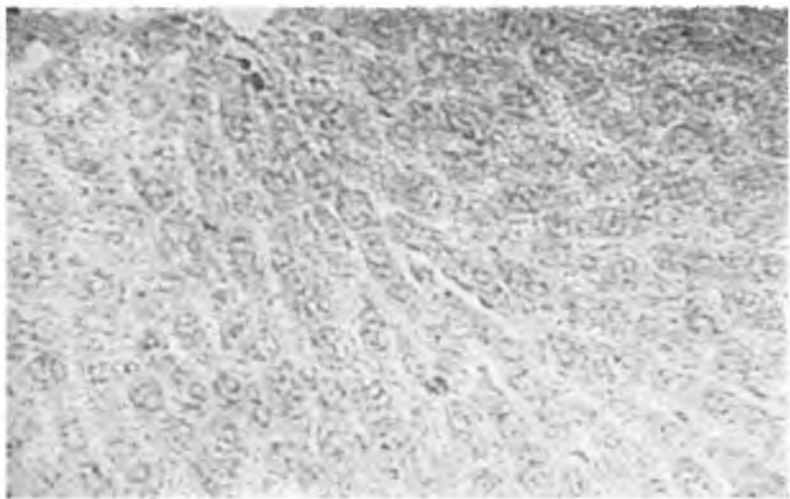
Fig. 3. Control group. Liver cells. The whole cytoplasm of the cells stained with back K. Staining within the nuclei — weak. Microscope Lumipan C. Zeiss, Jena. Objective 20 ×. Ocular 12.5 ×. Microphot. Practina FX.

Fig. 4. The animals kept on protein diet. Liver cells. Coloured reaction with pyronine uniformly distributed in the cytoplasm. The colour of the reaction intense. Nucleoli visible in unstained nuclei. Microscope Lumipan C. Zeiss, Jena. Objective 20 ×. Ocular 12.5 ×. Microphot. Practina FX.

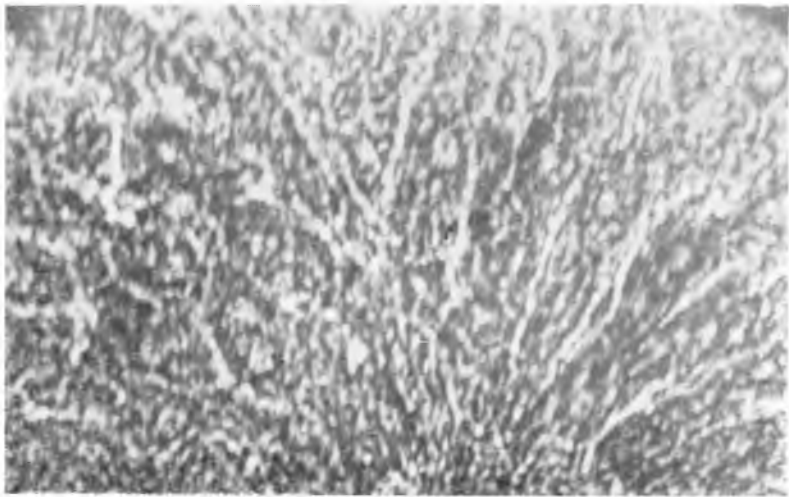
Fig. 5. The animals kept on protein diet. Liver cells. Barnett and Seligman's reaction is very intense in the cytoplasm. The nuclei of the cells are also stained. Microscope Lumipan C. Zeiss, Jena. Objective 20 ×. Ocular 12.5 ×. Microphot. Practina FX.

Fig. 6. Starved animals. Liver cells. Coloured reaction with pyronine, not uniform within the cytoplasm; it is more intense around the nuclei. The nucleoli strongly stained. Microscope Lumipan C. Zeiss, Jena. Objective 20 ×. Ocular 12.5 ×. Microphot. Practina FX.

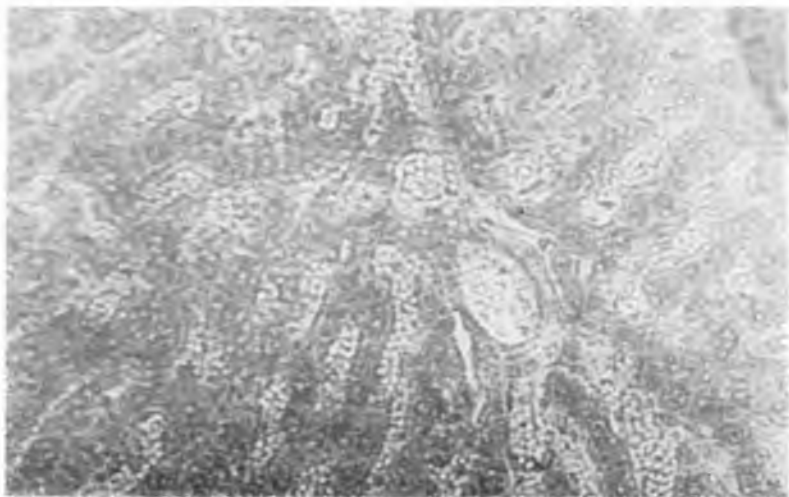
Fig. 7. Starved animals. Liver cells. Weak staining with the black K, uniform within the whole cytoplasm. Nuclei unstained. Microscope Lumipan C. Zeiss, Jena. Objective 20 ×. Ocular 12.5 ×. Microphot. Practina FX.



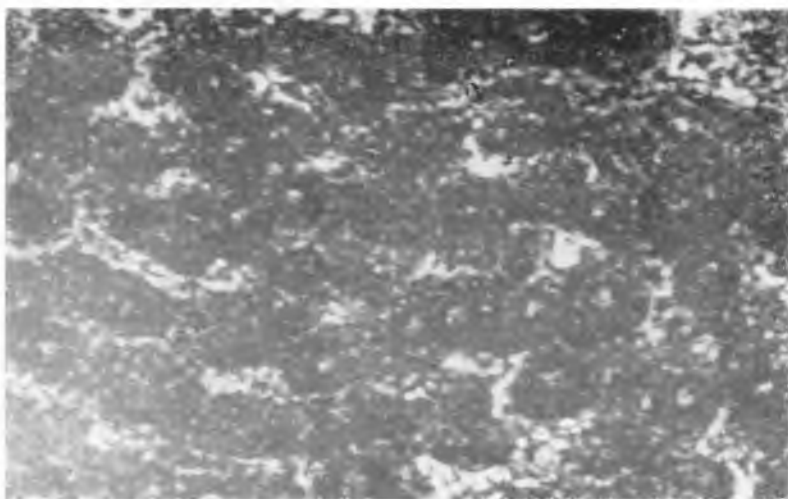
Ryc. 2



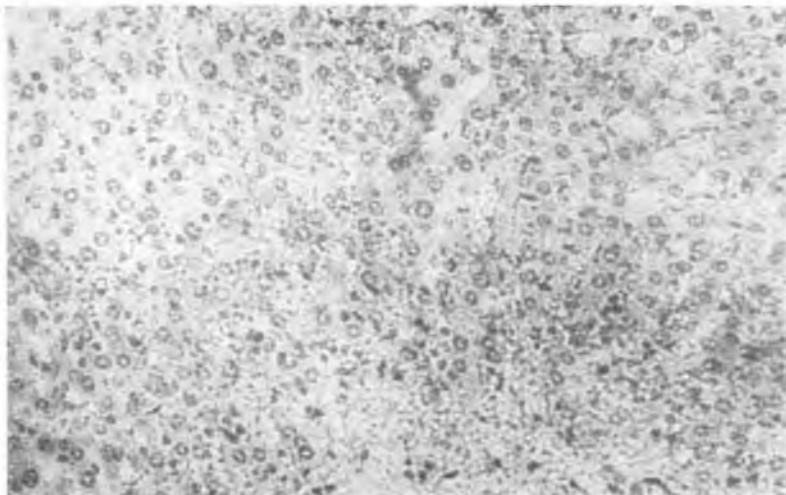
Ryc. 3



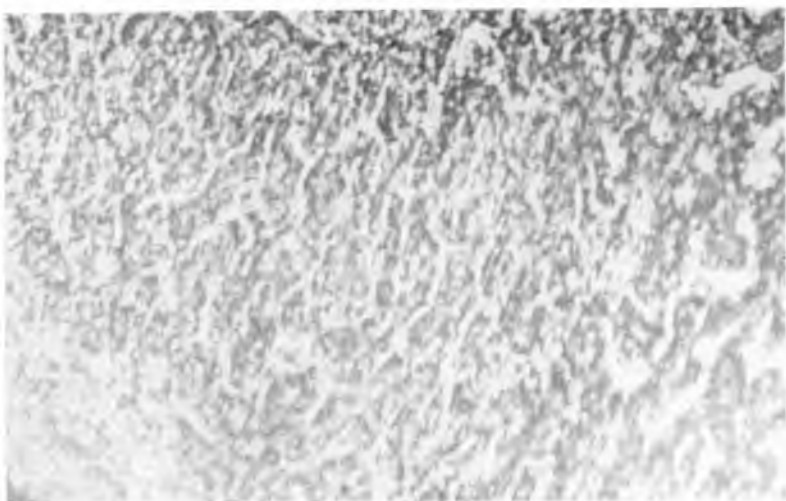
Ryc. 4



Ryc. 5



Ryc. 6



Ryc. 7

