

ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN—POLONIA

VOL. XVI, 8

SECTIO D

1961

Z Katedry i Zakładu Histologii i Embriologii Wydziału Lekarskiego Akademii Medycznej
w Lublinie

Kierownik: prof. dr med. Stanisław Grzycki

Stefan DUBAS

Występowanie RNA pozakomórkowo w wątrobie myszy białej

Внеклеточная рибонуклеиновая кислота в печени белой мыши

Extracellular Occurrence of RNA in the Liver of White Mice

Współczesne poglądy na rozmieszczenie i rolę biologiczną kwasu rybonukleinowego (RNA) są dokładnie określone. Podstawowe prace z tej dziedziny J. Bracheta (1959, 1960, 1961), E. Baltus (1954, 1957), Ficq (1960) i Casperssona (1950) określają biosyntezę RNA i białek w komórce, jak również zachodzącą w niej współzależność jądrowo-cytoplazmatyczną.

W bogatej literaturze, dotyczącej rozmieszczenia RNA nie spotkałem opisu występowania pozakomórkowego, a śledząc jego rozmieszczenie w komórkach wątroby myszy białej obserwowałem obrazy świadczące o jego istnieniu w przestrzeniach międzykomórkowych.

MATERIAŁ I METODYKA BADAŃ

Do obserwacji nad rozmieszczeniem RNA w komórkach wątrobowych użyto myszy białych jednego gatunku, karmionych dietą standardową. Wycinki wątroby utrwalano w płynach Zenkera i Serra, i po odwodnieniu zatopiono w parafinie. Obserwacje mikroskopowe przeprowadzono na: 1) skrawkach mikrotomowych grubości 3—5 mikronów barwionych wg metody Unny podanej przez Bracheta, 2) skrawkach poddanych działalności enzymatycznej rybonukleazy wg Bracheta i 3) skrawkach niebarwionych, badanych w mikroskopie fazowo-kontrastowym, używając płynów pośrednich o różnym współczynniku załamania światła. Ostatnią grupę przebadano w świetle ultrafioletowym.

BADANIA WŁASNE

Obserwacje skrawków mikrotomowych wątroby zabarwionych mieszaniną zieleni metylowej i pyroniny (U n n a) pozwoliły wykazać obecność i rozmieszczenie kwasów nukleinowych. Odczyn pyroninochłonny wykazujący obecność RNA można obserwować w proctoplazmie podstawowej, w licznych jąderkach jądra komórkowego i w przestrzeniach

międzykomórkowych, a przede wszystkim w ograniczonych przestrzeniach cytoplazmy komórek układu siateczkowo-śródbłonkowego wątroby względnie w ich sąsiedztwie (ryc. 1). W przestrzeniach międzykomórkowych środkowej części zrazików wątrobowych występowało zabarwienie pyroniną od bardzo delikatnego, dyfuzyjnego odczynu do intensywnej barwy różowo-czerwonej. Odczyn ten występował w dużym nasileniu w bezpośrednim sąsiedztwie niektórych komórek Browicza. W bezpośrednim sąsiedztwie tych komórek kwas rybonukleinowy formował się w różnokształtne twory: owalne, kuliste, półksiężycowate i nieregularnie wieloboczne. Bardzo często można było zauważyć wypustki komórek Browicza zdążające w kierunku tych tworów, względnie już otaczające je. Obrazy te przypominały znane zjawisko fagocytozy, co niewątpliwie świadczy, że RNA występujący pozakomórkowo zachowuje się jak ciało obce.

Dla upewnienia się czy oglądane pyroninochłonne twory i różowoczerwone zabarwienie pyroniną substancji występującej w przestrzeniach międzykomórkowych są rzeczywiście nagromadzeniem RNA, przeprowadzono badania kontrolne przez zastosowanie metody Bracheta z rybonukleazą krystaliczną i obserwacji w świetle ultrafioletowym mikroskopu fluorescencyjnego. Działalność rybonukleazy na opisywane twory jest identyczna do jej działania trawiącego RNA jąderka i cytoplazmy.

Należy jednak stwierdzić, że przy stężeniu 0,2 mg enzymu/ccm roztworu zostaje całkowicie zniesiona pyroninochłonność jąderek i cytoplazmy komórek wątrobowych, a utrzymuje się nadal pyroninochłonność nagromadzonego RNA w sąsiedztwie i cytoplazmie komórek Browicza. Całkowity zanik pyroninochłonności uzyskuje się przy stężeniu 0,9—1,0 mg/ccm. Fakt ten może wskazywać na obecność dużych ilości RNA w tych tworach.

W świetle ultrafioletowym obraz absorpcji promieni przez RNA pokrywa się z obrazem uzyskanym po zabarwieniu pyroniną (ryc. 3).

Badania histochemiczne zostały uzupełnione badaniami refraktometrycznymi, które jak mieliśmy możność niejednokrotnie się przekonać, stanowią nieodłączną część badań histochemicznych różnych struktur. W tym celu skrawki mikrotomowe niebarwione poddano obserwacjom w świetle fazowo-kontrastowym, używając różnych płynów pośrednich o znanym współczynniku załamania światła (ryc. 2, 4, 5, 6). Po zamknięciu skrawków w benzenie ($RI = 1.4983$) uzyskano pełną fazę dodatnią tworów będących w kontakcie z komórkami Browicza. Tę samą fazę posiadały jąderka i cytoplazma podstawowa. Twory te nigdy nie wykazywały żadnej struktury wewnętrznej. Fazę zerową struktur komórkowych zawierających RNA uzyskano przy $RI = 1.5451$ (benzaldehyd) (ryc. 4),

a opisywane twory zachowały nadal fazę dodatnią. Dopiero zastosowanie o-nitrotoluenu ($RI = 1.5462$) dawało możliwość uzyskania ich fazy zerowej przy równoczesnym wystąpieniu niepełnej fazy ujemnej jąderek i cytoplazmy podstawowej. Przesunięcie fazy zerowej jest prawdopodobnie wynikiem znikomej zawartości białka w tych tworach. Stwierdzenie to może być również potwierdzone obrazami fazowo-kontrastowymi uzyskanymi na preparatach poddanych działaniu rybonukleazy. Zamknięcie skrawków po zadziałaniu na nich rybonukleazą w czterochlorku węgla, lub benzenie dawało bardzo charakterystyczny obraz zupełnie pustej fazowo ujemnej przestrzeni, obrzeżonej cienką fazowo dodatnią obwódką (ryc. 6). W miejscu tej pustej fazowo ujemnej przestrzeni, posiadającej ten sam współczynnik załamania światła, jaki posiada użyty płyn pośredni, na preparatach przed zadziałaniem rybonukleazą można było obserwować ten sam obraz morfologiczny o odwrotnej — dodatniej fazie. Cienka otoczka ograniczająca skupienie RNA jest charakteru błonki białkowej i zachowuje niezmienny współczynnik załamania światła przed i po zadziałaniu rybonukleazą.

RNA występujący w przestrzeniach międzykomórkowych i komórkach Browicza w swoich skupieniach nie wykazywał żadnej struktury wewnętrznej, co spowodowane może być prawdopodobnie jednorodnym składem chemicznym. Identyfikacja uzyskanych obrazów z drobnoustrojami wypadła ujemnie, już sama wielkość i różnorodność opisywanych tworów (zgrupowań RNA) wykluczała możliwość pochodzenia bakteryjnego. Barwienie skrawków metodą Grama nie wykazało obecności drobnoustrojów. Również zachowanie się układu siateczkowo-śródbłonkowego wątroby nie wykazywało żadnych cech stanu zapalnego gruczołu. Wyklucza się również identyfikację tych tworów z pasożytami, lub ich jajami, gdyż tak ich wygląd morfologiczny, jak i struktura wewnętrzna nie przypominały żadnego ze znanych pasożytów lub ich jaj.

Analiza pochodzenia RNA występującego pozakomórkowo i gromadzonego w komórkach Browicza nie rozwiązuje zagadnienia czy jest on wynikiem wzmożonej przemiany materii w komórce wątrobowej i przejścia niskopolimeryzowanej, rozpuszczalnej frakcji RNA, nie związanej w strukturach rybosomalnych przez błonę komórkową. Istnieje również możliwość pochodzenia RNA z rozpadających się komórek wątrobowych. W tym celu przeprowadzono badania nad wątrobą psa z podwiązaną tętnicą wątrobową. Po 3 i 7 dniach po podwiązaniu tętnicy wątrobowej, w gruczole obserwowano rozległą martwicę i rozpad komórek, nigdy jednak nie udało się zaobserwować RNA pozakomórkowo.

PISMIENNICTWO

1. Baltus E.: Observations sur le rôle biochimique du nucléole. *Biochim. et Biophys Acta* 15, 263, 1954.
2. Baltus E.: Observations sur le rôle biochimique du nucléole. Thèse de Doctorat Univ. libre de Bruxelles 1957.
3. Brachet J.: Rôle biologique des acides nucléiques. Bruxelles 1959.
4. Brachet J.: *Biochemical Cytology*. Academic Press, N. Y. 1960.
5. Brachet J.: *The Cell*. Academic Press, N. Y. 1961.
6. Caspersson T.: *Cell Growth and Cell Function*. Norton N. Y. 1950.
7. Ticq A.: *Problèmes d'ultrastructures et de fonctions nucléaires*. Masson et Cie. Paris 1959.

РЕЗЮМЕ

На основании проведенных гистохимических и рефрактометрических исследований а также результатов, полученных при употреблении ультрафиолетовых лучей, автор приходит к заключению, что может находиться в печени белой мыши внеклеточная рибонуклеиновая кислота. Рибонуклеиновая кислота может быть в межклеточных пространствах, а также возможно ее накопление в клетках Бровича путем фагоцитоза. Скопления рибонуклеиновой кислоты поблизости клеток Бровича и в них самих могут приобретать разные формы: овальную, шаровидную, многоугольную, полулунную и т.д. Эти образования, содержащие рибонуклеиновую кислоту обладают очень значительной пиронинофильностью. Коэффициент преломления света этих образований близок к таковому для ядрышка и цитоплазмы.

Рис. 1. Печень белой мыши. Фиксирование жидкостью Серра. Окрашивание смесью метилгрюна с пиронином (Унна). В просвете капилляра видна клетка Бровича с крупным шариком интенсивно окрашенным пиронином. Микроскоп Nf Ц. Цейсс, Йена. Иммерсионный объектив 100/1,25. Окуляр К 12,5x Т. Микрофот Ехаста Vorex IIa.

Рис. 2. Печень белой мыши. Фиксирование жидкостью Серра. Препарат неокрашенный. Фазоотрицательная картина цитоплазмы клетки. Бровича и шаровидного скопления рибонуклеиновой кислоты. Диметиланилин RI = 1,5589. Фазовоконтрастный микроскоп Nf Ц. Цейсс, Йена. Иммерсионный объектив Ph III 90/1,25. Окуляр К 12,5x Т. Микрофот, Ехаста Vorex IIa.

Рис. 3. Печень мыши. Препарат неокрашенный, наблюдаемый в ультрафиолетовом свете. Видно поглощение лучей рибонуклеиновой кислотой в межклеточных пространствах и в клетке Бровича. Флюоресцентный микроскоп Ц. Цейсс, Йена. Микрофот. Ехаста Vorex IIa.

Рис. 4. Печень мыши. Фиксирование жидкостью Серра. Препарат неокрашенный. Видно фазовоположительные образование с накоплением рибонуклеиновой кислоты. Печеночные клетки и клетки Бровича в нулевой фазе. Бензальдегид RI = 1.5451. Фазово-контрастной микроскоп Nf. Ц. Цейсс, Йена. Иммерсионный объектив Ph III 90/1,25. Окуляр К 12,5x Т. Микрофот. Ехаста Vorex IIa.

Рис. 5. Как и на рис. 4. Образование из рибонуклеиновой кислоты в отрицательной фазе. Диметиланилин $RI = 1,5583$. Фазово-контрастный микроскоп Nf. Ц. Цейсс, Йена. Иммерсионный объектив Ph HI 90/1,25. Окуляр К 12,5х Т. Микрофот. Ехаста Vorex IIa.

Рис. 6. Как на рис. 4 и 5. Препарат подвергнут действию рибонуклеазы. В фазовоконтрастном свете видны пустые места после вытравления рибонуклеиновой кислоты. Бензол $RI = 1,4983$. Фазовоконтрольный микроскоп Nf. Ц. Цейсс, Йена. Иммерсионный объектив Ph HI 90/1,25. Окуляр К 12,5х Т. Микрофот. Ехаста Vorex IIa.

SUMMARY

Histochemical, refractometric and ultraviolet fluorescence investigations brought the author to the conclusion that ribonucleic acid (RNA) can occur extracellularly in the liver of mice. RNA can be distributed in intercellular spaces, or thanks to phagocytosis it can accumulate in Browicz's cells. The accumulations of RNA near and in Browicz's cells can take various shapes: they can be oval, spherical, polygonal, crescent-like, etc. The formations which contain RNA are characterized by a very strong affinity to pyronine. Their light refraction coefficient approaches that of RI of the nucleolus and cytoplasm.

Fig. 1. Liver of white mouse, fixed in Serra's liquid. Stained with a mixture of methyl green and pyronine (Unna). In the lumen of a capillary Browicz's cell is seen, containing a large ball intensely stained with pyronine. Microscope Nf C. Zeiss, Jena. Immersion objective 100/1.25. Ocular K. 12.5 \times T. Microphot. Exacta Vorex II a.

Fig. 2. Liver of white mouse, fixed in Serra's liquid, unstained. Negative phase picture of cytoplasm of Browicz's cell and of spherical accumulation of RNA. Dimethylaniline 1.5589. Phase-contrast microscope Nf C. Zeiss, Jena. Immersion objective Ph HI 90/1.25. Ocular K 12.5 \times T. Microphot. Exacta Verax IIa.

Fig. 3. Liver of mouse. Preparation unstained, seen in ultraviolet light. Rays absorbed by RNA in intercellular spaces and in Browicz's cell. Fluorescence microscope C. Zeiss, Jena Microphot. Exacta Vorex IIa.

Fig. 4. Liver of mouse, fixed in Serra's liquid, unstained. A positive phase formation is seen, containing an accumulation of RNA. Liver cells and Browicz's cells in zero phase. Benzaldehyde 1.5451. Phase-contrast microscope Nf C. Zeiss, Jena. Immersion objective Ph HI 90/1.25. Ocular K 12.5 \times T. Microphot Exacta Vorex IIa.

Fig. 5. Same as in Fig. 4. The formation with RNA in negative phase. Dimethylaniline 1.5583. Phase-contrast microscope Nf C. Zeiss, Jena. Immersion objective Ph HI 90/1.25. Ocular K 12.5 \times T. Microphot. Exacta Vorex II a.

Fig. 6. Same as in Figs. 4 and 5. Preparation subjected to the action of ribonuclease. Empty spaces left by decomposed RNA are seen. Benzene 1.4983. Phase-contrast microscope Nf C. Zeiss, Jena. Immersion objective PH HI 90/1.25. Ocular K 12.5 \times T. Microphot. Exacta Vorex II a.

Papier druk-sat III kl. 80 gr.
Annales U.M.C.S., Lublin 1961.
800+60 egz. D-4

70 x 100

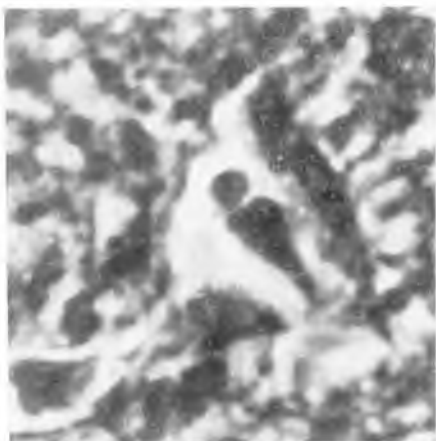
Lub. Druk. Pras. — Lublin Unicka 4

Data otrzymania manuskryptu 23.II.62 r.

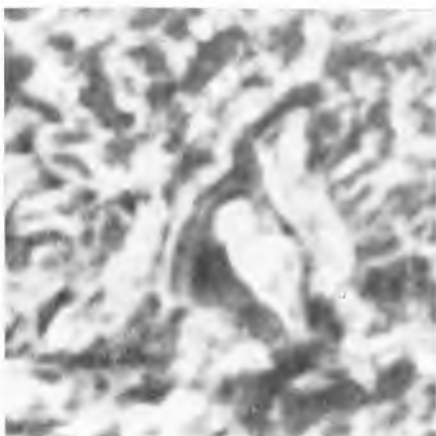
Druku 5 str. + 2 tabl.

Zam. 795 23.II.62 r.

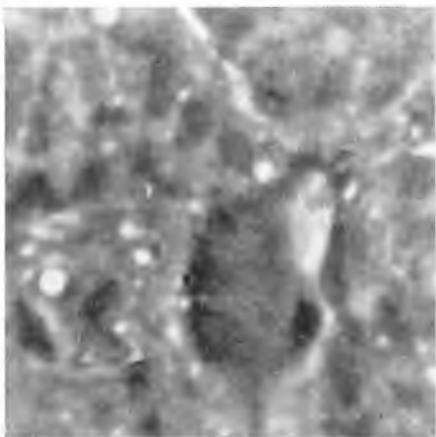
Data ukończenia druku 14.VIII.62.



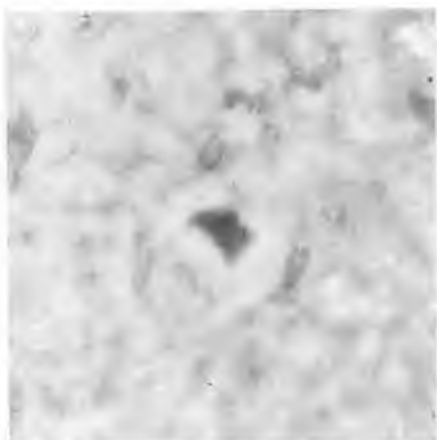
Ryc. 1. Wątroba myszy białej. Utrwalanie płynem Serra, barwienie mieszaniną zieleni metylowej z pyroniną (Unna). W świetle naczynia włosowatego widoczna komórka Browicza z dużą kulą intensywnie wybarwioną pyroniną. Mikroskop Nf C. Zeiss, Jena. Obiektyw immersyjny 100/1.25. Okular K 12,5 × T. Mikrofot. Exacta Varex IIa



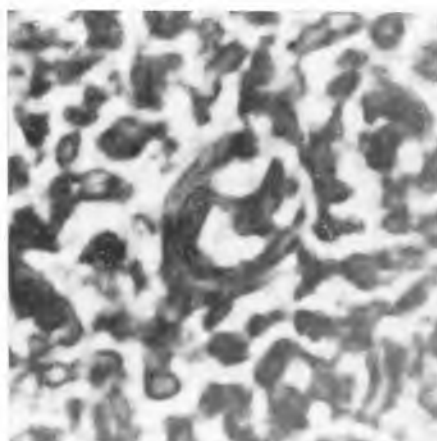
Ryc. 2. Wątroba myszy białej. Utrwalanie płynem Serra. Preparat nie barwiony. Fazowo ujemny obraz cytoplazmy komórki Browicza i kulistego zgrupowania RNA. Dwumetyloanilina RI = 1.5589. Mikroskop fazowo-kontrastowy Nf C. Zeiss, Jena. Obiektyw immersyjny Ph HI 90/1.25. Okular K 12,5 × T. Mikrofot. Exacta Varex IIa



Ryc. 3. Wątroba myszy. Preparat nie barwiony, oglądany w świetle ultrafioletowym. Widoczna absorpcja promieni przez RNA w przestrzeniach międzykomórkowych i w komórce Browicza. Mikroskop fluorescencyjny C. Zeiss, Jena Mikrofot. Exacta Varex IIa.



Ryc. 4. Wątroba myszy. Utrwalanie płynem Serra. Preparat nie barwiony. Widoczny fazowo dodatni twór z nagromadzonym RNA. Komórki wątrobowe i Browicza w fazie zerowej. Benzaldehyd RI = 1.5451. Mikroskop fazowo-kontrastowy Nf C. Zeiss, Jena. Obiektyw immersyjny Ph HI 90/1.25. Okular K 12,5 × T. Mikrofot. Exacta Varex IIa



Ryc. 5. Jak na ryc. 4. Twór z RNA w fazie ujemnej. Dwumetyloanilina RI = 1.5583. Mikroskop fazowo-kontrastowy Nf C. Zeiss, Jena. Obiektyw immersyjny Ph HI 90/1.25. Okular K 12,5 × T. Mikrofot. Exacta Varex IIa



Ryc. 6. Jak na ryc. 4 i 5. Preparat poddany działaniu rybonukleazy. W świetle fazowo-kontrastowym widoczne puste miejsca po wytrawieniu RNA. Benzen RI = 1.4983. Mikroskop fazowo-kontrastowy Nf C. Zeiss, Jena. Obiektyw immersyjny Ph HI 90/1.25. Okular K 12,5 × T. Mikrofot. Exacta Varex IIa