

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

K r y s t y n a C Z E R N Y

**Badania histochemiczne enzymów hydrolitycznych (fosfatazy kwaśnej,
fosfatazy zasadowej, 5-nukleotyduazy i esteraz niespecyficznych)
w komórkach nerki w warunkach doświadczalnych**

**Гистохимические исследования над гидролазами (кислой фосфатазой,
щелочной фосфатазой, 5-нуклеотидазой и неспецифическими
эстеразами) в клетках почки в опытных условиях.**

**Histochemical Investigation on Hydrolytic Enzymes (Acid Phosphatase,
Alkaline Phosphatase, 5-Nucleotidase and Non Specific Esterases)
in the Kidney Cells under Experimental Conditions**

Rozszerzenie kanalików nefronu i równoczesne zapadanie się niektórych jego odcinków w ostrym wodonerczu opisał Suzuki (42), który po podwiązaniu moczowodu u szczura i królika wyróżnił trzy okresy: 1) początkowe ogólne rozszerzenie systemu kanalików i przestrzeni torebkowych, 2) zapadanie się niektórych kanalików głównych i pętli Henlego oraz 3) zapadanie się po czterech tygodniach kanalików krętych II rzędu i cewek zbiorczych. Podobną kolejność zjawisk obserwował Novikoff (32). Morfologiczne zmiany są tylko podłożem, na którym zarysowuje się szereg charakterystycznych i interesujących zjawisk. Jedną z najwcześniej opisanych zmian w nerce po podwiązaniu moczowodu był wzrost ilości podziałów mitotycznych, znacznie bardziej zaznaczony aniżeli w nerce po stronie moczowodu nie podwiązanego. Jednocześnie w jądrach komórkowych kanalików głównych po stronie moczowodu podwiązanego nie stwierdzono zmian w zawartości kwasu dezoksyrybonukleinowego, a po drugiej stronie występowało nawet zmniejszenie intensywności odczynu Feulgena (15).

Zaburzenia enzymatyczne w komórkach nerki spowodowane wodonerczem były przedmiotem zainteresowania niewielu histochemików. Harry i Wilmer (20) zwrócili uwagę na spadek aktywności fosfatyz w nerce po podwiązaniu moczowodu, nie mówiąc jednak o które fosfatazy chodzi i nie tłumacząc z czym związane jest to zmniejszenie czynności. Podobne spostrzeżenia odnośnie zachowania lipazy i fosfatazy zasadowej spotyka się w pracy Wachsteina (49). W materiale pobranym w 10 i 12 dni po operacji Wachstein stwierdził ogniskowe

zmniejszenie aktywności lipazy zarówno w komórkach rozszerzonych, jak i zapadniętych kanalików.

Tak samo zachowywała się wykrywana w skrawkach parafinowych wg metody Gomoriego fosfataza zasadowa. W dalszych swych pracach Wachstein (52) opisał zmniejszenie się aktywności esteraz niespecyficznych po podwiązaniu moczowodu. Przecinając moczowód między dwoma podwiazkami, a następnie badając odczyny wykazujące aktywność fosfataz w nerce, Frankö i Niemi (14) zauważyli już po 24 godzinach zmniejszenie aktywności fosfatazy kwaśnej i zasadowej. Nie były to badania cytochemiczne, raczej histochemiczne, bowiem autorzy ograniczyli się do stwierdzenia, że odczyny wykazujące aktywność obu fosfataz zmniejszały się po eksperymentcie. W wypadku gdy nie przecinano moczowodu a tylko zaciskano podwiazkę, zmiany były odwracalne.

W r. 1954 de Duve i współprac. (9) zwrócili uwagę na istnienie lizosomów, a w dalszych badaniach rozwinęli to zagadnienie (10, 11), sądząc, że dzięki wartości pewnych fermentów mogą odgrywać one ważną rolę w procesach litycznych. Okazało się bowiem, że lizosomy zamykają w swym wnętrzu komplet hydrolaz takich jak: kwaśna rybonukleaza, kwaśna dezoksyrybonukleaza, kwaśna fosfataza, fosfataza fosfoproteinowa, katepsyny, β N acetyloglukozamidaza, β galaktozydaza, α mannozydaza, arylsulfataza A i B oraz inne. Dzięki temu lizosomy mogą być wykrywane poprzez reakcje histochemiczne, wykazujące aktywność enzymów w nich zawartych. Novikoff (31, 32, 33, 34, 35), wywołując doświadczalnie procesy degeneracji komórek, obserwował w cytoplazmie powiększenie ziaren zawierających fosfatazę kwaśną, które oglądane w mikroskopie elektronowym były lizosomami posiadającymi w swym wnętrzu resztki zniszczonych mitochondriów i struktur ergastoplazmatycznych. Obecność degenerującej cytoplazmy w kropelkach kwaśnej fosfatazy we wczesnych stadiach uszkodzenia komórek i wyraźny rozrost struktur zawierających kwaśną fosfatazę obserwowane przez Novikoffa były poparciem zapatrywań de Duve na rolę lizosomów w procesach litycznych.

W naszej pracy przeprowadzono badania na nerce pobranej w niewielkich odstępach czasu od chwili jednostronnego podwiązania moczowodu. Obserwowano zmiany zachodzące w kanalikach nerki, zwracając szczególną uwagę na zachowanie się enzymów hydrolitycznych, biorących udział zarówno w nie zaburzonej czynności nefronu, jak i w postępujących w nim zmianach wstecznych. Zwrócono także uwagę na występowanie substancji PAS dodatnich oraz przebadano okresowe wahania ilości podziałów mitotycznych. Starano się przeanalizować czy istnieje współzależność między uruchomieniem tego mechanizmu a zmianami aktywności enzymatycznej. Stwierdzony bowiem przez wielu autorów (22, 15) niezwykle silny odczyn regeneracyjny przystania w pewnym okresie wodonercza proces powolnej degeneracji i dlatego — wydaje się nam — nie można brać pod uwagę przy rozpatrywaniu zmian zachodzących w podwiązanej nerce — jedynie degeneracji tego narządu. W badaniach naszych uwzględniono również zmiany zachodzące w nerce po stronie nie operowanej, porównując je z wynikami otrzymanymi na skrawkach histologicznych z narządu operowanego.

MATERIAŁ I METODY BADAŃ

Badania wykonano na szczurach białych (*Rattus rattus* L. *albino*) hodowli własnej. Zwierzęta doświadczalne, ośmiomiesięczne samce, wagi ca 170 g, operowano w znieczuleniu ogólnym, podwiązując lewy moczowód, a następnie w okre-

ślonych odstępach czasu zabijano poprzez skrawienie w lekkiej narkozie eterowej. Równocześnie u szczurów, które potem stanowiły materiał kontrolny, przecinano powłoki i po nakłuciu tkanek w okolicy moczowodu, zaszywano warstwowo.

Zwierzęta podzielono na dziewięć grup. W każdej grupie znalazły się trzy szczury z jednostronnym wodonerczem i jeden kontrolny po laparotomii próbnej. Materiał pobierano zawsze między 9 a 10 godz. z obu nerek i utrwalano w temperaturze 4°C w mieszaninie obojętnego roztworu formaliny z chlorkiem wapnia według Bakera (2), w oziębionym bezwodnym acetonie oraz w płynach według Zenkera, Carnoy, Gendre i Serra. Pierwszą grupę stanowiły zwierzęta, z których pobrano materiał po 6 godz. od chwili operacji, drugą grupę — po 12 godz., trzecią po 24 godz., czwartą grupę po 48 godz., piątą po 3 dniach od operacji, szóstą po 7 dniach, siódmą po 10 dniach, ósmą po 14 dniach, a dziewiątą grupę po 21 dniach od czasu operacji.

Badania histochemiczne polegały na wykonaniu odczynów wykazujących aktywność fosfatazy kwaśnej, fosfatazy zasadowej, 5-nukleotyduzy, esteraz niespecyficznych oraz dodatkowo wykonano odczyny wykazujące obecność kwasu dezoksyrybonukleinowego (DNA), substancji PAS dodatnich a także wykrywano chondriom komórkowy. U wszystkich zwierząt doświadczalnych i u wybranych kontrolnych określono indeks metafaz w częściach korowych obu nerek. U pozostałych zwierząt kontrolnych zaniechano liczenia metafaz wobec braku istotnych różnic w ilości podziałów mitotycznych.

Aktywność enzymów hydrolitycznych wykrywano w skrawkach grubości 10 μ skrawanych na mikrotomie do zamrażania oraz w skrawkach parafinowych z materiału utrwalonego w zimnym bezwodnym acetonie (fosfataza zasadowa). Aktywność fosfatazy kwaśnej badano wg Gomoriego (18), stosując zgodnie z zaleceniami Vorbrodta pH środowiska 5,4. Czynność fosfatazy zasadowej wykazywano wg metody kobaltowej Gomoriego w modyfikacji Vorbrodta (45). W celu wykazania czynności 5-nukleotyduzy w pH 8,3 skrawki inkubowano wg Gomoriego w modyfikacji Vorbrodta (45). Aktywność esteraz niespecyficznych w pH 7,4 wykrywano używając octanu α naftolu oraz naftolu AS, które sprzęgano z Fast Blue B produkcji Hoechst, stosując znaczną ilościową przewagę barwnika wg metody Lojdy, co pozwoliło na dokładniejszy obraz rozmieszczenia enzymów w komórce (55). Czas inkubacji dla poszczególnych hydrolaz wynosił: dla fosfatazy zasadowej 45 min., dla 5-nukleotyduzy 60 min., a dla esteraz niespecyficznych — 5 min.

DNA barwiono zgodnie z metodą Feulgena, przy czym optymalny czas hydrolizy wynosił 6 min. Na wybarwionych skrawkach obliczano indeks metafaz. Liczono stadia metafazy, a nie w ogóle mitozy, ponieważ nie stosowano kolchicyny przed zabiciem zwierząt. Indeks metafaz prześledzono w obu nerkach u wszystkich zwierząt doświadczalnych oraz w nerkach po stronie laparotomii próbnej u 5 wybranych kontrolnych. Każdorazowo liczono ilość metafaz na 4 000 komórek kory nerki. Substancje PAS dodatnie natomiast wykazywano na skrawkach utrwalonych w mieszaninie Gendre wg metody Mac Manusa (27). Glikogen hydrolizowano diastazą. Stosowano także dimedon dla blokowania grup aldehydowych (Bulmer D. (5). Chondriom komórkowy barwiono hematoksyliną żelazistą oraz wg metody fuksynowo-pikrynowej Altmana.

W dwóch przypadkach, po zabarwieniu skrawków hematoksyliną i eozyną, stwierdzono zmiany o charakterze zapalenia śródmiąższowego w nerce. Zwierzęta te wykluczono z badań, zastępując je nowo operowanymi. Wszystkie mikroфотоgrafie zostały wykonane aparatem fotograficznym Practina FX przy użyciu mikroskopu Nf. C. Zeiss (Jena). Obiektyw $10\times$ lub $20\times$, okular 12,5.

BADANIA WŁASNE

Grupa I

Materiał pobrany w 6 godz. od chwili podwiązania moczowodu.

Nerka po stronie moczowodu podwiązanego

Po 6 godz. obserwowano się tylko nieznaczne rozszerzenie cewek zbiorczych, pozostałe części nefronu zachowały kształt nie zmieniony. W epicytach naczyń włosowatych kłębuszków występowały nieznaczne ilości ziaren wykazujących aktywność kwaśnej fosfatazy oraz ziarnisty odczyn na esterazy niespecyficzne. Znajdowano także niewielki dodatni odczyn wykazujący aktywność 5-nukleotydu. Trzewna i ścienna blaszki torebki Bowmana zawierały substancje PAS dodatnie odporne na działanie diastazy, a także 5-nukleotydu. Kanalik główny odznaczał się bogactwem enzymów. Fosfataza kwaśna występowała w ziarnistościach, których ilość i wielkość w porównaniu z obrazem nerki fizjologicznej uległa wyraźnemu powiększeniu. W wysokim rąbku szczoteczkowym obserwowano się nie zmienioną aktywność fosfatazy zasadowej (ryc. 3) oraz 5-nukleotydu. Ziarniste odczyny na 5-nukleotydu oraz esterazy niespecyficzne występowały w cytoplazmie komórek wokół jąder. Substancje PAS dodatnie spotykano w rąbku szczoteczkowym, w błonie podstawowej oraz w postaci niewielkich ziaren w cytoplazmie. Ziarna te barwiły się nadal po zablokowaniu grup aldehydowych dimedonem, zaś pod wpływem hydrolitycznego działania diastazy ilość ich zmniejszyła się znacznie. Mitochondria występowały w postaci gęsto ułożonych, przypodstawowych pałeczek.

W części cienkiej pętli Henlego nie udało się wykazać obecności fosfatazy zasadowej i esteraz niespecyficznych. Występowały tu nie liczne ziarnistości z fosfatazą kwaśną, większe nieco aniżeli w nerce niezmienionej, zaś w błonie podstawowej — 5-nukleotydu i substancje PAS dodatnie. Mitochondria znacznie mniej liczne niż w kanaliku głównym nie miały także regularnego pałeczkowatego ułożenia.

W szerokiej części pętli Henlego znaleziono liczniejsze w porównaniu z poprzednim odcinkiem ziarnistości zawierające fosfatazę kwaśną, żywą aktywność esteraz niespecyficznych, w błonie podstawowej natomiast 5-nukleotydu oraz substancje PAS dodatnie. Mitochondria były tu

bardzo liczne, nitkowate. Kanalik kręty II rzędu wykazywał dyfuzyjny odczyn na fosfatazę kwaśną, a poza tym stwierdzono obecność dość dużych i licznych ziarnistości zawierających fosfatazę kwaśną. Esterazy niespecyficzne występowały obficie, podobnie jak w kanaliku krętym I rzędu. Substancje PAS dodatnie i 5-nukleotydaza umiejscowiły się w błonie podstawowej kanalika. Mitochondria były liczne i ułożone w postaci długich pałeczek prostopadłych do błony podstawowej. W kanalikach zbiorczych obserwowano dużo powiększonych ziarnistości, zawierających fosfatazę kwaśną oraz niewielką aktywność esteraz niespecyficznych.

Naczynia włosowate i śródbłonki większych naczyń wykazywały wyraźną aktywność 5-nukleotydazy. 5-nukleotydaza występowała także w przydancie naczyń i w tkance łącznej narządu. Po wybarwieniu wg metody Feulgena, zaobserwowano pewne różnice w interkinetycznych jądrach. W większości jąder DNA tworzył gęste ziarna, w innych dłuższe lub krótsze luźno ułożone nici. Podziałów mitotycznych nie zauważono (tab. 1).

Nerka po stronie moczowodu nie podwiązanego

Poza węższymi przewodami zbiorczymi, jedyną dostrzegalną różnicę w porównaniu z nerką operowaną stanowiło zachowanie się aktywności fosfatazy kwaśnej. Ziarnistości zawierające ten enzym były mniej liczne, mniejsze i odpowiadały znajdowanym w warunkach fizjologicznych. W cytoplazmie komórek kanalików nie widziano substancji PAS dodatnich. Narząd nie wykazywał, jeśli chodzi o badane odczyny, odchylenia od przyjętych ogólnie norm.

Kontrola

W nerce po stronie laparotomii próbnej zauważono nieznaczne obniżenie aktywności fosfatazy zasadowej. Ponieważ w grupie doświadczalnej, u zwierząt z podwiązanym moczowodem zjawiska tego nie obserwowano, powtórzono badanie kontrolne, badając jeszcze jedno zwierzę w 6 godz. po laparotomii próbnej. Tym razem nie było zmian w zachowaniu się enzymów hydrolitycznych oraz przy barwieniu wg metody PAS, metody Feulgena i hematoksyliną żelazistą.

G r u p a I I

Materiał pobrany w 12 godz. od chwili podwiązania moczowodu.

Nerka po stronie moczowodu podwiązanego.

Przewody zbiorcze, kanaliki kręte II rzędu i wstępujące ramiona pętli Henlego były rozszerzone, choć wysokość komórek nie uległa

zmianie. Nie obserwowano spłaszczenia nabłonka. Odczyny histochemiczne w kłębuszkach nerkowych zachowywały się tak samo jak w grupie poprzedniej. W kanalikach głównych obserwowano nieznaczne zmniejszenie ilości ziaren z fosfatazą kwaśną oraz w niektórych miejscach, nieregularnie rozłożonych zmniejszenie aktywności fosfatazy zasadowej w rąbku szczoteczkowym. Czynność 5-nukleotydyazy i esteraz niespecyficznych nie uległa zaburzeniom. Nieznacznie zmniejszyła się natomiast ilość substancji PAS dodatnich w rąbku szczoteczkowym. W pozostałych częściach nefronu zmianom uległa jedynie aktywność fosfatazy kwaśnej. W porównaniu z grupą poprzednią ilość ziarnistości, zawierających fosfatazę kwaśną, uległa zmniejszeniu, przy czym wielkość niektórych ziarenek była większa.

Nie zanotowano różnic ani w wyglądzie jąder po wybarwieniu wg metody Feulgena ani w obrazie mitochondriów. Po przebadaniu wszystkich trzech zwierząt doświadczalnych zauważono jedną metafazę w części korowej nerki (tab. 1). Ściany włócnic i innych naczyń zmian nie wykazały.

Nerka po stronie moczowodu nie podwiązanego

U dwóch badanych zwierząt nie było żadnych odchyżeń od stanu prawidłowego. U jednego szczura obserwowano powiększenie i zwiększenie ilości ziaren zawierających fosfatazę kwaśną w kanalikach głównych. Czynność pozostałych badanych hydrolaz, rozmieszczenie i ilość substancji PAS dodatnich i mitochondria nie uległy zmianie.

Kontrola

Nie obserwowano żadnych zmian w badanych odczynach histochemicznych.

Grupa III

Materiał pobrany po 24 godzinach od chwili podwiązania moczowodu.

Nerka po stronie moczowodu podwiązanego.

Cienkie odcinki pętli Henlego były nieznacznie porozszerzane, zaś kanaliki główne nie wykazywały morfologicznych zmian. Odczyny histochemiczne w kłębuszkach nerkowych zachowywały się tak, jak w poprzednich grupach doświadczalnych. W kanaliku głównym ilość i ułożenie ziaren zawierających fosfatazę kwaśną przedstawiała się podobnie jak po 12-godzinnym wodonerczu. Wyraźnie zmniejszyła się natomiast intensywność odczynu wykazującego aktywność fosfatazy zasadowej w rąbku szczoteczkowym. Ilość czynnej 5-nukleotydyazy i esteraz niespe-

cyficznych nie uległa zmianie. Mniej wyraźny natomiast dał się zauważyć odczyn PAS w rąbku szczoteczkowym (ryc. 9). Kształt i wielkość mitochondriów nie wykazywały odchylenia od spotykanych w preparatach kontrolnych. Cienki i szeroki odcinek pętli Henlego zachowywały się podobnie do odpowiadających im odcinkom nefronu w 12-godzinnym wodonerczu. W cewce krętej II rzędu obserwowano niewielką ilość dużych ziaren, zawierających fosfatę kwaśną, tak samo jak w poprzedniej grupie doświadczalnej. Pozostałe odczyny histochemiczne także nie uległy zmianom. W kanalikach zbiorczych wykrywano niewielki dyfuzyjny odczyn fosfatazy kwaśnej i niezmienioną czynność esteraz niespecyficznych.

Po zabarwieniu wg metody Feulgena duża ilość jąder miała wygląd mniej zbitych, nici chromatynowe układały się luźno. Znalezione także stadia metafazy: u dwóch zwierząt po dwie i u jednego — jedną metafazę na 4 000 przeliczonych komórek (tab. 1).

Nerka po stronie moczowodu nie podwiązanej

Odczyny histochemiczne wykazujące aktywność enzymów hydrolitycznych były nie zmienione. U jednego zwierzęcia zauważono stadium metafazy po zabarwieniu wg metody Feulgena (tab. 1). Mitochondria w komórkach nie zmieniły swego kształtu i wielkości w porównaniu ze spotykanymi w poprzednich grupach doświadczalnych.

Kontrola

Nie obserwowano zmian w żadnym z wykonywanych odczynów histochemicznych.

Grupa IV

Materiał pobrany w 48 godz. od chwili podwiązania moczowodu.

Nerka po stronie moczowodu podwiązanej.

Światło niektórych kanalików głównych było rozszerzone, choć większość kanalików krętych I rzędu pozostała nie zmieniona. Komórki kanalików krętych II rzędu i szerokich odcinków pętli Henlego uległy nieznacznemu spłaszczeniu. Przestrzenie torebkowe nie były zmienione. Odczyny histochemiczne naczyń kłębuszków i torebki Bowmana były podobne do odczynów w nerkach grupy III. W kanalikach głównych znajdowano duże ziarnistości zawierające fosfatę kwaśną. Zwiększył się w cytoplazmie komórek dyfuzyjny odczyn fosfatazy kwaśnej, natomiast zmniejszyła się w porównaniu z poprzednimi grupami aktywność

fosfatazy zasadowej w rąbku szczoteczkowym. W niektórych kanalikach nawet znikła ona zupełnie. Nie łączyło się to ściśle i proporcjonalnie ze stopniem rozszerzenia kanalików, miało charakter raczej ogniskowy. Nie zauważono także różnic w zawartości 5-nukleotydu i esteraz niespecyficznych. Substancje PAS dodatnie zachowywały się jak w preparatach z grupy III. Mitochondria były liczne, pałeczkowato ułożone.

W cienkich odcinkach pętli Henlego obserwowano dyfuzyjny odczyn na fosfatę kwaśną. Czynność esteraz niespecyficznych, 5-nukleotydu i substancje PAS dodatnie zmian nie wykazywały. Szeroki odcinek pętli Henlego i kanalik kręty II rzędu charakteryzowały się dyfuzyjnym odczynem na fosfatę kwaśną, niewielką ilością dużych ziarnistości i podobnie jak pozostałe części nefronu — nie wykazywały zmian w zawartości 5-nukleotydu, esteraz niespecyficznych substancji PAS dodatnich i mitochondriów w porównaniu z grupą III.

Cewki zbiorcze były porozszerzane, komórki nabłonka spłaszczone. Wykryto tu jedynie 5-nukleotydu, esterazy niespecyficzne, a w błonie podstawowej substancje PAS dodatnie. Jądra po zabarwieniu wg metody Feulgena wykazywały nieznaczne rozrzedzenie zrębu chromatynowego. We wszystkich trzech przypadkach znaleziono po dwie metafazy przy obliczaniu indeksu (tab. 1).

Nerka po stronie moczowodu nie podwiązanego

Obserwowano niewielkie zmniejszenie wielkości ziarenek zawierających fosfatę kwaśną w komórkach kanalików głównych oraz (w tym samym odcinku nefronu) wzrost ilości mitochondriów. Pozostałe odczyny zachowywały się jak w grupie III. Znaleziono tylko jedną metafazę przy obliczaniu indeksu metafaz.

Kontrola

Odczyny histochemiczne i obraz morfologiczny nerki były podobne do znajdujących na preparatach nerek kontrolnych grupy III. Przy obliczaniu indeksu metafaz, znaleziono w jednym przypadku stadium telofazy.

Grupa V

Materiał pobrany po 3 dniach od chwili podwiązania moczowodu.

Nerka po stronie moczowodu podwiązanego.

W niektórych nefronach poszerzenie światła kanalików sięgało kłębuszków nerkowych. Część kanalików głównych pozostała morfologicznie nie zmieniona. Aktywność enzymów hydrolitycznych w kłębuszkach

nie uległa zmianie. Również zawartość substancji PAS dodatnich nie zmieniła się. W komórkach kanalika głównego, na tle silnego odczynu dyfuzyjnego, obserwowano nieliczne ziarnistości zawierające fosfatazę kwaśną (ryc. 1). Było ich tak samo niewiele, jak w nerkach poprzedniej grupy zwierząt doświadczalnych. Dużo kanalików krętych I rzędu nie wykazywało w ogóle aktywności fosfatazy zasadowej w rąbku szczoteczkowym. W innych aktywność ta była tylko zmniejszona. Odczyny na esterazy niespecyficzne i 5-nukleotydzę zachowywały się jak w grupie poprzedniej (ryc. 6 i 7). Intensywność odczynu PAS w rąbku szczoteczkowym uległa dalszemu zmniejszeniu. Zmniejszyła się także ilość ziaren PAS dodatnich w cytoplazmie. W reakcji tej intensywność wybarwienia błon podstawowych pozostała nie zmieniona.

W pozostałych odcinkach nefronu odczyny wykazujące enzymy hydrolityczne i substancje PAS dodatnie zachowywały się podobnie jak po 48 godz. trwania wodonercza. Również mitochondria nie uległy widocznym zmianom. Obserwowano żywy odczyn mitotyczny. Przy obliczaniu indeksu metafaz znaleziono 11, 12 i 13 metafaz u zwierząt badanych (tab. 1).

Nerka po stronie moczowodu nie podwiązanego

Odczyny histochemiczne zachowywały się jak w grupie IV. Obserwowano również zwiększoną ilość mitochondriów w kanalikach głównych. Znaleziono u dwóch zwierząt po dwa, a u jednego — jedno stadium metafazy (tab. 1).

Kontrola

Badane odczyny nie wykazywały odchyień od poprzednio uzyskanych wyników u zwierząt kontrolnych. Nie widziano także podziałów mitotycznych (tab. 1).

Grupa VI

Materiał pobrany po 7 dniach od chwili podwiązania moczowodu.

Nerka po stronie moczowodu podwiązanego.

Część nefronów była poszerzona na całej długości, łącznie z przestrzeniami torebkowymi. Wśród nich obserwowano również kanaliki główne nie zmienione. Odczyny histochemiczne kłębuszków i torebek Bowmana nie różniły się od spotykanych w nerce nie operowanej. W poszerzonych kanalikach głównych znaleziono w porównaniu z grupą poprzednią nieco więcej ziaren zawierających fosfatazę kwaśną na tle

niewielkiego dyfuzyjnego odczynu (ryc. 2). W kanalikach nie poszerzonych odczyn ten był intensywniejszy, a w cytoplazmie komórek obserwowano więcej ziarnistości. W porównaniu z grupą trzydniową, w kanalikach z zachowanym rąbkiem szczoteczkowym wzrosła zawartość fosfatazy zasadowej (ryc. 4) i substancji PAS dodatnich (ryc. 11). 5-nukleotydaza występowała w nie zmienionej ilości w błonach podstawowych, zachowanym rąbku szczoteczkowym i tkance łącznej (ryc. 8). W cytoplazmie komórek kanalika głównego zauważono nieznaczny spadek aktywności esteraz niespecyficznych, zwłaszcza w porozszerzanych częściach nefronu. Mitochondria zachowywały się jak w grupie V. Wąskie odcinki pętli Henlego zawierały tylko bardzo nieznaczną ilość ziarenek z fosfatazą kwaśną. W szerokiej części pętli Henlego oraz w kanaliku krętym II rzędu na tle nieznacznego odczynu dyfuzyjnego występowały nieliczne, duże ziarna zawierające fosfatazę kwaśną. Czynność esteraz niespecyficznych była zmniejszona. Kanaliki zbiorcze wykazywały jedynie niewielką zawartość esteraz niespecyficznych.

Po wybarwieniu wg metody Feulgena znaleziono bardzo dużą ilość jąder komórkowych w stadiach mitozy. Obliczając indeks metafaz zanotowano u poszczególnych zwierząt: 14, 16 i 18 metafaz na 4 000 przeliczonych komórek (tab. 1).

Nerka po stronie moczowodu nie podwiązanego

Odczyn histochemiczne nie różniły się od obserwowanych po trzech dniach wodonercza. Obserwowano także podziały mitotyczne: dwukrotnie znaleziono po jednej i raz — dwie gwiazdy macierzyste przy obliczaniu indeksu (tab. 1).

Kontrola

Badana nerka po stronie laparotomii próbnej nie wykazywała odchyleń w odczynach histochemicznych. Podziałów mitotycznych nie zauważono (tab. 1).

Grupa VII

Materiał pobrany po 10 dniach od chwili podwiązania moczowodu.

Nerka po stronie moczowodu podwiązanego.

W większości kanalików nerki obserwowano się daleko posunięte zmiany w postaci rozszerzenia światła i spłaszczenia komórek. Zmiany te sięgały do kłębków i obejmowały także przestrzenie torebkowe. Niektóre kanaliki główne pozostały jednak wąskie, z zachowanym rąbkiem

szczoteczkowym. We włóscinkach kłębuszków nerkowych aktywność fosfatazy kwaśnej i 5-nukleotyduzy nie uległa zmianie. Także nie zmniejszyła się zawartość substancji PAS dodatnich. Nie obserwowano tu natomiast esteraz niespecyficznych. Torebka Bowmana zawierała dużą ilość substancji PAS dodatnich, zwłaszcza jej zgrubiały listek ścienny i nie zmienioną aktywność 5-nukleotyduzy.

W kanalikach głównych znaleziono niewielką ilość dużych ziarnistości z fosfatazą kwaśną. W rąbku szczoteczkowym zmniejszyła się aktywność fosfatazy zasadowej i substancji PAS dodatnich. Po raz pierwszy zauważono na powierzchni niektórych poszerzonych kanalików głównych zanik a w cytoplazmie komórek zmniejszenie czynności 5-nukleotyduzy. Nie obserwowano również obecności ziarenek PAS dodatnich. Dużo kanalików wykazywało zmniejszenie aktywności esteraz niespecyficznych. Błony podstawowe kanalików były zgrubiałe, zawierały dużo substancji PAS dodatnich, opornych na hydrolityczne działanie diastazy. Mitochondria straciły swój pałeczkowy kształt, miały wygląd różnej wielkości ziarenek.

Pozostałe części nefronu były trudne do ścisłej identyfikacji z powodu spłaszczenia wszystkich komórek. Obserwowano jedynie ogólne zmniejszenie aktywności fosfatazy kwaśnej, której układ miał charakter dyfuzyjny. W grubych błonach podstawowych i tkance łącznej występowała 5-nukleotyduza. W korze nerki znaleziono dużą ilość podziałów mitotycznych: 13, 14 i 15 metafaz u trzech badanych zwierząt (tab. 1).

Nerka po stronie moczowodu nie podwiązanego

Obserwowano wzrost aktywności fosfatazy zasadowej w rąbku szczoteczkowym. Na uwagę zasługuje również powiększenie ilości i rozmiarów mitochondriów. Pozostałe odczyny histochemiczne zachowywały się jak w grupie poprzedniej.

Kontrola

Wykonując badane przez nas odczyny histochemiczne, nie zauważyliśmy odchyień od zwykle spotykanych w stanie fizjologicznym.

Grupa VIII

Materiał pobrany po 14 dniach od chwili podwiązania moczowodu.

Nerka po stronie moczowodu podwiązanego.

Ogromna większość kanalików nefronów była poszerzona aż do kłębuszków nerkowych, tak że zróżnicowanie poszczególnych części ne-

fronu niejednokrotnie nie było możliwe. Obserwowano wnikanie tkanki łącznej w miąższ nerki od strony miedniczki i przerosłej torebki. W kłębuszkach nerkowych stwierdzono aktywność fosfatazy kwaśnej oraz brak czynności esteraz niespecyficznych. W torebce Bowmana wykryto substancje PAS dodatnie oraz 5-nukleotydzę. W kanalikach nefronów odczyn wykazujący fosfatazę kwaśną występował w postaci niewielkiej dyfuzji siarczku ołowiu w cytoplazmie komórek. Ogniskową aktywność fosfatazy zasadowej obserwowano w niewielkich odcinkach kanalików głównych (ryc. 5), które zachowywały ścięczały rąbek szczoteczkowy. Wybitnemu także zmniejszeniu uległa czynność 5-nukleotydu. Zgrubiałe błony podstawowe zawierały 5-nukleotydzę i nieznaczną ilość substancji PAS dodatnich. Substancje PAS dodatnie ulegały całkowitemu zablokowaniu przy użyciu dimedonu, diastaza zaś nie powodowała zmiany ich obrazu.

Chondriom komórkowy występował w postaci nielicznych, drobnych ziaren. Obliczając indeks metafaz, znaleźliśmy u trzech badanych zwierząt 1, 2 i 3 gwiazdy macierzyste (tab. 1). Naczynia nerki miały przeważnie światło pozapadane, ściany ich wykazywały aktywność 5-nukleotydu.

Nerka po stronie moczowodu nie podwiązanego

Oprócz nie zmienionych odczynów na 5-nukleotydzę i esterazy niespecyficzne obserwowano zwiększoną ilość fosfatazy zasadowej i substancji PAS dodatnich w rąbku szczoteczkowym. W cytoplazmie komórek kanalików głównych występowały niewielkie ziarna zawierające fosfatazę kwaśną oraz pałeczkowate, powiększone mitochondria. Wzrosła także ilość podziałów mitotycznych, znaleziono bowiem we wszystkich trzech badanych przypadkach po 2 stadia metafazy (tab. 1).

Kontrola

Obraz nerki odpowiadał spotykanemu u poprzednich zwierząt kontrolnych.

Grupa IX

Materiał pobrany po 21 dniach od chwili podwiązania moczowodu.

Nerka po stronie moczowodu podwiązanego.

Warstwa miąższu nerki była wąska, cienka. Obserwowano przerost torebki łącznotkankowej, wnikanie włókien i komórek tkanki łącznej w głąb narządu. Niektóre kanaliki były pozapadane, inne miały światło

szerokie. Komórki nabłonków kanalików były przeważnie spłaszczone, przestrzenie torebkowe poszerzone, a w niektórych kłębuszkach zapadnięte. W epicytach naczyń kłębuszków występował nieznaczny dyfuzyjny odczyn na fosfatazę kwaśną, nie było tu natomiast czynnych esteraz niespecyficznych. Aktywność 5-nukleotydyazy w torebce Bowmana zmniejszyła się. Obserwowano wyraźny odczyn PAS, zwłaszcza w listku ściennym torebki. Substancje PAS dodatnie były odporne na działanie diastazy, znikaly zaś pod wpływem działania dimedonu.

W cytoplazmie komórek kanalików nie udało się wykazać obecności ziarenek zawierających fosfatazę kwaśną. Aktywność esteraz niespecyficznych uległa wybitnemu zmniejszeniu. Niektóre kanaliki zachowały w resztkach rąbka szczoteczki fosfatazę zasadową (ryc. 6). Najwyższy odczyn dawała 5-nukleotydyaza, która występowała w tkance łącznej, w zgrubiałych błonach podstawowych, w nieco zmniejszonej ilości w cytoplazmie komórek i na powierzchni mniej rozszerzonych kanalików. Błony podstawowe kanalików zawierały także dużą ilość substancji PAS dodatnich, nie zmieniających się pod wpływem działania diastazy (ryc. 12). Mitochondria w komórkach tworzyły nieregularnie ułożone, nieliczne ziarna. Jądra komórek zabarwione wg metody Feulgena były bardzo liczne, zrąb chromatynowy miały zbity, ziarnisty. W dwóch wypadkach znaleziono po jednej metafazie,

Tab. 1. Indeks metafaz — jego wartości względne i bezwzględne
Index of metaphases — its relative and absolute value

Grupa doświadczeń	Ilość stadiów metafaz na 4000 komórek kory nerki.													
	Nerki po stronie moczowodu podwiązane						Nerki po stronie moczowodu niepodwiązane						Kontrola	
	%	ilość bezw.	%	ilość bezw.	%	ilość bezw.	%	ilość bezw.	%	ilość bezw.	%	ilość bezw.	%	ilość bezw.
I	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
II	0	0	0,25	1	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—
III	0,5	2	0,25	1	0,5	2	0	0	0	0	0,25	1	—	—
IV	0,5	2	0,5	2	0,5	2	0	0	0	0	0,25	1	1 telofaza	
V	0,25	13	2,75	11	3,0	12	0,5	2	0,25	1	0,5	2	0	0
VI	4,0	16	3,5	14	4,5	18	0,25	1	0,5	2	0,25	1	0	0
VII	3,75	15	3,5	14	3,25	13	0,25	1	0,25	1	0,5	2	—	—
VIII	0,5	2	0,75	3	0,25	1	0,5	2	0,5	2	0,5	2	0	0
IX	0	0	0,25	1	0,25	1	1,0	4	0,75	3	1,0	4	—	—

u trzeciego zwierzęcia nie spotkano ani jednej gwiazdy macierzystej (tab. 1). Naczynia nerki miały światło zapadnięte z zachowaną aktywnością 5-nukleotydu w śród błonkach i przydince.

Nerka po stronie moczowodu nie podwiązanej

Stwierdzono nadal obecność drobnoziarnistego odczynu na fosfatazę kwaśną. Obrazy czynności esteraz niespecyficznych i 5-nukleotydu odpowiadały znajdowanym w nerkach kontrolnych. Zwiększeniu uległa aktywność fosfatazy zasadowej i ilość substancji PAS dodatnich w rąbku szczoteczkowym. Obserwowano dość dużą ilość podziałów komórkowych: w dwóch wypadkach znaleziono po 4, a w jednym 3 metafazy (tab. 1).

Kontrola

W nerce szczura, u którego przed 21 dniami wykonano laparotomię próbną, nie obserwowano zaburzeń w zachowaniu się enzymów hydrolitycznych, substancji PAS dodatnich i chondriomu komórkowego.

OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ I WNIOSKI

Aktywność enzymów jest jak najściślej związana ze stanem czynnościowym żywej komórki, stąd też zmienność ich występowania może być wyrazem przemian odbywających się w obrębie cytoplazmy i jądra. Zgodnie więc z tym badając zachowanie się poszczególnych hydrolaz zauważono, że w przebiegu wodonercza czynność ich w komórkach nefronu ulegała znacznym wahaniom. Aktywność fosfatazy kwaśnej, enzymu związanego z frakcją komórkową lekkich mitochondriów-lizosomów (9, 10, 11) zmieniła się już w pierwszej grupie badanych zwierząt w 6 godz. od chwili podwiązania moczowodu. Ziarnistości wykazujące aktywność fosfatazy kwaśnej na przestrzeni całego kanalika nefronu były liczniejsze i ulegały powiększeniu. Po dalszych 6 godz. obraz aktywności fosfatazy kwaśnej zmienił się o tyle, że ilość ziarnistości zmniejszyła się, rozmiary ich jednak nadal pozostały duże. Następne 12 godzin nie przyniosło widocznych zmian. Preparaty nerek zwierząt zabitych w 48 godz. po podwiązaniu moczowodu, wykazywały dalsze zmniejszenie ilości dużych ziarnistości, zawierających fosfatazę kwaśną, zwiększył się natomiast dyfuzyjny odczyn w cytoplazmie komórek, zwłaszcza w szerokich odcinkach pętli Henlego i kanalikach krętych II rzędu. Powiększone, choć nieliczne ziarnistości, zawierające czynną fosfatazę kwaśną spotykano także w grupie następnej po trzech dniach trwania wodonercza. Po 7 dniach ziarnistości te były nieco liczniejsze niż po 3 dniach. W 10 dni po podwiązaniu moczowodu znajdowano

jeszcze nie zmienioną aktywność fosfatazy kwaśnej w epicytach naczyń kłębków nerkowych, natomiast w poszerzonych kanalikach, na tle słabego dyfuzyjnego odczynu, wykazujące fosfatazę kwaśną — nieliczne, bezładnie ułożone duże ziarnistości-lizosomy. Ziarnistości te zniknęły w następnych 4 dniach, pozostał tylko niewielki odczyn dyfuzyjny. Po trzech tygodniach wodonercza fosfatazę kwaśną można było wykazać w epicytach naczyń włosowatych kłębuszków, a w cytoplazmie komórek kanalików spotykano tylko niewielką dyfuzję produktów reakcji katalizowanych pośrednio przez fosfatazę kwaśną. W ogóle kłębuszki nerkowe okazały się w przebiegu wodonercza najodporniejsze i najdłużej zachowały czynne enzymy hydrolityczne.

Spostrzeżenia odnośnie zmniejszenia się aktywności fosfatazy kwaśnej w przebiegu wodonercza zgadzały się z uwagami Frankö O. i Niemi M. (13), choć autorzy ci nie zwrócili uwagi na wzrost jej aktywności w pewnych okresach i na ciekawe zachowanie się ziaren wewnątrzcytoplazmatycznych, zawierających czynną fosfatazę kwaśną. Novikoff, badając po podwiązaniu moczowodu lizosomy w nerce przy pomocy mikroskopu elektronowego, zauważył w ich wnętrzu ergastoplazmę i struktury przypominające zniszczone mitochondria (32). Podobne zjawisko otaczania aktywną fosfatazą kwaśną cytoplazmatycznych blaszek, opisał Clark (7) w kanalikach bliższych nerek nowo narodzonych myszy. Clark określa to jako „Consist of an amorphous material and contain concentrically lamellar structures and mitochondria” (J. Biophys. Biochem. Cytol., 3, s. 358, 1957). Także powiększenie ziaren zawierających fosfatazę kwaśną występowało po podwiązaniu przewodu żółciowego w komórkach wątroby oraz w degenerujących komórkach guzów wątroby wywołanych doświadczalnie u szczurów karmionych pochodnymi benzenu (34, 35).

Zgodnie z poglądami Novikoffa (32), który uważa struktury blaszkowate znajdujące w lizosomach za zniszczone twory cytoplazmatyczne, początkowe powiększenie lizosomów, a później zjawienie się (prawdopodobnie w wyniku ich uszkodzenia) dyfuzyjnego odczynu na fosfatazę kwaśną, może być wykładnikiem uszkodzenia komórek nabłonka kanalików nerki. Z tego punktu widzenia odczyn na fosfatazę kwaśną jest cennym wskaźnikiem stopnia degeneracji tkanki. Z drugiej strony, jak wskazują badania niektórych autorów, powiększenie lizosomów i zwiększenie aktywności fosfatazy kwaśnej, występują w procesie odżywiania jednokomórkowców, w zwiększonym wydzielaniu hormonów przysadki mózgowej i nadnercza, w zwiększonej absorpcji tłuszczów w nabłonku jelitowym (3). Aktywność fosfatazy kwaśnej jest więc też związana z fizjologicznym trawieniem wewnątrzkomórkowym substancji

pobranymi drogą pinocytozy i fagocytozy. Z tego względu początkowe powiększenie lizosomów może wskazywać także na wzmożoną pinocytozę w pierwszych godzinach wodonercza. Z początkową degeneracją komórek (jako jej przyczyna lub też skutek) wiąże się natomiast niewątpliwie odczyn dyfuzyjny na fosfatyzę kwaśną. Zaawansowanym procesom degeneracji w przebiegu wodonercza towarzyszy zdecydowane zmniejszenie aktywności fosfatazy kwaśnej, dlatego określenie odczynu na fosfatyzę kwaśną jako wykładnika uszkodzenia komórek, wydaje się być nieco ryzykowne.

W nerkach po stronie moczowodu nie podwiązanej zmiany w zachowaniu się fosfatazy kwaśnej nie były takie znamienne. Ziarnistości zawierające fosfatyzę kwaśną znajdowano w strefie Golgiego. Wielkość ich zmniejszyła się nieznacznie po 48 godz. od chwili podwiązania moczowodu. Stan ten utrzymywał się we wszystkich grupach doświadczalnych i zawartość fosfatazy kwaśnej w tych nerkach po trzech tygodniach nie różniła się od obrazu znajdującego po 48 godz. wodonercza.

Odczyn wykazujący aktywność fosfatazy zasadowej w rąbku szczoteczkowym zmniejszył się już w 12 godz. od chwili podwiązania moczowodu. Zjawisko to postępowało stopniowo w grupach zwierząt badanych w 24 i 48 godz. oraz po 3 dniach. Po 7 dniach obserwowano wzrost aktywności fosfatazy zasadowej. Stan ten miał charakter przejściowy, bowiem po dalszych trzech dniach zauważono bardzo silny spadek aktywności fosfatazy zasadowej. Po dwóch tygodniach wodonercza, ilość kanalików zawierających aktywną fosfatyzę zasadową zmniejszyła się w nerce podwiązanej jeszcze bardziej. Po 21 dniach tylko bardzo nieliczne kanaliki kręte zawierały w swym rąbku szczoteczkowym fosfatyzę zasadową. W nerce po stronie moczowodu nie podwiązanej aktywność fosfatazy zasadowej, która zwiększyła się po 10 dniach wodonercza, pozostawała w dalszych grupach doświadczalnych (14 i 21 dni) na stałym poziomie. Zmniejszenie aktywności fosfatazy zasadowej w rąbku szczoteczkowym obserwowali w doświadczalnym wodonerczu Wilmer (53, 54) i Wachstein (51). Autorzy ci nie ocenili szybkości tego procesu. Wilmer uważał, że aktywność fosfatazy zasadowej po stronie przeciwnej także uległa zmniejszeniu. Obaj autorzy, Wilmer i Wachstein, przeprowadzali badania na skrawkach parafinowych, przy czym stężenie jonów Ca w środowisku inkubacyjnym było suboptymalne. Na skrawkach tkanek utrwalonych w zimnej mieszaninie według Bakera i krajanych po zamrożeniu, Novikoff stwierdził pewne zmniejszenie aktywności fosfatazy zasadowej już w 3 godziny po podwiązaniu moczowodu, przy czym za-

uważył on, że całkowite zniknięcie czynności fosfatazy zasadowej wiąże się ze zniszczeniem rąbka szczoteczki, co wykazało badanie w mikroskopie elektronowym (32). Można przypuszczać, że zniszczenie struktury morfologicznej (rąbek) pociąga za sobą utratę czynności enzymów w niej umiejscowionych. Wniosek ten jest jednak w pewnej sprzeczności z obserwacjami Frankö i Niemi (14), którzy nie wykluczają możliwości powrotu do normalnej aktywności fosfataz po czasowym zaciśnięciu moczowodu. Czynność fosfatazy zasadowej łączy się ściśle z funkcją kanalika nerki (18, 48, 50). Hiller i współprac. (24) stwierdzili, że fosfataza zasadowa pojawia się w nerkach zarodków szczura w chwili rozpoczęcia pracy kanalików, na parę dni przed urodzeniem. Procesy uszkodzające nerkę powodują przeważnie zmniejszenie lub zniknięcie odczynu na fosfatazę zasadową. Hepler, Gorley i Simonds (21) w r. 1945 zauważyli znikanie fosfatazy zasadowej z nerek zwierząt zatrutych uranem i sublimatem. Bunting w roku 1948 (6) opisał zmniejszenie aktywności fosfatazy zasadowej w cukrzycy alloxanowej. Niektórzy autorzy wykazywali, że czynność fosfatazy zasadowej znika także po podaniu florydzy, która hamuje resorbcję zwrotną cukru (1, 53). Enzym ten jest wrażliwy bardzo na stany niedotlenienia (19, 40). Jest to stwierdzenie dla nas o tyle istotne, że w dłuższej trwającym wodonerczu dochodzić może do ucisku naczyń krwionośnych, co pociąga za sobą niedotlenienie narządu. Aktywność fosfatazy zasadowej w nerce ulega też wahaniom pod wpływem niektórych hormonów. Ruyter i współprac. (38) po obustronnej adenektomii stwierdzili zanik rąbka szczoteczki. Stan ten nie poprawiał się pod wpływem dezoksykortykosteronu. Podobne zjawisko obserwowali Holl i Stochaj (25). Podawanie hormonów nadnerczy powodowało z początku wzrost czynności fosfatazy zasadowej, następnie spadek na skutek uszkodzenia nerki przez kortykosterydy (23). Usunięcie przytarczyc powodowało także spadek aktywności fosfatazy zasadowej (13). Wstrzyknięcie kastrowanym zwierzętom estradiolu wiązało się ze wzrostem aktywności fosfatazy zasadowej (12), a w podobnych warunkach testosteron powodował spadek czynności tego enzymu (26). Kapryśne i różnorodne zachowanie się fosfatazy zasadowej wymaga jeszcze wielu szczegółowych badań. Obecnie wiadomo jest na przykład, że fosfataza zasadowa powoduje defosforylację powstałego pod wpływem fosforylasy z glikozy fosforanu heksozy, biorąc tym samym udział w aktywnym wchłanianiu zwrotnym glikozy. Rola jej w tym procesie prawdopodobnie nie ogranicza się tylko do hydrolizy estrów glikozy (8, 39). Badania nowsze przeczą spostrzeżeniom Wilmera (53) i Allegra (1), jakoby florydzy wpływała na fosfatazę, raczej działała na fosforylase w kanalikach krętych nerki (4).

Skomplikowane zagadnienia te nie znajdują jeszcze odpowiednich metod dla ostatecznego rozstrzygnięcia.

Obserwując odczyn na 5-nukleotydzę w pH 8,3, widziano jej żywą aktywność w tkance łącznej narządu, w postaci ziarnistego odczynu wewnątrz cytoplazmy komórek nabłonka kanalików, w rąbku szczoteczkowym, w błonach podstawowych, a także w obu listkach torebki Bowmana oraz w przydancie i śródbłonkach naczyń. W porównaniu z badanymi przez nas hydrolazami czynność 5-nukleotydyzy w przebiegu wodonercza nie zmieniała się bardzo długo. Po 7 dniach trwania doświadczenia na przestrzeni porozszerzanych kanalików krętych, które straciły już czynność fosfatazy zasadowej, widać było jeszcze odczyn na 5-nukleotydzę. Po raz pierwszy czynność 5-nukleotydyzy znikiała w rąbku szczoteczkowym porozszerzanych kanalików i zmniejszała w cytoplazmie komórek dopiero po 10 dniach wodonercza. Po 21 dniach zmniejszyła się także nieco aktywność 5-nukleotydyzy w torebce Bowmana. Pomimo tego, 5-nukleotydyza pozostawała w tej grupie doświadczalnej najbardziej czynnym enzymem. Wykrywano ją w zgrubiałych błonach podstawowych kanalików, rąbku szczoteczkowym i cytoplazmie mniej rozszerzonych kanalików głównych, w naczyniach i tkance łącznej. Nerki po stronie moczowodu nie podwiązanego nie wykazywały uchwytanych zmian w aktywności 5-nukleotydyzy. Zmniejszenie się odczynu 5-nukleotydyzy w cytoplazmie komórek w przebiegu wodonercza, łączyło się być może z mitochondrialnym umiejscowieniem tego enzymu (46, 47). Mitochondria w naszych badaniach ulegały dużym zmianom. Do zagadnienia tego powrócimy, rozpatrując zachowanie się chondriomu komórkowego. Ma en y n - D a v i e s i współprac. (28) stosując jako substraty adenozyotrójfosforan, kwasy adenozyopięćfosforowy i adenozyotrójfosforowy, wykazali w zasadowym środowisku szereg enzymów, przy czym umiejscowienie niektórych z nich podobne do obserwowanej przez nas 5-nukleotydyzy. Podkreślali oni możliwość wieloetapowego rozkładu adenozyotrójfosforanu przy współdziałaniu kilku enzymów, przy czym 5-nukleotydyza w łańcuchu tym hydrolizuje kwas adenilowy. Autorzy ci wykazywali w swych badaniach czynność 5 nukleotydyzy w pH 9,9 także w jądrach komórkowych, czego my nigdy nie widzieliśmy, wykrywając 5-nukleotydzę w pH 8,3. Nie można wykluczyć, że są to dwa różne enzymy.

Esterazy niespecyficzne wykazywały w nerce dużą aktywność i były dość odporne na działanie czynników zewnętrznych. Po raz pierwszy spadek nieznaczny aktywności esteraz niespecyficznych spotkano w rozszerzonych kanalikach nerki i w naczyniach kłębuszków w 7 dni po podwiązaniu moczowodu. Czynność esteraz niespecyficznych wyraźnie

zmniejszyła się po 10 dniach wodonercza, a w dalszych grupach — tylko nieliczne i morfologicznie mało zmienione kanaliki wykazywały odczyn działania esteraz niespecyficznych. W nerkach po stronie moczowodu nie podwiązanego nie można było zauważyć żadnych odchyłeń od stanu kontrolnego. Wykonując reakcje oparte na hydrolizie ostanu α naftolu i naftolu AS, a następnie sprzęgając produkty hydrolizy z barwnikami dwuazowymi, używając tkanek utrwalonych w oziębionej mieszaninie Calcium-formol, nie stwierdzono zmniejszenia czynności esteraz niespecyficznych w pierwszych okresach wodonercza, co sygnalizował Wachstein (52) obserwując odczyny na skrawkach parafinowych. Niewiele jest doniesień o zmianie aktywności esteraz niespecyficznych w nerkach. Svansson (43) wykazał zmniejszenie się czynności esteraz niespecyficznych w kanalikach nerki w zaburzeniach przemiany tłuszczowej, zaś Verne i Hebert (44) po działaniu dezoksykortykosteronu. Trudno jest na razie powiązać rolę esteraz z czynnością kanalików nerkowych. Zawistowski (55) przypuszcza, że enzym ten bierze udział w procesach biochemicznych zachodzących w strefie Golgiego.

Substancje PAS dodatnie w nerce po 6 godz. wodonercza występowały w nie zmienionych ilościach w torebce Bowmana, w rąbku szczoteczkowym, w błonie podstawowej kanalików i w postaci niewielkiej ilości ziaren w cytoplazmie kanalików głównych. Po hydrolitycznym działaniu diastazy, pewnemu zmniejszeniu uległa jedynie ilość substancji PAS dodatnich, znajdujących w postaci ziaren w cytoplazmie komórek, co świadczyć mogło że przynajmniej niektóre z nich zawierały glikogen nie występujący w nerce w warunkach normalnych. Dimedon natomiast blokował aldehydowe grupy substancji PAS dodatnich rąbka, błon podstawowych, torebki Bowmana, oraz częściowo ziarnistości w cytoplazmie komórek. Być może, ziarna te mają związek z powiększonymi w tym okresie wodonercza lizosomami, które jak wiemy (34, 35) mają w otaczającej je błonie substancje PAS dodatnie, odporne na działanie amylazy ślinnej, choć z drugiej strony — Novikoff obserwował wybarwienie się otoczki lizosomów przy pomocy odczynnika Schiffa w wątrobie i to na bardzo cienkich skrawkach z tkanki utrwalonej w zimnej mieszaninie Calcium-formol i skrawanych w niskiej temperaturze. Wybarwienie rąbka szczoteczkowego w reakcji PAS zmniejszyło się nieco w nerce podwiązanej już po 12 godz. Po dalszych 12 godz. można było zauważyć w rąbku szczoteczkowym dalsze zmniejszenie intensywności odczynu PAS. W następnej grupie zwierząt (materiał pobrany po 48 godz.) nie obserwowano zmian w porównaniu z obrazami poprzednimi. Trzy dni trwające wodonercze powodowało dalszy spadek intensywności odczynu PAS w rąbku i zmniejszenie ilości ziaren PAS

dotadnich w cytoplazmie. Odczyn w błonie podstawowej i torebce Bowmana nie uległy zmianie. Po 7 dniach znajdowano nieco wyraźniejszy, w porównaniu z grupą poprzednią, odczyn w rąbku szczoteczkowym. Interesujący był fakt, że u tych samych zwierząt zanotowano także wzrost aktywności fosfatazy zasadowej w rąbku szczoteczkowym. Jednocześnie wystąpiły zasadnicze zmiany w zachowaniu odczynu PAS. Intensywność tego odczynu w rąbku szczoteczkowym była mała, a w cytoplazmie widziano bardzo niewiele ziarnistości. Zgrubieniu uległy natomiast wyraźnie zabarwione błony podstawowe kanalików i ścienny listek torebki Bowmana. Grubiały zwłaszcza błony kanalików poszerzonych, ze szczególnie źle zachowanym rąbkiem szczoteczkowym. Zjawiska te w dalszych grupach (14 i 21 dni) pogłębiły się, ilość substancji PAS dodatnich w grubych błonach podstawowych była bardzo duża, rąbek szczoteczkowy zaś tracił swą barwliwość. W nerce po stronie moczowodu nie podwiązanego po 14 i 21 dniach zwiększyła się intensywność odczynu PAS w rąbku szczoteczkowym, czemu także towarzyszył wzrost aktywności fosfatazy zasadowej. W cytoplazmie komórek nie obserwowano ziaren PAS dodatnich.

Wiadomo jest, że w reakcji PAS uwidacznia się wiele związków chemicznych (wielocukry, mukopolisacharydy obojętne, muko- i glikoproteidy, glikolipidy, nienasycone tłuszcze, fosfolipidy). Niektóre spośród nich (skrobia, glikogen) ulegają hydrolizie pod wpływem amylazy, czy też diastazy. Grupy aldehydowe innych (powstałe po utlenieniu kwasem nadjodowym) można zablokować dimedonem. Reakcje te nie pozwalają jednak określić, ilość których związków uległa zmniejszeniu w rąbku szczoteczkowym równoległe do zmniejszenia aktywności fosfatazy zasadowej w tej strukturze. Moog i Wenger (29) wykazali, że mukopolisacharydy znajdujące w miejscach aktywności fosfatazy zasadowej w nerce odporne są na hydrolizę, na działanie hialuronidazy, nie są zasadochłonne i nie wykazują metachromazji. Vorbrodt (informacje ustne) zauważył w nerce szczurów, u których wywołano doświadczalnie miażdżycę, że w odcinkach gdzie błona podstawowa kanalików wykazywała silny odczyn PAS i była zgrubiała, nabłonek kanalików był niski i rąbek szczoteczkowy zanikający, ze słabym odczynem PAS. W naszych badaniach, w procesie wodonercza, obserwowano podobne zachowanie się odczynu PAS. Może więc istnieje współzależność między grubością błony podstawowej a stanem czynnościowym komórek oraz wysokością i PAS dodatnim odczynem rąbka szczoteczkowego. Świadczyć może o tym równoczesny spadek w rąbku aktywności fosfatazy zasadowej, która bierze udział w procesach resorpcji zwrotnej, zachodzących w kanaliku.

Po zabarwieniu preparatów utrwalonych w mieszaninie wg Zenkera hematoksyliną żelazistą oraz wg Altmana, można było przeanalizować zachowanie się mitochondriów, a przede wszystkim ich ułożenie, kształt i wielkość. Ponieważ zmiany morfologiczne kanalików, zachodzące w czasie wodonercza utrudniają, zwłaszcza w późniejszych okresach, ścisłą identyfikację odcinka nefronu, pod uwagę wzięto tylko najmniej zmienione kanaliki główne, w których mitochondria były najliczniejsze i miały charakterystyczne przypodstawne ułożenie. Pierwsze okresy wodonercza nie miały wyraźnego wpływu na mitochondria kanalika głównego. Po 10 dniach zauważono, że mitochondria traciły swój pałeczkowaty kształt i miały wygląd ziarnistości ułożonych nieregularnie w komórce. Stan taki dało się obserwować do końca trwania doświadczenia (po 14 i 21 dniach). W nerce po stronie moczowodu nie podwiązanego, już po 48 godz. zauważono, zwiększenie ilości i wzrost mitochondriów. Zjawisko to widoczne było we wszystkich dalszych badanych grupach. *Novikoff* (32) opisał w uszkodzonych nieodwracalnie czasowym (6 godz.) podwiązaniem moczowodu, nekrotyzujących kanalikach nerki zanik mitochondrialnej czynności DPNH tetrazolium reduktazy dopiero po 4 tygodniach. *Dubas* (informacje ustne) widział, badając przy pomocy mikroskopu elektronowego, znaczny wzrost mitochondriów w komórkach nerki kompensacyjnie przerosłej po jednostronnej nefrektomii. Błaszczkowate struktury, przypominające mitochondria obserwowane były we wnętrzu cytolizomów-lizosomów w komórkach patologicznie zmienionych (31, 32, 33, 34). *Novikoff* (35) wspomina o możliwym związku lizosomów z mitochondriami. *Richter* (36) obserwował mianowicie możliwość przejścia „dense bodies”, z których część mogła być lizosomami — w mitochondriach. *Novikoff* nie popiera jednak tego poglądu, łącząc lizosomy raczej ze strefą Golgiego.

Łącznie z omówionymi odczynami histochemicznymi, u wszystkich zwierząt doświadczalnych oraz u pięciu kontrolnych prześledzono również odczyn mitotyczny, obliczając indeks metafaz w kanalikach kory. Już po 24 godz. w nerce podwiązanej znaleziono u wszystkich trzech zwierząt gwiazdy macierzyste. Ilość ich wzrosła po 48 godz. W następnych grupach po 3, a zwłaszcza 7 dniach od chwili podwiązania moczowodu, obserwowano gwałtowny wzrost ilości podziałów mitotycznych. Ilość komórek w stadiach metafazy wynosiła po 3 dniach średnio 3%, a po 7 dniach aż 16%. Po 10 dniach ilość podziałów mitotycznych zmniejszyła się nieco i indeks metafaz wynosił przeciętnie 14%, po 14 dniach tylko 2%, a po trzech tygodniach 0,25%. Interesującym zjawiskiem jest zwiększenie aktywności mitotycznej w nerce po stronie moczowodu nie podwiązanego zwłaszcza w trzy tygodnie od chwili ope-

racji (1‰), gdy stopień degeneracji narządu podwiązanego był największy. W nerkach szczurów kontrolnych znaleziono w ogóle po 48 godz. od chwili laparotomii próbnej tylko jedną telofazę na 4000 przeliczonych komórek. Ponieważ w innych preparatach z nerek szczurów kontrolnych nie znaleziono w ogóle podziałów mitotycznych, można przypuszczać, że był to (telofaza po 48 godz.) tylko przypadek. W kanalikach nerkowych dorosłego szczura, podziały mitotyczne są bardzo rzadkie i wynoszą średnio na 100 g wagi zwierzęcia 15,5 komórek w całym przekroju poprzecznym nerki (Herlaut 22). Na ilość tę ma duży wpływ wiek zwierzęcia. U zwierząt młodych występuje podziałów więcej (15, 16, 22). Franck (16), Fautrez i Roels (15) i Herlaut (22) liczyli nie indeksy metafaz, lecz indeksy mitotyczne. W tym celu podawali zwierzętom doświadczalnym przed zabiciem kolchicynę, która zatrzymuje mitozę na etapie metafazy. W ten sposób liczenie gwiazd macierzystych jest w ich badaniach równocześnie liczeniem całego indeksu mitotycznego. Ponieważ nie używaliśmy kolchicyny (nie chcąc dodawać nowych czynników, które mogłyby wpłynąć na funkcje komórki), ograniczyliśmy się do liczenia i porównywania indeksu metafaz. Liczenie metafaz było dokładniejsze od liczenia wszystkich stadiów podziałowych, bowiem odróżnienie zwłaszcza profazy wśród różnych morfologicznie jąder jest czasem bardzo trudne. Te różnice w budowie jąder polegały przede wszystkim na niejednakowej gęstości i różnym układzie DNA w jądrze, który w jednym typie jąder tworzył gęste, ziarniste skupienia, w innych (dużych jądrach) — wydłużone, luźno rozpięte nici. Franck (16) w nerce kompensacyjnie przerosłej zauważył wzrost aktywności mitotycznej już po 48 godzinach. Następnie obserwował pewne zmniejszenie ilości podziałów i drugi szczyt po 6 dniach od chwili operacji. Jeśli chodzi o zawartość DNA w jądrach międzypodziałowych, to autor ten nie widzi różnic między zwierzętami doświadczalnymi i kontrolnymi w jądrach „diploides”, natomiast wyraźnie wzrasta wraz z ilością podziałów mitotycznych ilość jąder „tetraploides” z podwójną zawartością DNA. Franck twierdzi, że łączy się to z przedprofazową syntezą DNA. Sulkin (41) maksimum nasilenia ilości mitoz w hipertrofii kompensacyjnej spotykał między 72 a 240 godziną od chwili eksperymentu, zaś Rollason (37) — po dwóch dniach. Herlaut (22) przeprowadzając obliczenia przy użyciu kolchicyny, widział w wodnerczu bardzo dużo podziałów mitotycznych po 48 godz. w kanalikach krętych i w tkance śródmiąższowej. Ten stan wzrastał aż do 9 dnia, to znaczy do chwili, gdy występowała atrofia narządu. Autor ten podkreślił, że kłębuszki w ogóle nie wykazywały aktywności mitotycznej. Najwięcej podziałów znalazł w kanaliku głównym. Herlaut stoi na stanowisku,

że zwiększona akcja mitotyczna w nerce po podwiązaniu moczowodu spowodowana była większą resorbcją produktów hydrolizy białka (powstałych w procesach degeneracji niektórych odcinków kanalików), które wchłonięte przez mniej uszkodzone odcinki nefronu, mogły działać bodźcowo na podziały komórkowe. Nerka po stronie moczowodu nie podwiązanego wykazywała w badaniach Herlauta między 2 a 4 dniem pewien wzrost ilości mitoz, który potem nie ulegał dalszym zmianom. Fautrez i Roels (15) badając ilość DNA w obu nerkach, po stronie moczowodu podwiązanego i nie podwiązanego, opisali w nerce po stronie podwiązanego moczowodu nie zmieniającą się ilość DNA w jądrach, zaś po stronie nie podwiązanego moczowodu ilość ta uległa nawet znacznemu zmniejszeniu, co stoi w pewnej sprzeczności z badaniami Franka (16) nad zawartością DNA w nerce kompensacyjnie przerosłej.

Zestawiając zachowanie się enzymów hydrolitycznych z poziomem indeksu metafaz, zauważono, że w grupie badanej po 7 dniach od chwili podwiązania moczowodu gwałtownemu odczynowi rozrodczemu komórek (szczyt wartości indeksu metafaz w naszych badaniach) towarzyszył wzrost aktywności fosfatazy kwaśnej, fosfatazy zasadowej i substancji PAS dodatnich w komórkach mniej zmienionych kanalików. Być może zjawisko to wypływa właśnie z gwałtownej akcji rozplemu komórek kanalika głównego. Jest jednak zagadnieniem otwartym, czy zjawiska te można rzeczywiście ze sobą łączyć, czy też oba procesy od siebie nawzajem nie są uzależnione, tym bardziej że wzrost aktywności mitotycznej dał się zauważyć także w 3 i 10 dni od chwili operacji, kiedy to obserwowano obniżenie aktywności fosfatazy zasadowej i osłabienie odczynu PAS.

Na podstawie przeprowadzonych obserwacji, można przypuszczać, że:

1. Po jednostronnym podwiązaniu moczowodu zmienia się w obu nerkach aktywność hydrolaz: fosfatazy kwaśnej, fosfatazy zasadowej, 5-nukleotydazy i esteraz niespecyficznych, oraz substancji PAS dodatnich.

2. W nerce po stronie moczowodu podwiązanego, ilość i rozmiary lizosomów z początku wzrastają, następnie ilość lizosomów maleje na korzyść odczynu dyfuzyjnego na fosfatazę kwaśną. Powiększenie lizosomów można łączyć ze wzrostem pinocytozy, zaś wystąpienie potem odczynu dyfuzyjnego — z początkiem procesów degeneracji komórek. Zaawansowanym zmianom degeneracyjnym towarzyszy zmniejszenie aktywności fosfatazy kwaśnej.

3. Odczyn histochemiczny na aktywność fosfatazy zasadowej w rąbku szczoteczkowym w nerce po stronie moczowodu podwiązanego zmniejsza się wraz ze zniszczeniem rąbka szczoteczkowego. Po stronie moczowodu

nie podwiązanego, odczyn na aktywność fosfatazy zasadowej wzrasta. Łączy się to prawdopodobnie ze zwiększoną funkcją nerki kompensacyjnie przerosłej.

4. W nerce podwiązanej intensywność odczynu PAS w rąbku szczotczkowym zmniejsza się, natomiast błony podstawowe kanalików ulegają zgrubieniu i zawierają dużo substancji PAS dodatnich. Można przypuszczać, że błony podstawowe grubiejące w procesie wodonercza są czynnie zaangażowane w mechanizmie wchłaniania zwrotnego, że istnieje współzależność między grubością błony podstawowej a wysokością i PAS dodatnim odczynem rąbka szczotczkowego.

5. Po stronie podwiązanego moczowodu występuje w komórkach nefronów degeneracja mitochondriów, zaś po stronie przeciwnej — obserwuje się przerost chondriomu, co wraz ze wzrostem wartości indeksu metafaz — można uważać za morfologiczny wyraz kompensacyjnego przerostu nerki nie podwiązanej.

PIŚMIENICTWO

1. Allegra G., Niutta R., Pastore G.: Studi bio-istochimici sulle fosfatasi renali il canali florizinati, dopo carico di vitamine ed ormoni. Arch. „De Vecchi” (Firenze). **22**, 281—295, 1954.
2. Baker J. R.: The Histochemical Recognition of Lipine. Quart J. Mic. Sci. **87**, 441—451, 1946.
3. Barka T.: Cellular Localisation of Acid Phosphatase Activity. J. Histochem. Cytochem. **10**, 231—232, 1962.
4. Best C. H., Taylor N. B.: Fizjologiczne podstawy postępowania lekarskiego. P.Z.W.L., t. I. Warszawa 1959, ss. 526—582.
5. Bulmer D.: Dimedone as an Aldehyde Blocking Reagent to Facilitate the Histochemical Demonstration of Glycogen. Stain Technol. **34**, 95—98, 1959.
6. Bunting H.: Kidney Alkaline Phosphatase of Rats Following Alloxan Induced Diabetes and Actue Hypo- and Hyperglycemia. Proc. Soc. Exp. Biol. **67**, 370—372, 1948.
7. Clark S. L.: Cellular Differentiation in the Kidneys of Newborn Mice Studied with the Electron Microscope. J. Biophysic. and Biochem. Cytol., **3**, 349—359, 1957.
8. Crane R. K., Miller D., Bihler J.: Membrane Transport and Metabolism Symposia C.S.A.V. Praha. 1961.
9. de Duve C., Pressman B. C., Gianetto R., Wattiaux R., Appelmanns F. Tissue Fraction Studies 6. Intracellular Distribution Patterns of Enzymes in Rat-Liver Tissue. Bioch. J. **60**, 604—617, 1955.
10. de Duve C.: Lysosomes, a New Group of Cytoplasmic Particles. In „Subcellular Particles” ed. T. Hayashi, The Ronald Press, New York. 1959, ss. 128—159.
11. de Duve C.: On the Function of Intracellular Hydrolases. Exper. Cell. Res. (supp.). **7**, 167—179, 1959.
12. Dunn T. B.: Sex Difference in the Alkaline Phosphatase Distribution in the Kidney of the Mouse. Am. J. Path. **24**, 719—720, 1958.

13. Eger W., Geller H. F.: Über den Einfluss der Nebenschilddrüse auf die Phosphatasen der Nieren. *Arch. Exp. Path. u. Pharmacol.* **218**, 222—238, 1953.
14. Érankö O., Niemi M.: Histochemically Demonstrable Acid Phosphatasen in the Kidney of Hydronephrotic Rats. *Acta Path. et Microbiol. Scand.* **35**, 357—364, 1954.
15. Fautrez J., Roels H.: Mitose et synthèse d'acide désoxyribonucleique. Le cas des mitoses provoqué dans le tube contourné du rein par l'hydro-néphrose unilatérale. *Arch. Biol.* **65**, 459—496, 1954.
16. Franck G.: Etude du métabolisme et de la synthèse des acides désoxy-ribonucleiques au cours de l'hypertrophie compensatrice du rein chez le rat jeune, par cytophotométrie, caryométrie, et histoautoradiographie. *Arch. Biol.* **71**, 489—525, 1960.
17. Freiman D. G., Kaplan N.: Studies on the Histochemical Differentiation of Enzymes Hydrolysing Adenosine Triphosphate. *J. Histochem. Cytochem.* **8**, 159—170, 1960.
18. Gomori G.: Microtechnical Demonstration of Phosphatase in Tissue Sections and Tissues. *Proc. Soc. Exp. Biol. a. Med.* **42**, 23—25, 1939.
19. Gömöri P., Rohanyi G., Földi M., Szabo G.: Functional and Morphological Changes of the Kidney in Dehydration. *Acta Morphol. (Budapest)* **4**, 9—23, 1954.
20. Harry A., Wilmer M. D.: Renal Phosphatase and Correlation between the Functional Activity of the Renal Tubule and Its Phosphatase Content. *Arch. Path.* **34**, 227—237, 1944.
21. Hepler O. E., Gorley H., Simonds J. P.: Experimental Nephropaties. II. Renal Phosphatasen after Poisoning with Mercury Bichloride, Uranyl Nitrate and Potassium Dichromate. *Arch. Path.* **39**, 133—141, 1945.
22. Herlaut M.: Activité mitotique des cellules renales au cours de l'hydro-néphrose unilatérale. *Bull. Acad. Roy. Med. Belg.* **13**, 315—330, 1948.
23. Herlaut M., Timiras P. S.: Étude histologique et histochimique des lésions provoquées par les corticoïdes au niveau du rein du rat. II Influence sur les phosphatasen alcalines et acides et sur les ribonucléïnes du rein. *Acta anat. (Basel)* **14**, 65—97, 1952.
24. Hiller S., Kędzia H., Zawistowska H., Zawistowski S., Zegarska Z.: Sur la phosphatase alcaline et les polysaccharides dans l'appareil uro-génital au cours du développement du rat. *Compt. Rend. de l'Assoc. des Anatom.* XLVI Réunion Montpellier, 22 mars 1959, ss. 355—365.
25. Holl T. C., Stochaj E. M.: Some Renal Histochemical Changes in the Rat Following Adrenalectomy and Hormone Treatment. *J. Histochem. Cytochem.* **2**, 438—439, 1954.
26. Kochankien C. D.: Histochemical Study of the Alkaline Phosphatase of the Kidney of the Castrated Mouse after Stimulation with Various Androgens. *Am. J. Physiol.* **152**, 257—262, 1948.
27. Mac Manus J. F. A.: Histological and Histochemical Uses of Periodic Acid. *Stain Tech.* **25**, 89—99, 1949.
28. Maenwyn-Davies G. D., Friedwald J. S., White R. T.: Substrate Specificity of Enzymes Hydrolysing Adenosine Triphosphate, Muscle and Yeast Adenylic Acids and Creatinine-phosphate at High pH: the Histochemical Demonstration of Myosin ATPase. *J. Cell. Comp. Physiol.* **39**, 395—448, 1952.

29. Moog F., Wenger E. L.: The Occurrence of a Neutral Mucopolisaccharide at Sites of High Alkaline Phosphatase Activity. *Am. J. Anat.* **90**, 339—378, 1952.
30. Novikoff A. B.: Histochemical Demonstration of Nuclear Enzyme. *Exp. Cell. Res. Suppl.* **62**, 465—475, 1952.
31. Novikoff A. B.: Lysosomes and the Physiology and Pathology of Cells. *Biol. Bull.* **117**, 385—395, 1959.
32. Novikoff A. B.: The Proximal Tubule Cell in Experimental Hydronephrosis. *J. Biophys. a. Biochem. Cytol.* **6**, 136—139, 1959.
33. Novikoff A.B.: The Rat Kidney: Cytochemical and Electron Microscopic Studies. In „Biology of Pyelonephritis”, Ed. E. Quinn a. E. Kass, Little, Brown a. Co., Boston. 1960. ss. 113—144.
34. Novikoff A. B.: Lysosomes and Related Particles. In „The Cell”, Ed. Brachet J. a. Mirsky A. E. Academic Press, New York a. London, 2. 423—488, 1961.
35. Novikoff A. B., Essner E.: The Liver Cell. *Am. J. Med.* **29**, 102—131, 1960.
36. Richter G. W.: The Cellular Transformation of Injected Colloidal Iron Complexes into Ferritin and Hemosiderin in Experimental Animals. A Study with the Aid of Electron Microscopy. *J. Exper. Med.* **109**, 187—197, 1959.
37. Rollason H. D.: Compensatory Hypertrophy of the Kidney of the Young Rat with Special Emphasis on the Role of Cellular Hyperplasia. *Anat. Rec.* **104**, 263—285, 1949.
38. Ruyter J. H. C., Kroon D. B., Neumann H.: Effect of Bilateral Adrenalectomy on Alkaline Phosphatase Activity in the Rat in Relation to Regressive Changes in the Nephron. *Acta Anat.* **14**, 42—53, 1952.
39. Smytri D. H.: Membrane Transport and Metabolism. *Symposia C.S.A.V. Praha*, 1961.
40. Somogyi E., Donath T., Balint J.: Histochemical Changes in the Renal Parenchyma after Compression of the Renal Artery in the Dog. *Acta Morph.* **7**, 1—14, 1956.
41. Sulkin N. M.: Cytologic Studies of the Remaining Kidney Following Unilateral Nephrectomy in the Rat. *Ant. Rec.* **105**, 95—11, 1949.
42. Suzuki T.: Zur Morphologie der Nierensekretion unter physiologischen und pathologischen Bedingungen. *Jena*, 1912.
43. Svanborg A.: Determination of the Esterase Activity in Tissue Suspension from Rabbit Liver and Kidney in Experimentally Induced Renal Disorders Accompanied by Hyperlipemia. *Act. med. Scand.* **149**, 349—353, 1953.
44. Verne J., Hebert S.: Les activités enzymatiques comparées dans l'entérocyte et le néphrocyte étudiées par la cytochimie. *Arch. d'Anat. microsc.* **42**, 49—56, 1953.
45. Vorbrodt A.: Metody histochemicznego wykrywania fosfataz. *Fol. Morphol.* **4**, 271—280, 1956.
46. Vorbrodt A.: Rozmieszczenie i czynność fosfatazy w komórce. *Fol. Morphol.* **4**, 313—318, 1956.
47. Vorbrodt A.: O udziale fosfataz w śródkomórkowym metabolizmie. *Post. Hig. Med. Dośw.* **13**, 200—207, 1959.
48. Wachstein M.: Renal Phosphatase in Choline Deficiency. *Arch. Path. (Lab. Med.)*. **38**, 297—304, 1944.

49. Wachstein M.: Influence of Experimental Kidney Damage on Histochemically Demonstrable Lipase Activity in the Rat; Comparison with Alkaline Phosphatase Activity. *J. Exp. Med.* **84**, 25—36, 1946.
50. Wachstein M.: Nephrotoxic Action of dl-serine in the Rat. I The Localisation of the Renal Damage, the Phosphate Activity and the Influence of Age, Sex, Time and Dose. *Arch. Path.* **43**, 503—514, 1947.
51. Wachstein M.: Histochemical Staining Reactions of the Normally Functioning and Abnormal Kidney. *Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med.* **79**, 680—682, 1952.
52. Wachstein M., Meisel E.: Histochemical Demonstration of Esterase Activity in the Normal Human Kidney and in Renal Carcinoma. *Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med.* **79**, 680—682, 1952.
53. Wilmer H. A.: The Disappearance of Phosphatase from the Hydronephrotic Kidney. *J. Exp. Med.* **78**, 225—231, 1943.
54. Wilmer H. A.: Renal Phosphatase. *Arch. Path.* **37**, 227—237, 1944.
55. Zawistowski S.: Cytotopochemical Investigations on Hydrolysates in the Kidneys of Laboratory Rodents. *Folia Biologica* (w druku).

OBJAŚNIENIA DO RYCIN

Ryc. 1. Nerka szczura po 3 dniach od chwili podwiązania moczowodu. Dośw. grupa V. Metoda Gomoriego, pH 5,4, substrat-glicerofosforan sodu. Duże ziarnistości zawierające fosfatę kwasną, mniej liczne aniżeli we wcześniejszych stadiach wodonercza. Pow. negat. ca 250 X.

Ryc. 2. Nerka szczura po 7 dniach od chwili podwiązania moczowodu. Dośw. grupa VI. Metoda Gomoriego, pH 5,4, substrat-glicerofosforan sodu. Aktywność fosfatazy kwasnej większa w porównaniu z grupą V. Pow. negat. ca 250 X.

Ryc. 3. Nerka szczura po 6 godz. od chwili podwiązania moczowodu. Dośw. grupa I. Metoda CoS, pH 9,2, substrat-glicerofosforan sodu. Widoczna żywa aktywność fosfatazy zasadowej w rąbku szczoteczkowym. Pow. negat. ca 125 X.

Ryc. 4. Nerka szczura po 7 dniach od chwili podwiązania moczowodu. Dośw. grupa VI. Metoda CoS, pH 9,2, substrat-glicerofosforan sodu. Przejściowe zwiększenie aktywności fosfatazy zasadowej. Pow. negat. ca 250 X.

Ryc. 5. Nerka szczura po 14 dniach od chwili podwiązania moczowodu. Dośw. grupa VIII. Metoda CoS, pH 9,2, substrat-glicerofosforan sodu. Tylko nieliczne kanaliki zachowały w swym rąbku szczoteczkowym fosfatę kwasną. Pow. negat. ca 125 X.

Ryc. 6. Nerka szczura po 3 dniach od chwili podwiązania moczowodu. Dośw. grupa V. Reakcja wykazująca aktywność esteraz niespecyficznych w pH 7,4 przy użyciu octanu α naftolu. Widoczny żywy odczyn w cytoplazmie komórek nabłonka kanalików głównych. Pow. negat. ca 250 X.

Ryc. 7. Nerka szczura po 3 dniach od chwili podwiązania moczowodu. Dośw. grupa V. Metoda CoS, pH 8,3, substrat A5P. Widoczny żywy odczyn 5 nukleotyduzy w błonach podstawowych kanalików, w torebce Bowmana i w rąbku szczoteczkowym kanalików głównych. W cytoplazmie komórek nabłonka kanalików ziarnisty odczyn aktywności enzymu. Pow. negat. ca 250 X.

Ryc. 8. Nerka szczura po 7 dniach od chwili podwiązania moczowodu. Dośw. grupa VI. Metoda CoS, pH 8,3, substrat A5P. Czynność enzymu w nie zmienionych kanalikach w pełni zachowana. Pow. negat. ca 250 X.

Ryc. 9. Nerka szczura po 24 godz. od chwili podwiązania moczowodu. Dośw. grupa III. Reakcja PAS. Żywy odczyn w torebce Bowmana i w błonach podstawowych kanalików. W rąbku szczoteczkowym ilość substancji PAS dodatnich zmniejszona. W cytoplazmie kanalików głównych widoczne ziarnistości. Pow. negat. ca 250 X.

Ryc. 10. Nerka szczura po 24 godz. od chwili podwiązania moczowodu. Dośw. grupa III. Reakcja dimedon-PAS. Widoczne ziarnistości w nabłonku kanalików. Pozostałe struktury komórkowe nie wybarwione. Pow. negat. ca 250 X.

Ryc. 11. Nerka szczura po 7 dniach od chwili podwiązania moczowodu. Dośw. grupa VI. Reakcja diastaza-PAS. Wzrost ilości substancji PAS dodatnich w rąbku szczoteczkowym. Pow. negat. ca 250 X.

Ryc. 12. Nerka szczura po 21 dniach od chwili podwiązania moczowodu. Dośw. grupa IX. Reakcja diastaza-PAS. Znaczne pogrubienie podstawowych błon kanalików i listków ściennych torebek Bowmana. Brak odczynu w rąbku szczoteczkowym. Pow. negat. ca 250 X.

РЕЗЮМЕ

Автор исследовал активность и внутриклеточное размещение некоторых гидролаз (кислой фосфатазы, щелочной фосфатазы, 5-нуклеотидазы и неспецифических эстераз) в клетках почек после одностороннего подвязывания мочеточника. Исследовались почки белых крыс. Ткани из обеих почек были взяты в разные послеоперационные периоды. На основании обеих собственных исследований и полученных данных, сопоставленных с наблюдениями ряда исследователей, можно полагать, что в почке со стороны подвязанного мочеточника лизосомы сначала увеличивались и затем наступала диффузия. Активность кислой фосфатазы со временем уменьшалась.

Щелочная фосфатаза в щеточной каемке со стороны подвязанной почки стала менее активной. В противоположной почке обнаружен высокий уровень щелочной фосфатазы. Активность 5-нуклеотидазы и неспецифических эстераз уменьшалась гораздо медленнее. Кроме того, исследовались реакция ПАС и клеточные митохондрии. После проведения реакции Фейльгена определялись индексы метафаз в слое коры обеих почек.

Базальные мембраны канальцев подвязанной почки стали толще и вместе с тем щеточная каемка стала тоньше, и она обнаруживала менее интенсивную реакцию ПАС. Митохондрии в подвязанной почке дегенерировались, в противоположной же почке хондриом пролиферировался. Число митотических делений в подвязанной почке увеличивалось, достигая максимума после 7-ми дней после

операции. В противоположной почке самый высокий уровень регенерации был обнаружен в последних исследованных группах, т.е. когда дегенерация подвязанной почки достигла максимума.

Рис. 1. Почка крысы после 3 дней с момента операции. Опытная группа V. Метод Гомори, рН 5,4 субстрат — глицерофосфат натрия. Кислая фосфатаза содержится в крупных зернах, менее многочисленных, чем в более ранние стадии нефрогидроза. Увеличение негатива ок. 250X.

Рис. 2. Почка крысы в 7 дней после операции. Опытная группа V. Метод Гомори, рН 5,4, субстрат — глицерофосфат натрия. Активность кислой фосфатазы несколько больше, чем в пятой группе. Увеличение негатива ок. 250X.

Рис. 3. Почка крысы после 6 часов с момента операции. Опытная группа I. Кобальт-сульфидный метод, рН 9,2, субстрат — глицерофосфат натрия. Заметен высокий уровень щелочной фосфатазы в щеточной каемке. Увеличение негатива ок. 150X.

Рис. 4. Почка крысы после 7 дней с момента операции. Опытная группа VI. Кобальт-сульфидный метод, рН 9,2, субстрат — глицерофосфат натрия. Увеличение активности щелочной фосфатазы. Увеличение негатива ок. 250X.

Рис. 5. Почка крысы после 14 дней с момента операции. Опытная группа VIII. Кобальт-сульфидный метод, рН 9,2, субстрат — глицерофосфат натрия. Только лишь в некоторых канальцах щеточной каемки сохранилась щелочная фосфатаза. Увеличение негатива ок. 125X.

Рис. 6. Почка крысы после 3 дней с момента проведения операции. Опытная группа V. Субстрат — α -нафтилацетат, рН 7,4. Высокая активность эстераз в цитоплазме клеток канальцев почки. Увеличение негатива ок. 250X.

Рис. 7. Почка крысы после трех дней с момента операции. Опытная группа V. Кобальт-сульфидный метод, рН 8,3, субстрат — А5Ф. Высокая активность 5-нуклеотидазы в базальных мембранах, в капсуле клубочка, в щеточной каемке. В цитоплазме клеток видны зерна, свидетельствующие о ферментативной активности. Увеличение негатива ок. 250X.

Рис. 8. Почка крысы после 7 дней с момента операции. Опытная группа VI. Кобальт-сульфидный метод, рН 8,3, субстрат — А5Ф. Наблюдается высокая активность в неизмененных канальцах. Увеличение негатива ок. 250X.

Рис. 9. Почка крысы после 24 часов с момента проведения операции. Опытная группа III. Реакция ПАС. Высокая интенсивность реакции в капсуле клубочка и в базальных мембранах канальцев. В щеточной каемке реакция ПАС уменьшилась. В цитоплазме клеток проксимальной части канальцев видны зерна ПАС. Увеличение негатива ок. 250X.

Рис. 10. Почка крысы после истечения 24 часов с момента завершения операции. Опытная группа III. Реакция димедон-ПАС. Зерна ПАС в эпителии канальцев. Остальные клеточные структуры реакции не дают. Увеличение негатива ок. 250X.

Рис. 11. Почка крысы после 7 дней с момента завершения операции. Опытная группа VI. Реакция диастаза-ПАС. Увеличение интенсивности реакции в щеточной каемке. Увеличение негатива ок. 250X.

Рис. 12. Почка крысы после истечения 21 дня со времени операции. Опытная группа IX. Реакция диастаза-ПАС. Значительное утолщение базальных мембран канальцев и внешнего листка капсулы клубочка. Щеточная каемка не дает реакции. Увеличение негатива ок. 250X.

табл. 1. Метафазный индекс — его относительная и абсолютная величина.

SUMMARY

The object of this paper was the investigation of the activity and the intracellular localisation of some hydrolytic enzymes (acid phosphatase, alkaline phosphatase, 5-nucleotidase and non specific esterases) in the kidney cells after unilateral ligation of the ureter. The experimental animals were white rats (*Rattus rattus* L. *albino*). The tissues for the histochemical investigation were collected from both kidneys at various intervals after operation. On the basis of the investigation it was found that, at first, in the kidney on the side of the ligatured ureter the size of lysosomes increases and then there occurs the diffusion reaction of acid phosphatase which decreases during a longer period of investigation. The activity of alkaline phosphatase decreased in the brush border in the tissue of hydronephrosis, but in the untreated kidney the activity of alkaline phosphatase increased. The activity of 5-nucleotidase and non specific esterases decreased in a later period of hydronephrosis. In addition the PAS reaction was performed; the cell mitochondria were stained. After that, following Feulgen's method, the index of metaphases was calculated in the parts of the kidney cortex. A thickening of the main membranes of the kidney tubules and simultaneous lowering of intensity of the PAS reaction was observed in the brush border during hydronephrosis. The cell mitochondria in the ligatured kidney underwent degeneration, whereas in the unligatured ureter it was hypertrophied. The number of cell divisions in hydronephrosis rose especially 7 days after ligation of the ureter. In the other kidney the greatest regeneration reaction was observed in the last groups of animals (21 days after the operation). This occurred when the degeneration of the ligatured kidney was mostly advanced.

EXPLANATION OF FIGURES

Fig. 1. Rat's kidney 3 days after the ligation of the ureter. 5th experimental group. Gomori method, pH 5.4. The substrate was sodium glycerophosphate. The large granules containing acid phosphatase are less numerous than in the early period of hydronephrosis. 250 X.

Fig. 2. Rat's kidney 7 days after the ligation of the ureter. 6th experimental group. Gomori method, pH 5.4. The substrate was sodium glycerophosphate. The activity of acid phosphatase is greater than that in group V. 250 X.

Fig. 3. Rat's kidney 6 hours after the ligation of the ureter, 1st experimental group. CoS method, pH 9.2. The substrate was sodium glycerophosphate. A distinct activity of alkaline phosphatase in the brush border. 125 X.

Fig. 4. Rat's kidney 7 days after the ligation of the ureter. 6th experimental group. CoS method, pH 9.2. The substrate was sodium glycerophosphate. A temporary increase of alkaline phosphatase. 250 X.

Fig. 5. Rat's kidney 14 days after the ligation of the ureter. 8th experimental group. CoS method, pH 9.2. The substrate was sodium glycerophosphate. Only few tubules preserved alkaline phosphatase in their brush border. 125 X.

Fig. 6. Rat's kidney 3 days after the ligation of the ureter. 5th experimental group. Reaction showing the activity of non specific esterases in pH 7.5 by using alpha naphthol acetate. A distinct reaction in cell cytoplasm of the epithelium of the main tubules. 250 X.

Fig. 7. Rat's kidney 3 days after the ligation of the ureter. 5th experimental group. CoS method, pH 8.3. The substrate was A5P. A marked reaction 5-nucleotidase in the basic membranes of tubules, in Bowman capsule and in the brush border of the main tubules. In the cell cytoplasm of the epithelium of tubules—granulous reaction of enzyme activity. 250 X.

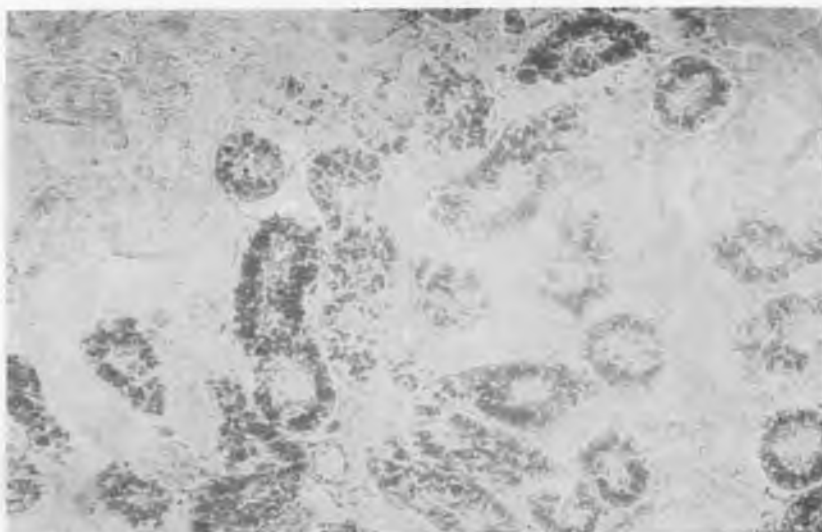
Fig. 8. Rat's kidney 7 days after the ligation of the ureter. 6th experimental group. CoS method, pH 8.4. The substrate was A5P. The enzyme activity in unchanged tubules is fully maintained. 250 X.

Fig. 9. Rat's kidney 24 hours after the ligation of the ureter. 3rd experimental group. PAS reaction. A lively reaction in the Bowman capsule and in the basic membranes of tubules. The number of the PAS positive substances decreased in the brush border. The granules are visible in the cytoplasm of main tubules. 250 X.

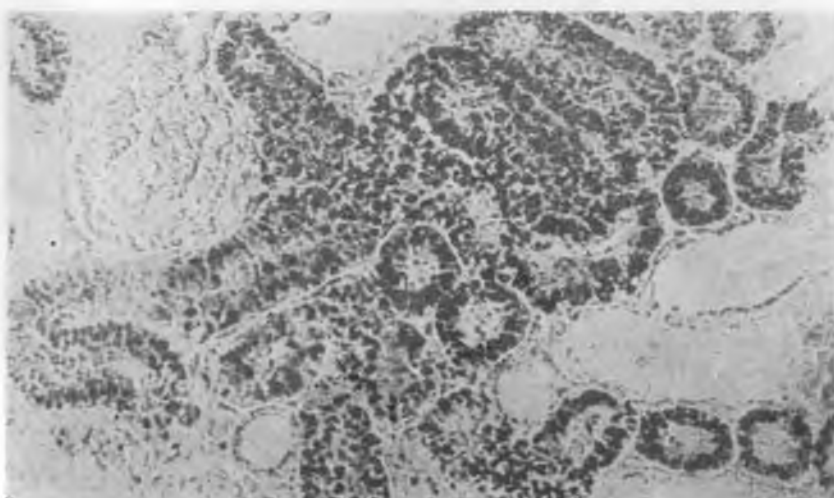
Fig. 10. Rat's kidney 24 hours after the ligation of the ureter. 3rd experimental group. Dimedon PAS reaction. Visible granules in the epithelium of tubules. The remaining cell structures are unstained. 250 X.

Fig. 11. Rat's kidney 21 days after the ligation of the ureter. 6th experimental group. Diastase PAS reaction. An increase of positive substances in the brush border. 250 X.

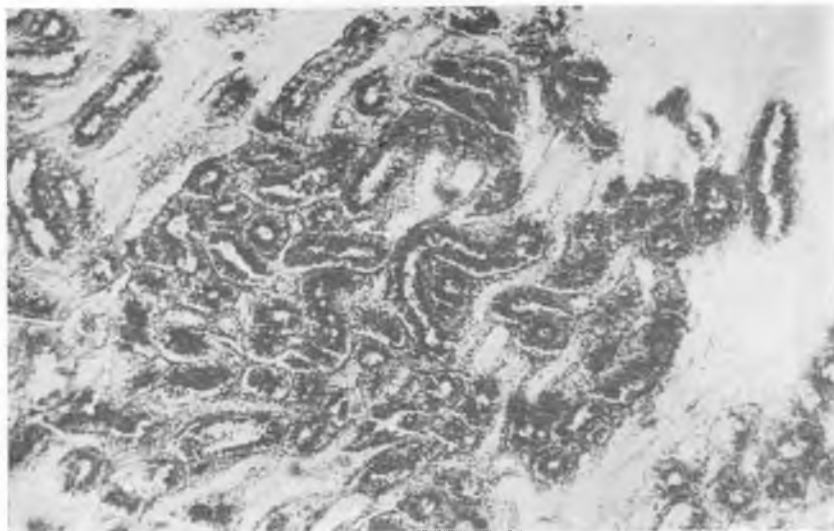
Fig. 22. Rat's kidney 21 days after the ligation of the ureter. 9th experimental group. Diastase PAS reaction. A marked thickening of the basic membranes of tubules and the membranes of the Bowman capsule. Lack of reaction in the brush border. 250 X.



Ryc. 1



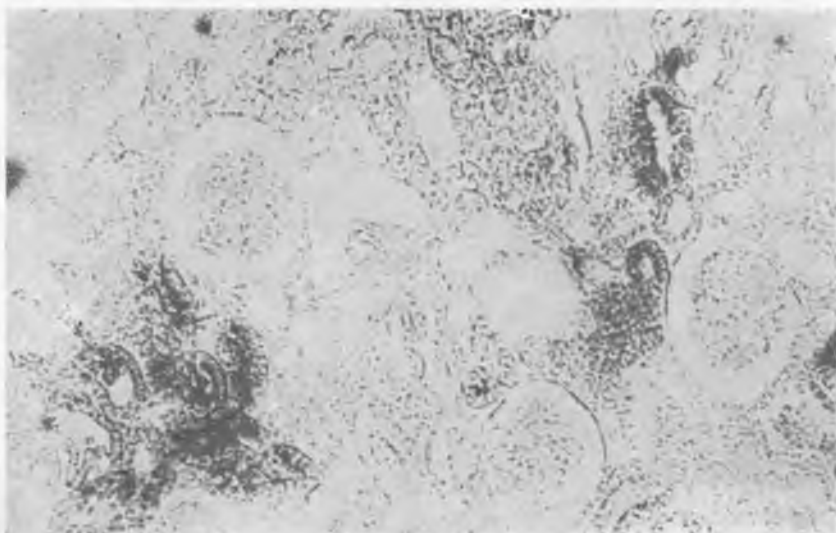
Ryc. 2



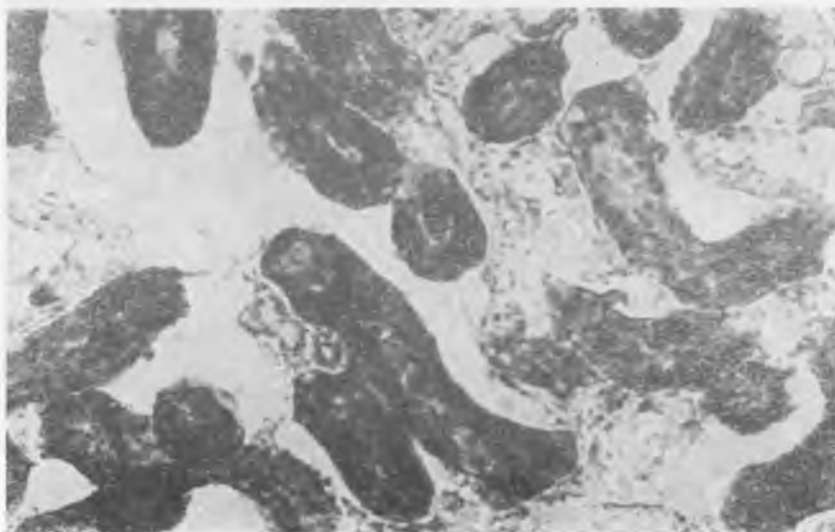
Ryc. 3



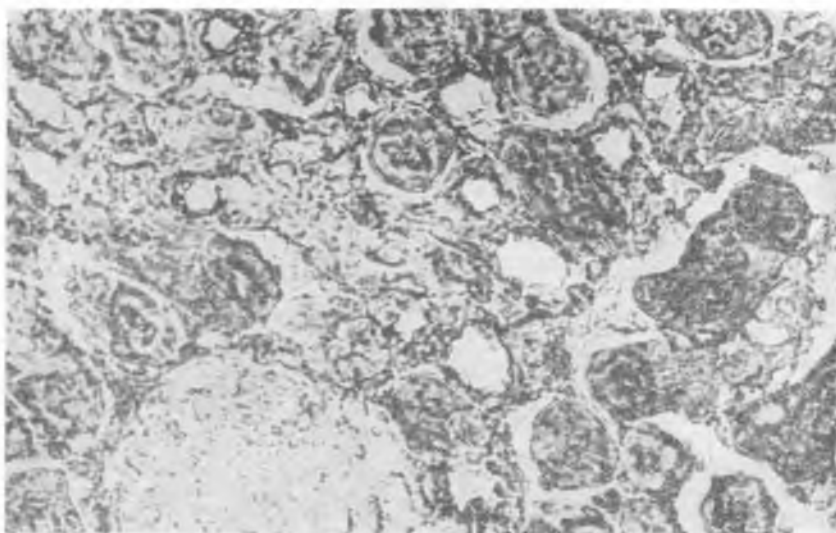
Ryc. 4



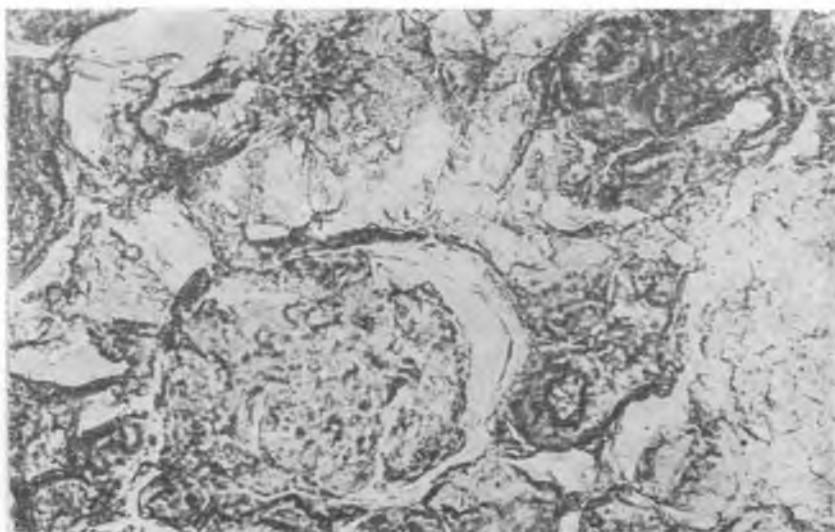
Ryc. 5



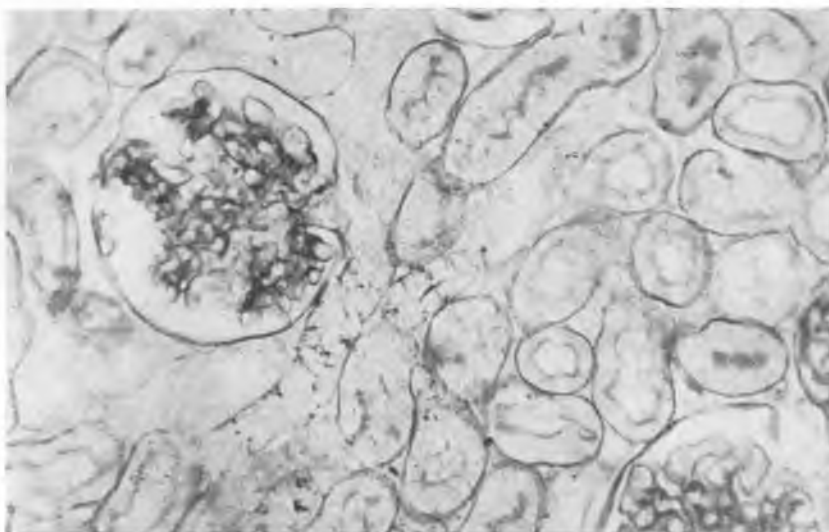
Ryc. 6



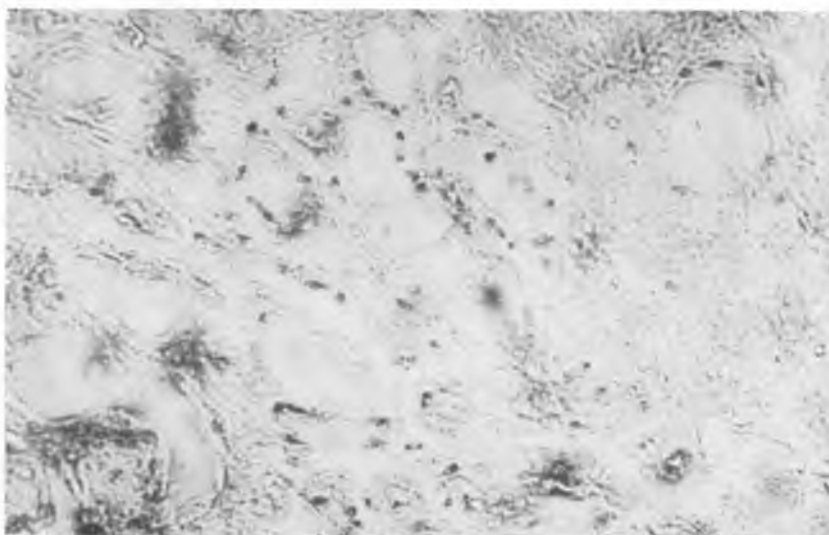
Ryc. 7



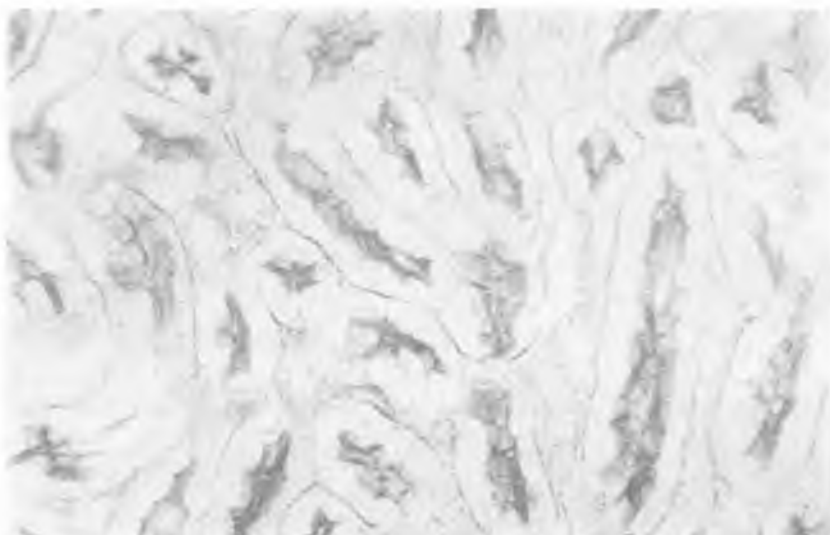
Ryc. 8



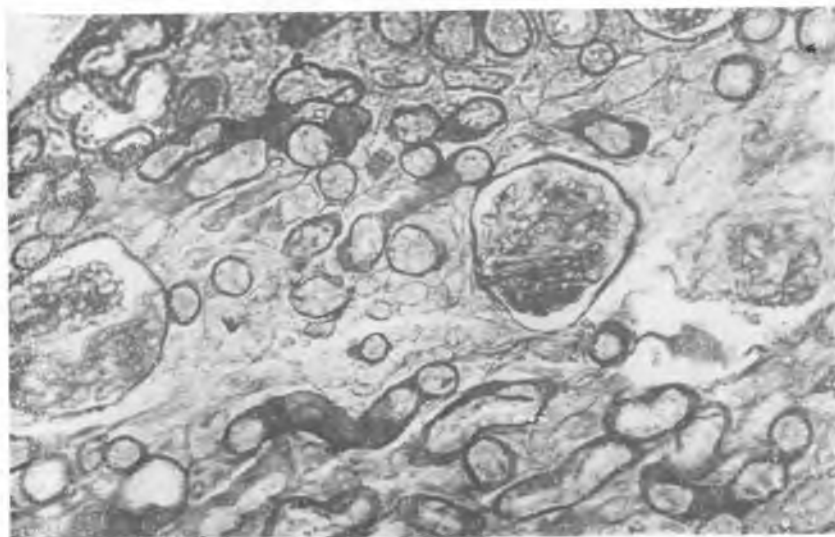
Ryc. 9



Ryc. 10



Ryc. 11



Ryc. 12