

wchodzą w skład elementów regulujących wszystkie procesy biochemiczne w komórce. W naszej pracy przebadano kwasy nukleinowe w komórkach wątroby u zwierząt z doświadczalną toksemią błoniczą. Wątroba jest narządem wrażliwym na działanie toksyny błoniczej obfitującym zarówno w RNA, jak i DNA, będącym równocześnie podstawowym ogniwem regulującym przemianę materii żywego organizmu.

MATERIAŁ I METODYKA BADAŃ

Badania przeprowadzono na świnkach morskich wagi około 250 g i myszkach rasy B-6 wagi 21—22 g. Przy doborze zwierząt kierowano się ich specyficzną wrażliwością na jad błoniczy. Z wątroby świnek morskich wykonywano homogenaty i skrawki histologiczne do oznaczania zawartości RNA i DNA a inkorporację izotopu P^{32} do RNA przeprowadzano na myszkach, ponieważ były trudności z uzyskaniem odpowiedniej ilości radioaktywnego fosforu. Mimo, że zarówno świnki morskie, jak i myszki rasy B-6 są w podobnie wysokim stopniu wrażliwe na toksynę błoniczą, przy omawianiu wyników badań zwrócono uwagę na różnice gatunkowe badanego materiału.

Świnki morskie podzielono na dwie grupy doświadczalne. I grupa stanowiła kontrolę. Grupie II doświadczalnej wstrzykiwano dootrzewnowo 1 DLM toksyny błoniczej otrzymanej z Państwowej Wytwórni Surowic i Szczepionek w Lublinie. Świnki morskie zabijano przez dekapitację.

Grupę doświadczalną podzielono na trzy podgrupy: 1 podgrupa zawierała zwierzęta, którym pobrano wątrobę po 15 godzinach działania toksyny. 2 podgrupie pobrano wątrobę po 42 godzinach, a 3 — po około 90 godzinach. Z części wyciętej wątroby we wszystkich badanych grupach zwierząt wykonywano skrawki histologiczne, utrwalano w płynie Serra i barwiono metodą Bracheta (dla RNA) wg ogólnie przyjętych zasad, oraz jako uzupełnienie badań histochemicznych dokonano obserwacji w mikroskopie elektronowym. Wątrobę świnki morskiej utrwalano w czterotlenku osmu, odwadniano w alkoholach etylowych o wzrastających stężeniach i zatapiano w metakrylanie n-butyłu. Ultracienkie skrawki sporządzano nożem szklanym na ultramikrotomie Sitte OmU (C. Reichert, Wiedeń). Elektromikrofotogramy wykonywano przy użyciu mikroskopu elektronowego Elmi D₂ (C. Zeiss Jena).

Pobierano także 10 g ilości tkanki wątrobowej, z których sporządzano homogenaty w celu wyodrębnienia RNA i DNA, a w fazie wstępnej wykonywano z nich trwałe proszki dwoma następującymi metodami:

I. Wg Kok i Opolskiej (1960) homogenaty wykonywano w roztworze zimnego etanolu, następnie dwa razy ekstrahowano w mieszaninie etanolu i eteru (1:1 v/v) oraz dwa razy w eterze i suszono na powietrzu, otrzymując substancję sproszkowaną, dalej zwaną proszkiem A.

II. Wg Caniewa i Markowa (1960) homogenaty wykonywano w 10% roztworze kwasu trójchlorooctowego, przemywano 5% kwasem trójchlorooctowym, a następnie ekstrahowano w etanolu, mieszaninie etanolu i eteru (1:1 v/v), oraz w eterze i suszono na powietrzu otrzymując substancję sproszkowaną, dalej zwaną proszkiem T.

Z proszków A i T wyizolowywano kwasy nukleinowe, stosując dwie poniższe metody postępowania:

1. Metoda wg Davidsona i Smelle (1952) uzupełniona badaniami przeprowadzonymi w następnych latach (Spirin i Biełozierski — 1956, Fleck i Munro — 1962), a uzyskany w osadzie DNA rozpuszczano wg metody Schneidera (1946).

2. Metodą wg Schmidta-Thannhausera (1945), otrzymano roztwory kwasów nukleinowych przeznaczone do dalszych oznaczeń ilościowych.

Pomiary spektrofotometryczne roztworów RNA z proszków A i T przeprowadzono na spektrofotometrze Unicam SP-500 w następujących długościach fal: 260, 275, 280, 286 m μ . Ilość RNA obliczano wg wzorów podanych przez Fleck i Munro (1962), Caniewa i Markowa (1960), Warburga i Christiana (1941), a w celu porównania wyników oznaczano dodatkowo zawartość fosforu w oparciu o metodę Horeckera i wsp. (1940).

Korzystając z uprzejmości Pana Profesora dr Bronisława Filipowicza, Kierownika Katedry Chemii Fizjologicznej Akademii Medycznej w Łodzi, oraz Pana dr Andrzeja Lewandowskiego, asystenta tejże Katedry wykonano oznaczenia biochemiczne, jak również przebadano inkorporację izotopu P³² do RNA. W celu określenia inkorporacji izotopu P³² do RNA badania przeprowadzono na myszach rasy B-6. Myszy podzielono na dwie grupy.

Grupie pierwszej podano dootrzewnowo 1 DLM toksyny błoniczej. Po 15 godzinach działania toksyny podano dootrzewnowo myszom z grupy pierwszej 100 μ c izotopu P³² w postaci roztworu ortofosforanu potasowego. Tę samą dawkę izotopu P³² otrzymały myszy z grupy drugiej, stanowiącej kontrolę. Po 15 min. od chwili podania izotopu P³² myszy zabijano przez przerwanie rdzenia kręgowego, pobierano wątrobę i natychmiast ją homogenizowano.

Kwas rybonukleinowy otrzymano metodą fenolową wg Scherrera i Darnella (1962) z ominięciem siarczanu poliwinylu (Kurland 1960), oraz stosując roztwór Kirby (1956). Otrzymane roztwory wodne służyły do oznaczania kwasu rybonukleinowego wg metody spektrofotometrycznej i stanowiły czystą radioaktywnie frakcję RNA.

W celu określenia ilości impulsów dla izotopu P³² wbudowanego w cząsteczki kwasu rybonukleinowego pobierano wodny roztwór RNA i oznaczano licznikiem cienkwarstwowym Geigera-Müllera połączonym z przelicznikiem LL-1. Impulsy oznaczano w ciągu 5 minut. Jednocześnie przebadano ilość impulsów w całkowitych homogenatach pobierając do oznaczenia 0,1 ml homogenatu, licząc impulsy w ciągu 1 min. Dla określenia zaś stężenia RNA pobrane próbki oznaczano na spektrofotometrze Unicam SP-500 w zakresie ultrafioletu, w długościach fal 260 i 280 m μ . Jeżeli stosunek odczytu w 280 m μ do odczytu w 260 m μ jest bliski 0,5 to ilość kwasu rybonukleinowego obliczano wg odczytu w 260 m μ . Współczynnik E₂₆₀ równy 1,000 (odczyt 1 000) odpowiada w przybliżeniu 40 μ g RNA.

BADANIA WŁASNE

W badaniach własnych uwzględniono: 1) badania histochemiczne i w mikroskopie elektronowym oraz 2) badania biochemiczne, w których uwzględniono: A) badania ilościowe DNA i RNA w homogenatach wątrobowych, oraz B) inkorporację izotopu P³² do RNA.

1. Badania histochemiczne

I. Grupa kontrolna: w preparatach przeglądowych pobranych z wątroby świnki morskiej barwionych hematoksyliną i eozyną uwidaczniała się wyraźna struktura narządu. Żyły środkowe miały prawidłowe średnice, między sznurami komórek znajdowały się w skąpej ilości elementy tkanki łącznej. Komórki wątrobowe dwujądrazte obserwowano w niewielkiej ilości. Jądra komórkowe były duże, o wyraźnym zrębie chromatynowym, z przeciętnie dwoma jąderkami. Kwas rybonukleinowy wybarwiony wg Bracheta układał się w formie drobnych ziarenek, które w okolicach przyjądrowych wykazywały dążność do zlewania się w duże, wyraźne skupiska. W pozostałym obszarze cytoplazmy obserwowano pojedyncze, drobne odgraniczone od siebie i otoczenia ziarenka (ryc. 1). Odczyn barwny w jąderkach był podobny do uzyskanego w ziarenkach cytoplazmy. Poszczególne jąderka również nie różniły się od siebie intensywnością zabarwienia. Nie obserwowano także zmian w reakcji Bracheta między jąderkami znajdującymi się w jądrach komórek jedno- i dwujądraztych.

II. Grupa doświadczalna:

W 1 podgrupie doświadczalnej w wątrobie świnek morskich po 15 godz. działania toksyny błoniczej nie obserwowano tworzenia się dużych skupisk ziarnistości RNA w okolicach przyjądrowych, co wyraźnie uwidaczniało się w grupie kontrolnej (ryc. 2). Natomiast ziarenka z jednakowo nasilonym odczynem barwnym były równomiernie rozrzucone na przestrzeni całej cytoplazmy. Intensywność zabarwienia ziarenek i jąderek nie różniła się od siebie, jak również od obrazów uzyskanych w grupie kontrolnej. Liczba jąderek w jądrach nie uległa zmianie. Zauważono także, że światło naczyń krwionośnych w wątrobie świnek morskich było poszerzone, wypełnione elementami morfologicznymi krwi, co wiąże się z przekrwieniem narządu, wywołanym działaniem toksyny błoniczej (Orłowski 1950). Jak widać, obrazy uzyskane w grupie kontrolnej i 1 podgrupie doświadczalnej różniły się od siebie jedynie rozmieszczeniem ziarnistości w obrębie cytoplazmy i stanem czynnościowym naczyń krwionośnych. Intensywność odczynów barwnych w ziarenkach cytoplazmatycznych i jąderkach była podobna.

W 2 podgrupie doświadczalnej, czyli po 42 godz. działania toksyny błoniczej obserwuje się w wątrobie świnek morskich znaczne poszerzenie naczyń krwionośnych w porównaniu nie tylko z grupą kontrolną, ale i z poprzednio opisywaną (ryc. 3). Naczynia krwionośne były obficie wypełnione krwią. W rozmieszczeniu, wielkości i intensywności zabarwienia ziarnistości zawartych w komórkach nie było uchwytnych różnic w porównaniu z wątrobą pobraną od zwierząt po 15 godz. działania tok-

syny błoniczej. W obrazie jąderek nie było zmian w zestawieniu zarówno z grupą kontrolną, jak i 1 podgrupą doświadczalną. Zasadniczym zjawiskiem występującym w wątrobach tej grupy badanych zwierząt były także zmiany czynnościowe w obrębie naczyń krwionośnych, objawiające się znacznym ich poszerzeniem.

W 3 podgrupie doświadczalnej po 90 godz. działania toksyny błoniczej (świnki padły) zwracała uwagę niewyraźna, zatarta struktura tkanki wątrobowej. Miejscami zupełnie znikał regularny układ komórek, które tworzyły skupienia o słabo widocznych granicach. Natomiast w poszczególnych komórkach wątrobowych wyraźnie odznaczały się jądra, a w niektórych widać było 2—3 jąderka. Jąderka były dokładnie odgraniczone od otoczenia, wykazywały intensywny odczyn barwny. Zmienił się zasadniczo obraz naczyń krwionośnych, które były znacznie zwężone i przeważnie puste. Ziarenka RNA były bardzo drobne, delikatnie odgraniczone, rozrzucone gęsto w cytoplazmie. Wśród nich można było zauważyć większe ziarenka podobne do opisanych w grupach poprzednich (ryc. 4). W opisywanej grupie zaznaczają się zmiany zarówno w układzie naczyń krwionośnych, jąderkach jak i w zachowaniu się ziarenek RNA. Należy podkreślić, że śmiertelna dawka toksyny błoniczej właśnie w około 90 godz. od chwili jej podania powodowała zgon zwierząt doświadczalnych.

Zestawiając wyniki uzyskane z badań histochemicznych, można stwierdzić, że pod wpływem śmiertelnej dawki toksyny błoniczej w miarę upływu czasu od jej wstrzyknięcia zmieniał się układ i struktura ziarnistości RNA, zachodziły zmiany w jąderkach jak również w stanie czynnościowym naczyń krwionośnych.

Jako uzupełnienie badań histochemicznych wykonane zostały preparaty i fotografie w mikroskopie elektronowym.

W grupie kontrolnej zaznaczały się wyraźnie granice między poszczególnymi komórkami. Jądra miały kształt okrągły i owalny, o gładkich obrysach, otoczone były dwuwarstwową błoną. Warstwy brzeżne błony jądrowej wykazywały wybitną gęstość elektronową w porównaniu z warstwą środkową. Jąderka występowały jako twory kuliste, wyraźnie odgraniczone od otoczenia. Struktura ich była zbita, gęstość elektronowa bardzo znaczna. Układały się na skraju jądra, tuż przy błonie. W obrazie poszczególnych komórek zwracały uwagę różnie ukształtowane mitochondria oraz szereg wakuoli pustych elektronowo. Mitochondria układały się głównie w pobliżu błony komórkowej i jądrowej. Taki układ szczególnie wyraźnie obserwowano w grupie kontrolnej.

W 1 podgrupie doświadczalnej po 15 godz. działania toksyny błoniczej granice między komórkami nadal były dobrze widoczne. Zmieniło się położenie mitochondriów, które nie wykazywały typowego układu

tuż przy błonie jądrowej i komórkowej, a zajmowały całe wnętrze komórki. Pogłębiła się poza tym gęstość elektronowa mitochondriów i znacznie zwiększyła się ilość drobnych, okrągłych wakuoli pustych elektronowo.

W obrazie 2 podgrupy doświadczalnej nie obserwowano uchwytłych różnic w porównaniu z obrazem grupy pierwszej.

W 3 podgrupie doświadczalnej w wątrobie wystąpiły zmiany wskazujące na znaczne zaburzenia metabolizmu komórki. Granice między komórkami stały się zatarte, miejscami zupełnie niewidoczne. W niektórych jądrach obserwowano objawy kariolizy. Jąderka stały się mniejsze, a w jądrach wielojąderkowych wykazywały osłabienie gęstości elektronowej i niekiedy mało wyraźnie odgraniczały się od pozostałych struktur jądrowych. Zmniejszała się ilość oraz gęstość elektronowa mitochondriów, zbliżając się do gęstości elektronowej cytoplazmy. Natomiast położenie ich nie uległo zmianie w porównaniu z grupą poprzednio opisywaną. Zwiększyła się wyraźnie objętość wakuoli, które przybrały kształty wydłużone.

W wyniku analizy otrzymanych obserwacji z badań histochemicznych i mikroskopu elektronowego można stwierdzić zbieżność między zmianami histochemicznymi i strukturalnymi w komórkach wątrobowych pod wpływem toksemii błoniczej (ryc. 5, 6 i 7).

2. Badania biochemiczne

A. Badania ilościowe DNA i RNA w homogenatach wątrobowych.

W oparciu o stosowane metody badań zestawiono w tabelach średnie zawartości DNA i RNA w wątrobie zwierząt kontrolnych i doświadczalnych oraz zależność między zawartością DNA i RNA w wątrobach zwierząt doświadczalnych a czasem działania toksyny błoniczej.

a) Średnie zawartości DNA w wątrobie zwierząt kontrolnych i doświadczalnych.

W tab. 1 przedstawiono wyniki uzyskane z proszków A i T otrzymanych wg stosowanych metod. Proszek T wykonany był z homogenatu w roztworze kwasu trójchlorooctowego. Proszek A otrzymany był z homogenatu w roztworze alkoholu etylowego. Wyniki otrzymane wg metody Davidsona i Smelle (1952) w przeliczeniu na P-DNA w przypadku proszku T były około dwa razy niższe od wyników dla proszku A. Ponieważ dalsze wyizolowywanie z proszku A uzyskanego wg Kok i Opolskiej (1960) z homogenatów alkoholowych i z proszku T otrzymanego wg Caniewa i Markowa (1960) z homoge-

natów w kwasie trójchlorooctowym było identyczne, więc różnice mogły być spowodowane tylko podczas przygotowywania samych proszków.

Wyniki uzyskane z proszku T metodą Schmidta-Thannhausera (1945) były zbliżone do danych przedstawionych dla proszku A metodą Davidsona i Smelle (1952). Reasumując, można stwierdzić, że ilości P-DNA w przypadku proszku T były niższe niż w przypadku proszku A.

Tab. 1. Stężenie P-DNA w $\mu\text{g}/100$ mg świeżej masy
Concentration of P-DNA in $\mu\text{g}/100$ mg of fresh pulp

Grupy zwierząt	Proszek A			Proszek T					
	Metoda Davidsona i Smelle			Metoda Davidsona i Smelle			Metoda Schmidta — Thannhausera		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
	kontrolna	43,8	35	46,7	20	25	21,3	34,3	35,5
15 godz	46,8	35	47,7	19	24	22,6	37,2	38	65,3
42 godz	49,8	38	53,8	20	26,6	23,3	33,6	37,8	61,7
90 godz	42,8	38	52,7	20,4	26,2	19,3	35,2	37,7	65

Objaśnienia: 1. dane wg zawartości fosforu, 2. dane wg zawartości dezoksyrybozy, 3. obliczenia Caniewa i Markowa z danych spektrofotometrycznych.

Explanation: 1. data according to the content of phosphorus, 2. data according to the content of deoxyribose, 3. estimation according to Caniev and Markov, based on spectrophotometric data.

Znaczne różnice między wynikami obliczonymi wg danych spektrofotometrycznych oraz wyjątkowo wysokie wartości P-DNA otrzymanego wg metody Schmidta-Thannhausera (1945) dla proszku T były spowodowane różnymi metodami wyizolowywania DNA. Wprowadzony przez Markowa i Caniewa (1960) wzór dla wyliczania ilości P-DNA z danych spektrofotometrycznych odnosi się do szczurów. Świnki morskie mogą posiadać inny skład produktów rozkładu białek występujących razem z rozdzielonymi kwasami nukleinowymi i tym samym mogą być inne odczyty na spektrofotometrze. Ponieważ brak innych wzorów przeliczeniowych dla świńek morskich, więc w celach porównawczych wzór ten jest całkowicie przydatny, gdyż wyniki otrzymane były analogiczne do danych uzyskanych wg zawartości fosforu i dezoksyrybozy. Z podanej tabeli można stwierdzić, że praktycznie w czasie działania toksyny błoniczej ilość kwasu dezoksyrybonukleinowego nie ulega zmianom, względnie tylko minimalnym wahaniom w zależności od metody postępowania.

b) Średnie zawartości RNA w wątrobie zwierząt kontrolnych i doświadczalnych.

Tab. 2. Stężenie P-RNA w $\mu\text{g}/100$ mg świeżej masy
Concentration of P-RNA in $\mu\text{g}/100$ mg of fresh pulp

Grupy zwierząt	Proszek A								Proszek T							
	Metoda Davidsona i Smelle				Metoda Schmidta — Thannhausera				Metoda Davidsona i Smelle				Metoda Schmidta — Thannhausera			
	Dane spektrofotometryczne				Dane spektrofotometryczne				Dane spektrofotometryczne				Dane spektrofotometryczne			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
kontrolna	80	102	75,4	90,4	82	168	138	127	90	87,4	88,9	83,4	78	103	89,2	119
15 godz	86	108	82,3	105	89	184	165	168	110	92,5	93,1	87	81	119	91,9	129
42 godz	89	118	99,9	113	95	215	176	179	115	102	99,5	95	86	126	92,2	130
90 godz	95	146	135	137	118	245	206	219	130	119	112	109	101	170	132	173

Objaśnienia: 1. dane wg zawartości fosforu, 2. obliczenia wg Fleck i Munro, 3. obliczenia wg Caniewa i Markowa, 4. Obliczenia wg Warburga i Christiana.

Explanation: 1. data according to the content of phosphorus 2. estimation according to Fleck and Munro 3. estimation according to Caniev and Markov, 4. estimation according to Warburg and Christian.

W tab. 2 widać, że obliczone ilości RNA wg Fleck i Munro (1962) Caniewa i Markowa (1960) oraz Warburga i Christiana (1941) z proszków A i T były zbliżone, przy czym wyniki uzyskane metodą Schmidta-Thannhausera (1945) były wyższe od danych otrzymanych metodą Davidsona i Smelle (1952). Uzyskane ilości P-RNA z proszku A wg zawartości fosforu były niższe od obliczonych ilości P-RNA wg danych spektrofotometrycznych, natomiast w przypadku proszku T uzyskano podobne zależności dla P-RNA otrzymanego metodą Schmidta-Thannhausera (1945).

Z tab. 2 wynika, że następuje wzrost ilości RNA w homogenatach wątrobowych w miarę upływu czasu działania toksyny błoniczej. Najwyższe wyniki uzyskano w czwartym dniu od chwili podania śmiertelnej dawki toksyny błoniczej (w momencie zgonu zwierząt). Wielkości przedstawionych zmian RNA są w dużym stopniu uzależnione od metody otrzymywania, sposobu oznaczania i obliczania kwasów nukleinowych. Ponieważ celem naszej pracy były oznaczenia tylko porównawcze, więc przyjęto je jako całkowicie wystarczające przy oznaczaniu wyników.

B. Inkorporacja izotopu P^{32} do RNA.

W grupie kontrolnej i grupie doświadczalnej uzyskano średnie dane spektrofotometryczne dla wątroby przedstawione w tab. 3.

Tabela 3

Grupy	E_{260}	E_{280}	$\frac{E_{280}}{E_{260}}$
kontrolna	0,514	0,271	0,527
doświadczalna	0,613	0,322	0,525

Ponieważ dla czystego RNA drożdżowego stosunek $\frac{E_{280}}{E_{260}}$ wynosi w przybliżeniu 0,5 stwierdzono, że uzyskane preparaty są tylko w minimalnym stopniu zanieczyszczone białkiem. Zanieczyszczenie białkiem w obliczeniach porównawczych zostało zniwelowane, ponieważ w grupie kontrolnej i doświadczalnej procent białka był taki sam, gdyż dla obu grup stosunki $\frac{E_{280}}{E_{260}}$ były identyczne (0,527 i 0,525).

Po zastosowaniu współczynnika $\frac{E_{260}}{0,025}$ i uwzględnieniu 30-krotnego rozcieńczenia uzyskano średnie ilości RNA w grupie kontrolnej i doświadczalnej przedstawione w tab. 4.

Jak widać z porównania wyników dla zwierząt kontrolnych i doświadczalnych uzyskano większe stężenie RNA w wątrobie myszek, bę-

Tab. 4. Stężenie RNA w $\mu\text{g/ml}$
Concentration of RNA in $\mu\text{g/ml}$

Grupy	E_{260}	$\frac{E_{260}}{0,025}$	$\frac{E_{260}}{0,025} \cdot 30$
kontrolna	0,514	20,56	617
doświadczalna	0,613	24,5	735

dających pod działaniem toksyny błoniczej (o około 20%). W dalszych badaniach po uwzględnieniu poprawki na tło (radioaktywność atmosfery) uzyskano średnie wartości radioaktywności właściwej dla obu grup przedstawione w tabeli 5, gdzie aktywność właściwa (AS) jest obliczona wg wzoru: $AS = \text{ilość impulsów/min/P-RNA w } \mu\text{g}$.

Tabela 5

Grupy	Impulsy	Tło	Ilość impulsów dla RNA/5'/ml	Ilość impulsów dla RNA/1'/ml	AS
kontrolna	213	86,5	126,5	25,3	0,041
doświadczalna	150	86,5	63,5	12,7	0,017

Zakładając, że aktywność właściwa grupy kontrolnej stanowi 100%, uzyskano dla grupy doświadczalnej 42%. Powyższe wyniki wskazują, że aktywność właściwa (AS) szybko znakującego się RNA odpowiedzialnego za syntezę białka w ciągu 15 min. wbudowywania się izotopu P^{32} zmalała w grupie doświadczalnej o około 60% w stosunku do grupy kontrolnej.

W celu porównania aktywności właściwej RNA w grupie kontrolnej i grupie doświadczalnej z wielkością inkorporacji izotopu P^{32} do wątroby jako całości w obu grupach przebadano ilości impulsów w całkowitych homogenatach wątroby, pobierając do oznaczania 0,1 ml homogenatu oraz licząc średnio ilość impulsów w ciągu 1 minuty. Wyniki przedstawiono w tab. 6.

Tabela 6

Grupy	Ilość impulsów na 1'/0,1 ml	Tło	Ilość impulsów homogenatu na 1'/0,1 ml
kontrolna	3 868	13	3 855
doświadczalna	2 745	13	2 732

Z powyższych danych wynika również, że znakowanie całkowitego homogenatu wątrobowego spada w grupie doświadczalnej o około 25%

w stosunku do wątroby kontrolnej. Wartości w grupie doświadczalnej dla poszczególnych zwierząt były zgodne, a wartości w grupie kontrolnej wykazywały duże wahania.

W celu porównania ilości izotopu P^{32} znajdującego się w całej wątrobie kontrolnej i doświadczalnej oraz w kwasie RNA wyizolowanym z wątroby kontrolnej i doświadczalnej obliczono ilości impulsów w całym homogenacie wątrobowym przedstawione w tabeli 7.

Tabela 7

Grupy	Waga wątroby w g	Ilość homo- genatu w ml	Ilość impul. 0,1 ml	Ilość impul. na homogenat
kontrolna	1,47	7,5	3 855	289 125
doświadczalna	1,376	7,4	2 732	202 168

Wyniki przedstawione w tab. 7 wskazują, że ilość impulsów w całym homogenacie z wątrób zwierząt doświadczalnych jest niższa od ilości impulsów w całym homogenacie z wątrób kontrolnych o około 25%.

Reasumując dane liczbowe zebrane w przedstawionych tabelach można stwierdzić, że aktywność właściwa szybko znakującego się RNA w grupie zwierząt doświadczalnych jest około 60% niższa od aktywności właściwej szybko znakującego się RNA w grupie zwierząt kontrolnych. Ilość impulsów w całym homogenacie z wątrób zwierząt doświadczalnych jest o około 25% niższa od ilości impulsów w całym homogenacie wątrobowym z grupy zwierząt kontrolnych.

Ogólnie można przypuszczać, że zmniejszenie się aktywności właściwej szybko znakującego się RNA z wątrób zwierząt doświadczalnych jest ściślej związane ze zmniejszeniem się ilości impulsów w homogenacie z całej wątroby zwierząt doświadczalnych, czyli z mniejszą zawartością izotopu P^{32} w wątrobach zwierząt doświadczalnych.

OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ

Metody wyizolowywania i obliczania kwasów nukleinowych z tkanek są szeroko rozbudowane, a w związku z tym dobrane najodpowiedniejszych sposobów postępowania nastrocza pewne trudności. W przedstawionych badaniach z najbardziej znanych metod: Schneidera (1945), Ogura-Rosena (1950) oraz Schmid-Tannhausera (1945) zastosowano przede wszystkim tę ostatnią, pozwalającą na bardzo dokładne oddzielenie RNA od DNA. W metodzie Schneidera (1945, 1946), pierwotnie opartej na ekstrakcji RNA i DNA przy pomocy kwasu trójchlorooctowego, który w znacznym stopniu pochłania promieniowa-

nie w zakresie ultrafioletu, a w następnych modyfikacjach przy pomocy kwasu nadchlorowego, który w minimalnym stopniu pochłania promieniowanie w zakresie ultrafioletu, nie uzyskuje się rozdziału kwasów nukleinowych. Natomiast w metodzie Ogura-Rosena (1950) DNA przechodzi częściowo do RNA. Do przeprowadzenia badań w naszych warunkach konieczne było sporządzenie trwałych proszków z tkanki wątrobowej. W tym celu wybrano dwie różne metody: Kok i Opolskiej (1960) oraz Caniewa i Markowa (1960) pozwalające na dokładniejszą interpretację uzyskanych wyników.

Metodą Kok i Opolskiej (1960) uzyskuje się trwałe proszki z homogenatów otrzymanych w środowisku bezwodnym, a metodą Caniewa i Markowa (1960) z homogenatów sporządzonych w wodnym roztworze kwasu trójchlorooctowego. Z uzyskanych wyników nasuwa się wniosek, że w przeważającej większości badań ilości RNA otrzymane z proszków wykonanych metodą Kok i Opolskiej (1960) były wyższe od ilości RNA z proszków sporządzonych wg Caniewa i Markowa (1960). Można przypuszczać, że podczas homogenizacji w zimnym wodnym roztworze kwasu trójchlorooctowego nastąpiły pewne straty RNA. Wg Kapłana i Greenberga (1944) wymywanie z tkanki zhomogenizowanej związków rozpuszczalnych w kwasach przy pomocy kwasu trójchlorooctowego w 0°C nie powoduje strat kwasu fosforowego związanego z podstawowym łańcuchem kwasu nukleinowego, gdyż ulega ona bardzo powoli hydrolizie w zimnym kwasie trójchlorooctowym. Jednak należy tu podkreślić, że przemywanie zimnym kwasem nie zmienia temperatury tkanki zhomogenizowanej, natomiast podczas homogenizacji w zimnym kwasie trójchlorooctowym może nastąpić lekkie podwyższenie temperatury, powodując niewielkie straty P-RNA.

W badaniach spektrofotometrycznych oznaczano RNA i DNA w zakresie ultrafioletu w długościach 260—290 m μ , ponieważ wg Davidsona (1957) kwasy nukleinowe intensywnie pochłaniają światło w tych długościach fal dzięki zawartym w nich purynom i pirymidynom. Davidson (1957) podaje, że pochłanianie światła w wyżej podanym zakresie przez sumę nukleotydów, otrzymanych podczas hydrolizy polinukleotydów jest wyższe niż samych polinukleotydów. Wyniki z oznaczania wg metody spektrofotometrycznej ilości RNA wyizolowanego z proszków A i T metodą Davidsona i Smelle (1952) były niższe od danych otrzymanych metodą Schmidta-Thannhausera (1945), ponieważ w metodzie pierwszej (1952) oznaczano RNA w formie polinukleotydów natomiast w metodzie drugiej (1945) w formie nukleotydów. W naszych badaniach znaczne rozpiętości między uzyskanymi ilościami kwasów nukleinowych otrzymanych przy pomocy stoso-

wanych metod były zgodne z obserwacjami Schmidta-Thannhausera (1945) oraz Schneidera i Kluga (1946). Według Schmidta-Thannhausera (1945) dla wątroby szczura P-RNA = 77—110 mg/100 g świeżej masy, P-DNA = 21—25 mg/100 g świeżej masy, a wg Schneidera i Kluga (1946) dla wątroby szczura P-RNA = 55—71 mg/100 g świeżej masy, P-DNA = 20,8—31,3 mg/100 g świeżej masy.

Należy podkreślić, że w naszych badaniach średnie ilości DNA otrzymane stosowanymi metodami w minimalnym stopniu różniły się między grupą zwierząt kontrolnych i doświadczalnych. Powyższe wyniki są zgodne z obserwacjami Brodskiego (1960). Davidson i Leslie (1950) podają, że jądra komórkowe zawierają stałą ilość DNA, charakterystyczną dla danego gatunku. Wyżej cytowani autorzy twierdzą, że DNA może być z całą pewnością uważany za najbardziej stały ze wszystkich składników komórki. W naszych badaniach obserwowano nie zmienione ilości DNA, w związku z tym można uważać, że w toku doświadczenia liczba jąder pozostała również nie zmieniona. Jednak w badaniach w mikroskopie elektronowym można było zauważyć, że część jąder komórek wątrobowych uległa częściowej kariolizie. Ponieważ średnia zawartość DNA pozostała stała, nasuwa się przypuszczenie, że kwas dezoksyrybonukleinowy w jądrach ulegających częściowej kariolizie nie został rozłożony. Przy stałej zawartości DNA w badanych grupach ilości RNA ulegały wyraźnym zmianom.

Ilość RNA w pierwszej i drugiej podgrupie doświadczalnej zwiększała się w niewielkim stopniu, a dopiero w trzeciej, tj. w około 90 godzin od chwili podania śmiertelnej dawki toksyny błoniczej wyraźnie wzrosła. Powyższe dane uzyskano na podstawie analizy biochemicznej. Natomiast w badaniach histochemicznych nie można było zmian tych dokładnie ustalić, ponieważ uległa zmianie struktura i barwliwość ziarnistości RNA. W grupie kontrolnej ziarenka RNA były duże i miały tendencję do tworzenia skupisk w okolicach jąder, sprawiając wrażenie intensywniej wybarwionych niż np. w trzeciej podgrupie doświadczalnej, w której drobne, delikatne ziarenka były równomiernie rozproszone w cytoplazmie. W związku z tym jąderka znacznie wyraźniej uwidoczniły się właśnie w trzeciej podgrupie doświadczalnej. Jąderka, wg Andersona i Beamsa (1956) oraz Chenga (1959) zawierają cząsteczki rybonukleoproteidu identyczne z ziarnistościami rybozomalnymi cytoplazmy. Brachet (1959) i Niebrój (1959) wskazują, że RNA może być syntetyzowany zarówno w jądrze, jak i cytoplazmie, przy czym synteza RNA w jądrach jest wielokrotnie większa niż w cytoplazmie (Brodski i 1961). Oba rodzaje kwasów nukleinowych: cytoplazmatyczny i jądrowy w jednakowym stopniu wybarwiają się pironiną. Gieorgijew (1961)

oraz Samarina i Gieorgijew (1960) w swoich badaniach nad syntezą białek wykazała, że kwas nukleinowy jądrowy i cytoplazmatyczny posiadają podobną funkcję w procesie syntezy białka.

W około 90 godzin od chwili podania toksyny błoniczej (bezpośrednio po zgonie zwierząt) obraz jąderka obserwowany w mikroskopie elektronowym uległ częściowym zmianom. W stosunku do kontroli jąderka były przeważnie mniejsze, wykazywały rozluźnienie struktury. Zmiany w jąderkach pod wpływem bodźców działających na komórkę świadczą o żywym ich udziale w przemianie materii komórki (Miętkiewski, Kozik 1959). Istnieje również pewna zależność w komórkach wątrobowych między zawartością glikogenu i kwasów nukleinowych. Myśliwski i Michalik (1963) podają, że komórki zawierające znaczne ilości glikogenu mają mało kwasów nukleinowych. W doświadczalnej toksemii błoniczej obserwacje Soroczana (1964 praca magisterska) wykazały spadek zawartości glikogenu w komórkach wątrobowych, szczególnie bezpośrednio po zgonie zwierząt. W naszych badaniach w końcowym etapie toksemii błoniczej czyli po zgonie zwierząt obserwowano zwiększenie ilości kwasu rybonukleinowego, co może być w związku ze zmniejszoną zawartością glikogenu. Zmianom w zakresie biochemii i histochemii kwasów nukleinowych towarzyszą również zmiany morfologiczne w tkance wątrobowej. W mikroskopie optycznym obserwowano zatarcie struktur zrazików wątrobowych i zmiany czynnościowe naczyń krwionośnych w zależności od czasu trwania toksemii błoniczej.

Mikroskop elektronowy wskazał na zmiany w mitochondriach, jądrach, jąderkach i wakuolach cytoplazmatycznych. Obraz mitochondriów zmienia się znacznie w zależności od różnorodnych czynników, działających na organizm i np. tylko 8-godzinne przetrzymywanie żab w temperaturze 40°C powodowało bardzo wyraźne zmiany struktury i gęstości elektronowej mitochondriów w komórkach wątrobowych (Latański 1963).

W celu uzupełnienia badań ilościowych i histochemicznych starano się również wykazać wpływ początkowych stadiów toksemii błoniczej na inkorporację izotopu P^{32} do szybko znakującego się RNA. Wyników badań histochemicznych i biochemicznych nie porównujemy z wynikami uzyskanymi przez wbudowywanie izotopu P^{32} do RNA jądrowego, ponieważ były one przeprowadzone na różnych gatunkach zwierząt. Inkorporację wykonano na wątrobie myszek, a poprzednie badania na wątrobie świnek morskich. Sisakian (1963) uważa, że wysoko spolimeryzowany kwas rybonukleinowy jądra charakteryzuje się bardzo szybką inkorporacją izotopów w odróżnieniu do RNA rybozomalnego. Ponieważ badania izotopowe pozwalają na wykrycie już bardzo niewielkich odchyleń od normy, zostały przeprowadzone w okresie rozwoju toksemii błoniczej kiedy jeszcze zmiany biochemiczne i histochemiczne są trudno

uchwytnie. Z uzyskanych wyników można zauważyć, że mimo niewielkiego wzrostu ogólnej ilości kwasu rybonukleinowego zmniejszyła się zdecydowanie bo o około 60% w stosunku do normy aktywność właściwa szybko znakującego się RNA. W naszych badaniach w początkach toksemii błoniczej ogólna zawartość RNA w komórkach wątrobowych pozostawała bez widocznych zmian. W tym okresie zwierzęta jeszcze prawidłowo spożywały pokarmy. Wg Davidsona (1957) ilość RNA w komórkach wątrobowych jest zależna od przyjmowanego z pokarmem białka. Natomiast proces wbudowywania się izotopu P^{32} do szybko znakującego się RNA uległ wyraźnemu zmniejszeniu. Munro i współpracownicy (1953) podają, że stopień włączania izotopu P^{32} do szybko znakującego się RNA nie zależy od ogólnej ilości RNA, a od ilości dostarczonej energii. Ponieważ w naszym doświadczeniu zmalała aktywność RNA jądrowego można przypuszczać, że związane jest to ze zmniejszeniem się przemian energetycznych w komórce wątrobowej po podaniu toksyny błoniczej. Na uwagę zasługuje fakt, że aktywność właściwa RNA u poszczególnych zwierząt w grupie kontrolnej wykazywała dość znaczne rozbieżności, a aktywność właściwa RNA w grupie zwierząt doświadczalnych nie wykazywała prawie żadnych różnic między osobnikami. Tłumażyć to można indywidualnym oddziaływaniem zdrowych zwierząt na bodziec, co prawdopodobnie zanika w trakcie rozwoju toksemii błoniczej.

Analiza badań przeprowadzonych na tkance wątrobowej w czasie trwania doświadczalnej toksemii błoniczej nasuwa następujące spostrzeżenia:

1. pod wpływem toksyny błoniczej następują zmiany morfologiczne w tkance wątrobowej oraz czynnościowe w zakresie naczyń krwionośnych, przy czym ilości RNA wzrastają szczególnie wyraźnie po zgonie zwierząt.

2. W miarę upływu czasu działania toksyny błoniczej zmienia się struktura, rozmieszczenie i barwliwość ziarenek RNA (od zbitych, intensywnie wybarwionych skupisk ziarnistości do delikatnie rozproszonych w całej cytoplazmie).

3. W mikroskopie elektronowym w doświadczalnej toksemii błoniczej obserwuje się zmiany w jądrach, jąderkach, mitochondriach i wakuolach cytoplazmatycznych.

4. Aktywność właściwa RNA, wyrażająca się stopniem inkorporacji P^{32} do RNA maleje w początkach toksemii błoniczej, co może wskazywać na osłabienie metabolizmu komórek wątrobowych.

5. Pod wpływem toksyny błoniczej nie można ujawnić uchwytnych różnic w ilościach DNA w tkance wątrobowej.

PIŚMIENNICTWO

1. Anderson E. i Beams H. W.: cyt.: Z. Walter: Kwasy rybonukleinowe struktur komórkowych trzustki, Łódź 1963 (praca doktorska).
2. Brachet J.: Le rôle biologique des acides nucleiques. Onzième Conseil de Chimie. Bruxelles 1959.
3. Brodskij W. J.: Dokl. Akad. Nauk SSSR 131, 680—683, 1961.
4. Burton K.: Biochem. J. 62, 315—323, 1956.
5. Caniew R. G. i Markow G. G.: Biochimija 25, 451—459, 1960.
6. Cheng P. Y.: Nature 184, 190—191, 1959.
7. Davidson J. N.: cyt.: Davidson J. N.: Biochemia kwasów nukleinowych, P. W. R. i L., Warszawa 1963.
8. Davidson J. N. i Leslie I.: Nature 165, 49—53, 1950.
9. Davidson J. N. i Smelle R. M. S.: Biochem. J. 52, 594—599, 1952.
10. Davidson J. N. i Smelle R. M. S.: Biochem. J. 52, 599—606, 1952.
11. Davidson J. N. i Wymouth C.: Biochem. J. 38, 39—50, 1944.
12. Davidson J. N. i Wymouth C.: Nature 154, 183—184, 1944.
13. Dische Z.: Biochem. Z. 229, 169—175, 1930.
14. Filipowicz B., Redlich P., Margelis A. i Witkowska Z.: Pamiętnik X Zjazdu Pediatrów Polskich w Szczecinie, Warszawa 1955.
15. Fleck A. i Munro H. N.: Biochem. Biophys. Acta 55, 571—583, 1962.
16. Gieorgijew G. P.: Dokl. Akad. Nauk SSSR 138, 458—461, 1961.
17. Gieorgijew G. P. i Samarina O. P.: Biochimija 26, 454—461, 1961.
18. Horecker E. L.: J. Biol. Chem. 136, 775—776, 1940.
19. Kaplan N. O. i Greenberg D. M.: Am. J. Physiol. 140, 598—602, 1944.
20. Kirby K. S.: Biochem. J. 64, 405—408, 1956.
21. Kłopotowski T.: Arch. Immunologii i Terapii Doświadczalnej 9, 881—885, 1961.
22. Kok I. P. i Opolskij A. F.: Biochimija 25, 1073—1080, 1960.
23. Kurland C. G.: J. Mol. Biol. 2, 83—91, 1960.
24. Latański M.: Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, Lublin. Sec. D. 18, 15—20, 1963.
25. Miętkiewski K. i Kozik M.: Endokr. Pol. 10, 1—6, 1959.
26. Myśliwski A. i Michalik I.: Fol. Morph. 22, 59—66, 1963.
27. Munro H. N., Naismith D. J. i Wikramanayake T. W.: Biochem. J. 54, 198—205, 1953.
28. Niebrój T.: Fol. Morph. 4, 198—205, 1953.
29. Ogur M. i Rosen G.: Arch. Biochem. 25, 262—276, 1950.
30. Orłowski W.: Nauka o chorobach wewnętrznych, PZWL, Warszawa 1950, t. VII, 134—154.
31. Pappenheimer: Cyt.: Bogdanowicz J.: Błonica, PZWL, Warszawa 1956, 14.
32. Samarina O. P. i Gieorgijew G. P.: Dokl. Akad. Nauk SSSR 133, 694—697, 1960.
33. Scherrer K. i Darnell J. E.: Biochem. Biophys. Res. Comm. 7, 486—501, 1962.
34. Schmidt G. i Thannhauser S. J.: J. Biol. Chem. 161, 83—89, 1945.
35. Schneider W. C.: J. Biol. Chem. 161, 293—303, 1945.
36. Schneider W. C.: Cancer Research 5, 717—721, 1945.
37. Schneider W. C.: J. Biol. Chem. 164, 747—751, 1946.

38. Schneider W. C. i Klug H. L.: *Cancer Research* 6, 691—694, 1946.
39. Sisakian N. M., Biezingiew E. N., Marczikajtis M. I., Małczanow M. I., Czigiriew W. S. i Kotowskaja A. P.: *Biochimija*, 28, 326—333, 1963.
40. Soroczan W.: Wpływ toksyny błoniczej na zawartości glikogenu w tkance wątrobowej i mięśni sercowym u białych myszek. Praca magisterska przyjęta przez Radę Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi UMCS w Lublinie w dniu 30 XI 1964.
41. Spirin A. S. i Biełozierskij A. N.: *Biochimija* 21, 768—775, 1956.
42. Szymoński K., Śmiglak K., Kiuba W., Spett J. i Wanicka A.: *Polski Tyg. Lek.* 16, 1—11, 1961.
43. Warburg O. i Christian W.: Colowick S. P. i Kaplan N. O. *Methods in Enzymology*. Academic Press Inc. Publishers. New York, 3, 451—454, 1957.

Pracę otrzymano 20 XII 1967

OBJAŚNIENIA RYCN

Ryc. 1. Wątroba świnki morskiej. Preparat kontrolny. Barwienie wg metody Bracheta. W komórkach wątrobowych znajdują się skupiska RNA. Naczynia krwionośne o prawidłowym świetle, widoczne poza tym elementy tkanki łącznej. Mikroskop Lumipan C. Zeiss, Jena. Obiektyw 40 ×. Okular 12,5 ×. Mikrofot. Exacta Varex IIa.

Ryc. 2. Wątroba świnki morskiej po 15 godzinach działania toksyny błoniczej. Barwienie wg metody Bracheta. Ziarnistości RNA w komórkach wątrobowych nie tworzą skupisk w okolicach przyjądrowych, natomiast są równomiernie rozrzucone w cytoplazmie. Mikroskop Lumipan C. Zeiss, Jena. Obiektyw 20 ×. Okular 12,5 ×. Mikrofot. Exacta Varex IIa.

Ryc. 3. Wątroba świnki morskiej po 42 godzinach działania toksyny błoniczej. Barwienie wg metody Bracheta. Ziarenka RNA rozrzucone w cytoplazmie komórek wątrobowych. Poszerzone znacznie naczynia krwionośne, wypełnione elementami morfologicznymi krwi. Mikroskop Lumipan C. Zeiss, Jena. Obiektyw 20 ×. Okular 12,5 ×. Mikrofot. Exacta Varex IIa.

Ryc. 4. Wątroba świnki morskiej po 90 godzinach działania toksyny błoniczej. Barwienie wg Bracheta. Drobne delikatne ziarenka RNA rozproszone w cytoplazmie komórek wątrobowych. Jąderka wykazują wybitny odczyn pironinochłonny. Mikroskop Lumipan C. Zeiss, Jena. Obiektyw 20 ×. Okular 12,5 ×. Mikrofot. Exacta Varex IIa.

Ryc. 5. Wątroba myszki rasy B-6. Preparat kontrolny. Powiększenie 11000 ×.

Ryc. 6. Wątroba myszki rasy B-6 po 15 godzinach działania toksyny błoniczej. Powiększenie 11000 ×.

Ryc. 7. Wątroba myszki rasy B-6 po 90 godzinach działania toksyny błoniczej. Powiększenie 11000 ×.

Гистохимические и биохимические исследования нуклеиновых кислот печени при экспериментальной дифтерийной токсемии с учетом инкорпорации изотопа P³² к RNA

Резюме

Исследования поведения нуклеиновых кислот в ткани печени под влиянием смертельной дозы дифтерийного токсина проводились при

помощи биохимических методов с учетом инкорпорации изотопа P^{32} к RNA и гистохимических методов, дополненных наблюдениями в электронном микроскопе. Подопытными животными были морские свинки, только при инкорпорации из-за трудностей в получении изотопа P^{32} использовались белые мыши расы В-6. Полученные результаты позволяют утверждать, что дифтерийные токсины вызывают нарушения в метаболизме клеток, особенно выступающие после смерти животных. Обнаруживались также изменения в количестве и структуре RNA, в то время как DNA остался без изменений. Одновременно с биохимическими изменениями в клетке проявлялись изменения в ядрах, ядрышках, митохондриях и цитоплазматических вакуолях.

Histochemical and Biochemical Studies of Nucleic Acids in the Liver in Diphtheric Toxaemia Including the Incorporation of Isotope P^{32} into RNA

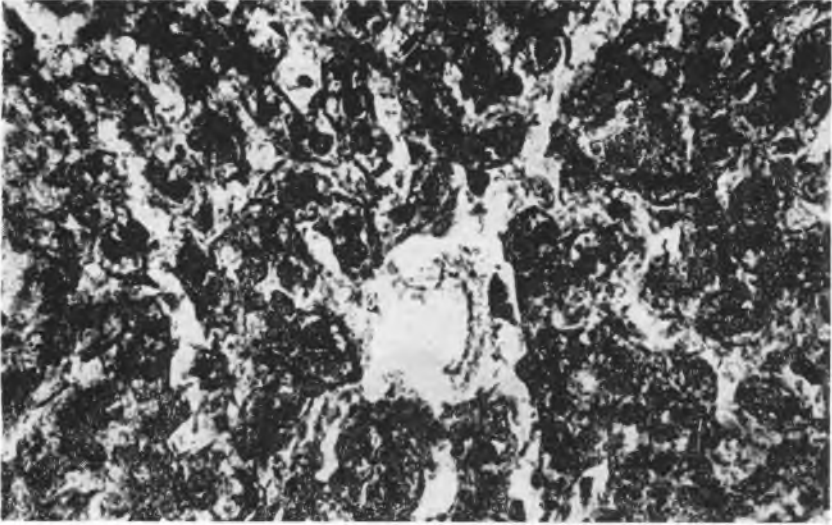
S u m m a r y

The effect of a lethal dose of diphtheric toxin on the behaviour of nucleic acids in the hepatic tissue was examined with biochemical methods, including the incorporation of isotope P^{32} into RNA, as well as histochemical methods supplemented by electron microscopic observations. Experiments were performed on guinea pigs. White mice of breed B-6 were used only for the incorporation because of some difficulty in obtaining isotope P^{32} . It was observed that diphtheric toxin caused disturbances in the metabolism of hepatic cells, especially distinct on postmortem examinations. Some variations in the volume and structure of RNA occurred. DNA remained unchanged. Biochemical changes in the cell were observed to occur simultaneously with some lesions in the nuclei, nucleoli, mitochondria, and cytoplasmic vacuoles.

EXPLANATION TO FIGURES

Fig. 1. Guinea pig liver. Control preparation. Staining according to Brachet. Aggregations of RNA in the hepatic cells. Normal lumen of blood vessels. Elements of the connective tissue are visible. Microscope Lumipan C. Zeiss, Jena. Objective 40 \times . Ocular 12.5 \times . Microphot. Exacta Varex IIa.

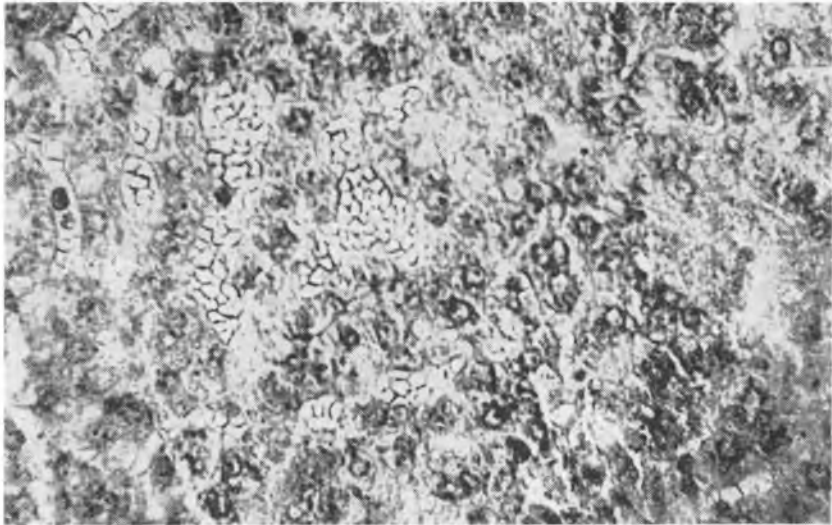
Fig. 2. The liver of a guinea pig after 14 hrs. of the activity of diphtheric toxin. Brachet's staining. RNA granulations in the hepatic cells are not aggregated in the perinuclear parts but are evenly distributed in the whole cytoplasm. Microscope Lumipan C. Zeiss, Jena. Objective 20 \times , ocular 12.5 \times . Microphot. Exacta Varex IIa.



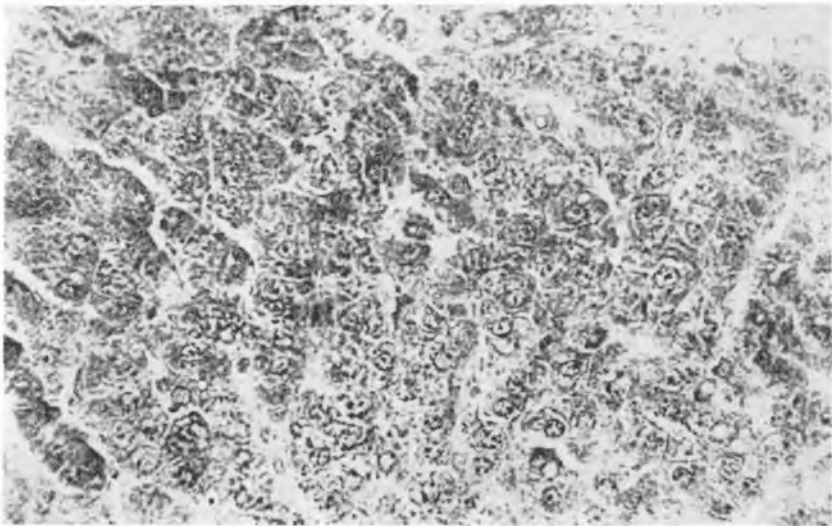
Ryc. 1



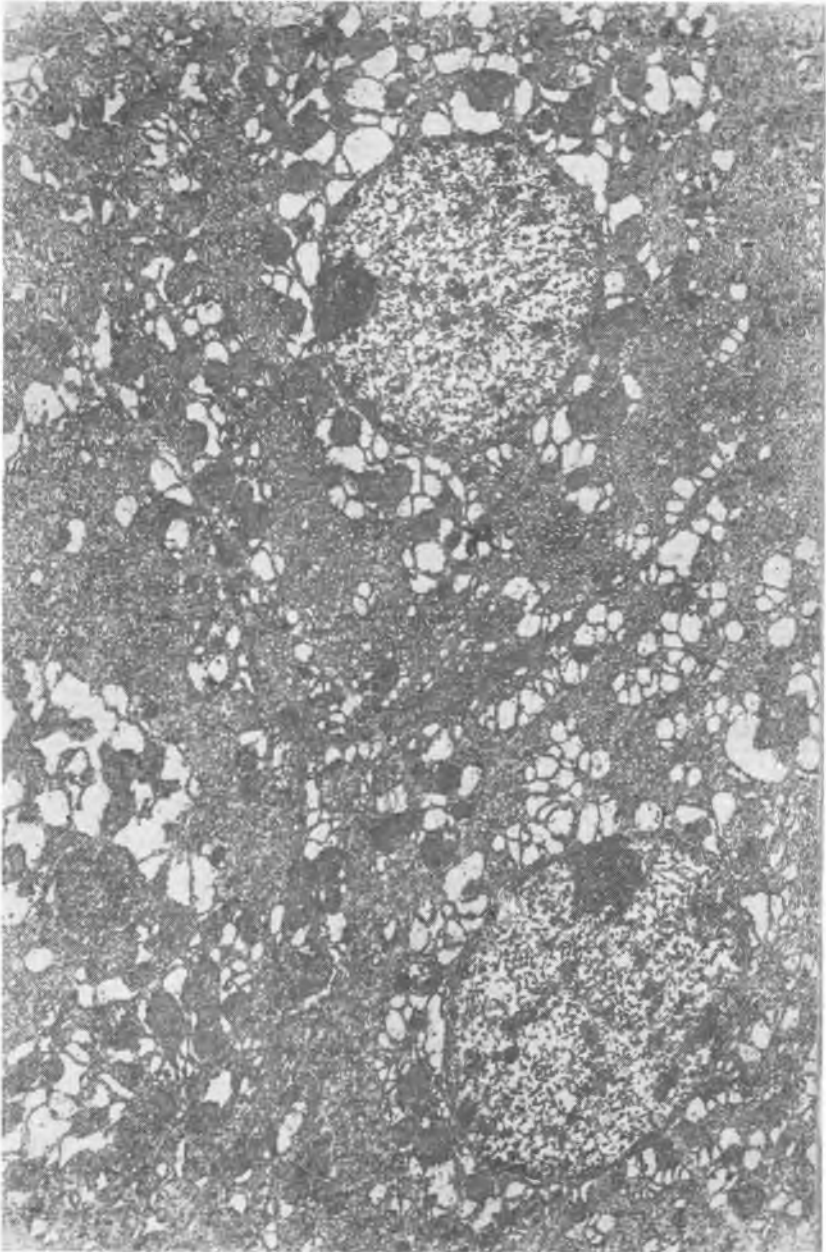
Ryc. 2



Ryc. 3



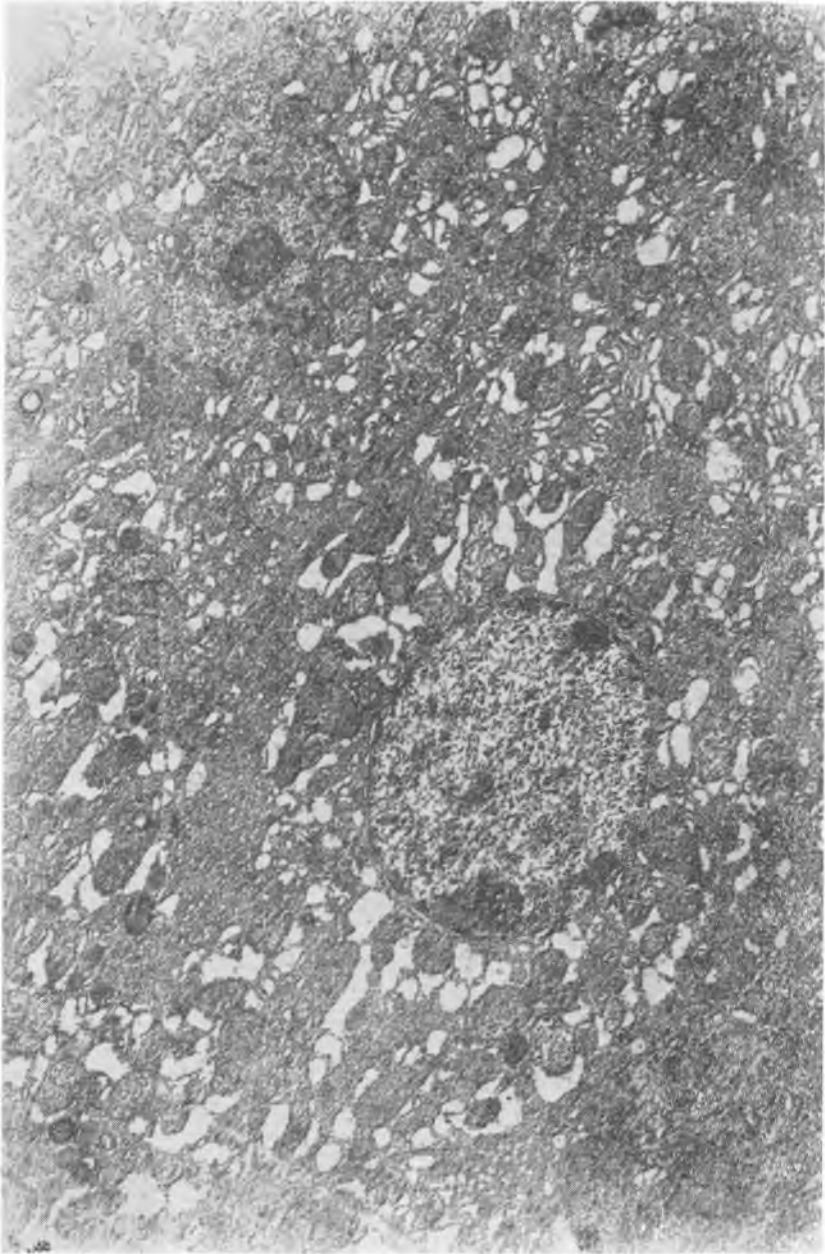
Ryc. 4



Ryc. 5



Ryc. 6



Ryc. 7

Fig. 3. The liver of a guinea pig after 42 hrs. of the activity of diphtheric toxin. Brachet's staining. RNA granules dispersed in the cytoplasm of the hepatic cells. Blood vessels considerably dilated are filled up with morphological elements of blood. Microscope Lumipan C. Zeiss, Jena. Objective 20 ×. Ocular 12.5 ×. Microphot. Exacta Varex IIa.

Fig. 4. The liver of a guinea pig after 90 hrs. of the activity of diphtheric toxin. Brachet's staining. Minute RNA granules are dispersed in the cytoplasm of the hepatic cells. Nucleoli show strong pyrone-absorptive reaction. Microscope Lumipan C. Zeiss, Jena. Objective 20 ×. Ocular 12.5 ×. Microphot. Exacta Varex IIa.

Fig. 5. The liver of a white mouse of breed B-6 following 15 hrs. activity of diphtheric toxin.

Fig. 6. The liver of a white mouse affected by the activity of diphtheric toxin for 15 hrs. Magn. 11,000 ×.

Fig. 7. The liver of a white mouse affected by the activity of diphtheric toxin for 90 hrs. Magn. 11,000 ×.

