

ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN—POLONIA

VOL. XVI, 3

SECTIO D

1961

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

Kierownik: prof. dr med. Stanisław Grzycki

Maciej LATALSKI

**Badania nad kwasem rybonukleinowym i grupami sulfhydryłowymi
w komórce jajowej**

**Исследования над рибонуклеиновой кислотой и сульфгидрильными
группами в яйцевой клетке**

**Investigations on Ribonucleic Acid and Sulfhydryl Groups
in the Oocyte**

Brachet (7) i Caspersson (10) posługujący się różnymi metodami badań, zwrócili uwagę na niewątpliwy udział kwasu rybonukleinowego (RNA) w syntezie białek komórkowych. Obaj badacze niezależnie od siebie zauważyli, że komórki cechujące się szybką syntezą białka, np. komórki trzustki, gruczołów żołądka itp. posiadają dużą ilość RNA, podczas gdy narządy, których czynność nie jest związana z nasiloną produkcją białka, np. serce, mięśnie, nerki są stępsunkowo ubogie w ten kwas. Mikroorganizmy, które posiadają szybki system podziałowy i w których — w związku z tym — zachodzi szybka synteza białek, obfitują w kwas rybonukleinowy. Na podstawie więc tych i innych obserwacji [Brachet (3, 4, 5, 8, 9), Webster (31), Prescott (24), Hill (15), Freinendegen (13), Zalokar (32, 33), Makarow (20), Sirlin (28), Zubay (34), Ryabinina (26)] można sądzić, że istnieje związek między obecnością kwasu rybonukleinowego w komórce, a jej zdolnością do syntezy białka.

Konopacki (17, 18) przeprowadził badania nad procesami metabolizmu zachodzącymi w dojrzewającej komórce jajowej *Loligo vulgaris* (molówka). Austin (1) obserwując komórki jajowe szczura w mikroskopie fazy, główną uwagę zwrócił na kwas dezoksyrybonukleinowy, który umiejscowiony jest w obrębie jądra komórkowego w formie płacików z dwóch stron jąderka lub też jako całkowity, dość nieregularny, pierścień wokół jąderka. Grubość tego pierścienia wahała się od cienkiej warstewki do tak szerokiej, że trudno było rozróżnić granice jąderka.

Sotelo (29) zaś, badając w mikroskopie elektronowym jaja szczura utrwalone w calcium-formolu, zauważył, że kwas rybonukleinowy jest zmagazynowany w cytoplazmie jaja. Z badań Colliera (11) natomiast wynika,

że komórki jajowe *Ilyanasa Obsoleta* (z typu mięczaków) zawierają stosunkowo dużo kwasu rybonukleinowego. Umiejscowiony on jest w części cytoplazmy wolnej od żółtka. Analiza izolowanych płytek żółtkowych potwierdziła brak kwasu rybonukleinowego w tej frakcji. Wyniki swoje autor uzyskał przy pomocy określania absorpcji promieni ultrafioletowych o danej długości fali.

Badania Bella (2) i innych wykazały ścisły związek i współzależność między kwasem rybonukleinowym a grupami SH. Bell stwierdził, że udział kwasu rybonukleinowego w syntezie białek jest uwarunkowany obecnością grup sulfhydrylowych. Brachet (6) podał także, że grupy SH odgrywają rolę w procesie organogenezy. Działając przez okres 24 godzin merkaptoetanolem na zapłodnione jaja *Rana temporaria* (żaba płowa) stwierdził on, że rozwój płytki nerwowej u tego gatunku został zahamowany, lecz nie zauważył zmian w strukturze płytki rdzeniowej. Ponieważ inne substancje, nawet bardziej toksyczne, jak np. dwutiodwuglikol rozwoju nie hamowały, Brachet wynik działania merkaptoetanolu przypisuje grupom SH zawartym w tym związku.

W dostępnej mi literaturze nie znalazłem prac dotyczących stężenia i wzajemnego stosunku kwasu rybonukleinowego i grup SH oraz SS w komórkach jajowych. Postanowiłem więc zająć się tym zagadnieniem i przeprowadzić obserwacje w warunkach doświadczalnych, po wstrzykiwaniu zwierzętom gonadotropiny łożyskowej. Gonadotropina łożyskowa działa pobudzająco na proces jajczkowania oraz przyspiesza wzrost pęcherzyków Graafa [Niweliński (22, 23), Latałski (19)].

MATERIAŁ I METODYKA BADAŃ

Badania przeprowadzono na 18 dziewiczych samiczkach szczurów białych (*Rattus rattus L. albino*) wagi od 35 do 50 g, w wieku 2—3 miesięcy. Zwierzęta podzielono na trzy grupy. Pierwszą grupę (6 sztuk) stanowiły zwierzęta kontrolne, grupy drugą i trzecią (po 6 sztuk) — zwierzęta doświadczalne. Otrzymały one domięśniowo gonadotropinę łożyskową w postaci preparatu Pregnadyl (Fabr. — Lubelska Wytwórnia Surowic i Szczepionek). Zwierzęta drugiej grupy otrzymały łącznie 1,2 j. m. pregnadylu w sześciu iniekcjach, po 0,2 j. m. dwa razy dziennie w ciągu trzech dni. Czwartego dnia wykonywano sekcję. Sposób podawania pregnadylu i jego łączna ilość uzasadnione są takim mianowaniem preparatu na dziewiczych samiczkach szczurzych w Lubelskiej Wytwórni Surowic i Szczepionek. Zwierzęta trzeciej grupy otrzymały pregnadyl w podobny sposób, lecz w podwójnej ilości (0,4 j. m. dwa \times dziennie przez trzy dni — łącznie 2,4 j. m.).

Jajniki przeznaczone do badań nad zawartością kwasu rybonukleinowego (RNA) w komórce jajowej utrwalano — jedne w płynie Serra, a drugie w kwaśnym płynie Zenkera. Skrawki mikrotomowe grubości 5 mikronów po odparafinowaniu barwiono wg metody Bracheta i pyroniną. Preparaty kontrolne trawiono rybonukleazą krystaliczną (Sigma) w stężeniu od 0,1 do 1,0 mg. enzymu na 1 ml roztworu.

Dla wykrycia grup SH i SS materiał utrwalano w kwasie trójchlorooctowym. Skrawki mikrotomowe grubości 5 mikronów po odparafinowaniu barwiono wg metody Barnetta i Seligmana, używając jako barwnika czerni K, poczym zamykano je w glicerożelu. Aby określić całkowitą zawartość grup siarkowych zredukowano wiązanie —S—S— do grup SH za pomocą kwasu tioglikolowego. Stężenie kwasu rybonukleinowego oraz grup SH i SS określano na mikrofotometrze C. Zeiss II (Jena). Wartość ekstynkcji obliczano stosunkiem Sandrittera (25).

Aby mieć możliwie największą pewność, że przekroje komórek jajowych są równikowe, lub najbardziej do równikowych zbliżone, przy badaniach brano pod uwagę tylko te komórki, w których w jądrach widoczne było jąderko.

Zarówno u zwierząt kontrolnych, jak i u zwierząt doświadczalnych komórki jajowe podzielono na grupy o różnym stopniu zaawansowania rozwoju, przyjmując za kryterium podziału ich powierzchnię przekroju. (I — do 100 mikronów kwadratowych, II — od 100 do 200 mikronów kwadratowych, III — od 200 do 300 mikronów kwadratowych, IV — od 300 do 400 mikronów kwadratowych i V — ponad 400 mikronów kwadratowych). Powierzchnię przekroju komórek obliczano przy użyciu planimetru.

Zwierzęta grup: kontrolnej i doświadczalnych w chwili rozpoczęcia badań były w okresie przedrujowym (*prooestrus*). Okres ten określano na podstawie wymazów pochwowych utrwalonych w mieszaninie alkoholu absolutnego i eteru. Po zabarwieniu hematoksyliną Ehrlicha i eozyną widoczne były liczne komórki jądrzaste, płaskie i wieloboczne złuszczonego nabłonka. Ilość komórek zrogowaciałych była niewielka.

(Wszystkie wyniki dotyczące stężeń RNA i grup SH i SS sprawdzono testem statystycznym von Neumanna (21).

$$\eta = \frac{\frac{\sum (x_i - x_{i+1})^2}{n-1}}{S^2}$$

x_i — kolejne spostrzeżenia uporządkowane wg wielkości komórek, n — liczba spostrzeżeń, S^2 — wariancja

$$S^2 = \frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n}$$

\bar{x} — średnica.

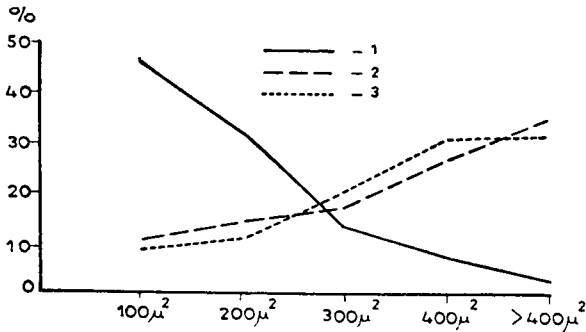
Test ten wykazuje wartość istotną wówczas, jeśli w przypadku pięciu spostrzeżeń (bo tyle grup komórek jajowych wyodrębniono) wynik jego (η) jest mniejszy od 1,026 [Hart (14)].

BADANIA WŁASNE

Pierwszym etapem doświadczeń było wykazanie wpływu gonadotropiny łożyskowej na proces wzrostu i dojrzewania komórki jajowej. W tym celu porównano ilość komórek jajowych w poszczególnych stadiach rozwoju w grupie kontrolnej i w grupach doświadczalnych. Za podstawę podziału komórek na grupy przyjęto ich powierzchnię przekroju (ryc. 1).

W grupie kontrolnej było najwięcej komórek najmniejszych (o powierzchni do $100 \mu^2$). Ilość ich wynosiła 46% w odniesieniu do wszystkich komórek jajowych, jakie były widoczne na preparatach histologicznych, sporządzonych z jajników tej grupy zwierząt. Ilość komórek o większych powierzchniach była mniejsza. Komórek o powierzchni do $200 \mu^2$ było 32%, do $300 \mu^2$ — 13%, do $400 \mu^2$ — 7%, a komórek największych (najstarszych) o powierzchni ponad $400 \mu^2$ było najmniej, bo 2%.

W obu grupach doświadczalnych obrazy krzywych były do siebie zbliżone, jednak zupełnie inne w porównaniu z krzywą obrazującą grupę kontrolną. W przypadku obu grup doświadczalnych w najmniejszej ilości (8—10%) występowały komórki młode, o powierzchni do $100 \mu^2$. Ilość komórek o powierzchni do $200 \mu^2$ wynosiła 11—14%, do $300 \mu^2$ — 17—20%, do $400 \mu^2$ — 26—30%. W największej ilości występowały komórki dojrzałe, o powierzchni przekroju ponad $400 \mu^2$. Było ich 31—33%.



Ryc. 1. Ilość komórek w poszczególnych stadiach rozwoju po obliczeniu ich powierzchni (w odniesieniu do ilości stu komórek jajowych). 1 — grupa kontrolna, 2 — grupa doświadczalna I (1,2 j. m.), 3 — grupa doświadczalna II (2,4 j. m.). Number of cells in the separate development stages after estimation of their surface (in relation to 100 ova); 1 — control group, 2 — I experimental group (1.2 i. u.), 3 — II experimental group (2.4 i. u.)

Na podstawie uzyskanych obrazów można było sądzić, że gonadotropina łożyskowa przyspiesza dojrzewanie komórki jajowej i skraca czas tego procesu. Dotyczy to również pęcherzyka, który podobnie jak i komórka jajowa uległ szybszemu powiększeniu.

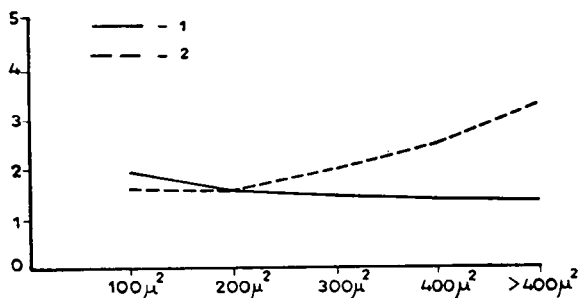
Dopiero teraz, po wykazaniu wpływu gonadotropiny łożyskowej, jaki wywiera ona na proces dojrzewania komórki jajowej, zajęto się określaniem stężenia kwasu rybonukleinowego i grup SH oraz SS w tych komórkach.

Grupa kontrolna

Komórki jajowe w różnych stadiach podzielono na grupy o wzrastającej powierzchni przekroju (ryc. 2).

Komórki o najmniejszej powierzchni do $100 \mu^2$ występują w największym procencie (46%). Ich cytoplazma i jąderko wybarwiają się bardzo intensywnie pyroniną. Odczyn ten jest jednolity na całej powierzchni cytoplazmy, o nieznacznym wzroście natężenia w strefie błony jądrowej (ryc. 7). Wartość ekstynkcji w tych komórkach obrazu-

jąca stężenie RNA jest największa i wynosi 1,9 osiągając kolejno następujące wartości ekstynkcji: 1,6 w komórkach o powierzchni przekroju do $200 \mu^2$, 1,5 w komórkach do $300 \mu^2$, 1,4 w komórkach do $400 \mu^2$ oraz tę samą wartość (1,4) w komórkach największych, o powierzchni ponad $400 \mu^2$. W tych nielicznych komórkach RNA jest rozmieszczony równomiernie w całej cytoplazmie pod postacią drobnitklich ziarenek i grudek. Jąderko jest małe i słabo zabarwione (ryc. 8).



Ryc. 2. Grupa kontrolna. Stężenie RNA oraz grup SH i SS w komórkach jajowych różnej wielkości, obliczone na podstawie 200 pomiarów dla każdej grupy komórek.

1 — stężenie RNA, 2 — stężenie SH i SS.

Control group. Concentration of RNA and SH and SS groups in ova of various sizes, estimated on the strength of 200 measurements for each group of cells;

1 — RNA concentration, 2 — SH and SS concentration

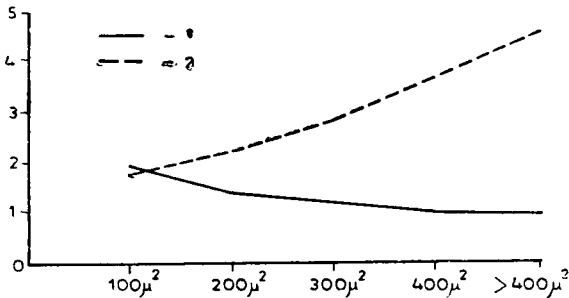
Wysokość stężenia kwasu rybonukleinowego we wszystkich wielkościach komórek określana była na tę samą powierzchnię cytoplazmy komórki jajowej. Powierzchnia ta ograniczona była zawsze stałą szczeliną mikrofotometru.

Obniżenie krzywej obrazującej stężenie kwasu rybonukleinowego, zmniejszające się w miarę wzrostu komórki jest istotne, co wynika po sprawdzeniu testem statystycznym von Neumanna.

Odczyn Barnetta i Seligmana na względną zawartość grup SH i SS w komórkach najmniejszych (do $100 \mu^2$) jest niewielki i równomiernie rozmieszczony, nieco silniejszy na obwodzie cytoplazmy, a wartość ekstynkcji wynosi 1,6 (ryc. 9). Wartość ta utrzymuje się na tym samym poziomie również w drugiej grupie komórek (do $200 \mu^2$). W komórkach o powierzchni do $300 \mu^2$ i do $400 \mu^2$ odczyn ten wyraźnie wzrasta w obrębie całej cytoplazmy poprzez wartości 2,0 i 2,5 i osiąga maksymalne natężenie 3,3 w komórkach dojrzałych, największych, o powierzchni ponad $400 \mu^2$ (ryc. 10). Podwyższenie krzywej po sprawdzeniu testem statystycznym ma wartość istotną.

Grupa doświadczalna I

Szczury białe, samice, otrzymały łącznie 1,2 j. m. pregnadylu. Komórki jajowe w różnym stadium rozwoju podzielono na grupy o wzrastającej powierzchni przekroju (ryc. 3).



Ryc. 3. Grupa doświadczalna I. Stężenie RNA oraz grup SH i SS w komórkach jajowych różnej wielkości, obliczone na podstawie 200 pomiarów dla każdej grupy komórek. 1 — stężenie RNA, 2 — stężenie SH i SS.

I experimental group. Concentration of RNA and SH and SS groups in oocytes of various sizes, estimated on the strength of 200 measurements for each group of cells

Podobnie jak w grupie kontrolnej odczyn pyroninochłonny, okazujący stężenie RNA jest bardzo intensywny w komórkach jajowych małych. Cytoplazma i jąderko tych komórek wybarwiają się równomiernie intensywnie (ryc. 11), a wartość ekstynkcji wynosi 1,9 co odpowiada wartości grupy kontrolnej. Wysokość stężenia RNA cytoplazmy i jąderka tych komórek obrazuje również działalność enzymatyczna rybonukleazy. I tak, by usunąć RNA z cytoplazmy trzeba było użyć stężenia 0,5 mg rybonukleazy na 1 ml roztworu działając w czasie 1 godziny, a w celu usunięcia RNA z jąderka stężenie musiało wynosić 1 mg enzymu na 1 ml roztworu.

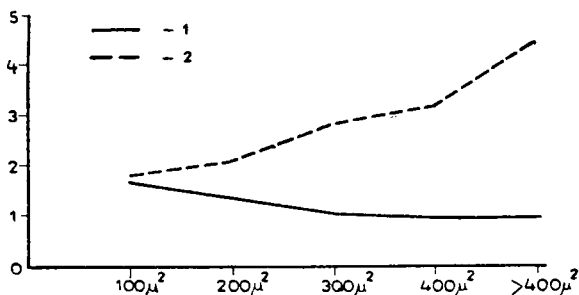
W miarę wzrostu komórki następuje obniżenie pyroninochłonności cytoplazmy. W komórkach o powierzchni przekroju do 200 μ² stężenie RNA wyrażone wartością ekstynkcji wynosi już 1,4, w komórkach większych, o powierzchni do 300 μ² — 1,2, a w komórkach o powierzchni do 400 μ² oraz ponad 400 μ² osiąga wartość 1,0 (ryc. 12). We wszystkich grupach komórek, z wyjątkiem komórek najmłodszych, stężenie RNA jest mniejsze w porównaniu z kontrolą. Na skutek tego obniżenie krzywej na wykresie jest wyraźniejsze i po sprawdzeniu testem von Neumanna również okazało się istotne.

Stężenie grup SH i SS, podobnie jak w grupie kontrolnej, jest najniższe w komórkach najmłodszych i wyrażone jest ekstynkcją

równą 1,8. Odczyn barwny na grupy sulfhydrylowe z czernią K jest równomierny w całej cytoplazmie, nie zaciiera sylwetki jądra komórkowego. Jądro daje odczyn słabszy, a jąderko tak intensywny jak cytoplazma (ryc. 13). Począwszy od następnej grupy komórek odczyn wzrasta stopniowo, a we wszystkich grupach komórek wartość ekstynkcji jest wyższa w porównaniu z grupą kontrolną i wynosi kolejno 2,2, 2,8, 3,7 i 4,5 w komórkach największych, o powierzchni ponad $400\mu^2$. W tych komórkach odczyn barwny Barnetta i Seligmana jest bardzo intensywny zarówno w cytoplazmie jak i w jądrze komórki, przez co staje się ono słabo widoczne (ryc. 14). Wzrost stężenia grup SH i SS jest istotny we wszystkich grupach komórek.

Grupa doświadczalna II

Szczury białe, samice, otrzymały łącznie 2,4 j. m. pregnadylu. Komórki jajowe w różnym stadium rozwoju podzielono na grupy o wzrastającej powierzchni przekroju (ryc. 4).



Ryc. 4. Grupa doświadczalna II. Stężenie RNA oraz grup SH i SS w komórkach jajowych różnej wielkości, obliczone na podstawie 200 pomiarów dla każdej grupy komórek. 1 — stężenie RNA, 2 — stężenie SH i SS.

II experimental group. Concentration of RNA and SH and SS groups in oocytes of various sizes, estimated on the strength of 200 measurements for each group of cells

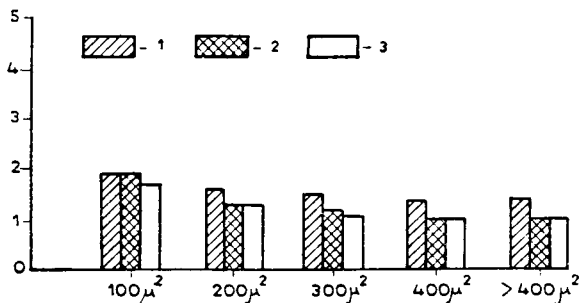
Stężenie kwasu rybonukleinowego i w tej grupie zwierząt wykazuje podobny przebieg krzywej. Największa wartość, bo 1,7 występuje w komórkach najmniejszych, następnie stopniowo obniża się. W kolejnych grupach wielkościowych komórek jajowych stężenie RNA wykazuje wartości 1,4, 1,1 i osiąga najmniejszą wartość (1,0) w komórkach największych o powierzchniach przekroju $400\mu^2$ i ponad $400\mu^2$. Przebieg krzywej jest bardzo zbliżony do tego obrazu, jaki uzyskano w pierwszej grupie doświadczalnej. W porównaniu z grupą kontrolną,

stężenie kwasu rybonukleinowego we wszystkich grupach komórek jest niższe. Spadek krzywej i tu jest istotny.

Wyniki cytofotometryczne pokrywają się z obserwacjami histochemicznymi, gdyż obserwując jedynie odczyn pyroninochłonny i działalność enzymatyczną rybonukleazy w obrębie cytoplazmy i jąderka, można się było przekonać o spadku stężenia RNA.

Stężenie grup SH i SS w drugiej grupie doświadczalnej wykazuje podobne wartości jak w grupie pierwszej, lecz zawsze wyższe w porównaniu z kontrolą. Wynosi ono dla komórek o powierzchni przekroju do $100\ \mu^2$ — 1,8, dla komórek o powierzchni do $200\ \mu^2$ — 2,1, do $300\ \mu^2$ — 2,8, do $400\ \mu^2$ — 3,2 i dla komórek o powierzchni ponad $400\ \mu^2$ — 4,5. Krzywa obrazująca to stężenie wzrasta stopniowo od komórek o najmniejszej powierzchni do największej. Wzrost krzywej po sprawdzeniu testem statystycznym okazał się istotny.

W celu sprawdzenia czy gonadotropina łożyskowa ma wpływ na stężenie badanych substancji w komórce jajowej, porównano wyniki uzyskane w grupie kontrolnej i w obydwu grupach doświadczalnych. Sporządzono wykresy wskazujące różnicę pomiędzy odpowiadającymi sobie wartościami ekstynkcji dla grupy kontrolnej i grup doświadczalnych przy ustalonych wartościach powierzchni przekroju komórek. Dla ciągu tych różnic przeprowadziliśmy test von Neumanna. Wynik okazał się istotny, można więc sądzić, że różnica we względnym stężeniu RNA między grupą kontrolną a pierwszą grupą doświadczalną jest istotna. Istotna jest również różnica między kontrolą a drugą grupą doświadczalną. Nie ma istotnej różnicy między obydwoma grupami doświadczalnymi, pierwszą i drugą.

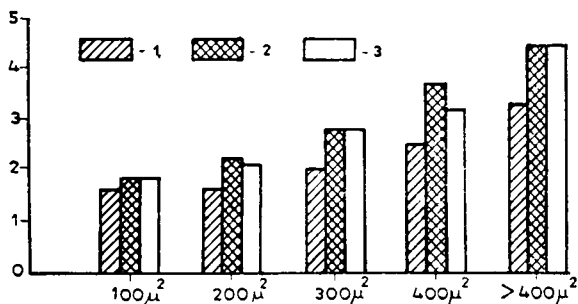


Ryc. 5. Stężenie RNA w grupie kontrolnej oraz w obu grupach doświadczalnych w komórkach jajowych różnej wielkości. 1 — grupa kontrolna, 2 — grupa doświadczalna I, 3 — grupa doświadczalna II.

Concentration of RNA in oocytes of various sizes in control group and in either of the experimental groups; 1 — control group, 2 — I experimental group, 3 — II experimental group

Ryc. 5 obrazuje stężenie kwasu rybonukleinowego w grupie kontrolnej oraz w grupach doświadczalnych pierwszej i drugiej.

Podobne wyniki otrzymano przy obliczeniach statystycznych dla grup SH i SS. Również w tym wypadku są istotne różnice między grupą kontrolną i grupą doświadczalną pierwszą oraz między kontrolną i doświadczalną drugą. Między pierwszą grupą doświadczalną i drugą doświadczalną istotna różnica nie zachodzi. Wartość ekstynkcji dla grup SH i SS w kontroli i w obu grupach doświadczalnych przedstawiona jest na ryc. 6.



Ryc. 6. Stężenie grup SH i SS w grupie kontrolnej oraz w grupach doświadczalnych w komórkach jajowych różnej wielkości. 1 — grupa kontrolna, 2 — grupa doświadczalna I, 3 — grupa doświadczalna II.

Concentration of SH and SS groups in oocytes of various sizes in control group and in either of the experimental groups

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Uzyskane w przeprowadzonych doświadczeniach wyniki świadczą o pobudzającym działaniu gonadotropiny łożyskowej na szybkość wzrostu i dojrzewania komórki jajowej. Z procesami tymi, tj. dojrzewaniem i wzrostem połączony jest proces zwiększonej syntezy białek komórkowych i witellogeneza, a więc różnego stopnia stężenie kwasu rybonukleinowego i grup sulfhydrylowych.

Obserwacje te są zbliżone do spostrzeżeń Bracheta (7), Bella (2), Favarda (12), Kawamury (16), Sawicha (27), Vernea (30) i innych, którzy obserwowali różne ilości kwasu rybonukleinowego i grup sulfhydrylowych w różnych okresach rozwoju komórki jajowej. W cytoplazmie komórek jajowych zwierząt doświadczalnych stwierdzono zmniejszenie odczynu pyroninochłonnego, obrazującego zmniejszenie stężenia kwasu rybonukleinowego, przy równoczesnym zwiększeniu odczynu barwnego Barnetta i Seligmana, świadczącego o podwyższeniu poziomu tioli białkowych cytoplazmy.

Ilość komórek dojrzałych po zadziałaniu gonadotropiny łożyskowej

dochodziła do ponad 30%, natomiast nie można było obserwować dużej ilości komórek jajowych z okresu przedwitellogenetycznego, które w grupie kontrolnej zawierają najwyższe stężenie RNA, a najniższe grup SH i SS. Te najmniejsze komórki o powierzchni przekroju do $100\mu^2$ i najwyższym stężeniu kwasu rybonukleinowego, występujące najliczniej w grupie kontrolnej, pod wpływem gonadotropiny łożyskowej uległy w ciągu krótkiego czasu wzrostowi i dojrzewaniu, w wyniku czego część kwasu rybonukleinowego, jak wydaje się została zużyta do syntezy białek cytoplazmy, o czym świadczy wzrost ilości grup SH

Tab. 1.

Grupa zwierząt	Powierzchnia przekroju komórki	Stężenie RNA	Stężenie SH i SS
Kontrolna	do $100\mu^2$	1,9	1,6
	do $200\mu^2$	1,6	1,6
	do $300\mu^2$	1,5	2,0
	do $400\mu^2$	1,4	2,5
	pon. $400\mu^2$	1,4	3,3
Doświadczalna I 1,2 j. m.	do $100\mu^2$	1,9	1,8
	do $200\mu^2$	1,4	2,2
	do $300\mu^2$	1,2	2,8
	do $400\mu^2$	1,0	3,7
	pon. $400\mu^2$	1,0	4,5
Doświadczalna II 2,4 j. m.	do $100\mu^2$	1,7	1,8
	do $200\mu^2$	1,4	2,1
	do $300\mu^2$	1,1	2,8
	do $400\mu^2$	1,0	3,2
	pon. $400\mu^2$	1,0	4,5

i SS tych białek. Pozostała część została rozproszona na znacznie większym obszarze dojrzalej komórki. Spostrzeżenie to pokrywa się z obserwacjami ultrastruktury komórki jajowej w różnych jej okresach, dokonany przez Favarda i Carasso (12).

Wysokość stężenia i rozmieszczenie RNA w komórkach jajowych młodych świadczy prawdopodobnie o dużej możliwości syntezy białek w tym okresie rozwoju komórki. Stężenie tego kwasu jest wystarczające, by w skróconym okresie czasu, po zadziałaniu gonadotropiną łożyskową, nastąpił maksymalny wzrost objętości komórki przy równoczesnym

ukończeniu procesu dojrzewania. Świadczy o tym również znaczne podwyższenie poziomu stężenia grup sulfhydrylowych, który z niskich wartości w komórkach małych dochodzi do szczytowego wzrostu w komórkach dojrzałych (Tab. 1).

Wykazanie tej współzależności między stężeniem RNA a grupami SH i SS na stałe tę samą powierzchnię cytoplazmy komórki jajowej pozwoliło przypuszczać, że w miarę wzrostu i dojrzewania komórki kwas rybonukleinowy zostaje zużyty do syntezy jej białek strukturalnych i zapasowych, przy równocześnie niskim poziomie jego odnowy. Za tym przemawiałyby również obraz morfologiczny jąderka, które słabo barwiły się pyroniną w ciągu całego procesu dojrzewania, a szczególnie pod jego koniec oraz to, że już stężenie 0,1 mg rybonukleazy na 1 ml roztworu w ciągu 1 godziny całkowicie usuwało kwas rybonukleinowy z jąderka.

Pod koniec procesu dojrzewania komórki jajowej ilość białka zapasowego, a więc i grup SH i SS dochodzi do swego maksimum, co prawdopodobnie pociąga za sobą zahamowanie procesu syntezy RNA jąderka i cytoplazmy.

Z przeprowadzonych badań wynika ciekawe zjawisko, że sztuczne pobudzenie dojrzewania komórek jajowych za pomocą pregnadyłu prowadzi do nadmiernego wytwarzania białek komórkowych zawierających grupy SH i SS, a równocześnie zapas RNA spada poniżej wartości charakterystycznych dla komórek jajowych normalnie dojrzewających. Fakt ten jest jeszcze jednym dowodem, przemawiającym za słusznością poglądu, że synteza białka uwarunkowana jest obecnością RNA, którego ilość w toku syntezy ulega stopniowemu wyczerpaniu (zmniejszeniu).

WNIOSKI

Badano względną zawartość kwasu rybonukleinowego i białek tiolowych w komórkach jajowych szczura przy użyciu metod histochemicznych. Ekstynkcję określano przy pomocy mikrofotometru Zeissa.

Zwierzętom doświadczalnym podawano gonadotropinę łożyskową w ilości 1,2 j.m. i 2,4 j.m. Powierzchnię komórek jajowych mierzono planimetrem.

Analiza uzyskanych wyników upoważnia do przedstawienia następujących wniosków:

1. Gonadotropina łożyskowa działa pobudzająco na szybkość wzrostu i dojrzewania komórki jajowej.

2. Wartości ekstynkcji świadczące o stężeniu RNA w komórkach jajowych są najwyższe w komórkach najmłodszych i obniżają się w miarę wzrostu komórki.

3. Natężenia odczynu barwnego Barnetta i Seligmana, świadczące o względnej zawartości grup SH i SS w komórkach jajowych są najmniejsze w komórkach najmłodszych, a osiągają swe maksimum w komórkach najstarszych.

4. W miarę wzrostu i dojrzewania komórki kwas rybonukleinowy zostaje zużyty do syntezy jej białek strukturalnych i zapasowych przy równocześnie niskim poziomie jego odnowy.

5. Sztuczne pobudzenie dojrzewania komórek jajowych za pomocą pregnadylu prowadzi do nadmiernego wytwarzania białek komórkowych zawierających grupy SH i SS, a równocześnie zapas RNA spada poniżej wartości charakterystycznych dla komórek jajowych normalnie dojrzewających.

PIŚMIENNICTWO

1. Austin C. R.: Nucleic Acids Associated with the Nucleoli of Living Segmented Rat Eggs. *Exp. Cell. Res.* **4**, 249—251, 1953.
2. Bell L. G. E.: Sulfhydryl Groups and Ribonucleic Acid. *Nature*, **182**, 4642, 1088—1089, 1958.
3. Brachet J.: Remarques à propos des interactions biochimiques entre le noyau et le cytoplasme. *Biochemia*, **22**, 238—239, 1957.
4. Brachet J.: The Effects of Various Metabolites and Antimetabolites on the Regeneration of Fragments of *Acetabularia mediterranea*. *Exp. Cell. Res.* **14**, 650—651, 1958.
5. Brachet J.: Effects of β -Mercaptoethanol on Morphogenesis in Amphibian Eggs. *Nature*, **181**, 1736—1737, 1958.
6. Brachet J., Delange-Cornil M.: Recherches sur le rôle des groupes sulfhydriques dans la morphogenèse. *Developmental Biology*, **1**, 79—100, 1959.
7. Brachet J.: Le rôle biologique des acides nucléiques. Onzième Conseil de Chimie, Bruxelles 1959.
8. Brachet J.: Thiol Groups and Morphogenesis. *Nature*, **184**, 1074—1075, 1959.
9. Brachet J.: Nouvelles observations sur les effets de la ribonucléase in vivo sur les oeufs des batraciens. *Acta Embr. et Morph. Exp.* **2**, 107—117, 1959.
10. Caspersson O.: Cell Growth and Cell Function. Narton and Co. N. Y. 1950.
11. Collier J. R.: The Localization of Ribonucleic Acid in the Egg of *Ilyanassa obsoleta*. *Exp. Cell. Res.* **21**, 126—136, 1960.
12. Favard P., Carasso R.: Origine et ultrastructure des plaquettes vitellines de la Planorbe. *Arch. Anat. Microsc. Morph. Exp.* **47**, 211—234, 1961.
13. Freinendegen L. E., Bond V. P., Shreeve W.W., Painter R. B.: RNA and DNA Metabolism in Human Tissue Culture Cells Studied with Tritiated Cytigine. *Exp. Cell Res.* **19**, 433—459, 1960.
14. Hart G. J.: Significance Levels for the Ratio of the Mean Square Successive Difference to the Variance. *Annal. of Mathem. Statis.* **XIII**, **4**, 445—447, 1942
15. Hill R. B., Bensch K. G., King D. W.: Photosensitization of Nucleic Acids and Proteins. *Exp. Cell Res.* **21**, 106—117, 1930.
16. Kawamura N., Katsuma D.: A Cytochemical Study of the Sulfhydryl

- Groups of Sea Urchin Eggs during the First Cleavage. J. wiophys. Biochem. Cytol. 4, 615—619, 1958.
17. Konopacki M.: Mikrometabolizm podczas owogenezy u *Loligo vulgaris*. Kosmos, A, 58, 133—156, 1933.
 18. Konopacki M.: Organizacja komórki jajowej. Fol. Morph. 7, 1—5, 1936/37.
 19. Latański M.: Wpływ gonadotropiny łożyskowej na struktury Golgiego w komórkach jajowych szczura białego (*Rattus rattus L. albino*) Ann. Univ. M. Curie Skłodowska, Sec. D. 14, 51—58, 1959.
 20. Makarow P. W.: O roli nukleinowych kislót w syntezie kletocznych białek. Arch. Anat. Hist. i Embr. 40, 3—17, 1961.
 21. Neumann J.: Distribution of the Ratio of Mean Square Successive Difference to the Variance. Annal. of Mathem. Statis. 11, 367—395, 1941.
 22. Niweliński J.: Histochemia jajnika szczurzego z wszczepionym cholesterolem. Fol. Morph. 1/9, 521—536, 1950.
 23. Niweliński J.: Histochemia gonad i nadnerczy u *Xenopus laevis* Daud. w stanie spoczynku i pod wpływem gonadotropiny łożyskowej. Fol. Biol. 2, 87—98, 1954.
 24. Prescott D. M.: Nuclear Synthesis of Cytoplasmic Ribonucleic Acid in *Amoeba proteus*. J. Biophys. Biochem. Cytol. 6, 203—206, 1959.
 25. Rittner C., Di Stefano H. S., Parah A.: A Method for the Cytophotometric Estimation of Ribonucleic Acid. J. Histochem. Cytochem. 9, 97—102, 1961.
 26. Ryabinina Z. A.: Change of Nucleic Acid Content in Structural Components of the Ovaries of White Rats Fed Diets Varying in Protein Content. Bull. Exp. Biol. Med. 4, 93, 1957.
 27. Sawich K. M., Jakowlew W. A.: The Presence and Localization of Sulfhydryl Groups in Various Formations of the Cat's Brain. Wopr. Med. Kimii. 3, 121—127, 1957.
 28. Sirlin J. L., Risdale T. R.: Rates of Labelling of RNA and Proteins in Cell Components of the Amphibian Myoblast. Exp. Cell Res. 18, 268—281, 1959.
 29. Sotelo J. R., Porter K. R.: An Electron Microscope Study of the Rat Ovum. J. Biophys. Biochem. Cytol. 5, 327—341, 1959.
 30. Verne J., Gabe M., Schramm B.: Évolution des groupes SH dans la muqueuse vaginale au cours du cycle oestral de la rate. Ann. Histochem. 1, 249—255, 1956.
 31. Webster G. G.: The Biosynthesis of Nucleic Acids by Isolated Cellular Particles. Acta Histochem. 4, 1/4, 9—14, 1957.
 32. Zalokar M.: Nuclear Origin of Ribonucleic Acid. Nature. 183, 4667—4676, 1330, 1959.
 33. Zalokar M.: Sites of Protein and Ribonucleic Acid Synthesis in the Cell. Exp. Cell Res. 19, 559—576, 1960.
 34. Zubay G.: A Template Model for the Synthesis of Ribonucleic Acid from Deoxyribonucleic Acid. Nature, 182, 4645—4647, 1290—1292, 1858.

РЕЗЮМЕ

Исследования проводились на девственных самках крыс (*Rattus rattus L. albino*), находящихся в одном и том же периоде полового цикла. Животные были разделены на три группы. Второй

и третьей из этих групп подавался гонадотропный гормон плаценты в количестве 1,2 м.е. и 2,4 м.е. Гистологические наблюдения после окраски срезов по методу Браше, пиронином и по методу Барнетта — Зелигмана. Для определения концентрации РНК, а также SH и SS — групп автор пользовался микрофотометром Цейсса II.

Из микрофотометрических анализов следует, что концентрация РНК снижается параллельно созреванию яйцевой клетки, концентрация же SH и SS — групп возрастает. Гонадотропный гормон плаценты, сокращая срок созревания яйцевой клетки, усиливает изменения концентрации РНК а также SH и SS — групп.

Рис. 1. Количество клеток в отдельных стадиях развития после определения их поверхности (в пересчете на 100 яйцевых клеток).

Рис. 2. Контрольная группа. Концентрация РНК, а также групп SH и SS в яйцевых клетках разной величины, вычисленная на основании 200 измерений для каждой группы клеток.

Рис. 3. Экспериментальная группа I. Концентрация РНК, а также групп SH и SS в яйцевых клетках разной величины, вычисленная на основании 200 измерений для каждой группы клеток.

Рис. 4. Экспериментальная группа II. Концентрация РНК, а также групп SH и SS в яйцевых клетках разной величины, вычисленная на основании 200 измерений для каждой группы клеток.

Рис. 5. Концентрация РНК в контрольной группе, а также в обеих экспериментальных группах в яйцевых клетках разной величины.

Рис. 6. Концентрация групп SH и SS в контрольной группе, а также в обеих экспериментальных группах в яйцевых клетках разной величины.

Рис. 7. Контрольная группа. Ооцит поверхностью до 100 кв. микронов. Цветная реакция на пиронин в пределах цитоплазмы и ядрышка очень интенсивная, одинаковая на всей поверхности цитоплазмы. Видно незначительное увеличение интенсивности в зоне ядерной оболочки. Микроскоп Nf., Цейсс, Йена, объектив 40, окуляр 12,5 К. Микрофот. Eхаста Vаrех IIа.

Рис. 8. Контрольная группа. Ооцит поверхностью свыше 400 кв. микронов. Рибонуклеиновая кислота (РНК) размещена равномерно во всей цитоплазме в виде мельчайших зернышек и глыбок. Ядрышко маленькое и подобно цитоплазме слабо окрашено. Микроскоп Nf, Цейсс, Йена, объектив 40, окуляр 12,5 К. Микрофот. Eхаста Vаrех IIа.

Рис. 9. Контрольная группа. Ооцит поверхностью до 100 кв. микронов. Окраска по Барнетту и Зелигману довольно слабая и равномерно размещенная, несколько интенсивнее на периферии цитоплазмы. Микроскоп Nf, Цейсс Йена, объектив 60, окуляр 12,5 К. Микрофот. Eхаста Vаrех IIа.

Рис. 10. Контрольная группа. Ооцит поверхностью свыше 400 кв. микронов. Цветная реакция на относительное количество групп SH и SS максимальной концентрации. Краситель размещен равномерно во всей цитоплазме. Микроскоп Nf, Цейсс Йена, объектив 40, окуляр 12,5 К. Микрофот. Eхаста Vаrех IIа.

Рис. 11. Экспериментальная группа I. Ооцит поверхностью до 100 кв. микронов. Пиронинофильная реакция, определяющая концентрацию РНК очень интенсивная. Цитоплазма и ядрышко окрашиваются равномерно. Микроскоп Nf, Цейсс Йена, объектив 60, окуляр 12,5 К. Микрофот. Eхаста Vаrех IIа.

Рис. 12. Экспериментальная группа I. Ооцит поверхностью свыше 400 кв. микронов. Отчетливо выраженное снижение пиронинофильности цитоплазмы. Цитоплазма яйцевой клетки окрашена равномерно. Микроскоп Nf, Цейсс Йена, объектив 40, окуляр 12,5 К. Микрофот. Exacta Varex IIa.

Рис. 13. Экспериментальная группа I. Ооцит поверхностью до 100 кв. микронов. Цветная реакция на группы SH и SS с черным К равномерно охватывает всю цитоплазму. В ядре реакция слабее, а в ядрышке такой же интенсивности, как и в цитоплазме. Микроскоп Nf, Цейсс Йена, объектив 60, окуляр 12,5 К. Микрофот. Exacta Varex IIa.

Рис. 14. Экспериментальная группа I. Ооцит поверхностью свыше 400 кв. микронов. Цветная реакция Барнетта и Зелигмана очень интенсивная как в цитоплазме яйцевой клетки, так и в её ядре, благодаря чему ядро слабо заметно. Микроскоп Nf, Цейсс Йена, объектив 40, окуляр 12,5 К. Микрофот. Exacta Varex IIa.

SUMMARY

The investigations were carried out on virgin female rats (*Rattus rattus* L. *albino*), all in the same phase of the genital cycle. The animals were divided into three groups, of which the second and third were given placental gonadotropin in doses 1.2 i. u. and 2.4 i. u. Histological examination was preceded by staining the material according to Brachet or Barnett-Seligman, or with pyronine. Concentrations of RNA, SH and SS were determined by means of the microphotometer Zeiss II.

It resulted from the microphotometric determination that the concentration of RNA decreases during the process of the maturation of the oocyte; on the other hand, there is an increase of the SH and SS concentration. Placental gonadotropin, which shortens the maturation process of the oocyte, intensifies the changes in the concentration of RNA, SH and SS.

Fig. 7. Control group. Oocyte, surface up to 100 μ^2 . Intense colour reaction with pyronine in cytoplasm and nucleus, uniform over the whole surface of cytoplasm, slightly increasing in the area of membrane of nucleus. Microscope, Zeiss Nf, Jena, objective 40, ocular 12.5 K, microphot. Exacta Varex II a.

Fig. 8. Control group. Oocyte, surface over 400 μ^2 . RNA uniformly distributed in the whole cytoplasm in the form of tiny granules. Nucleolus small, faintly stained like cytoplasm. Microscope Nf, Zeiss Jena, objective 40, ocular 12.5 K, microphot. Exacta Varex II a.

Fig. 9. Control group. Oocyte, surface up to 100 μ^2 . Barnett and Seligman reaction slight, uniformly distributed, becoming stronger towards the periphery of cytoplasm. Microscope Nf, Zeiss Jena, objective 40, ocular 12.5 K, microphot. Exacta Varex II a.

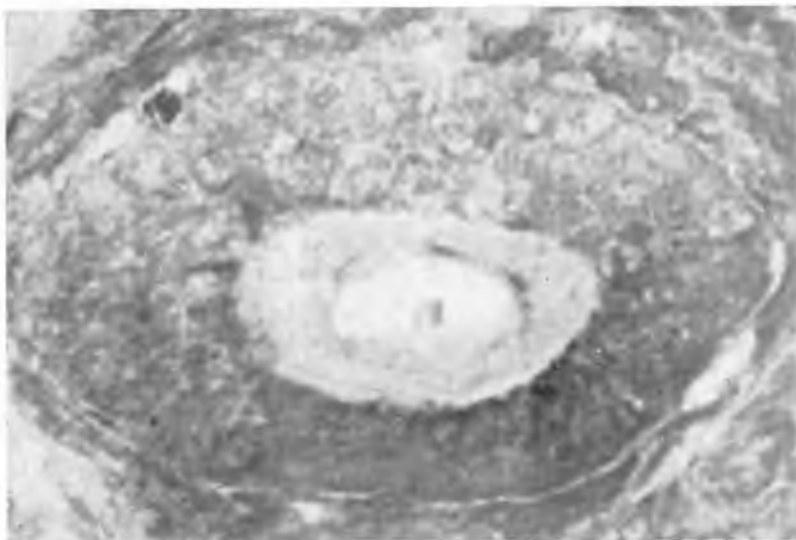
Fig. 10. Control group. Oocyte, surface over 400 μ^2 . Colour reaction to relative content of SH and groups of maximum intensity, uniformly distributed in the whole cytoplasm. Microscope Nf, Zeiss Jena, objective 40, ocular 12.5 K, microphot. Exacta Varex II a.

Fig. 11. I experimental group. Oocyte, surface up to $100 \mu^2$. Pyronine reaction to the presence of RNA, very intense. Cytoplasm and nucleolus uniformly stained. Microscope Nf, Zeiss Jena, objective 60, ocular 12.5 K, microphot. Exacta Varex II a.

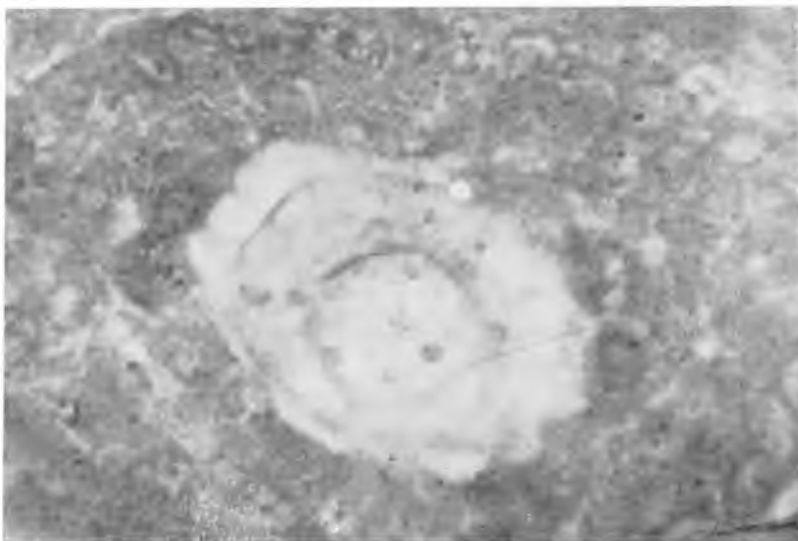
Fig. 12. I experimental group. Oocyte, surface $400 \mu^2$. Distinct decrease of pyronine affinity of cytoplasm. Reaction distributed uniformly in cytoplasm of cell. Microscope Nf, Zeiss Jena, objective 40, ocular 12.5 K, microphot. Exacta Varex II a.

Fig. 13. I experimental group. Oocyte, surface up to $100 \mu^2$. Colour reaction for SH and SS groups with K black uniform in the whole cytoplasm. Nucleus stained less intensely, nucleolus stained as strongly as cytoplasm. Microscope, Nf, Zeiss Jena, objective 60, ocular 12.5 K, microphot. Exacta Varex II a.

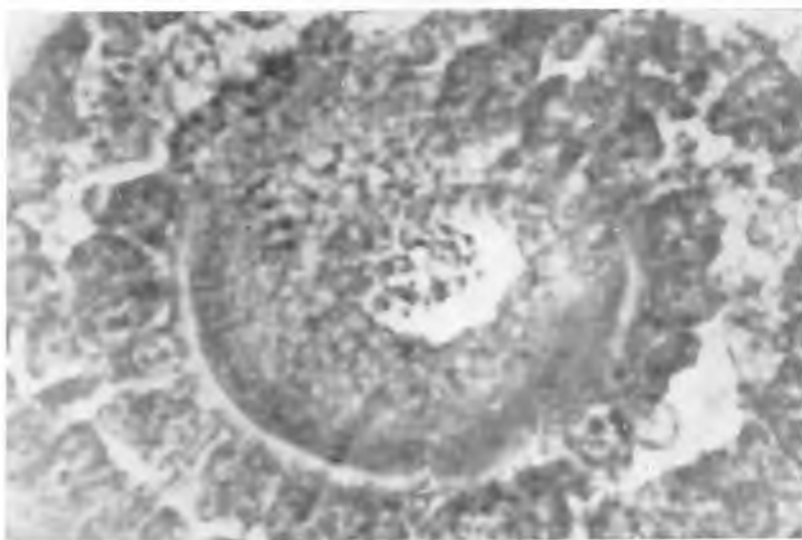
Fig. 14. I experimental group. Oocyte, surface over $400 \mu^2$. Colour reaction according to Barnett and Seligman very intense, both in cytoplasm and in nucleus, the latter becoming indistinct. Microscope Nf, Zeiss Jena, objective 40, ocular 12.5 K, microphot. Exacta Varex II a.



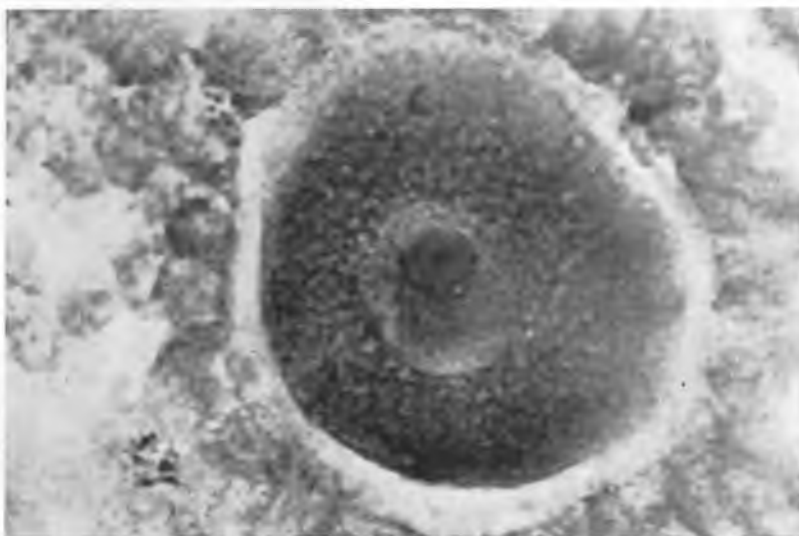
Ryc. 7. Grupa kontrolna. Oocyt o powierzchni do $100\mu^2$. Odczyn barwny z pyroniną w obrębie cytoplazmy i jąderka bardzo intensywny, jednolity na całej powierzchni cytoplazmy, o nieznacznym wzroście natężenia w strefie błony jądrowej. Mikroskop Nf, C. Zeiss (Jena), obiektyw 40, okular 12,5 K Mikrofot. Exacta Varex II a



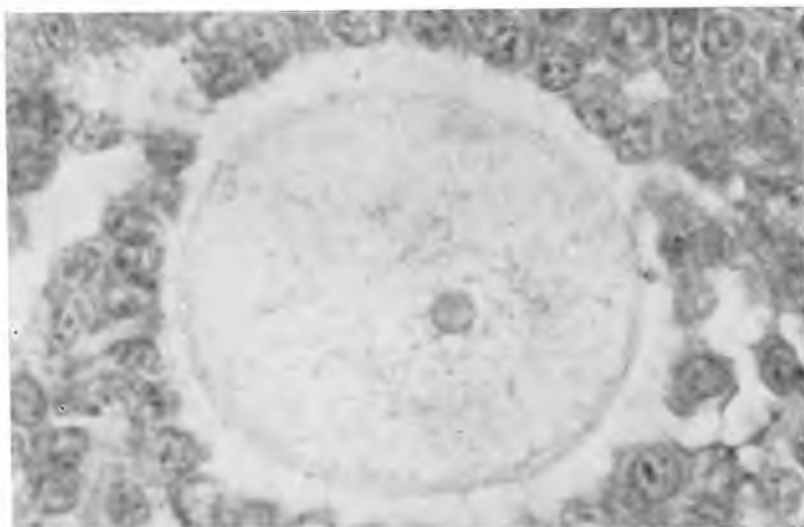
Ryc. 8. Grupa kontrolna. Oocyt o powierzchni ponad $400\mu^2$. RNA rozmieszczony równomiernie w całej cytoplazmie pod postacią drobniutkich ziarenek i grudek. Jąderko małe i podobnie jak cytoplazma słabo zabarwione. Mikroskop Nf, C. Zeiss (Jena), obiektyw 40, okular 12,5 K. Mikrofot. Exacta Varex II a



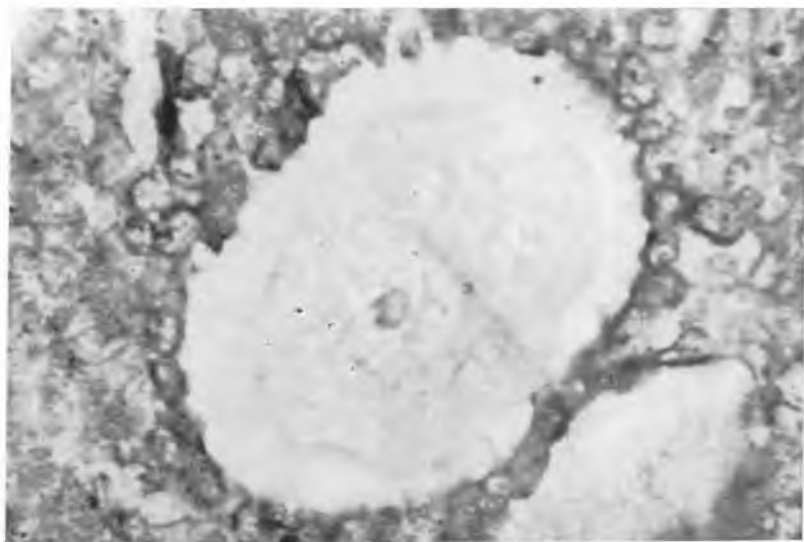
Ryc. 9. Grupa kontrolna. Oocyt o powierzchni do $100\mu^2$. Odczyn Barnetta i Seligmana niewielki i równomiernie rozmieszczony, nieco silniejszy na obwodzie cytoplazmy. Mikroskop Nf, C. Zeiss (Jena), obiektyw 60, okular 12,5 K. Mikrofoto. Exacta Varex II a



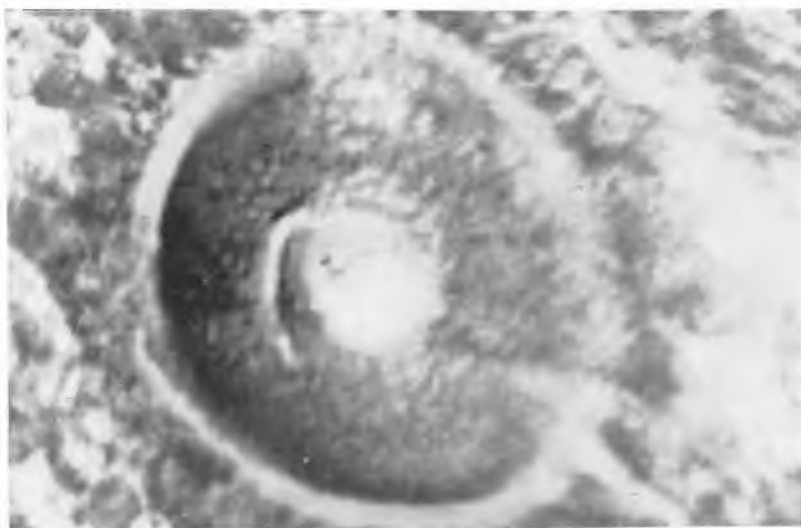
Ryc. 10. Grupa kontrolna. Oocyt o powierzchni ponad $400\mu^2$. Odczyn barwny na względną zawartość grup SH i SS o maksymalnym natężeniu, rozmieszczony równomiernie w całej cytoplazmie. Mikroskop Nf, C. Zeiss (Jena), obiektyw 40, okular 12,5 K. Mikrofoto. Exacta Varex II a



Ryc. 11. Grupa doświadczalna I. Oocyt o powierzchni do $100\mu^2$. Odczyn pyroninochłonny okazujący stężenie RNA jest bardzo intensywny. Cytoplazma i jąderko wybarwiają się równomiernie. Mikroskop Nf, C. Zeiss (Jena), obiektyw 60, okular 12,5 K. Mikrofol. Exacta Varex II a



Ryc. 12. Grupa doświadczalna I. Oocyt o powierzchni $400\mu^2$. Wyraźne obniżenie pyroninochłonności cytoplazmy. Odczyn rozmieszczony równomiernie w cytoplazmie komórki jajowej. Mikroskop Nf, C. Zeiss (Jena), obiektyw 40, okular 12,5 K. Mikrofol. Exacta Varex II a



Ryc. 13. Grupa doświadczalna I. Oocyt o powierzchni do $100\mu^2$. Odczyn barwny na grupy SH i SS z czernią K jest równomierny w całej cytoplazmie. Jądro daje odczyn słabszy a jąderko tak intensywne jak cytoplazma. Mikroskop Nf, C. Zeiss (Jena), obiektyw 60, okular 12,5 K. Mikrofont. Exacta Varex II a



Ryc. 14. Grupa doświadczalna I. Oocyt o powierzchni ponad $400\mu^2$. Odczyn barwny Barnetta i Seligmana bardzo intensywny zarówno w cytoplazmie jak i w jądrze komórki, przez co staje się ono słabo widoczne. Mikroskop Nf, C. Zeiss (Jena), obiektyw 40, okular 12,5 K. Mikrofont. Exacta Varex II a