

---

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

Irena KRÓLIKOWSKA-PRASAŁ

**Histochemiczne i mikrofotometryczne badania nad udziałem kwasów nukleinowych w procesie wydzielniczym komórki**

**Гистохимические и микрофотометрические исследования над участием нуклеиновых кислот в выделительном процессе клетки**

**Histochemical and Microphotometric Investigations on the Participation of Nucleinic Acids in the Secretory Process of the Cell**

Rola kwasów nukleinowych w wielu podstawowych procesach biologicznych budziła i budzi nadal szerokie zainteresowanie. Zagadnienie więc zachowania się kwasu rybonukleinowego (RN) cytoplazmy i kwasu dezoksyrybonukleinowego (DRN) jądra podczas hamowania i pobudzania procesów wydzielniczych jest z punktu widzenia analizy dynamiki przemian odbywających się na terenie komórki nadal zagadnieniem ważnym i dyskutowanym. Caspersson (2) na przykład podaje, że jądro bierze bezpośredni udział w omawianym procesie, podczas gdy Brachet (1) mówi raczej o pośredniej roli jądra i podkreśla jego współudział w syntezie RN. Udziałem jądra i kwasów nukleinowych w procesach wydzielniczych komórki zajmowali się również Mc Master-Kaye (4) i Skalska-Vorbródt (7). Autorzy ci jednak nie podejmowali prób ilościowego określenia zawartości kwasów. Wydało się więc nam słuszne podjęcie badań histochemicznych i mikrofotometrycznych kwasów nukleinowych (RN i DRN) w komórkach gruczołowych ślinianki podszczękowej pozostającej pod wpływem atropiny i pilokarpiny, jako czynników farmakologicznych hamujących i pobudzających procesy wydzielnicze.

**MATERIAŁ I METODYKA BADAŃ**

Badania przeprowadzono na 35 myszach białych, samcach, wagi około 15 g, które w czasie doświadczenia przebywały w jednakowych warunkach. Zwierzęta podzielono na trzy grupy. W I grupie wstrzykiwano zwierzętom podskórnice w okolicę grzbietu jednorazowo 1 ml 0,3% atropiny. Zwierzęta II grupy otrzymały pod skórę grzbietu 1 ml 0,3% pilokarpiny. Grupę III stanowiły zwierzęta

kontrolne, którym, celem wykluczenia ewentualnego wpływu urazu, podawano podskórnie 1 ml soli fizjologicznej. W każdej grupie zabijano zwierzęta przez dekapitację w czasie 10 min., 30 min. i 60 min. po iniekcji. Myszy, którym podawano atropinę po 10 min. czuły się zupełnie dobrze, dopiero po 30 i 60 min. można było zaobserwować pewne podrażnienie u zwierząt. Natomiast myszy, które otrzymały podskórnie pilokarpinę czuły się bardzo źle już po 10 min., zaś po 30 i 60 min. obserwowano drgawki mięśni całego ciała, a ślinotok, jak również wydalanie kału były bardzo obfite.

Do badań pobierano ślinianki podszczękowe, które utrwalano w utrwalczacach: 1) chlorek rtęciowy + kwas octowy lodowaty w stosunku 50:1, 2) formalinę 10%, pH  $7,0 \pm 0,2$ . Skrawki parafinowe grubości 5  $\mu$  barwiono wg metody Feulgena na kwas DRN, oraz zielenią metylową i pyroniną według metody Bracheta. Nasilenie odczynu histochemicznego określano przy pomocy mikrofotometru C. Zeiss (Jena). Uzyskane wyniki pomiarów ekstynkcji grup doświadczalnych i kontrolnej poddano analizie statystycznej posługując się testem t.

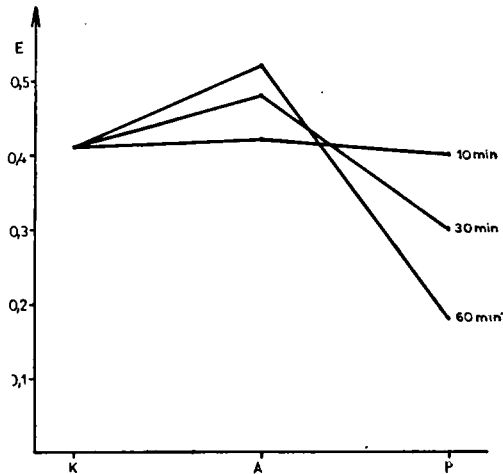
## BADANIA WŁASNE

### Badania histochemiczne

Dokładny przegląd preparatów histologicznych pozwolił prześledzić zmiany odczynów kwasów dezoksyrybonukleinowego i rybonukleinowego w komórkach gruczołowych ślinianki podszczękowej zwierząt, którym podano atropinę oraz pilokarpinę. W obrazie histologicznym komórek gruczołowych zwierząt, które otrzymały atropinę i zostały zabite w 30 min. po iniekcji obserwowano wyraźne nasilenie odczynu na DRN w wyniku reakcji Feulgena. DRN występował we wszystkich komórkach w postaci gruboziarnistych skupisk oraz grubszych ziaren intensywnie fioletowo zabarwionych, zwłaszcza dokoła błony jądrowej. Podobnych spostrzeżeń dokonano na preparatach barwionych wg metody Bracheta, w wyniku której obserwowano intensywnie zielony odczyn na DRN w jądrze komórkowym. W komórkach tych widoczny był również wyraźny odczyn na RN. Odczyn ten w reakcji Bracheta wyrażał się obecnością różowych ziarenek równomiernie rozmieszczonych w całej cytoplazmie. Dużo RN obserwowano w jąderkach (ryc. 4). U zwierząt natomiast zabitych w czasie 60 min. od chwili wstrzyknięcia atropiny silny odczyn na RN był widoczny we wszystkich komórkach gruczołowych, natomiast odczyn na DRN był słaby (ryc. 3). W obrazie histologicznym komórek zwierząt, które otrzymały atropinę i zostały zabite w 10 min. po iniekcji nie zauważono prawie wcale zmian odczynów kwasów nukleinowych i to zarówno RN, jak i DRN (ryc. 6), w porównaniu z odczynem występującym w komórkach gruczołowych zwierząt kontrolnych (ryc. 3).

W II grupie doświadczalnej, w której zwierzęta otrzymały pilokarpinę, obserwowany odczyn histochemiczny na RN i DRN w komórkach

gruczołowych po 10 min. nie różnił się od obrazu kontrolnego (ryc. 7). Natomiast po 30 min. dało się zauważyć osłabienie odczynu na DRN, który także był słaby po 60 min. i to zarówno po reakcji Feulgen a, gdzie wystąpiło jednolite słabo fioletowe zabarwienie jąder komórkowych, jak również na preparatach barwionych wg metody Bracheta. Odczyn na RN był zbliżony do odczynu na preparatach kontrolnych, zaś po 60 min. wystąpiło wyraźne osłabienie odczynu. RN występował w postaci rozproszonej w całej cytoplazmie (ryc. 8 i 9).

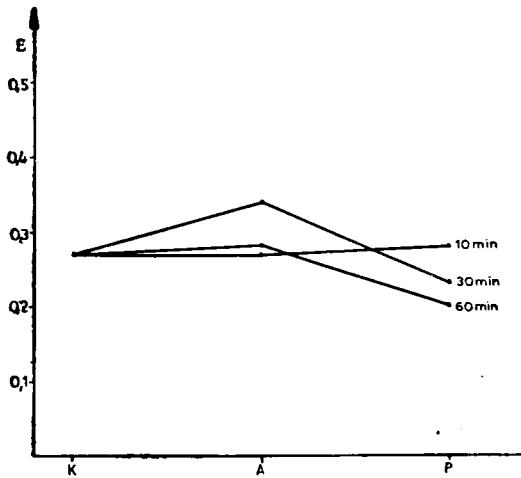


Ryc. 1. Wpływ atropiny i pilokarpiny na zmiany DRN  
Influence of atropine and pilocarpine on changes in DRN

### Badania mikrofotometryczne

Oznaczenia mikrofotometryczne preparatów barwionych pyroniną na RN oraz wg metody Feulgen a na DRN pozwoliły wykazać zmiany ilości tych kwasów w komórkach gruczołowych ślinianek myszy. Podczas hamowania procesów wydzielniczych przez podawanie zwierzętom atropiny ilość kwasów DRN i RN zwiększała się. Wzrost ten był statystycznie znamieny w komórkach tych zwierząt, które zostały zabite w 30 min. i 60 min. po iniekcji. Po 30 min. obserwowano wzrost ilości DRN, wartość  $t = 6,39$ , dla RN  $t = 5,53$ . Obydwie wartości znacznie różniły się od wartości krytycznej  $t_{0,01} = 3,36$ , a zatem obserwowane tu różnice były statystycznie znamienne. W 60 min. zauważało się jeszcze większy wzrost ilości DRN w porównaniu z kontrolą, gdyż wartość  $t$  dla DRN wynosiła  $8,29$ , natomiast wartości  $t$  dla RN po 60 min. nie były statystycznie istotne ( $t = 0,91$ ). U zwierząt zabitych po 30 min.

od chwili wstrzyknięcia atropiny ilości RN, jak i DRN w komórkach gruczołowych nie były statystycznie znamienne.



Ryc. 2. Wpływ atropiny i pilokarpiny na zmiany RN  
Influence of atropine and pilocarpine on changes in RN

W II grupie doświadczalnej, u zwierząt, którym podawano pilokarpinę w 10 min. po iniekcji także nie obserwowano zmian ilości DRN i RN. Natomiast po 30 min. ilość DRN wyraźnie zmniejszała się, co wyrażało się  $t = 10,04$  przy  $t_{0,01} = 3,36$ , a zatem uzyskany wynik był wybitnie nieprzypadkowy, natomiast zmiany ilości RN nie były statystycznie znamienne, gdyż  $t = 1,7$  przy  $t_{0,01} = 3,36$ . Po 60 min. zarówno ilości DRN, jak i RN zmniejszały się i były statystycznie istotne, gdyż dla DRN  $t = 12,12$  a dla RN  $t = 7,84$  przy  $t_{0,01} = 3,36$ . Wyniki zmian DRN i RN pod wpływem atropiny i pilokarpiny przedstawiono na ryc. 1 i 2.

#### OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ I WNIOSKI

Wpływ pilokarpiny i atropiny na komórkę był przedmiotem badań licznych autorów. Scott (5) badając działanie pilokarpiny na aktywność fosfatazy zasadowej w jelitach, nerce i gruczołach potowych myszy stwierdził, że ilość enzymu malała, a maksymalny spadek obserwowano się po 1 godz. od chwili wstrzyknięcia pilokarpiny oraz powrót do wartości normalnej po 24 godzinach. Shannon i Brooks (6) badając wpływ pilokarpiny na zawartość sodu i potasu w podjęzykowych i przyusznym gruczołach ślinowych szczura obserwowali wzrost ilości sodu

w gruczołach zwierząt, którym podawano pilokarpinę, podczas gdy ilości potasu zmniejszały się. Badania kwasów nukleinowych w gruczołach ślinowych *Drosophila* zostały przeprowadzone przez M c M a s t e r - K a y e (4). Dotyczyły one metabolizmu jąderkowego, chromosomalnego i plazmatycznego kwasu rybonukleinowego. Autor stwierdził, że największe przemiany zachodziły w RN jąderkowym, następnie RN chromosomalnym, a najniższą aktywność wykazywał RN cytoplazmatyczny. S k a l s k a - V o r b r o d t (7) w badaniach nad udziałem jądra komórkowego w procesie wydzielniczym wskazywała, że działanie pilokarpiny powodowało przemieszczenie DRN na obwód jądra komórkowego gruczołów ślinowych i ubytek chromatyny przyjąderkowej. DRN gromadził się w nielicznych chromocentrach przy błonie jądrowej. Natomiast atropina powodowała rozproszenie DRN w całym obszarze jądra, oraz duże jego nagromadzenie w obszarze przyjąderkowym. English (3) zaś badając gruczoły ślinowe u zwierząt napromienianych wskazywał na wyraźne zmiany kształtu, objętości oraz intensywności zabarwienia jądra komórkowego.

W badaniach naszych przeanalizowano zmiany DRN i RN w komórkach gruczołowych ślinianki podszczękowej w stanie doświadczalnego hamowania i pobudzania procesów wydzielniczych. Okazało się, że pod wpływem atropiny ilość DRN po 30 min. wzrastała, osiągając maksymalną wartość po 60 min. Natomiast ilość RN po 30 min. wzrastała, zaś po 60 min. była taka sama jak w jądrach komórkowych zwierząt kontrolnych. Nie obserwowano żadnych zmian w wartości DRN i RN po krótkim działaniu atropiny, tj. w czasie 10 min. po iniekcji.

W pobudzaniu procesów wydzielniczych przez podawanie zwierzętom pilokarpiny zauważono, że po 10 min. także nie występowały żadne istotne zmiany w ilościach kwasów nukleinowych, natomiast po 30 min. obserwowano obniżenie wartości DRN, gdy tymczasem ilość RN nie zmieniała się. Po 60 min. zmniejszała się jeszcze bardziej ilość DRN, a także nastąpiło znaczne obniżenie wartości RN.

Należy przyjąć, że pod wpływem atropiny i pilokarpiny występują zaburzenia w przemianie kwasów nukleinowych. W stanach hamowania procesów wydzielniczych ilości kwasów nukleinowych przeważnie wzrastają, natomiast w przypadku pobudzania ilości ich zmniejszają się. Zmian tych nie daje się zauważyć w czasie krótkiego działania zarówno atropiny, jak i pilokarpiny.

#### OBJAŚNIENIA DO RYCIN

Ryc. 3. Ślinianka podszczękowa myszy. Preparat kontrolny. Barwienie wg metody Bracheta. Mikroskop Nf. C. Zeiss (Jena), obiektyw 40 x, okular 12,5 x. Mikrofot. Practina FX.

Ryc. 4. Ślinianka podszczękowa myszy. 1 ml atropiny 0,3%. Zwierzęta zabite w 30 min. po iniekcji. Intensywny odczyn RN i DRN. Barwienie wg metody Bracheta. Mikroskop Nf. C. Zeiss (Jena), obiektyw 40 x, okular 12,5 x.

Mikrofot. Practina FX.

Ryc. 5. Ślinianka podszczękowa myszy. 1 ml atropiny 0,3%. Zwierzęta zabite w 60 min. po iniekcji. Intensywny odczyn na RN, natomiast na DRN słaby. Barwienie wg metody Bracheta. Mikroskop Nf. C. Zeiss (Jena), obiektyw 40 x, okular 12,5 x. Mikrofot. Practina FX.

Ryc. 6. Ślinianka podszczękowa myszy. 1 ml atropiny 0,3%. Zwierzęta zabite w 10 min. po iniekcji. Odczyn na RN i DRN, jak na preparatach kontrolnych. Barwienie wg metody Bracheta. Mikroskop Nf. C. Zeiss (Jena), obiektyw 40x, okular 12,5x. Mikrofot. Practina FX.

Ryc. 7. Ślinianka podszczękowa myszy. 1 ml pilokarpiny 0,3%. Zwierzęta zabite w 10 min. po iniekcji. Odczyn na RN i DRN, jak na preparatach kontrolnych. Barwienie wg metody Bracheta. Mikroskop Nf. C. Zeiss (Jena), obiektyw 40 x, okular 12,5 x. Mikrofot. Practina FX.

Ryc. 8. Ślinianka podszczękowa myszy. 1 ml pilokarpiny 0,3%. Zwierzęta zabite w 30 min. po iniekcji. Osłabienie odczynu na RN i DRN. Barwienie wg metody Bracheta. Mikroskop Nf. C. Zeiss (Jena), obiektyw 40 x, okular 12,5 x.

Mikrofot. Practina FX.

Ryc. 9. Ślinianka podszczękowa myszy. 1 ml pilokarpiny 0,3%. Zwierzęta zabite w 60 min. po iniekcji. Słaby odczyn DRN. RN jak na preparatach kontrolnych. Barwienie wg metody Bracheta. Mikroskop Nf. C. Zeiss (Jena), obiektyw 40 x, okular 12,5 x. Mikrofot. Practina FX.

---

#### PIŚMIENNICTWO

1. Brachet J.: Le rôle biologique des acides nucléiques. Bruxelles — Belgique, 1959.
  2. Caspersson T. O.: Cell Growth and Cell Function. Norton Co N. Y. 1950
  3. English J. A.: Morphologic Effect of Irradiation on the Salivary Gland of Rat. J. Dent. Res. **34**, 4—11, 1955.
  4. Mc Master-Kaye R.: The Metabolic Characteristics of Nucleolar, Chromosomal and Cytoplasmic Ribonucleic Acid of Drosophile Salivary Gland. J. Biophys. Biochem. Cytol. **8**, 365—378, 1960.
  5. Scott T. G.: The Effect of Pilocarpine on Alkaline Phosphatase Activity in Sweat Gland Intestinal Epithelium and Kidney of the Mouse. Exp. Cell. Res. **23**, 130—137, 1961.
  6. Shannon I. R., Brooks R. A.: The Effect of Pilocarpine Stimulation on the Histologic Appearance and the Sodium and Potassium Content of Rat Submaxillo-Sublingual Glands. Oral Surg. Med. Path. **13**, 240—245, 1960.
  7. Skalska-Vorbrodt J.: Badania doświadczalne nad udziałem jądra komórkowego w procesie wydzielniczym gruczołów ślinowych. Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, Sec. D, **7**, 1—22, 1952.
-

## РЕЗЮМЕ

В работе излагаются результаты гистохимических и микрофотометрических исследований РНК и ДНК в клетках подчелюстной слюнной железы белых мышей в связи с действием атропина и пилокарпина.

Исследования показали, что под влиянием атропина и пилокарпина наступают изменения в содержании нуклеиновых кислот ядра и цитоплазмы. Торможение выделительных процессов под влиянием атропина приводило, как правило, к увеличению содержания нуклеиновых кислот (РНК и ДНК), возбуждение же пилокарпином уменьшало содержание этих кислот. Необходимо отметить, что коротко-срочное действие атропина и пилокарпина не вызывало заметных изменений количества исследуемых нуклеиновых кислот ядра и цитоплазмы.

Рис. 1. Влияние атропина и пилокарпина на изменение содержания ДНК.

Рис. 2. Влияние атропина и пилокарпина на изменение содержания РНК.

Рис. 3. Подчелюстная слюнная железа мыши. Контрольный препарат. Окрашивание по методу Браше. Микроскоп Nf. С. Цейсс (Иена). Объектив 40 X, окуляр 12,5 X. Микрофото Practina FX.

Рис. 4. Подчелюстная слюнная железа мыши. 1 мл. атропина 0,3%. Животные забитые 30 мин. после инъекции. Интенсивная реакция на РНК и ДНК. Окрашивание по методу Браше. Микроскоп Nf. С. Цейсс (Иена). Объектив 40 X, окуляр 12,5 X. Микрофото Practina FX.

Рис. 5. Подчелюстная слюнная железа мыши. 1 мл. атропина 0,3%. Животных забивали в 60 мин. после инъекции. Интенсивная реакция на РНК, и слабая на ДНК. Окрашивание по методу Браше. Микроскоп Nf. Цейсс (Иена). Объектив 40 X, окуляр 12,5 X. Микрофото Practina FX.

Рис. 6. Подчелюстная слюнная железа мыши. 1 мл. атропина 0,5%. Животные забитые 10 мин. после инъекции. Реакция на РНК и ДНК такая же как и на контрольных препаратах. Окрашивание по методу Браше. Микроскоп Nf. Цейсс (Иена). Объектив 40 X, окуляр 12,5 X. Микрофото Practina FX.

Рис. 7. Подчелюстная слюнная железа мыши. 1 мл. пилокарпина 0,3%. Животные забитые 10 мин. после инъекции. Реакция на РНК и ДНК такая же как и на контрольных препаратах. Окрашивание по методу Браше. Микроскоп Nf. С. Цейсс (Иена). Объектив 40 X, окуляр 12,5 X. Микрофото Practina FX.

Рис. 8. Подчелюстная слюнная железа мыши. 1 мл. пилокарпина 0,3%. Животные забитые 30 мин. после инъекции. Реакция на РНК и ДНК слабо выраженная. Окрашивание по методу Браше. Микроскоп Nf. С. Цейсс (Иена). Объектив 40 X, окуляр 12,5 X. Микрофото Practina FX.

Рис. 9. Подчелюстная слюнная железа мыши. 1 мл. пилокарпина 0,3%. Животных забивали 60 мин. после инъекции. Слабая реакция на ДНК и РНК как и на контрольных препаратах. Окрашивание по методу Браше. Микроскоп Nf. С. Цейсс (Иена). Объектив 40 X, окуляр 12,5 X. Микрофото Practina FX.

## SUMMARY

The author conducted histochemical and microphotometric investigations on RN and DRN acids in the gland cells of the submandibular salivary glands of white mice subjected to the action of atropine and pilocarpine.

It was found that under the influence of atropine and pilocarpine there occur changes in the amount of nucleic acids in the nucleus and cytoplasm. Generally speaking, the inhibitory action of atropine on the secretory processes produced an increase of the amount of nucleic acids (RN and DRN); the stimulating action of pilocarpine reduced their amount. It should be noted that when atropine or pilocarpine acted for a short time only, no evident changes in the amount of RN and DRN acids in the nucleus and cytoplasm could be found.

Fig. 3. Submandibular salivary gland of mouse, control preparation. Stained according to Brachet. Microscope Nf., C. Zeiss, Jena; objective 40 x, eyepiece 12.5 x. Microphot. Practina FX.

Fig. 4. Submandibular salivary gland of mouse, 1 ml. of 0.3% atropine. Animals killed 30 minutes after injection. Intense RN and DRN reaction. Stained according to Brachet. Microscope Nf., C. Zeiss, Jena; objective 40 x, eyepiece 12.5 x. Microphot. Practina FX.

Fig. 5. Submandibular salivary gland of mouse, 1 ml. of 0.3% atropine. Animals killed 60 minutes after injection. Intense reaction to RN, weak reaction to DRN. Stained according to Brachet. Microscope Nf., C. Zeiss, Jena; objective 40 x, eyepiece 12.5 x. Microphot. Practina FX.

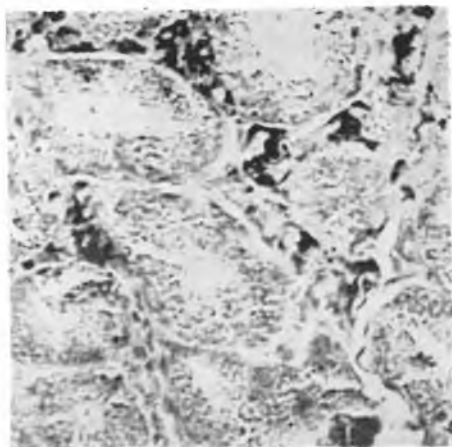
Fig. 6. Submandibular salivary gland of mouse, 1 ml. of 0.3% atropine. Animals killed 10 minutes after injection. Reaction to RN and DRN as in control preparations. Stained according to Brachet. Microscope Nf., C. Zeiss, Jena; objective 40 x, eyepiece 12.5 x. Microphot. Practina FX.

Fig. 7. Submandibular salivary gland of mouse. 1 ml. of 0.3% pilocarpine. Animals killed 10 minutes after injection. Reaction to RN and DRN as in control preparations. Stained according to Brachet. Microscope Nf., C. Zeiss, Jena; objective 40 x, eyepiece 12.5 x. Microphot. Practina FX.

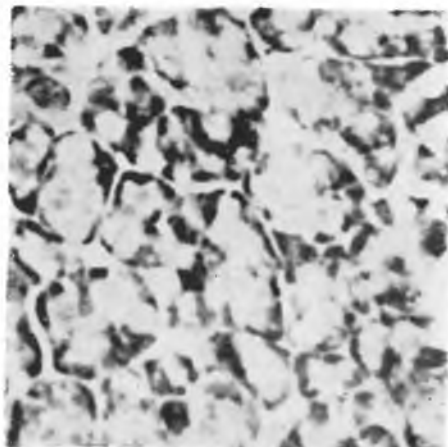
Fig. 8. Submandibular salivary gland of mouse. 1 ml. of 0.3% pilocarpine. Animals killed 30 minutes after injection. Reaction to RN and DRN weakened. Stained according to Brachet. Microscope Nf., C. Zeiss, Jena; objective 40 x, eyepiece 12.5 x. Microphot. Practina FX.

Fig. 9. Submandibular salivary gland of mouse. 1 ml. of 0.3% pilocarpine. Animals killed 60 minutes after injection. Weak reaction to DRN; reaction to RN as in control preparations. Stained according to Brachet. Microscope Nf., C. Zeiss, Jena; objective 40 x, eyepiece 12.5 x. Microphot. Practina FX.

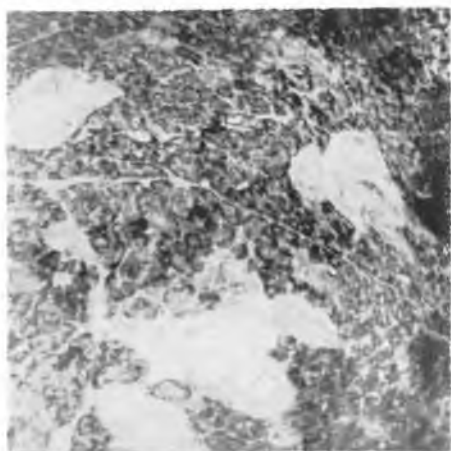




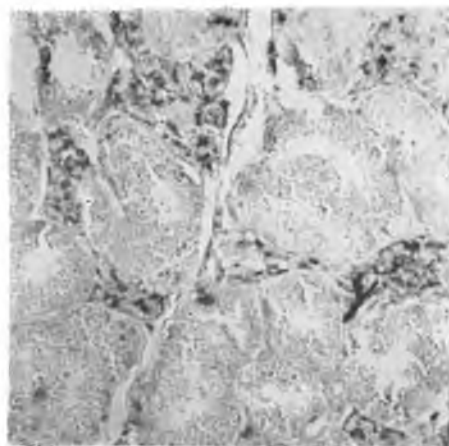
Ryc. 3



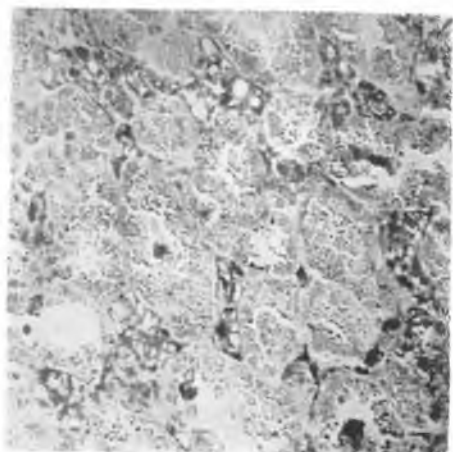
Ryc. 4



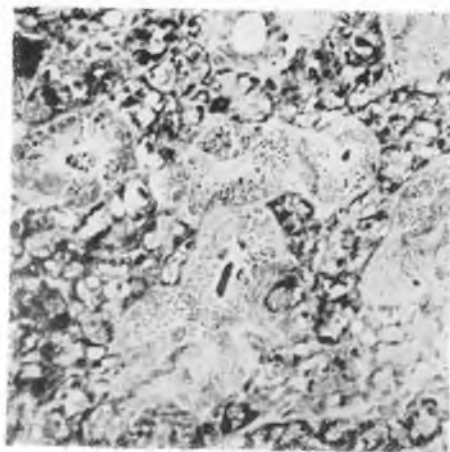
Ryc. 5



Ryc. 6



Ryc. 7



Ryc. 8



Ryc. 9