

ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN — POLONIA

VOL. XXVII, 11

SECTIO D

1972

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

Józef STASZYC

**Badania cytotopochemiczne nefronów po operacyjnym podwiązaniu
tętnicy nerkowej u szczurów**

Цитотопохимические исследования нефронов после операционного наложения
лигатуры на почечную артерию крыс

Cytotopochemical Tests of Nephrons after Ligation of the Kidney Artery in a Rat

Badania Deterlinga (1962), Berndta (1963) oraz Binga i Kazimierczaka (1969) wskazują, że nagle niedokrwienie nerek ma wyraźny wpływ na przemianę materii organizmu zwierzęcego. Staszyc i wsp. (1971) opisali zmiany histochemiczne zachodzące w niedokrwionej nerce. Nie wiemy jednak nadal, jak zachowują się enzymy w rewaskulowanych nerkach. Jest to istotny problem ponieważ enzymy nerek obok udziału w przemianach tego narządu są również zaangażowane w ogólnych procesach całego ustroju. Interesujące wydaje się więc przeanalizowanie aktywności enzymatycznej komórek nabłonka kanalików nerkowych w różnym okresie czasu po przywróceniu drożności tętnicy nerkowej uprzednio doświadczalnie zamkniętej.

MATERIAŁ I METODY

Badania wykonano na szczurach białych, płciowo dojrzałych samcach, hodowli wsobnej, w ogólnej narkozie eterowej. Zwierzęta przebywały w dobrych warunkach lokalowych, a jako pokarm otrzymywały paszę granulowaną i wodę do picia bez ograniczeń. Doświadczenia prowadzono w czterech grupach. Każda z nich składała się z dziewięciu szczurów, którym operacyjnie (Staszyc i wsp. 1969) zaciskano na pewien okres czasu tętnicę nerkową lewą, a następnie udrażniało ją zdejmując klips naczyniowy (Baron 1965). Część kontrolną każdej grupy stanowiło sześć szczurów. Trzem z nich wykonywano tylko próbną laparatomię, a pozostałe trzy stanowiły materiał porównawczy. W grupie I t. nerkowa zaciśnięta była przez 2, w II przez 5, w III przez 10, a w IV przez 20 minut. Po upływie oznaczonego czasu usuwano klemę naczyniową z tętnicy, przywracając krążenie w nerce. Następnie w 3 (Podgrupa A), 6 (Podgrupa B) i 9 (Podgrupa C) godzin od udrożnienia t. nerkowej pobierano do badania materiał jednocześnie z nerek doświadczalnych i kontrolnych. Przed pobraniem skrawków sprawdzano, czy nerka lewa nie posiada naczyń dodatkowych odchodzących od tętnicy głównej.

Tkanki utrwalano w płynach Bouina, Carnoy'a, Zenke'a oraz w mieszaninie calcium-formol o temp. 4°C. Na skrawkach mrożonych wykonywano reakcje histochemiczne. Badano fosfatazy kwaśną (Fk) i zasadową (Fz) wg m. Gomoriego oraz esterazy niespecyficzne (EN) przy użyciu reakcji dwuazowej. Aktywność adenylozotrójfosfatazy (ATP-azy) wykazano wg. m. Wachstein — Meisel'a. Pirofosfatazę tiaminową (TPP-azę) oznaczano wg zleceń Novikoffa i Goldfischera, a 5-nukleotydazę (5-N) wg m. Gomoriego w modyfikacji Vorbrodta. Kwasy nukleinowe wykazano metodami Feulgena i Bracheta. Mukopolisacharydy obojętne wybarwiano wg reakcji PAS z odczynnikiem Schiffa. Grupy aldehydowe blokowano dimedonem, a trawiąc preparaty diastazą eliminowano glikogen. Do celów przeglądowych zastosowano barwienie hematoksyliną Delafielda i eozyną.

BADANIA WŁASNE

Fosfataza kwaśna (Fk)

Zwierzęta kontrolne. W komórkach nabłonka kanalików głównych hydrolaza ta występowała w lizosomach zlokalizowanych przede wszystkim w środkowej i przypodstawnej części cytoplazmy. Brak lub słabą reakcję na ten enzym obserwowano w śródbłonku naczyń i w torebce Bowmana. Na preparatach pochodzących ze zwierząt pozornie operowanych aktywność Fk w kanalikach głównych nieznacznie wzrosła w porównaniu z grupą kontrolną. Stan ten utrzymywał się przez cały okres eksperymentu.

Grupa I. Podgrupa A. Zwierzętom tej grupy doświadczaonej uciśnięto t. nerkową lewą na 2 min. a następnie zwolniono zacisk. Wycinki z nerek pobrano do badania w 3 godz. po rewaskulizacji. W porównaniu z materiałem kontrolnym zmalała nieco liczba lizosomów aktywnych na Fk. Umiejscowione one były przeważnie w pobliżu jąder komórkowych. Po upływie 6 godz. (Podgrupa B) aktywność Fk powróciła do stanu obserwowanego na materiale zwierząt pozornie operowanych. Natomiast po 9 godz. (Podgrupa C) obserwowano dalszy spadek reakcji na Fk, choć był on nadal większy niż na preparatach ze szczurów kontrolnych.

Grupa II. Podgrupa A. T. nerkowa uciśnięta była przez 5 min., a od udrożnienia jej do pobrania materiału upłynęło 3 godz. W porównaniu z podgrupą A grupy I stan aktywności Fk był na niższym poziomie. Również i tutaj Fk występowała pod postacią odczynu ziarnistego, który wskazywał na obecność lizosomów. W kanalikach krętych I rzędu ziarenka fosfatazo dodatkowo były bardziej delikatne i rozrzucone po całej cytoplazmie. O ile w grupie I w 6 godz. od zdjęcia klemy naczyniowej (Podgrupa B) reakcje na Fk spadły do poziomu zwierząt pozornie operowanych, to w tym materiale nie znaleziono obniżenia aktywności. Zaznaczył się on dopiero po 9 godz., tj. w Podgrupie C.

Grupa III. Niedrożność t. nerkowej trwała przez 10 min. Podgrupa A. Odczyny enzymatyczne na Fk oraz jej rozmieszczenie wskazywały na zmiany aktywności tego enzymu. W cewkach krętych I rzędu uwidoczniły się liczne duże lizosomy. Były one mocno wybarwione. Pojawiła się aktywność enzymatyczna w śródbłonku naczyń kłębkowych i naczyń krwionośnych oplatających kanaliki moczowe (ryc. 1). Zmiany te miały miejsce przede wszystkim w nefronach przyrdzennych. W okolicy podtorebkowej stan enzymatyczny nefronów nie odbiegał od zanotowanego u szczurów pozornie operowanych. Podgrupa B. W sześć godzin po udrożnieniu t. nerkowej utrzymywały się zmiany aktywności Fk stwierdzone w podgrupie A. Ponadto zaobserwowano tutaj dodatkowo jeszcze odczyny na Fk w cewkach zbiorczych, których nie było w materiale porównawczym. Podgrupa C. Znikła aktywność Fk w naczyniach krwionośnych. Również i w części nefronów przyrdzennych nastąpił spadek aktywności na tę hydrolazę i to przede wszystkim w komórkach nabłonka kanalików głównych.

Grupa IV. W ciągu 20 min. było zamknięte światło t. nerkowej. Preparaty pochodzące z Podgrupy A wykazywały odczyn na Fk w rąbku szczoteczkowym nefronów zarówno części środkowej, jak i przyrdzennej. Obok pojedynczych dużych lizosomów obserwowano w komórkach nabłonka również odczyn dyfuzyjny. Stan taki był w tych kanalikach, których światło było znacznie poszerzone, a nabłonek niski. Pojawiły się też reakcje na Fk w kłębkach naczyniowych ciałek nerkowych i w torbkach Bowmana. Podgrupa B. Tylko nefrony podtorebkowe nie wykazywały pobudzenia enzymatycznego. Nieznaczne obniżenie aktywności w porównaniu z podgrupą A zaznaczyło się w kłębkach naczyniowych. Podgrupa C. Wzmoczone reakcje na Fk utrzymywały się we wszystkich odcinkach nefronów przyrdzennych (ryc. 2). W strefie Golgiego oraz w lizosomach ektoplazmy Fk była nadal bardzo aktywna. W licznych nefronach stwierdzono odczyn dyfuzyjny. W cewkach zbiorczych spadły fosfatazo dodatnie odczyny do poziomu podgrupy B.

Fosfataza zasadowa (Fz)

Zwierzęta kontrolne. Najsilniejsze odczyny na Fz występowały w rąbku szczoteczkowym (ryc. 3). Drobnodziarnistą aktywność wykazywały też błony i jądra komórek nabłonka kanalików moczowych. Śródbłonek naczyń krwionośnych był również fosfatazo dodatni. U zwierząt, którym dokonano laparatomii w narkozie eterowej, wzrosła aktywność Fz, szczególnie wyraźnie w cewkach krętych I rzędu. Zauważono, że stan pobudzenia enzymatycznego utrzymywał się przez cały okres eksperymentu.

Grupa I. Podgrupa A. W cewkach krętych I rzędu zarówno w rąbku szczoteczkowym, jak i w komórkach nabłonka reakcje na Fz były nieco

słabsze niż w grupie zwierząt pozornie operowanych. Podgrupa B. Preparaty tej podgrupy nie wykazywały różnic w stosunku do poprzednich. Podgrupa C. W 9 godz. od udrożnienia t. nerkowej reakcje na Fz wzrosły do poziomu zwierząt po laparatomii.

Grupa II. Przedłużenie niedrożności t. nerkowej z 2 do 5 min. w tej serii doświadczalnej nie wpłynęło zasadniczo na stan enzymatyczny Fz. We wszystkich podgrupach obserwowano odczyny na Fz podobne do preparatów z podgrupy C grupy I.

Grupa III. Podgrupa A. W proksymalnych odcinkach kanalików głównych zaznaczyło się obniżenie reakcji na Fz. Było ono szczególnie intensywne w nefronach strefy przyrdzennej i środkowej części korowej (ryc. 4). Nefrony położone tuż pod torebką wykazywały żywsze reakcje enzymatyczne. W ich kanalikach krętych wysokość rąbka szczoteczki nie uległa zmianie. Podgrupa B. W porównaniu z podgrupą A poziom reakcji enzymatycznych bez wyraźnych zmian. W błonie podstawowej części głównej kanalików moczowych pojawiły się delikatne odczyny na Fz. Podgrupa C. Wzrosła aktywność Fz w nefronach położonych w środkowej części kory. Stopień ich aktywności był jednak znacznie niższy niż w grupach poprzednich i kontrolnych.

Grupa IV. Podgrupa A. Jeszcze bardziej zmniejszyła się liczba nefronów wykazujących dodatni odczyn na Fz. Tylko nefrony leżące w strefie podtorebkowej miały dodatnią aktywność. W licznych kanalikach moczowych rąbek szczoteczki był uszkodzony i dawał słabo dodatnie lub ujemne odczyny na Fz (ryc. 5). Tutaj w ektoplazmie komórek nabłonka obserwowano drobne ziarenka aktywne na ten enzym. Podgrupa B. W dalszym ciągu w zdecydowanej większości nefronów aktywność Fz była bardzo mała albo jej w ogóle nie można wykazać. Podgrupa C. Nabłonek kanalików był spłaszczony. Wzrosła jednak aktywność na Fz szczególnie w rąbku szczoteczkowym. W części nefronów leżących bliżej istoty rdzennej odczyny były nadal słabo dodatnie lub ujemne.

Esterazy niespecyficzne (EN)

Zwierzęta kontrolne. Esterazy niespecyficzne wyczerpiły się w komórkach nabłonka kanalików moczowych w postaci ziarnistego odczynu. Szczególnie aktywne reakcje były w polu Golgiego. Kanaliki zbiorcze, podobnie jak śródbłonek naczyń, dawały słabe lub ujemne wyniki. Po laparatomii wzrosła aktywność EN w nabłonku cewek krętych I rzędu oraz w układzie naczyniowym. Inaktywowanie cholinesterazy ezeryną i wykonany następnie odczyn na EN nie wykazał różnic w porównaniu z grupą kontrolną.

Grupa I. Podgrupa A, B i C. Podgrupy te przedstawiono wspólnie, ponieważ reakcje enzymatyczne na EN nie wykazywały zasadniczych

różnic w stosunku do zwierząt pozornie operowanych i w stosunku do siebie. Przeprowadzona inaktywacja cholinesterazy dała wynik ujemny.

Grupa II. Podgrupa A. Lokalizacja wewnątrzkomórkowa tej esterazy była wyraźnie zaznaczona w polu Golgiego. Drobne ziarenka aktywne na EN układały się przede wszystkim pomiędzy jądrem a wolną powierzchnią komórki. Podgrupa B. W tej części doświadczenia aktywność na EN w porównaniu z podgrupą A nie dawała wyraźnych różnic. Natomiast w zestawieniu z grupą zwierząt pozornie operowanych można było zauważyć, że liczba ziarenek aktywnych na EN była mniejsza. Podgrupa C. Prawidłowe ukrwienie nerki trwające przez 9 godz. miało wpływ na aktywność EN, ponieważ uzyskane reakcje przypominały obrazy z grup kontrolnych.

Grupa III. Podgrupa A. Na całym poprzecznym przekroju kory nerki pojawił się nierównomiernie rozłożony odczyn na EN i to zarówno w nefronach, jak i podścielisku. Był on silniejszy w strefie podtorebkowej, a słabszy w okolicy przyrdzennej. Stan ten utrzymywał się bez zmian w Podgrupie B. Dopiero w Podgrupie C obserwowano zwiększenie aktywności EN, ale tylko w nefronach zlokalizowanych w części podtorebkowej kory.

Grupa IV. Podgrupa A. Niewielka liczba nefronów leżących w części brzeżnej kory nerki dawała dodatnie odczyny na EN. W pozostałych reakcje na EN były słabo dodatnie lub ujemne. Podgrupa B. W śródbłonku naczyń podtorebkowych zanotowano słabą reakcję na EN. W pętłach Henlego i w kanalikach zbiorczych odczyny były ujemne. Podgrupa C. Nieznaczny wzrost aktywności na EN zaznaczył się i w nefronach przyrdzennych. Zmienił się jednak w komórkach ich nabłonka charakter odczynu enzymatycznego. Obok ziarenek drobnych pojawiły się w większej ilości ziarenka grube, dość intensywnie wysyczone. Reakcje na cholinesterazę dały wynik ujemny.

A d e n o z y n o t r ó j f o s f a t a z a (ATP-aza)

Zwierzęta kontrolne. Najsilniejsze reakcje na ATP-azę zaznaczyły się w cewkach krętych I rzędu (ryc. 6). W komórkach nabłonka pozostałych odcinków kanalików moczowych występowała ona również w jądrach i w cytoplazmie dając reakcje bardziej gruboziarniste. Pozorna operacja spowodowała nierównomierny wzrost aktywności ATP-azy, który zaakcentował się szczególnie w rąbku szczoteczkowym i błonie podstawowej nefronów podtorebkowych. Stan tego pobudzenia utrzymywał się przez cały czas doświadczenia.

Grupa I. Podgrupa A. W tym okresie eksperymentu odczyn ATP-azy manifestował się również za pomocą elementów ziarnistych wypełnia-

jących cytoplazmę. Stopień aktywności i rozmieszczenie ATP-azy w Podgrupach B i C podobny był również do grupy pozornie operowanej.

Grupa II. Podgrupa A. Nefrony leżące w części przytorebkowej były bardziej aktywne niż w pozostałych częściach kory nerki. W Podgrupie B w przywierzchołkowej okolicy komórek kanalików głównych występował odczyn dyfuzyjny. Natomiast w Podgrupie C w błonie podstawowej kanalików krętych I rzędu pojawił się odczyn na ATP-azę, którego nie było poprzednio.

Grupa III. Podgrupa A. W kanalikach krętych I rzędu odczyn na ATP-azę stał się ziarnisty. Był on szczególnie wyraźny w nefronach podtorebkowych. Podgrupa B. Zmiany w natężeniu reakcji enzymatycznych ATP-azy utrzymywały się również i po 6 godz. od udrożnienia t. nerkowej. Podgrupa C. W dalszym ciągu nefrony przyrdzenne reagowały na ATP-azę słabiej niż pozostałe.

Grupa IV. Podgrupa A. Zróżnicowanie aktywności enzymatycznej ATP-azy zaznaczało się na całej powierzchni kory. O ile w nefronach podtorebkowych odczyny były słabo dodatnie to w przyrdzennych spotykano znaczną liczbę reakcji ujemnych. Podgrupa B. Nadal liczne nefrony miały ujemną aktywność na ATP-azę. Były one położone przeważnie w części środkowej i w przyrdzennej. W podścielisku ujawniono reakcję na ATP-azę o charakterze dyfuzyjnym. Podgrupa C. Nieznacznie nasiliły się odczyny na ATP-azę w rąbku szczoteczkowym kanalików krętych I rzędu.

Pirofosfataza tiaminowa (TPP-aza)

Zwierzęta kontrolne. TPP-aza jako marker aparatu Golgiego umiejscawiała się przeważnie w okolicy przyjądrowej komórki (ryc. 7). W większej ilości występowała ona w kanalikach krętych I i II rzędu dając blaszkowate lub nitkowate struktury, które odpowiadały elementom Golgiego. Liczba ich w różnych nefronach nie była jednakowa. Po próbnym otwarciu jamy brzusznej w kanalikach głównych wystąpiły liczne zbite elementy aktywne na TPP-azę, które maskowały jądra komórkowe. Zmiany te w cewkach krętych I rzędu miały miejsce w bardzo licznych nefronach nawet po 9 godz. od udrożnienia tętnicy nerkowej.

Grupa I. Podgrupa A. Podobnie jak w kontroli błony komórkowe oraz jądra pozbawione były reakcji na TPP-azę. Podgrupa B. Twory aktywne na TPP-azę układały się przeważnie w płaszczyźnie równikowej w pewnej odległości od jądra komórkowego. W porównaniu z podgrupami A i B w Podgrupie C spotykało się więcej elementów TPP-azododatnich, ułożonych nad jądrem w przywierzchołkowej części komórki. Wyczerniły się też drobne ziarenka odpowiadające systemom Golgiego.

Grupa II. Podgrupa A. Pod torebką widoczne były skupiska nefronów ze wzmożoną aktywnością TPP-azy. Odczyn manifestował się tutaj strukturami pierścieniowymi zlokalizowanymi w okolicy wydzielniczej komórki. Podgrupy B i C. Analogicznie jak w podgrupie poprzedniej aktywność TPP-azy manifestowała się na biegunie wydzielniczym komórki.

Grupa II. Podgrupa A. Zmalała liczba struktur Golgiego reagujących na ten enzym. Większość z nich przybrała formę nitek lub nieregularnych ziaren. Zmiany te miały miejsce najczęściej w kanalikach krętych I rzędu środkowej i przyrdzennej części kory. Podgrupa B. Ten okres bardzo przypominał stan enzymatyczno-morfologiczny aparatu Golgiego z poprzedniej podgrupy doświadczalnej. Podgrupa C. W porównaniu z podgrupami A i B można było zauważyć więcej elementów Golgiego w nefronach podtorebkowych. Pod samą torebką były nefrony nawet ze wzmożoną aktywnością TPP-azy.

Grupa IV. Podgrupa A. W obrębie kory wystąpiły nefrony o ujemnym odczynie na TPP-azę. Słabo dodatnią aktywność wykazywały tylko nefrony położone tuż pod torebką. Odczyn enzymatyczny składał się z drobnych nitkowatych tworów. Śródbłonek naczyńniowy reagował ujemnie na TPP-azę. Podgrupa B. W dalszym ciągu liczne nefrony nie dawały dodatniej reakcji. Podgrupa C. W kanalikach przyrdzennych utrzymywały się śladowe odczyny. TPP-aza lekko zaznaczała się w podścielisku. Cewki zbiorcze dawały ujemne wyniki.

5 - Nukleotydaza (5-N)

Zwierzęta kontrolne. Ziarnisty odczyn na 5-N występował w rąbku szczoteczkowym, cytoplazmie i na terenie jądra komórkowego. W śródbłonku naczyń krwionośnych oraz w podścielisku zaznaczała się również reakcja enzymatyczna. Błazki torebki Bowmana wykazywały średnio dodatnie odczyny na 5-N. U zwierząt po laparatomii zarówno w 3, 6, jak i 9 godz. od zabiegu widoczne były w rąbku szczoteczkowym silniejsze odczyny na 5-N niż u szczurów kontrolnych. Natomiast reakcje w obrębie podścieliska i naczyń krwionośnych nie wykazywały różnic.

Grupa I. Podgrupa A. Aktywność 5-N wyraźnie się zmniejszyła w śródbłonku naczyń krwionośnych środkowej i przyrdzennej części kory. Również istota rdzenna zarówno w podścielisku, jak i w układzie naczyniowym miała obniżoną reakcję na 5-N. Podgrupa B. W naczyniach krwionośnych istoty korowej aktywność powróciła do stanu podobnego jak u zwierząt pozornie operowanych. Mniejszą aktywność na 5-N notowano nadal w podścielisku i w części rdzennej. Podgrupa C. Zarówno w korze, jak i w rdzeniu nerki próby enzymatyczne na 5-N upodobniły się do preparatów histochemicznych grupy szczurów po laparatomii.

Grupa II. Podgrupa A. Zauważono niewielkie obniżenie aktywności 5-N w rąbku szczoteczkowym. Liczne naczynia krwionośne miały bardzo słabą, a nawet ujemną reakcję na 5-N. Podobnie zachowała się 5-N w tkance łącznej. Stan taki utrzymywał się również i w materiale Podgrupy B. Po 9 godz. preparaty z Podgrupy C przypominały materiał porównawczy.

Grupa III. Podgrupa A. Jądra komórkowe nefronów podtorebkowych wykazywały zwiększoną liczbę ziarenek 5-N. Były one grube, dobrze wysyczone, niekiedy zlewające się ze sobą. Natomiast w pozostałych nefronach i w rąbku szczoteczkowym reakcje enzymatyczne zmalały. W tkance łącznej międzykanalikowej i w naczyniach krwionośnych odczyny na 5-N były ujemne. Podgrupa B. Aktywność enzymatyczna w jądrach komórek nabłonka nefronów podtorebkowych utrzymywała się na poziomie podgrupy A. Zauważono tutaj, że błona podstawowa kanalików krętych I rzędu była zgrubiała i o słabo dodatnim odczynie na 5-N. Podgrupa C. Zachowanie się 5-N nie wykazywało tak znacznych różnic aktywności pomiędzy nefronami podtorebkowymi a przyrzedzennymi. Zalcjowaną jednak równowagę notowano i po 9 godz.

Grupa IV. Podgrupa A. W tym okresie doświadczenia zaznaczało się ogniskowe pobudzenie nefronów podtorebkowych. Pozostałe dawały przeważnie ujemne wyniki reakcji Gomoriego. W Podgrupie B odczyny histochemiczne na 5-N przypominały obrazy z poprzedniej części doświadczenia. Podgrupa C. W niewielkiej liczbie nefronów obserwowano mierne wybarwioną reakcję na 5-N. Miejsca powracającej aktywności występowały zarówno w środkowej, jak i w przyrzedznej części kory.

Kwas dezoksyrybonukleinowy (DNA)

Zwierzęta kontrolne. Odczyn na ten kwas wystąpił na terenie karioplazmy w postaci grubych i drobnych ziarnistości. Były one ułożone przeważnie pod błoną jądrową (ryc. 8). Nie zauważono różnic w ich rozmieszczeniu i wyglądzie w poszczególnych czynnych odcinkach nefronów. W materiale pochodzącym ze zwierząt po laparatomii ziarenka Feulgen dodatnie przypominały DNA kontrolny.

Grupa I i II. Podgrupy A, B i C. Preparaty z tego okresu obserwacji przedstawiono razem, ponieważ nie różniły się one zasadniczo od siebie i od materiału porównawczego.

Grupa III. Podgrupa A. Zmieniło się rozmieszczenie części ziaren Feulgen dodatnich, ponieważ odsunęły się od błony jądrowej w strefę przyjąderkową. W porównaniu ze stanem po 3 godz. analiza skrawków w Podgrupach B i C nie wykazała różnic w rozmieszczeniu i wybarwieniu struktur Feulgen pozytywnych.

Grupa IV. Podgrupa A. W cewkach krętych I rzędu wybarwiono mniej ziarenek Feulgen dodatnich. Podgrupa B. Ułożenie DNA było nadal bardziej centralne, a barwliwość mniejsza. Podgrupa C. W cewkach krętych nefronów podtorebkowych obserwowano DNA zarówno w pobliżu jąderka, jak i pod błoną jądrową. Światło wielu cewek krętych I rzędu było szerokie, a dalsze odcinki nefronów miały niski nabłonek.

Kwas rybonukleinowy (RNA)

Zwierzęta kontrolne. Barwienie wg m. Bracheta dało intensywny odczyn w cytoplazmie i jąderkach komórek nabłonka cewek moczowych. W cytoplazmie RNA wybarwił się w postaci podobnych sobie drobnych licznych grudek (ryc. 9). Na preparatach ze zwierząt pozornie operowanych zauważono w kanalikach krętych I rzędu nierównomierne wybarwienie jąderek. Po trawieniu rybonukleazą odczyn pyroninochłonny zanikał.

Grupa I. Podgrupa A. W porównaniu ze szczurami, którym otwierano tylko jamę brzuszną, odczyn Bracheta w wąskim pasie tkanki nerkowej pod torebką były niezmienione. W komórkach pozostałych nefronów nastąpiło obniżenie odczynu pyroninochłonnego. W Podgrupie B utrzymywał się stan barwliwości taki jak poprzednio. Skrawki z Podgrupy C barwiły się jak w grupach porównawczych.

Grupa II. Podgrupa A. W komórkach nabłonka nefronów przyrządzonych obniżyły się odczynu pyroninochłonne. Działając rybonukleazą wytrawiono RNA zawarty w jąderkach i w cytoplazmie. Podgrupa B. Stan przedstawiony powyżej utrzymywał się nadal bez zmian. Podgrupa C. Uzyskane wyniki histochemiczne na RNA podobne były do preparatów kontrolnych.

Grupa III. Podgrupa A. Liczba drobnych ziarenek RNA zmalała (ryc. 10). Pojawiły się duże grudki tego kwasu, które wytrawiały się rybonukleazą. Podgrupy B i C. Opisywane zmiany w podgrupie A utrzymywały się po 6 i 9 godz.

Grupa IV. Podgrupa A. W nefronach przyrządzonych, a także i w środkowej części kory wystąpiły w ektoplazmie pojedyncze duże grudki RNA. W komórkach nabłonka cewek krętych I rzędu tych nefronów jąderka barwiły się nierównomiernie. Podgrupa B. Jąderka wybarwione wg m. Bracheta miały silniejszy odczyn w porównaniu z RNA cytoplazmatycznym. Ponadto RNA w cytoplazmie wytrawiał się rybonukleazą szybciej niż w jąderkach. Podgrupa C. W komórkach nabłonka sześciennego cewek głównych, które posiadały kilka jąderek wykazywały one różne nasilenie reakcji na RNA. W części tych cewek obserwowano nawet odczynu dyfuzyjne.

Polisacharydy

Zwierzęta kontrolne. Najsilniejszy odczyn PAS oporny na działanie diastazy występował w rąbku szczoteczkowym i w błonie podstawowej kanalików (ryc. 11). Po zablokowaniu dimedonem grup aldehydowych w komórkach nabłonka kanalików głównych pozostały ziarenka odpowiadające glikogenowi. Po laparatomii dał się zauważyć spadek stężenia substancji PAS dodatnich, o czym świadczyły mniej intensywne odczyny.

Grupa I. Podgrupa A. W obrębie rąbka szczoteczkowego wszystkich nefronów słabiej wybarwiały się substancje PAS pozytywne. W cytoplazmie natomiast ziarenka dające odczyn na glikogen zachowywały się jak w grupach kontrolnych. Podgrupa B. Po zastosowaniu diastazy i dimedonu stwierdzono, że elementy PAS dodatnie zachowywały się jak w podgrupie A. Podgrupa C. Odczyny barwne na glikogen były zbliżone do kontrolnych po operacji.

Grupa II. W podgrupach A, B, C zachowanie się substancji PAS pozytywnych i reakcji kontrolnych przypominały wyniki osiągnięte w grupie I.

Grupa III. Podgrupa A. W cytoplazmie komórek kanalików krętych uwidoczniły się tylko nieliczne ziarenka glikogenu. Rąbek szczoteczkowy dawał słabo dodatnie odczyny PAS. Podgrupa B. Odnosiło się wrażenie, że błona podstawowa kanalików głównych była również mniej aktywna. Podgrupa C. Intensywność odczynów na glikogen w rąbku szczoteczkowym, cytoplazmie i błonie podstawowej znacznie wzrosła i w okolicy podtorebkowej odpowiadała wartościom kontrolnym.

Grupa IV. Podgrupa A. W nefronach przyrządzonych reakcja PAS wypadła słabo dodatnio lub nawet ujemnie. Podgrupa B. Spadek aktywności elementów barwiących się odczynnikami Schiffa utrzymywał się nadal w strefie przyrządzonej. Kontrola po acetytacji była ujemna, a po acetylowaniu i zmydłaniu dodatnia. Podgrupa C. Zgrubiałe blaszki torebki Bowmana i błony podstawowe kanalików barwiły się słabo dodatnio odczynnikami Schiffa (ryc. 12). W cytoplazmie komórek nefronów środkowej części kory uwidoczniły się drobne ziarenka glikogenu, które po zablokowaniu innych cukrów dimedonem i trawieniu diastazą zanikały.

OMÓWIENIE WYNIKÓW I WNIOSKI

Badania wykonano na nerce lewej, ponieważ w niej są częstsze zatory, co tłumaczy się między innymi faktem, że t. nerkowa po tej stronie odchodzi od aorty pod kątem prostym. Wprowadzając grupy zwierząt pozornie operowanych można było obserwować wpływ laparatomii, działanie narkozy eterowej i stresu pooperacyjnego. Pozwoliło to na różni-

cowanie zmian spowodowanych samym niedokrwieniem i wpływem czasu na rekonstrukcję metabolizmu komórek nabłonka nefronów.

Fosfataza kwaśna jako enzym lizosomalny (Lojda i wsp. 1964) uczestniczy w procesach wewnętrznego trawienia substancji obcych przedostających się do komórki. Bierze ona również udział w fagocytozie wewnątrzkomórkowej starzejących się organelli. Być więc może, że zmniejszenie aktywności po 2 i 5 min. spowodowane było osłabieniem reakcji metabolicznych. Wydaje się, że w tym czasie komórki nabłonka kanalików krętych nie uległy jeszcze zmianom wstecznym. Sądzymy tak na tej podstawie, że po 9 godz. prawidłowego ukrwienia nerki odczynny na Fk wracały do poziomu kontrolnego. Pojawienie się Fk w rąbku szczoteczkowym kanalików krętych I rzędu grupy IV dowodzi upośledzenia procesów przemiany materii (Zawistowski i Roszkiewicz, 1967), które zostało spowodowane uszkodzeniem osłonki lizosomalnej (Wachstein, 1955). Pobudzenie procesów katabolicznych wskazuje na zaburzenie resorpcji zwrotnej (Pozorska, 1970) oraz uszkodzenie nabłonka kanalików głównych (Godlewski, 1962, Wolna, 1962).

Fosfataza zasadowa bierze udział w procesach twórczych i regeneracyjnych, w przemianach kwasów nukleinowych oraz umożliwia zwrotne wchłanianie w proksymalnym odcinku kanalik nerkowego. Jako enzym jest bardzo czuła na zmniejszenie poziomu glukozy we krwi. Dlatego też między innymi zmiany jej aktywności narastały z dłużej lub krócej trwającym niedokrwieniem. Ponadto spadek aktywności Fz pokrywał się w naszym doświadczeniu czasowo z procesem uwstecznienia rąbka szczoteczkowego, co miało miejsce szczególnie w grupie IV. W tym okresie eksperymentu utrzymywało się zmniejszenie aktywności Fz w rąbku szczoteczkowym, a w cytoplazmie pojawiły się pojedyncze ziarenka aktywne na ten enzym. Sądzymy, że przeszły one z rąbka do cytoplazmy drogą dyfuzji, co wskazuje na morfologiczne uszkodzenie komórki nabłonka kanalików.

Wewnątrzkomórkowa lokalizacja EN nie jest jeszcze w pełni wyjaśniona, choć Novikoff (1962) sugeruje, że znajduje się ona w lizosomach. Nie ulega jednak wątpliwości, że aktywność jej uwarunkowana jest, podobnie jak i innych enzymów, stanem morfologicznego podłoża (Miętkowski i Łukaszuk, 1967). Obniżona aktywność EN spowodowana 2 minutowym niedotlenieniem utrzymuje się jeszcze po 6 godz. Fakt ten wskazuje wg Marcephersona i Pearse'a (1965) na zmianę przemiany materii, przede wszystkim białkowej. Możemy więc sądzić, że głód tlenowy i brak dowozu glukozy trwający tylko 2 min. powoduje zachwianie się metabolizmu w nabłonku najbardziej czynnych odcinków nefronu.

Rola ATP-azy polega przede wszystkim na udziale w rozbiciu wiązań kwasu adenozynotrójfosforowego i wyzwoleniu dużej ilości energii potrzebnej komórce do przemian. Bierze ona udział nie tylko w gospodarce fosforem organicznym powstającym w nerce z rozkładu nukleotydów, ale również i w transporcie kwasu fosforowego przez błony komórkowe. W przebiegu doświadczenia aktywność ATP-azy zmieniała się znacznie i to zarówno w związku z czasem niedokrwienia, jak i okresem po udrożnieniu t. nerkowej. Ponadto zauważono, że stopień obniżenia aktywności uzależniony był od rozmieszczenia nefronów w korze nerki. Fejgin (1959) uważa, że ma to łączność ze zróżnicowaniem czynnościowym nefronów.

Pirofosfataza tiaminowa związana jest czynnościowo i strukturalnie z elementami aparatu Golgiego. Biorąc pod uwagę badania Grzyckiego (1951, 1953), który sądzi że struktury Golgiego są czynnie zaangażowane w metabolizmie komórek, uważamy, że we wszystkich grupach zmniejszone odczyny na TPP-azę wskazują na obniżenie funkcji życiowych komórek nabłonka. Zmianom tym towarzyszyła nie tylko redukcja liczby markerów, ale również ich przemieszczenie. Objawy te były szczególnie nasilone po 20 min. niedokrwienia i nie zanotowano tutaj powrotu do stanu wyjściowego nawet po 9 godz. od przywrócenia prawidłowego krążenia w nerce. W oparciu o nasze wyniki oraz badania Allena (1963) i Staszyc (1965) sądzimy, że nastąpiło bardzo poważne uszkodzenie systemu wydzielniczego komórek nabłonka cewek krętych I rzędu.

W przemianach biochemicznych strefy Golgiego oraz w syntezie nukleotydów bierze udział również 5-N (Schiebler i wsp., 1962). Zauważyliśmy, że różnice w aktywności na 5-N zależne są nie tylko od budowy czy wartości czynnościowych poszczególnych odcinków kanalików, ale również i od położenia nefronu.

Zróżnicowane odczyny cytochemiczne nerki są zarówno wyrazem złożonych czynności fizjologicznych nefronów, jak i ich unaczynienia. We wszystkich grupach doświadczalnych normalne lub prawie prawidłowe reakcje enzymatyczne na badane hydrolazy utrzymywały się w nefronach leżących w strefie podtorebkowej. Wyjaśnienie tego stanu wiązać można z faktem, że naczynia torebkowe pochodzące od tętnic nadnerczowych wnikają w korę i anastomozują tutaj z siecią naczyniową pochodzącą z naczyń doprowadzających, drugie zaś odprowadzających. Dlatego też najsilniejsze zmiany wystąpiły w strefie przyrdzennej, do której te połączenia prawie nie dochodzą. Również i powrót do wartości kontrolnych był szybszy w nefronach leżących pod torebką.

Zaistniałe zmiany w kwasach nukleinowych szczególnie wyraźne po 20 min. niedokrwienia sugerują o przesunięciach w metabolizmie jądra

komórkowego i cytoplazmy (Myśliński i wsp., 1966). Stan ten został wywołany nie tylko głodem tlenowym i wstrzymaniem dowozu ciał odżywczych, ale również gromadzeniem się w tkankach wytworów przemiany materii i substancji wydzielanych przez niedokrwioną nerkę.

Zmiany aktywności odczynów PAS w rąbku szczoteczkowym i błonie podstawowej kanalików krętych I rzędu nie przebiegały z podobnym nasileniem. Świadczyć to może nie tylko o odmiennym charakterze biochemicznym, ale również o nieco zróżnicowanej roli substancji PAS dodatnich w tych strukturach. W podgrupie C grupy IV błona podstawowa kanalików była zgrubiała, co wg Ginecińskiej i wsp. (1954) oraz Fricha i Sachsa (1961) wskazuje na zaburzenia w mikrometabolizmie oraz utrudnienia wymiany substancji między komórkami nabłonka nefronów a otaczającymi je naczyniami krwionośnymi.

Zwróciliśmy uwagę, że wrażliwość odcinków nefronu na brak krwi jest różna. Jak wynika z odczynów histochemicznych najmniej czułe są kłębki, gdzie odbywa się filtracja bierna, oraz kanaliki odprowadzające i zbiorcze. Zmianami enzymatycznymi zareagowała również tkanka łączna międzykanalikowa pełniąca, jak wiadomo, znaczną rolę w reabsorpcji. Z punktu widzenia cytofizjologii ciekawy jest wzrost aktywności na badane enzymy w nefronach leżących tuż pod torebką. Naszym zdaniem jest to reakcja obronna organizmu, bardzo indywidualna — osobnicza, mająca wyrównać straty spowodowane zaburzeniem funkcji nefronów anemizowanych. Można więc sądzić, że obserwowane zmiany cytochemiczne są spowodowane nie tylko czynnikami uprzednio omówionymi, ale również złożonych procesów przystosowania całego ustroju szczura.

Zestawiając wyniki badań stwierdzamy, że od chwili zadziałania bodźca anemizacji na komórkę do momentu wystąpienia zmian w jej mikrometabolizmie musi upłynąć pewien okres czasu. Zmiany histomorfologiczne cofają się z szybkością zależną od czasu trwania zamknięcia t. nerkowej i od okresu, jaki upłynął po przywróceniu jej drożności. W przyjętych warunkach doświadczalnych okres 10—20 minut uciśnięcia t. nerkowej okazał się dla szczurów wystarczająco długi, by doprowadzić wewnątrzkomórkowy metabolizm do przemian biochemicznych wskazujących na upośledzenie funkcji nefronów i zmian destrukcyjnych. Powrót do wartości kontrolnych zależy przede wszystkim od wczesnego usunięcia przeszkody. Krytycznym okresem dla szczurów jest 20 minutowa anemizacja, szczególnie dla nefronów przyrdzennych.

PIŚMIENNICTWO

1. Allen J. M.: J. Histochem. Cytochem., 11, 542—552, 1963.
2. Baron H. C.: J. A. M. A., 193, 663—672, 1965.
3. Berndt O.: Chirurg., 7, 318—326, 1963.
4. Bing J., Kazimierczak J.: Acta Pathol. et Microbiol. Scand. 1, 505—507, 1969.
5. Deterling R.: Ann. Surgery, 155, 283—289, 1962.
6. Fejgin M.: Choroby nerek w klinice chorób wewnętrznych. PZWL, Warszawa 1959.
7. Frisch M., Sachs H.: Virchows, Arch. Path. Anat., 334, 256—258, 1961.
8. Ginecinskij A. G., Broitman A. J., Iwanowa L. N.: Bjulet. Eksperim. Biologii i Medicyny, 38, 37—43, 1954.
9. Godlewski H.: Folia Morphol., 21, 433—448, 1962.
10. Grzycki S.: Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, sec. D., 6, 297—322, 1951.
11. Grzycki S.: Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, sec. D., 8, 193—231, 1953.
12. Lojda Z., Wecerek B., Pelichowa H.: Histochemie, 3, 428—454, 1964.
13. Marcperson O., Pearse A.: Brit. Med. Bull., 13, 19—26, 1957.
14. Miętkiewski K., Łukaszuk A.: Folia Morphol., 26, 1—13, 1967.
15. Myśliński A., Michalik T.: Folia Morphol., 25, 61—67, 1966.
16. Novikoff A.: Folia Morphol., 13, 257—281, 1962.
17. Pozorska D.: Pamiętnik V Zjazdu Nauk. Polskiego Tow. Anatomopat. 313—314, Katowice, 1970.
18. Schiebler T. H., Schumacher H. H.: Folia Morphol., 13, 289—304, 1962.
19. Staszyc J.: Polski Przegląd Radiol. i Med. Nuklearnej, 29, 265—290, 1965.
20. Staszyc J., Rzeszowska G.: Polski Przegląd Chirurgii, 41, 888—895, 1969.
21. Staszyc J., Rzeszowska G.: Polish Medical Journal, 10, 123—132, 1971.
22. Wachstein M.: Journ. Hist. and Cytochem., 3, 4—9, 1955.
23. Wolna E.: Post. Hig., 22, 215—221, 1962.
24. Zawistowski S., Roszkiewicz J.: Folia Morphol., 26, 315—324, 1967.

Otrzymano 15.III.1972

OBJAŚNIENIA DO RYCIN

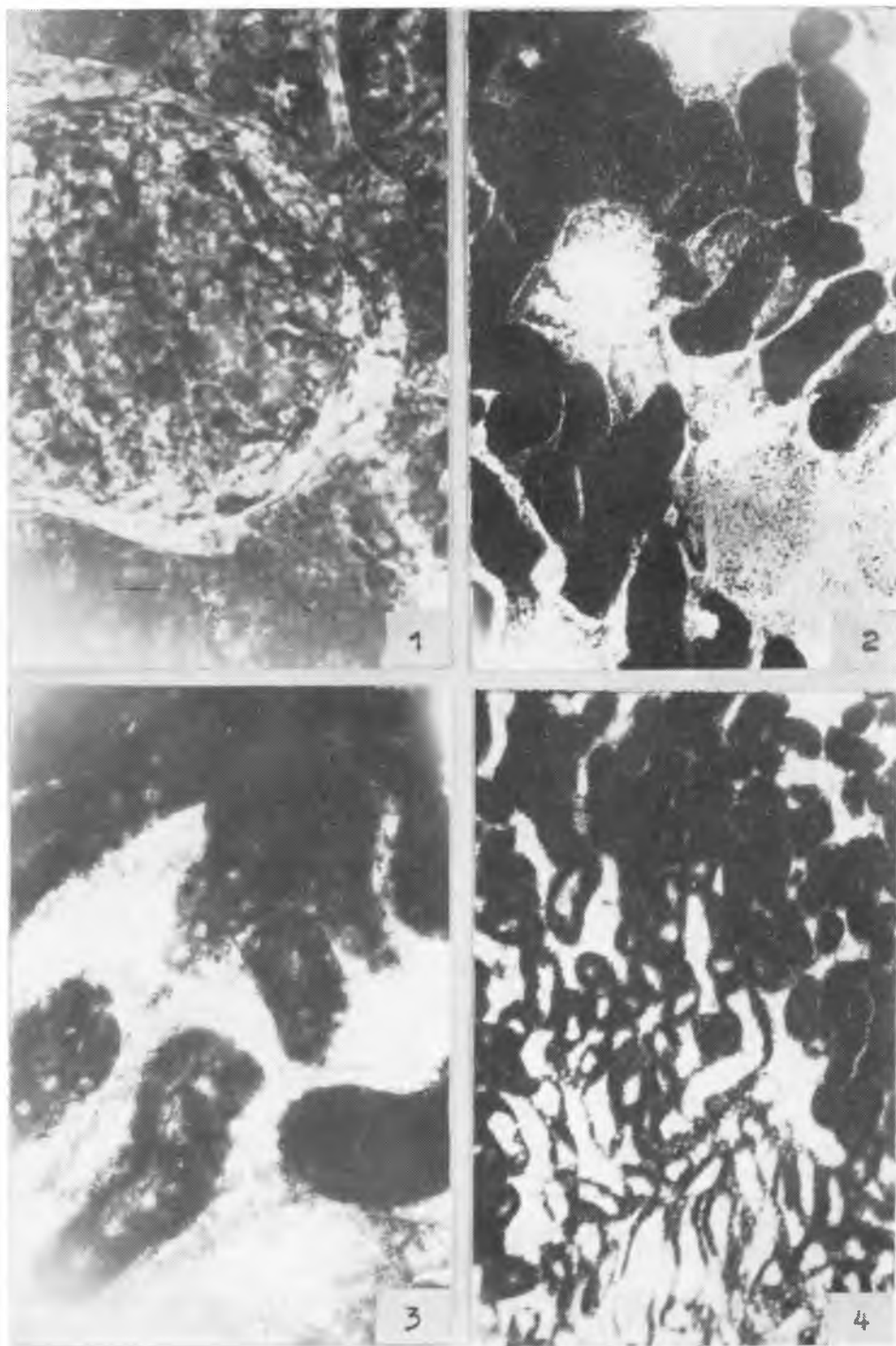
Ryc. 1. Grupa doświadczalna III. Podgrupa A. Odczyny na Fk. Metoda Gomoriego. Pow. ca 420 X.

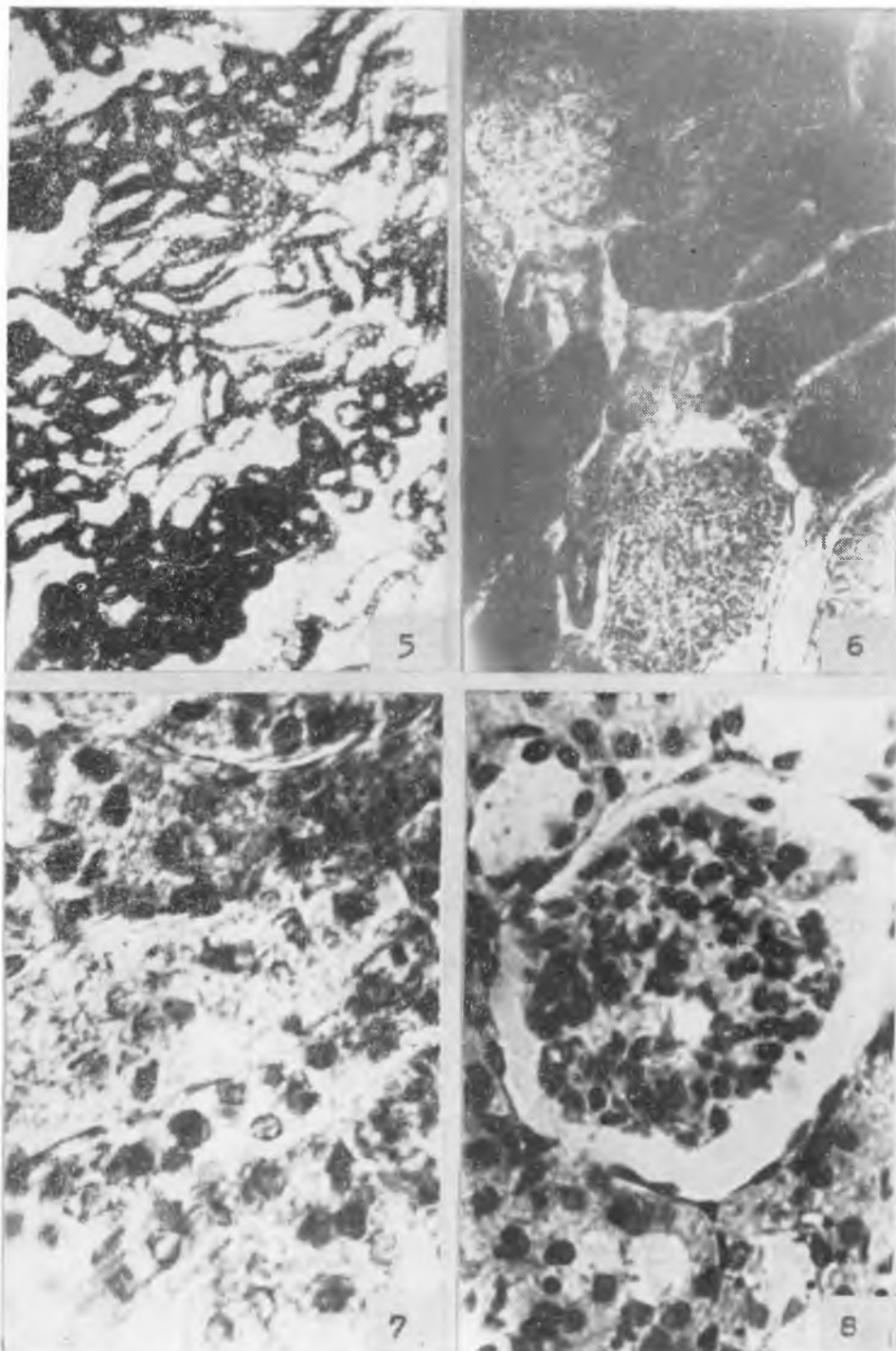
Ryc. 2. Grupa doświadczalna IV. Podgrupa C. Aktywność na Fk w kanałikach krętych. Metoda Gomoriego. Pow. ca 420 X.

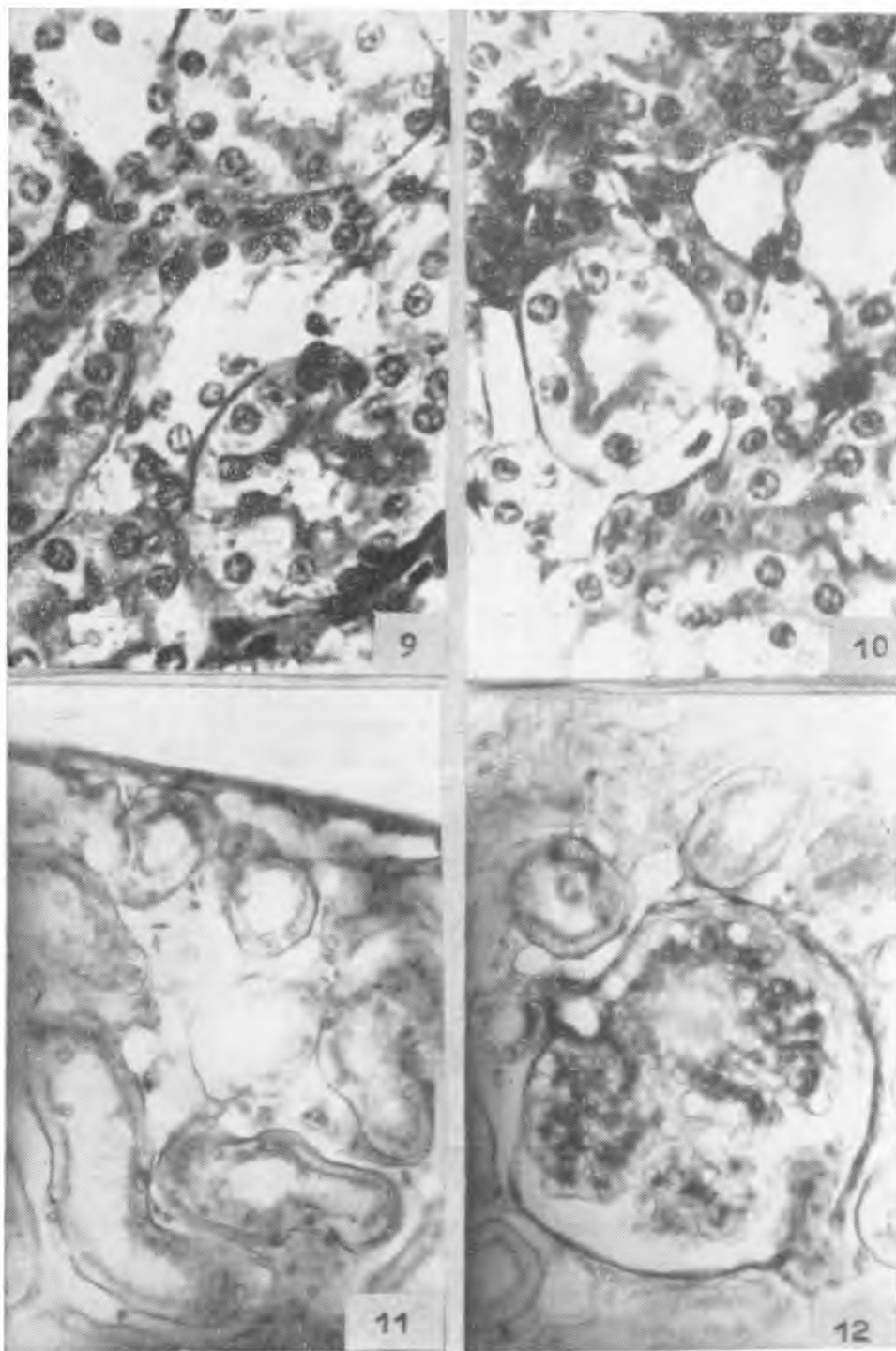
Ryc. 3. Grupa kontrolna. Aktywność na Fz w kanałikach krętych I rzędu. Metoda Gomoriego. Pow. ca 420 X.

Ryc. 4. Grupa doświadczalna III. Podgrupa A. Odczyny enzymatyczne na Fz w nefronach. Metoda Gomoriego. Pow. co 420 X.

Ryc. 5. Grupa doświadczalna IV. Podgrupa A. Nierównomierna aktywność na Fz w nefronach przyrdzennych. Metoda Gomoriego. Pow. ca 420 X.







Ryc. 6. Grupa kontrolna. Reakcja na ATP azę. Metoda Wachsteina i Meisel'a. pow. ca 420 X.

Ryc. 7. Grupa kontrolna. Aktywność TPP-azy w strefie przyjądrowej komórek. Metoda Novikoffa i Goldfishera. Pow. ca 420 X.

Ryc. 8. Grupa kontrolna. Wybarwiony DNA. Metoda Feulgena. Pow. ca 420 X.

Ryc. 9. Grupa kontrolna. Odczyn pyroninochłonny w cytoplazmie i jąderkach. Metoda Bracheta. Pow. ca 420 X.

Ryc. 10. Grupa doświadczalna III. Podgrupa A. Obniżenie odczynu na RNA. Metoda Bracheta. Pow. ca 420 X.

Ryc. 11. Grupa kontrolna. Pozytywne reakcje PAS. Metoda PAS z odczynnikiem Schiffa. Pow. ca 420 X.

Ryc. 12. Grupa doświadczalna IV. Podgrupa C. Obniżenie reakcji PAS Metoda PAS z odczynnikiem Schiffa. Pow. ca 420 X.

РЕЗЮМЕ

Автор накладывал лигатуру на артерию левой почки белой крысы на 2, 5, 10 и 20 минут. Материал для цитотопохимических исследований брался по истечении 3, 6 и 9 минут после снятия лигатуры.

В зависимости от продолжительности ишемии почки и от времени, прошедшего после снятия лигатуры, наблюдались изменения, произошедшие в активности энзиматических реакций на кислую и щелочную фосфатазы, неспецифические эстеразы, аденозинтрифосфатазу, тиаминовую пирофосфатазу, 5-нуклеотидазу, нуклеиновые кислоты и мукополисахариды.

Полученные результаты дают возможность предполагать, что критическим периодом является 20-минутная анемизация, особенно для нефронов спинномозговой области.

SUMMARY

The author secured the artery in the left kidney of a white rat for 2, 5, 10 and 20 minutes. Next after 3, 6 and 9 hour after the ligature, he collected substance for cytotopochemical tests.

Subject to the blood deficiency in the kidney and to the time which had lapsed since the ligation of the kidney artery, there were changes in the activity of enzyme reaction to, acid and alkaline phosphatases, unspecified esterase, adenosinetriphosphate, thiamine pyrophosphate, 5-nucleotidase, nucleic acids and mucopolysaccharides.

On the basis of received results, it is presumed that the crucial period, is that of the twenty minute exsanguination, especially for the nephrons near the medullar.

EXPLANATIONS OF FIGURES

Fig. 1. Research Group III. Subgroup A. Reaction to acid phosphatases. Gomori's method. Surface about 420 X.

Fig. 2. Research Group IV. Subgroup C. Activity of acid phosphatases in the spiral tubules. Gomori's method. Surface about 420 X.

Fig. 3. Control Group. Activity of acid phosphatases in the I line of spiral tubules. Gomori's method. Surface about 420 X.

Fig. 4. Research Group III. Subgroup A. Enzyme reaction to alkaline phosphatases in the nephrons. Gomori's method. Surface about 420 X.

Fig. 5. Research Group IV. Irregular activity to alkaline phosphatases in the nephrons near the medulla. Gomori's method. Surface about 420 X.

Fig. 6. Control Group. Reaction to ATP. Wachstein's and Meisel's method. Surface about 420 X.

Fig. 7. Control Group. Activity of TPP in the region of the testis cells. Novikoff's and Goldfischer's method. Surface about 420 X.

Fig. 8. Control Group. Coloured DNA. Feulgen's method. ca 420 X.

Fig. 8. Control Group. Coloured DNA. Feulgen's method. Surface about 420 X.

Fig. 9. Control Group. Pyronine absorbing action in the cytoplasm and testis. Brachet's method. Surface about 420 X.

Fig. 10. Research Group III. Subgroup A. Reaction decrease to RNA. Brachet's method. Surface about 420 X.

Fig. 11. Control Group. PAS positive reaction. PAS method with Schiff's reagent ca 420 X.

Fig. 12. Research Group IV. Subgroup C. Decrease in PAS reaction. PAS method with Schiff's reagent. ca 420 X.