

ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN — POLONIA

VOL. XVI, 7

SECTIO D

1961

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

Kierownik: prof. dr med. Stanisław Grzycki

Zbigniew FRELEK

**Chromatograficzne i histochemiczne badania pierwiastków metalicznych
wątroby**

**Хроматографические и гистохимические исследования по
содержанию химических металлоэлементов в печени**

**Chromatographical and Histochemical Studies on Metallic Elements
in the Liver**

Badania składu chemicznego narządów zwierzęcych najszybciej i w największym zakresie rozwijały się w kierunku oznaczania substancji organicznych. Literatura ostatnich lat także dotyczy rozdziału i oznaczania związków organicznych w materiale biologicznym. Niebrójski (1958) badał chromatograficznie hormony sterydowe jądra, jajnika i kory nadnercza. Oznaczaniem jonów metalicznych w różnych tkankach, narządach i płynach ustrojowych zajmowali się, jak pisał Homolka (1958): Korinek (1954), King (1946), Pincussen (1950), Lockhead (1951) Biering (1944), Orange (1951) i Venture (1954). Wszyscy oni posługiwali się metodami oznaczeń kolorymetrycznych i objętościowych. Chromatograficznym rozdzielaniem jonów metalicznych w materiale biologicznym zajmował się Gordon (1955), który badał wapń, magnez, potas i sód we krwi. Raczkowski (1954) przeprowadził rozdział żelaza, miedzi, kobaltu, manganu i niklu przy zastosowaniu jako płynu rozwijającego roztworu o składzie: metylo-n-propyloketon-aceton-kwas solny stężony (80:10:10). Bukowska (1958) zaś oznaczała chromatograficznie żelazo, cynę i ołów w konserwach rybnych. Nie spotkaliśmy dotąd prac dotyczących badań chromatograficznych składu mineralnego narządów zwierzęcych.

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na wątrobach psa, królika i szczura. 50 g wątroby pobranej natychmiast po zabiciu zwierzęcia przepłukiwano wodą destylowaną, podsuszano na bibule i po pokrojeniu ostrożnie odwadniano na parownicy. Po całkowitym odwodnieniu i zwęgleniu suchą pozostałość rozcierano w moździerzu. Sproszkowaną substancję powoli spalano, prażąc przez kilka godzin w tempera-

turze 600—700°C. Do uzyskanego popiołu po ostudzeniu dodawano 2—3 ml kwasu solnego stężonego i gotowano około 10 min. Roztwór oddzielano od osadu na wirowce przy 3000 obr./min. Po odwirowaniu otrzymano około 1 ml przejrzystego żółtozielonego płynu, który służył jako roztwór podstawowy do rozdzielania chromatograficznego.

Po wypróbowaniu kilku płynów rozwijających zastosowano ostatecznie roztwór o składzie: n—butanol-aceton-kwas solny stężony (50:30:20), który nadawał się tylko do jednorazowego użycia, gdyż czerniał i zmieniał własności. Chromatogramy rozwijano na bibule chromatograficznej Whatman Nr 3, którą cięto na paski 3 cm szerokie i 23,25 cm długie. Przeznaczony do badania roztwór podstawowy nakrapiano na wysokości około 1,5 cm mierzonej od linii zanurzenia bibuły do płynu rozwijającego. Wielkość plamek wynosiła około 1 cm średnicy. Chromatogramy rozwijano w atmosferze nasyconej parą wodną (na dno komory wlewano nieco wody) w komorach dużych, w których mieściły się 3—4 paski bibuły, bądź w komorach małych na 1 pasek. Na dno komory stawiano naczynka z płynem rozwijającym. Każda komora zamknięta była od góry korkiem. W korku umieszczony był drut zakończony haczykiem, służącym do zawieszania bibuły. Głębokość zanurzenia paska w roztworze rozwijającym regulowano podciąganiem lub opuszczaniem drutu znajdującego się w korku. Czas rozwijania chromatogramów techniką wstępującą wynosił około 5—6 godzin. Czoło wędrowało w tym czasie około 19 cm. Po rozwinięciu chromatografowanej substancji paski suszono na powietrzu i wywoływano w następujących płynach:

- 1) ditazon (0,02% roztwór w czterochlorku węgla),
- 2) rubeanowódór (0,1% roztwór w alkoholu),
- 3) uranylocynkowy octan (nasycony roztwór w 1 n kwasie octowym),
- 4) sześćoazotynokobaltan sodu (5% roztwór w wodzie),
- 5) magnezon (0,01% roztwór w 2 n wodorotlenku sodu),
- 6) żelazocyjanek potasowy (10% roztwór w wodzie),
- 7) roztwory 0,1% nadmanganianu potasowego i 1% szczawianu amonowego.

Materiał przeznaczony do badań histochemicznych utrwalano w alkoholu absolutnym i po odwodnieniu zatapiano w parafinie. Skrawki mikrotomowe 10—20 μ po odparafinowaniu uwadniają i poddawano działaniu:

- 1) azotanu srebra wg metody von Kossa (1901) w celu wykrycia wapnia,
- 2) sześćoazotynokobaltanu sodu i żółtego siarczku amonowego wg metody Marza (1934) podanej przez Lisona (1953) dla wykrycia potasu.
- 3) żelazocyjanek potasowy wg metody histochemicznej na żelazo podanej przez Bagińskiego (1951).

BADANIA WŁASNE

Po wywołaniu na chromatogramach rozwiniętych roztworem o składzie: n—butanol-aceton-kwas solny stężony (50:30:20) obserwowano obecność trzech grup (a, b, c) plamek przedstawionych na ryc. 1.

I.

a) W grupie pierwszej ($R_f = 0—0,2$) wykryto następujące metale:

W a p. n. Paski z rozwiniętym chromatogramem zanurzano w roztworze szczawianu amonowego, wypłukiwano nadmiar odczynnika wodą

i spryskiwano roztworem nadmanganianu potasowego. Powstawała jasna plama na brązowym tle.

M a g n e z. Paski z rozwiniętym chromatogramem umieszczano w roztworze magnezonu w wodorotlenku sodu. W obecności magnezu powstawała niebieska plama soli kompleksowej.

S ó d. Po spryskaniu paska roztworem octanu uranylocynkowego powstawał octan uranylocynkowsodowy dający zielonkawą plamę w świetle UV.

P o t a s. Paski z rozwiniętym chromatogramem zanurzano w roztworze sześćoazotynokobaltanu sodu. Następnie po wypłukaniu wodą nadmiaru odczynnika pozostawała żółta plama sześćoazotynokobaltanu sodowopotasowego.

b) W grupie drugiej ($R_f = 0,5$) otrzymano plamę tylko pod wpływem roztworu rubeanowodoru. Plama ta była zabarwiona na kolor szaroliwkowy. Po przeprowadzeniu prób kontrolnych (na pasek bibuły nakrapiano roztwór chlorku miedziowego, chromatogram rozwijano i wywoływano) nasunęło się przypuszczenie, że była to miedź. Plama ta występowała tylko na chromatogramach pochodzących z wątroby psa.

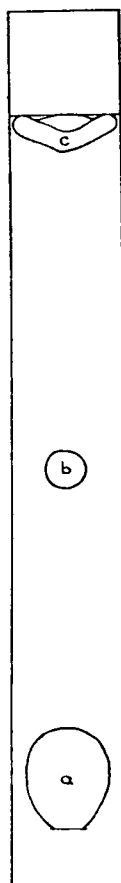
c) W grupie trzeciej ($R_f = 0,9-1$) wykryto:

Ż e l a z o. Po zwilżeniu paska wodnym roztworem żelazocyjanku potasowego, powstawało niebieskie zabarwienie żelazocyjanku żelazowego.

C y n k. W celu wykrycia cynku pasek spryskiwano roztworem ditiononu w czterochlorku węgla. Powstawała czerwona plama soli kompleksowej ditiononu z cynkiem.

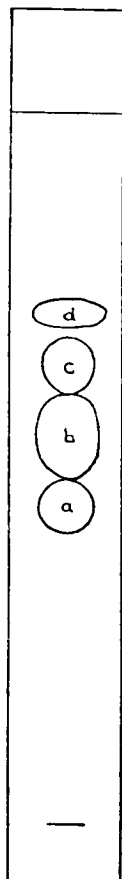
II.

Następnie kilka pasków po rozwinięciu chromatogramu i wysuszeniu pocięto na kawałki i przebadano te, które odpowiadały pierwszej plamce (a). Spopielono je, popiół rozpuszczono w 1 ml kwasu solnego stężonego i chromatogram rozwijano roztworem składającym się z etanolu 96% i kwasu octowego 2 n (80:20). Rozwinięte chromatogramy wywoływano substancjami charakterystycznymi dla kationów znajdujących się w pierwszej plamce. Wywołane plamki ułożyły się w sposób podany na ryc. 2, przy czym najwolniej wędrował p o t a s, następnie s ó d, w a p ń, a najszybciej m a g n e z. Obecność wykrytych metali potwierdzona była próbami kontrolnymi (na poszczególne paski bibuły nakrapiano roztwory czystych soli badanych metali, chromatogramy rozwijano i wywoływano).



Ryc. 1. Chromatogram uzyskany za pomocą roztworu rozwijającego o składzie: n-butanol-aceton-kwas solny stężony (50:30:20); a — pierwsza grupa metali (Ca, Na, K, Mg), b — druga grupa metali (Cu), c — trzecia grupa metali (Fe, Zn)

Chromatogram obtained with the use of the developing solution: n-butanol-acetone-concentrated hydrochloric acid (50:30:20); a — first group of metals (Ca, Na, K, Mg), b — second group of metals (Cu), c — third group of metals (Fe, Zn)



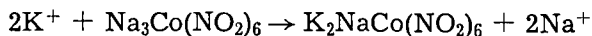
Ryc. 2. Chromatogram uzyskany za pomocą roztworu rozwijającego o składzie: etanol 96% — 2n kwas octowy (80:20); a — potas, b — sód, c — wapń d — magnez

Chromatogram obtained with the use of the developing solution: ethanol 96% — 2n acetic acid (80:20); a — potassium, b — sodium, c — calcium, d — magnesium

III.

Obecność kationów występujących w komórkach wątrobowych można było potwierdzić również na skrawkach mikrotomowych po zastosowaniu metod histochemicznych. Obserwacje przeprowadzono na komórkach wątrobowych psa.

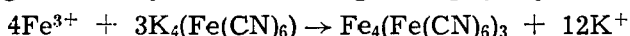
P o t a s. Skrawki wątrobowe utrwalone w alkoholu barwiono wg metody M a r z a (1934). Można było obserwować intensywne wyczerzenie powstałe w wyniku reakcji:



Otrzymany w ten sposób sześćoazotynokobaltan potasowosodowy był osadem barwy żółtej, jednak słabo w mikroskopie widocznym. W celu uzyskania lepszych wyników kobalt z $K_2NaCo(NO_2)_6$ przeprowadzano za pomocą żółtego siarczku amonowego w czarny CoS, który był dobrze widoczny. Odczyn ten obejmował cały przekrój komórek wątrobowych.

W obrębie cytoplazmy można było spotkać dość liczne drobne ziarenka siarczku kobaltu. Największą intensywność odczynu zaobserwowano na obszarze jądra komórkowego, które w całości przyjmowało zabarwienie ciemnobrunatne lub czarne. Zabarcwienie to w większości wypadków maskowało jąderka. Tylko w nielicznych jądrach komórek wątrobowych widoczne były błyszczące jąderka w liczbie jedno do kilku. W przestrzeniach międzybeleczkowych zrazików wątroby występowało intensywnie czarne zabarcwienie.

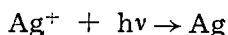
Żelazo. Skrawki utrwalone w alkoholu wkładano na 24 godz. do 3% roztworu kwasu azotowego w alkoholu 95% o temperaturze 35°C. Czynność ta była konieczna do uwolnienia żelaza związanego w kompleksach organicznych „żelaza ukrytego”. Następnie skrawki barwiono w ciągu 5 min. w roztworze 1,5% żelazocyjanku potasowego i 0,5% kwasu solnego w równych ilościach wg następującej reakcji.



Niebieskie zabarcwienie obserwowano na całym przekroju komórek wątrobowych. W obrębie cytoplazmy występowały niebieskie ziarenka żelazocyjanku żelazowego-błękitu berlińskiego. Najintensywniej zabarcwione były jądra komórkowe. Jąderka reakcji barwnej nie dawały. Zabarcwienie było trwałe i po odwodnieniu i zamknięciu w balsamie kanadyjskim utrzymywało się dłuższy czas. Przeprowadzone próby barwienia rodankiem potasowym w celu otrzymania czerwonego rodanku żelazowego pozwoliły uzyskać reakcję dodatnią, jednak zabarcwienie zniknęło bardzo szybko. Wyżej uzyskane wyniki zabarczania żelaza żelazocyjankiem potasowym i rodankiem potasowym potwierdziły badania Grzyckiego (1946), który między innymi wykrywał żelazo w komórkach wątrobowych królika białego. Słabszą reakcję na żelazo można było obserwować w środkowych częściach zrazików wątroby, a najslabszą w okolicy żyły środkowej. W komórkach układu siateczkowo-śródbłonkowego wątroby odczyn ten był zawsze intensywniejszy niż w komórkach mięsżowych.

Wapń. Do wykrywania wapnia w komórkach wątrobowych ślimaka Grzyckiej i Królikowska (1956) stosowali metodę von Kossa (1901), uzyskując wyczernienie bezbarwnych ziarenek występujących w cytoplazmie. Podobne wyczernienie ziarenek obserwowano w komórkach wątrobowych psa. Zastosowanie metody von Kossa (1901) w celu wykazania obecności związków wapnia w komórce wątrobowej psa pozwoliło przekonać się, że wykrywany wapń rozmieszczony był w dość charakterystyczny sposób. We wszystkich komórkach wątrobowych znajdowały się liczne ziarna srebra, powstałe w wyniku zastąpienia wapnia w związkach, a głównie w kwaśnym fosforanie wapnia. W warunkach reakcji mógł powstawać fosforan srebra, który jest trudniej rozpuszczalny od fosforanu wapnia. Następnie na świetle w wyniku reakcji

fotokemicznej srebro zredukowane do postaci metalicznej występowało jako czarne, drobne ziarenka.



Ziarna te zawsze rozmieszczały się na jednym z biegunów komórki wątrobowej. Na pozostałym obszarze cytoplazmy nie można było ich obserwować. Drobne i nieliczne ziarna występowały również na terenie jądra komórkowego. Biegunowe rozmieszczenie soli wapnia w komórce wątroby mogło być prawdopodobnie wynikiem polaryzacji czynnościowej tych komórek lub też, co jest mniej prawdopodobne, wynikiem przesunięcia jonów w czasie utrwalania.

OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ

Użycie metody chromatograficznego rozdzielania jonów metalicznych wątroby różnych zwierząt umożliwiło w pierwszej fazie naszych badań wykazanie obecności szeregu metali występujących w tym gruczole. Metoda ta pozwoliła wykazać istnienie różnych kationów zachowujących się odmiennie pod względem ich rozmieszczenia na chromatogramie. W naszych badaniach wartości R_f dla poszczególnych metali wynoszą:

1. Przy zastosowaniu roztworu rozwijającego o składzie: n-butanol-aceton-kwas solny stężony (50:30:20):

R_f	Metale
0—0,2	K, Na, Ca, Mg
0,5	Cu
0,9—1	Fe, Zn

2. Przy zastosowaniu roztworu rozwijającego o składzie: etanol 96% — 2n kwas octowy (80:20):

R_f	Metale
0,46	K
0,55	Na
0,66	Ca
0,73	Mg

Te same wyniki prawdopodobnie można byłoby osiągnąć stosując chromatografię dwukierunkową. Najpierw rozwijać w roztworze butanol-aceton-kwas solny stężony (50:30:20), a następnie po wysuszeniu i obróceniu bibuły o 90° w roztworze etanol 96% — 2n kwas octowy (80:20).

Metoda chromatograficznego rozdzielania jonów metalicznych wymagała użycia odpowiednich roztworów rozwijających i substancji wywołujących ze względu na różną granicę czułości oraz stężenie badanych metali. W wątrobie psa można było wykazać poza potasem, sodem, wapniem, magnezem, żelazem i cynkiem również i miedź, której nie udało się stwierdzić w wątrobie szczura i królika. Można było sądzić, że badane przez nas psy zawierały większy

procent miedzi w wątrobie od wątroby królika i szczura, wystarczający do utworzenia w naszych warunkach doświadczenia widocznej plamy z roztworem rubeanowodoru.

Zastosowanie odczynów histochemicznych na potas wg metody Marza (1934), na wapń wg metody von Kossa (1901), na żelazo wg metody podanej przez Bagińskiego (1951) pozwoliło potwierdzić obecność oraz przeanalizować rozmieszczenie wyżej wymienionych metali w komórkach wątrobowych. Zastosowanie metody chromatograficznej i histochemicznej dało wyniki zgodne w obu przypadkach. Potwierdzenie obecności poszczególnych metali przez obie metody pozwoliło na wzajemną kontrolę i uzyskanie wyników rzeczywistych.

PIŚMIENNICTWO

1. Bagiński S.: Technika Histologiczna. PZWL, Warszawa 1958, 114.
2. Bukowska H, Jaworska D.: Fe, Sn, Pb w konserwach rybnych. Przemysł Rolny i Spożywczy. 7, 215, 1953.
3. Gordon H. T., Hewel C. A.: Paper Chromatography of Alkali and Alkaline Earth Cations. Analytical Chemistry. 27, 1471—1474, 1955.
4. Grzycki St.: Histochemiczne metody wykrywania żelaza w komórkach. Med. Wet. 7, 299—300, 1946.
5. Grzycki St., Królikowska I.: Glikogen, kwas dezoksyrybonukleinowy i sole wapnia w komórkach gruczołu wątrobowego ślimaka (*Helix pomatia* L.) Ann Univ. Mariae Curie-Skłodowska. Sec. D. 12, 153—159, 1956.
6. Homolka J.: Diagnostyka Biochemiczna. PZWL, Warszawa 1958, 61—79, 301—312.
7. Von Kossa: Nachweis von Kalk. Zieglers Beitr. 29, 163, 1901.
8. Lison L.: Histochemie et Cytochemie Animales. Gauthier-Villars, Paris 1953, 154.
9. Niebrój T.: Badania chromatograficzne nad rozmieszczeniem hormonów sterydowych w jądrze, jajniku i korze nadnercza. Endokrynol. Pol. 3, 111—124, 1958.
10. Raczinskij W., Gapon T. B.: Chromatografija w biologii. Izdat. Akad. Nauk SSSR. Moskwa. 1953, 172.

РЕЗЮМЕ

Автором при помощи хроматографического метода обнаружено наличие калия, натрия, железа, калиция, магния, цинка и меди в печени собаки, кролика и крысы. Применяя для проявления хроматограммы смесь растворителей: n-бутанол — ацетон — концентрированная соляная кислота (50:30:20), автор обнаружил три группы металлов: а) в состав первой группы с Rf 0—0,2 вошли Ca, Na, K, Mg, б) во второй группе с Rf 0,5 была обнаружена медь,

которую в условиях опыта удалось обнаружить лишь в печени собаки, в) в третьей группе с R_f 0,9—1 обнаружено железо и цинк.

При применении смеси растворителей: этанол 96% — 2n уксусная кислота (80:20), металлы, входящие в состав группы а (рис. 1) расположились на хроматограмме следующим образом: R_f 0,46 — калий; R_f 0,55 — натрий; R_f 0,66 — кальций; R_f 0,73 — магний.

Гистохимически были обследованы микротомовые срезы толщиной 10—20 μ из печени собаки для выявления кальция по методу von Косса (1901), калия — по методу Марца (1934) и железа по методу, разработанному Багинским (1951).

Полученные результаты подтвердили наличие, а также позволили проанализировать размещение вышеупомянутых металлов в печеночных клетках. Применение хроматографического и гистохимического методов дало результаты сходные в обоих случаях. Подтверждение наличия отдельных металлов обоими методами дает возможность проводить самоконтроль и получить вполне достоверные результаты.

Рис. 1. Хроматограмма, полученная при применении смеси растворителей: n-бутанол, — ацетон — концентрированная соляная кислота (50:30:20), а — первая группа металлов (Ca, Na, K, Mg), б — вторая группа металлов (Cu), с — третья группа металлов (Fe, Zn)

Рис. 2. Хроматограмма, полученная при применении смеси растворителей: этанол 96% — 2n уксусная кислота (80:20), а — калий, б — натрий, с — кальций, д — магний

S U M M A R Y

The purpose of the present investigations was to demonstrate by a chromatographic way the presence of potassium, sodium, iron, calcium, magnesium, zinc and copper in the livers of dogs, rabbits and rats. Using the following developing system: n-butanol-acetone-concentrated hydrochloric acid (50:30:20), the author demonstrated three groups of metals: a) in the first group, characterized by $R_f = 0-0.2$, Ca, Na, K and Mg were present; b) in the second group of $R_f = 0.5$ copper was present, which under the conditions of the present experiments could be found in the liver of the dog only; c) in the third group of $R_f = 0.9-1$ iron and zinc were demonstrated.

With the use of the developing solution composed of ethanol 96% and 2n acetic acid (80:20), chromatographic distribution of the metals belonging to group a (Fig. 1) was as follows:

- Rf 0.46 — potassium
- Rf 0.55 — sodium
- Rf 0.66 — calcium
- Rf 0.73 — magnesium.

Histochemical examination of microtome sections 10—12 μ thick of the dog liver were aimed at demonstrating calcium by the von Koss method (1901), potassium by the Marz method (1934), and iron according to the method given by Bagiński (1951).

The results confirmed the presence of the metals mentioned above and made it possible to analyse their distribution in the liver cells.

The results obtained by the chromatographic and histochemical methods were compatible. Thanks to the confirmation of the presence of the separate metals by both methods, it was possible to compare and verify the results.

