

Stefan DUBAS

**The Effect of Cobalt Salts on the Nucleoli of Hepatic Cells
(Investigations Conducted by Phase Contrast Illumination)**

**Wpływ soli kobaltu na jąderka komórek wątrobowych
(Badania w mikroskopie fazowo-kontrastowym)**

**Влияние солей кобальта на ядрышка печеночных клеток
(Исследования в фазовоконтрастном микроскопе)**

The structure of nucleoli, especially their activity in the glandular cells, has been investigated by many authors. Bernhard and co-workers (1954, 1955) conducting their research with the aid of electron microscopy, described the structure of the nucleoli in various cells and on the basis of the pictures obtained drew some conclusions as to their physiological role. Caspersson (1950) worked on the physiology of this organoid and Miętkiewski and Kozik (1959), conducting their research on the neurosecretion of the supraorbital and paraventricular nuclei in the domestic cat, were of the opinion that the nucleolus takes an active part in secretory processes in the nerve cell. Niebrój (1959), however, using cobalt salts in his investigations on the histophysiology of the neurosecretory nuclei of the hypothalamus in a guinea pig, showed both quantitative increase in the number of the nucleoli as well as morphological changes. The investigations on the effect of cobalt salts on cells, especially on glandular cells, show that the latter have a marked chemical affinity to cell proteins (Bass, Zizuma 1956).

The investigations conducted up to date led us to believe that the administration of cobalt compounds to experimental animals produces in the cells of organs substantial cytological and physiological changes, affects the composition of metabolic ferments in the cell and considerably decreases the amount of active -SH and -S-S- groups in the

amino-acids and cellular proteins. Moreover, it affects considerably the metabolism of the lipids and lipoids in the hepatic cell.

Bearing this last in mind we thought it useful to investigate the effect of cobalt salts on the morphology and physiology of the nucleolus in the hepatic cell.

MATERIAL AND METHODS

Histological investigations were conducted on the hepatic cells of 60 albino rats (*Rattus rattus* L. *albino*). The experimental animals were given per os cobaltous acetate — $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Co}$, cobaltous chloride — CoCl_2 , cobaltous nitrate — $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$, mixed with food, at the rate of 15 mg of cobalt per day, for 3 months. Hepatic sections were fixed in Schaffer's solution (alcohol + formol), closed in paraffin and cut into microtomic slices of 2—4 microns in thickness. The sections were deparaffinized and viewed unstained in transmitted light under a C. Zeiss phase contrast microscope „Lumipan”, using immersion objective Ph 90/1.25 and immersion oil $n_D = 1.515$ (20°C). The nucleolus was clearly visible after mounting the unstained sections in media of known RI i. e. benzene (RI = 1.4983) and di-methylaniline (RI = 1.5569). Control sections of nucleoli were obtained by staining them with eosine-hematoxylin.

RESULTS

Thin hepatic sections (2—4 microns), after being deparaffinized in p-xylene, dried and mounted in di-methylaniline (RI = 1.5569), were examined by phase-contrast microscopy. The nucleoli appeared on these sections as large, bright and glistening masses, more or less round in shape, with an optically uniform and structureless interior. From the surface of the nucleoli there were propagated processus of various thicknesses and of the same refractive index as the nucleolus itself. As the nucleolus and its processus were brighter than the background, they distinctly contrasted with the surrounding nucleoplasm (Figs. 1, 2, 3, 4). Thus the former gave phase negative pictures, the latter phase positive. Nuclear membrane and fundamental protoplasm also produced phase negative pictures.

In the hepatic cells of the control animals the nucleoli occurred singly, being mostly situated in the centre of the nucleus. Their contours were regular and it was very seldom that fine striations, radiating from the nucleolus into the nucleoplasm, could be observed, they were never attached to the nuclear membrane.

In the hepatic sections of the experimental animals 2—3 nucleoli of various sizes could usually be seen, situated in the vicinity of the

nuclear membrane. If, however, only one nucleolus could be observed, it was always much bigger than those observed in the control sections, and its position in the nucleus was eccentric (Figs. 3, 8). The surface of the nucleoli was always uneven. From the surface there ran coarse and fine filiform structures and striae which in their course within the nucleus became thicker or thinner and were nearly always attached to the nuclear membrane. At the place of this attachment the membrane was considerably thickened on the nucleoplasmatic side (Figs. 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8). Very often these filiform structures running within the nucleoplasm produce a network which, by means of distinct swelling, is connected at the periphery to the nuclear membrane (Figs. 3, 4, 7). In some sections there could be observed a network of a nucleolar substance covering the whole nuclear field and which was of the same refractive index as the nucleolus and nuclear membrane. However, owing to its very fine structure the intensity of the negative phase was less than the intensity of the nucleolus and its thick processus. Nevertheless the network sharply contrasted with the positive phase of the nucleoplasm.

If the nucleolus was close enough to the nuclear membrane, its processus were arranged in a characteristic manner. The whole surface of the nucleolus, directed towards the nuclear membrane, propagated very numerous and fine processus in this direction. This gave the impression of a broad diffusion zone between the nucleolus and the nuclear membrane. Most of the surface, directed towards the centre of the nucleus, was completely void of any processus (Figs. 2, 4, 6).

In the negative contrast pictures there could be observed throughout the nucleus club-like, conical, pyramidal and spherical structures of nucleolar origin and in close contact with the nuclear membrane (Figs. 4, 6). It should be stressed that the nuclear membrane zone is much wider, especially in the vicinity of the nucleoli or their processus.

The embedding of sections in benzene (RI = 1.4983) brought about an inversion of the phase contrast, hence the nucleolus, its processus, the nuclear membrane and the fundamental protoplasm appeared in a positive phase, whereas the nucleoplasm appeared in a negative phase (Figs. 5, 6, 7, 8). Phase positive pictures of the nucleolus and their processus after embedding the sections in benzene do not show, morphologically, any perceptible difference with regard to the negative phase pictures; however, owing to the not fully negative phase of the nucleoplasm, they are less readable.

DISCUSSION

Miętkiewski & Kozik connect the occurrence of the nucleolar processus with the secretory activity of the nucleolus. Caspers-

son is of opinion that the nucleolus produces a substance responsible for basic reaction of the protoplasm, but gives, however, no explanation as to how it is transported from the nucleolus to the protoplasm.

Sjöstrand and Bernhard confirm that the hepatic nucleoli are of striated and filiform structure. Our investigations, in which an increase in the number of the nucleoli and their hyperplasia was observed, enabled us to assume that cobalt salts induce the nucleolus to an increased synthesis of the nucleolus — derivative bodies.

The variability in the size, shape and site of the nucleoli, influenced as they are by the cobalt salts, accounts for the intensified excretory activity. The presumed participation of this organoid in the production of the secretion has already been stressed by Bernhard, Miętkiewski & Kozik, Niebrój and others.

The presence of a large amount of nucleolar substance in the territory of the nucleus deserves special mention. This substance can be seen most often in the form of a spatial network or coarse striations connecting the nucleolus with the nuclear membrane. A large amount of this substance may be found in the club-like, conical, pyramidal and spherical structures in the cellular nucleus as well as in the zone of the nuclear membrane.

The occurrence of processes and of a network connecting the nucleolus with nuclear membrane suggests that the nucleolar substances pass to the protoplasm through the nucleus.

This observation seems to be justified, for the nucleolus and its processus, the nuclear membrane zone and the fundamental substances, possess the same, or nearly the same, refraction index in the phase-contrast illumination.

EXPLANATIONS OF THE FIGURES

Fig. 1. Nucleus of the hepatic cell-control section. Alcohol-formol fixation. Nucleolus phase negative with a few fine striations. **Di-methylaniline (RI = 1.5569)**. Zeiss Lumipan phase-contrast microscope, oil immersion objective Ph 90/1.25. Ocular K 10x T. Photomicrograph camera: Practina FX.

Fig. 2. Against the background of the nucleolus there are visible 2 nucleoli, different in size. Fine processus may be seen propagating from the outside of the nucleoli and connected with the nuclear membrane. Considerable accumulation of nucleolus derivative bodies within phase negative membrane. **Di-methylaniline (RI = 1.5569)**. Zeiss Lumipan phase-contrast microscope, oil immersion objective Ph 90/1.25. Ocular K 10x T. Photomicrograph camera: Practina FX.

Fig. 3. Phase negative, hyperplastic nucleolus with numerous processus of various length. Nucleolar processus on the territory of the nucleus produce a fine network. **Di-methylaniline (RI = 1.5569)**. Zeiss Lumipan phase-contrast microscope, oil immersion objective Ph 90/1.25. Ocular K 10x T. Photomicrograph camera: Practina FX.

Fig. 4. Two nucleoli visible in the vicinity of the nuclear membrane. Between the surface of the nucleolus and the nuclear membrane there is a diffusion area

of nucleolus — derivative substance. **Di-methylaniline** (RI = 1.5569). Zeiss Lumipan phase-contrast microscope, oil immersion objective Ph 90/1.25. Ocular K 10x T. Photomicrograph camera: Practina FX.

Fig. 5. Phase positive picture of the nucleoli of the hepatic cell. Against the background of phase negative nucleoplasm oval, club-like and pyramidal structures of nucleolar origin and the same RI. **Benzene** (RI = 1.4983). Zeiss Lumipan phase-contrast microscope, oil immersion objective Ph 90/1.25. Ocular K 10x T. Photomicrograph camera: Practina FX.

Fig. 6. Nucleolus in the vicinity of nuclear membrane with numerous processes. Throughout the nucleus there are conglomerates of nucleolus derivative substance, oval or pyramidal in shape. **Benzene** (RI = 1.4983). Zeiss Lumipan phase-contrast microscope, oil immersion objective Ph 90/1.25. Ocular K 10x T. Photomicrograph camera: Practina FX.

Fig. 7. Nucleolus with a thick processus. Considerable accumulation of the nucleolus derivative substance in the nuclear membrane zone. **Benzene** (RI = 1.4983). Zeiss Lumipan phase-contrast microscope, oil immersion objective Ph 90/1.25. Ocular K. 10x T. Photomicrograph camera: Practina FX.

Fig. 8. Overgrown nucleolus. In the area of the nucleus considerable amount of phase positive substance of nucleolus origin. **Benzene** (RI = 1.4983). Zeiss Lumipan phase-contrast microscope, oil immersion objective Ph 90/1.25. Ocular K 10x T. Photomicrograph camera: Practina FX.

REFERENCES

1. Bernhard W., Bauer A., Gropp A., Haguenu F., Oberling Ch.: *Exp. Cell Research.*, **9**, 88—100, 1955.
2. Bass H., Zizuma A.: *Latvijas PSR Zinatnu Akad. Vestis.*, **8**, 39 1956.
3. Bernhard W., Gautier A., Rouiller C.: *Arch. Anat. Micr.*, **43**, 236, 1954.
4. Caspersson O.: *Cell Growth and Cell Function*. Norton and Co, N. Y. 1950.
5. Miętkiewski K., Kozik M.: *Endokrynologia Polska*, **10**, 1—6, 1959.
6. Niebrój T.: *Endokrynologia Polska*, **10**, 7—15, 1959.
7. Niebrój T.: *Endokrynologia Polska*, **10**, 16—20, 1959.

STRESZCZENIE

Biorąc pod uwagę badania Bernharda i współpracowników, Casperssona, Miętkiewskiego i Kozika, Niebroja i innych postanowiono przeanalizować wpływ soli kobaltu na obraz morfologiczny i czynność jąderka komórki wątrobowej. Badania histologiczne przeprowadzono na komórkach wątrobowych szczurów białych w ilości 60 sztuk. Zwierzętom doświadczalnym podawano w okresie trzech miesięcy doustnie z pożywieniem azotan kobaltawy, chlorek kobaltawy i octan kobaltawy, — 15 mg kobaltu na dobę.

W jądrach komórek wątrobowych doświadczalnych stwierdzono przerost jąderek i zwiększenie ich ilości, co pozwoliło przypuszczać, że sole kobaltu pobudzają jąderko do wzmożonej syntezy ciał jąderkopochodnych.

Wielkość, kształt i umiejscowienie jąderek pozostających pod wpływem soli kobaltu są zmienne, co niewątpliwie świadczy o ich wzmożonym procesie wydzielniczym. Na szczególną uwagę zasługuje obecność dużej ilości substancji jąderkopochodnych na obszarze jąder komórkowych i w strefie błony jądrowej. Na obszarze jąder występuje ona najczęściej pod postacią siateczki przestrzennej lub grubych pasm, łączących jąderko z błoną jądrową. Duża ilość tej substancji ma wygląd charakterystycznych tworów maczugowatych, stożkowatych, piramidalnych i kulistych.

Występowanie wypustek i siateczki łączących jąderko z błoną jądrową pozwala przypuszczać, że tą drogą prawdopodobnie następuje przenikanie substancji jąderkopochodnych poprzez jądro do protoplazmy. Spostrzeżenie to wydaje się być słuszne, gdyż tak jąderko jak i jego wypustki, strefa błony jądrowej i protoplazma podstawowa posiadają ten sam lub bardzo zbliżony współczynnik załamania światła, obserwowany po zastosowaniu metody refraktometrycznej w mikroskopie fazowo-kontrastowym.

OBJAŚNIENIA RYCIN

Ryc. 1. Jądro komórki wątrobowej — preparat kontrolny. Utrwalanie alkohol-formol. Jąderko fazowo ujemne z nielicznymi delikatnymi wypustkami. **Dwumetylanilina (RI = 1.5569)**. Mikroskop fazowo-kontrastowy Lumipan Zeiss. Obiektyw immersyjny Ph 90/1.25. Okular K 10x T. Mikrofot. Practina FX.

Ryc. 2. Jądro komórki wątrobowej pozostającej pod wpływem soli kobaltu. Widoczne dwa jąderka nierównej wielkości. Od powierzchni jąderek odchodzą delikatne wypustki łączące się z błoną jądrową. W obrębie fazowo ujemnej błony jądrowej duże nagromadzenie ciał jąderkopochodnych. **Dwumetylanilina (RI = 1.5569)**. Mikroskop fazowo-kontrastowy Lumipan Zeiss. Obiektyw immersyjny Ph 90/1.25. Okular K 10x T. Mikrofot. Practina FX.

Ryc. 3. Jądro komórki wątrobowej — preparat doświadczalny. Fazowo ujemne, przerosłe jąderko z licznymi wypustkami różnej grubości. Wypustki jąderkowe na obszarze jądra komórkowego wytwarzają delikatną siateczkę. **Dwumetylanilina (RI = 1.5569)**. Mikroskop fazowo-kontrastowy Lumipan Zeiss. Obiektyw immersyjny Ph 90/1.25. Okular K 10x T. Mikrofot. Practina FX.

Ryc. 4. Jądro komórki wątrobowej — preparat doświadczalny. Widoczne dwa jąderka w sąsiedztwie błony jądrowej. Pomiedzy powierzchnią jąderka a błoną jądrową istnieje dyfuzyjny pomost z substancji jąderkopochodnej. **Dwumetylanilina (RI = 1.5569)**. Mikroskop fazowo-kontrastowy Lumipan Zeiss. Obiektyw immersyjny Ph 90/1.25. Okular K 10x T. Mikrofot. Practina FX.

Rys. 5. Jądro komórki wątrobowej, preparat doświadczalny. Obraz fazowo dodatni jąderka komórki wątrobowej. Na tle fazowo ujemnej nukleoplazmy widoczne twory owalne, maczugowate i piramidalne pochodzenia jąderkowego o tym samym RI. **Benzen (RI = 1.4983)**. Mikroskop fazowo-kontrastowy Lumipan Zeiss. Obiektyw immersyjny Ph 90/1.25. Okular K 10x T. Mikrofot. Practina FX.

Ryc. 6. Jądro komórki wątrobowej — preparat doświadczalny. Jąderko w sąsiedztwie błony jądrowej z licznymi wypustkami. Na obszarze jądra widocz-

ne zgrupowania substancji jąderkopochodnej pod postacią tworów owalnego i piramidального. **Benzen (RI = 1.4983)**. Mikroskop fazowo-kontrastowy Lumipan Zeiss. Obiektyw immersyjny Ph 90/1.25. Okular K. 10x T. Mikrofot. Practina FX.

Рис. 7. Jądro komórki wątrobowej-preparat doświadczalny. Jąderko z grubą wypustką. Duże nagromadzenie substancji jąderkopochodnej w strefie błony jądrowej. **Benzen (RI = 1.4983)**. Mikroskop fazowo-kontrastowy Lumipan Zeiss. Obiektyw immersyjny Ph 90/1.25. Okular K 10x T. Mikrofot. Practina FX.

Рис. 8. Jądro komórki wątrobowej — preparat doświadczalny. Przeszło jąderko. Na całym terytorium jądra duża ilość substancji fazowo dodatniej pochodzenia jąderkowego. **Benzen (RI = 1.4983)**. Mikroskop fazowo-kontrastowy Lumipan Zeiss. Obiektyw immersyjny Ph 90/1.25. Okular K 10x T. Mikrofot. Practina FX.

Р Е З Ю М Е

Исходя из исследований, произведенных Бернгардом и со-трудниками, Касперсоном, Миенткевским и Козиком, Небром и многими другими исследователями, автор решил подробно проанализировать влияние солей кобальта на морфологи-ческую картину и деятельность ядрышка печеночной клетки. Гисто-логические исследования были произведены на печеночных клетках белых крыс. Для исследований использовано 60 штук этих животных. Упомянутым экспериментальным животным в течение трех месяцев подавались орально вместе с пищей азотнокислый кобальт, хлори-стый кобальт и уксуснокислый кобальт в количестве 15 мг кобальта в сутки.

В ядрах экспериментальных печеночных клеток автором устано-влено чрезмерное развитие ядрышек и увеличение их количества. Этот факт позволяет выдвинуть предположение, что кобальтовые соли стимулируют ядрышко к усиленному синтезу особых веществ ядрышкового происхождения.

Величина, форма и расположение ядрышек, находящихся под влиянием солей кобальта, проявляют сравнительно большую измен-чивость, что без сомнения указывает на их усиленную выделитель-ную деятельность. Особого внимания заслуживает наличие большого количества субстанций ядрышкового происхождения в области кле-точных ядер и ядерных оболочек. В области ядер они чаще всего выступают в виде пространственной сеточки или в виде толстых пучков, соединяющих ядрышко с ядерной оболочкой. Большое коли-чество этих субстанций имеет вид характерных булавовидных, кону-совидных, пирамидальных и шарообразных образований.

Наличие отростков и сеточки, соединяющих ядрышко с ядерной оболочкой позволяет предполагать, что эти образования представляют собой путь, по которому вещества, образующиеся в ядрышке, проникают через ядро в протоплазму клетки. Этот факт является весьма правдоподобным, так как и ядрышко со своими отростками, и зона ядерной оболочки, и протоплазма имеют одинаковый или очень сближенный рефракторный индекс (РИ), наблюдаемый в фазовоконтрастном микроскопе при применении рефрактометрического метода.

ОБЪЯСНЕНИЯ К РИСУНКАМ

Рис. 1. Ядро печеночной клетки — контрольный препарат. Фиксирование формоловым спиртом. Ядрышко фазово отрицательное с редкими нежными отростками. Двуметиланилин (РИ = 1.5569). Фазовоконтрастный микроскоп Люмипан Цейс. Иммерсионный объектив Ph 90/1.25. Окуляр К 10 × Т. Микрофот. Practina FX.

Рис. 2. Ядро печеночной клетки, находящейся под влиянием солей кобальта. Видны два ядрышка неодинаковой величины. От поверхности ядрышек отходят нежные отростки, соединяющиеся с ядерной оболочкой. В пределах фазово отрицательной ядерной оболочки значительное нагромождение веществ, образующихся в ядрышках. Двуметиланилин (РИ = 1.5569). Фазовоконтрастный микроскоп Люмипан Цейс. Иммерсионный объектив Ph 90/1.25. Окуляр К 10 × Т. Микрофот. Practina FX.

Рис. 3. Ядро печеночной клетки — экспериментальный препарат. Фазово отрицательное, проросшее ядрышко с многочисленными отростками различной толщины. Ядрышковые отростки в области клеточного ядра образуют тонкую сеточку. Двуметиланилин (РИ = 1.5569). Фазовоконтрастный микроскоп Люмипан Цейс. Иммерсионный объектив Ph 90/1.25. Окуляр К 10 × Т. Микрофот. Practina FX.

Рис. 4. Ядро печеночной клетки — экспериментальный препарат. Видны вблизи ядерной оболочки два ядрышка. Между поверхностью ядрышка и ядерной оболочкой выступает диффузный мостик, состоящий из веществ образующихся в ядрышке. Двуметиланилин (РИ = 1.5569). Фазовоконтрастный микроскоп Люмипан Цейс. Иммерсионный объектив Ph 90/1.25. Окуляр К 10 × Т. Микрофот. Practina FX.

Рис. 5. Ядро печеночной клетки — экспериментальный препарат. Фазово положительная картина ядрышек печеночной клетки. На фоне фазово отрицательной нуклеоплазмы видны овальные, булавовидные и пирамидальные образования ядрышкового происхождения с такой же величиной РИ. Бензол (РИ = 1.4883). Фазовоконтрастный микроскоп Люмипан Цейс. Иммерсионный объектив Ph 90/1.25. Окуляр К 10 × Т. Микрофот. Practina FX.

Рис. 6. Ядро печеночной клетки — экспериментальный препарат. Ядрышко вблизи ядерной оболочки с многочисленными отростками. В области ядра видны скопления субстанции ядрышкового, происхождения в виде овального и пирамидального образований. Бензол (РИ = 1.4883). Фазовоконтрастный микроскоп Люмипан Цейс. Иммерсионный объектив Ph 90/1.25. Окуляр К 10 × Т. Микрофот. Practina FX.

Рис. 7. Ядро печеночной клетки — экспериментальный препарат. Ядрышко с толстым отростком. Большое нагромождение веществ ядрышкового происхождения в области

ядерной оболочки. Бензол ($PI = 1.4983$). Фазовоконтрастный микроскоп Люмпан Цейс. Иммерсионный объектив Ph 90/1.25. Окуляр К 10 \times Т. Микрофот. Practina FX.

Рис. 8. Ядро печеночной клетки — экспериментальный препарат. Ядрышко проросшее. Во всей области ядра большое количество фазово положительной субстанции ядрышкового происхождения. Бензол ($PI = 1.4983$). Фазовоконтрастный микроскоп Люмпан Цейс. Иммерсионный объектив Ph 90/1.25. Окуляр К 10 \times Т. Микрофот. Practina FX.

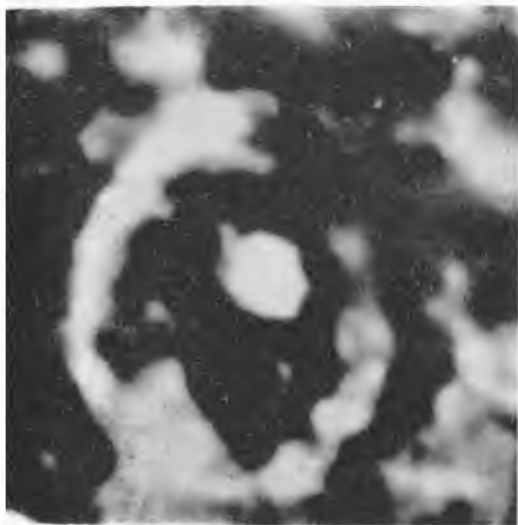


Fig. 1

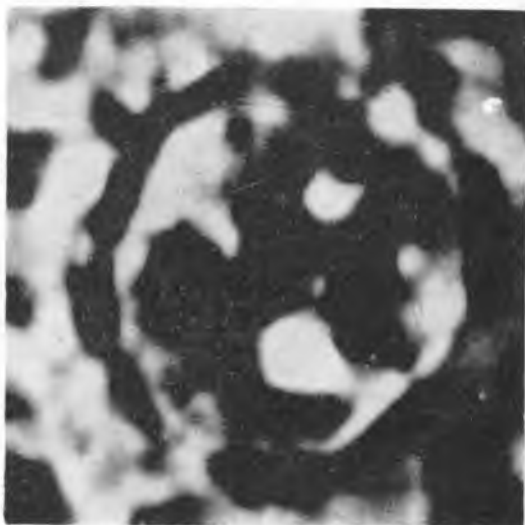


Fig. 2

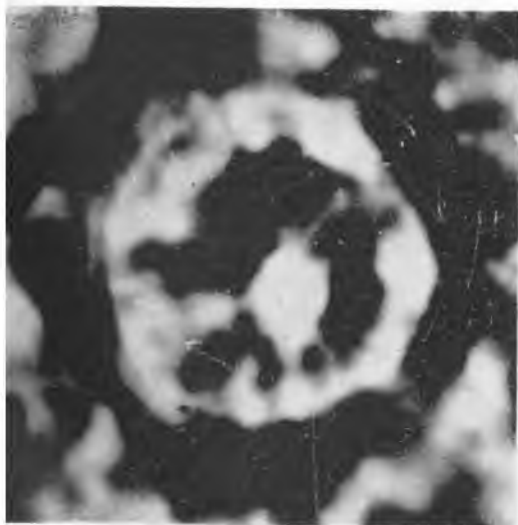


Fig. 3



Fig. 4



Fig. 5



Fig. 6



Fig. 7



Fig. 8