

Zakład Histologii i Embriologii. Instytut Biologiczno-Morfologiczny. Akademia Medyczna
w Lublinie

Kierownik: prof. dr hab. med. Stanisław Grzycki

Stanisław GRZYCKI, Krystyna CZERNY

Barwienie preparatów histologicznych przy użyciu rywanolu (2,5-diamino-7-etoksyakrydyny) w mikroskopii fluorescencyjnej

Окраска гистологических препаратов при использовании риваноля
(2,5-диамин-7-этоксакридина) во флуоресцентной микроскопии

The Staining of Histological Preparations with the Use of Rywanol
(2,5-diamino-7-etoxacridine) in Fluorescence Microscopy

Pochodne akrydyny (aurofosfina, oranż akrydyny, benzoflawina, fosfina 3R, tryptaflawina i inne) dzięki swym właściwościom fizykochemicznym znajdują szerokie zastosowanie w mikroskopii fluorescencyjnej jako fluorochromy wykazujące powinowactwo do pewnych struktur i składników komórkowych (10, 5, 16, 7, 4, 8). Oranż akrydyny, corifosfina 0 i inne łączą się z kwasami nukleinowymi wiązaniami elektrostatycznymi dając związki o charakterze soli i poprzez kohezję typu van der Waals'a (15). Pochodne akrydyny potraktowane dwutlenkiem siarki: akryflawina-SO₂, aurofosfina-SO₂, flawofosfina-SO₂, fosfina SG-SO₂, rywanol-SO₂ wchodzi w specyficzną reakcję z aldehydami otrzymanymi w czasie kwaśnej hydrolizy DNA i stąd ich zastosowanie dla metodyki Feulgena w technice fluorescencyjnej (2, 6, 12, 13). W dotychczasowych publikacjach naukowych niewiele miejsca poświęcono zastosowaniu w technice histochemicznej rywanolu (1, 3, 13). Związek ten zasługuje na uwagę ze względu na jego dużą zdolność tworzenia połączeń z białkami ustrojowymi i wpływ na białkową część enzymów, co przyczynia się do ich hamowania lub aktywacji (9, 14). Obecne doniesienie stanowi dotychczasowe nasze wyniki uzyskane w eksperymencie laboratoryjnym.

MATERIAŁ I METODY

Do badań użyto tkanek zwierzęcych (szczur biały, świnka morska) oraz rozmazów krwi i wymazów z jamy ustnej człowieka. Wycinki narządów (nerka, wątroba, dwunastnica) utrwalano w 10% formalinie obojętnej (24 godz.), w mieszaninie calcium-formol wg Bakera (24 godz.), w mieszaninie wg Carnoy (1 godz.) oraz w 1% wodnym roztworze rywanolu (24 godz.), a po odwodnieniu w alkoholach zatapiało

w parafinie. Rozmazy krwi i wymazy z jamy ustnej utrwalano w parach formaliny (7 min.) i w alkoholu metylowym (10 min.). Skrawki mikrotomowe grubości 6 mikr. po odparafinowaniu, a także rozmazy i wymazy, po nawodnieniu barwiono 0,1% roztworem wodnym rywanolu (pH 7,8—8,0) w ciągu 3 min. Przeprowadzono następnie obserwacje na niektórych otrzymanych preparatach w A, B, C i D warunkach. Preparaty A podbarwiano przy pomocy Fast Red B (roztwór 1 mg/1 ml w 0,1 M buforze weronalowo octanowym pH 9,2) w ciągu 3 min. Preparaty B po działaniu rywanolem inkubowano przez 3 min. w samym buforze weronalowo octanowym pH 9,2, preparaty C po działaniu rywanolem inkubowano w 1% wodnym roztworze chlorku glinu, a preparaty D w tych samych warunkach w 1% wodnym roztworze octanu cynku. Po odwodnieniu preparaty zamykano w środowisku niefluoryzującym i oglądano w mikroskopie fluorescencyjnym typu MB 30 Fl, PZO Warszawa, urządzenie fluorescencyjne UFL 1, filtry UG 1'3,5 mm. Ze wszystkich badanych tkanek wykonano przeglądowe preparaty barwione hematoksyliną i eozyną.

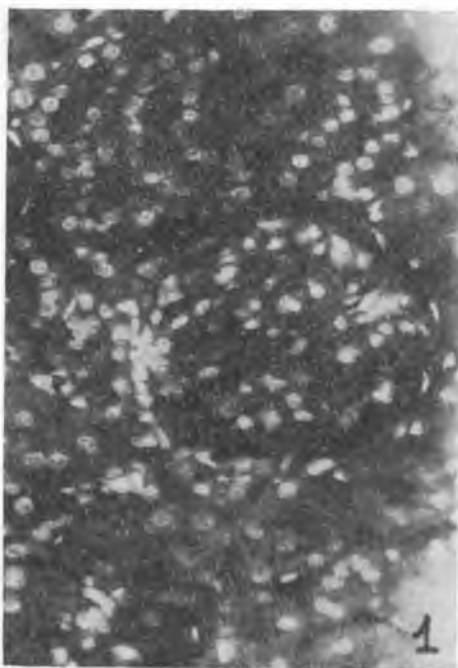
WYNIKI BADAŃ

Barwienie przeglądowe przy pomocy hematoksyliny i eozyny wykazało prawidłowo zachowaną strukturę tkanek utrwalonych przy pomocy stosowanych płynów, za wyjątkiem 1% roztworu wodnego rywanolu. Płyn ten jako utrwalacz w stosowanych warunkach okazuje się nieprzydatny, źle zachowuje strukturę komórek i narządów.

Tkanki utrwalone w mieszaninie wg Carnoy, barwione w 0,1% roztworze rywanolu, oglądane w mikroskopie fluorescencyjnym, wykazują kontrastową żółtocytrynową fluorescencję zrębu jądrowego i jąderek oraz bardzo słabą fluorescencję cytoplazmy (ryc. 1). Podobnie jasną fluorescencję wykazują struktury komórek nabłonka jamy ustnej i jądra krwinek białych rozmazów utrwalonych w alkoholu metylowym (ryc. 2). Na preparatach utrwalonych w formalinie i w mieszaninie calcium-formol, po działaniu rywanolem, obserwuje się wyraźną żółtocytrynową fluorescencję cytoplazmy, utrudniającą obserwację jąder (ryc. 3).

Preparaty A (podbarwione przy pomocy Fast Red B) wykazują znaczne zmiany fluorescencji: na preparatach utrwalonych w mieszaninie wg Carnoy, występuje całkowite wygaszenie fluorescencji cytoplazmy i znaczne osłabienie fluorescencji jąder. Na preparatach utrwalonych w formalinie obojętnej i w mieszaninie Bakera występuje wybitne zmniejszenie fluorescencji cytoplazmy i jąder, natomiast na preparatach dwunastnicy obserwuje się w tych warunkach bardzo jasną żółtą fluorescencję zawartości komórek kubkowych i rąbka szczoteczkowego (ryc. 4).

Preparaty grupy B po działaniu rywanolu inkubowane w buforze weronalowo octanowym pH 9,2 nie wykazują zmian fluorescencji w porównaniu z tymi, na które działano tylko rywanolem. W preparatach C i D pod wpływem roztworów soli glinu i cynku występuje nieznacz-



ne wygaszenie fluorescencji cytoplazmy komórkowej. Na wszystkich preparatach barwionych rywanolem po 3 miesiącach od chwili ich wykonania nie zauważono zmian we fluorescencji.

OMÓWIENIE WYNIKÓW I WNIOSKI

Przy dobrym i odpowiednim doborze filtrów na ciemnym polu widzenia mikroskopu obserwuje się tylko i wyłącznie fluoryzujące obiekty preparatu, których intensywność i kolor świecenia uzależnione są od obecności i zestawu znajdujących się w nich substancji. Daje to możliwość obserwować nie tylko kształt mikroobektu lub mikrostruktury w preparacie, ale także po kolorze światła fluoryzującego odczytać substancje, jakie w nim występują. Zdolność luminiscencji struktur komórkowych lub tkankowych wywołana sztucznie różnymi fluorochromami była w latach trzydziestych przedmiotem badań Haitingera, Hamperla, Bukatscha, Monne, Struggera, Hirta i innych. W naszej pracy w technice utrwalania i barwienia zastosowano rywanol, ale w trakcie wykonywania badań zaobserwowano zjawiska, których analiza spowodowała rozszerzenie metodyki i wyłoniła nowe zagadnienia. Dla otrzymania preparatów wyraźnie rysujących zrąb jąder komórkowych najwłaściwsza okazała się metoda utrwalania tkanek w mieszaninie Carnoy i barwienia 0,1% wodnym roztworem rywanolu. Ciekawe wyniki daje zastosowanie formaliny jako utrwalacza. Jest to najlepszy ze stosowanych w technice histologicznej utrwalacz białek. Reakcje formaliny z białkami tkanek są liczne i złożone, bo może się ona wiązać z wieloma różnymi czynnościowo grupami. Dzięki możliwości tworzenia wiązań między leżącymi blisko łańcuchami białkowymi jest przydatna jako utrwalacz polimeryzujący. Do grup, które biorą udział w utrwalaniu białek formaliną należą m.in. grupa aminowa, iminowa, amidowa, peptydowa, hydroksylowa, karboksylowa, SH i pierścienie aromatyczne. Przedłużone utrwalanie w formalinie utlenia grupy acetalowe i ujawnia substancje reagujące z odczynnikiem Schiffa. Odczynnik Schiffa jest stosowany w reakcji PAS, która znajduje zastosowanie m. in. w badaniu komórek kubkowych i rąbka szczoteczkowego jelit. Zastosowanie w naszej pracy Fast Red B, które w pierwotnym założeniu miało na celu badanie ziarnistości specyficznych komórek enterochromafinowych, dało w wyniku wygaszenie fluorescencji preparatów barwionych rywanolem za wyjątkiem fluorescencji zawartości komórek kubkowych i rąbka szczoteczkowego nabłonka. Zjawisko to obserwowane na preparatach utrwalonych formaliną nie zależało od stosowanego buforu, o czym przekonano się inkubując preparaty (B), w samym buforze, ani od soli cynku i glinu, które są

stabilizatorami soli dwuazowych, o czym przekonano się inkubując preparaty w roztworach soli tych metali (C i D).

W strukturze rąbka szczoteczkowego dużą rolę odgrywiają fosfolipidy, które mogą reagować w określonych warunkach podobnie, jak aldehydy odpowiedzialne za reakcję plazmalową. Być może w obserwowanych w obecnej pracy zjawiskach pewną rolę odgrywiają również mechanizmy podobne do zachodzących w reakcji plazmalowej swoistej dla fosfatydów acetalowych. Fosfatydy acetalowe, które same nie reagują z odczynnikiem Schiffa, łatwo są rozbijane przez sublimat, rozpadając się na aldehydy, które reagują z tym odczynnikiem powodując jego zabarwienie się. Utrwalanie formaldehydem nie pozwala na wystąpienie reakcji plazmalowej w przypadku niektórych lipidów tkankowych, lipidy te mogą jednak ponownie dawać tę reakcję jeśli zadziała się na nie sublimatem. W wypadku wybiórczego świecenia zawartości komórek kubkowych i rąbka szczoteczkowego na preparatach utrwalonych formaliną i po działaniu rywanolu oraz Fast Red B zachodzić mogą skomplikowane mechanizmy, być może połączone ze zjawiskami redukcji i utleniania, których wyjaśnienie wymagać będzie dalszych badań. Podstawowym wynikiem obecnej pracy jest stwierdzenie, że po utrwaleniu tkanek w niektórych utrwalaaczach (wg Carnoy, w alkoholu metylowym), rywanol można stosować jako fluorochrom jądrowy i reakcja ta ze względu na łatwość wykonania, przejrzystość obrazu i ich trwałość może być stosowana w mikroskopii fluorescencyjnej do barwienia preparatów przeglądowych, podobnie jak barwienie hematoksyliną w mikroskopii optycznej.

PIŚMIENNICTWO

1. Acheson R. M.: *Acridine Interscience*. Publ. New York 1956.
2. Bradley D. F.: *Trans. N. Y. Acad. Sci. Ser II*, **24**, 64, 1961.
3. Bruck H. C.: *Histologische Technik. Leitfaden für die Herstellung mikroskopischer Präparate in Unterricht und Praxis*. Stuttgart 1973.
4. Brumberg E. M., Czernogriadskaia N. A.: *Fluorescentnaja mikroskopija*. W: *Rukowodstwo po cytologii. I — Metody cytologičeskogo issledowanija*. ss. 64—71. Edit. Nauka. Moskwa—Leningrad 1965.
5. Bukatsch F., Haitinger M.: *Protoplasm* **34**, 515—523, 1934.
6. Culling C., Vassar P.: *Arch. Path.* **71**, 76—80, 1961.
7. Haitinger M., Hamperl H.: *Z. mikr. anat. Forsch.* **33**, 193—221, 1933.
8. Hirt A., Ansorge J., Markstrahler H.: *Z. Anat. u. Entwicklungsgesch.* **109**, 1—32, 1932.
9. Krawczyński J.: *Annal. Univ. M. Curie-Skłodowska. Lublin. Sec. D*, **9**, 341—394, 1954.
10. Monné L.: *Z. f. wissenschaftl. Mikroskopie* **55**, 143—149, 1938.
11. Pearse A. G. E.: *Histochemistry*. Ed. Churchill. London 1960.
12. Prenna G., Piva N., Zanotti L.: *Riv. Istoch. norm. pat.* **8**, 427—437, 1962.
13. Prenna G., Bianchi U. A., Zanotti L.: *Riv. Istoch. norm. pat.* **10**, 389—404, 1964.

14. Rosnowska M., Krawczyński J.: Diagnost. Laborat. (Warszawa) 8, 151—159, 1972.
 15. Schümmelfeder N., Krogh R. E., Ebschner K. J.: Histochemie. 1, 1—28, 1958.
 16. Strugger S.: Protoplasma 30, 85—100, 1938.
- Ctrzymano 21 XII 1973.

OBJAŚNIENIA RYCIN

Ryc. 1. Nerka szczura. Utrwalanie wg Carnoy. Barwienie 0,1% wodnym roztworem rywanolu. Fluorescencja zrębu jąder komórkowych. Pow. 300 ×.

Ryc. 2. Krew człowieka, rozmaz. Utrwalanie: alkohol metylowy. Barwienie 0,1% wodnym roztworem rywanolu. Jasna fluorescencja jąder krwinek białych. Pow. 300 ×.

Ryc. 3. Dwunastnica świnki morskiej. Utrwalanie: 10% formalina obojętna. Barwienie 0,1% wodnym roztworem rywanolu. Intensywna fluorescencja cytoplazmy komórkowej utrudniająca obserwację struktur jądrowych. Pow. 600 ×.

Ryc. 4. Dwunastnica świnki morskiej. Utrwalanie: 10% formalina obojętna. Barwienie 0,1% wodny roztwór rywanolu i Fast Red B. Mała intensywność fluorescencji cytoplazmy i jąder komórkowych. Jasno żółta fluorescencja zawartości komórek kubkowych i rąbka szczoteczki nabłonka. Pow. 600 ×.

EXPLANATION OF FIGURES

Fig. 1. Rat kidney. Fixative according to Carnoy. Staining — 0,1% rywanol water solution. Fluorescence of the cell nuclei stroma. ca 300 ×.

Fig. 2. Human blood, smear. Methyl alcohol fixative. Staining — 0,1% rywanol water solution. A light fluorescence of the white corpuscles nuclei. ca 300 ×.

Fig. 3. Guinea pig duodenum. 10% neutral formalin fixative. Staining — 0,1% rywanol water solution. An intensive fluorescence of the cell cytoplasm hindering the observation of nuclei structures. ca 600 ×.

Fig. 4. Guinea pig duodenum. 10% neutral formalin fixative. Staining — 0,1% rywanol water solution and Fast Red B. Small fluorescence intensity of the cytoplasm and cell nuclei. Light yellow fluorescence of the content of beaker cells and the edge of the brush-like epithelium. ca 600 ×.

РЕЗЮМЕ

Проводились исследования животных тканей, фиксированных в разных жидкостях (жидкость Карно, метильный спирт, нейтральный формалин) и окрашенных 0,1% водным раствором риваноля. Установлено, что риваноль является флуорохромом, который дает ядерной структуре лимонно-желтую окраску.

SUMMARY

Research was carried out on animal tissue fixed in various liquids (Carnoy, methyl alcohol, neutral formalin) and stained with 0,1% of rywanol water solution. It appears that rywanol is a fluorochrome which gives the nuclei structures a lemon-yellow staining.

Klinika Otolaryngologiczna. Instytut Chirurgii. Akademia Medyczna w Lublinie
Kierownik: prof. dr hab. Bolesław Semczuk

Wiesław GOŁĄBEK, Janusz SIDOR,
Marianna NOWAKOWSKA,
Irena PRĘDKA-MICHAŁOWSKA

The Indications for Tonsillectomy in Adults and in Children

Wskazania do tonsylektomii u dorosłych i u dzieci

Показания к тонзиллэктомии у взрослых и детей

After the views on the role of the lymphatic tissue changed, the indications for tonsillectomy also changed. For the estimation of indications for tonsillectomy all the operated cases in the Laryngological Clinic in Lublin in the years 1952—1972 were analyzed. This analysis revealed, that the number of tonsillectomies in this period diminished three times, where by in children — six times, and in adults — twice (Fig. 1). The number of these operations diminished mostly due to the decrease in tonsillectomies for general indications, i.e. non-laryngological ones (about 50% and in children even about 70%), less — for laryngological and general indications (about 35%), and at least — for laryngological indications alone (about 15%).

In the last 6 years the rate of tonsillectomies for the laryngological indications in children was 65% and in adults 75% of these operations. In other patients tonsillectomy was performed due to general diseases related to chronic tonsillitis (Fig. 2). The laryngological indications were as follow: tonsils hypertrophy disturbing breathing and deglutition, recurrent peritonsillar abscess, purulent cyst, and some neoplasms. The internal diseases accounted in children for 100% and in adults for 85% of non-laryngological indications, and consisted of all forms of rheumatic fever, nephritis, bronchial asthma. On the remaining 15% of general indications contributed other diseases: the neurological (*Sclerosis multiplex*,

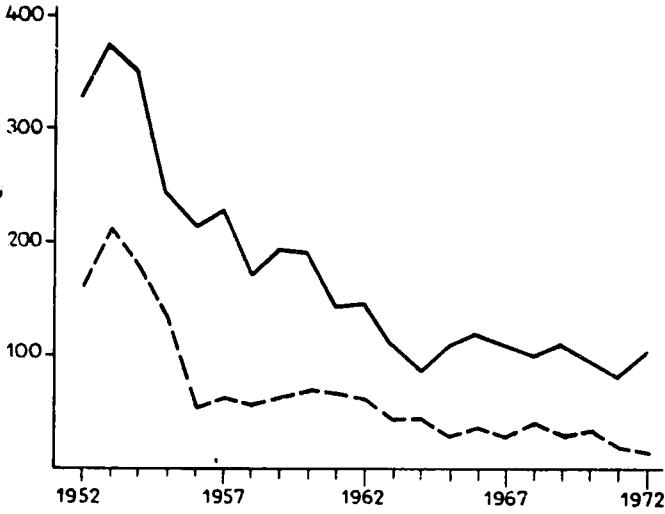


Fig. 1. The number of tonsillectomies in the consecutive years in children and in adults together (continuous line) and in children alone (dotted line)

chorea minor), the ophtalmological (*Neuritis nervi optici, retinitis*), the psychiatric (*Psychosis*) and the dermatological diseases (*Psoriasis*).

The rate of tonsillectomies in women was 64% and in men 34% of these operations. A similar relation was observed in children. The reason for the higher percentage of operations in women could be the higher incidence rate of chronic tonsillitis and general diseases related to it in women, and perhaps their greater sensibility to pain as well.

We opened an inquiry concerning the indications for tonsillectomy to

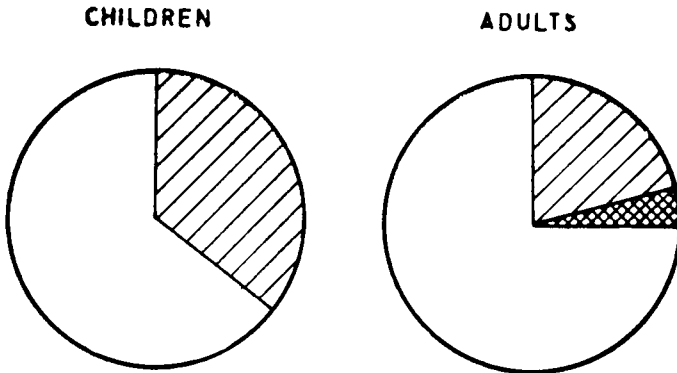


Fig. 2. The indications for tonsillectomy in children and in adults. White area — the laryngological indications, striped area — the internal diseases, black area — other diseases

14 otolaryngological clinics in Europe. The data from the most clinics (9 from 14) were similar to our criteria and management. The reasons for the decrease in the number of tonsillectomies could be the improved results of pharmacological treatment of chronic tonsillitis and the limitation of indications for tonsillectomy. Many investigations revealed that the lymphatic tissue plays an important role in the pathomechanism of allergy and resistance. In the tonsils phagocytosis and the identification of bacterial antigens takes place. The releasing ribonucleic acid (m.RNA) stimulates the synthesis of antibodies in the bone-marrow, the spleen, the lymph nodes and in the tonsils as well. The free antibodies and the antibodies bound to lymphocytes are synthesized (1, 8, 12). There are also antibodies in the secretion of the mucosa of the respiratory tract, but they are a little different from serum antibodies (10).

Many authors think, that some general diseases could be caused by chronic tonsillitis. Following tonsillectomy due to laryngological and general indications (rheumatic fever, nephritis) some biochemical indicators of these general diseases normalize and the incidence rate of anginas diminished too (4, 5, 9). But up to the present time we do not have any objective tests, which could point out the causative relationship between chronic tonsillitis and the general disease. After some authors the source of the general disease following tonsillectomy quite seldom if ever improved (2, 11). That is why the indications for tonsillectomy in the non-laryngological diseases should be taken up by an experienced team of specialists. This has a peculiar significance in children, in whom tonsillectomy deprives the organism of a „vaccine laboratory” and just in the period, when the resistance is mostly required (3, 6, 7).

REFERENCES

1. Berendt W.: Pamiętnik Konferencji Naukowej IV Dni Otolaryngologii Dziecięcej. Zakopane 28—30 IX 1969, 154—155.
2. Chwalibogowski A.: Reumatol. Pol. 1, 197—200, 1963.
3. Danielewicz J.: Otolaryng. Pol. 10, 381—389, 1956.
4. Denisiewicz K.: Otolaryng. Pol. 25, 307—312, 1971.
5. Kuśnierczyk W., Sośnierzowa K., Piastowska E.: Otolaryng. Pol. 17, 449—450, 1963.
6. Miodoński J.: Otolaryng. Pol. 10, 369—379, 1956.
7. Semczuk B.: Pol. Tyg. Lek. 22, 1837—1839, 1967.
8. Siegenthaler W.: Klinische Pathophysiologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1970.
9. Słotwińska L.: Reumatologia 7, 233—237, 1969.
10. Sośnierzowa K.: Otolaryng. Pol. 25, 113—114, 1971.
11. Stryjecki J.: Pediaatria Pol. 43, 1531—1534, 1968.
12. Surjan L., Surjan L. jr, Surjan M.: Acta Otolaryng. 73, 222—226, 1972.

Otrzymano 28 I 1974.

STRESZCZENIE

Przeprowadzono analizę wszystkich przypadków schorzeń laryngologicznych i nielaryngologicznych zakwalifikowanych do wyłuszczenia migdałków podniebiennych w Lubelskiej Klinice Laryngologicznej w latach 1952—1972. Z analizy tej wynika, że liczba tonsylektomii w ocenianym okresie zmniejszyła się trzykrotnie, w tym u dzieci — sześciokrotnie, a u dorosłych — dwukrotnie. Omówiono przyczyny spadku liczby tonsylektomii w świetle aktualnych poglądów na rolę tkanki limfatycznej w patomechanizmie odporności.

OBJASNIENIA RYCIN

Ryc. 1. Liczba tonsylektomii w poszczególnych latach u dorosłych i dzieci łącznie (linia ciągła) oraz u dzieci (linia przerywana).

Ryc. 2. Wskazania do tonsylektomii u dzieci i u dorosłych. Pole białe — wskazania laryngologiczne, pole zakreskowane — choroby wewnętrzne, pole czarne — inne choroby.

РЕЗЮМЕ

Авторы проанализировали все случаи ларингологических и неларингологических заболеваний, в процессе лечения которых проводилось выщипывание миндалин. Исследованиями были охвачены больные, леченные в Ларингологической клинике (Люблин) в 1952—1972 гг. Из анализа следует, что число тонзиллэктомии в этот период уменьшилось в три раза, причем у детей — в шесть раз, а у взрослых — в два раза. Авторы анализируют причины уменьшения числа тонзиллэктомии в свете актуальных взглядов на роль лимфатической ткани в патомеханизме иммунитета.