

Wanda Ficek *

Inkorporacja ^3H -tymidyny i zmiany poziomu histonów w komórkach grasicy szczurów młodych po iniekcji dootrzewnowej witaminy B_6

Streszczenie

Doświadczenia wykonano na szczurach (samcach) szczepu Wistar, nie-dojrzałych płciowo (w wieku 23 dni). Zwierzęta stanowiące grupę kontrolną otrzymały jeden raz w drodze iniekcji dootrzewnowej $2,5 \mu\text{Ci } ^3\text{H}$ -tymidyny na g ciężaru ciała, a następnie tej grupie podawano (też dootrzewnowo) przez kolejnych 9 dni w odstępach co 24 godz. 0,2 ml wodnego roztworu soli fizjologicznej (0,9% NaCl) na jednego osobnika.

Zwierzęta grupy doświadczalnej otrzymały $2,5 \mu\text{Ci } ^3\text{H}$ -tymidyny na g ciężaru ciała, a następnie przez kolejne 9 dni (w odstępach co 24 godz.) podawano im w iniekcji dootrzewnowej 0,2 ml witaminy B_6 na jednego osobnika.

Uzyskane wyniki wykazują wyraźny wpływ witaminy B_6 na inkorporację ^3H -tymidyny w komórki grasicy. Po podaniu pirydoksyny wynik ten był dziewięciokrotnie wyższy w porównaniu z grupą kontrolną, co stanowiło różnicę statystycznie istotną ($p < 0,001$).

Histochemiczne badania histonów wykazały, że u zwierząt otrzymujących witaminę B_6 liczba komórek zawierających wysoki poziom tych białek wynosiła 6%, a w grupach kontrolnych wynik ten wynosił 20%.

WSTĘP

Grasica jest gruczołem, którego wielkość ulega zmianie w zależności od wieku. W normalnych warunkach fizjologicznych stosunek ciężaru grasicy ssaków do ciężaru całego ciała jest największy zaraz po urodzeniu.

* Zakład Fizjologii Zwierząt Uniwersytetu Jagiellońskiego.

W okresie dojrzewania płciowego u wszystkich ssaków grasicca ulega inwolucji o charakterze fizjologicznym. Oprócz inwolucji fizjologicznej może występować inwolucja następcza (np. po podaniu w iniekcji dużych dawek hormonów nadnerczowych), charakteryzująca się rozrostem tkanki łącznej włóknistej i tłuszczowej oraz zmniejszeniem DNA (kwasu dezoksyrybonukleinowego) w tymocytach (Ficek, 1981) lub zmianami rozmieszczenia tymocytów na obszarze całego gruczołu grasicznego (Haelst U. Van, 1967; Munck i Young, 1975; Richards, 1978; Ober i Prahlad, 1987).

W badaniach przeprowadzonych na szczurach wykazano, że usunięcie kory nadnerczy lub gonad w pierwszych dniach życia tych zwierząt może spowodować znaczny wzrost ciężaru grasicy w porównaniu ze zwierzętami kontrolnymi (Knutson i Lundin, 1966; Comsa, Leonhardt i Ozminski, 1979). Dane powyższe potwierdzają, że proces inwolucji grasicy w dużym stopniu jest uzależniony od poziomu hormonów sterydowych.

Badania ostatnich lat wykazują, że rozwój oraz prawidłowe funkcjonowanie gruczołu grasicznego jest uzależnione również od optymalnej zawartości niektórych witamin w organizmie ssaków (Ficek, 1982; Strumpf, Clare, Sar i De Luca, 1984 i 1987). Strumpf i Downs (1987) używając metody autoradiograficznej wykazali, że komórki grasicy, szczególnie komórki siateczki, zawierają liczne receptory wiążące witaminę D₃ (Cholecalciferol), zaś w wyniku badań własnych wykonanych na młodych szczurach (Ficek, 1982) stwierdzono, że w kilka dni po urodzeniu tych zwierząt wzrastał poziom witaminy C (kwasu askorbinowego) w grasicy aż do okresu dojrzewania płciowego. Uważa się, że jest to okres, w którym grasicca pełni wzmoczoną funkcję immunologiczną oraz endokrynną i dlatego wykazuje zwiększone zapotrzebowanie na niektóre witaminy (Trainin, 1974; Plescia, Feit, Skelly i White, 1976; Springer, Pavelič i Grgič, 1979).

Znając wyniki badań i dane bibliograficzne, że grasicca wykazuje zapotrzebowanie na takie witaminy, jak kwas askorbinowy oraz witaminę D₃, postanowiono w doświadczeniach własnych zbadać zmiany inkorporacji ³H-tymidyny oraz poziom histonów w komórkach grasicy u zwierząt nie-dojrzałych płciowo, po podaniu tym zwierzętom większych dawek witaminy B₆. Szybkość inkorporacji ³H-tymidyny w komórki grasicy mówi nam o intensywności syntezy DNA na tym obszarze anatomicznym.

MATERIAŁ I METODY

Do doświadczeń użyto 30 szczurów (samców) szczepu Wistar. Wszystkie zwierzęta w czasie rozpoczęcia doświadczeń miały 23 dni i średni ciężar ciała wynosił 41 g. Szczury te podzielono na II grupy.

I grupa stanowiła kontrolę. Zwierzęta w tej grupie otrzymywały jednorazowo w iniekcji dootrzewnowej $2,5 \mu\text{Ci}$ ^3H -tymidyny na 1 g ciężaru ciała. Oprócz tego codziennie przez okres 9 dni zwierzęta te otrzymywały w iniekcji dootrzewnowej 0,2 ml wodnego roztworu soli fizjologicznej (0,9% NaCl).

II grupa to zwierzęta doświadczalne. Szczury w tej grupie otrzymywały jednorazowo w iniekcji dootrzewnowej $2,5 \mu\text{Ci}$ ^3H -tymidyny na 1 g ciężaru ciała, a następnie przez okres 9 dni podawano im (również dootrzewnowo) 0,2 ml witaminy B_6 na jednego osobnika.

Tymidynę znakowaną izotopem wodoru (6- ^3H -Thymidin - Firmy: Institute for Research Production and uses of Radioisotopes-Praga, Czechosłowacja) podano zwierzętom w 23 dniu życia, a potem przez następne 9 dni podawano im w iniekcji dootrzewnowej, w odstępach co 24 godz., wodny roztwór soli fizjologicznej lub (grupie doświadczalnej) wodny roztwór witaminy B_6 (Pyridoxinum hydrochloricum 0,05 g/2ml, produkcji "Polfy" w Krakowie).

Młode zwierzęta nadal pozostawały przez cały okres wraz z matkami. Matki, jak również szczury młode, były karmione paszą standardową "Murigran" a do picia otrzymywały dowolną ilość wody. Po zakończeniu doświadczeń zwierzęta usypiano lekko eterem, wykrawiano i pobierano gruczoł grasiczny.

Do badań inkorporacji ^3H -tymidyny gruczoł grasiczny poddawano trypsynizacji wg metody Myśliwskiej (1979), stosując pomiary w ciekłej scyntytacji wg metody Foxa (1976). Wszystkie pomiary wykonano na liczniku Intertechnique SL-30. Uzyskane wyniki pomiarów impulsów w czasie 1 minuty na 100 mg świeżej tkanki obliczano testem Studenta -t i podano w tekście w formie diagramów.

W celu przeprowadzenia badań autoradiograficznych grasicę utrwalano w płynie Carnoya, zatapiano w parafinie i skrawki grubości $0,8 \mu\text{m}$ pokrywano emulsją K_2 (Ilford Nuclear Research Emulsion in gel form - Anglia) według metody Gahana (1972). Liczbę ziaren inkorporowanej w komórki ^3H -ty-

midyny liczone w kolejnych skrawkach na obszarze 1 cm^2 , stosując w okularze siatkę mikrometryczną. Wytrącone ziarna srebra liczone ponad jądrami komórek zrębu, wybierając zawsze w grasicy ten sam obszar, tj. na pograniczu części korowej i rdzennej. Uzyskane wyniki sumowano, wyciągano średnie i obliczano testem Studenta -t, co przedstawiono w tekście w postaci diagramu.

Pobrano też materiał z grasic zwierząt kontrolnych i zwierząt otrzymujących witaminę B_6 do badań histonów metodą Alferta i Geschwinda w modyfikacji Deitcha (cyt. za Krygier-Stojałowską, 1975). Nasilenie reakcji barwnej obliczano przy pomocy wskaźnika "score" (Pawelski, 1977), a uzyskane wyniki przedstawiono w tekście za pomocą wykresu. W badaniach cytochemicznych dla uzyskania różnicy zabarwienia komórek można stosować wskaźnik "score". Metoda ta polega na odczytywaniu nasilenia zabarwienia przy użyciu skali od 0 do 4, licząc 100 kolejnych komórek.

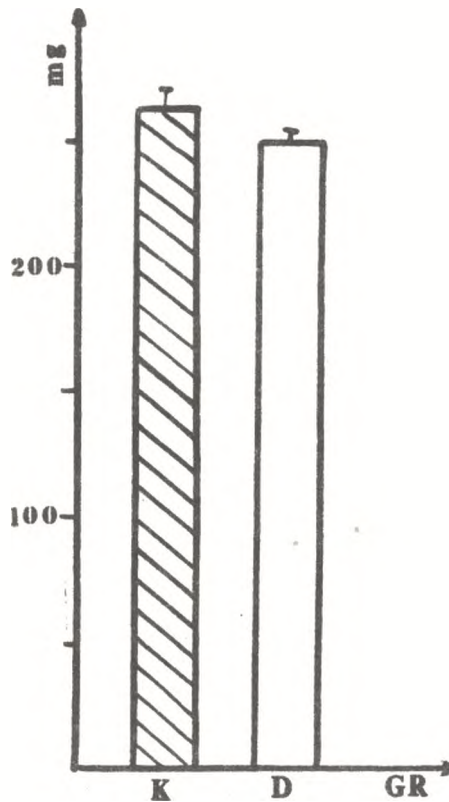
WYNIKI

Średni ciężar ciała młodych szczurów w 23 dniu życia wynosił 41 g. Po zakończeniu doświadczenia ponownie ważono wszystkie szczury. Grupa zwierząt, która otrzymywała witaminę B_6 miała mniejszy ciężar ciała o 4,6 g na jednego osobnika w porównaniu ze zwierzętami kontrolnymi. Wyniki te przedstawiały się następująco: średni ciężar ciała zwierząt kontrolnych (na jednego osobnika) wynosił 66,6 g, zaś zwierząt doświadczalnych - 62 g. W obliczeniach testowych różnica ta nie dawała istotności statystycznej.

Ciężar grasicy

Po zakończeniu doświadczenia, tj. w 33 dniu życia szczurów, pobierano całe grasicy i ważono. Średni ciężar grasicy (jednego osobnika) u zwierząt kontrolnych wynosił 268,3 mg, zaś u zwierząt otrzymujących wita-

minę B_6 ciężar ten równał się 250 mg (ryc. 1). Różnica na korzyść zwierząt kontrolnych wynosiła 18,3 mg, co w obliczeniach testem -t- stanowiło różnicę statystycznie istotną ($p < 0,01$).

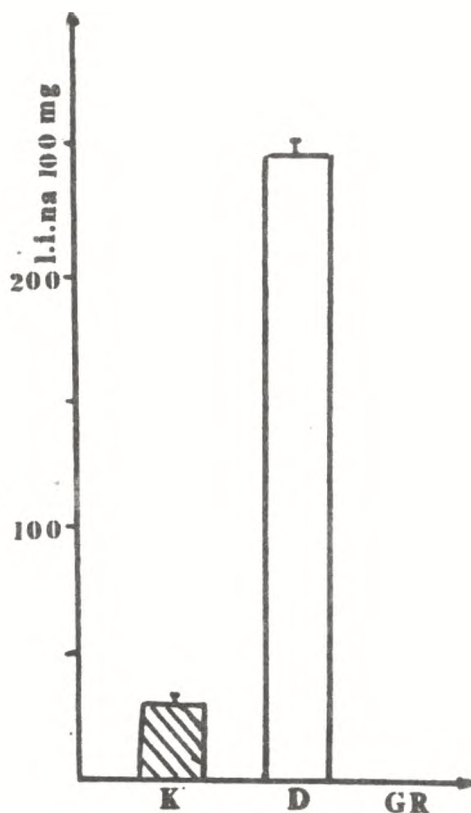


Ryc. 1. Diagram przedstawiający średnią wagę grasic w mg: K - kontrola, D - zwierzęta doświadczalne, GR - grupy zwierząt

Dane w pomiarach ciekłej scyntytacji

Do pomiarów w ciekłej scyntytacji pobierano 100 mg świeżej tkanki i mierzono liczbę impulsów w ciągu 1 minuty, co pozwoliło na bardzo dokładne określenie ilości znakowanej trytem tymidyny, wbudowanej w komórki grasicy (ryc. 2). W grupie zwierząt kontrolnych liczba ta wynosiła 29 im-

pulsów na 100 mg świeżej tkanki w ciągu 1 minuty, zaś w grupie zwierząt doświadczalnych (otrzymujących witaminę B₆) liczba ta stanowiła 250 imp. na 100 mg świeżej tkanki w ciągu 1 minuty. Dla zwierząt doświadczalnych jest to o 221 impulsów więcej w porównaniu z grupą kontrolną. W obliczeniach testem -t- jest to wartość statystycznie istotna ($p < 0,001$).



Ryc. 2. Diagram przedstawiający średnią liczbę impulsów na 100 mg świeżej tkanki grasicznej: l.i. na 100 mg - liczba impulsów na 100 mg tkanki, K - kontrola, D - grupa doświadczalna, GR - grupy zwierząt

Wyniki w metodzie autoradiograficznej

W pomiarach metodą autoradiograficzną liczono ilość ziaren srebra, które zostały wytrącone w miejscu wbudowania znakowanej trytem tymidyny. W każdym kolejnym preparacie liczono ziarna na obszarze 1 cm^2 , wykorzystując w tym celu wmontowaną w okular siatkę mikrometryczną. Po obliczeniu średniej, wyniki przedstawiały się następująco: dla preparatów kontrolnych 17 ziaren, a dla grupy doświadczalnej 45 ziaren, na obszarze 1 cm^2 badanej tkanki grasiczej (ryc. 3). W obliczeniach testem -t- stanowiło to wartość statystycznie istotną ($p < 0,01$).

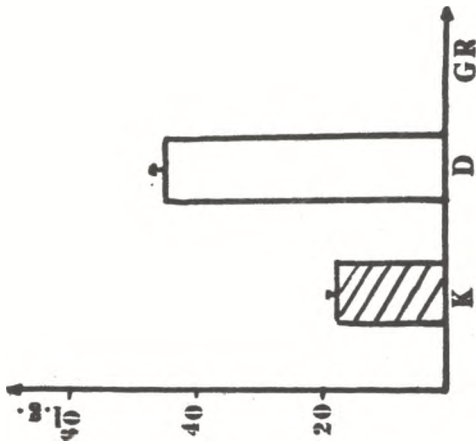
Cytochemiczne badania histonów

Komórki grasicy zawierają znaczną ilość białek o charakterze zasadowym. Są to białka zwane histonami. Ich obecność można wykazać przez zastosowanie w barwieniu zieleni trwałej (Fast green), po uprzedniej hydrolizie zawartego w komórkach DNA, a następnie ustalenia dla barwienia odpowiedniego pH. Intensywność zabarwienia mówi o poziomie histonów w komórkach grasicy.

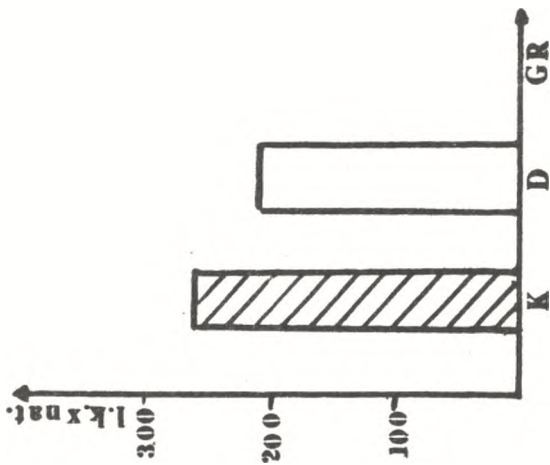
Przeprowadzona analiza seryjnych skrawków grasic wykazała, że u zwierząt otrzymujących witaminę B_6 współczennik "score" dla najintensywniejszego zabarwienia komórek wynosił 24, zaś w preparatach grupy kontrolnej 80. Przy obliczaniu w 5-ciostopniowej skali natężenia zabarwienia (od 0 do 4) "total score" dla grasic zwierząt doświadczalnych wynosił 218, a dla grasic zwierząt kontrolnych 280 (ryc. 4).

DYSKUSJA

Witamina B_6 podana w pokarmie ulega w ustroju ssaków przemianie do tzw. estrów fosforanowych pirydoksalu i wtedy związki te stają się formami czynnymi. Postacie czynne witaminy B_6 są koenzymami wielu reakcji i biorą udział w przemianie aminokwasów, w procesach transeminacji oraz dekarboksylacji. Fosforan pirydoksalu jest grupą prostetyczną nie tylko



Ryc. 3. Wykres przedstawiający średnią liczbę ziaren wytrąconego srebra w badaniach audioradiograficznych na 1 cm²: l.g. - liczba ziaren, K - kontrola, D - grupa doświadczalna, GR - grupa zwierząt



Ryc. 4. Wykres przedstawiający poziom histonów w komórkach grasicy: l.k. x nat. - liczba komórek x natężenie zabarwienia, K - kontrola, D - grupa doświadczalna, GR - grupa zwierząt

aminotransferaz, ale także szeregu innych enzymów katalizujących niektóre reakcje alfa-aminokwasów. Uważa się, że działa on jako pośrednik grup aminowych lub nawet niektórych aminokwasów (Pawelski, 1977; Lott, Coulombe, Di Paolo, Richardson i Levy, 1978; Kurlemann, Löscher, Dominick i Palm, 1987). Badania ostatnich lat wykazują, że witamina B₆ jest niezbędna w drogach przemiany tryptofanu do kwasu nikotynowego oraz jego pochodnych. Niedobór pirydoksyny może doprowadzić do wydalania z moczem pośrednich metabolitów tryptofanu, np. takich, jak kwas ksanturenowy.

Bender, Tagoe i Vale (1982) oraz Catterjee (1980) uważają, że hormony sterydowe mają wpływ na zwiększony metabolizm witaminy B₆ w organizmach ssaków. Badania te dały podstawę do przypuszczeń, że w okresie ciąży ssaków zapotrzebowanie na pirydoksynę wzrasta, ponieważ u wszystkich zwierząt znajdowano w tym czasie jej podwyższony poziom w osoczu (Lumeng, Cleary, Wagner, Yu i Li 1976; Sloger i Reynolds, 1980).

W doświadczeniach własnych, po podaniu młodym szczurom (23-dniowym) znakowanej trytem tymidyny, a następnie witaminy B₆, zanotowano stosunkowo wysoki poziom inkorporacji ³H-tymidyny w komórkach grasicy. Ilość inkorporowanej ³H-tymidyny daje możliwość szybkiego i dokładnego wykazania funkcjonowania jąder komórkowych, syntezy DNA, jak również przebiegu niektórych procesów biochemicznych zachodzących w komórkach. Zatem należałoby przypuszczać, że rozwój gruczołu grasicznego u młodych zwierząt wykazuje zapotrzebowanie na zwiększoną ilość witaminy B₆. U zwierząt doświadczalnych, którym podano dootrzewnowo pirydoksynę, poziom znakowanej trytem tymidyny wzrósł w komórkach grasicy dziewięciokrotnie w porównaniu ze zwierzętami kontrolnymi. Ta zwiększona ilość wbudowanej tymidyny w grasicy świadczy o zwiększonej syntezie DNA w jądrach komórkowych, jak również o większym zapotrzebowaniu na aminokwasy budujące te komórki.

Rozpatrując tężnie wyniki uzyskane w zakresie badań histonów i inkorporacji znakowanej trytem tymidyny, należałoby sądzić, że młode szczury w czasie wzrostu wykazują zwiększone zapotrzebowanie na pirydoksynę, ponieważ w tym okresie jest u nich czynnie zaangażowany układ immunologiczny, jak również szybkiemu rozwojowi podlega układ hormonalny. Badania Rose (1978) oraz Van Den Berga i Bogaardsa (1987) wykazują, że przy

zwiększonym wydzielaniu hormonów sterydowych (np. progesteronu) jest zwiększone zapotrzebowanie na witaminę B₆, jak również wtedy, gdy w organizmie istnieje zwiększone zapotrzebowanie na kwas nikotynowy (Vannuchi, Kutnink, Sauberlich i Howerde, 1986). Opierając się na wykonanych doświadczeniach i uzyskanych wynikach, jak i danych bibliograficznych należałoby sądzić, że w okresie intensywnej czynności hormonalnej oraz immunologicznej (Plescica, Feit, Skelly i White, 1976; Comsa, Leonhardt i Ozminski, 1979; Springer, Pavelič i Grgič, 1979) grasica wykazuje zwiększone zapotrzebowanie na syntezę DNA, jak również na substancje egzogenne (jak witamina B₆), które tę syntezę aktywują.

Reasumując całościowo te badania, można wyciągnąć następujące wnioski:

1. Podanie dootrzewnowe znakowanej trytem tymidyny, a następnie witaminy B₆, prowadzi u młodych szczurów do zwiększonej inkorporacji ³H-tymidyny w komórki grasicy.

2. Po dootrzewnowej iniekcji witaminy B₆ następuje w grasicy spadek liczby komórek o wysokim poziomie nagromadzenia histonów w porównaniu z kontrolą podstawową.

Literatura

- Bender D. A., Tagoe C. E. and Vale J. A., 1982. Effects of estrogen administration of vitamin B₆ metabolism in the rat. Br. J. Nutr., 47, 609-614.
- Chatterjee A. K., 1980. Possible influence of gonadotropin formation in vivo of pyridoxal phosphate. Horm. Metab. Res., 12, 397-399.
- Comsa J., Leonhardt H. and Ozminski K., 1979. Hormonal influences on the secretion of the thymus. Thymus, 1, 81-93.
- Ficek W., 1981. Histological and DNA level changes in the thymus gland of rats as induced by simultaneous injections of adrenaline and hydrocortisone. Gegenbaurs morph. Jahrb., 127, 544-551.
- Ficek W., 1982. Histochemical studies on vitamin C distribution in the thymus of immature rats. Zool. Jb. Anat., 108, 11-18.

- Fox B. W., 1976. Techniques of sample preparation for liquid scintillation counting. Ed. by T. S. Work and E. Work, Amsterdam, Oxford: North Holland, Pub. Company. New York: American Elsevier.
- Gahan P. B., 1972. Autoradiography for Biologists. Academic Press. London and New York.
- Haelst U. Van., 1967. Light and electron microscopic study of the normal and pathological thymus of the rat. *Zellforsch Z.*, 80, 153-182.
- Knutson F. and Lundin P. M., 1966. Effect of hypophysectomy adrenalectomy and cortisone incorporation of tritiated thymidine in rat organs. *Acta Endocrinol.* 55, 518-521.
- Krygier-Stojałowska A., Godlewski H. G., 1975. Topochemiczne metody badań komórek i tkanek. PWN, Warszawa.
- Kurlemann G., Löscher W., Dominick H. C. and Palm G. D., 1987. Disappearance of neonatal seizures and low CSF GABA levels after treatment with vitamin B₆. *Epilepsy res.* 1, 152-154.
- Lott J. T., Coulombe T., Di Paolo R. V., Richardson Jr. E. P. and Levy H. L., 1978. Vitamin B₆-dependent seizures: pathology and chemical findings in brain. *Neurology*, 28, 47-54.
- Lumeng L., Cleary R. E., Wagner R., Yu P. L. and Li T. K., 1976. Adequacy of vitamin B₆ supplementation during pregnancy: a prospective study. *Am. J. Clin. Nutr.* 29, 1376-1383.
- Munck A. and Young D. A., 1975. Corticosteroids and lymphoid tissue. *Handbl. Phys.* 6, 231-243.
- Myśliwska J., 1979. Changes in the mouse thymus observed during puberty. *Endokrinologie.* 73, 55-60.
- Ober M. N. and Prahlad K. V., 1987. Ultrastructure of thymus and liver following adrenalectomy and replacement adrenal hormone therapy in rats. *Cytobios.* 52, 71-82.
- Pawelski S., 1977. Diagnostyka laboratoryjna w Hematologii. PZWL Warszawa.
- Plescica O. J., Feit C., Skelly R. and White A., 1976. Thymic hormones as regulators of immune responses. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 274, 519-526.
- Richards J. F., 1978. ODC activity in lymphoid tissues of rats: effects of glucocorticoids. *Life Sci.* 23, 1619-1624.

- Rose D. P., 1978. The interactions between vitamin B₆ and hormones. Vitam. Horm. 36, 53-99.
- Sloger M. S. and Reynolds R. D., 1980. Effects of pregnancy and lactation on pyridoxal 5'-phosphate in plasma, blood and liver of rats fed three levels of vitamin B₆. J. Nutr. 110, 1517-1524.
- Springer O., Pavelić J. and Grgić Z., 1979. The role of thymic humoral factor (THF) in hemopoietic tissues: II the effect of THF on the reconstitution of lymphoid cells in neonatally thymectomized and thymic (nude) BALB/c mice. Periodicum Biologorum, 81, 73-75.
- Stumpf W. E., Clare S. A., Sar M., De Luca H. F., 1984. Topographical and developmental studies on 1,25/OH/2 vitamin D₃ target sites in skin. Cell Tissue Res. 238, 489-496.
- Stumpf W. E. and Downs T. W., 1987. Nuclear receptors for 1,25/OH/2 vitamin D₃ in thymus reticular cells studied by autoradiography. Histochemistry, 87, 367-369.
- Trainin N., 1974. Thymic hormone and the immune response. Physiol. Rev. 54, 272-306.
- Ven Den Berg H. and Bogaards J. J. P., 1987. Vitamin B₆ metabolism in the pregnant rat: Effect of progesterone on the (Re) distribution in maternal vitamin B₆ stores. J. Nutr. 117, 1866-1874.
- Vannucchi H., Kutnink M. D., Sauberlich M., Howerde E., 1986. Interaction among niacin, vitamin B₆ and zinc in rats receiving ethanol. Internal. J. Vit. Nutr. Res. 56, 355-362.

Incorporation of H-thymidine and changes in histone levels
in the thymus cells in young rats
after intraperitoneal injections of vitamin B₆

Summary

The experiments were carried out on sexually immature 23-day old male rats of Wistar strain. The animals were divided into control and experimental group. The control group received one peritoneal injection

2,5 μCi ^3H -thymidine per g of body weight followed by nine peritoneal injections of 0,2 ml of 0,9% saline solution given in 24 hr intervals.

The animals of experimental group received 2,5 μCi ^3H -thymidine per g of body weight followed by nine peritoneal injections of 0,2 ml of vitamin B_6 per animal given in 24 hr intervals. After the series of injections, the thymus was obtained from each animal for studies of ^3H -thymidine incorporation and on the histone levels in thymus cells.

In general, the results clearly indicate the effect of vitamin B_6 on the incorporation of ^3H -thymidine in the thymus. After the administration of pyridoxine there was a tenfold increase in thymine incorporation. The difference was statistically significant ($p < 0,001$) compared with the control. The histochemical studies of histones revealed that in the animals receiving vitamin B_6 , the fraction of cells with high levels of these proteins dropped to 6% while in the control animals such cells made 20% of total number of cells.

Ванда Фидек

Инкorporация ^3H - тимидина и изменение уровня гистонов
в клетках зубной железы неполовозрелых крыс
в результате внутрибрюшинной инъекции витамина B_6

Резюме

Опыты ставили на неполовозрелых самцах крысы линии Wistar /в возрасте 23 дней/. Животных поделили на контрольную и подопытную группы. Животные контрольной группы были инъецированы внутрибрюшинно один раз в день дозой 2,5 μCi ^3H -тимидина на 1 г веса тела, затем в организм животных той же группы /так-

же внутривенно/ вводили на протяжении очередных 9 дней в 24-часовых промежутках времени 0,2 мл водного раствора физиологической соли /0,9% NaCl/ на одну особь.

Животным подопытной группы вводили 2,5 мCi ³H-тимидина на 1 г веса тела, а затем в течение очередных 9 дней /в 24-часовых промежутках времени/ внутривенно инъецировали 0,2 мл витамина B₆ на 1 особь. После окончания вышеупомянутого опыта брали материал зубной железы для исследования инкорпорации ³H-тимидина, а также для исследования количества гистонов в отдельных клетках зубной железы.

Благодаря всем перечисленным опытам получены результаты, указывающие на сильное влияние витамина B₆ на инкорпорацию ³H-тимидина в клетках зубной железы. После введения пиридоксина, упомянутые результаты были девятикратно выше по сравнению с контрольной группой, что является статистически существенной разницей /p < 0,001/. Гистохимические исследования гистонов показывают, что у животных, в организм которых вводили витамин B₆, количество клеток, содержащих высокий уровень этих белков, уменьшилось до 6%, в контрольных же группах результат равнялся 20%.