

Zakład Histologii i Embriologii. Instytut Biologiczno-Morfologiczny.

Akademia Medyczna w Lublinie

Kierownik: prof. dr hab. n. med. Stanisław Grzycki

Wojewódzki Szpital Onkologiczny w Lublinie

Dyrektor: doc. dr hab. n. med. Mieczysław Kwiatkowski

Krystyna CZERNY, Maria KALASIEWICZ,
Zofia KOSTKOWSKA

Badania cytochemiczne bezziaźnistych krwinek białych u chorych na odoskrzelowego raka płuc

Цитохимические исследования агранулоцитов у больных бронхогенным
раком легких

A Cytochemical Study on Agranulocytes in the Peripheral Blood of Patients with
Carcinoma of the Lungs

Około 30 lat trwają badania, dzięki którym uzyskano szereg preparatów o właściwościach cytostatyków. Znalazły one zastosowanie w paliatywnym leczeniu zaawansowanych postaci nowotworów złośliwych jako metoda samodzielna lub jedno z ogniw postępowania kompleksowego obok chirurgii i radioterapii. Jednym z najskuteczniejszych leków przeciwnowotworowych, należących do grupy środków alkilujących, okazał się endoxan (cytoxan). Znalazł zastosowanie w leczeniu ziarnicy złośliwej (1, 9), raka sutka (1, 3), raka oskrzela (2, 4, 7), szpiczaka (1) i wielu innych schorzeń nowotworowych. Może być stosowany domięśniowo, doustnie, do jam ciała lub dożylnie. Depresyjne działanie endoxanu na szpik objawia się leukopenią, która ma charakter odwracalny. Może występować również trombocytopenia (2, 7). B u c n e r i wsp. podają przypadki powikłań infekcyjnych u niektórych chorych leczonych dużymi dawkami tego cytostatyku (2). W badaniach nad działaniem endoksanu wiele miejsca poświęcono granulocytopenii, mniej zajmowano się obrazem limfocytów i monocytów, choć lek ten znalazł zastosowanie w leczeniu białaczek limfatycznych. Praca nasza zajmuje się skutkami działania endoxanu na krwinki białe bezziaźniste. Zastosowano metody cytochemiczne, wybierając odczyny, których obraz łączy się ze stanem czynnościowym komórek.

MATERIAŁ I METODY

Wykonywano rozmazy z krwi obwodowej 7 mężczyzn w wieku 42—77 lat, leczonych w Wojewódzkim Szpitalu Onkologicznym w Lublinie z powodu płaskonabłonkowego odoskrzelowego raka płuc. Materiał do badania drobnowidowego uzyskiwano drogą bronchoskopii. Stosowano endoxan we wlewnych dożylnych, podając jednorazowo dawkę 30 mg/kg ciężaru ciała, nie przekraczając 2000 mg. Krew pobierano tuż przed wlewem kroplowym (I grupa), 2 godz. po zakończeniu wlewu (II grupa) i w tydzień później (III grupa). Reakcje histochemiczne przeprowadzono na

preparatach nieutrwalonych i utrwalonych w parach formaliny. Wykonano następujące odczyny: PAS, PAS-dimedon, barwienie błękitem alcjanowym, reakcja Bracheta, reakcja Feulgena, barwienie Sudanem III, reakcje na aktywność fosfatazy zasadowej, fosfatazy kwaśnej, esterazy niespecyficzne i dehydrogenazę bursztynianową. Postępowano wg metod podanych w pracy Kowalewskiego (5). Reakcje przeprowadzono również na rozmazach krwi obwodowej osób zdrowych. W dniu wlewu dożylnego (grupy I i II) oraz po upływie tygodnia (grupa III) oznaczono ilościowo zawartość krwinek białych, a wśród nich procentową ilość limfocytów i monocytów w 1 mm³ krwi obwodowej.

WYNIKI BADAŃ

Grupa I (Krew pobrana przed dożylnym wlewem endoxanu).

Limfocyty i monocyty wykazują bardzo słabo dodatnie lub ujemne odczyny PAS i PAS-dimedon. Po zastosowaniu błękitu alcjanowego cytoplazma barwi się dyfuzyjnie. Niektóre monocyty zawierają odczyn drobnoziarnisty. Zrąb jąder agranulocytów (reakcja Feulgena) jest prawidłowy. Również po wykonaniu reakcji Bracheta pironinochłonność cytoplazmy nie różni się od występującej w preparatach krwi osób zdrowych. Nie stwierdzono obecności substancji barwiących się Sudanem III. Odczyn na fosfatazę kwaśną w cytoplazmie limfocytów jest ujemny, natomiast w monocytach — drobnoziarnisty. Nie występuje w obserwowanych komórkach aktywność fosfatazy zasadowej. Monocyty wykazują lekko dodatnią reakcję na esterazy niespecyficzne (ryc. 1). Aktywność dehydrogenazy bursztynianowej w limfocytach jest dość silna, monocyty zawierają pojedyncze ziarenka formazanu, podobnie jak we krwi osób zdrowych.

Grupa II (Krew pobrana w 2 godz. po zakończeniu wlewu).

Limfocyty po wykonaniu reakcji PAS i PAS-dimedon są niezabarwione. Monocyty w cytoplazmie zawierają nieliczne ziarnistości PAS-pozytywne, podobny obraz występuje po wykonaniu reakcji PAS-dimedon. Po użyciu błękitu alcjanowego odczyn w limfocytach jest często silniejszy (ok. 50%) w porównaniu z grupą I. Również pojedyncze monocyty mają cytoplazmę intensywnie zabarwioną. Jądra agranulocytów po wykonaniu reakcji Feulgena nie wykazują zmian struktury, podobnie nie zmienia się pironinochłonność cytoplazmy (reakcja Bracheta). Nadal nie stwierdza się obecności substancji sudanochłonnych. Aktywność fosfatazy kwaśnej w limfocytach jest słaba. W monocytach występuje odczyn drobnoziarnisty, dość silny. Odczyn na fosfatazę zasadową w badanych komórkach jest ujemny. Reakcja na esterazy niespecyficzne w porównaniu z grupą I w limfocytach i monocytach jest osłabiona, często ujemna (50%). Stwierdza się dość silną aktywność dehydrogenazy bursztynianowej w limfocytach, nie zmienioną w cytoplazmie monocytów.

Grupa III (Krew pobrana po 1 tygodniu od chwili wlewu).

Reakcja PAS i PAS-dimedon w limfocytach jest mało intensywna (ryc. 2). Natomiast stwierdza się silniejsze zabarwienie błękitem alcjanowym. Zrąb jąder w niektórych limfocytach i około 50% monocytów (ryc. 3) jest mniej gęsty, słabiej wybarwiony (reakcja Feulgena) aniżeli w grupie II. Zmniejszyła się również pironinochłonność cytoplazmy agranulocytów. Odczyn na aktywność fosfatazy kwaśnej w limfocytach jest ujemny, w monocytach dość intensywny (ryc. 4). Jak w grupach poprzednich, nie stwierdza się aktywności fosfatazy zasadowej. Osłabione są reakcje na aktywność esteraz niespecyficznych i dehydrogenazy bursztynianowej zarówno w limfocytach, jak i w monocytach.

Wyniki oznaczeń ilościowych w badanych grupach nie wykazały wyraźnych różnic w ogólnej liczbie leukocytów i w odsetkach limfocytów i monocytów.

OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ I WNIOSKI

Chorzy, których poddano obserwacjom, nie byli uprzednio leczeni innymi metodami z powodu raka oskrzela. Ze względu na znaczny stopień zaawansowania procesu nowotworowego zostali zakwalifikowani wyłącznie do chemioterapii. Jako wykładnik stanu metabolicznego agranulocytów ich krwi obwodowej zastosowano badania cytochemiczne. Stwierdzono, że po tygodniu od chwili wlewu endoxanu zmniejszyła się aktywność dehydrogenazy bursztynianowej. Enzym ten jest bardzo wrażliwy na czynniki uszkodzające komórkę. K o w a l e w s k i (5) stwierdza, że zmniejszenie aktywności dehydrogenazy bursztynianowej u chorych na ostrą białaczkę limfatyczną spowodowane jest wzmożoną podatnością tych komórek na czynniki uszkodzające środowiska zapalnego. Obserwowane w obecnej pracy osłabienie aktywności przemawia za zmniejszeniem zapotrzebowania energetycznego, a tym samym intensywności procesów życiowych agranulocytów. Już po upływie 2 godzin od chwili zakończenia wlewu endoxanu zmniejszyła się aktywność esteraz niespecyficznych w monocytach i limfocytach. Zjawisko to występowało również po upływie tygodnia. Zgodnie ze spostrzeżeniami L e d e r a i wsp. (16), odczyn na esterazy niespecyficzne może dobrze ilustrować stopień nasilenia procesów metabolicznych komórek. Zauważony w obecnych badaniach wzrost aktywności fosfatazy kwaśnej spowodowany jest czynnikami uszkodzającymi komórkę, nie ma podstaw przypuszczać, że nasiliły się procesy fagocytozy. Brak aktywności fosfatazy zasadowej w agranulocytach zgodny jest z wynikami uzyskanymi podczas badań krwi osób zdrowych. Wzrost intensywności zabarwienia błękitem alcjanowym jest prawdopodobnie zjawiskiem niespecyficznym, potwierdzają to obserwacje węglo-

wodanów po zastosowaniu reakcji PAS i PAS-dimedon. Właściwości alkilujące endoxanu, jego działanie na DNA tłumaczą zmiany w strukturze jąder limfocytów i monocytów (zmniejszenie barwliwości, rozrzedzenie zrębu). Uszkodzający wpływ leku powoduje również zmniejszenie pironochłonności cytoplazmy. Ciała tłuszczowe komórki jak wynika z barwienia Sudanem III, nie biorą udziału w obserwowanych procesach. Porównując ilości krwinek białych z wynikami cytochemicznymi stwierdzono, że po tygodniu od chwili jednorazowego dożylnego wlewu endoxanu w ilości 30 mg/kg nie obserwuje się u chorych wyraźnej leukopenii oraz różnic w odsetkach limfocytów i monocytów. Podana dawka cytostatyku nie wpłynęła ujemnie na stan ogólny chorych. Działanie toksyczne leku ograniczyło się do wystąpienia nudności i utraty łaknienia trwających przeciętnie jedną dobę. Na podstawie przeprowadzonych badań można wyprowadzić wnioski, że zastosowane leczenie nie wpływa w istotny sposób na ilość bezziaarnistych komórek krwi i w niewielkim stopniu powoduje osłabienie metabolizmu komórkowego. Nie zauważa się wyraźnych objawów degeneracji limfocytów i monocytów.

PISMIENICTWO

1. Boesen E., Davis W.: Chemioterapia nowotworów. Leki cytostatyczne, PZWL, Warszawa 1972.
2. Buckner C. D., Rudolph R. H., Feler A., Clift R. A., Epstein R. B., Funk D. D., Neimen P. E., Slichter S. J., Storb S., Thomas E. D.: *Cancer* **29**, 357—365, 1972.
3. Glińska H., Chrzanowska A.: *Nowotwory*, **2**, 149—153, 1967.
4. Górecki R., Brodziak R., Gondrowicz K., Starek E.: *Gruźlica* **37**, 251—255, 1969.
5. Kowalewski J.: *Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, Sec. D*, **22**, 21—46, 1967.
6. Leder L. D.: *Beitz. Path.* **141**, 286—287, 1970.
7. Ratajek M.: *Wiad. Lek.* **23**, 15—18, 1970.
8. Sadliński C., Stadnik J., Włodarczyk D., Biskupek H.: *Pol. Tyg. Lek.*, **24**, 1811—1813, 1969.
9. Topolska P., Rostkowska J.: *Wiad. Lek.* **8**, 127—130, 1966.

Otrzymano 17 I 1976.

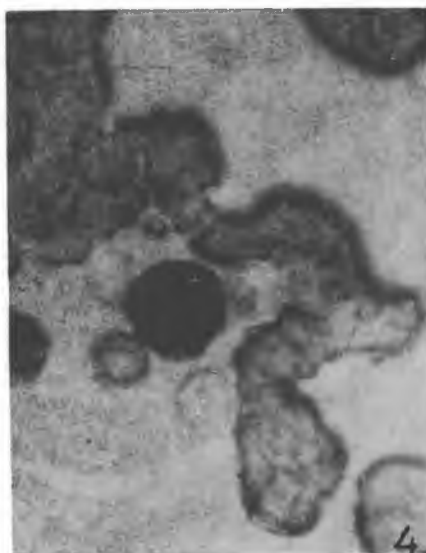
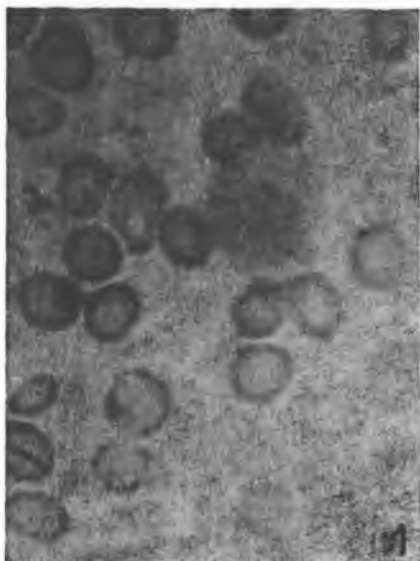
OBJAŚNIENIE RYCIŃ

Ryc. 1. Grupa I. Reakcja na aktywność esteraz niespecyficznych w cytoplazmie monocyta. Pow. 1000×.

Ryc. 2. Grupa III. Barwienie PAS-dimedon. Słaby odczyn w limfocycie. Pow. 1000×.

Ryc. 3. Grupa III. Reakcja Feulgena. Zrąb jądra monocyta słabo wybarwiony. Pow. 1000×.

Ryc. 4. Grupa III. Reakcja na aktywność fosfatazy kwaśnej intensywna w monocycie. Jądra podbarwione hematoxyliną Mayera. Pow. 1000×.



РЕЗЮМЕ

Исследовали лимфоциты и моноциты периферической крови больных carcinoma bronchogene planoepitheliale, которые были лечены при помощи эндоксана (endoxan) (однократное внутривенное вливание 30 мг/кг).

Примененные цитохимические методы (активность энзимов, нуклеиновые кислоты и полисахариды) показали, что спустя неделю от момента вливания наступает незначительное уменьшение метаболизма агранулоцитов.

SUMMARY

Lymphocytes and monocytes in the peripheral blood of patients with carcinoma planoepitheliale bronchogenes treated with Endoxan (single intravenous infusion of 30 mg/kg) were investigated.

The cytochemical methods used (enzymes activity detection, nucleic acids and polysaccharides detection) have shown that one week after the administration of the drug the agranulocytes metabolism is slightly reduced.

EXPLANATION TO FIGURES

Fig. 1. Group I. Reaction for non-specific esterases in monocyte's cytoplasm. Enlargement $\times 1000$.

Fig. 2. Group III. PAS-dimedon counterstained preparation. A slight reaction in lymphocyte. Enlargement $\times 1000$.

Fig. 3. Group III Feulgen's reaction. Monocyte nucleus stroma slightly stained. Enlargement $\times 1000$.

Fig. 4. Group III. Intensive reaction for acid phosphatase activity in monocyte. Nucleus stained with Mayer's haematoxylin. Enlargement $\times 1000$.

