

16. Kallas H.—Klin. Wschr., 1930, 29, 1345.
17. Klinefelter H. et al.—J. Clin. Endocrin., 1943, 3, 529.
18. Nelson N.—Anat. Record., 1933, 56, 3, 241.
19. Smith P.—J. Amer. Med. Assoc., 1927, 88, 158.

Надійшла до редакції
18.VIII 1968 р.

ЦИТОХІМІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ НУКЛЕІНОВИХ КИСЛОТ І ГЛІКОГЕНУ В КЛІТИНАХ КРОВІ І КІСТКОВОГО МОЗКУ ЩУРІВ З ПЕРЕЩЕПНИМ ЛЕЙКОЗОМ ШВЕЦА В ПРОЦЕСІ РОЗВИТКУ ЗАХВОРЮВАННЯ І ЛІКУВАННЯ ДИНАФТИМІНОМ

В. Г. Комісаренко

Київський інститут гематології і переливання крові

Проблема вивчення лейкозів внаслідок різкого поширення цього захворювання стала першочерговим завданням.

У з'ясуванні патогенетичної суті лейкозів одне з перших місць посідає вивчення обмінних процесів на рівні клітини.

Найбільшу увагу в працях по дослідженню внутріклітинного обміну при лейкозах приділяють вивченню нуклеїнових кислот. Встановлений рядом авторів факт відмінностей у фізико-хімічній структурі нуклеїнових кислот та зміни їх вмісту і біологічних властивостей при різних формах лейкозного процесу дозволяють вважати однією з найважливіших ланок у патогенезі лейкозу порушення синтезу і обміну нуклеїнових кислот. Не менш важливе значення при цьому має вивчення вуглеводного обміну, зокрема глікогену.

Однією з найважливіших функцій нуклеїнових кислот є регуляція біосинтезу білка і передача спадкової інформації у клітині.

ДНК і РНК поряд з білками є матеріальним субстратом таких важливих для життя процесів, як ріст і розмноження, а глікоген це основна енергетична речовина, що забезпечує різні функції клітин.

В літературі описані результати цитохімічного вивчення внутріклітинного обміну, які свідчать про зміни нуклеїнових кислот і глікогену при різних формах лейкозів [3, 4, 6, 12, 14, 17].

Ми вивчали динаміку порушення вмісту нуклеїнових кислот і глікогену на різних етапах розвитку захворювання з моменту перещеплення лейкозу до термінальної стадії; нас цікавило з'ясувати, чи передують зміни цих показників клінічним і морфологічним проявам лейкозу, а також зміни їх у процесі лікування цитостатичним препаратом.

Дослідження проведені в хронічних умовах на 165 щурах.

Для вивчення вмісту і розподілу РНК, ДНК і глікогену у клітинах гемопоетичної тканини у процесі розвитку і лікування лейкозу ми застосували модель експериментального лейкозу, вперше одержаного Швецом та ін. [18] в результаті введення молодим щуренятам лінії Вістар безклітинного центрифугата із злоякісної мезенхімально-епітеліальної пухлини. У нашому дослідженні штам лейкозу Швеца успішно перещеплювався як на щурах лінії Вістар, так і на безпородних.

Матеріалом для перещеплення служила 40—45%-на суспензія подрібненої пухлинної тканини на ізотонічному розчині кухонної солі; перещеплення здійснювали підшкірно по 0,4—0,5 мл на імплантацію.

Для лікування був застосований динафтимін (препарат 484), одержаний Г. І. Деркачем в Інституті органічної хімії АН УРСР, який проявив сприятливий терапевтичний ефект при лікуванні щурів з перещепним лейкозом Швеца [5].

Препарат вводили підшкірно у бік, протилежний перещепленню лейкозних клітин, в дозі 10—15 мг/кг, починаючи з п'ятого-шостого дня після трансплантації лейкозу, щодня, протягом чотирьох днів.

У клітинних елементах периферичної крові і кісткового мозку визначали: ДНК за методом Фельгена, РНК за методом Браше, глікоген за Шабадашем. Морфологічний контроль здійснювали на мазках, забарвлених за Паппенгеймом. Цитохімічні дослідження провадили у динаміці: у здорових щурів, потім на п'ятий, десятий і 15-й день після перещеплення лейкозу у щурів піддослідних (лікованих) і контрольних (нелікованих) груп. У деяких груп піддослідних тварин дослідження провадили також на 20-й і 25-й дні після трансплантації лейкозу.

Інтенсивність реакції на нуклеїнові кислоти і глікоген визначали нарізно у клітинних категоріях кровотворної системи за такими групами: родонаціальні клітини (гемогістіобласти, гемогістіоцити, гемоцитобласти, мієлобласти), мієлоцити і юні, зрілі гранулоцити (паличкоядерні і сегментоядерні), лімфоцити, еритробласти і нормобласти.

Уявлення про кількісні зміни ДНК, РНК і глікогену одержували на підставі диференціального підрахунку під імерсійною системою мікроскопа 100 клітинних елементів після відповідного забарвлення з оцінкою його інтенсивності в ядрі і цитоплазмі за шестибальною системою.

Для об'єктивної оцінки результатів виводили середній гістохімічний коефіцієнт (СГК), як це прийнято при проведенні таких досліджень [3, 4, 6], за формулою, запропонованою Астальді і Верга.

При аналізі одержаних даних були використані методи варіаційної статистики.

Вивчення розподілу і вмісту нуклеїнових кислот в елементах кровотворної тканини здорових щурів показало, що в процесі клітинної диференціації інтенсивність забарвлення клітин змінюється.

Найбільший вміст РНК відзначається в цитоплазмі і ядрах родонаціальних клітин кісткового мозку. В міру дозрівання елементів мієлоїдної і еритропоетичної систем спостерігається зменшення вмісту РНК в цитоплазмі, чому відповідає ослаблення піронінофілії.

Дезоксирибонуклеїнова кислота визначається в ядрах клітин. У родонаціальних клітинах кровотворної тканини ДНК виявляється у вигляді ніжної сіточки, розташованої відповідно сплетенням ниток хроматину. У процесі диференціації клітин кісткового мозку інтенсивність реакції Фельгена підвищується. Відповідно змінюється також характер розподілу ДНК.

Більшою або меншою мірою виражена позитивна реакція цитоплазми на глікоген виявляється на всіх стадіях дозрівання гранулоцитів. Цитохімічно глікоген визначається, починаючи з стадії промієлоциту, про що свідчить ніжнорожеве дифузне забарвлення цитоплазми цих клітин. В міру дозрівання елементів мієлоїдного ряду вміст глікогену в них збільшується, досягаючи максимуму в зрілих гранулоцитах.

При цитохімічному дослідженні елементів гемопоетичної тканини щурів з лейкозом Швеца було встановлено зменшення вмісту РНК, а також зниження інтенсивності реакції на ДНК, починаючи з п'ятого дня після перещеплення штаму, ще до появи виражених клінічних і морфологічних ознак, характерних для лейкозного процесу.

У клітинах крові і кісткового мозку відзначалось також зниження вмісту глікогену, спостережуване вже на п'ятий день після трансплантації лейкозу. В еритроблестах, які не містять у нормі глікоген, при лейкозі Швеца виявлялась позитивна реакція-ШИК.

Розвиток захворювання супроводжувався більш чітким зменшенням вмісту РНК, ДНК і глікогену в цитоплазмі клітин. Причому, ступінь зниження реакції на РНК і глікоген відповідав глибині і тяжкості лейкозного процесу.

Проте, у поодиноких тварин визначали чітке підвищення інтенсивності ШИК-реакції в особливо тяжких випадках перебігу захворювання з вираженою картиною генералізованого лейкозу. Збільшення кількості глікогену відзначено у всіх нейтрофільних клітинах. Вміст РНК і ДНК у цих щурів був значно знижений.

Підвищення рівня глікогену, спостережуване при тяжкому перебігу перещепного лейкозу і звичайно поєднуване з різким зниженням вмісту РНК і ДНК, вказує на особливо глибоке порушення усього обміну в лейкемічних клітинах. Ці випадки найбільш демонстративно підкреслюють можливий патогенетичний зв'язок між зрушенням обмінних процесів у клітинах, порушенням взаємовідношення різних аспектів обміну і глибиною ураження кровотворення при лейкозі.

Одержані нами дані, які свідчать про зниження вмісту РНК, ДНК і глікогену в клітинах гемопоетичної тканини, в процесі розвитку експериментального лейкозу збігаються з результатами досліджень [1, 12], в яких вивчали ці цитохімічні показники у людей, хворих на лейкоз, а також з даними, одержаними при вивченні цього ж штаму [3].

Особливої уваги, на нашу думку, заслуговує виявлюване (статистично достовірне) зниження концентрації РНК, ДНК і глікогену, що передуює появі характерних гематологічних і морфологічних ознак розвинутого лейкозу; це можна використати для ранньої діагностики і встановлення закінчення ремісії, одержаної в результаті лікування.

Виявлене нами зниження вмісту глікогену в клітинах кровотворної тканини у процесі розвитку лейкозу Швеца свідчить про участь цього полісахариду в загальному патологічному комплексі, що викликає обмінні порушення у клітинах, в результаті яких настають дегенеративні зміни, характерні для лейкозного процесу.

Наші припущення збігаються з результатами біохімічних досліджень глікогену у людей з гострим лейкозом [7, 15]. Автори пов'язують зниження глікогену в клітинах із зменшенням активності фосфорилази в них.

При цитохімічному визначенні рибонуклеїнової кислоти в клітинах крові і кісткового мозку щурів з перещепним лейкозом, лікованих динафтиміном, обчислення середнього гістохімічного коефіцієнта показало наближення рівня РНК у цитоплазмі родоначальних клітин і еритробластів до вихідних величин. З боку нейтрофільних гранулоцитів і лімфоцитів ступінь нагромадження піронінофільної речовини у лікованих щурів був нижчим, ніж у здорових, проте, значно перевищував вміст РНК у лейкозних (контрольних) щурів.

Обчислення середнього гістохімічного коефіцієнта при визначенні ДНК у клітинах кровотворної тканини лікованих щурів показало, що нормалізація вмісту ДНК в ядрах клітин настає через 10—15 днів після закінчення лікування.

Деяке відставання нормалізації РНК і ДНК (більшою мірою ДНК) від гематологічної картини, видимо, пояснюється пригнічуючим впливом препарату на синтез нуклеїнових кислот у лейкоцитах, що до деякої міри можна пов'язати з лейкопенічним впливом цього препарату. Підтвердженням висловленої думки служить обчислення СГК при визначенні нуклеїнових кислот в еритробластих і нормобластих, в яких наприкінці дослідження спостерігалась нормалізація вмісту РНК і ДНК у лікованих щурів щодо вихідних даних.

Дані, аналогічні результатам наших досліджень, були одержані Грушиною [2], Черновим та ін. [13] в дослідях на щурах з саркомою 45, лікованих похідним етиленіміну-ТЕФ. Паралельно з гальмуванням росту пухлини автори відзначали закономірне зменшення вмісту нуклеїнових кислот.

Дез'ярдінс та ін. [16], вивчаючи синтез ДНК у щурів з перещепною пухлиною Уокера шляхом внутріочеревинного введення тимідину-Н-³ відзначали пригнічення синтезу ДНК під впливом вінбластину.

Результати цитохімічного дослідження РНК, ДНК і глікогену у клітинах крові і кісткового мозку здорових шурів з перещепним лейкозом Швеца і при лікуванні динафтиміном у динаміці

Цитохімічні показники	Групи клітин	Вихідні дані	П'ятий день після перещеплення лейкозу	Дні досліджень			
				Десятий день після перещеплення лейкозу		15-ий день після перещеплення лейкозу	
				ліковані	неліковані	ліковані	неліковані
РНК	Родоначальні	4,48 ± 0,02	4,21 ± 0,054	4,39 ± 0,017	4,23 ± 0,013	4,44 ± 0,028	3,93 ± 0,037
	Мієлоцити, юні	3,38 ± 0,036	2,84 ± 0,014	3,14 ± 0,042	2,86 ± 0,035	3,19 ± 0,024	2,62 ± 0,039
	Зрілі гранулоцити	1,54 ± 0,012	1,43 ± 0,013	1,36 ± 0,026	1,33 ± 0,022	1,36 ± 0,049	1,10 ± 0,021
	Лімфоцити	3,49 ± 0,021	3,07 ± 0,042	3,01 ± 0,087	2,79 ± 0,069	2,93 ± 0,073	2,54 ± 0,072
	Еритробласти, нормобласти	3,54 ± 0,056	3,18 ± 0,052	3,37 ± 0,052	3,08 ± 0,031	3,68 ± 0,049	3,13 ± 0,06
ДНК	Родоначальні	1,07 ± 0,007	1,05 ± 0,005	1,03 ± 0,003	1,03 ± 0,004	1,03 ± 0,023	1,02 ± 0,004
	Мієлоцити, юні	1,35 ± 0,01	1,33 ± 0,022	1,25 ± 0,018	1,27 ± 0,023	1,23 ± 0,031	1,21 ± 0,024
	Зрілі гранулоцити	1,85 ± 0,024	1,67 ± 0,024	1,51 ± 0,036	1,44 ± 0,039	1,51 ± 0,046	1,38 ± 0,061
	Лімфоцити	2,43 ± 0,032	2,25 ± 0,035	2,10 ± 0,043	2,08 ± 0,047	1,89 ± 0,064	1,90 ± 0,084
	Еритробласти, нормобласти	3,77 ± 0,103	3,59 ± 0,062	3,40 ± 0,063	3,28 ± 0,093	3,67 ± 0,068	3,15 ± 0,09
Глікоген	Мієлоцити, юні	0,95 ± 0,018	0,87 ± 0,023	1,00 ± 0,009	0,89 ± 0,024	0,98 ± 0,016	0,76 ± 0,025
	Зрілі гранулоцити	2,91 ± 0,032	2,49 ± 0,029	3,16 ± 0,042	2,27 ± 0,044	3,16 ± 0,048	2,12 ± 0,097

У наших дослідженнях на лейкозних щурах деяке пригнічення нуклеїнових кислот при лікуванні динафтиміном виявлялось, видимо, з переважним впливом на синтез ДНК і меншою мірою — на синтез РНК.

Цитохімічне дослідження ШИК-реакції при визначенні глікогену в клітинах гемопоетичної тканини показало, що у щурів з перещепним лейкозом Швеца, лікованих динафтиміном, вміст ШИК-позитивної речовини в цитоплазмі молодих клітин гранулоцитарного ряду нормалізується наприкінці досліду, а в зрілих гранулоцитах навіть дещо перевищує вихідний рівень, що, мабуть, можна пояснити впливом препарату на синтез глікогену. Як відомо, синтез цього полісахариду в лейкоцитах здійснюється уридиндифосфатглюкозним шляхом [7, 9, 10]. Можливо, динафтимін, посилюючи активність ферментів і кофакторів синтезу глікогену, тим самим збільшує його утворення. Більш швидка нормалізація вмісту глікогену в молодих гранулоцитах кісткового мозку цілком обгрунтована, оскільки ці клітини здатні до активної диференціації, і тривалість їх життя значно менша, ніж зрілих гранулоцитів крові. Отже, наприкінці досліду (через чотири-п'ять днів після закінчення лікування) у кістковому мозку переважали новоутворені клітини, які не зазнали дії препарату, тоді як у периферичній крові ще продовжували циркулювати лейкоцити, що перебували під впливом лікарської речовини.

Отже, в результаті проведених досліджень вдалося встановити певні відмінності у вмісті РНК, ДНК і глікогену в клітинах гемопоетичної системи здорових щурів з перещепним лейкозом і лікованих цитостатичним препаратом.

Це дає можливість припускати, що виявлені цитохімічні зміни вмісту нуклеїнових кислот і глікогену є істотним фактором, що відіграє важливу роль у патогенезі цього тяжкого захворювання.

Література

1. Алмазов В. А., Павлов Б. А., Рябов С. И.— Пробл. гематол. и перелив. крови, 1963, 4, 15.
2. Грушина А. А.— Вопр. онкологии, 1955, 1, 4, 51.
3. Глузман Д. Ф.— Цитохим. исслед. клеток крови и костного мозга при переливном и индуцир. РНК лейкозе крыс, Автореф. дисс. канд., К., 1966.
4. Казанова Л. И.— Динамика измен. нуклеин. кислот в элементах гемопоэза при лейкозах и некоторых апластич. сост. кроветворения (цитохим. исслед.), Автореф. дисс. канд., М., 1964.
5. Киндзельский Л. П.— Изучение противолейкозного действия препарата 484. Дисс. канд., К., 1965.
6. Ковалева Л. Г.— Клинико-цитохим. параллели при остром лейкозе, Автореф. дисс. канд., М., 1965.
7. Луганова И. С., Владимиров А. Д., Сейц И. Ф.— В кн.: Актуальные вопросы гематол. и перелив. крови, Л., 1963, 231.
8. Луганова И. С., Сейц И. Ф.— Вопр. онкологии, 1964, X, 7, 38.
9. Сейц И. Ф.— Сб. научн. трудов Ленингр. НИИ перелив. крови, Л., 1963, 14.
10. Сейц И. Ф.— Вести. АМН СССР, 1965, 4, 10.
11. Сейц И. Ф., Луганова И. С.— Биохимия клеток крови и костного мозга в норме и при лейкозах, Л., 1967.
12. Терентьева Э. И., Зисимовская А. И., Казанова Л. И.— Пробл. гематол. и перелив. крови, 1957, 5, 24.
13. Чернов В. А., Захарова Ж. Ф.— Вопр. онкологии, 1957, 3, 5, 546.
14. Шубич М. Г.— Пробл. гематол. и перелив. крови, 1958, 3, 16.
15. Askerman G.— Blood, 1964, XXIV, 4, 372.
16. Desjardins R., Grogan D., Arendell J., Busch H.— Cancer Res., 1967, 27, 1, 159.
17. Hayhoe F., Quaglino D., Doll R.— The cytology and cytochemistry of acute leukemias, A Study of 140 cases. London, 1964.
18. Svec F., Hlavay E., Thurzo V., Kossey P.— Acta Haemat., 1957, 17, 1, 34.