

ПРО ПРОЛІФЕРАТИВНУ АКТИВНІСТЬ КІСТКОВОГО МОЗКУ ЩУРІВ У НОРМІ ТА ПРИ ПРИГНІЧЕННІ КРОВОТВОРЕННЯ БЕНЗОЛОМ

В. Н. Ф р а ш

Свердловський інститут гігієни праці профпатології

При вивченні нормального і патологічного гемопоєзу істотне значення надається кількісному дослідженню проліферативної активності кровотворної тканини [1, 3—5, 8, 11, 13, 14, 18, 19]. Проте відомості щодо проліферативної активності кісткового мозку за нормальних умов суперечливі, а за умов гемопоєзу відсутні.

Ми вивчали стан проліферативної активності окремих клітинних груп кісткового мозку щурів у нормі та при експериментальній бензолній інтоксикації.

Методика досліджень

Досліди проведені на 40 щурах вагою 180—230 г. Бензол вводили щодня підшкірно по 2,5 мл/кг протягом 30 днів.

Було використано два способи визначення часових параметрів проліферативної активності клітин кісткового мозку — з допомогою мітотичних і статмокінетичних індексів [8, 11] та за даними мієлограми і мітотичними індексами [13, 14]. Загальні мітотичні індекси обчислювали в забарвлених за Романським мазках кісткового мозку стегнових кісток в розрахунку на 3000 клітин; загальні статмокінетичні — на 500 клітин. Специфічні мітотичні індекси визначали не менш ніж на 100 клітин даного виду, а статмокінетичні — на 50 клітин. Статмокінетичні індекси визначали через 5 год після введення колхіцину в дозі 1,2 мг/кг. У спеціальній серії дослідів ми заздалегідь переконалися, що сам бензол за умов п'ятигодинного впливу статмокінетичного ефекту не дає.

Одержані показники мітотичних I_m і статмокінетичних I_{st} індексів використовували для визначення часу мітозу t_m і генераційного часу t_g . Відомо, що при стаціонарному стані гемопоєзу, наприклад, у нормальних тварин $I_m = \frac{t_m}{t_g}$. При бензолній гемопатії

стан гемопоєзу, взагалі кажучи, нестаціонарний. Проте за умов даного дослідів у період з 20 до 30 дня введення бензолу клітинність кісткового мозку практично не змінювалась, залишаючись на рівні 63—65% від вихідної. Клітинність кісткового мозку визначали підрахуванням кількості ядровмісних клітин у кістковому мозку стегнової кістки. Для цього забивали по три — чотири щури кожні три — шість днів дослідів.

Отже, стан гемопоєзу піддослідних тварин між 20 і 30 днем можна вважати приблизно стаціонарним і тому застосовували згадане рівняння і при бензолній гемопатії.

Для обчислення t_m застосовували I_{st} . За Дастінім [11], $t_m = \frac{I_m}{I_{st}}(t-1)$, де t — час дії колхіцину, в наших дослідів $t=5$ год. Знаючи t_m , легко визначити t_g з першої формули.

Для визначення часових параметрів кінетики клітин кісткового мозку ми застосували також метод Кілмана та ін. [13, 14]. Автори визначали «час проходження через підрозділ (compartment transit time — CTT) показник, аналогічний генераційному часу. CTT родоначальних клітин гранулопоєзу і еритропоєзу (ними були прийняті відповідно мієлобласт і проеритробласт) обчислювали за рівнянням $CTT = \frac{N_0}{K_m}$, де N_0 — число мієлобластів або проеритробластів, K_m — швидкість мітозу (у числі мітозів за годину на 1000 клітин даного підрозділу). Розрахунок провадили для $N_0=1000$. Для наступних мітотично активних клітинних підрозділів (промєлоцитів, мієлоцитів, базофілних і по-

ліхроматофільних еритробластів) обчислювали два значення CTT — максимально і мінімально можливі: $CTT_{\max} = \frac{N}{K_{\text{вх}}} CTT_{\min} = \frac{N}{K_{\text{вх}} + K_{\text{м}}} = \frac{N}{K_{\text{вих}}}$, де N — кількість клітин даного підрозділу, що припадають на 1000 родоначальних клітин (обчислюється за даними мієлограми), $K_{\text{вх}}$ — швидкість входу клітин у даний підрозділ, що дорівнює швидкості виходу $K_{\text{вих}}$ клітин з попереднього підрозділу. $K_{\text{м}}$ у цих випадках визначається як $K_{\text{м}} = \frac{1_{\text{м}} \cdot m}{t_{\text{м}}}$, де m — відносна частота клітин даного підрозділу в порівнянні з підрозділом родоначальних клітин, $t_{\text{м}}$ — час мітозу, прийнятий авторами для всіх підрозділів однаковим і рівним 1 год*. Автори відзначають, що істинне значення CTT міститься між $CTT_{\max}$ і $CTT_{\min}$ та залежить від положення мітозу в проліферативній схемі.

CTT неділених підрозділів визначали як $CTT = \frac{N}{K_{\text{вх}}}$.

Результати досліджень

Склад кісткового мозку піддослідних щурів наведено в табл. 1.

Загальні мітотичні та загальні статмокінетичні індекси у «бензолних» щурів були підвищені — відповідно $1,86 \pm 0,39$ і $21,7 \pm 2,36\%$ щодо норми ($0,81 \pm 0,07$ і $10,2 \pm 0,87\%$). Специфічні ж мітотичні індекси змінювались мало, а в деяких випадках вони достовірно підвищувались (табл. 2). Специфічні статмокінетичні індекси здебільшого знижувались.

Таблиця 1

Мієлограма нормальних і «бензолних» щурів (в %)

Вид клітин	Нормальні щури (n=10)			«Бензолні» щури (n=10)			
	X	$\pm S_{\bar{X}}$	m	X	$\pm S_{\bar{X}}$	p	m
Ретикулярні	5,9	1,2		9,0	0,5	<0,001	
Мієлобласти	1,0	0,1	1,0	2,0	0,2	<0,001	1,0
Промієлоцити	2,5	0,3	2,5	4,9	0,6	<0,001	2,45
Мієлоцити	5,5	0,8	5,5	7,7	0,9	>0,1	3,85
Неділені гранулоцити *	48,5	4,3	48,5	36,3	3,6	>0,1	18,15
Проеритробласти	1,0	0,1	1,0	2,0	0,2	<0,001	1,0
Еритробласти базофільні	1,5	0,2	1,5	2,75	0,4	<0,01	1,375
Еритробласти поліхроматофільні	4,1	0,5	4,1	7,25	0,7	<0,01	3,625
Неділені еритробласти **	10,2	0,7	10,2	10,6	1,3	>0,2	5,3
Лімфоцити	11,0	3,0		8,9	2,0	>0,2	
Інші	9,7	1,7		9,5	1,1	>0,2	

Примітка. Тут і в табл. 3; * — метамієлоцити + паличкоядерні + сегментоядерні гранулоцити; ** — поліхроматофільні і оксифільні нормобласти.

Обчислені з табл. 1 і 2 показники t_m , t_g і CTT наведені в табл. 3. Час мітозу клітин гранулоцитарного ряду у «бензолних» тварин був збільшений. Відзначено також значне подовження генераційного часу цих і ретикулярних клітин. Відповідно збільшувався і CTT даних клітинних підрозділів. Водночас генераційний час ділених еритробластів

* В наших обчисленнях для більшої точності застосовано t_m , одержаний коліциновим методом (табл. 3).

Таблиця 2

Специфічні мітотичні і статмокінетичні індекси кісткового мозку піддослідних щурів
(у ‰)

Вид клітин	Мітотичні індекси					Статмокінетичні індекси				
	Норма (n=10)		Бензол (n=10)			Норма (n=10)		Бензол (n=10)		
	X	$\pm S_{\bar{X}}$	X	$\pm S_{\bar{X}}$	p	X	$\pm S_{\bar{X}}$	X	$\pm S_{\bar{X}}$	p
Ретикулярні	14,8	7,3	12,3	4,4		237	26	155	12	<0,01
Мієлобласти	40,5	10	41,2	10		395	63	202	67	>0,02
Промієлоцити	53,7	8,0	81,0	10	>0,05	464	64	272	61	>0,04
Мієлоцити	40,6	5,0	66,6	10,6	>0,03	294	68	218	59	
Проеритро- бласти	58,2	17,5	65,0	6,0		382	27	452	33	
Еритробла- сти базофіль- ні	58,2	17,5	65,0	6,0		382	27	452	33	
Еритробла- сти поліхро- матофільні	125,6	18,4	120,0	12,4		625	50	421	20	>0,04
Ділені ери- тробласти разом *	106,3	13,0	89,0	6,0		592	35	452	34	

Примітка. Тут і в табл. 3: * — проеритробласти+базофільні+поліхроматофільні еритробласти, p наведене тільки для достовірних відхилень ($p \leq 0,05$).

при бензольній інтоксикації у цілому мало змінювалися, а генераційний час найбільш молодих форм еритробластів — проеритробластів і базофільних еритробластів — навіть скорочувався. Відповідно були знижені і величини *СТТ* цих форм еритробластів. *СТТ* неділених (дозріваючих) форм нейтрофільних гранулоцитів і еритробластів значно знижувався (табл. 3).

Значення часу мітозу t_m , «генераційного часу» t_g і «часу проходження через

Вид клітин	t_m (час)				
	Норма		Бензол		
	X	$\pm S_{\bar{X}}$	X	$\pm S_{\bar{X}}$	p
Ретикулярні	0,25	0,15	0,32	0,14	>0,1
Мієлобласти	0,41	0,17	0,82	0,17	>0,06
Промієлоцити	0,46	0,10	1,19	0,22	>0,01
Мієлоцити	0,56	0,21	1,22	0,22	>0,03
Неділені гранулоцити					
Проеритробласти	0,61	0,06	0,58	0,10	>0,1
Еритробласти базофільні	0,61	0,06	0,58	0,10	>0,1
Еритробласти поліхроматофільні	0,80	0,18	0,96	0,26	>0,2
Сума ділених еритробластів	0,73	0,15	0,79	0,13	>0,2
Сума неділених еритробластів					

Обговорення результатів досліджень

Одержані нами дані про загальні і специфічні мітотичні індекси клітин кісткового мозку нормальних щурів, а також про тривалість мітозу, що становить приблизно 1 год [13, 14, 18, 19], узгоджуються з деякими літературними відомостями [1]. Дані про основний кінетичний параметр клітин — генераційний час — також не суперечать нечисленним літературним відомостям [5, 18, 19]. Виявилось, що обчислені нами значення t_g у нормальних тварин перебували в межах відповідних значень $STT_{\min}$ — $STT_{\max}$. Досить невисокі показники t_g свідчать, очевидно, про те, що розмір проліферативного пулу у нормальних щурів близький до 100%.

При бензолній інтоксикації загальний мітотичний індекс підвищувався, що пов'язано зі збільшенням вмістом молодих, мітотично активних клітин у кістковому мозку «бензолних» тварин (табл. 1). Це показує, що розрахування мітотичної активності по відношенню до всіх клітин, без диференціювання — невірне і може призвести до перекуреного уявлення про стан проліферації. Більш цінними для судження про проліферативну активність виявились специфічні мітотичні і, особливо, специфічні статмокінетичні індекси. Найбільш точно стан проліферації відбиває генераційний час. Обчислення STT дозволило до деякої міри оцінити вірність розрахунків t_g , а також дає уявлення про час перебування у кістковому мозку дозріваючих форм гранулоцитів і еритроцитів.

Виявлене в цих дослідах зниження проліферативної активності (подовження генераційного часу) клітин-попередників гранулоцитів показує один з важливих механізмів лейкопенічної дії бензолу [6, 12]. Ці дані свідчать на користь того, що на фоні загального зниження проліферації в кістковому мозку при дії бензолу можливе існування окремих клітинних груп з незміненою або навіть підвищеною проліферацією (ранні форми еритробластів). В літературі є окремі вказівки на збільшення проліферації еритробластів при бензолізмі [7, 12, 15],

Таблиця 3
підрозділення STT для клітин кісткового мозку нормальних і «бензолних» щурів

t_g (час)					STT (час)	
Норма		Бензол			Норма	Бензол
$\bar{x}$	$\pm S_{\bar{x}}$	$\bar{x}$	$\pm S_{\bar{x}}$	p		
16,9	0,1	25,8	0,2	<0,001	16,9	25,8
10,2	0,2	19,8	0,4	<0,001	10,2	19,8
8,8	0,2	14,7	0,4	<0,001	6,3—25,3	11,3—48,8
13,6	0,3	18,4	0,4	<0,001	7,0—14,0	9,0—17,8
					61,5	42,5
10,5	0,2	8,9	0,3	<0,001	10,5	8,9
10,5	0,2	8,9	0,3	<0,001	6,3—15,8	5,2—12,3
8,2	0,4	8,9	0,2	>0,2	4,6—17,3	5,4—13,5
8,5	0,3	8,9	0,2	>0,2		
					11,6	7,8

причому цю обставину поряд з появою атипівних мітозів розглядають як показник лейкозогенної активності бензолу [10, 12, 17].

Зменшення *СТТ* дозріваючих форм гранулоцитів і еритробластів свідчить про їх прискорений вихід з кісткового мозку, що в умовах цитопенії в периферичній крові є, очевидно, компенсаторним пристосуванням. Зменшення проліферативної активності ретикулярних клітин дозволяє припустити, що виявлене нами раніше збільшення їх при бензольній гемопатії [6] також є пристосувальною реакцією — це дозволяє організму зберегти певний рівень камбіальних елементів, здатних до диференціації в специфічні (гемопоетичні, імунокомпетентні і макрофаги [9, 16]).

Висновки

1. Визначення специфічних мітотичних статмокінетичних індексів клітин кісткового мозку може бути використане для обчислення параметрів клітинної кінетики в нормі та при пригніченні гемопоезу.

2. Визначення *СТТ* за способом Кілмана та ін. [13] дозволяє оцінити вірність розрахунків генераційного часу коліциновим методом.

3. При бензольній інтоксикації в кістковому мозку поряд зі зниженням проліферативної активності існують групи клітин з незміненою або підвищеною проліферацією.

Література

1. Богатов Л. В.— Бюлл. exper. биол. мед., 1970, 2, 103.
2. Владимирская Е. Б.— Пробл. гематол., 1964, 12, 13.
3. Мосягина Е. Н., Владимирская Е. Б.— Пробл. гематол., 1967, 8, 20.
4. Рябов С. И., Шостка Г. Д.— Молекулярно-генетич. аспекты эритропоэза, Л., «Медицина», 1973.
5. Сильвестрова Л. Е.— Бюлл. exper. биол. мед., 1972, 1, 87.
6. Фраш В. Н.— В сб.: Вопросы гигиены труда и профпатол. в металлургии, М., 1972, 249.
7. Фраш В. Н., Капралова Л. И.— В сб.: Труды III Всес. совещ. по управляемому биосинтезу и биофизике популяций. Красноярск, 1973, 171.
8. Astaldi G.— In: Ciba Foundation Symposium on Haemopoiesis, London, 1960, 99, disc., 127.
9. Berman L.— Blood, 1963, 21, 246.
10. Di-Guglielmo G., Jannascone A.— Acta haemat., 1958, 19, 144.
11. Dustin P.— In: The Kinetics of Cellular Proliferation, N. Y., London, 1959, 50, disc., 127.
12. Elmino O., Dotta F., Gossarini G.— Folia med., 1959, 42, 1228.
13. Killamann S., Cronkite C. et al.— Blood, 1963, 21, 141.
14. Killamann S., Cronkite C. et al.— Blood, 1964, 24, 267.
15. Paterni L., Rosera G., Colicchio G.— Folia med., 1958, 41, 881.
16. Redick J., Lo-Grippo G.— Lab. invest., 1961, 10, 6, 1, 1068.
17. Rondanelli E., Gorini P. et al.— Acta haemat., 1961, 26, 281.
18. Tarbutt R.— Brit. J. Haemat., 1969, 16, 9.
19. Quastler H.— In Cell proliferation, Oxford, 1963, 18.

Надійшла до редакції
25.IX 1974 р.

ON PROLIPHERATIVE ACTIVITY OF RAT BONE IN NORM
AND UNDER INHIBITION OF HEMOPOIESIS WITH BENZENE

V. N. Frash

Institute of Labour Hygiene and Profpathology, Sverdlovsk

Summary

The time parameters are determined by the prolipherative activity in certain cellular groups of rat bone marrow in norm and under inhibition of hemopoiesis with benzene. Two methods were used for calculating cellular kinetics: from the specific mitotic and statmokinetic indexes and from the myelograms data and mitotic indexes. Both methods yielded similar results. During benzene intoxication the cells with unchanged or higher prolipherative activity were found in bone marrow simultaneously with a decrease in the prolipherative activity in most cells.