

ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN — POLONIA

VOL. XXXIII, 4

SECTIO D

1978

Samodzielna Pracownia Mikroskopii Elektronowej. Instytut Biologiczno-Morfologiczny.
Akademia Medyczna w Lublinie
Kierownik: prof. dr hab. n. med. Maciej Latański
Klinika Hematologiczna. Instytut Chorób Wewnętrznych. Akademia Medyczna w Lublinie
Kierownik: prof. dr hab. n. med. Jan Kowalewski

Maciej LATALSKI, Janina HALLIOP,
Andrzej NOWAKOWSKI

**Ultrastrukturalne i cytochemiczne badania komórek szeregu rozwojowego
granulocytów obojętnochłonnych po podaniu środka-antagonisty
kwasu foliowego**

Ультраструктурные и цитохимические исследования клеток генетического ряда
нейтрофильных гранулоцитов после введения препарата антагониста фолиевой
кислоты

Ultrastructural and Cytochemical Studies of the Neutrophil Granulocyte Series after
the Administration of a Folic Acid Antagonist Compound

Środki cytotoksyczne odgrywają obecnie ważną rolę w leczeniu różnych nowotworów. Stworzyły one nowe możliwości postępowania lekarskiego i w niektórych przypadkach ich stosowanie stało się podstawowym sposobem leczenia. Dobór leku zastosowanego w określonym typie nowotworu jest ustalony głównie na podstawie doświadczenia klinicznego. W przypadku tych nowotworów, co do których istnieje możliwość wyleczenia, wydaje się usprawiedliwione stosowanie nawet wysokich dawek, a w konsekwencji spowodowanie częstego występowania objawów ubocznych, związanych z toksycznym działaniem danego specyfiku.

Do takich leków należy Metotreksat. Jest on silnym antagonistą kwasu foliowego, a wiadomo, że właśnie kwas foliowy działa stymulująco na czynność krwiotwórczą. Można zatem przypuszczać, że brak tego kwasu spowoduje zaburzenia w procesie hematopoezy. Poza tym Metotreksat należy do związków, których główne działanie toksyczne dotyczy szpiku. Wydało się nam ciekawe przebadanie szeregu rozwojowego granulocytów obojętnochłonnych po zastosowaniu tego środka u zwierząt w warunkach doświadczalnych.

MATERIAŁ I METODYKA BADAŃ

Badania przeprowadzono na szczurach białych, samcach, o ciężarze ciała ok. 250 g. Zwierzętom doświadczalnym podawano Metotreksat (firmy Lederle, USA) w dawce 0,25 mg/kg c.c. jeden raz dziennie w ciągu 5 dni (grupa doświadczalna I) i 7 dni (grupa doświadczalna II). Dawkę i okres podawania leku ustalono na podstawie obserwacji własnych. Podawano szczurom Metotreksat i określano liczbę krwinek białych i płytek w krwi obwodowej. Zaobserwowano zauważalny spadek ilości krwinek białych i płytek po 3 dniach stosowania leku. Po 10 dniach podawania preparatu zwierzęta ginęły wśród objawów toksycznych (biegunka, skaza krwotoczna), a w badaniach szpiku stwierdzono tzw. szpik „pusty”, z pojedynczymi elementami szeregu granulocytarnego. Biorąc pod uwagę powyższe, uznaliśmy za najbardziej korzystny do badań okres 5 i 7 dni stosowania leku.

Badania prowadzono na szpiku pobieranym z kości udowej. Materiał do badań w mikroskopie elektronowym przygotowywany był w sposób typowy. Badania ultrastrukturalne szeregu rozwojowego granulocytów obojętnochłonnych uzupełniliśmy prowadzonymi w mikroskopie elektronowym obserwacjami cytochemicznymi, określającymi zachowanie się aktywności fosfatazy kwaśnej i peroksydazy. Kwaśną fosfatazę wykrywano wg metody Gomoriego (2), a aktywność peroksydazy wykazywano wg Novikoffa (5). Skrawki sporządzano przy użyciu ultramikrotomu Tesla BS 490 A, preparaty oglądano i fotografowano w mikroskopie elektronowym Tesla BS 613.

Poprzednio prześledziliśmy u szczurów budowę ultrastrukturalną szeregu rozwojowego granulocytów obojętnochłonnych oraz określiliśmy zachowanie się aktywności kwaśnej fosfatazy i peroksydazy w poszczególnych formach rozwojowych tych komórek w warunkach fizjologicznych (3). Wyniki uzyskane w obecnych badaniach eksperymentalnych były porównywane z tym prawidłowym modelem.

BADANIA WŁASNE

Grupa doświadczalna I

W wielu komórkach wszystkich stadiów rozwojowych granulocytów obojętnochłonnych obserwowano nieregularny kształt jąder komórkowych, spowodowany głębokimi wpukleniami błony jądrowej w obręb karioplazmy. Głębokość tych wpukleń sprawiała niekiedy wrażenie płatowatości jądra, obserwowanej już nawet w stadium meloblasta (ryc. 1). Oprócz takich jąder spotykano również we wczesnych stadiach rozwojowych jądra kształtu podkowiatego, co w warunkach fizjologicznych występuje dopiero u metamielocytów.

We wszystkich przypadkach zmianom kształtu jąder komórkowych towarzyszyło wyraźne zmniejszenie ich gęstości elektronowej, niekiedy tak znaczne, że sprawiały one wrażenie elektronowo „pustych”. W związku z tym nie obserwowano też brzeżnych skupień chromatyny jądrowej, pojawiających się normalnie już od stadium promielocyta (ryc. 2). W obrębie cytoplazmy i umieszczonych w niej struktur komórkowych w komór-

kach szeregu rozwojowego granulocytów obojętnochłonnych tej grupy doświadczalnej nie stwierdzono zmian w porównaniu z warunkami fizjologicznymi. Dotyczy to również obecności, lokalizacji i intensywności wykonanych odczynów cytochemicznych dla wykazania peroksydazy i kwaśnej fosfatazy.

Grupa doświadczalna II

Ultrastrukturalny obraz jąder komórkowych wszystkich form rozwojowych granulocytów obojętnochłonnych był podobny jak w poprzednio opisanej grupie, dotyczył jednak większej ilości oglądanych komórek. Zmianom w jądrze komórkowym niekiedy towarzyszyły zmiany w obrębie cytoplazmy. Dotyczyło to głównie dojrzałych form badanych komórek. W porównaniu z prawidłowym dojrzałym granulocytem obojętnochłonnym w krwinkach tych obecnie opisywanej grupy doświadczalnej zwracały uwagę wyraźnie zaznaczone błony struktur Golgiego, zmniejszona ilość typowych ziarnistości pierwszo- i drugorzędowych (ryc. 3) oraz pojawienie się tworów lizosomopodobnych (ryc. 4).

W obserwacjach cytochemicznych prowadzonych w tej grupie zwierząt w porównaniu z warunkami prawidłowymi stwierdzono wyraźne osłabienie aktywności peroksydazy, a niekiedy nawet brak odczynu w otoczce jądrowej i błonach gładkich mieloblastów i promielocytów (ryc. 5).

Odczyn specyficzny dla fosfatazy kwaśnej występował głównie w strukturach, które odpowiadały lizosomom wtórnym (ryc. 4) i w błonach gładkich struktur Golgiego (ryc. 6), natomiast bardzo rzadko stwierdzało się jego obecność w ziarnistościach, co ma miejsce w warunkach fizjologicznych i dotyczy niektórych ziarnistości pierwszorzędowych.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Kwas foliowy uzyskiwany z pokarmów zapoczątkowuje bardzo ważne procesy biochemiczne. W procesach tych jest on zasadniczym czynnikiem dla syntezy puryn. Pierwszym etapem jest enzymatyczna redukcja kwasu foliowego do kwasu dwuhydrofoliowego, który następnie zostaje dalej zredukowany enzymatycznie do kwasu trójhdrofoliowego. Metotreksat wiąże się bardzo silnie z enzymem reduktazą dwuhydrofoliową. Wiązanie to powstrzymuje redukcję kwasu foliowego i na tej drodze zostaje zablokowana przemiana w kwas trójhdrofoliowy. Ten związek (jeśli synteza jego nie jest zaburzona) może uzyskać dodatkowy atom węgla (w postaci grupy formylowej), który z kolei może zostać przesunięty z kwasu trójhdrofoliowego do wymagającego metylacji metabolitu. Jednym z przykładów jest metylacja kwasu urydylowego do kwasu tymidylowego, któ-

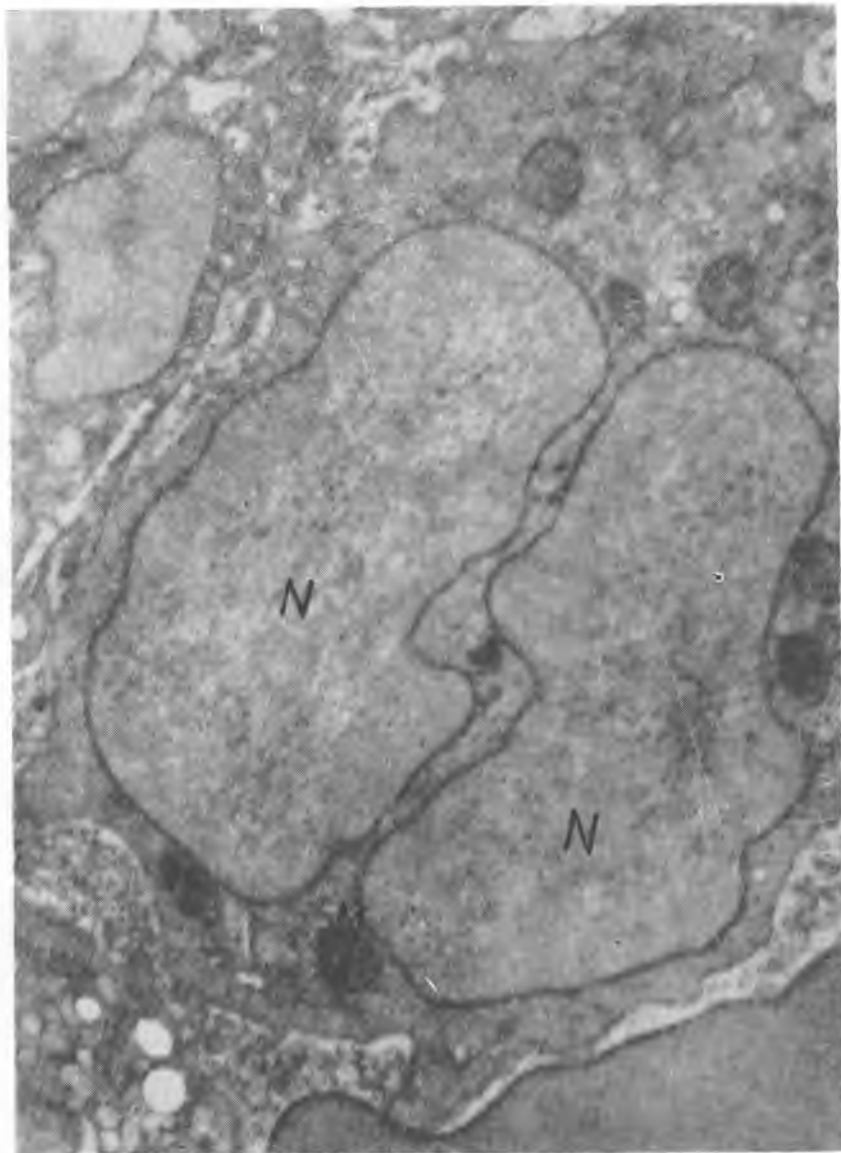
ry jest ważnym składnikiem kwasu nukleinowego. Grupa formylowa może być także przenoszona z kwasu trójchlorofoliowego do rybotydu aminomidazolu karboksamidowego, dając związek formylowy, który jest prekursorem puryny (1). Wynika z tego, jak bardzo istotna jest rola kwasu trójhydrofoliowego dla procesu przemian. Można zatem przypuszczać, że brak tego kwasu spowoduje poważne zaburzenia, które mogą znaleźć odbicie w syntezie kwasów nukleinowych.

W naszych obserwacjach stwierdziliśmy zmiany kształtu jąder komórkowych na poszczególnych etapach powstawania granulocytów obojętno-chłonnych. Pofałdowanie obrysów jądra zwykle przemawia za wzmożeniem wymiany jądrowo-cytoplazmatycznej, co w tym konkretnym przypadku może dotyczyć właśnie kwasów nukleinowych, których niedobór w cytoplazmie poważnie hamował syntezę białek, koniecznych do wytworzenia struktur wewnątrzkomórkowych.

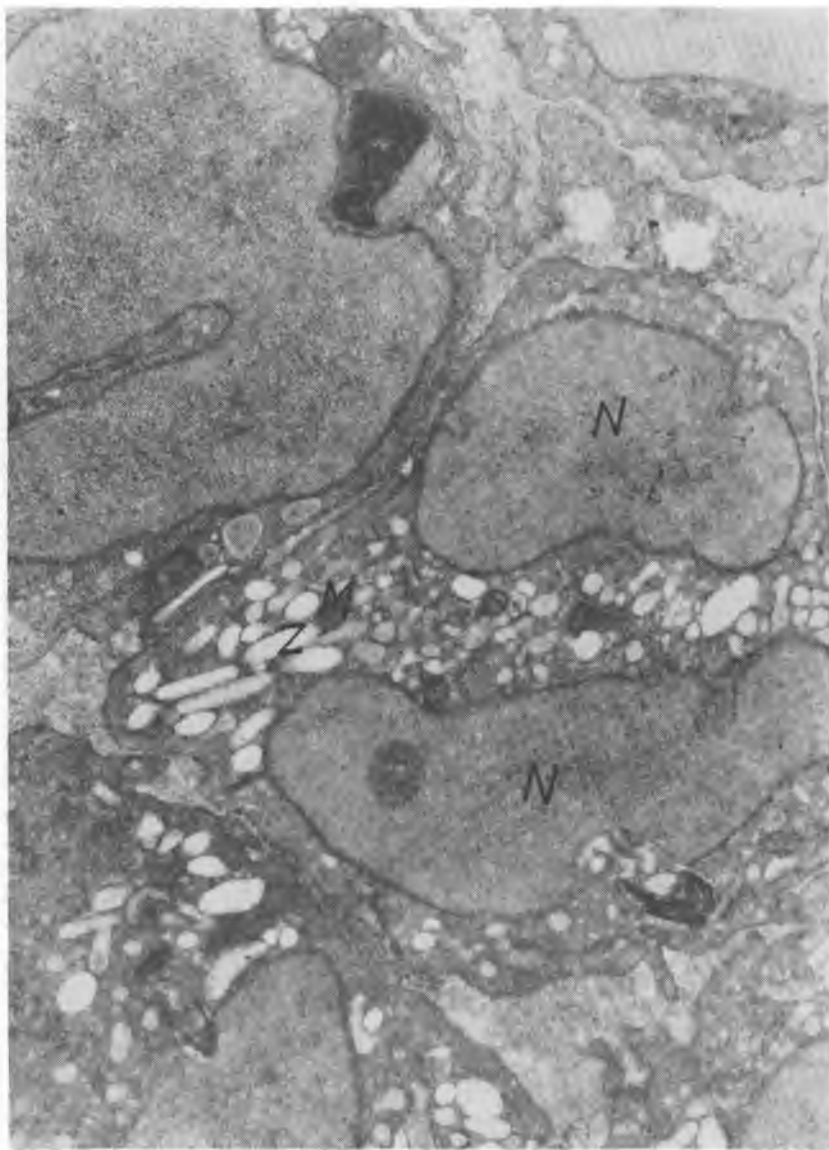
O zaburzeniu w syntezie kwasów nukleinowych można sądzić także na podstawie ultrastruktury jąder analizowanych komórek. Wydaje się, że bardzo mała gęstość elektronowa karioplazmy i brak skupień chromatyny jądrowej nasuwają to przypuszczenie. Trudno jednak wypowiadać się w sposób bardziej wiążący bez wykonania reakcji specyficznych dla RNA i DNA. Nie posiadaliśmy jednak możliwości przeprowadzenia tych badań w mikroskopie elektronowym, a obserwacje w mikroskopie świetlnym będą wykonane w przyszłości, w ramach planowanych innych badań tych komórek.

W obserwacjach struktur cytoplazmatycznych w wyniku wykonanego doświadczenia stwierdziliśmy w dojrziałych granulocytach obojętno-chłonnych dobrze rozwinięte struktury Golgiego, a znacznie zmniejszoną ilość ziarnistości charakterystycznych dla tych komórek. Poprzednie nasze badania (3) wykazały, że w tych komórkach ziarnistości pierwszo- i drugorzędowe są bardzo liczne i wypełniają całą komórkę, a struktury Golgiego nie są już na tym etapie rozwoju krwinki tak wyraźne. Można więc sądzić, że podawanie zwierzętom doświadczalnym antagonisty kwasu foliowego, jakim jest Metotreksat, powoduje zahamowanie procesu wytwarzania ziarnistości i opóźnione ich powstawanie w stosunku do procesu dojrzewania komórki.

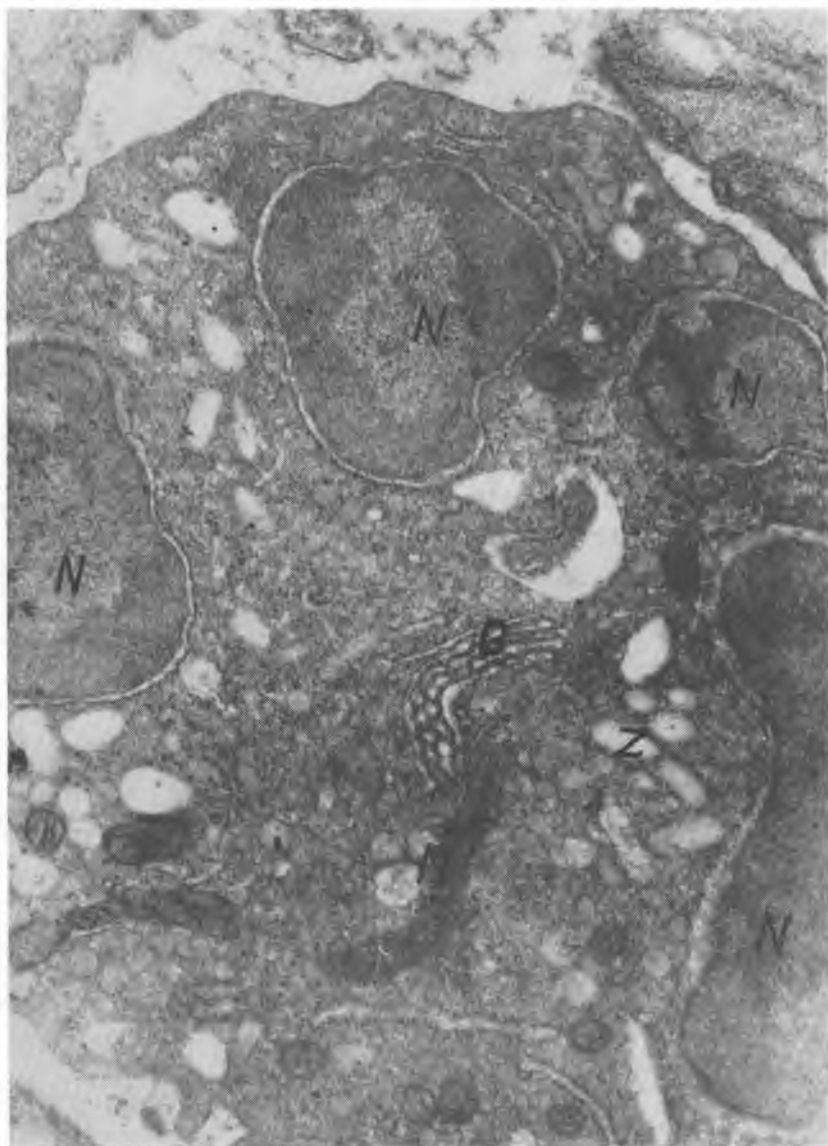
Cytochemiczne badania ziarnistości pierwszorzędowych granulocytów obojętno-chłonnych szczura w mikroskopie elektronowym (6) wykazały, że niektóre z tych ziaren posiadają w swym wyposażeniu enzymatycznym obok innych enzymów także kwaśną fosfatazę. Nasze własne badania w tym zakresie, wykonane wcześniej (4), pozwoliły przyjąć hipotezę, że wszystkie te ziarnistości pierwszorzędowe, w których stwierdza się obecność kwaśnej fosfatazy (bez względu na obecność innych enzymów) można zaliczyć do grupy lizosomów. Należy je jednak określić jako lizosomy



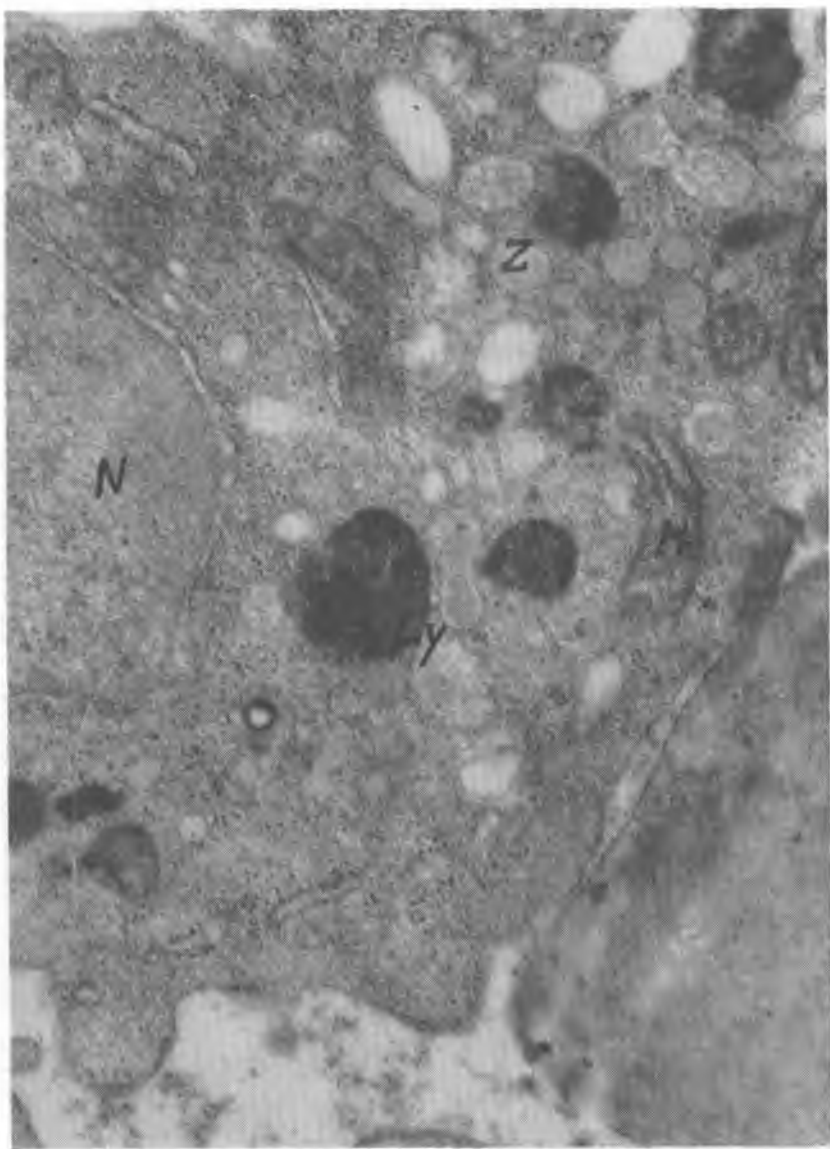
Ryc. 1. Mieloblast. N — jądro, M — mitochondria. Pow. ok. 30 000×
Myeloblast. N — nucleus, M — mitochondria. Magn. ca 30 000×



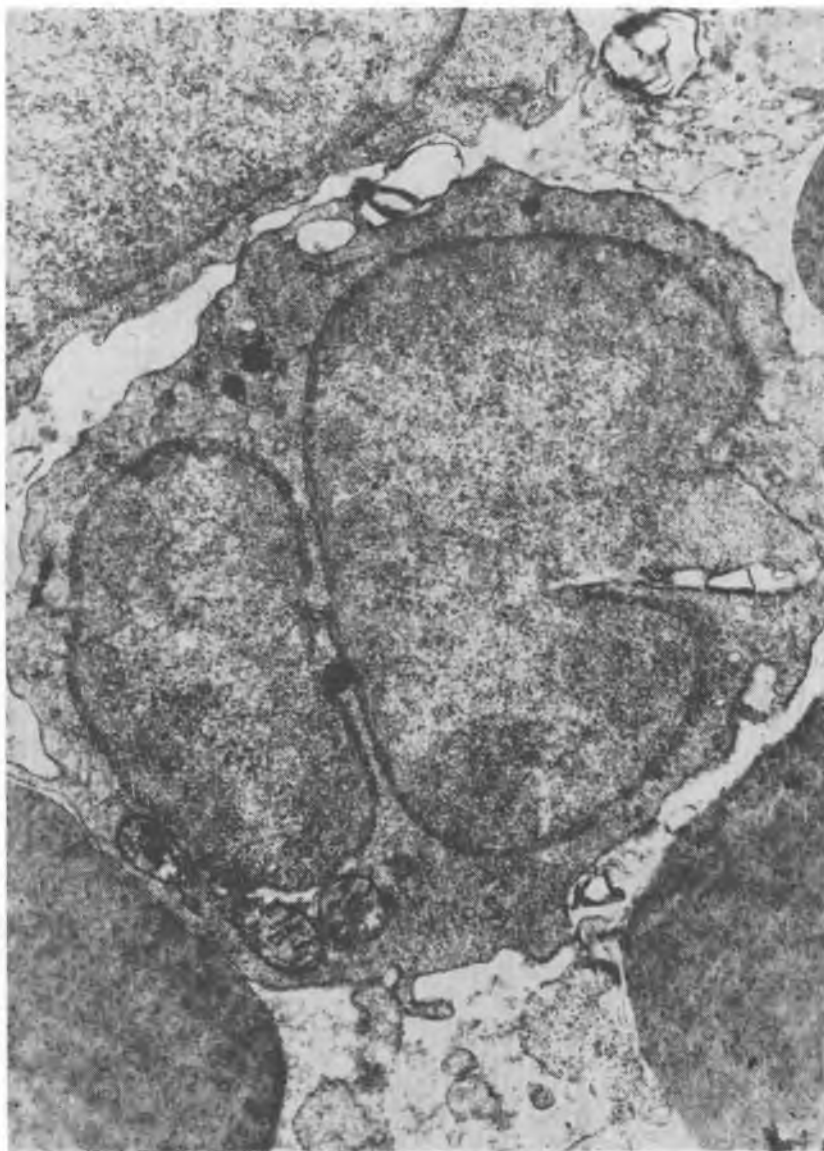
Ryc. 2. Mielocyt. N — jądro, M — mitochondria, Z — ziarnistości. Pow. ok. 30 000 $\times$
Myelocyte. N — nucleus, M — mitochondria, Z — granules. Magn. ca 30 000 $\times$



Ryc. 3. Granulocyt obojętnochłonny. N — jądro, M — mitochondria, G — struktury Golgiego, Z — ziarnistości. Pow. ok. 42 000 ×
 Neutrophil granulocyte. N — nucleus, M — mitochondria, G — Golgi's structure, Z — granules. Magn. ca 42 000 ×

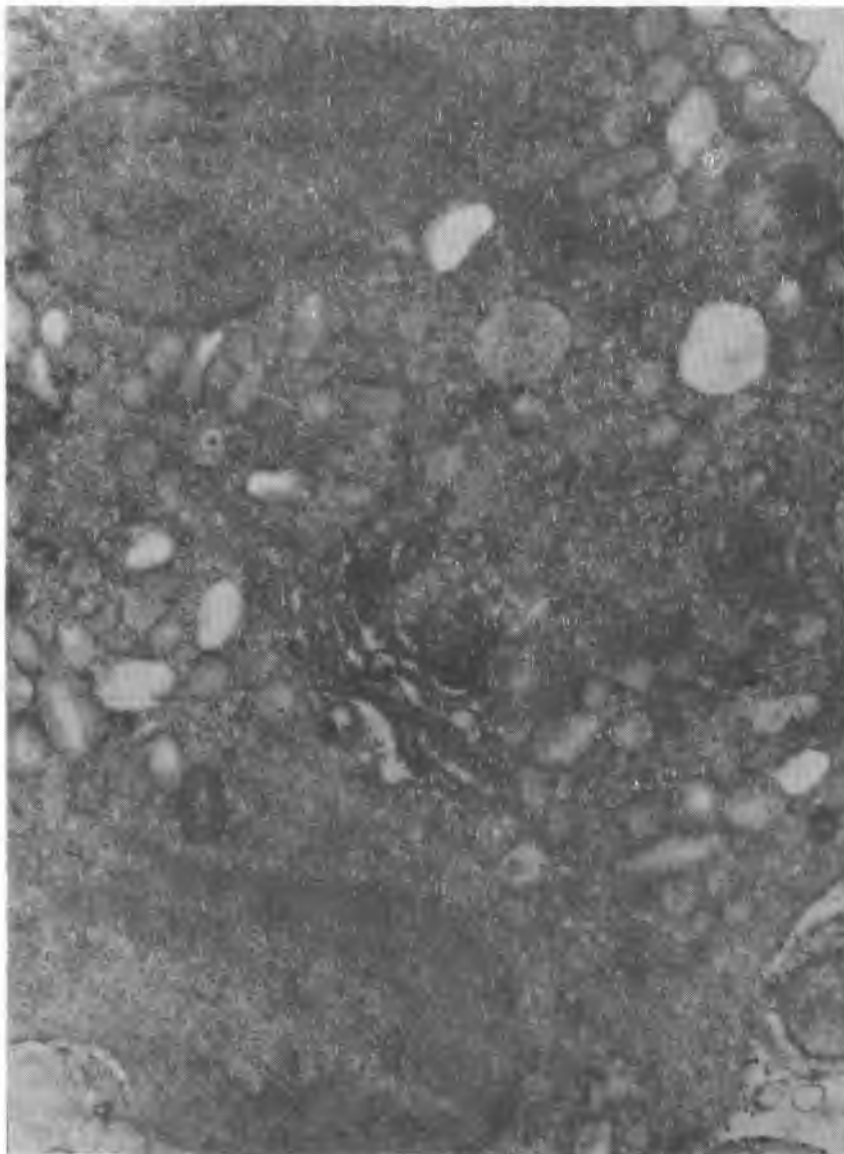


Ryc. 4. Mielocyt. N — jądro, M — mitochondria, Z — ziarnistości, Ly — lizosomy.
Pow. ok. 42 000 $\times$
Myelocyte. N — nucleus, M — mitochondria, Z — granules, Ly — lysosomes. Magn.
ca 42 000 $\times$



Ryc. 5. Promielocyt. Produkt reakcji z DAB w otoczce jądrowej i w ziarnistościach.
Pow. ok. 30 000×

Promyelocyte. Product of reaction with DAB in the nuclear membrane and in
granules. Magn. ca 30 000×



Ryc. 6. Granulocyt obojętnochłonny. Aktywność kwaśnej fosfatazy w strukturach Golgiego. Pow. ok. 42 000×

Neutrophil granulocyte. Acid phosphatase activity in Golg's structures. Magn. ca 42 000×

pierwotne, nie zaangażowane w procesy trawienia. Zakładając tę hipotezę w obecnych badaniach, można przyjąć, że ilość lizosomów pierwotnych w dojrzałych komórkach była zmniejszona, gdyż stwierdzono małą ilość ziarnistości pierwszorzędowych z obecnością produktu reakcji na kwaśną fosfatazę. Stwierdzono natomiast obecność dużych struktur, otoczonych pojedynczą błoną, zawierających kwaśną fosfatazę, posiadających niejednorodną strukturę wewnętrzną i odpowiadających typowym lizosomom wtórnym, nie spotykanym u tych komórek w warunkach fizjologicznych. Wydaje się więc prawdopodobne, że lizosomy pierwotne włączone zostały w trawienie wewnątrzkomórkowe w wyniku narastania procesów katabolicznych. Procesy te osiągnęły przewagę nad anabolicznymi ze względu na wcześniej wspomniane zaburzenia w syntezie kwasów nukleinowych, a w następstwie — także białek.

PIŚMIENNICTWO

1. Boesen E., Davis W.: Chemioterapia nowotworów. PZWL, Warszawa 1972.
2. Gomori G.: J. Histochem. Cytochem. 2, 209—215, 1954.
3. Latański M., Halliop J., Nowakowski A.: Acta Haemat. Pol. 6, 273—281, 1975.
4. Latański M., Nowakowski A., Halliop J.: Acta Haemat. Pol. 7, 311—319, 1976.
5. Nowikoff A. B., Goldfischer S.: J. Histochem. Cytochem. 16, 507—509, 1968.
6. Rogowin W. W., Murawiew R. A., Gieranina W. O., Frołowa W. M., Piruzian L. A.: Izv. Akad. Nauk. SSSR. Biol. 1, 135, 1972.

Otrzymano 15 IV 1977.

РЕЗЮМЕ

Фолиевая кислота стимулирует процесс гематопоеза. Подопытным животным вводился препарат „Metotreksat” (марки Lederle, США) являющийся антагонистом этой кислоты. В клетках генетического ряда нейтрофильных гранулоцитов обнаружены изменения в ультраструктуре клеточных ядер, а также изменения в морфологической и цитохимической картинах цитоплазматических структур. Эти изменения могут свидетельствовать о расстройствах синтеза нуклеиновой кислоты, а также о усилении кatabolicческих процессов в исследуемых клетках.

SUMMARY

The process of haematopoiesis is stimulated by folic acid. The animals used in the experiment were given a "Metotreksat" preparation (by Lederle, USA) which is an antagonist of this acid. Changes were found to occur in the ultrastructure of cell nucleus in neutrophil granulocyte series, as well as in morphological and cytochemical picture of cytoplasmatic structures. These changes may show that there are disturbances in the synthesis of nucleic acids and an increase in catabolic processes in the cells under investigation.

