

Technika oznaczania aktywności f. zas. Rozmazy krwi obwodowej utrwalano 0,5 godziny w zimnym acetonie, płukano w wodzie destylowanej, a następnie inkubowano 0,5 godziny w temperaturze pokojowej w mieszaninie substratu zawierającej: 20 ml — 0,05 M buforu propandiolowego (pH 9,75), 20 mg — fosforanu sodowego alfa-naftyłu i 20 mg — Fast Garnet GBC. Po przemyciu preparatów-rozmazów w wodzie destylowanej podbarwiano jądra hematoksyliną Mayera od 3 do 5 minut. Preparaty zamykano w glicero-żelatynie i oglądano pod immersją.

Aktywność enzymu dla poszczególnych krwinek oznaczano w stopniach od 0 do 4. 0 = odczyn ujemny, 1 = odczyn słabo dodatni, jednolite różowe zabarwienie cytoplazmy z pojedynczymi ziarnistościami skupionymi zwłaszcza w pobliżu błony komórkowej, 2 = odczyn dodatni, liczniejsze i większe ziarnistości, skupione przede wszystkim w obwodowej części komórki, 3 = odczyn intensywnie dodatni z licznymi czerwono-brunatnymi ziarnistościami, wypełniającymi prawie całą cytoplazmę i 4 = odczyn wybitnie dodatni, ziarnistości duże, brunatne i brunatno-czarne, zlewające się i wypełniające całą cytoplazmę komórki. Ogólną aktywność fosfatazy oceniano wg metody podanej przez K a p l o w a (1955), wyprowadzając wskaźnik odzwierciedlający aktywność enzymu w stu dojrzałych granulocytach. Za podstawę do obliczenia wskaźnika przyjęto intensywność zabarwienia w stopniach od 0 do 4 w stu kolejnych leukocytach. W celu wyprowadzenia wskaźnika sumowano iloczyny stopnia aktywności f. zas. przez liczbę granulocytów o tym stopniu aktywności.

BADANIA WŁASNE

Grupa kontrolna

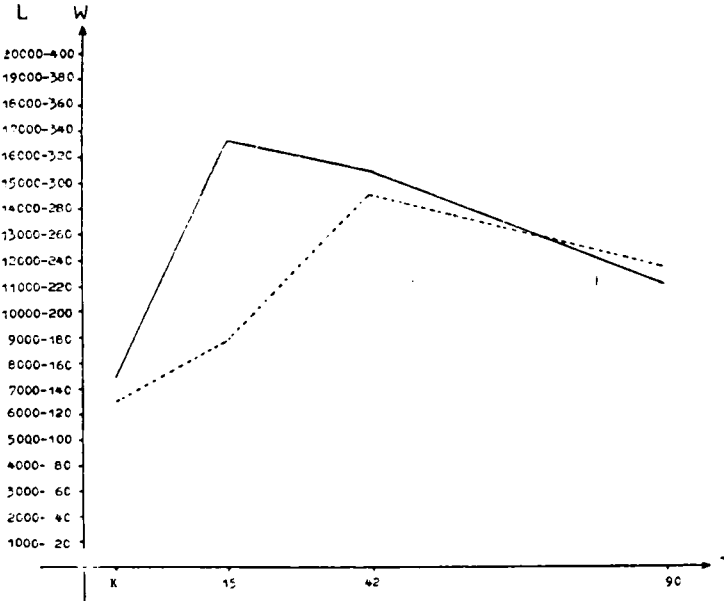
Średnia leukocytoza we krwi świnek zdrowych wynosiła 6800. Dodatnią reakcję na f. zas. wykazywało 63—70% granulocytów. Najwięcej krwinek wykazywało średni (2 i 3) stopień aktywności f. zas. Średni wskaźnik aktywności f. zas. obliczony na podstawie powyższych danych wynosił 155.

Grupa doświadczalna

1) U świnek grupy doświadczalnej po 15 godzinach działania toksyny błoniczej stwierdzono nieznaczny wzrost leukocytozy, średnio do wartości 9200 oraz znaczny wzrost aktywności f. zas. granulocytów. Stwierdzono 95—100% krwinek fosfatazododatnich (ryc. 2). Z kolei spośród krwinek wykazujących dodatni odczyn na f. zas. około 80% wykazywało bardzo wysoki (4) stopień tej aktywności (ryc. 3). Wartość wskaźnika aktywności fosfatazowej w tym okresie wynosiła średnio 350.

2) Po 42 godzinach działania toksyny błoniczej leukocytoza wynosiła średnio 15200. W rozmazach krwi pobranych w tym okresie 93—100% krwinek wykazywało dodatni odczyn na aktywność f. zas. Spośród nich 50% dawało odczyn wybitnie pozytywny (ryc. 4). Wartość wskaźnika dla tego okresu wynosiła 324.

3) Po 90 godzinach działania toksyny leukocytoza nieznacznie spadła, średnie wartości wynosiły 12300. Ogólna ilość krwinek fosfatazododatnich utrzymywała się na tym samym poziomie 90—100%. Spadała liczba granulocytów z wybitną aktywnością f. zas. Zwiększyła się liczba krwinek wykazujących niskie (1 i 2) stopnie aktywności. Średni wskaźnik aktywności f. zas. w tym okresie wynosił 237.



Ryc. 1. Średnie zmiany aktywności f. zas. w leukocytach obojętnochłonnych i średnie zmiany leukocytozy w różnych okresach doświadczenia; W — wskaźnik aktywności f. zas. (liczby w kolumnie wewnętrznej), L — leukocytoza (liczby w kolumnie zewnętrznej), T — czas pobierania materiału, K — kontrola, 15 — po 15 godzinach działania toksyny błoniczej, 42 — po 42 godzinach działania toksyny błoniczej, 90 — po 90 godzinach działania toksyny błoniczej, linia ciągła — krzywa wskaźnika, linia przerywana — krzywa leukocytozy

Mean variations of alkaline phosphatase in neutrophils and mean variations of leukocytosis at different stages of the experiment; W — index of activity of alkaline phosphatase (figures in the inside column), L — leukocytosis (figures in the outside column), T — time of collecting samples, K — control, 15 — 15 hrs. following toxin activity, 42 — 42 hrs. following toxin activity, 90 — 90 hrs following toxin activity, continuous line — the index curve, interrupted line — the leukocytosis curve

Na podstawie średnich wartości leukocytozy i średnich wartości wskaźnika określającego aktywność f. zas. granulocytów dla grupy kontrolnej oraz różnych okresów toksemii błoniczej sporządzono wykres, a następnie porównano przebieg tych dwóch krzywych (ryc. 1).

Dane liczbowe przedstawiające procent granulocytów fosfatazododatnich oraz procent granulocytów z wybitną aktywnością w poszczególnych okresach doświadczenia zawiera tabela 1.

Tab. 1. Procentowa zawartość granulocytów fosfatazododatnich oraz granulocytów z wybitną aktywnością fosfatazy zasadowej (spośród granulocytów dających dodatni odczyn f. zas.) w poszczególnych okresach doświadczenia
Per cent values showing the number of phosphatase positive granulocytes and granulocytes with a very high activity of alkaline phosphatase at different stages of the experiment

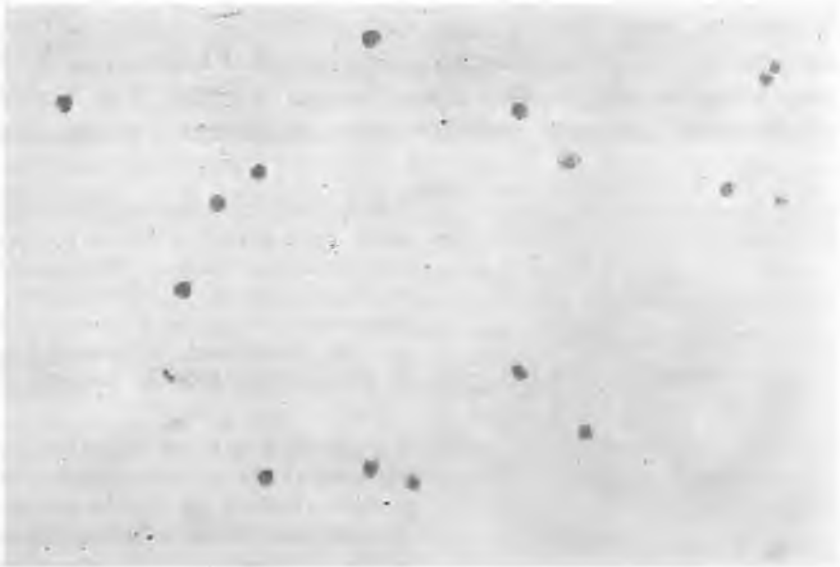
Grupy badane	% granulocytów fosfatazododatnich	% granulocytów z wybitną aktywn. f. zas.
Grupa kontrolna	63 — 70	14 — 22
Po 15 godzinach działania toksyny	95 — 100	78 — 84
Po 42 godzinach działania toksyny	93 — 100	47 — 55
Po 90 godzinach działania toksyny	90 — 100	10 — 15

OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ I WNIOSKI

Określenie aktywności f. zas. granulocytów ma duże znaczenie w różnicowaniu wielu schorzeń (11). Najlepiej przebadane pod względem właściwości cytochemicznych są granulocyty w chorobach układu krwiotwórczego i krwi. Znacznie mniej doniesień spotykamy w literaturze odnośnie znaczenia określania aktywności f. zas. w granulocytach dla diagnostyki różnicowej chorób zakaźnych. L a m b e r s K. i B a u e r - S i c P. (7) donoszą, że w mononukleozie zakaźnej stwierdza się obniżony poziom aktywności f. zas., podczas gdy w anginie i błonicy aktywność ta jest zwykle podwyższona. W naszej pracy starano się dokładnie przebadać aktywność f. zas. granulocytów w przebiegu toksemii błoniczej w zestawieniu z zachowaniem się ogólnej leukocytozy w poszczególnych okresach tego schorzenia.

Obraz białych krwinek w błonicy był szeroko opracowany. Większość badaczy (1, 2, 4, 6, 9, 13, 16) stwierdza, że w błonicy najczęściej spotyka się podwyższoną leukocytozę. Leukocytoza w błonicy nie jest charakterystyczna (2), jak również nie może być miernikiem ciężkości schorzenia (9). W naszych badaniach stwierdzono, że leukocytoza w przebiegu toksemii błoniczej jest przez cały czas podwyższona. W początko-

wym okresie nieznacznie, najwyższe wartości osiąga po 42 godzinach, a po 90 godzinach nieznacznie spada w porównaniu z okresem drugim.



Ryc. 2. Leukocyty fosfatazododatnie w rozmazie krwi świnki morskiej po 15 godzinach działania toksyny błoniczej. Mikroskop Lumipan C. Zeiss. Powiększenie 300 \times . Kamera „Standard”

Phosphatase positive granulocytes in blood smear after 15 hrs. of toxin activity. Microscope Lumipan Zeiss. Magn. \times 300. "Standard" Camera

W rozmazach krwi cytochemicznie, metodą sprzęgania z barwnikami dwuazowymi oznaczano aktywność f. zas. Aktywność tą oceniano wg metody podanej przez K a p l o w a, obliczając wskaźnik aktywności enzymu w stu granulocytach. Dodatnią aktywność f. zas. stwierdzono tylko w granulocytach obojętnochłonnych dojrzałych i pałeczkowatych. Pozostałe, obserwowane przez nas, elementy komórkowe krwi nie wykazywały dodatniej aktywności enzymu zarówno u zdrowych, jak i zakażonych świnek, co zgodne jest z danymi w dotychczasowej literaturze (3, 5, 8, 15). Stwierdzono, że aktywność f. zas. granulocytów neutrofilnych zdrowych świnek jest bardzo wysoka w porównaniu z wartościami wskaźnika dla ludzi zdrowych. Wskaźnik ten dla zdrowych kobiet wg Q u i g l e y a i D a w s o n a (10) wynosił 33, obliczany dla obu płci wg K a p l o w a (5) wynosił 22, wg S z u b i c z a (12) 27.

W naszych badaniach średni wskaźnik aktywności enzymatycznej dla zdrowych świnek morskich (samców) wynosił 155. Wg innych autorów przyjmował wyższe wartości, dochodzące do 247,2 (12). Być może, że różnice te wynikły na skutek tego, że do naszych badań użyto

świnek morskich tylko płci męskiej, a na przykładzie obserwacji przeprowadzonych u ludzi można twierdzić, że aktywność fosfatazowa jest znacznie wyższa u płci żeńskiej (14), co uzależnione jest od zawartości estrogenów we krwi. Stwierdzono również znaczny wzrost aktywności fosfatazowej już w początkowym okresie toksemii błoniczej. Po 15 godzinach wskaźnik aktywności f. zas. osiągał wartość 350. Po 42 godzinach działania toksyny zaobserwowano nieznaczny spadek aktywności



Ryc. 3. Leukocyt obojętnochłonny w rozmazie krwi świnki morskiej po 15 godzinach działania toksyny błoniczej. Odczyn na f. zas. wybitnie dodatni. W całej cytoplazmie widoczne intensywne, zlewające się ziarnistości. Mikroskop Lumipan C. Zeiss. Pow. 3000 \times . Kamera „Standard”

A neutrophil in blood smear of a guinea pig after 15 hrs. of toxin activity. Distinct positive reaction to alkaline phosphatase. Intense blurred granulations fill up the whole cytoplasm. Microscope Lumipan Zeiss. Magn. \times 3000. Standard camera



Ryc. 4. Leukocyt obojętnochłonny w rozmazie krwi świnki morskiej po 42 godzinach działania toksyny błoniczej. Odczyn na f. zas. wybitnie dodatni. Liczne zlewające się, intensywnie wybarwione ziarnistości wypełniają całą cytoplazmę komórki. Mikroskop Lumipan C. Zeiss. Pow. 4500 \times . Kamera „Standard”

A neutrophil in blood smear of a guinea pig after 42 hrs. of toxin activity. Distinct positive reaction. Numerous blurred and colourless granulations fill up the whole cytoplasm. Microscope Lumipan Zeiss. Magn. \times 4500. Standard camera

ności fosfatazowej (wartość wskaźnika 324). Po 90 godzinach aktywność f. zas. nagle spadała (wartość wskaźnika 237). Była jednak ona jeszcze bardzo wysoka w porównaniu z aktywnością fosfatazy u świnek zdrowych. Nie zauważono wyraźnej zależności między stopniem aktywności fosfatazowej neutrofilów a wartościami ogólnej leukocytozy dla poszczególnych okresów. Najwyższe wartości leukocytozy stwierdzono po 42 godzinach działania toksyny, podczas gdy aktywność enzyma-

tyczna była największa w pierwszym okresie toksemii po 15 godzinach, a później spadała aż do śmierci zwierzęcia, która następowała po około 90 godzinach od chwili podania toksyny.

PIŚMIENNICTWO

1. Bogdanowicz J.: *Blonica*. PZWL, Warszawa 1956.
 2. Gajda A.: *Patol. Pols.* 13, 467—478, 1962.
 3. Hayhoe F. G. J., Quaglino D.: *Brit. Jour. Haematol.*, 4, 375—389, 1958.
 4. Hofman H.: *Pediat. Pols.* 1, 51—58, 1956.
 5. Kaplow L. S.: *Blood*, 10, 1023—1029, 1955.
 6. Kucharzewski H.: *Kron. Lek.* 13, 525—528, 1902.
 7. Lambers K., Bauer-Sic P.: w: Merker H., IX Freiburger Symposium, *Zyto-und Histochemie in der Hämatologie*, Springer Verlag, Berlin, 1963, 254—270.
 8. Merker H., Heilmeyer L.: *Deutsche med. Wochenschr.* 85, 253—258, 1960.
 9. Nowosielecka E.: *Patol. Pols.* 4, 195—208, 1953.
 10. Quigley H. J., Dawson E. A.: *Amer. Jour. Clin. Pathol.* 33, 109—114, 1960.
 11. Szmigielski S., Litwin J., Żupańska B., Królikowska I.: *Postępy Hig. i Med. Dośw.* 19, 1—76, 1965.
 12. Szubicz M. G.: *Citologija*, 8, 420—422, 1966.
 13. Tempka T.: *Choroby układu krwiotwórczego*, PZWL, Warszawa 1956.
 14. Vanotti A.: w: Merker H., IX Freiburger Symposium, *Zyto-und Histochemie in der Hämatologie*, Springer Verlag, Berlin 1963, 349—360.
 15. Wachstein M.: *Jour. Lab. Clin. Med.* 31, 1—17, 1946.
 16. Wszelaki S.: *Zarys kliniki chorób zakaźnych*, PZWL, Warszawa 1957.
- Pracę otrzymano 20 VI 1966.

Влияние дифтерийного токсина на активность щелочной фосфатазы лейкоцитов

Резюме

Была исследована активность щелочной фосфатазы в гранулоцитах морских свинок в процессе дифтерийной токсемии в сопоставлении с поведением общего лейкоцитоза в отдельные периоды этого заболевания. Животные получали 1 ДЛМ дифтерийного токсина. Не установлено отчетливой зависимости между степенью фосфатной активности нейтрофилов и величинами общего лейкоцитоза для отдельных периодов дифтерийной токсемии. Самая высокая энзиматическая активность наблюдалась спустя 15 часов, а наивысшая величина лейкоцитоза — спустя 42 часа от момента подачи дифтерийного токсина.

The Influence of Diphtheric Toxin on the Activity of Alkaline Phosphatase of Leukocytes

Summary

During diphtheric toxæmia studies of the activity of alkaline phosphatase in granulocytes of guinea pigs were carried out simultaneously with examinations of general leukocytosis at different stages of the disease. The animals were given 1 DLM of diphtheric toxin. No distinct relation was found between the degree of the phosphatase of neutrophils and the values of general leukocytosis at different stages of diphtheric toxæmia. The highest enzymatic activity and the highest values of leukocytes were observed after 15 and 42 hrs., respectively following the moment of diphtheric toxin administration.