

Zakład Histologii i Embriologii. Instytut Biologiczno-Morfologiczny. Wydział Lekarski.  
Akademia Medyczna w Lublinie

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

Wojewódzki Szpital Onkologiczny w Lublinie

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

Krystyna CZERNY, Maria KALASIEWICZ,  
Krystyna JANISZEWSKA

**Wpływ Cyklofosfamidu na obraz cytochemiczny  
granulocytów obojętnochłonnych krwi obwodowej chorych na raka płuc  
(*carcinoma planoepitheliale*)**

Влияние циклофосфамида на цитохимическую картину нейтрофильных  
гранулоцитов периферической крови больных раком легких  
(*carcinoma planoepitheliale*)

The Influence of Cyclophosphamide on the Cytochemical Picture of the Neutrophils  
in the Blood of Patients with Lung *Carcinoma Planoepitheliale*

Cyklofosfamid (CY) jest lekiem antymitotycznym z grupy związków alkilujących. Podawany doustnie, dożylnie lub do jam ciała okazał się wartościowym i stosunkowo mało toksycznym preparatem stosowanym w paliatywnym leczeniu raka sutka (3, 6, 17, 18, 19), raka płuc (7, 14), ziarnicy złośliwej (3, 20), szpiczaków (3), raka jajnika, mięsaka limfatycznego i siateczkowatego oraz innych schorzeń nowotworowych (3). W organizmie przechodzi w aktywną cykliczną iminopochodną, która hamuje replikację DNA i jego polimeryzację (9). Uboczne działanie CY skierowane jest głównie na szpik kostny. Ze składników morfotycznych krwi obwodowej szczególnie wrażliwe okazały się granulocyty (3, 15). Lek ten powoduje leukopenię, czasem trombocytopenię (15). U 30% leczonych występuje łysienie, u 15—20% zaburzenia ze strony przewodu pokarmowego i układu moczowego (3). W związku z tymi toksycznymi właściwościami Cyklofosfamidu wydało się celowe prowadzenie obserwacji skutków działania CY na obraz reakcji cytochemicznych w granulocytach obojętnochłonnych krwi obwodowej. Zagadnieniu temu poświęcono dotychczas

niewiele badań, a wiadomo że reakcje cytochemiczne są morfologicznym odzwierciedleniem stanu czynnościowego komórki.

#### MATERIAŁ I METODY BADAŃ

Badaniem objęto 6 mężczyzn w wieku 42—77 lat (pacjenci Wojewódzkiego Szpitala Onkologicznego w Lublinie), u których rozpoznano pierwotnego raka płuc o typie histologicznym *carcinoma planoepitheliale*. Chorzy ci nie byli uprzednio poddawani leczeniu przeciwnowotworowemu. CY stosowano we wlewach dożylnych, podając jednorazowo dawkę 30 mg/kg i nie przekraczając 2000 mg. Krew obwodową do badań pobierano tuż przed wlewem kroplowym (I grupa), w 2 godz. po jego zakończeniu (II grupa) oraz po upływie tygodnia (III grupa). Odczyny cytochemiczne wykonywano na rozmazach nieutrwalonych i utrwalonych w parach formaliny. Wykonywano następujące reakcje: 1) odczyn na aktywność dehydrogenazy bursztynianowej (16), 2) odczyn na aktywność fosfatazy zasadowej (cyt. wg 11), 3) odczyn na aktywność fosfatazy kwaśnej (4), 4) odczyn na aktywność esteraz niespecyficznych (4), 5) reakcję PAS (13), 6) reakcję PAS-dimedon (21), 7) reakcję PAS-diałaza (13), 8) oznaczanie lipidów (cyt. wg 11), 9) reakcję Bracheta (13), 10) reakcję Feulgena (13), 11) barwienie błękitem alcjjanowym (13), 12) barwienie rywanolem (8). W dniu dożylnego wlewu CY oraz po upływie 1 tygodnia od chwili wlewu oznaczono ilościowo zawartość we krwi krwinek białych i wśród nich procentową ilość granulocytów obojętnochłonnych.

#### WYNIKI BADAŃ

Grupa I (Badanie cytochemiczne granulocytów obojętnochłonnych w rozmazach krwi pobranej przed wlewem dożylnym CY).

W cytoplazmie większości granulocytów obojętnochłonnych stwierdzono obecność dodatniego odczynu na aktywność dehydrogenazy bursztynianowej. Pozytywny był również wynik reakcji wykazującej aktywność fosfatazy zasadowej. Reakcje na aktywność fosfatazy kwaśnej i esteraz niespecyficznych były słabo dodatnie lub ujemne. Komórki wykazywały w cytoplazmie duże nagromadzenie substancji PAS-pozytywnych, których ilości zmniejszyła się po hydrolizie przy pomocy diastazy. Cytoplazma granulocytów barwiła się błękitem alcjjanowym słabo, dyfuzyjnie. Tylko pojedyncze komórki zawierały nieliczne ziarenka sudanochłonne. Jądra granulocytów obojętnochłonnych posiadały po zabarwieniu wg metody Feulgena zrąb prawidłowy, po zabarwieniu rywanolem obserwowano żółtopomarańczową intensywną ich fluorescencję (ryc. 1). Pironinochłonność cytoplazmy była mała, zmniejszyła się jeszcze (zanikała) po trawieniu rybonukleazą.

Grupa II (badanie cytochemiczne granulocytów obojętnochłonnych w rozmazach krwi pobranej w 2 godz. po wlewie dożylnym CY).

Odczyn cytochemiczny na aktywność dehydrogenazy bursztynianowej miał charakter dyfuzyjny, w wielu komórkach drobnoziarnisty. Nie stwierdzono różnic w porównaniu z obrazami grupy I. Nie zauważono



Ryc. 1. Grupa I. Barwienie rywanolem wg Grzyckiego. Jądra komórkowe wykazują żywą fluorescencję. Pow. 500×

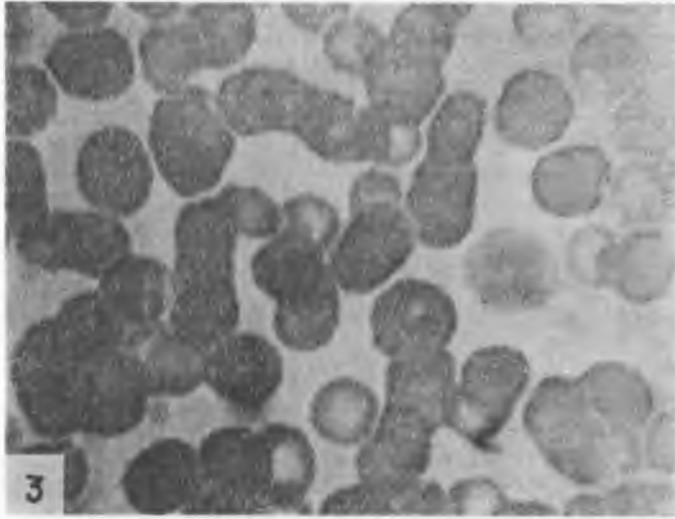
Group I. Staining by ryvanol after Grzycki's method. The strong fluorescence of nuclei is vivid. Magn. 500×



Ryc. 2. Grupa III. Odczyn na aktywność dehydrogenazy bursztynianowej ujemny w cytoplazmie komórki (jądra podbarwione hematoksyliną Mayera). Pow. 500×

Group III. Succinic dehydrogenase activity reaction was negative in the cytoplasm (the nuclei were stained with Mayer's hematoxylin). Magn. 500×

również zmian w aktywności fosfatazy zasadowej. Odczyn na aktywność fosfatazy kwaśnej w porównaniu z grupą I był lekko wzmożony, nato-



Ryc. 3. Grupa III. Odczyn na aktywność fosfatazy zasadowej ujemny (jądra komórkowe podbarwione). Pow. 500×

Group III. Alkaline phosphatase activity reaction seems negative (the nuclei stained with Mayer's semotoxylin). Magn. 500×



Ryc. 4. Grupa III. Barwienie PAS. Mała intensywność odczynu w cytoplazmie granulocyту obojętnochłonnego. Pow. 500×

Group. III. Cytochemical PAS staining. A feeble reaction in the cytoplasm cell. Magn. 500×

miast odczyn na aktywność esteraz niespecyficznych mniej intensywny. W cytoplazmie obserwowano silnie dodatni odczyn PAS, podobnie jak

w grupie I. Obrazy oglądane po działaniu diastazy i zastosowaniu dime-donu również nie wykazywały zmian w porównaniu z grupą I. Odczyn po zabarwieniu błękitem alcjanowym był wzmożony. Granulocyty obojętnochłonne nie zawierały substancji sudanochłonnych. Jądra komórkowe badane przy pomocy reakcji wg Feulgena, barwione rywanolem wg Grzyckiego i w odczynie wg Bracheta, nie różniły się od jąder granulocytów obojętnochłonnych poprzedniej grupy. Pironinochłonność cytoplazmy nie uległa zmianie.

Grupa III (badanie cytochemiczne granulocytów obojętnochłonnych w rozmazach krwi pobranej po upływie 1 tygodnia od chwili dożylnego wlewu CY).

W cytoplazmie komórek obserwowano znaczne zmniejszenie intensywności odczynu na aktywność dehydrogenazy bursztynianowej. Często spotykano komórki bez śladu aktywności enzymu (ryc. 2). Znacznemu osłabieniu uległa aktywność fosfatazy zasadowej (ryc. 3). Natomiast wiele granulocytów obojętnochłonnych wykazywało silny odczyn na aktywność fosfatazy kwaśnej. Aktywność esteraz niespecyficznych zmniejszyła się w porównaniu z poprzednimi grupami. Intensywność odczynu PAS w cytoplazmie była również obniżona (ryc. 4). Po hydrolizie przy pomocy diastazy i po użyciu dime-donu zabarwienie produktów reakcji PAS było proporcjonalnie zmniejszone. Obserwowano silne zabarwienie cytoplazmy błękitem alcjanowym. Nie stwierdzono obecności ziaren sudanochłonnych w cytoplazmie. Zrąb jąder granulocytów obojętnochłonnych barwił się podobnie jak w grupach I i II, nie zmieniła się również ich fluorescencja. Obserwowano zmniejszoną w porównaniu z grupą II intensywność zabarwienia cytoplazmy granulocytów obojętnochłonnych pironiną.

Wyniki obliczeń leukocytozy i procentowe oznaczanie ilości granulocytów obojętnochłonnych (formy jąder segmentowane) przedstawiają się następująco: w dniu dożylnego wlewu CY (grupa I i II) u badanych 6 chorych stwierdzono leukocytozę 4800, 4600, 5000, 9800, 7400 i 4200. W tej samej kolejności u badanych w tym dniu pacjentów procent granulocytów obojętnochłonnych wynosił: 50, 53, 66, 54, 62 i 69. Po upływie 1 tygodnia od chwili wlewu CY (grupa III) wyniki obliczeń wynosiły, przy zachowaniu tej samej kolejności badanych przypadków: leukocytoza — 4200, 3800, 400, 6800, 5200 4100; procent granulocytów obojętnochłonnych — 54, 56, 72, 70, 68, 70.

#### OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ

Badania cytochemiczne zwróciły uwagę na różnice w aktywności niektórych enzymów w cytoplazmie granulocytów obojętnochłonnych, pojawiające się zwłaszcza po upływie tygodnia od chwili dożylnego wlewu Cyklofosfamidu. Obserwacje aktywności fosfatazy zasadowej były przed-

miotem zainteresowania wielu prac (m.in. 10, 11). Stwierdzono, że granulocyty kwasochłonne i zasadochłonne nie wykazują aktywności fosfatazy zasadowej. Rola tego niespecyficznego zespołu enzymatycznego w granulocytach obojętnochłonnych nie jest dotychczas dokładnie wyjaśniona. Prawdopodobnie fosfataza zasadowa bierze udział w gospodarce węglowodanowej. Oznaczanie jej aktywności ma zastosowanie jako test diagnostyczny w hematologii, w różnicowaniu pomiędzy przewlekłą białaczką szpikową a innymi zespołami proliferacyjnymi. Wiele czynników może wpływać na zmiany aktywności fosfatazy zasadowej w granulocytach obojętnochłonnych (11). Stwierdzono m.in. wzrost aktywności fosfatazy zasadowej w cytoplazmie po leczeniu bisulfanem, testosteronem, po stosowaniu kortykosterydów i w przebiegu zakażeń bakteryjnych. W obecnej pracy zauważono, po upływie 1 tygodnia od chwili dożylnego wlewu CY, obniżenie aktywności fosfatazy zasadowej w wielu komórkach. Ten spadek aktywności fosfatazy zasadowej może przemawiać za zmniejszeniem intensywności metabolizmu węglowodanów.

Wyniki badań aktywności fosfatazy kwaśnej w komórkach krwi, jak podaje literatura (11), nie są zgodne, zwłaszcza jeśli chodzi o nasilenie reakcji w poszczególnych komórkach. Pomimo że fosfataza kwaśna ma bardzo ścisły związek z fagocytozą, badanie jej aktywności nie jest bezpośrednim wykładnikiem możliwości fagocytarnych komórki (11). W obecnej pracy zauważono nieznaczny wzrost aktywności enzymu w III badanej grupie, powiększenie lizosomów również w niektórych granulocytach obojętnochłonnych grupy II. Zjawisko to może się łączyć raczej z czynnikami uszkodzającymi komórkę aniżeli z nasileniem procesów fagocytozy.

Dotychczas nie jest w pełni wyjaśniona rola esteraz niespecyficznych w komórkach krwi. Twierdzono, że zawierają je tylko monocyty (49). Aktywność esteraz niespecyficznych może mieć związek z procesami fagocytozy (5). Jednak wyniki prac różnych autorów są często niezgodne i uzależnione od stosowanej metody badań. Nowsze prace (12) polecają dla diagnozy schorzeń krwi badania aktywności m.in. esteraz niespecyficznych. Przy stosowaniu jako substratu octanu  $\alpha$ -naftyłu wykazano dodatni odczyn zarówno w granulocytach, jak i w agranulocytach. Stosując w obecnej pracy tę metodę cytochemiczną zauważono już po 2 godzinach od chwili dożylnego wlewu CY zmniejszenie aktywności esteraz niespecyficznych w granulocytach obojętnochłonnych. Zjawisko to obserwowano również w III badanej grupie. Być może, zgodnie z poprzednimi doniesieniami (12), odczyn na esterazy niespecyficzne może być wskaźnikiem zmniejszenia intensywności metabolizmu komórkowego bardziej czułym niż inne metody cytochemiczne.

Wykładnikiem stanu czynnościowego komórek jest aktywność dehydrogenazy bursztynianowej. Po tygodniu od chwili dożylnego wlewu CY

aktywność dehydrogenazy bursztynianowej w cytoplazmie granulocytów obojętnochłonnych uległa osłabieniu. Analizując to zjawisko w oparciu o poprzednie prace (1, 2, 11), osłabienie aktywności dehydrogenazy bursztynianowej może być uznane za dowód zmniejszenia intensywności procesów oksydoredukcyjnych w komórkach. Dehydrogenaza bursztynianowa jest bardzo nietrwała i wrażliwa na wszelkie czynniki uszkodzające komórkę. W świetle tego twierdzenia interesujący jest wynik zachowania nie zmienionej aktywności dehydrogenazy bursztynianowej w granulocytach grupy II, wtedy gdy aktywność esteraz niespecyficznych uległa już zmniejszeniu.

Badania po zastosowaniu reakcji PAS, PAS-diałaza i PAS-dimedon wykazały w cytoplazmie granulocytów obojętnochłonnych po tygodniu od chwili dożylnego wlewu CY spadek intensywności reakcji PAS. Dotyczyło to zarówno mukopolisacharydów obojętnych, jak i zawartości glikogenu. Obserwowane zjawisko jest zgodne z poprzednimi doniesieniami (11). Zmniejszoną zawartość glikogenu można tłumaczyć małą syntezą tego związku w badanych warunkach. Natomiast dużą intensywność reakcji po barwieniu błękitem alcjanowym stwierdzono w wielu granulocytach obojętnochłonnych zwłaszcza grupy III. Zgodnie z jednoczesnym zmniejszeniem intensywności odczynów na aktywność enzymów, prawdopodobnie występuje mniejszy rozkład mukopolisacharydów kwaśnych lub zachodzą patologiczne zjawiska w metabolizmie cukrowców i większe nagromadzenie substancji barwiących się błękitem alcjanowym.

Ujemne wyniki barwienia lipidów w cytoplazmie granulocytów tłumaczyć można niewielką rolą lipidów w gospodarce krwinek białych. Przy pomocy metody stosowanej w obecnej pracy wykazano obecność ziaren sudanochłonnych w nielicznych granulocytach obojętnochłonnych grupy I. Nie stwierdzono pojawienia się ziaren sudanochłonnych po dożylnym wlewie CY, pomimo że zwiększona synteza lipidów wiąże się z degeneracją komórki. O istnieniu degeneracji można myśleć biorąc pod uwagę fakt wzrostu aktywności fosfatazy kwaśnej przy jednoczesnym zmniejszeniu aktywności fosfatazy zasadowej i dehydrogenazy bursztynianowej. Prawdopodobnie więc, jeśli nawet zjawisko degeneracji występuje, to w małym stopniu i nie doprowadza do gromadzenia substancji tłuszczowych.

Cyklofosfamid w mechanizmie swego działania ma wpływ, jak wspomniano w części wstępnej pracy, na kwasy nukleinowe w komórce. Obserwacje prowadzone przy pomocy zastosowanych metod cytochemicznych nie wykazały istotnych różnic w jądrach granulocytów obojętnochłonnych badanych trzech grup. Zmniejszyła się natomiast pironinochłonność cytoplazmy. Osłabienie reakcji (zanikającej po hydrolizie przy pomocy RNA-azy), wiąże się ze zmniejszeniem ilości RNA i osłabieniem

syntez białkowych w cytoplazmie, co w warunkach obecnej pracy można uzależnić od wpływu CY. U wszystkich badanych chorych stwierdzono przed leczeniem stan znacznego miejscowego zaawansowania nowotworu z jednoczesnym dość dobrym stanem ogólnym i zadowalającym obrazem morfotycznym krwi obwodowej. Po upływie tygodnia od chwili dożylnego podania CY w ilości 30 mg/kg c. ciała wystąpił niewielki spadek ilości krwinek białych. Stan ogólny chorych nie pogorszył się. Obserwacje cytochemiczne po zastosowanej w obecnej pracy chemoterapii wykazały spadek intensywności metabolizmu w granulocytach obojętnochłonnych po zastosowaniu masywnego wlewu dożylnego Cyklofosfamidu i przeprowadzone odczyny mogą być pomocne przy wczesnej ocenie stanu komórek krwi. Zwłaszcza istotne znaczenie mogą mieć reakcje wykazujące aktywność enzymów komórkowych — esteraz niespecyficznych, dehydrogenazy bursztynianowej, fosfataz kwaśnej i zasadowej.

#### PIŚMIENNICTWO

1. Ackerman G. A.: *J. Biophysic. Biochem. Cytol.* 8, 61—71, 1960
2. Balogh L., Cohen R. B.: *Blood*, 17, 491, 1961.
3. Boesen E., Davis V.: *Chemioterapia nowotworów. Leki cytostatyczne*. PZWL, Warszawa 1972.
4. Braunstein H.: *J. Histochem. Cytochem.* 7, 202—205, 1959.
5. Chessich R. D.: *J. Histochem. Cytochem.* 1, 471, 1953.
6. Glińska H., Chrzanowska A.: *Nowotwory*, 27, 149—159, 1967.
7. Górecki R., Brodziak R., Gondarowicz K., Stanek S.: *Gruźlica*, 37, 251—254, 1969.
8. Grzycki S., Czerny K.: *Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, sec. D* 29, 183—187, 1974.
9. Hano J., Sierosławska J.: *Farmakologia i farmakodynamika*. PZWL, Warszawa 1972.
10. Kidson C.: *Anat. Ann. Med.* 11, 50, 1962.
11. Kowalewski J.: *Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, sec. D* 22, 21—46, 1967.
12. Leder L. D.: *Beitr. Path.* 141, 286—287, 1970.
13. Pearse A. G. E.: *Histochemistry Theoretical and Applied*, Churchill, London 1960.
14. Ratajek M.: *Wiad. Lek.* 21, 15—18, 1970.
15. Sadliński C., Stadnik J., Wodarczyk D., Biskupek M.: *Pol. Tyg. Lek.* 24, 1811—1813, 1969.
16. de Soura E. J., Kothare S. N.: *J. Histochem. Cytochem.* 7, 77, 1959.
17. Stadnik J.: *Wiad. Lek.* 23, 485—488, 1970.
18. Sułocka J., Kobierska A., Solska E.: *Wiad. Lek.* 25, 821—826, 1972.
19. Szymanowski J.: *Wiad. Lek.* 16, 341—345, 1963.
20. Topolska P., Rostkowska J.: *Wiad. Lek.* 19, 127—130, 1966.
21. Zawistowski S.: *Zarys histologii*. PZWL Warszawa 1973.

Otrzymano 25 III 1975.



## РЕЗЮМЕ

Нейтрофильные гранулоциты периферической крови больных *carcinoma planoepitheliale* легких исследовали при помощи цитохимических методов. Больные получали 30 мг/кг веса тела циклофосфамид (однократное внутривенно-капельное влияние). Мазки крови окрасили разными цитохимическими методами. Результаты исследований подтверждают влияние циклофосфида на метаболизм лейкоцитов.

## SUMMARY

The neutrophils from circulating blood of patients with carcinoma planoepitheliale were studied by cytochemical techniques. The patients were treated by Cyclophosphamide (a single i.v. drip-infusion 30 mg/kg body weight). The smears were stained with different cytochemical methods. The reaction results seem to confirm the influence of Cyclophosphamide on the leucocyte metabolism.

