

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ МЕДИЦИНА

Ю. Б. ХЕЙФЕЦ, А. Л. ШАБАДАШ

ЦИТОХИМИЯ ГЛИКОГЕНА НЕЙТРОФИЛОВ КРОВИ
КАК РАДИОБИОЛОГИЧЕСКИЙ ПОКАЗАТЕЛЬ

Цитохимические исследования изменений системы крови могут во многом помочь теории и практике радиобиологии; анализ периферической крови легко доступен и, не причиняя организму существенной дополнительной травмы, позволяет учитывать динамику реактивности организма; таким образом, диагностика фазовых изменений и оценка эффективности использования защитных или лечебных веществ может быть углублена с помощью цитохимических показателей.

Задачей наших исследований является изучение цитохимических изменений гликогена после облучения. Содержание гликогена в лейкоцитах существенно влияет на их функциональные свойства (например, на подвижность и фагоцитоз лейкоцитов) и жизнеспособность. Распад гликогена не только лишает клетку важнейших энергетических ресурсов, но и приводит к накоплению кислот (молочной, пировиноградной и т. п.), повреждающих структурную организацию.

Материал и методы исследования. Опыты проведены на линейных белых крысах-самцах, весом в 200—250 г, которые были однократно облучены на аппарате РУМ-3 дозой 800 р. Условия облучения — напряжение 185 кв, сила тока — 15 мА, фильтр — 0,5 мм Си; кожно-фокусное расстояние — 32 см; мощность дозы 44 р/мин., экспозиция — 18 мин. 22 сек. Животные облучались утром, натощак.

В опытной и контрольной группе производились общий клинический анализ крови (определение лейкоцитов, эритроцитов, гемоглобина, цветного показателя, лейкоформулы) и цитохимическое обнаружение гликогена по методу Шабадаша [5, 6]—до облучения, через 10, 30 и 60 мин. после воздействия; спустя 3, 6 и 24 ч.; затем, каждые сутки. Мазок крови на хорошо обезжиренном стекле немедленно подсушивался в струе теплого воздуха (максимально в течение 10—12 секунд) и сразу погружался на 30 мин. в фиксатор Шабадаша (на 100 мл 96° спирта 1,8 г азотнокислой меди и 0,9 г азотнокислого кальция; перед употреблением добавить 10 мл неразведенного формалина). Затем стекла с мазками переносились в 96° спиртректификат (3 смены по 10 мин.) и высушивались на воздухе. Сухие мазки могут длительно сохраняться, если нет возможности немедленно подвергнуть их последующей обработке раствором периодата натрия и т. п. [5].

Как известно [6], гликоген обнаруживается в нейтрофилах, эозинофилах, базофилах и тромбоцитах в типичной для каждой формы локализации, которая при других методах фиксации и цветного выявления теряет свою четкость [7]; докраска ядер гематоксилином Караччи проводилась нами после окончания цитохимической реакции в течение 2—3 мин.

При точном и совершенно стандартном соблюдении всех условий взятия, фиксации и цитохимической обработки мазков получаются достоверные и сравнимые результаты, в том числе—доступные объективной фотометрии. Практически учет контрастных, визуально улавливаемых различий в содержании гликогена позволяет подсчитывать 4 группы клеток: I—с высоким содержанием гликогена, интенсивно окрашенного в краснофиолетовый цвет* (условно 70—100%); II—среднее содержание гликогена, который окрашен в насыщенно розовый цвет (условно 40—65%); III—малое содержание гликогена—бледно-розовая окраска (условно 15—35%); IV—низкий уровень или отсутствие гликогена (условно—ниже 10%) документированы нулевыми окрасками. Подсчет для каждого срока и животного производился минимально для 300 клеток; результаты обрабатывались статистически (т. е. с вычислением среднеарифметических величин и учетом ошибки на основе квадратичных отклонений).

Фактические данные. При сохранении одних и тех же условий содержания чистопородных (линейных) крыс в виварии, в нейтрофилах периферической крови контрольных животных сохраняется относительно стандартная пропорциональность клеток со средним и низким содержанием гликогена в пределах дневных 6 ч., т. е. в период, когда кровь исследовалась у подопытных крыс. Круглосуточная ритмика в данном исследовании не учитывалась, поскольку мы в целях упрощения условий проводили наблюдение только между 10 и 16 часами с исключением пищи. Так как нейтрофилы являются наиболее многочисленной и наиболее богатой гликогеном группой среди лейкоцитов, то основная линия наблюдений основывается на их свойствах. У контрольных крыс 19% нейтрофилов содержат много гликогена, 53%—среднее его количество, 26%—малое и 2%—нулевое (табл. 1); полисахарид связан со специфической зернистостью и равномерно распределен в цитоплазме.

Естественно было поставить вопрос о корреляции уровня содержания гликогена и степени зрелости нейтрофилов, о которой принято судить по числу сегментов ядра. В работе одного из нас [6] в 1949 г. установлено, что у человека эмбриональные предшественники гранулоцитов маркированы, в отличие от других генеративных клеток кроветворных органов, наличием гликогена; однако, количество полисахарида в них невелико и прогрессивно нарастает по мере созревания. В ли-

* Характеристика цветовой гаммы при искусственном освещении ОИ-19 с белым матовым стеклом и исследований иммерсионным объективом 90× с окуляром 10×.

тературе мы не встретили данных о различиях в содержании гликогена в различных типах клеток периферической крови. Учитывая ускоренное созревание после ионизирующего облучения и фазовые изменения состава нейтрофилов (сдвиги Арнета влево и вправо), мы сопоставили у контрольных крыс число сегментов ядра (пропорциональное степени зрелости) с уровнем содержания гликогена. Оказалось, что содержание гликогена в нейтрофилах нарастает параллельно амитотическому увеличению числа сегментов (табл. 1).

Таблица 1

Содержание гликогена в нейтрофилах разной степени зрелости

	Несегмент. нейтрофилы		Сегмент. (2—4) нейтрофилы		Сегмент. (4—6) нейтрофилы		Полисегм. (6—8) нейтрофилы	
	в данной группе	в 100 нейтроф.	в данной группе	в 100 нейтроф.	в данной группе	в 100 нейтроф.	в данной группе	в 100 нейтроф.
Гр. I. Интенсивно окрашенные	—	—	19% — 9%	—	22% — 6%	—	40% — 4%	—
Гр. II. Умеренно окрашенные	47% — 7%	—	49% — 23%	—	64% — 18%	—	50% — 5%	—
Гр. III. Слабо окрашенные	40% — 6%	—	32% — 15%	—	14% — 4%	—	10% — 1%	—
Гр. IV. Бесцветные	13% — 2%	—	—	—	—	—	—	—

При этом поучителен подсчет I—IV групп не столько во всех нейтрофилах (что представлено в процентах на каждые 100 нейтрофилов), сколько в пределах каждого типа клеток—по форме ядра: а) несегментированные; б) состоящие из 2—4 сегментов; в) из 4—6 сегментов; г) полисегментированные (6—8). Из табл. 1 ясно, что по мере сегментации ядра появляются клетки, богатые гликогеном (9% при 2—4 сегментах) и увеличивается число клеток, умеренно насыщенных полисахаридом; при 4—6-сегментном ядре интенсивное содержание гликогена наблюдается в 22%, а у полисегментированных—в 40%; соответственно число клеток II группы нарастает до 50—64%. Однократное общее облучение крыс* дозой в 800 р обуславливает уменьшение содержания гликогена в нейтрофилах, которое в основных чертах аналогично изменениям, описанным одним из нас [4] у мышей. Рис. 1 графически изображает ход процесса; по горизонтали отложено время после облучения в логарифмическом масштабе, по вертикали—процент клеток, содержащих средние количества гликогена (II группа)—сплошная линия, и малые количества (III группа)—пунктир; разброс показан вертикальными линиями.

* Ни одно животное не пало в период наблюдения; среди отсаженных крыс с идентичным облучением в течение первых десяти дней наблюдалась гибель не более 20%.

Спустя 10 мин. характерное снижение содержания гликогена обнаруживается в немногих клетках. Убыль гликогена неравномерна в цитоплазме: в центральной, околоядерной зоне возникает гликогенолиз, а по краю клетки—в виде ярко окрашенного ободка сохраняются (и, возможно, скапливаются) глыбки гликогена. Через 30 мин. после облуче-

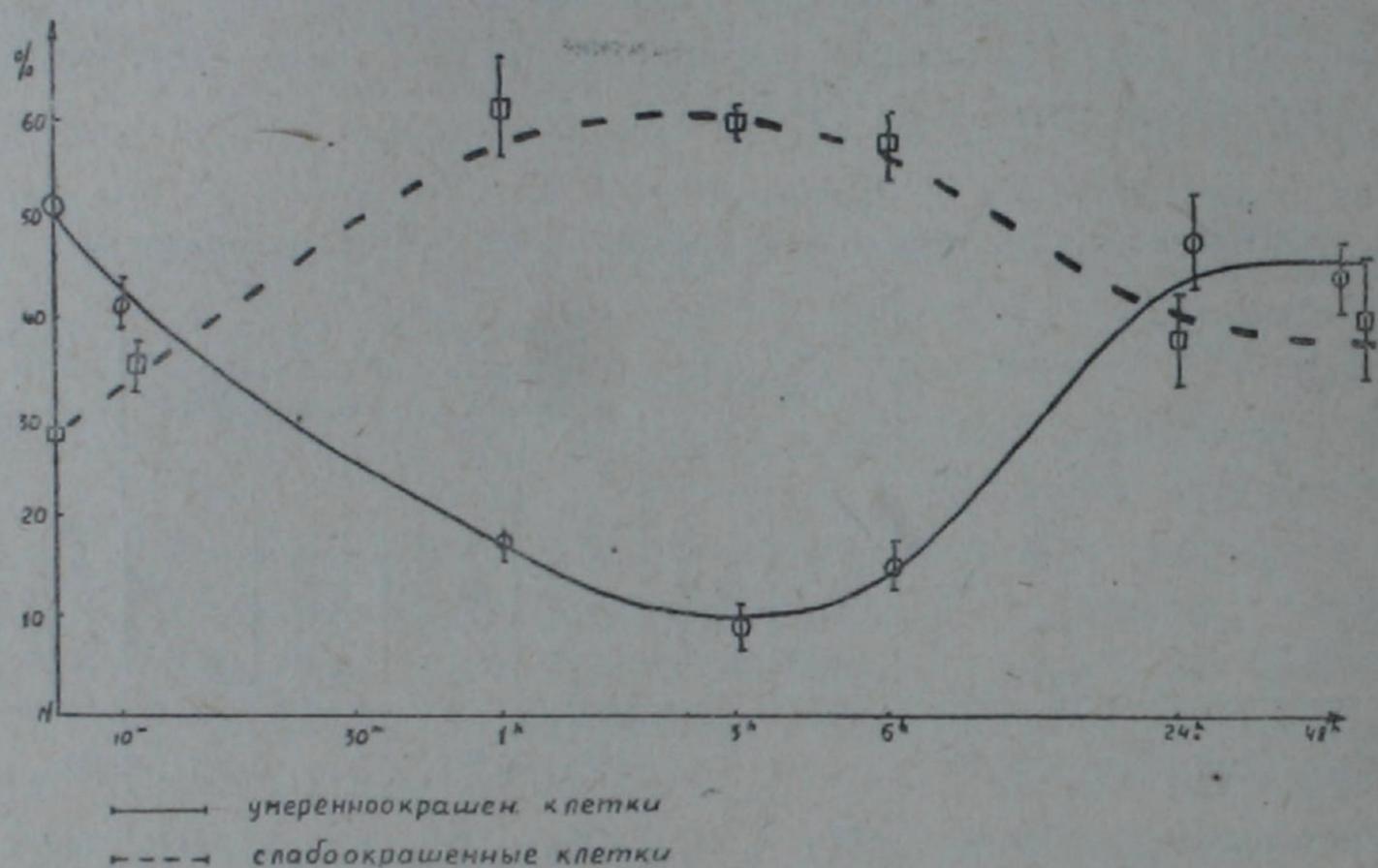


Рис. 1. Изменения количества умеренно и слабо окрашенных на гликоген нейтрофилов в разные сроки после облучения с учетом пределов допустимых ошибок.

ния число клеток, утрачивающих полисахарид (III группа), возрастает до 42—48%, и соответственно снижается число клеток II группы до 30%. Феномен центрального гликогенолиза также прогрессирует. Спустя 60 мин. исчезновение гликогена из клеток, отнесенных ко II группе, резко выражается; их процентное содержание уменьшается до 17% ($\pm 1\%$), тогда как число клеток III группы по сравнению с исходными значениями удваивается (до 63% $\pm 5\%$). Краевые, эктоплазменные ободки мелких гликогеновых гранул или сплошного диффузного слоя сочетаются с образованием нескольких псевдоподиальных выпячиваний; часть выростов гликоген-содержащей эктоплазмы отшнуровывается по типу описанного Шабдашем [6] клазматоза, подтвержденного в опытах М. П. Покровской и ее сотрудников [2, 3] при разнообразных микробиологических экспериментах. В это же время часть нейтрофилов фрагментируется нацело. Обращают на себя внимание: а) усиление реакции на гликоген в эозинофилах; б) появление гигантских форм нейтрофилов и лейкоцитов в окрашенных по Паппенгейму мазках; в) появление микробов с интенсивно окрашенной, богатой полисахаридами оболочкой. Таким образом, налицо начинающаяся бактериемия, которая существенно влияет на дальнейший ход процессов.

Через 3 ч. наблюдается максимальное снижение количества гликогена в нейтрофилах; число клеток II группы составляет едва 8% ($\pm 2\%$);

большинство клеток относится к III и IV группам. Наряду с обеднением гликогена, ярко выражено значительное набухание клеток, распластывание эктоплазмы в виде вуалевидных лапок, выступов, складок и т. п. В результате обводнения клеток и формирования псевдоподий из гомогенного внешнего мембранного слоя (по типу ундулирующей мембраны у гистиобластов и макрофагов) нейтрофилы деформируются и приобретают неправильную угловатую форму. Набухшие клетки легко сморщиваются от соприкосновения со спиртовым фиксатором, что особенно наглядно при сопоставлении с другими, сохранившими тургор элементами того же мазка. Другие признаки нарушений метаболизма—гипохроматоз ядер, значительное снижение сорбции дезоксирибонуклеопротеидами хроматина гематоксилинового лака; контуры ядра становятся расплывчатыми, наблюдается деформация ядер, смещение к периферии клетки, а также вакуолизация цитоплазмы и ядра в некоторых клетках, хроматинолиз и цитолиз. В единичных (2%) нейтрофилах, наряду с значительным повреждением ядерной организации, видны остатки интенсивно окрашенного гликогена, глыбки которого сосредоточены в одном участке цитоплазмы; это, несомненно, отмирающие элементы.

Триада признаков—гликогенолиз, набухание цитоплазмы и гипохроматоз—типичны для подавляющего большинства нейтрофилов. В то же время в отдельных клетках отмечаются индивидуальные различия, характеризующие отдельные фазы процессов. Очевидно, что гликогенолиз и сопутствующее ему накопление молочной кислоты причинно связаны с набуханием клеток; они влияют и, весьма вероятно, в свою очередь, зависимы от функционального состояния ядра; наконец, они определяют дезинтеграцию нейтрофилов.

Полиморфизм клеточных форм в течение 3 ч. усугубляется появлением юных нейтрофилов, которые при окраске по Паппенгейму обладают кольцевидным ядром; по малому содержанию гликогена они относятся к клеткам III и IV групп.

К 6 ч. после облучения содержание гликогена в нейтрофилах остается еще низким, однако за этой суммарной характеристикой скрывается несколько иная картина изменения содержания гликогена, чем через 3 ч. Большинство клеток относится к III и IV группе ($58\% \pm 3\%$) и содержит следы гликогена, который в виде узкого, бледно-розового кольца располагается по периферии клеток; центральные зоны нейтрофилов не содержат полисахарида; набухание и угловатые очертания свойственны примерно 50% нейтрофилов. Из этого числа многие клетки находятся в состоянии распада—кариолиз и цитолиз в окрашенных по Паппенгейму мазках наблюдаются в 15—20% нейтрофилов; клетки Гумпрехта составляют 10—12%. Полисегментированные формы достигают 10%.

В то же время уже появляются лейкоциты обычно округлой формы, с кольцевидным или палочковидным ядром, которое окрашивается ортохроматофильно; эти юные и молодые формы имеют невысокое количество гликогена (III и отчасти II группы) и, по-видимому, являются

новой генерацией, выделенной кроветворными органами. Наряду с нормальными очертаниями цитоплазмы, достаточным богатством хроматина в ядре и четким синтезом гликогена им, несомненно, присущи и типичные функции лейкоцитов. В связи с продолжающейся бактериемией

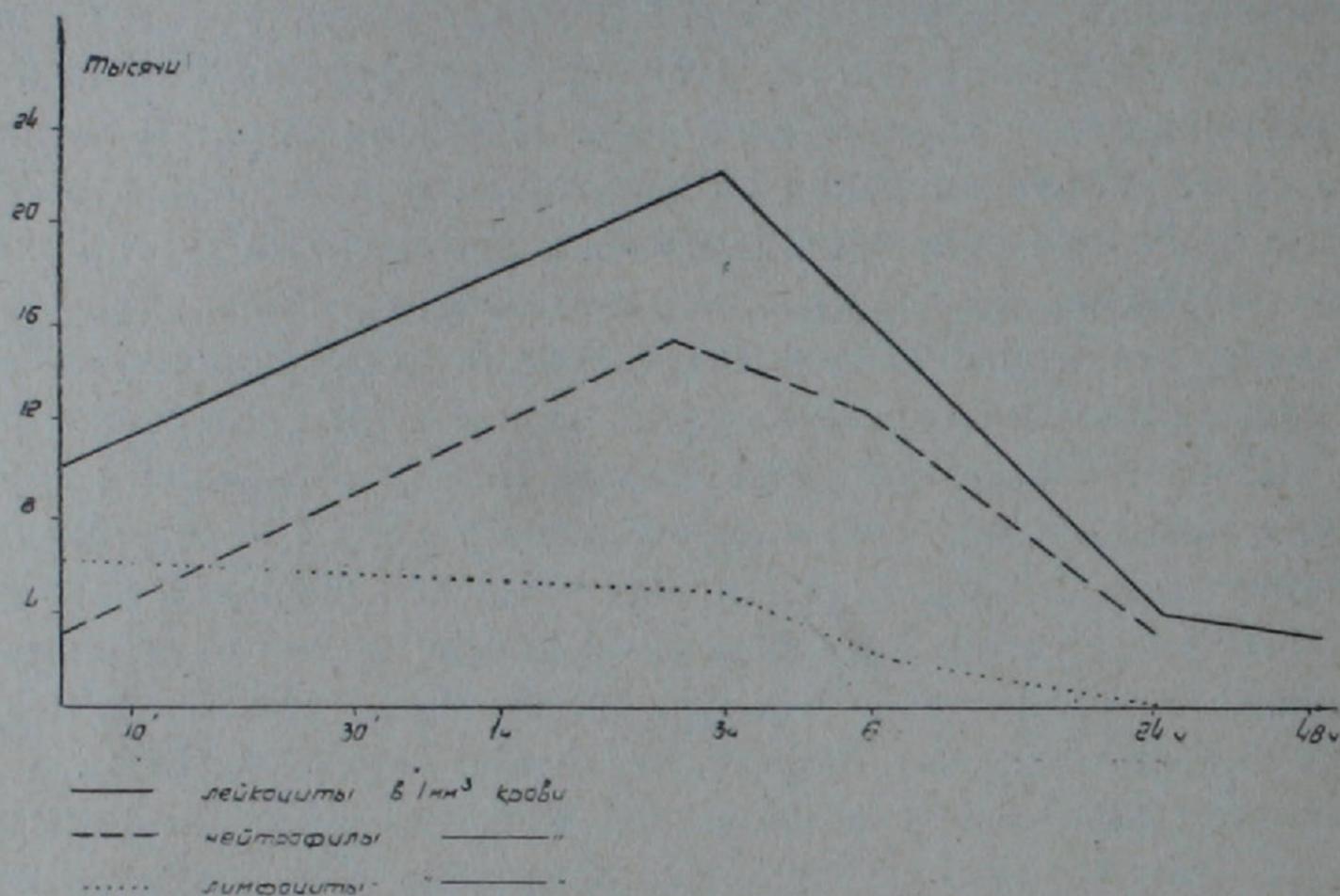


Рис. 2. Изменения абсолютного количества лейкоцитов, нейтрофилов и лимфоцитов в 1 мм³ крови в разные сроки после облучения.

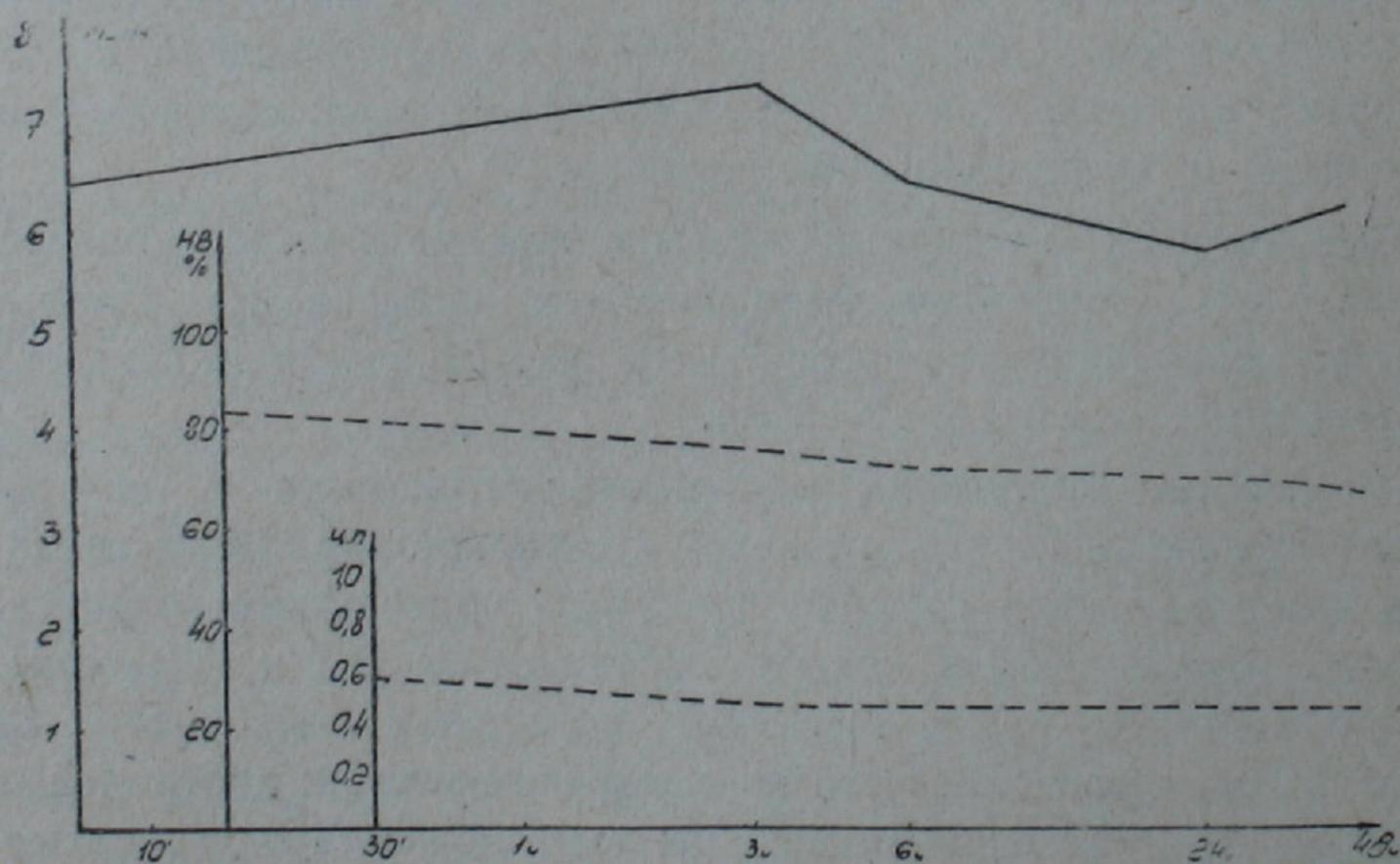


Рис. 3. Изменения эритроцитов, гемоглобина и цветного показателя в разные сроки после облучения.

они фагоцитируют микробов в различные этапы фагоцитоза, который, как известно, зависит от наличия гликогена [1], что хорошо видно в наших препаратах.

К концу первых суток кровь очищается от набухших нейтрофилов, потерявших гликоген, а также от фрагментированных или лизированных элементов. Новые генерации зрелых нейтрофилов, умеренно бога-

тые гликогеном (II группа), который равномерно распределен в цитоплазме, и с хорошо окрашивающимися ядрами (с 2—4 сегментами) составляют 47% ($\pm 5\%$). Малое содержание гликогена (III группа) наблюдается у 38% ($\pm 6\%$) нейтрофилов, но и в этих случаях способность хроматина ядер сорбировать гемотоксилин восстанавливается до нормы. Разрушенные клетки единичны.

На вторые сутки прогрессирует лейкопения и нейтропения (рис. 2), однако пропорциональное соотношение содержания гликогена в нейтрофилах II и III групп приближается к норме, с небольшим преобладанием II типа клеток с умеренно-высоким количеством полисахарида. Характеристика числа эритроцитов, количества гемоглобина и цветного показателя у облученных крыс представлена на рис. 3.

В ы в о д ы

1. Однократное общее рентгеновское облучение крыс (ЛД-100) обуславливает быстрое развитие гликогенолиза в крови, которое уже спустя 10—30 мин. приводит к обеднению нейтрофилов гликогеном.

2. Уменьшение содержания гликогена максимально выражено через 1—3 ч. после облучения и протекает на фоне значительного лейкоцитоза и нейтрофилеза. В отличие от происходящих в норме периодических вариаций уровня полисахарида, начавшийся после облучения распад полисахарида приобретает неудержимое развитие.

3. Спустя 5—6 ч. после облучения в периферической крови обнаруживается много разрушенных нейтрофилов, содержащих лишь следы гликогена. Через 24 ч. отчетливо выражена резкая лейкопения, несмотря на появление новых генераций клеток, с близким к норме умеренно-высоким содержанием гликогена.

4. Цитохимические изменения гликогена предшествуют морфологическим повреждениям ядра и цитоплазмы нейтрофилов.

Сектор радиобиологии АН АрмССР,
Институт биологической физики
АН СССР

Поступило 10.X 1961 г.

Յ. Բ. ԽԵՅՅԵՅ, Ա. Լ. ՇԱԲԱՏԱՇ

ԱՐՅԱՆ ՆԵՅՏՐՈՖԻԼՆԵՐԻ ԳԼԻԿՈԳԵՆԻ ՑԻՏՈՔԻՄԻԱՆ
ՈՐՊԵՍ ՌԱԴԻՈԲԻՈԼՈԳԻԱԿԱՆ ՑՈՒՑԱՆԻՇ

Ա մ փ ո փ ո լ մ

Կենդանիներին ճառագայթավորելուց հետո տարբեր ժամանակներում նրանց պերիֆերիկ արյան էլեմենտներում նկատվում են մորֆոլոգիական և հիստոքիմիական խիստ փոփոխություններ:

Ճառագայթավորումից 10—30 րոպե անց, դեռ մորֆոլոգիական տեսակետից շփոփոխված նեյտրոֆիլներում արդեն սկսվում է գլիկոգենի պարունակության անկում:

Գլիկոգենի պարունակության ամենախիստ պակասումը այդ բջիջներում նկատվում է ճառագայթավորումից 1—3 ժամ անց, որ առաջանում է նեյտրոֆիլային լեյկոցիտոզի ֆոնի վրա:

Պերիֆերիկ արյան էլեմենտներում մորֆոլոգիական փոփոխությունները սկսում են ճառագայթավորումից մեկ ժամ անց: Մինչ այդ բջիջների ձևը և կորիզմը նորմալ պահպանված են լինում: Ճառագայթավորումից 3 ժամ անց արդեն երևան են գալիս արյան ուռչեցած, քայքայված բջիջներ, նկատվում է նաև բջի կորիզի խրոմատինի ներկման առավելագույն անկում:

Ճառագայթավորումից 6 ժամ անց կենդանու պերիֆերիկ արյան մեջ դիտվում են գլիկոգենի հետքեր պարունակող, թվով շատ, քայքայված բջիջներ:

Ճառագայթավորումից մեկ օր հետո դիտվում է խիստ լեյկոպենիա: Այդ ժամանակ հանդես են գալիս նորմալ քանակությամբ գլիկոգեն պարունակող սովորական ձևի բջիջներ՝ լավ գունավորված հյուսվածի կորիզով:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Адо А. Д. Патологическая физиология фагоцитов. Медгиз, М., 1961.
2. Краскина Н. А. и Брауде Н. И. Изменения внутриклеточного углеводообмена в ранних стадиях вакцинного процесса у человека. Сб. Гистохим. методы в норм. и патол. морфологии. Медгиз, 1958, 182—194.
3. Покровская М. П., Макаренко И. Г., Брауде Н. А., Прядкина М. Д., Гуторова Н. М. Значение цитохимического исследования для изучения вопросов иммунологии. ЖМЭИ, 1959, 1, 5—10.
4. Хейфец Ю. Б. Изменения гликогена в лейкоцитах при воздействии ионизирующей радиации. Вопросы радиобиологии, Ереван, 1960, 1, 87—91.
5. Шабадаш А. Л. Проблемы гистохимического исследования гликогена нормальной нервной системы. Медгиз, М., 1948.
6. Шабадаш А. Л. Гликоген крови как гематологический признак. Доклады АН СССР, 1949, 68, 2, 389—392.
7. Bessis M. Cytology of the blood and blood-forming organs. 1956. New-York-London. Grune and Straton publishers.