

JANUSZ A. MADEJ, CZESŁAW KASZUBKIEWICZ, MICHAŁ MAZURKIEWICZ,
STANISŁAW KLIMENTOWSKI, LUCYNA FISZER

Próba wykorzystania chemiluminescencji w diagnostyce białaczki limfatycznej P 388 u myszy*)

Katedra Anatomii Patologicznej Wydziału Weterynaryjnego AR, ul. C. Norwida 31, 50-375

Wrocław
Katedra Epizootiologii i Klinika Chorób Zakaźnych Wydziału Weterynaryjnego AR, pl.
Grunwaldzki 45, 50-366 Wrocław

Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN, ul. Czerska 12, 53-114 Wrocław

Wśród metod mogących znaleźć zastosowanie we wczesnym diagnozowaniu nowotworzenia należy uznać te, których istota oparta jest na wykrywaniu procesów wolnorodnikowych. Do badań procesów wolnorodnikowych, obok elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR) (14), coraz częściej używa się metody chemiluminescencji (ChL) (15, 16). Chemiluminescencja pojawia się wówczas, gdy jeden z produktów reakcji, np. tlen singletowy, jest w stanie elektronowo wzbudzonym i powraca do stanu podstawowego emitując światło (2, 6, 21). Powstanie tlenu singletowego ma miejsce w szeregu procesach, np. rozpadzie tlenków nienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA) i utlenianiu polifenoli (6). Zazwyczaj mamy do czynienia z pierwszym wzbudzonym singletowym S_1 cząsteczki (2). Głównym źródłem wolnych rodników (WR) jest tlen, występujący jako podwójny rodnik $O^{\cdot}-O^{\cdot}$, zamiast $O=O$. Aspekt patogenności WR ma polegać na wywoływaniu zmian konformacji i wielkości cząstek, prowadząc do zaburzeń ich funkcji (1).

Stwierdzono (15), że w kolejnych badaniach chemiluminescencyjnych wartość współczynnika k ulega obniżeniu lub wzrostowi, co świadczy odpowiednio o zwiększeniu lub zmniejszeniu natężenia procesów wolnorodnikowych odpowiedzialnych za przebieg reakcji z alfa-tokoferolem w mieszaninie inkubacyjnej. Reakcja ta jest bezpośrednio uzależniona od proporcji lipidów antyutleniających w badanym narządzie. Obniżenie wartości k wydaje się być spowodowane wzrostem poziomu lipidów i obniżeniem zawartości antyutleniających i odwrotnie: obniżonemu poziomowi przeciwutleniających towarzyszy wzrost wartości współczynnika k (15, 16).

Celem pracy było określenie: a) przydatności metody chemiluminescencji w wykrywaniu wolnych rodników w surowicy i narządach wewnętrznych oraz b) znaczenia tej metody w diagnostyce wczesnych stadiów przeszczepialnej białaczki u myszy.

Materiał i metody

Do badań użyto myszy hybrydów $BDF_1(C_{57}BL)6 \times XDBA$ (2), samców, 3 mies., pochodzących z Ośrodka Hodowli Zwierząt Wsobnych przy Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu. Białaczkę P 288 pasażowano co 6–7 dni przeszczepiając myszom DBA/2 dootrzewnowo 10^6 komórek nowotworowych. Myszy doświadczalne zaszczepiono komórkami białaczki limfatycznej P 388, podając im do-

otrzewnowo 10^4 komórek nowotworowych, zawieszonych w 0,1 ml buforowanego PBS. Myszy zabijano przez skrwawienie po 2, 5 i 10 dobach od chwili zaszczepienia nowotworu, a więc we wczesnym stadium rozwoju białaczki. Narządy wewnętrzne, tj. wątrobę, śledzionę oraz węzły chłonne ważono, a następnie weryfikowano histopatologicznie w wym. terminach.

Badania chemiluminescencyjne: rejestracji bardzo słabych świeceń fotonowych dokonywano w 20% wyciągach tkankowych z wątroby, śledziony i węzłów chłonnych, a także w surowicy krwi wg metody Owczarczyk i wsp. (16). Czas rejestracji w próbce ogrzanej do temp. $323^{\circ}K$ wynosił 30 minut. Impulsy pochodzące z bardzo słabych świeceń fotonowych zliczano przelicznikiem elektronowym typu PEL-5 z zastosowaniem fotopowielacza P-12 FQ 51. Przebieg reakcji chemiluminescencyjnej w ustalonych przedziałach czasu wyliczano z równania:

$$I_t = I_0 e^{-\frac{t}{k}},$$

gdzie I_t — wartość natężenia promieniowania w czasie t , I_0 — wartość początkowa natężenia promieniowania i k — stała, charakterystyczna dla danej reakcji.

Wyniki i omówienie

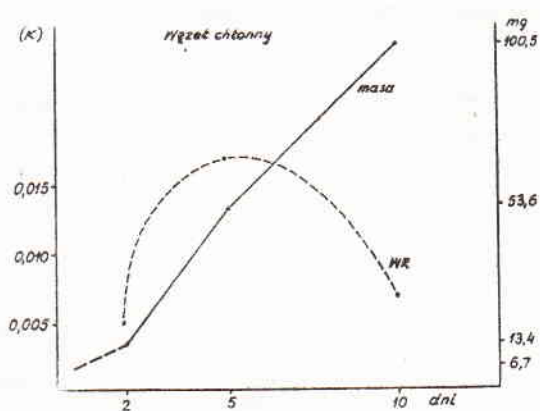
W drugim dniu po zaszczepieniu (p.z.) białaczki obserwowano w obrazie mikroskopowym rozpoczynającą się kolonizację węzłów chłonnych przez komórki nowotworowe, lokalizujące się przede wszystkim w zatokach brzożnych i promienistych. W 5 dniu ilość komórek nowotworowych wyraźnie wzrastała, a w 10 dniu komórki białaczkowe naciekały już cały węzeł chłonny. Kolonizacja wątroby i śledziony przez komórki białaczkowe rozpoczynała się nieco później w węzłach chłonnych, bo dopiero w 5 dniu po zaszczepieniu i nieznacznie nasiliła się w 10 dniu. W śledzionie komórki białaczkowe stwierdzono w zatokach, natomiast w wątrobie w naczyńkach kapilarnych, żyłce środkowej oraz w niektórych żyłach międzyzrakowych (ryc.

Tab. 1. Średnie wartości k w wyciągach tkankowych oraz w surowicy krwi myszy z przeszczepialną białaczką limfatyczną P 388

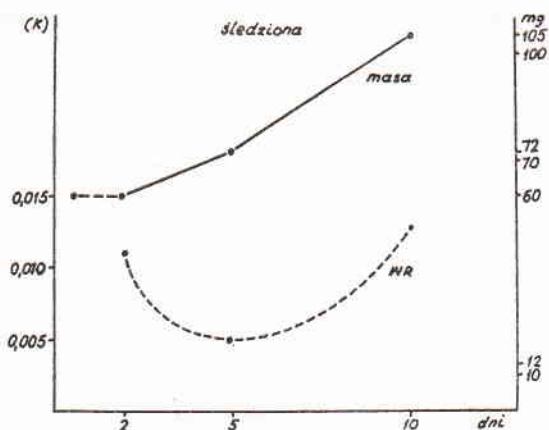
Grupa	Doba	Wątroba	Śledziona	Węzły chłonne	Surowica
Kontrolna		0,009	0,016	xx	0,014
Doświadczalna	2	0,015	0,011	0,006	0,014
	5	0,007	0,005	0,018	0,009
	10	0,015	0,013	0,01	0,017

Objaśnienie: xx — nie oznaczono ze względu na bardzo małą masę węzłów chłonnych.

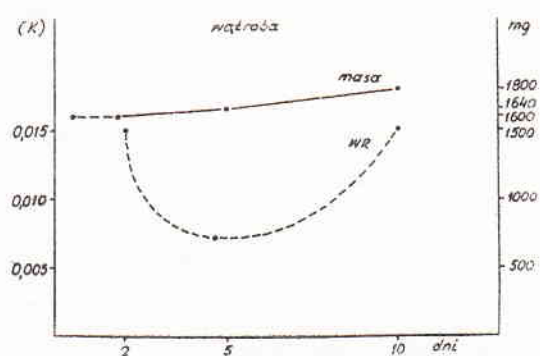
*) Praca wykonana w ramach Problemu MR — 2/17.



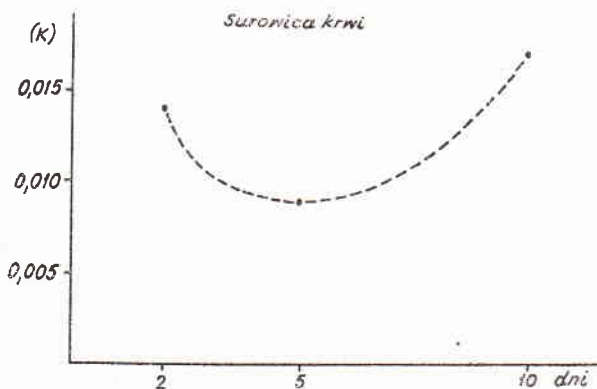
Ryc. 1. Średnia wartość k w węźle chłonnym po 2, 5 i 10 dobach od momentu zaszczepienia myszom białaczki limfatycznej P 388, skorelowana z masą ciała zwierzęcia



Ryc. 3. Średnia wartość k w śledzionie po 2, 5 i 10 dobach od momentu zaszczepienia myszom białaczki limfatycznej P 388, skorelowana z masą ciała zwierzęcia



Ryc. 2. Średnia wartość k w wątrobie po 2, 5 i 10 dobach od momentu zaszczepienia myszom białaczki limfatycznej P 388, skorelowana z masą ciała zwierzęcia



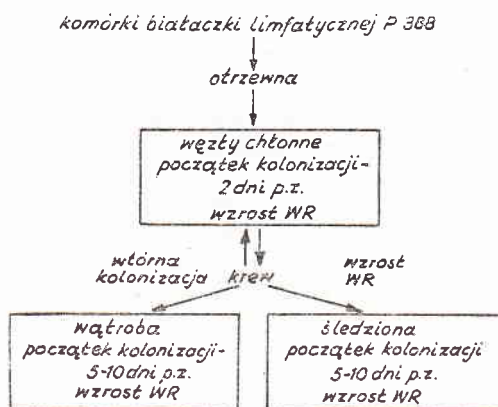
Ryc. 4. Średnia wartość k w surowicy krwi po 2, 5 i 10 dobach od momentu zaszczepienia myszom białaczki limfatycznej P 388

5). Wyniki badań chemiluminescencyjnych przedstawiono na ryc. 1—4 oraz w tab. 1.

W tab. 1 przedstawiono średnie wartości współczynnika k reakcji chemiluminescencyjnej w wyciągach tkankowych i w surowicy krwi myszy kontrolnych (zdrowych) i białaczkowych. W porównaniu do wartości wyjściowych wyciągi tkankowe myszy kontrolnych charakteryzował zanik intensywności reakcji ChL w czasie, ze stałą $= 0,009 < k < 0,016$, zaś w surowicy $= 0,008 < k < 0,013$. Natomiast wyciągi tkankowe myszy białaczkowych charakteryzował wzrost natężenia ChL w czasie przebiegu reakcji ze stałą $= -0,005 < k < -0,015$, zaś w surowicy $= -0,009 < k < -0,017$.

Na ryc. 1—3 przedstawiono wartości współczynnika k (od 0,005 do 0,01) po 2, 5 i 10 dobach od momentu zaszczepienia myszom nowotworu, skorelowane ze wzrostem masy węzłów chłonnych, wątroby i śledziony. Na ryc. 4 przedstawiono wartość współczynnika k w surowicy krwi myszy białaczkowych.

Obecnie ukształtował się pogląd, że koncentracja wolnych rodników oznaczanych metodą elektronowego rezonansu paramagnetycznego, a także produktów wolnorodnikowego utleniania (nadtlarki, epoksydy, aldehydy, ketony)



Objaśnienia: WR - wolne rodniki, p.z. po zaszczepieniu

Ryc. 5. Cyrkulacja komórek białaczki limfatycznej P 388 w ustroju myszy doświadczalnych

zwiększa się w tkankach w początkowej fazie nowotworzenia, by po osiągnięciu typowego dla poszczególnych procesów maksimum, obniżyć się (7, 8, 17—20).

Badania własne przy użyciu metody chemiluminescencji wykazały, że przeszczepialnej białaczce limfatycznej P 388 towarzyszy występowanie wolnych rodników zarówno w narządach, jak i surowicy krwi. Stwierdzono istnienie czasowej korelacji między ilością wolnych rodników a stopniem zaawansowania kolonizacji narządów przez komórki białaczkowe. Zwiększony poziom wolnych rodników wystąpił najwcześniej w węzłach chłonnych, bo już w drugim dniu po zaszczepieniu białaczki i zbiegał się wyraźnie z rozpoczynającą się kolonizacją węzłów chłonnych przez komórki nowotworowe. Maksymalny poziom wolnych rodników notowano w piątym dniu choroby. W 10 dniu ilość WR spadła do wartości wyjściowych. W wątrobie i śledzionie wzrost poziomu wolnych rodników rozpoczął się dopiero w piątym dniu po zaszczepieniu białaczki i trwał do dziesiątego dnia choroby. Korelował on z opuszczeniem krwiobiegu przez komórki nowotworowe i ich narastającym inkludowaniem się w tkankach.

Korelacja między poziomem wolnych rodników a rozwojem procesu białaczkowego jest zjawiskiem krótkotrwałym i ma miejsce tylko w pierwszych dniach kolonizacji narządów przez komórki nowotworowe. Okres synchronizacji obu procesów w narządach trwa około 4—5 dni. W tym czasie poziom wolnych rodników wzrasta wraz ze wzrostem ilości komórek białaczkowych w tkankach. W późniejszym okresie zawartość wolnych rodników w narządach szybko spada, mimo dalszego namnażania się komórek białaczkowych.

Wykonane badania dowodzą, że chemiluminescencja charakteryzuje się wysoką czułością i powtarzalnością wyników i że może być z powodzeniem wykorzystywana do wykrywania wolnych rodników w tkankach i surowicy krwi. Jej praktyczna wartość w diagnozowaniu białaczki jest jednak ograniczona. Wynika to z faktu krótkiego, bo zaledwie kilkudniowego wzrostu poziomu wolnych rodników i to tylko w początkowej fazie procesu białaczkowego.

Chemiluminescencja jako jedna z metod wykrywania wolnych rodników rozszerza przede wszystkim możliwości badawcze nad patogenezą nowotworów. Udział wolnych rodników w indukcji nowotworów, które są obecnie przedmiotem zainteresowań wielu badaczy, pozostaje nadal sprawą otwartą (3—5, 7—21).

Piśmiennictwo

1. Calvin M.: *Naturwiss.* 62, 405, 1975.
2. De Luca M.: *Adv. Enzymol.* 44, 37, 1976.
3. Demopoulos H. B.: *Fed. Rec.* 32, 1859, 1973.
4. Georgieff K. K.: *Science* 173, 537, 1971.
5. Harman D.: *Red. Res.* 16, 753, 1962.
6. Hastings J. W.: *Photochem. Photobiol.* 27, 397, 1978.
7. Kanclerz A., Zbytniewski Z.: *Post. Hig.* 32, 177, 1978.

8. Kanclerz A., Zbytniewski Z.: *Zagad. Biofiz. Współ.* 2, 111, 1977.
9. Lohmann W., Lange R.: *Z. Naturforsch.* 34 c, 546, 1979.
10. Lohmann W., Schreiber J., Greulich W.: *Z. Naturforsch.* 34 c, 550, 1979.
11. Lohmann W., Schreiber J., Gerhardt W., Breithaupt H.: *Blut* 39, 147, 1979.
12. Lohmann W., Schreiber J., Strobel W., Müller-Eckhardt Ch.: *Blut* 39, 317, 1979.
13. Lohmann W., Greulich W., Döll G.: *Blut* 39, 327, 1979.
14. Madej J. A.: Badania nad wpływem wybranych czynników egzogennych w patomechanizmie białaczek limfatycznych u myszy. Praca hab., AR Wrocław, 33, 5-46, 1982.
15. Mazurczak J., Owczarczyk B., Russak G.: *Medycyna Wet.* 34, 496, 1978.
16. Owczarczyk B., Mazurczak J., Russak G.: *Medycyna Wet.* 34, 519, 1978.
17. Saprin A. N., Minenkova E. A., Nagler L. G., Krugljak S. A., Krugljakova N. M., Emanuel N. M.: *Biofizyka* 11, 443, 1966.
18. Saprin A. N., Ktočko E. V., Cibirkin V. M., Krugljakova K. E., Emanuel N. M.: *Biofizyka* 12, 1022, 1967.
19. Saprin A. N., Nagler L. G., Koperina E. V., Krugljakova K. E., Emanuel N. M.: *Biofizyka* 11, 706, 1966.
20. Saprin A. N., Minenkova E. A., Nagler L. G., Kaznačeev J. S., Krugljak S. A., Krugljakova K. E., Emanuel N. M.: *Biofizyka* 12, 1099, 1967.
21. Shimomura O., Johnson F. H.: *Proc. natn. Acad. Sci. USA.* 72, 1546, 1975.

Adres autora: dr Janusz A. Madej, ul. Liskego 4/5, 50-345 Wrocław.

Мадей Я. А., Кашубкевич Ч., Мазуркевич М., Климентовский С., Фишер Л. — Пыттка использования химиолуминесценции в диагностике лимфатической лейкемии P 388 у мышей

Для исследований использовали мышей-гибридов BDF₁ самцов, 3 мес. которым вакцинировали внутрибрюшинно 10⁴ клеток лимфатической лейкемии P 388. Мышей убивали через 2, 5 и 10 суток опыта. В тканевых вытяжках из печени, селезенки и лимфатических узлов, а также в сыворотке крови обнаруживали свободные радикалы методом химиолуминесценции, т.е. провели запись фотонных свечений. Внутренние органы оценивались гистопатологически. Отметили, что корреляция между уровнем свободных радикалов и развитием лейкемии является кратковременным явлением и отмечается только в первые дни колонизации органов опухолевыми клетками. Период синхронизации обоих процессов продолжается ок. 4—5 дней. В это время уровень свободных радикалов растет с ростом лейкемических клеток в тканях. В позднейший период содержание свободных радикалов в органах быстро падает помимо дальнейшего размножения лейкемических клеток.

Madej J. A., Kaszubkiewicz C., Mazurkiewicz M., Klimentowski S., Fiszler L. — An attempt to exploit chemiluminescence in the diagnosis of lymphatic leukaemia P 388 in mice

The assessment was carried out on mice, hybrides BDF₁, three months old, which are inoculated with 10⁴ lymphatic leukaemia cells P 388. The mice were sacrificed after two, five and ten days. Free radicals were found in the extracts of the liver, spleen, lymph nodes, and in sera by means of chemiluminescence, i.e. by photon luminescence assesment. Internal organs were verified histopathologically. It was found that the correlation between the level of free radicals and the development of leukaemia was of short time and took place only in the first days of internal organs colonization by leukaemic cells. The period of synchronization of the both processes lasted about 4—5 days. During that time the level of free radicals increased along with the number of leukaemic cells in tissues. Later the content of free radicals decreased rapidly in tissues independently of the number of propagating leukaemic cells.