

JERZY SOKOŁOWSKI, WALDEMAR OLSZEWSKI

ZMIANY BIOCHEMICZNE I HISTOLOGICZNE W NASTĘPSTWIE
STOSOWANIA ŚRODKA IMMUNOSUPRESYJNEGO IMURANU
(AZATHIOPRINE)

Z Zespołu Chirurgii Doświadczalnej i Transplantologii Centrum Med. Doświadczalnej
i Klinicznej PAN

Kierownik: prof. dr *J. Nielubowicz*

Imuran jest środkiem hamującym proces odrzucania przeszczepionych narządów. Może on powodować uszkodzenie szpiku, śledziony, węzłów chłonnych, agranulocytozę, martwicę wątroby. Lek ten w dużych dawkach prowadzi do wyniszczenia i śmierci (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7). Poznanie trującego działania Imuranu ma ogromne znaczenie praktyczne dla odróżnienia zmian wywołanych tym lekiem od procesu odrzucania. Dotyczy to szczególnie wątroby.

Praca niniejsza została wykonana, aby uzyskać odpowiedź na następujące pytania: 1) jakie zmiany biochemiczne powoduje Imuran podawany zdrowym psom w małych dawkach stosowanych przewlekłe po przeszczepach nerki i wątroby, a jakie w dużych dawkach stosowanych w ostrym odrzuceniu; 2) jakie zmiany histologiczne w narządach mięszzowych mogą być spowodowane stosowaniem Imuranu.

POSTĘPOWANIE

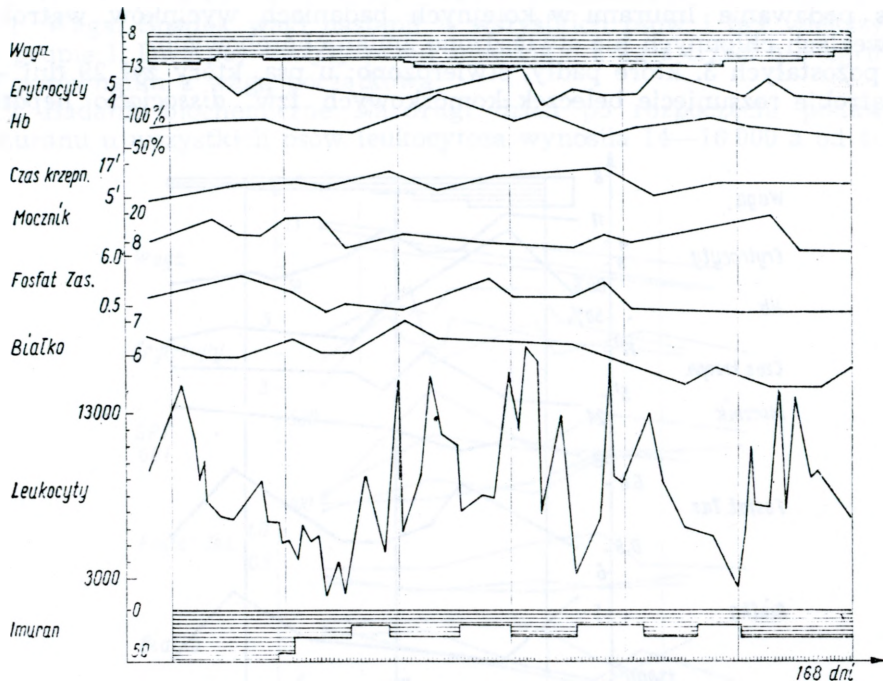
Badania przeprowadzono na 9 psach, mieszańcach, wagi 10—13,5 kg w dwóch grupach.

Grupa I obejmuje 6 psów, którym codziennie przez 6 miesięcy podawano Imuran doustnie, początkowo w dawce 4 mg/kg/dobę a następnie w zależności od leukopenii odpowiednio mniejszych. Najniższa dawka wynosiła 1 mg/kg/dobę (ryc. 1 i 2). Przed rozpoczęciem doświadczenia u wszystkich psów tej grupy oznaczono: liczbę krwinek czerwonych i białych, frakcje białek, fosfatazę zasadową, poziom mocznika we krwi, czas krzepnięcia. We wszystkich przypadkach pobierano wycinek wątroby i węzeł chłonny podkolanowy do badania histologicznego. U 5 psów tej grupy zbadano szpik. Podczas podawania Imuranu wagę zwierząt i leukocytozę oznaczano co 1—2 dni. Wycinek z wątroby, mięśnia, skóry oraz węzła chłonnego pobierano co 2—10 tygodni. Liczbę krwinek czerwonych, frakcje białek, fosfatazę zasadową, poziom mocznika we krwi, czas krzepnięcia oznaczano co tydzień. Po zakończeniu doświadczenia bądź po śmierci zwierząt, które padły przed upływem 6 miesięcy badano histologicznie wątrobę, śledzionę, węzły chłonne, nerki, m. sercowy, mm. szkieletowe, tkankę mózgową i skórę.

Grupa II obejmuje 3 psy, którym podawano Imuran w dawce 12 mg/kg/dobę aż do chwili zgonu zwierząt (ryc. 3). U zwierząt tych wykonywano te same badania co w grupie I przed, podczas i po zakończeniu podawania Imuranu.

WYNIKI

Grupa I. Z 6 psów grupy I padły kolejno 3 w 29, 70 i 164 dniu doświadczenia; dwa psy z powodu zapalenia płuc, u trzeciego stwierdzono zanik szpiku i wyniszczenie. Pozostałe 3 psy przeżyły 6-cio miesięczny okres podawania Imuranu.



Ryc. 1. Wyniki badań pomocniczych oraz dawkowanie Imuranu u psa z grupy I, który przeżył doświadczenie.

1. Waga. U wszystkich psów podczas pierwszych 3 tygodni podawania Imuranu waga zwierząt zmniejszyła się o 1–2 kg, utrzymując się na tym poziomie do chwili śmierci zwierzęcia bądź do końca doświadczenia.

2. Badania biochemiczne. U wszystkich psów tej grupy wystąpiła leukopenia od 2200 do 3900 leukocytów w 1 mm^3 , była ona najniższa między 4 a 6 tygodniem trwania doświadczenia, odpowiednio 3000, 1800, 1100, 700 i 400 leukocytów w 1 mm^3 (ryc. 1, 2, 3). Liczba krwinek czerwonych u 4 psów była prawidłowa, u 2, które padły, liczba krwinek czerwonych zmniejszyła się odpowiednio z $5,17 \times 10^6$ do $2,14 \times 10^6$ do $3,19 \times 10^6$ w 1 mm^3 .

Hipoproteinemię stwierdzono u wszystkich psów. Poziom białka spadł z 6,0–7,0 g% do 4,1–5,9 g% a poziom albumin z 41–62% do 32–45% (tab. 1).

Czas krzepnięcia określany metodą Lee-White'a był przedłużony we wszystkich przypadkach do 6–15 minut (tab. 2).

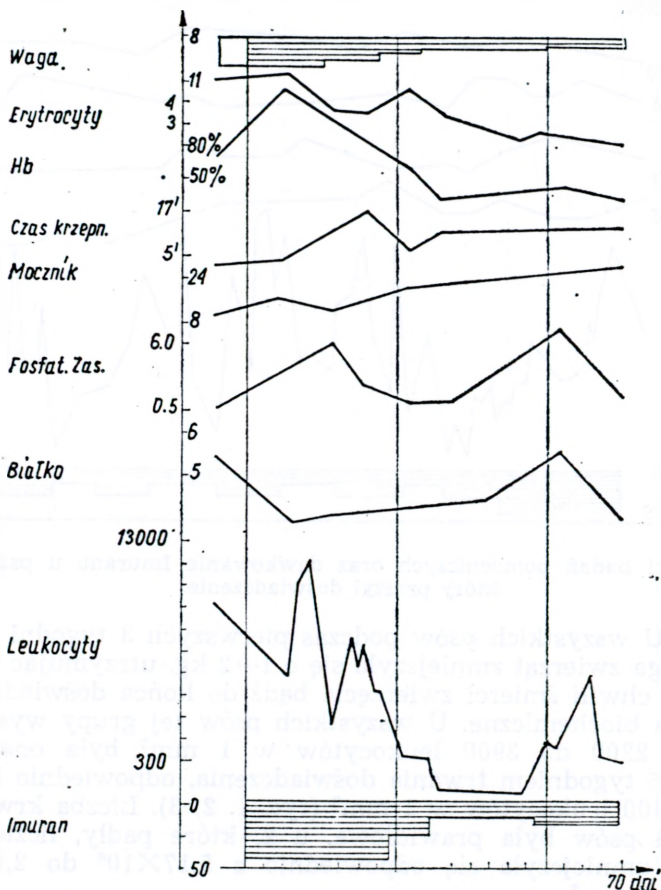
Fosfataza zasadowa i poziom mocznika we krwi były prawidłowe we wszystkich kolejnych badaniach i u wszystkich zwierząt.

3. Badanie szpiku. Rozmazy szpiku u 3 psów, które przeżyły były prawidłowe. W szpiku psa, który padł 29 dnia doświadczenia napotkano pojedyncze komórki układu limforetikularnego, komórki limfoidalne siateczki, limfocyty dojrzałe, komórki siateczki właściwe oraz cienie komórkowe. Obraz ten świadczył o wyraźnym zaniku szpiku.

U psa, który żył 164 dni, stwierdzono przejściowy odczyn układu erytroblastycznego z prawidłowym torem dojrzewania i niewielki odczyn układu siateczki w 4 miesiącu doświadczenia. Rozmaz szpiku wykonany 3 dni przed śmiercią zwierzęcia był prawidłowy.

4. Badania histologiczne. U 3 psów, które przeżyły 6-miesięczny okres podawania Imuranu w kolejnych badaniach wycinków wątroby i w węzłach chłonnych nie stwierdzono zmian chorobowych.

U pozostałych 3, które padły, stwierdzono: u psa, który żył 29 dni — w wątrobie rozsunięcie beleczek komórkowych tzw. *dissociatio hepatis*



Ryc. 2. Wyniki badań dodatkowych u psa grupy I, który padł w 70 dniu doświadczenia.

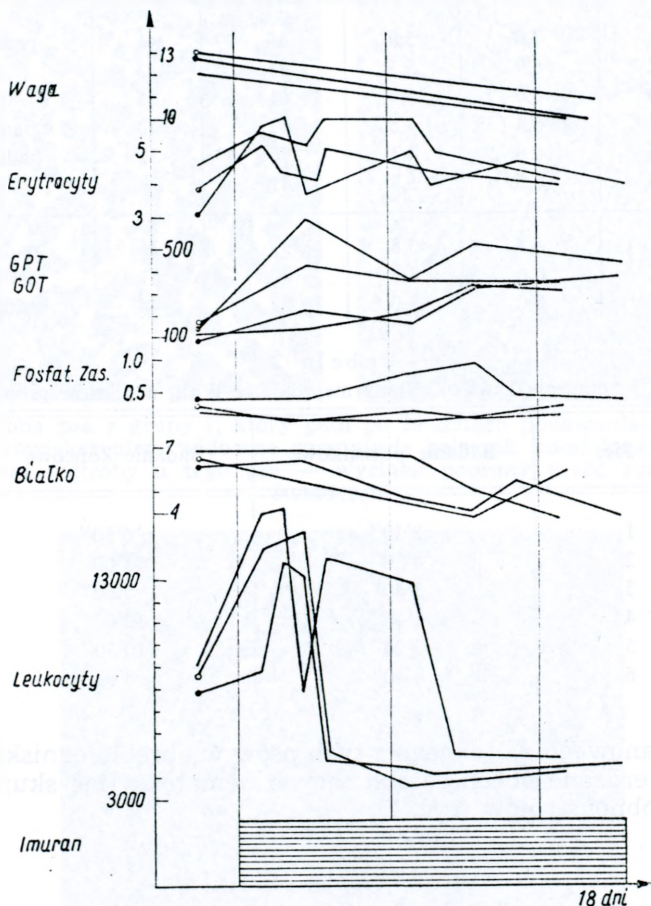
oraz zanik grudek chłonnych śledziony (ryc. 4 i 5). U psa, który żył 70 dni — w wątrobie oprócz rozsunięcia beleczek komórkowych liczne ogniska martwicy z naciekami zapalno-resorbującymi, w nerkach liczne ropnie, zanik tkanki limfatycznej śledziony z nielicznymi zachowanymi grudkami i rozszerzonymi zatokami, w węzłach chłonnych zmniejszenie ilości grudek chłonnych i rozszerzenie zatok (ryc. 6). U psa, który żył 164 dni — w wątrobie rozsunięcie beleczek komórkowych, zanik tkanki limfatycznej śledziony, zanik grudek chłonnych w węzłach chłonnych oraz okołooskrzelowe zapalenie płuc.

U żadnego psa tej grupy nie stwierdzono zmian chorobowych w mięśniach szkieletowych, m. sercowym, tkance mózgowej i skórze.

Grupa II. Wszystkie psy tej grupy padły w 16, 17 i 18 dniu podawania Imuranu.

1. Waga. Spadek wagi nastąpił u wszystkich psów i był większy niż w grupie I. Dwa psy ważyły przed śmiercią o 2 kg a trzeci o 3 kg mniej w porównaniu z wagą początkową.

2. Badania biochemiczne. Na drugi dzień po rozpoczęciu podawania Imuranu u wszystkich psów leukocytoza wynosiła 14—16 000 a od 4. dnia



Ryc. 3. Wyniki badań pomocniczych u 3 psów grupy II, którym podawano Imuran w stałej dawce 12 mg/kg/dobę.

doświadczenia poczynając, liczba leukocytów u wszystkich zwierząt zaczęła spadać do 4600, 4200 i 4000 w 1 mm^3 .

U wszystkich psów wystąpiła hipoproteinemia. Poziom białka całkowitego we krwi spadł — przeciętnie — z 6,65 do 3,5 g^o/o (tab. 1).

U 2 psów oznaczano transaminazy — w obu przypadkach stwierdzono wzrost aktywności SGOT do 380 i 440 j. oraz SGPT do 300 i 400 j.

3. Badania histologiczne. Histologicznie stwierdzono: w wątrobie płyn między komórkami wątrobowymi, rozsunięcie beleczek komórkowych, ogniska zaniku komórek wątrobowych oraz ostro odgraniczone od zdrowego mięszu ogniska martwicy, zanik śledziony, w węzłach chłonnych zmniejszenie ilości grudek chłonnych z rozszerzeniem zatok rdzeniowych i brzeżnych — w jednym przypadku ognisko ropienia w centralnej części

Tabela 1
Początkowe i końcowe wartości białka całkowitego i albumin we krwi

Grupa	Pies	białko całkowite w g%		albuminy w %		Przeżycie
		początkowe	końcowe	początkowe	końcowe	
I	1	7,0	5,9	45	41	padł 29 dnia
	2	6,9	5,5	35	33	przeżył
	3	6,0	5,7	61	45	przeżył
	4	6,4	4,8	62	43	padł 70 dnia
	5	6,8	4,1	50	35	padł 164 dnia
	6	6,5	5,9	41	34	przeżył
II	1	6,8	3,8	39	31	padł 16 dnia
	2	6,6	3,8	40	31	padł 17 dnia
	3	6,0	3,0	52	44	padł 18 dnia

Tabela 2
Czas krzepnięcia krwi określany metodą Lee-White'a u psów grupy I

Pies	Badanie początkowe	Badanie końcowe
1	2'30''	6'30''
2	4'20''	15'00''
3	3'40''	7'00''
4	1'40''	12'00''
5	3'20''	10'30''
6	4'40''	8'00''

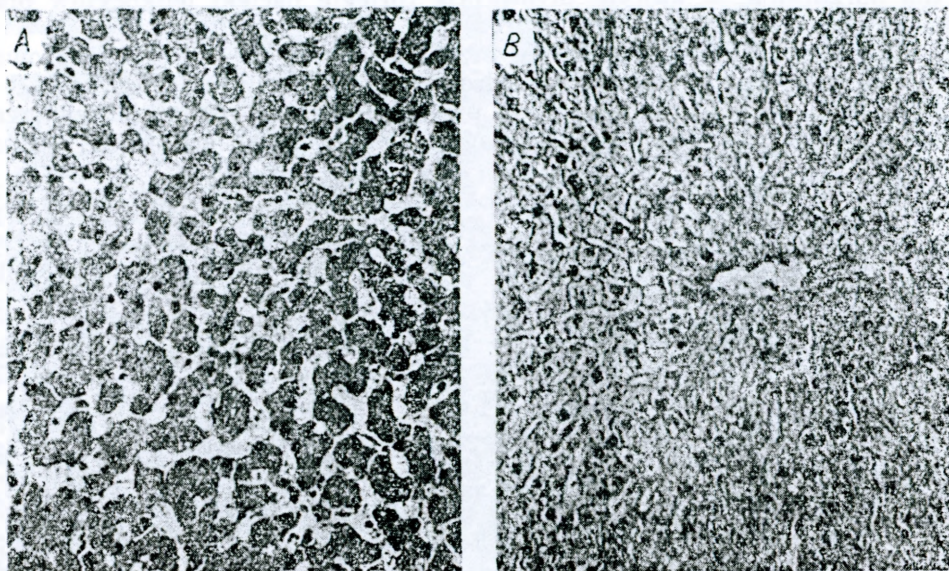
węzła podkolanowego. U jednego z tych psów w obrębie ogniska martwicy wątroby stwierdzono obecność chłonną hematoksylinę skupisk pałeczko-watych drobnoustrojów (ryc. 7).

OMÓWIENIE

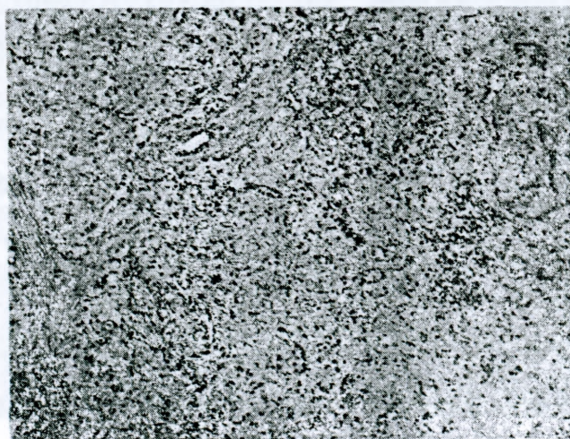
W grupie I zdrowym psom podawano Imuran przez pół roku w podobnych dawkach jakie stosowane są po przeszczepieniu nerek czy wątroby. Padły 3 psy, u dwu z nich stwierdzono na sekcji zapalenie płuc u trzeciego zanik szpiku. Badając histologicznie wycinki sekcyjne, oprócz zapalenia płuc, stwierdzono: zanik utkania chłonnego śledziony i węzłów chłonnych a w jednym przypadku ogniskową martwicę wątroby i ropnie nerek.

W badaniach biochemicznych u wszystkich psów obu grup była wyraźna leukopenia, niski poziom białka we krwi, wydłużenie czasu krzepnięcia oraz spadek wagi.

Histologicznie, również u wszystkich psów stwierdzono zanik grudek chłonnych śledziony i węzłów chłonnych oraz różnego stopnia uszkodzenie wątroby. Od obecności płynu między komórkami wątrobowymi z rozsunięciem beleczek komórkowych u psów z grupy I, które przeżyły do-



Ryc. 4. Wątroba psa z grupy I, który padł po 29 dniach podawania Imuranu. A — pod dużym powiększeniem widoczne rozsunięcie beleczek komórkowych, B — prawidłowy obraz wątroby u tego psa — wycinek pobrany przed rozpoczęciem doświadczenia.



Ryc. 5. Ten sam pies co na ryc. 4. Preparat sekcyjny obrazujący zanik śledziony.

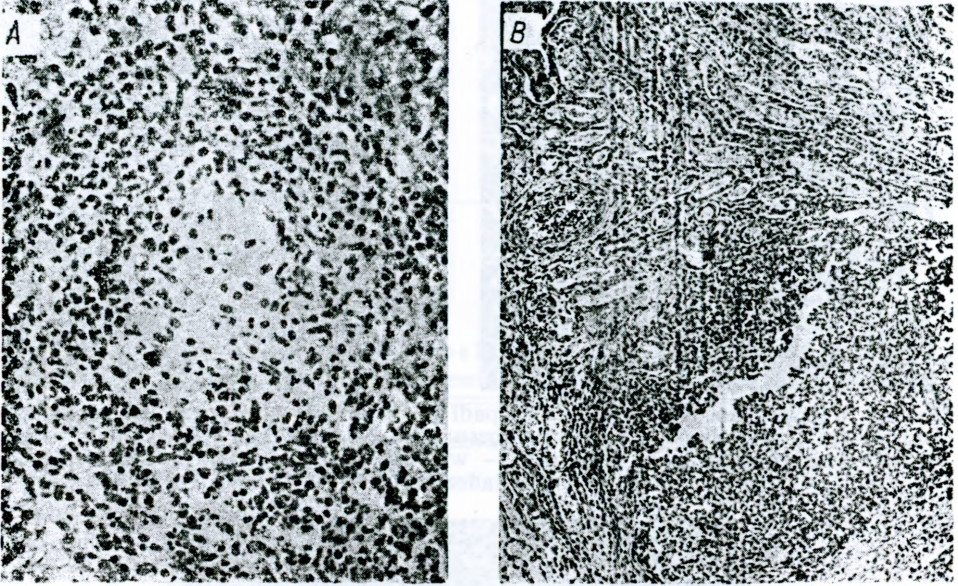
świadczenie, do ognisk martwicy w wątrobie oraz ropni nerek w przypadku psa tej grupy, który padł w czasie doświadczenia.

W grupie II dawkowano Imuran podobnie jak się go podaje w okresie ostrego odrzucania przeszczepu. W tej grupie wszystkie psy padły po 16—18 dniach skutkiem trującego uszkodzenia narządów mięszowych oraz wyniszczenia. I w tej grupie, podobnie jak w poprzedniej, wystąpiła znacznego stopnia leukopenia, hipoproteinemia, wzrost aktywności transaminaz i spadek wagi. Histologicznie stwierdzono zanik tkanki chłonnej śledziony i węzłów chłonnych oraz ogniskową martwicę wątroby.

Uzyskane obrazy histologiczne po stosowaniu u zwierząt Imuranu, szczególnie ogniska martwicy wątroby ostro odgraniczone od zdrowego mięsz-

szu, różnią się zasadniczo od zmian histologicznych charakterystycznych dla odrzucania, w którym przeważają rozległe nacieki leukocytów oraz rozplywna martwica.

Podobne badania jak te, które przedstawiono w tej pracy, przeprowadził Starzel i in. (6) podając 6 zdrowym psom Imuran w dawkach 2—4 mg/kg/dobę przez okres 40 dni; przeżył 1 pies. U wszystkich zwierząt autorzy ci obserwowali spadek wagi i hematokrytu, leukopenię, wzrost



Ryc. 6. Preparaty sekcyjne psa z grupy I, który padł po 70 dniach podawania Imuranu. A — ognisko martwicy w wątrobie, B — ropień nerki

aktywności transaminaz i fosfatazy zasadowej. Histologicznie stwierdzili w badaniach sekcyjnych ogniska martwicy w wątrobie, zanik grudek chłonnych a pod mikroskopem elektronowym zmniejszenie ilości glikogenu w komórkach wątrobowych i rozszerzenie kanalików żółciowych.

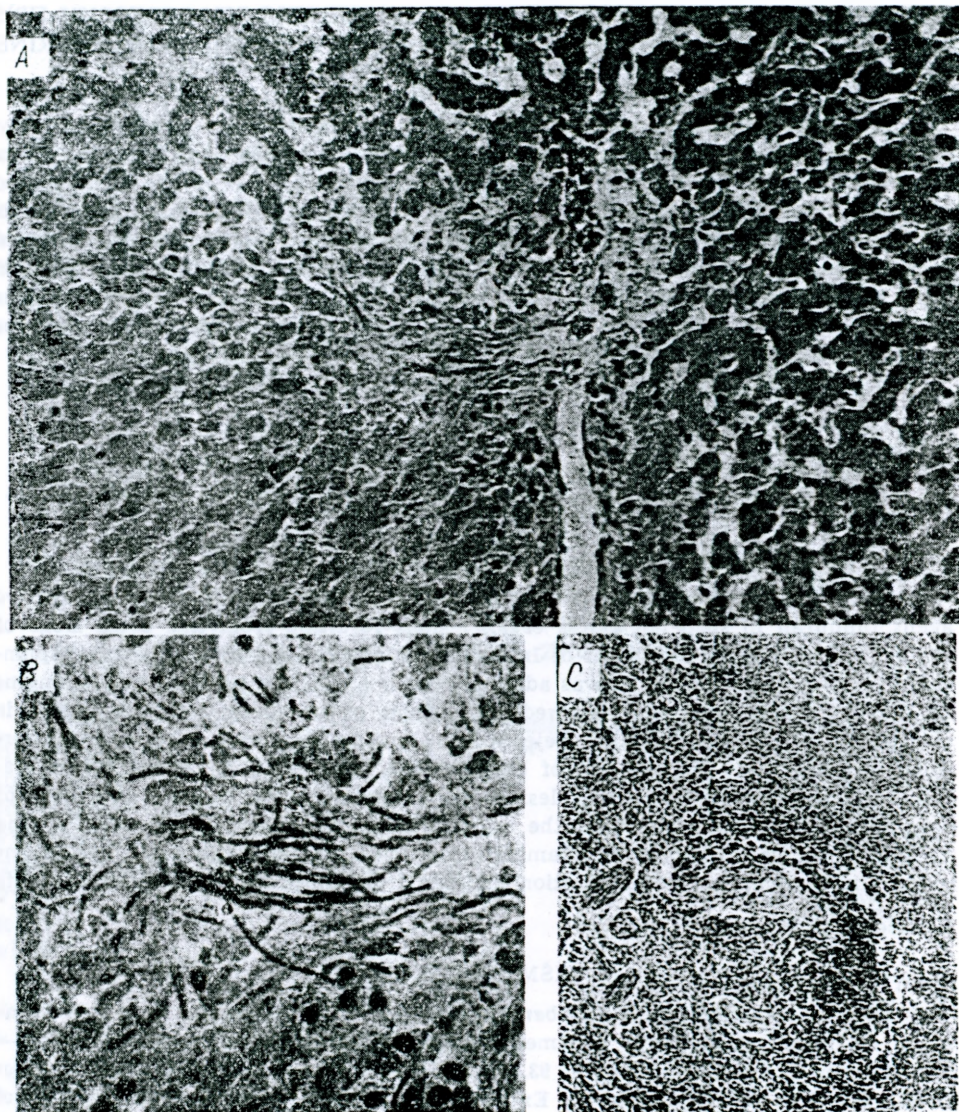
Badania niniejsze zostały przeprowadzone na małej liczbie zwierząt z powodu bardzo wysokiej ceny leku. Szczególnie ważne wydają się być obrazy histologiczne wątroby i nerek, całkowicie różne od spotykanych w allopreszczepach tych narządów.

WNIOSKI

1. Grupie zdrowych psów podawano doustnie Imuran przez pół roku w dawkach jakie stosuje się po przeszczepieniu nerek lub wątroby. Połowa psów w tej grupie padła z powodu zapalenia płuc i zaniku szpiku.

2. Innej grupie zdrowych psów podawano wysokie dawki Imuranu podobnie jak w okresie ostrego odrzucenia przeszczepu. Wszystkie psy padły z powodu trującego uszkodzenia narządów mięsnych oraz wyniszczenia.

3. W badaniach biochemicznych u psów obu grup wystąpiła leukopenia, hipoproteinemia, wydłużenie czasu krzepnięcia krwi, wzrost aktywności transaminaz oraz spadek wagi.



Ryc. 7. Pies z grupy II — padł po 17 dniach podawania Imuranu w dawce 12 mg/kg/dobę. A — ognisko martwicy w wątrobie, B — pod dużym powiększeniem widoczne skupisko pałeczkowatych drobnoustrojów, C — ten sam pies, widoczny zanik śledziony.

4. Badaniem histologicznym u wszystkich psów obu grup stwierdzono zanik grudek chłonnych śledziony i węzłów chłonnych. W wątrobie z wyjątkiem psów, które przeżyły doświadczenie — ogniskową martwicę wątroby.

*
* *

Składamy tą drogą podziękowanie dr *B. Mornington'owi* z firmy *Borroughs Co* w Londynie za udostępnienie nam Imuranu do badań.

Е. Соколовски, В. Ольшевски

БИОХИМИЧЕСКИЕ И ГИСТОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ВПОСЛЕДСТВИИ ПРИМЕНЕНИЯ ИММУНОСУПРЕССИВНОГО СРЕДСТВА ИМУРАНА (AZATHIOPRINE)

Содержание

Целью оценки изменений вызванных в органах иммуносупрессивным средством Имураном, здоровым собакам вводили Имуран в 2 группах. В I группе через 6 месяцев в низких дозах применяемых обычно после трансплантации органов, во II группе в токсических дозах таких, какие применяются в периоде острого отравления. У собак обеих групп наблюдали падение веса, лейкопению, гипоальбуминемию, атрофию лимфатической структуры и повреждение паренхиматозных органов. В I группе половина собак пережила эксперимент, во II группе все собаки погибли. Гистологически констатировано, что изменения в почках и печени, вызванные Имураном отличаются от изменений встречаемых при аллотрансплантатах этих органов.

J. Sokołowski, W. Olszewski

BIOCHEMICAL AND HISTOLOGICAL ALTERATIONS RESULTING FROM ADMINISTRATION OF AN IMMUNOSUPPRESSIVE AGENT IMMURAN (AZATHIOPRINE)

Summary

Healthy dogs divided into two groups were administered immunosuppressive agent Immuran in scope to assess organ lesions resulting from this drug. Dogs of the 1st group received low doses of Immuran, usually applied after organ transplantation. In this group Immuran was administered for a 6-month period. Dogs belonging to the 2nd group were administered toxic doses of Immuran, like those used in the period of acute transplant rejection. Following symptoms and lesions were noted in both these groups: loss of body weight, leukopenia, hypalbuminemia, vanishing of lymphatic tissue and lesions in parenchymatous organs. One half of dogs of the 1st group survived the experimentation meanwhile all dogs of the second group died. Histological examination revealed that alterations in kidneys and livers due to Immuran administration differed from those found in allotransplants of these organs.

PIŚMIENICTWO

1. Elion G. B., Callahan S., Bieber S., Hitchings G. S., Rundles R. W.: A summary of investigations with 6-/1-methyl-4-nitro-5-imidazolthio/purine (B. W. 57—322). *Cancer Chem. Rep.* 1961, 14, 93. — 2. Elion G. B., Callahan S. W., Hitchings G. H., Rundles R. W., Laszlo J.: Experimental, clinical and metabolic studies of thiopurines. *Cancer Chem. Rep.*, 1962, 16, 197. — 3. Schwartz R.: Immunosuppressive drugs. *Progr. Allergy* 1965, 9, 246. — 4. Starzl T. E.: Experience in renal transplantation. W. B. Saunders Philadelphia—London, 1964. — 5. Starzl T. E., Marchioro T. L., Rowlands D. T., Kirkpatrick C. H., Wilson W. E., Rifkind D., Waddell W. R.: Immunosuppression after experimental and clinical homotransplantation of the liver. *Ann. Surg.*, 1964, 160, 411. — 6. Starzl T. E., Marchioro T. L., Porter K. A., Taylor P. D., Faris T. D., Herrmann T. J., Hlad C. J., Waddell W. R.: Factors determining short- and long-term survival after orthotopic liver homotransplantation in the dog. *Surgery* 1965, 58, 131. — 7. Taylor R. M., Watson J. W., Walker F. C., Watson A. J.: Prolongation of survival of jejunal homografts in dogs treated azathioprine (imuran). *Brit. J. Surg.*, 1966, 53, 134.

Prace nadesłano: 21. IV. 1969.

Adres autora: Warszawa, ul. Chałubińskiego 5.