

Samodzielna Pracownia Mikroskopii Elektronowej. Instytut Biologiczno-Morfologiczny.
Akademia Medyczna w Lublinie
Kierownik: prof. dr hab. Maciej Latański

Janina HALLIOP, Maciej LATALSKI

**Badania mikroskopowo-elektronowe szeregu rozwojowego
granulocytów obojętnochłonnych w doświadczalnym zatruciu
monokrotofosem**

Микроскопно-электронные исследования генетического ряда нейтрофильных
гранулоцитов при экспериментальном отравлении монокротофосом

Electron Microscopic Research on the Neutrophil Granulocyte Series
in Experimental Poisoning by Monocrotophos

W ochronie upraw buraka cukrowego czynione są próby stosowania nowych środków chemicznych, a m. in. monokrotofosu. Preparat ten jest insektycydem o silnym działaniu systemicznym i kontaktowym. Stosowany jest do zwalczania wielu gatunków owadów ssących oraz chrząszczy i gąsienic zjadających liście. W naszym doświadczeniu, prowadzonym na szczurach białych, postanowiliśmy prześledzić proces powstawania granulocytów obojętnochłonnych po zatruciu monokrotofosem, dla stwierdzenia ewentualnego wpływu tego związku na układ krwiotwórczy. W tym celu w mikroskopie elektronowym dokonywano badań ultrastrukturalnych i cytochemicznych komórek szeregu rozwojowego tych krwinek.

MATERIAŁ I METODYKA BADAŃ

Doświadczenie prowadzone było na szczurach białych, samcach. Zwierzęta doświadczalne podzielono na dwie grupy, po 8 sztuk w każdej. Grupa I otrzymywała monokrotofos w dawkach 0,05 DL₅₀ 1 raz dziennie w ciągu 28 dni, a grupa II — 0,1 DL₅₀ jednorazowo. Preparat podawano w postaci wodnego roztworu stężonego preparatu technicznego firmy CIBA, sondą dożołądkową.

Szpik do badań pobierany był z kości udowych w narkozie eterowej, po 24 godz. od jednorazowego bądź ostatniego podania użytego w doświadczeniu związku.

Szpik kostny pobrany do badań morfologicznych utrwalano 1 godz. w 4% roztworze aldehydu glutarowego w 0,1 M buforze kakodylowym z dodatkiem 1% sacharozy. Po płukaniu w takim samym buforze z dodatkiem 7% sacharozy materiał do-

trwalano w ciągu 1 godz. w 1% OsO₄ w buforze kakodylowym, o takich samych właściwościach, z dodatkiem 5% sacharozy. Zlepki szpiku podbarwiano octanem uranylu, a następnie płukano w buforze, odwadniano i zatapiano w mieszaninie Eponu 812.

Szpik do badań cytochemicznych był utrwalany w 1,5% roztworze aldehydu glutarowego w 0,1 M buforze kakodylowym z dodatkiem 1% sacharozy w ciągu 2 godz. Po płukaniu przez 2 godz. w buforze z dodatkiem 7% sacharozy wykonywano reakcję z DA β w obecności H₂O₂. Inkubację prowadzono w ciągu 90 min. przy pH 7,6 i 0,1% H₂O₂ oraz w ciągu 60 min. przy 1% H₂O₂. Do płynu inkubacyjnego dodano 5% sacharozy i 1% dwumetylosulfotlenku. Po dotrwaleniu materiału w 1% OsO₄ postępowano z nim dalej podobnie, jak w przygotowaniach do obserwacji morfologicznych.

Ultracienkie skrawki sporządzano przy użyciu ultramikrotomu Tesla BS 490 A, a następnie oglądano i fotografowano w mikroskopie elektronowym Tesla BS 613.

WYNIKI BADAŃ

Opracowany i opisany przez nas wcześniej (3, 4) model szeregu rozwojowego granulocytów obojętnochłonnych szczura przyjęliśmy jako punkt odniesienia do wyników uzyskanych w tym doświadczeniu. Stąd też w opisie badań ograniczamy się jedynie do dwóch grup doświadczalnych.

Grupa I doświadczalna

Dojrzewające komórki szeregu granulocytarnego w stadium promielocyta wykazywały obecność peroksydazy w ziarnistościach I-rzędowych oraz w strukturach wewnątrzkomórkowych zaangażowanych w ich powstawanie. W niektórych komórkach nie wszystkie ziarnistości I-rzędowe były peroksydazo-dodatnie (ryc. 1). Również słabszy był odczyn w strukturach błoniastych.

W metamielocytach i formach dojrzałych ziarnistości II-rzędowe występowały w ilościach podobnych jak u zwierząt kontrolnych (ryc. 2) bądź też w ilościach mniejszych (ryc. 3). W komórkach wszystkich form rozwojowych pojawiały się (na terenie cytoplazmy) liczne figury mielinowe (ryc. 4).

Grupa II doświadczalna

W wielu promielocytach większość ziarnistości I-rzędowych nie wykazywała produktu reakcji. Delikatny odczyn występował w otoczce jądrowej, gładkiej siatce śródplazmatycznej i strukturach Golgiego (ryc. 5). W metamielocytach i dojrzałych granulocytach ziarnistości II-rzędowych

było mniej niż u zwierząt, do których odnosiliśmy uzyskane obecnie wyniki, bądź też występowały wręcz w znikomych ilościach (ryc. 6). Granulocyty dojrzałe, o 3—5-płatomym jądrze często posiadały wyraźnie zaznaczone struktury Golgiego oraz wolne i związane z błonami rybosomy.

We wszystkich formach rozwojowych występowało znacznego stopnia obrzmienie mitochondriów z pojawiającymi się figurami mielinowymi w tych organellach (ryc. 7). Zmianom tym towarzyszyło poszerzenie kanałów ziarnistej siatki śródplazmatycznej (ryc. 8).

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Granulocyty obojętnochłonne odgrywają m. in. bardzo istotną rolę w procesach obronnych ustroju, polegającą na fagocytowaniu mikroorganizmów. Spełnienie tej roli jest możliwe dzięki bogatemu asortymentowi enzymów zawartych w ziarnistościach, charakterystycznych dla opisywanych komórek. W strukturach tych wykryto: mieloperoksydazę, lizozym, alkaliczną fosfatazę, przeciwbakteryjne białka kationowe oraz kwaśną fosfatazę. U wielu gatunków występują jednak różnice zarówno w obecności poszczególnych enzymów, jak i w ich umiejscowieniu w obrębie poszczególnych rodzajów ziarnistości. Mieleloperoksydaza jest obecna u wszystkich gatunków, z wyjątkiem kurcząt i gęsi.

Granulocyty obojętnochłonne szczurów posiadają dwa rodzaje ziarnistości, syntetyzowane na różnych etapach rozwojowych krwinki. Synteza ziarnistości I-rzędowych ma swój początek już w stadium mieloblasta i ukończona zostaje w stadium promielocyta. Ziarnistości II-rzędowe natomiast powstają w stadium mielocyta, a ich synteza zostaje ukończona w komórkach dojrzałych.

Mieleloperoksydaza występuje u szczura tylko w ziarnistościach I-rzędowych. Enzym ten wykrywa się przy pomocy reakcji z DAB w obecności H_2O_2 . Wykorzystaliśmy więc tę reakcję cytochemiczną dla odróżnienia dwóch wspomnianych wyżej rodzajów ziarnistości, gdyż dokonanie tego na podstawie cech morfologicznych jest bardzo trudne.

Rozróżniając na tej podstawie ziarnistości w badanych krwinkach mogliśmy stwierdzić nieprawidłowości w syntezie ziarnistości I-rzędowych w mieloblastach i promielocytach. Dotyczyły one niewielu komórek na tych etapach rozwoju krwinki i polegały na pojawianiu się ziarnistości I-rzędowych pozbawionych mieloperoksydazy. W takich komórkach również w otoczce jądrowej, błonach siatki śródplazmatycznej i strukturach Golgiego odczyn na mieloperoksydazę był nieznaczący. Są to elementy zaangażowane w syntezę ziarnistości I-rzędowych i zwykle produkt reakcji jest w nich równie dobrze widoczny jak w samych ziarnistościach.

Można zatem sądzić, że proces syntetyzowania ziarnistości I-rzędowych został opóźniony w stosunku do warunków prawidłowych. Opóźnienie to obserwowaliśmy zarówno w podoстрыm, jak i ostrym zatruciu monokrotofosem, przy czym w tym drugim przypadku było bardziej nasilone.

Mieloperoksydaza jest nie tylko enzymem pozwalającym na różnicowanie typów ziarnistości, lecz odgrywa także bardzo ważną rolę w działalności przeciwbakteryjnej komórek (2). W procesie fagocytozy u królika enzymy ze wszystkich ziarnistości są uwalniane do wakuoli fagocytarnych (5). Częściowy brak mieloperoksydazy bywa łączony ze zwiększoną podatnością na infekcję *Staphylococcus aureus*, a Breton-Gorius i wsp. (1) wykazali obecność nieuszkodzonych bakterii w takich wakuolach fagocytarnych, które nie zawierały mieloperoksydazy.

W zatruciu ostrym u zwierząt doświadczalnych we wszystkich rodzajach komórek obserwowaliśmy ponadto uszkodzenie mitochondriów i pojawienie się struktur mielinowych. Należy więc przyjąć, że w komórkach szeregu rozwojowego granulocytów obojętnochłonnych dochodziło do zaburzenia procesów oksydoredukcyjnych i przemian lipidowych. Zmniejszeniu w porównaniu do normy uległa też ilość ziaren II-rzędowych.

W świetle przytoczonych danych można zatem sądzić, że zatrucie monokrotofosem, w warunkach jakie zastosowano w naszym doświadczeniu, może prowadzić do osłabienia własności fagocytarnych granulocytów obojętnochłonnych, a także może powodować zaburzenia w procesie granulogenezy na skutek zachwiania podstawowych procesów metabolicznych.

PIŚMIENNICTWO

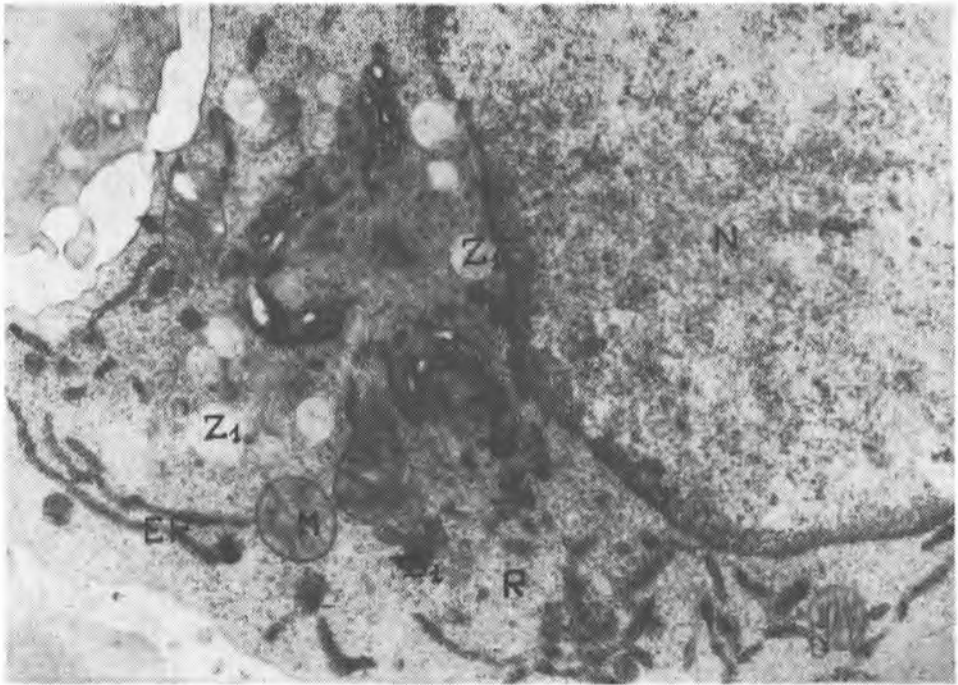
1. Breton-Gorius J., Hoassay D., Vilde J. L., Dreyfus B.: Br. J. Haematol. 30, 279—288, 1975.
2. Klebanoff S. J.: Science 169, 1095—1097, 1970.
3. Łatałski M., Halliop J., Nowakowski A.: Acta Haemat. Pol. 6, 273—281, 1975.
4. Łatałski M., Nowakowski A., Halliop J.: Acta Haemat. Pol. 7, 311—319, 1976.
5. Zucker-Franklin D., Hirsch J. G.: J. Exp. Med. 120, 569—576, 1964.

Otrzymano 30 VIII 1978.

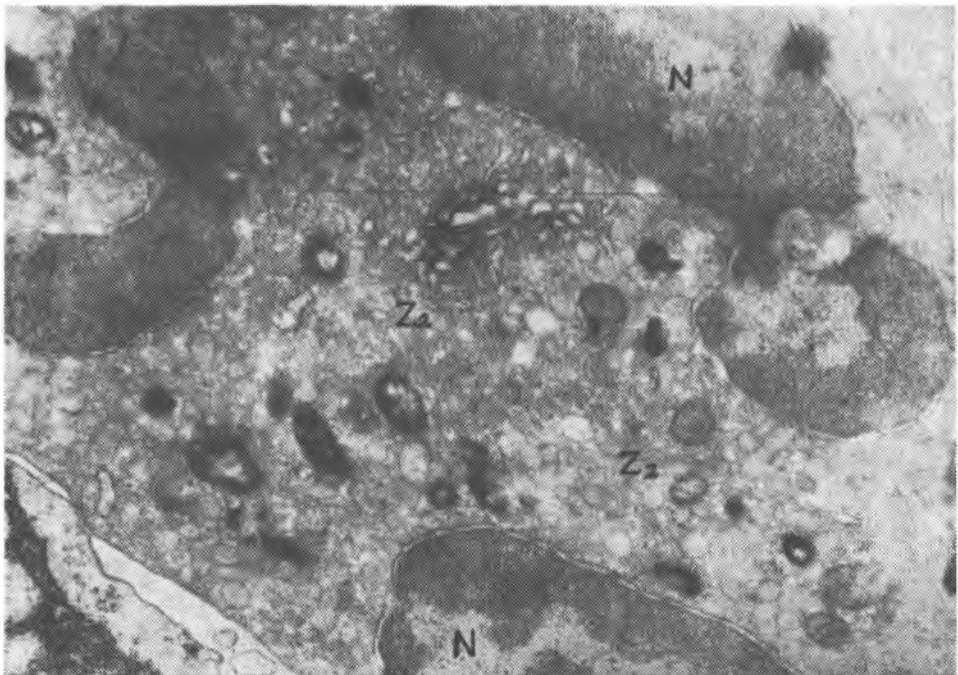
OBJAŚNIENIA RYCIŃ

Ryc. 1. Grupa I doświadczalna. Promielocyt. Er — ziarnista siatka śródplazmatyczna, G — struktury Golgiego, M — mitochondria, N — jądro, R — rybosomy, Z₁ — ziarnistości I-rzędowe. Pow. ok. 25 000×.

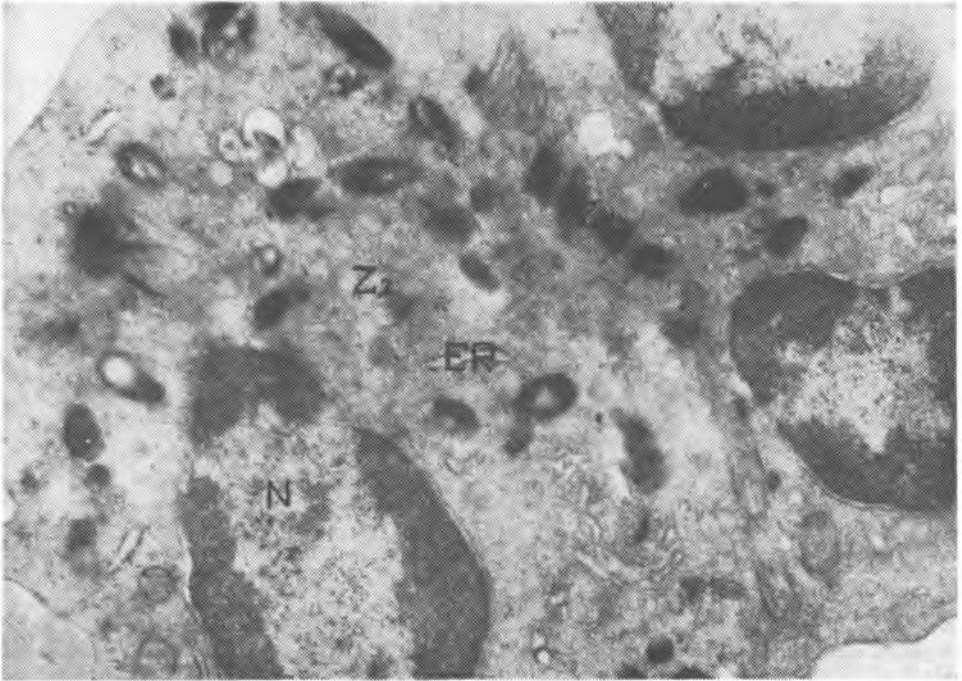
Ryc. 2. Grupa I doświadczalna. Granulocyt obojętnochłonny. N — jądro, Z₁ — ziarnistości I-rzędowe, Z₂ — ziarnistości II-rzędowe. Pow. ok. 25 000×.



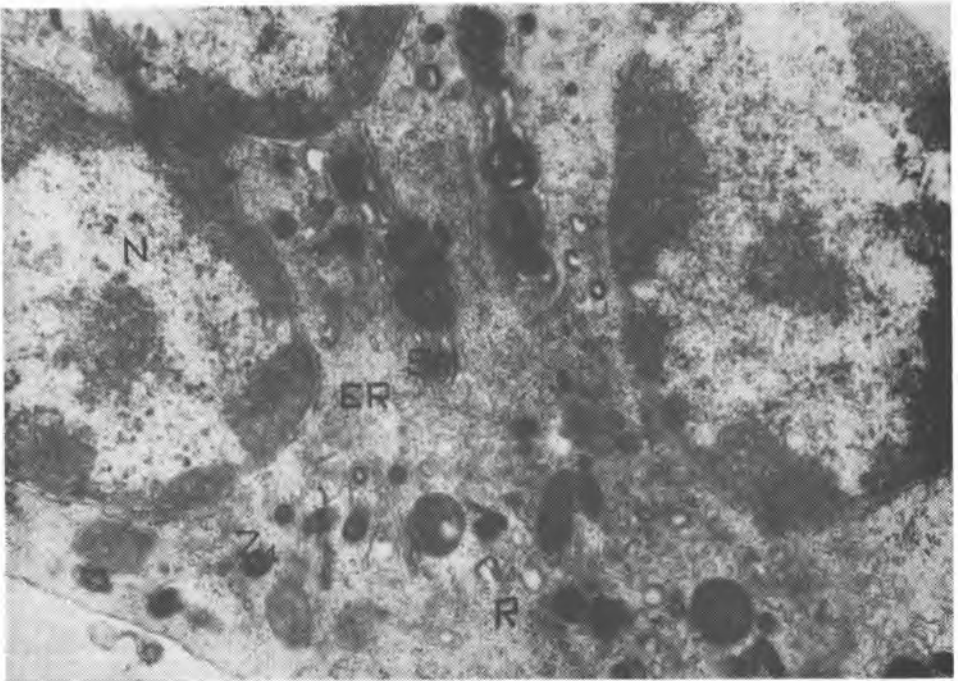
Ryc. 1



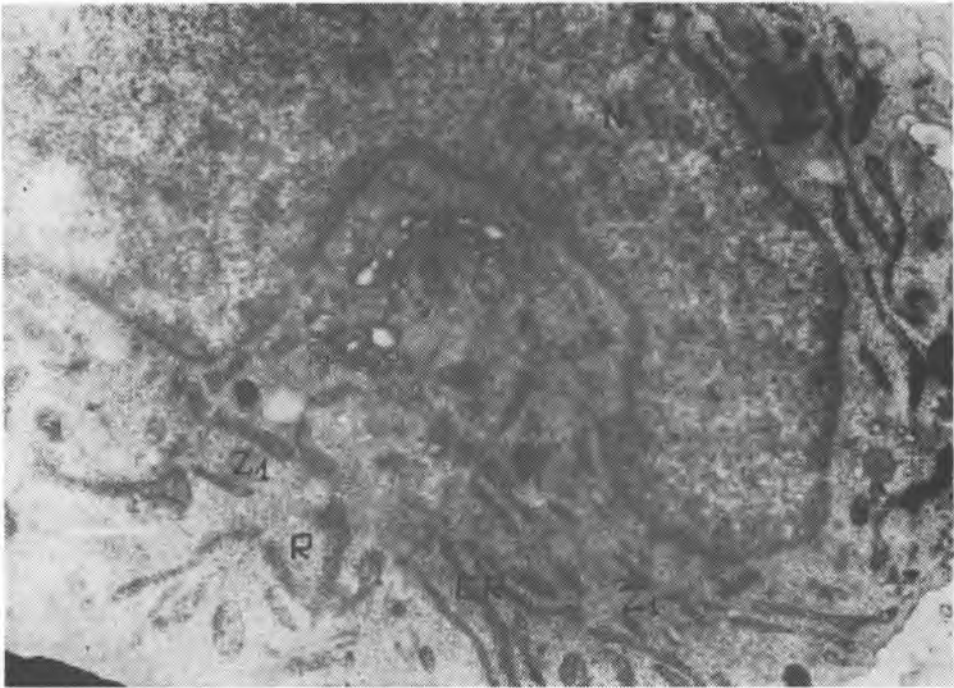
Ryc. 2



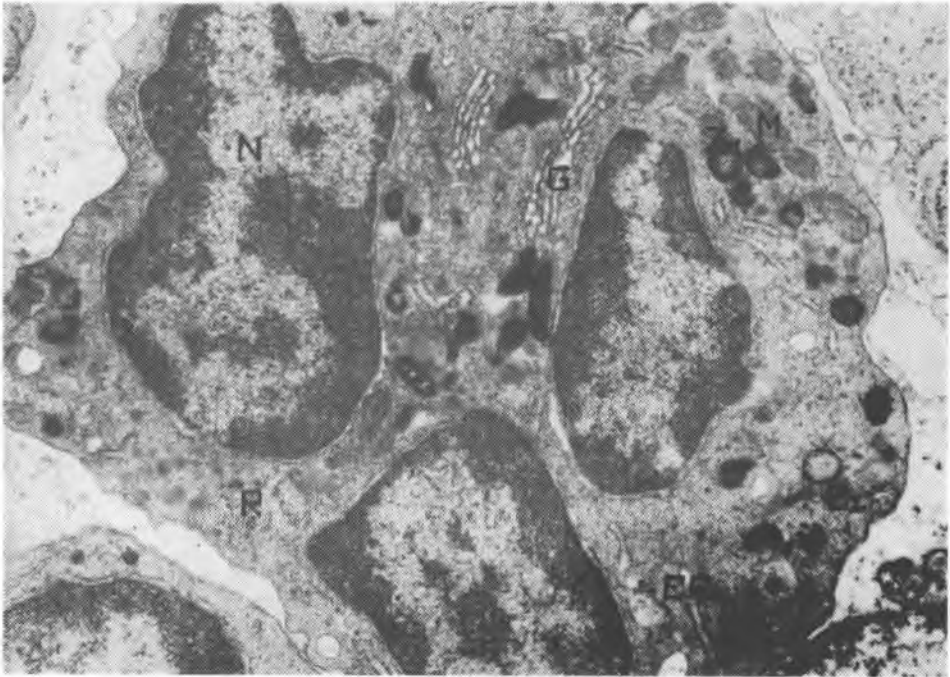
Ryc. 3



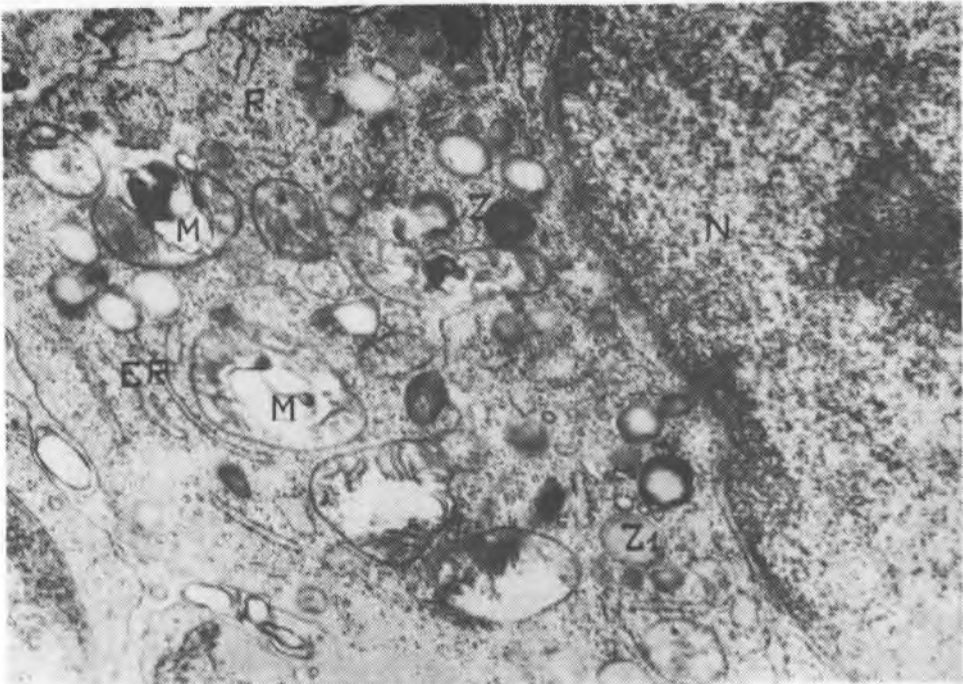
Ryc. 4



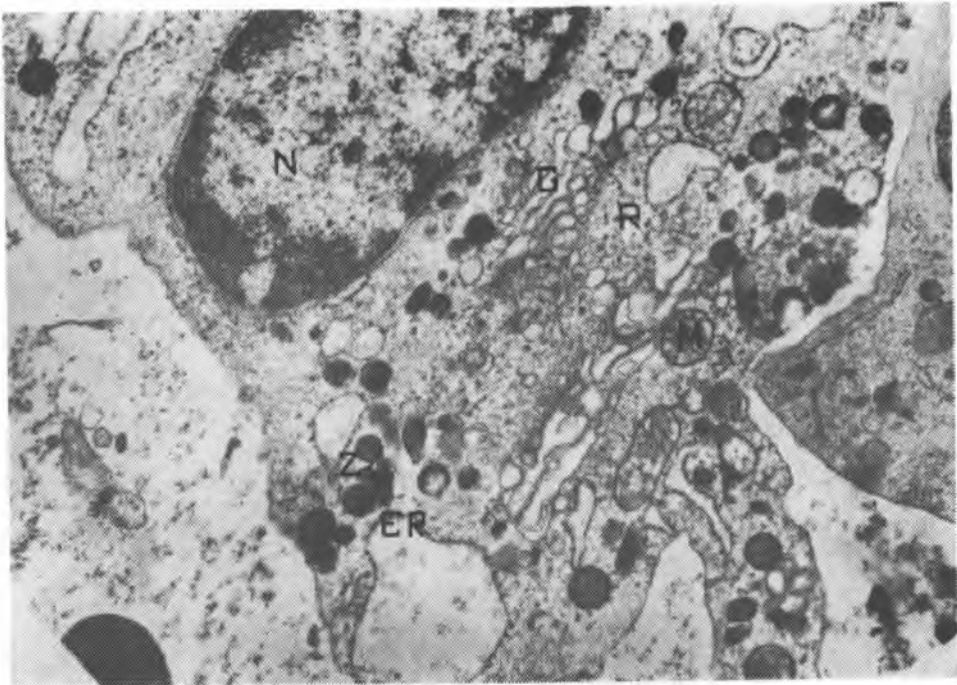
Ryc. 5



Ryc. 6



Ryc. 7



Ryc. 8

Ryc. 3. Grupa I doświadczalna. Granulocyt obojętnochłonny. Er — ziarnista siatka śródplazmatyczna, N — jądro, Z₁ — ziarnistości I-rzędowe, Z₂ — ziarnistości II-rzędowe. Pow. ok. 25 000 X.

Ryc. 4. Grupa I doświadczalna. Promielocyt. Er — ziarnista siatka śródplazmatyczna, N — jądro, R — rybosomy, SM — struktury mielinowe, Z₁ — ziarnistości I-rzędowe. Pow. ok. 25 000 X.

Ryc. 5. Grupa II doświadczalna. Promielocyt. Er — ziarnista siatka śródplazmatyczna, G — struktury Golgiego, M — mitochondria, N — jądro, R — rybosomy, Z₁ — ziarnistości I-rzędowe. Pow. ok. 25 000 X.

Ryc. 6. Grupa II doświadczalna. Granulocyt obojętnochłonny. Er — ziarnista siatka śródplazmatyczna, G — struktury Golgiego, M — mitochondria, N — jądro, R — rybosomy, Z₁ — ziarnistości I-rzędowe, Z₂ — ziarnistości II-rzędowe. Pow. ok. 20 000 X.

Ryc. 7. Grupa II doświadczalna. Promielocyt. Er — ziarnista siatka śródplazmatyczna, M — mitochondria, N — jądro, R — rybosomy, Z₁ — ziarnistości I-rzędowe. Pow. ok. 25 000 X.

Ryc. 8. Grupa II doświadczalna. Promielocyt. Er — ziarnista siatka śródplazmatyczna, G — struktury Golgiego, M — mitochondria, N — jądro, R — rybosomy, Z₁ — ziarnistości I-rzędowe. Pow. ok. 25 000 X.

РЕЗЮМЕ

Белым крысам вводился монокротофос — новое химическое средство, защищающее выращиваемую сахарную свеклу. Доза 0,05 DL₅₀ вводилась в течение 28 дней и однократная доза 0,1 DL₅₀. Проведено ультраструктурные и цитохимические наблюдения за клетками генетического ряда нейтрофильных гранулоцитов. Установлена неправильность синтеза зернистости I ряда в миело-perоксидазы в этих структурах. Уменьшилось также количество зернистости II ряда. Во всех стадиях развития нейтрофильных гранулоцитов замечено повреждение митохондрий, а также появление миелиновых структур в пределах этих органелл.

SUMMARY

White rats were given monocrotophos — a new chemical drug used in protecting the sugar — beet cultivation — in doses of 0.05 DL₅₀ during a period of 28 days and 0.1 DL₅₀ only once. Ultrastructural as well as the cytochemical observations of the cells of neutrophil granulocyte series were carried out. Some irregularities in the synthesis of the I sequence of granules in myeloblasts and promyelocytes being reflected in a partial lack of myeloperoxidase in those structures were noticed. The amount of the II sequence of granules was also decreased. In all developmental stages of neutrophilic granulocytes the damage of mitochondria and appearing of the myelinic structures within those organelles were also observed.

EXPLANATION TO FIGURES

Fig. 1. Experimental group I. Promyelocyte. Er — rough endoplasmic reticulum, G — Golgi's structures, M — mitochondria, N — nucleus, R — ribosomes, Z₁ — primary granules. Magn. approx. 25 000 X.

Fig. 2. Experimental group I. Neutrophil granulocyte. N — nucleus, Z₁ — primary granules, Z₂ — secondary granules. Magn. approx. 25 000×.

Fig. 3. Experimental group I. Neutrophil granulocyte. Er — rough endoplasmic reticulum, N — nucleus, Z₁ — primary granules, Z₂ — secondary granules. Magn. approx. 25 000×.

Fig. 4. Experimental group I. Promyelocyte. Er — rough endoplasmic reticulum, N — nucleus, R — ribosomes, SM — myeline structures, Z₁ — primary granules. Magn. approx. 25 000×.

Fig. 5. Experimental group II. Promyelocyte. Er — rough endoplasmic reticulum, G — Golgi's structures, M — mitochondria, N — nucleus, R — ribosomes, Z₁ — primary granules. Magn. approx. 25 000×.

Fig. 6. Experimental group II. Neutrophil granulocyte. Er — rough endoplasmic reticulum, G — Golgi's structures, M — mitochondria, N — nucleus, R — ribosomes, Z₁ — primary granules, Z₂ — secondary granules. Magn. approx. 20 000×.

Fig. 7. Experimental group II. Promyelocyte. Er — rough endoplasmic reticulum, M — mitochondria, N — nucleus, R — ribosomes, Z₁ — primary granules. Magn. approx. 25 000×.

Fig. 8. Experimental group II. Promyelocyte. Er — rough endoplasmic reticulum, G — Golgi's structures, M — mitochondria, N — nucleus, R — ribosomes, Z₁ — primary granules. Magn. approx. 25 000×.