

ANNALES  
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA  
LUBLIN—POLONIA

VOL. XXXIX, 21

SECTIO D

1924

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

Janina HALLIOP, Alina TOCHMAN,  
Maciej LATALSKI, Daniela OBUCHOWSKA

**Ocena charakteru zmian rozwijających się granulocytów  
obojętnochłonnych szpiku szczura białego w zatruciu karbarylem. Część I**

Оценка характера изменений в развивающихся нейтрофильных гранулоцитах  
костного мозга белой крысы при отравлении карбарилем. Часть I

Evaluation of the Nature of Changes in Developing Neutrophils in Bone Marrow  
of the White Rat in Carbaryl Intoxication. Part I

Powszechność stosowania środków chemicznej ochrony roślin stała się przyczyną rozwoju badań eksperymentalnych, których celem jest określenie stopnia ich szkodliwości dla organizmu ludzkiego. Związki te bowiem mają działanie mniej lub bardziej toksyczne, a możliwości zatruć osób poprzez kontakt z nimi ze względów zawodowych są bardzo duże. Dlatego szczególnie badania pozwalające na ujawnienie wczesnych zmian na poziomie komórkowym i subkomórkowym mogą dostarczyć wiele cennych informacji.

Posłużono się techniką mikroskopowo-elektronową w celu prześledzenia wpływu karbarylu na ultrastrukturę rozwijających się granulocytów obojętnochłonnych szpiku szczura. Chodziło przede wszystkim o wykazanie, czy i w jaki sposób, a także jakie dawki karbarylu zmieniają ultrastrukturę neutrofilii i komórek będących ich prekursorami oraz jak przebiega proces granulogenezy w tych komórkach. Granulogeneza jest bowiem zagadnieniem pierwszoplanowym z uwagi na udział mieloperoksydazy (4, 6) oraz innych enzymów zawartych w ziarnistościach cytoplazmatycznych granulocytów w ich funkcji obronnej.

W związku z tym, oprócz utrastrukturalnych badań morfologicznych, oceniano też zmiany w poziomie i rozmieszczeniu mieloperoksydazy w ziarnistościach granulocytów obojętnochłonnych. Układem odniesienia

dla materiału doświadczalnego był opracowany wcześniej model szeregu rozwojowego granulocytów obojętnochłonnych szpiku szczura (7).

#### MATERIAŁ I METODYKA BADAŃ

Badania przeprowadzono na szczurach białych, samicach, hodowli własnej o c.c. 150—200 g. Wśród zwierząt wyodrębniono 5 grup doświadczalnych po 15 zwierząt w każdej. Wskaźnik ostrej toksyczności dla karbarylu wynosi 540 mg/kg c.c. Preparat w postaci emulsji podawano szczurom dożołądkowo przy pomocy sondy. Zwierzęta otrzymywały następujące dawki karbarylu: grupa I doświadczalna — jednorazowa dawka karbarylu w wysokości równej 0,1 DL<sub>50</sub>, grupa II doświadczalna — jednorazowo w wysokości równej 0,5 DL<sub>50</sub>, grupa III doświadczalna — jednorazowo w wysokości równej DL<sub>50</sub>. Grupy doświadczalne IV i V obejmowały zwierzęta poddane zatruciu podostremu i otrzymywały: grupa IV doświadczalna — 0,025 DL<sub>50</sub> karbarylu w ciągu 30 dni, grupa V doświadczalna — 0,05 DL<sub>50</sub> w ciągu 30 dni.

Szpik z kości udowych pobierano w narkozie eterowej od szczurów wszystkich grup doświadczalnych po upływie 24 godz. od momentu podania ostatniej dawki insektycydu. Prowadzono badania morfologiczne i histochemiczne, wykonując reakcję z dwuaminobenzydyną — DAB na obecność mieloperoksydazy.

Materiał do badań morfologicznych przygotowywano w sposób typowy dla techniki mikroskopowo-elektronowej. Stosowano podwójne utrwalenie w zbuforowanych roztworach 4% glutaraldehydu i 1% kwasu osmowego, odwadnianie w szeregu etanolu i zatopienie w Eponie 812.

Szpik do badań cytochemicznych utrwalano w 1,5% zbuforowanym roztworze aldehydu glutarowego. Następnie wykonywano reakcję z dwuaminobenzydyną (DAB), inkubując materiał w ciągu 60 min. przy pH=7,0 w temp. +37°C. Po inkubacji szpik dotrwalało w 1% OsO<sub>4</sub>, po czym postępowano analogicznie jak w przypadku badań morfologicznych. Skrawki krojono na ultramikrotomie Tesla BS 490, a następnie oglądano i fotografowano w mikroskopie elektronowym Tesla BS 613.

#### WYNIKI BADAŃ

##### Grupa I doświadczalna — 0,1 DL<sub>50</sub>

Dojrzewające komórki szeregu rozwojowego granulocytów obojętnochłonnych szpiku nie wykazywały odchyień od normy w rozmieszczeniu mieloperoksydazy w strukturach błoniastych komórek (ryc. 1) oraz w ziarnistościach I-rzędowych (ryc. 1, 2, 3). Ilość ziarnistości I- i II-rzędowych w odpowiednich formach rozwojowych była również prawidłowa. Większość organelli komórkowych odpowiadała swą budową organellom obserwowanym w materiale kontrolnym. Jedynie w obrazie ultrastrukturalnym mitochondriów stwierdzano ich obrzmienie przy zachowaniu ciągłości błony zewnętrznej (ryc. 1, 2).

Grupa II doświadczalna — 0,5 DL<sub>50</sub>

W promielocytach obojętnochłonnych w odniesieniu do komórek prawidłowych obserwowano mniejsze ilości produktu reakcji z DAB w otocze jądrowej, kanałach siatki śródplazmatycznej oraz strukturach Golgiego (ryc. 4). W niektórych komórkach produkt reakcji na obecność mieloperoksydazy zlokalizowany był tylko na obwodzie ziarnistości I-rzędowych (ryc. 5). Nieliczne mielocyty wykazywały w porównaniu z kontrolą mniejszą ilość ziarnistości II-rzędowych bądź też ziarna takie występowały tylko sporadycznie. Metamielocyty i dojrzałe neutrofile nie wykazywały zaburzeń w granulogenezie. W promielocytach, mielocytach i metamielocytach obecne były balonowato rozdęte, elektronowo jasne, mitochondria z zatartym rysunkiem grzebieni (ryc. 5). Pozostałe organelle komórkowe były nie zmienione.

W omawianej grupie doświadczalnej obserwowano ściśle przyleganie do siebie komórek szpiku tak, że sąsiadujące ich błony stykały się na niewielkich odcinkach bądź też oddzielała je jedynie wąska szczelina (ryc. 6). Dotyczyło to nie tylko granulocytów obojętnochłonnych, lecz również innych komórek, np. granulocytów kwasochłonnych, limfocytów, erytrocytów, komórek plazmatycznych itd. W niektórych miejscach zewnętrzne fragmenty błony komórkowej ulegały odwarstwieniu i wpuklały się w postaci pęcherzyków do przestrzeni międzykomórkowych (ryc. 6). Między przylegającymi do siebie komórkami, oprócz wspomnianych wyżej struktur błoniastych, obecne były także struktury mielinopodobne (ryc. 6) oraz homogenny materiał osmofilny.

Grupa III doświadczalna — DL<sub>50</sub>

W promielocytach omawianej grupy doświadczalnej obserwowano zmniejszenie ilości produktu reakcji z DAB w strukturach błoniastych zaangażowanych w syntezę białek. Towarzyszyło temu zmniejszenie ilości ziarnistości I-rzędowych (ryc. 7). Niektóre mielocyty zawierały bardzo mało ziaren II-rzędowych, natomiast metamielocyty i dojrzałe komórki posiadały prawidłową ilość ziarnistości obu typów. Obserwowano także znaczne obrzmienie mitochondriów, połączone z obecnością struktur mielinowych w tych organellach (ryc. 7). Twory mielinowe spotykano również w obrębie siatki śródplazmatycznej i mitochondriów (ryc. 8). Opisane już wcześniej zjawisko przylegania komórek miało miejsce również w aktualnie analizowanej grupie (ryc. 9). Także w przestrzeniach międzykomórkowych obecne były elementy błoniaste oraz różnej wielkości struktury mielinowe (ryc. 9).

Grupa IV doświadczalna —  $30 \times 0,025 \text{ DL}_{50}$ 

W promielocytach grupy IV doświadczalnej ilość i lokalizacja produktu reakcji z DAB była podobna jak w kontroli, zarówno w odniesieniu do struktur błoniastych komórki, jak i ziarnistości I-rzędowych (ryc. 10). Także ilość ziarnistości I-rzędowych nie odbiegała od normy. Pozostałe formy rozwojowe — mielocyty, metamielocyty i dojrzałe neutrofile posiadały prawidłową ilość ziarnistości I- i II-rzędowych. Struktury wewnątrzkomórkowe w komórkach wszystkich stadiów rozwojowych były nie zmienione. Komórki przylegały do siebie wyraźnie, lecz przestrzenie oddzielające komórki były szersze niż to obserwowano w zatruciach ostrych (ryc. 11). W przestrzeniach tych obserwowano również mniej struktur błoniastych oraz mielinowych.

Grupa V doświadczalna —  $30 \times 0,05 \text{ DL}_{50}$ 

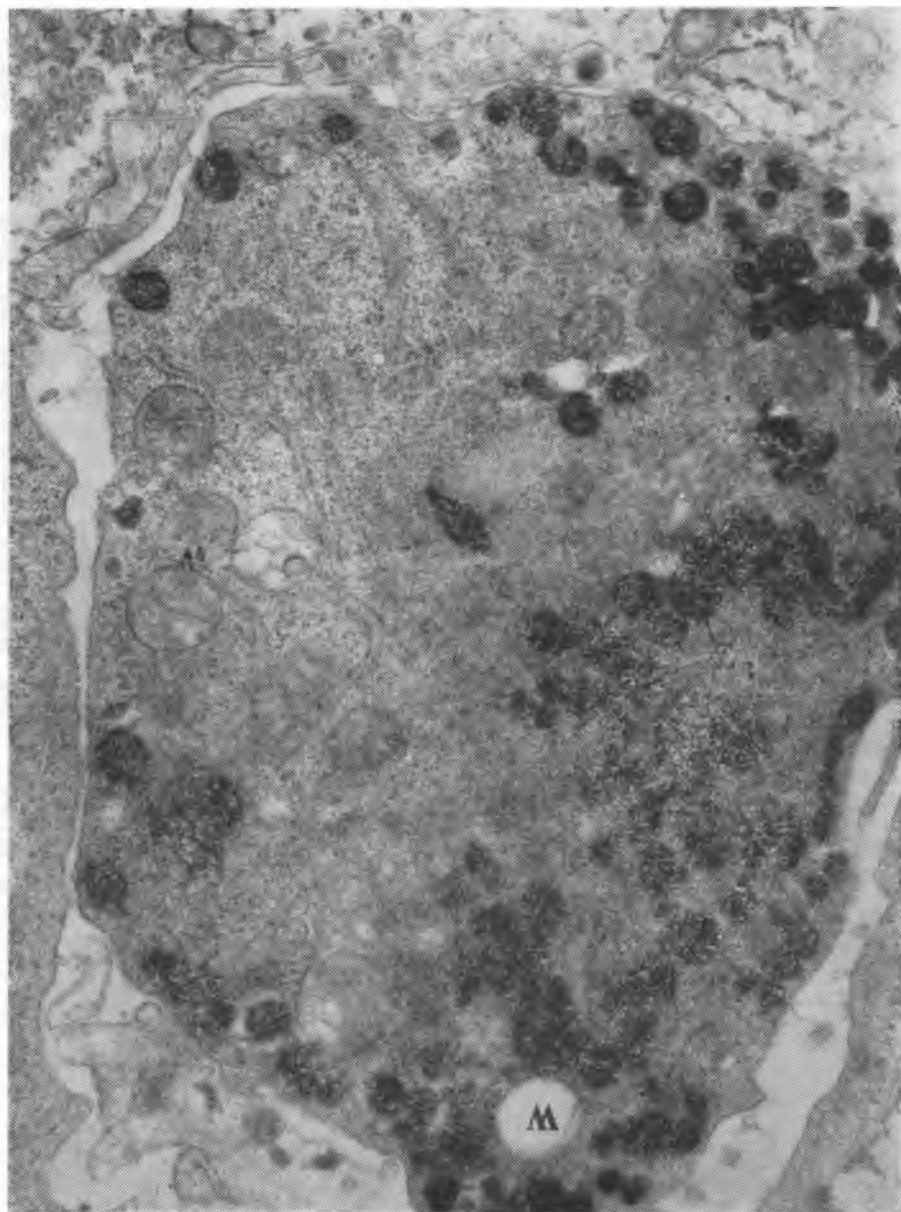
W komórkach rozwijających się neutrofilii odczyn na obecność mieloperoksydazy w strukturach komórkowych odpowiedzialnych za jej syntezę był mało intensywny (ryc. 12). Ziarnistości I-rzędowe niecałkowicie wypełniał produkt reakcji, jak to ma miejsce w warunkach fizjologicznych. Ilość tych ziarnistości ulegała zmniejszeniu w komórkach wszystkich form rozwojowych (ryc. 13, 14). Podobnie zmalała ilość ziarnistości II-rzędowych w mielocytach, metamielocytach i komórkach dojrzałych (ryc. 13, 14). Struktury wewnątrzkomórkowe były nie zmienione, z wyjątkiem obrznięcia mitochondriów, dostrzeganego w niektórych komórkach, i spotykanych niekiedy tworów mielinowych w obrębie elementów błoniastych komórek (siatka śródplazmatyczna, aparat Golgiego). Przyleganie komórek było wyraźnie zaznaczone. Towarzystwo mu duże nagromadzenie struktur błoniastych i mielinowych w wąskich przestrzeniach międzykomórkowych (ryc. 12).

## OMÓWIENIE WYNIKÓW

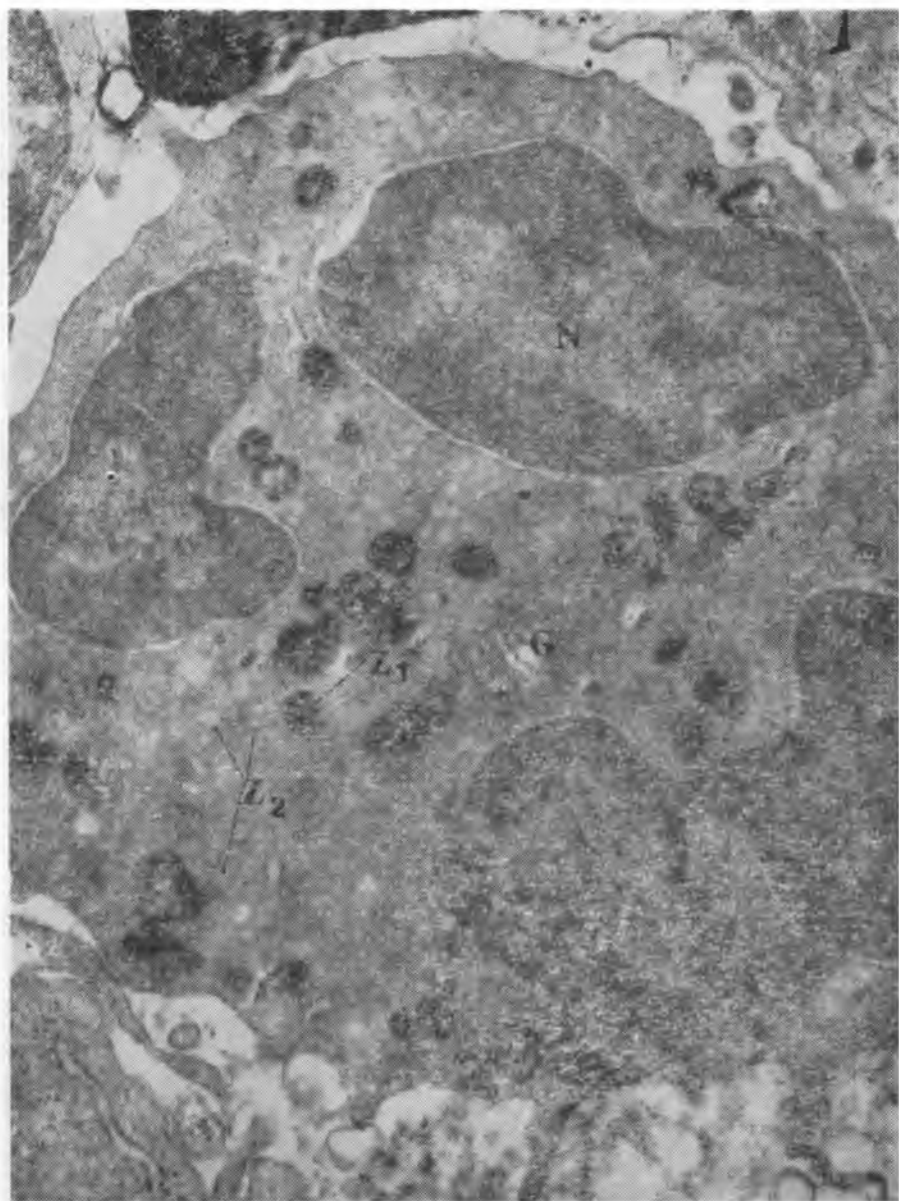
Mechanizm toksycznego działania insektycydów karbaminianowych polega na hamowaniu esterazy cholinowej, z którą jednak w odróżnieniu od związków fosforoorganicznych nie tworzą stałych kompleksów. Jednocześnie z uwagi na bardzo duże podobieństwo ich budowy chemicznej do acetylocholino mogą one wywierać bezpośredni wpływ na układ nerwowy. Skąpe są jednak wiadomości o ich procesach metabolicznych oraz toksyczności, zarówno samych insektycydów, jak i ich metabolitów, na narządy i tkanki (11, 13).



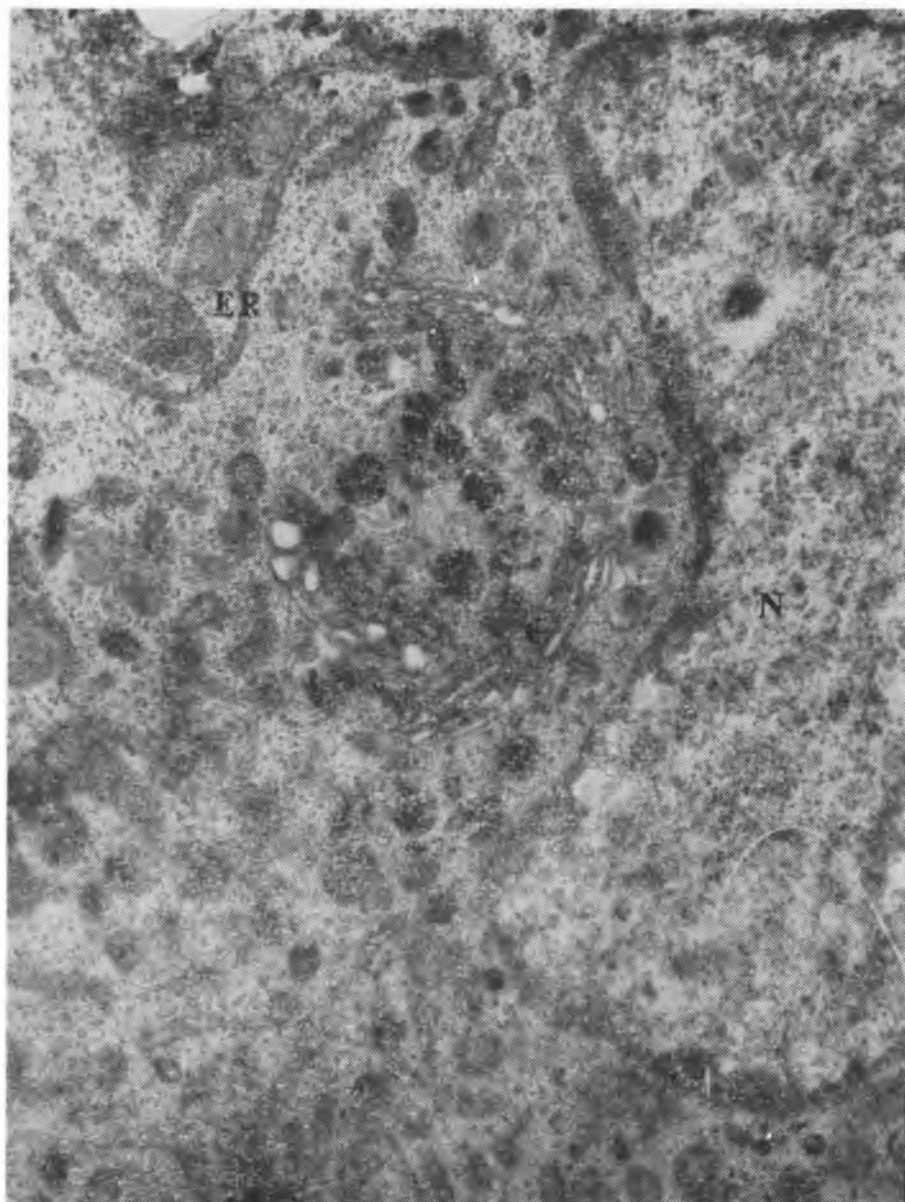
Ryc. 1



Ryc. 2

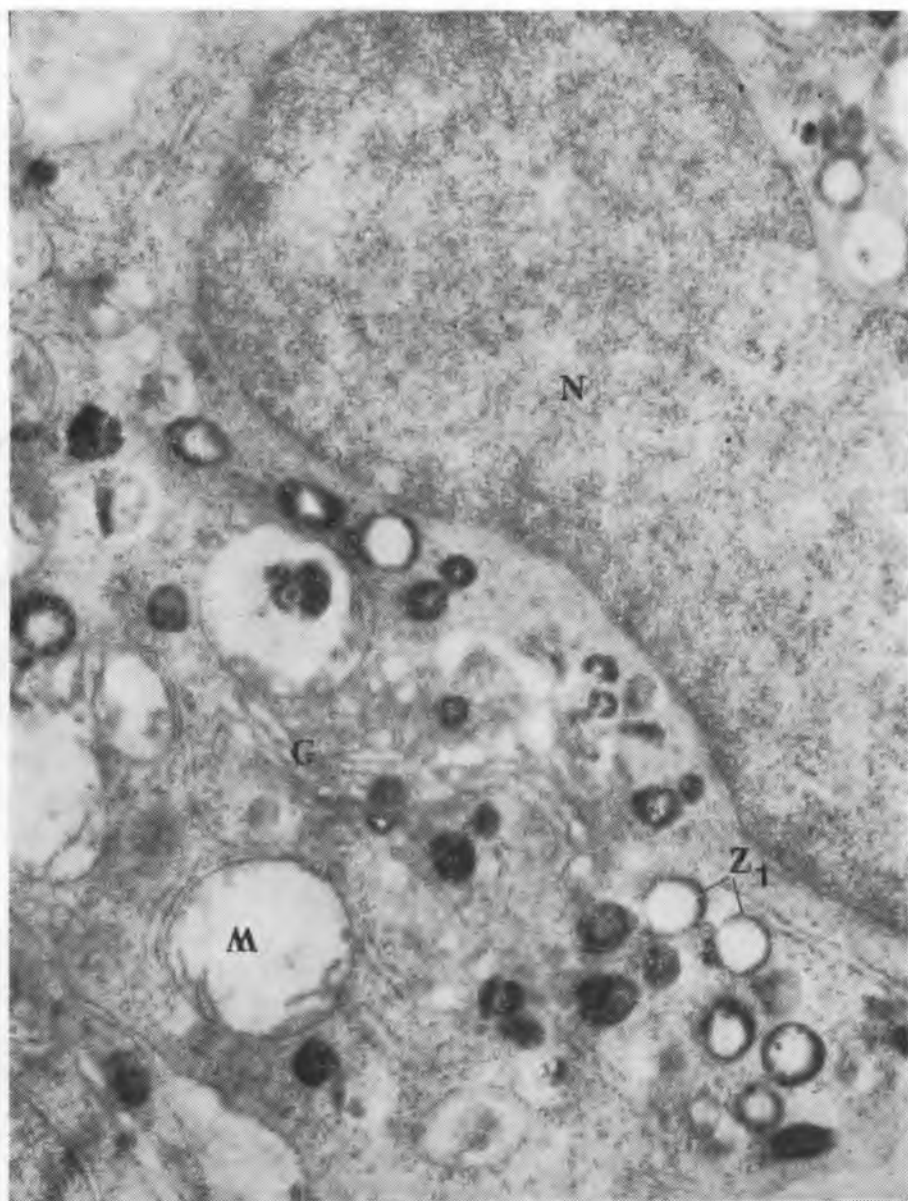


Ryc. 3

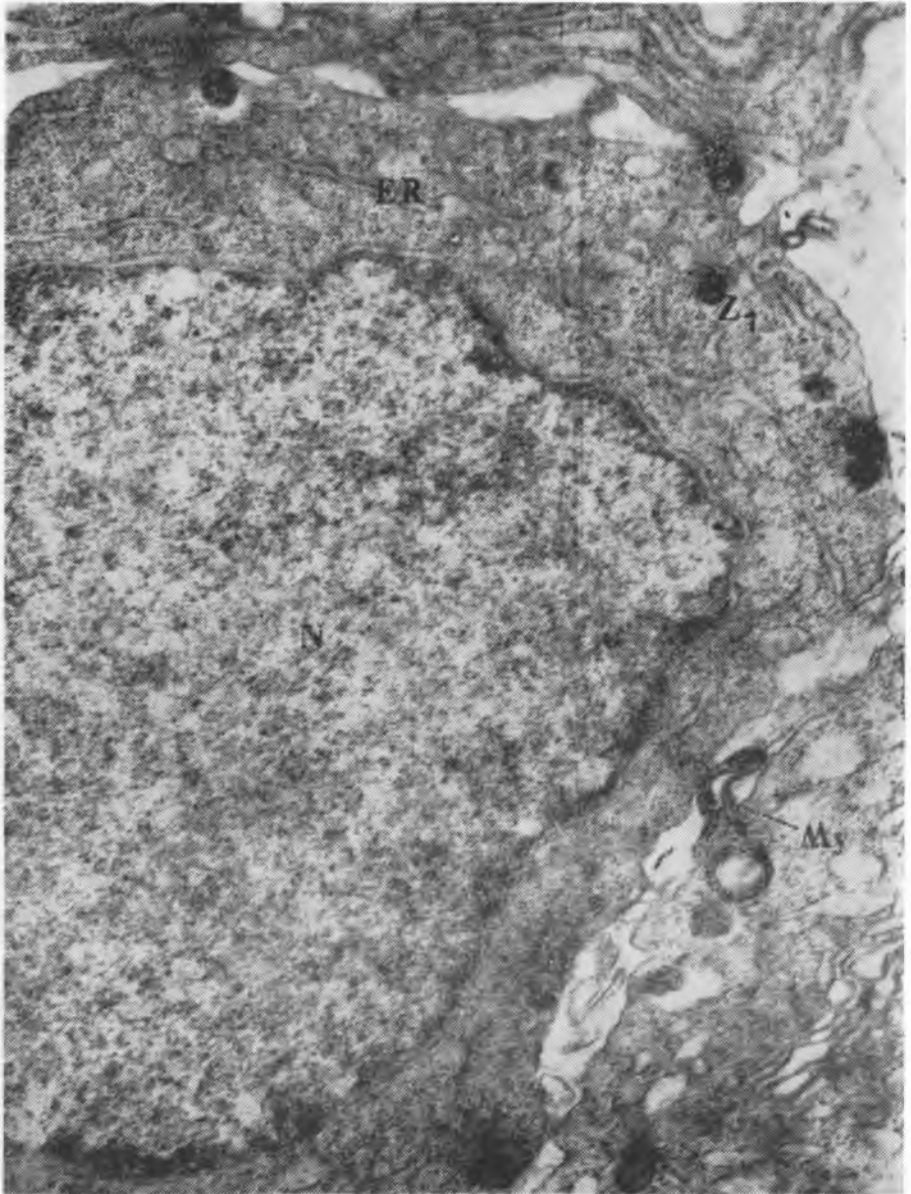


Ryc. 4

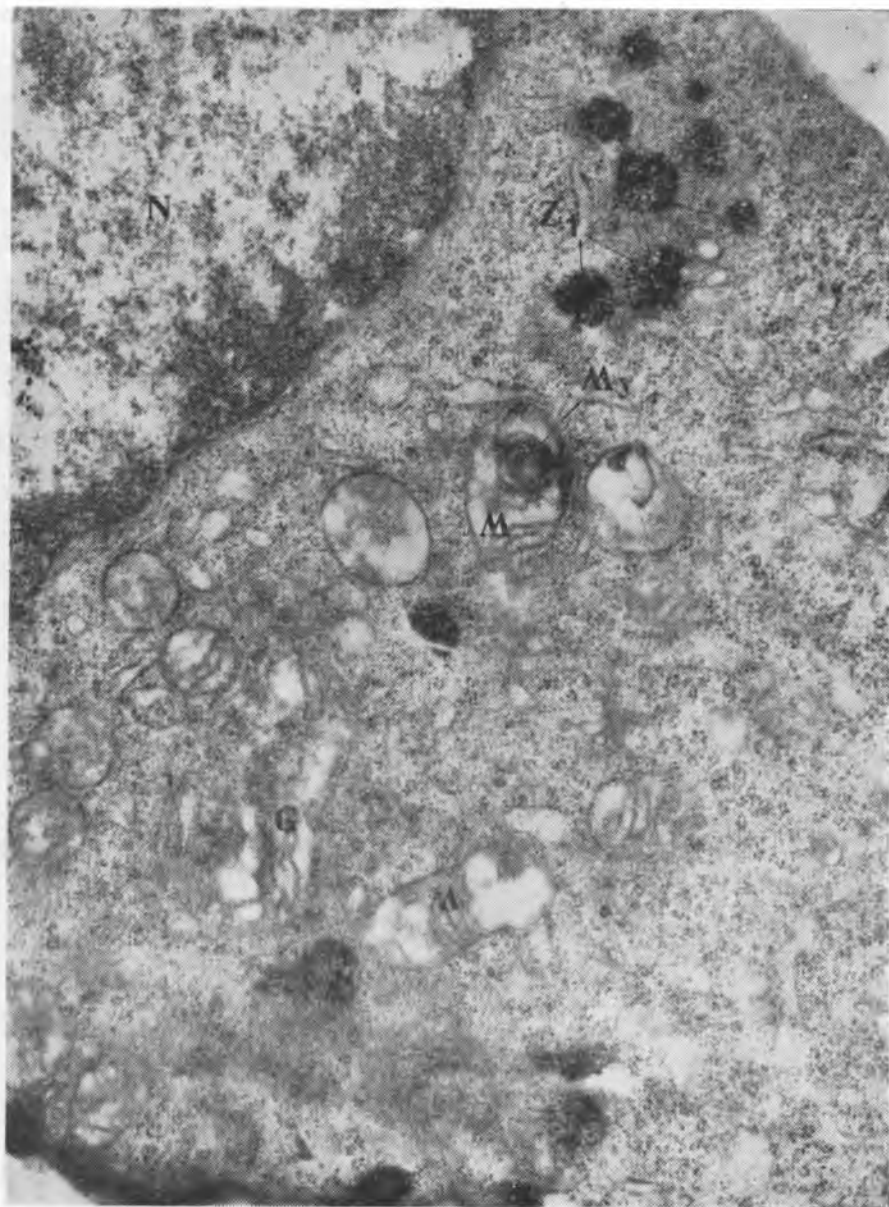




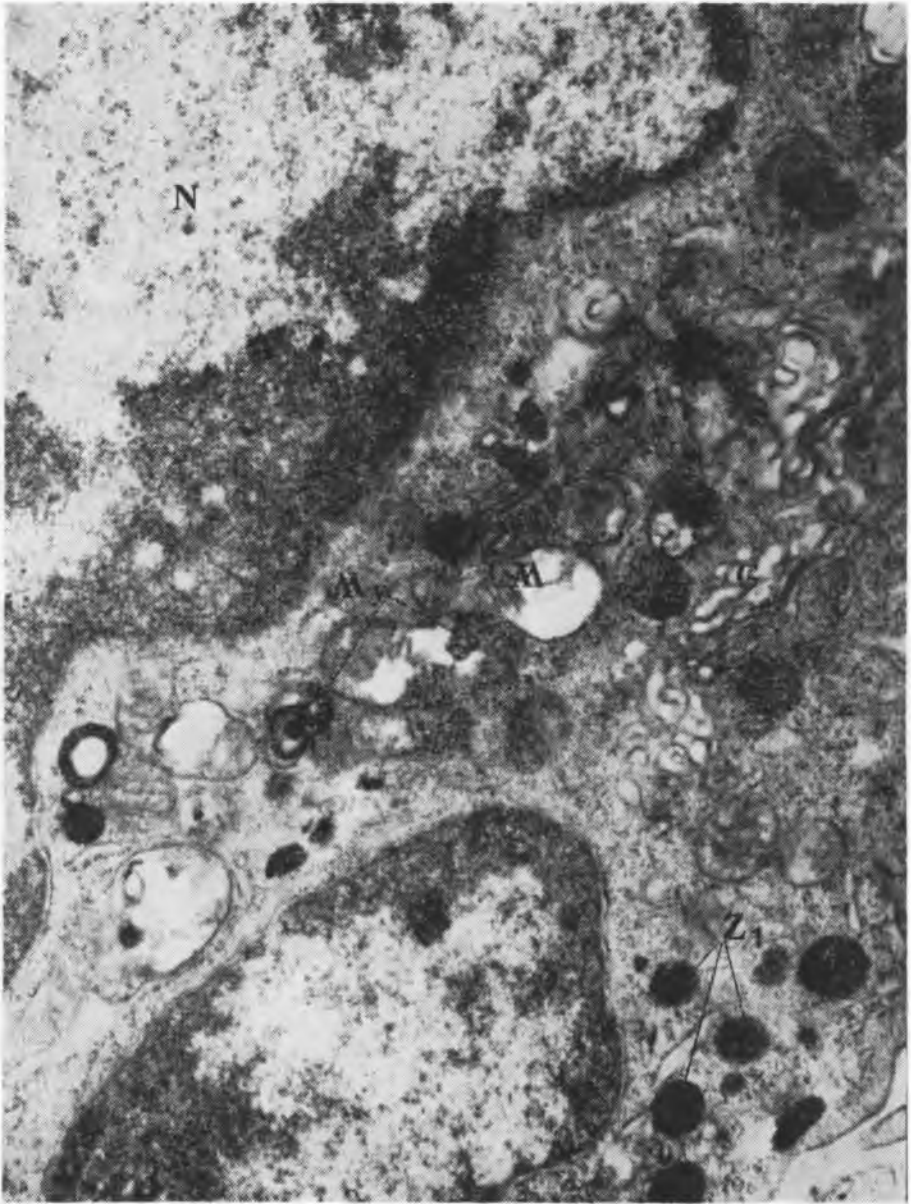
Ryc. 5



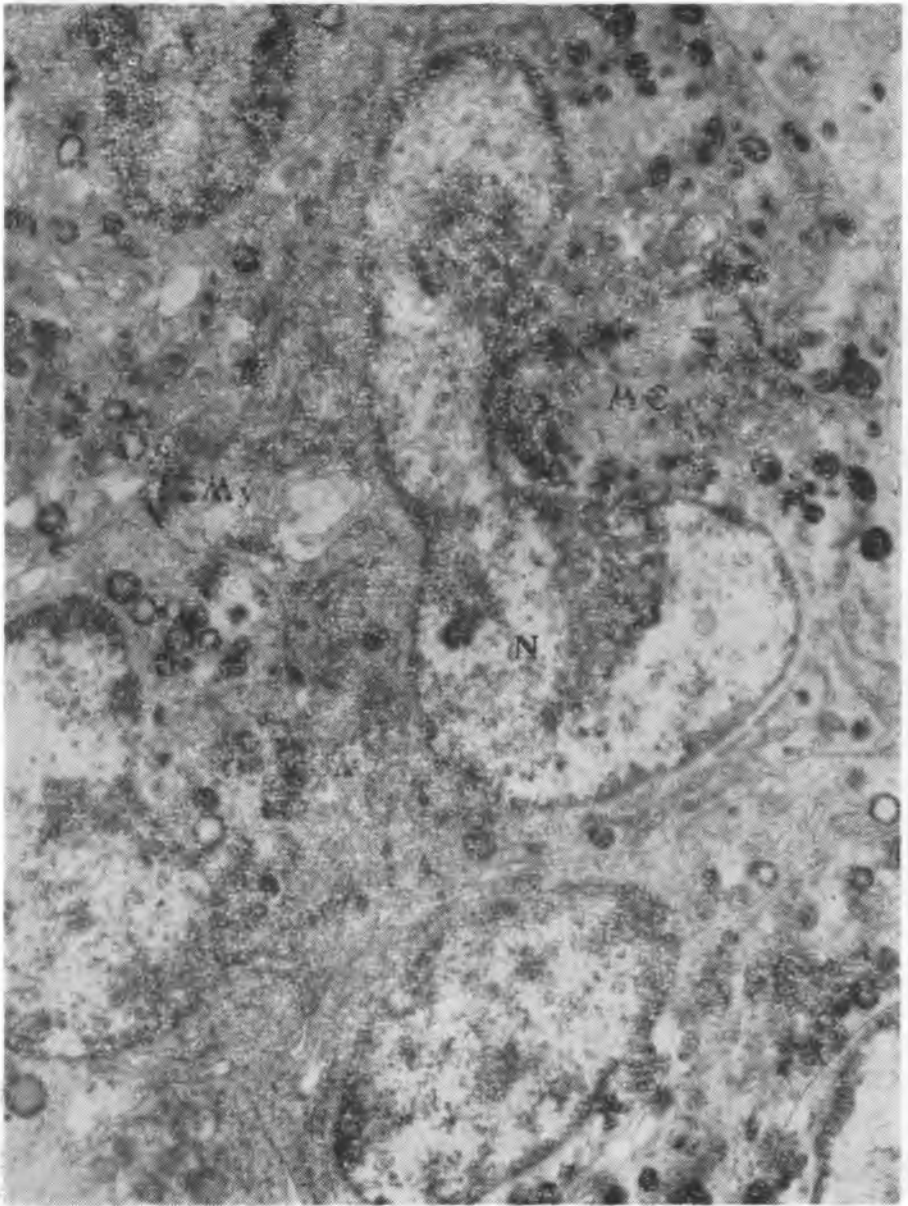
Ryc. 6



Ryc. 7

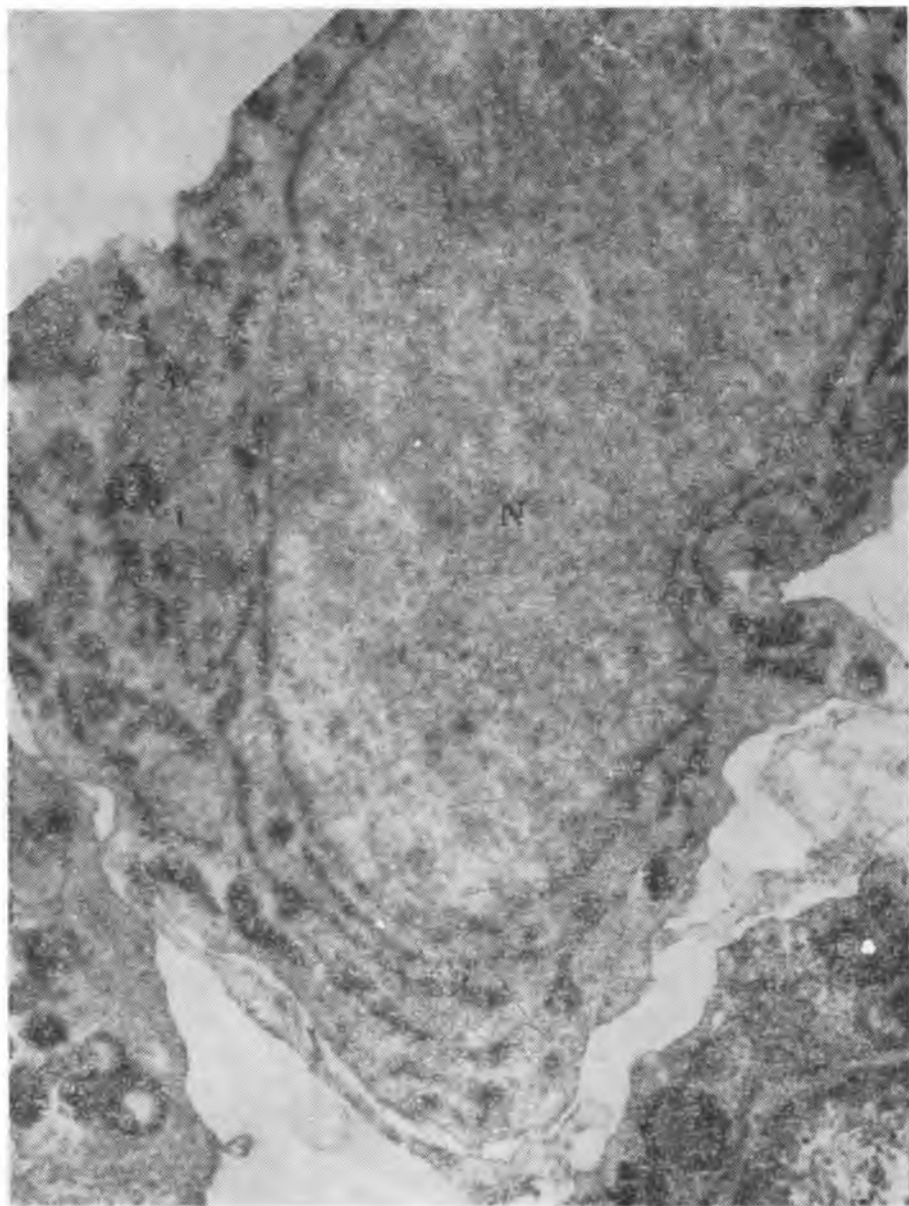


Ryc. 8

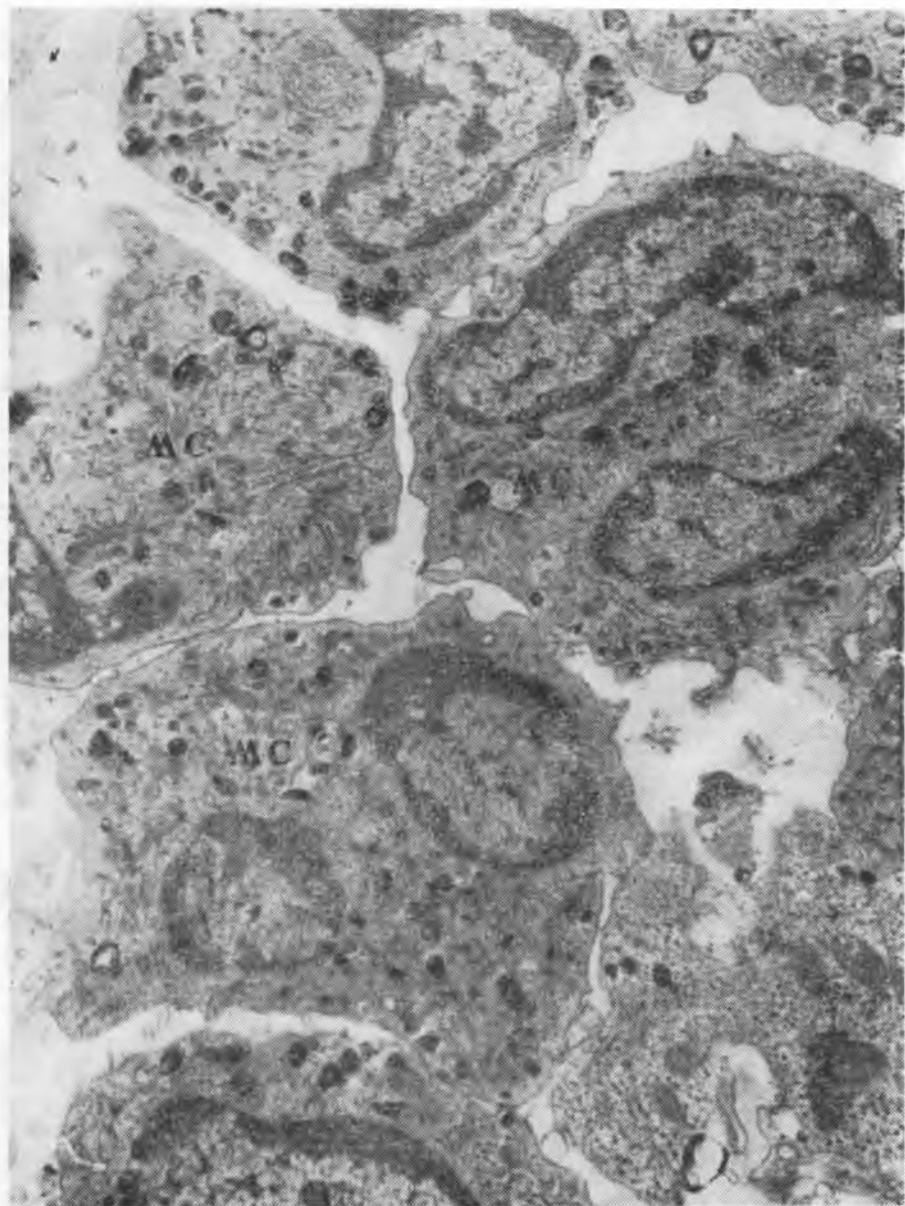


Ryc. 9





Ryc. 10



Ryc. 11

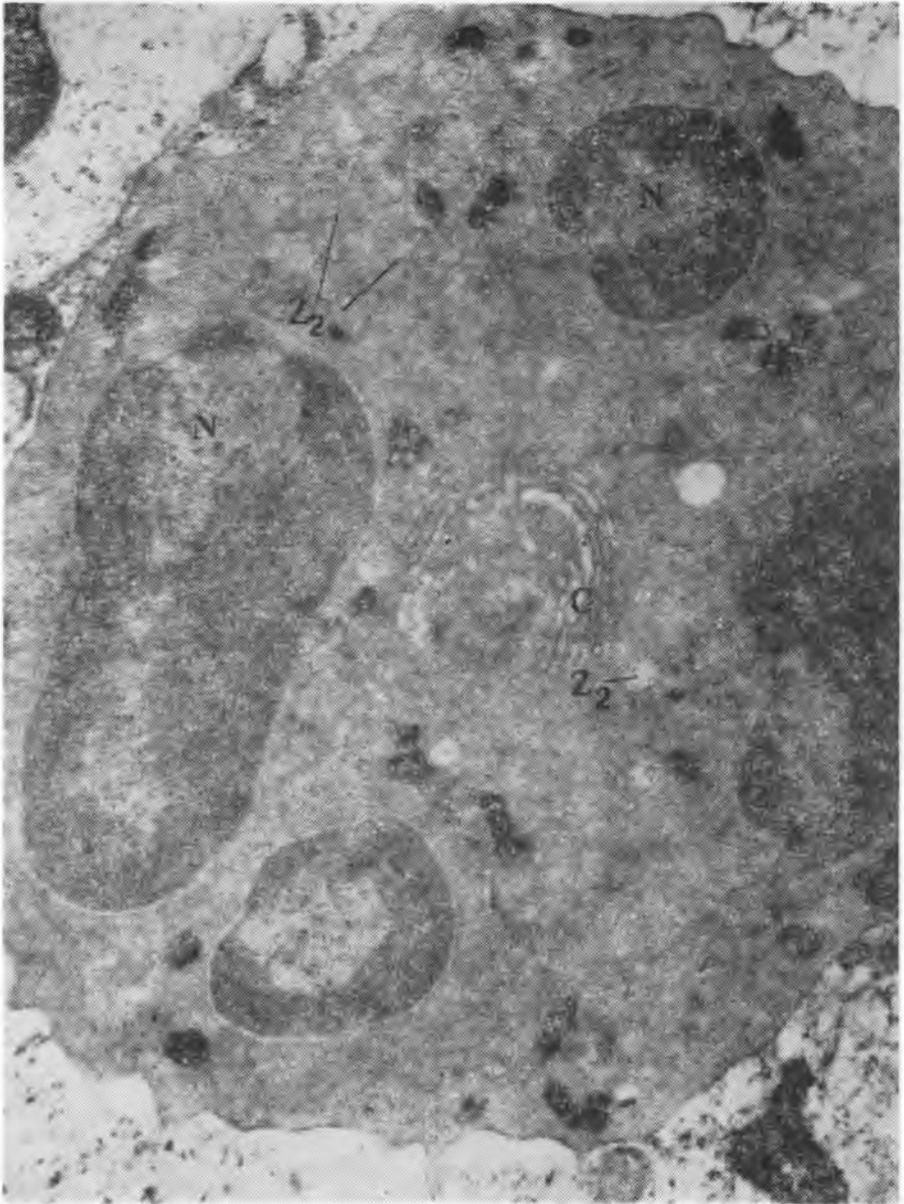


Ryc. 12





Ryc. 13



Ryc. 14

Spośród insektycydów tej grupy często stosowany jest karbaryl między innymi z uwagi na szeroki zakres działania oraz niską toksyczność.  $DL_{50}$  dla tego preparatu jest najwyższe spośród wszystkich stosowanych związków karbaminianowych. Na korzyść karbarylu, podobnie jak wszystkich insektycydów tej grupy, przemawia również fakt, że są one szybko metabolizowane i wydalane z moczem. W przypadku zatruc, objawy cofają się na ogół wcześniej, gdyż inhibicja cholinesterazy ma charakter odwracalny (11). Wpływ karbarylu oraz innych pestycydów na narządy związane z metabolizowaniem i wydalaniem substancji toksycznych wydaje się oczywisty i nie budzi wątpliwości. Jednak przeprowadzone badania, dotyczące szpiku kostnego, wykazały, że pestycydy wywierają działanie również na tę tkankę (5, 8, 9, 12). Wynika to prawdopodobnie ze specjalnych właściwości tkanki szpikowej. Obecne w niej komórki, żyjące krótko, szybko wymieniające się, jako młode i nie zróżnicowane są bardzo wrażliwe na bodźce zewnętrzne, także na działanie toksyczne substancji. We wcześniejszych badaniach wykazano, że niektóre pestycydy osłabiają granulogenezę oraz zmieniają obraz submikroskopowy pewnych organelli cytoplazmatycznych w komórkach rozwijających się granulocytów obojętnochłonnych i kwasochłonnych (5, 8, 9, 12, 13). Stwierdzone zmiany musiały niewątpliwie odbić się niekorzystnie na pełnionych przez te komórki funkcjach. Z tego też względu podjęto badania szpiku kostnego w aspekcie wpływu na rozwijające się granulocyty obojętnochłonne jednego z najmniej toksycznych preparatów karbaminianowych — karbarylu.

Wykazano, że jednorazowe dawki 0,1  $DL_{50}$  oraz 30-krotne w wysokości 0,025  $DL_{50}$  nie powodowały zmian w rozwijających się komórkach granulocytów obojętnochłonnych. Granulogeneza miała również przebieg nie zmieniony. W warunkach prawidłowych w stadium mieloblasta zostaje zapoczątkowana synteza białek enzymatycznych, które wejdą w skład ziarnistości I-rzędowych. Produkt reakcji z DAB, świadczący o obecności jednego z białek — mieloperoksydazy, obecny jest więc w tych komórkach w obrębie struktur cytoplazmatycznych zaangażowanych w syntezę białka, tj. w otoczce jądrowej i kanałach siatki śródplazmatycznej. W promielocytach, oprócz wyżej wymienionych struktur, produkt reakcji pojawia się w strefie Golgiego oraz wypełnia całkowicie wszystkie powstające w tym stadium rozwojowym ziarnistości I-rzędowe. Synteza tych ziarnistości zostaje całkowicie zakończona w promielocytach i nie powtarza się już w cyklu życiowym komórki (7). W mielocytach tworzone są ziarnistości II-rzędowe nie zawierające mieloperoksydazy. W metamielocytach synteza ziaren II-rzędowych zostaje zakończona i formy dojrzałe posiadają nagromadzone duże ilości ziarnistości obu typów, natomiast ilość organelli komórkowych jest zredukowana do minimum (7).

W przypadku zatruc ostrych ( $1 \times 0,5$  DL<sub>50</sub> i  $1 \times$ DL<sub>50</sub>) i podostrych ( $30 \times 0,05$  DL<sub>50</sub>) obserwowano osłabienie syntezy mieloperoksydazy i obniżenie jej zawartości w ziarnistościach I-rzędowych oraz zmniejszenie ilości tych ziarnistości. W przypadku dawek jednorazowych takie zmiany ograniczały się jedynie do mieloblastów i promielocytów, a w przypadku dawek wielokrotnych dotyczyły także mielocytów i form dojrzałych. Związane jest to prawdopodobnie z różną długością życia poszczególnych form rozwojowych. Przykładowo promielocyt żyje ok. 2 dni, zaś mielocyt ok. 3 dni. Po 24 godz. od podania karbarylu zmienione promielocyty nie mogły jeszcze przekształcić się w mielocyty. Dlatego też te mielocyty i dojrzałe formy posiadały prawidłową ilość ziarnistości I-rzędowych. Wyżej wymienione komórki w zatruciach podostrych wykazywały mniejszą ilość mieloperoksydazy, powstały one bowiem z promielocytów, w których synteza tego enzymu uległa osłabieniu. Ziarnistości I-rzędowe neutrofilii zawierają różne enzymy hydrolityczne (1, 2, 3) oraz mieloperoksydazę (1, 10).

Poza zaburzeniami granulogenezy w komórkach rozwijających się granulocytów obojętnochłonnych szpiku, zarówno w ostrych jak i podostrych zatruciach karbarylem, stwierdzono także pewne nieprawidłowości w strukturach błoniastych komórki. Struktury te, takie jak siatka śródplazmatyczna, aparat Golgiego czy mitochondria, wykazywały niekiedy obecność tworów mielinowych, które nie występowały jednakże często i nie we wszystkich komórkach. Wyraźniej zaznaczone były natomiast zaburzenia dotyczące błony komórkowej. Przejawiały się one nadmiernym przyleganiem sąsiadujących komórek, czasem częściowym odwarstwianiem zewnętrznych fragmentów otoczki komórkowej oraz obecnością w przestrzeniach międzykomórkowych struktur mielinopodobnych. Wyglądem i budową przypominały one analogiczne twory pojawiające się w komórkach w wyniku destrukcji fosfolipidów przez enzymy lizosomalne. Być może, zatem karbaryl lub jego metabolity działają na fosfolipidową komponentę błony komórkowej, powodując jej degradację. Wyjaśniałoby to również wyżej wspomniane zmiany właściwości powierzchniowych błon komórkowych.

Podobne zmiany, dotyczące błon komórkowych komórek szpiku, wykazano we wcześniejszych badaniach w wyniku podawania zwierzętom cynkotoxu (9). Działanie cynkotoxu było jednak bardziej drastyczne, powodowało bowiem przerwanie ciągłości błony komórkowej, czego nie wywoływał karbaryl. Wydaje się, że zaobserwowane odchylenia od prawidłowego obrazu morfologicznego oraz zaburzenia granulogenezy mogą mieć ujemny wpływ na funkcje pełnione w organizmie przez badane komórki. Charakter zmian sugeruje, że są one odwracalne. Rozstrzygnięcie tego zagadnienia wymaga jednak dalszych badań.

## PIŚMIENNICTWO

1. Ackerman G. A.: Contributions of the Nuclear Envelope, Endoplasmic Reticulum and Golgi to the Formation of Peroxidase and Lysosomal (Azurophil) Granules during Neutrophil Granulopoiesis. *Anat. Rec.* **160**, 304, 1968.
2. Ackerman G. A.: Ultrastructure and Cytochemistry of the Developing Neutrophil. *Lab. Inv.* **19**, 290, 1968.
3. Bainton D. F., Farquhar M. G.: Differences in Enzyme Content of Azurophil and Specific Granules of Polymorphonuclear Leucocytes. *J. Cell Biol.* **39**, 299, 1968.
4. Clark R. A., Klebanoff S. J.: Myeloperoxidase —  $H_2O_2$  — Halide System: Cytotoxic Effect on Human Blood Leucocytes. *Blood* **50**, 65, 1977.
5. Halliop J., Tochman A., Latałski M.: Badania ultrastrukturalne oraz badania mieloperoksydazy granulocytów obojętnochłonnych szczura w ostrym zatruciu kwasem 2,4-dwuchlorofenoksyoctowym. *Acta Haemat. Pol.* **11**, 249, 1980.
6. Klebanoff S. J., Clark R. A.: Jodination by Human Polymorphonuclear Leucocytes: a Re-evaluation. *J. Lab. Clin. Med.* **89**, 675, 1977.
7. Latałski M., Halliop J., Nowakowski A.: Ultrastruktura i cytochemia szeregu rozwojowego granulocytów obojętnochłonnych w szpiku szczura białego. *Acta Haemat. Pol.* **6**, 273, 1975.
8. Latałski M., Halliop J.: Obraz ultrastrukturalny komórek szeregu rozwojowego granulocytów obojętnochłonnych w zatruciu fosfamidem. *Bromat. Chem. Toksykol.* **12**, 323, 1979.
9. Latałski M., Halliop J., Tochman A.: Wpływ ostrego zatrucia herbicydem 2,4-D na proces granulogenezy w granulocytach kwasochłonnych. *Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, Lublin, Sectio D* **35**, 225, 1980.
10. Rausch P. G., Moore T. G.: Granule Enzymes of Polymorphonuclear Neutrophils. A Phylogenetic Comparison. *Blood* **46**, 913, 1975.
11. Szucki B. i wsp.: Chemiczne środki ochrony roślin. PWRiL, Warszawa 1978.
12. Tochman A., Latałski M., Halliop J.: Zaburzenia w procesie rozwoju granulocytów obojętnochłonnych w zatruciu cynkotoxem. *Bromat. Chem. Toksykol.* **14**, 43, 1981.
13. White-Stevens R.: Pestycydy w środowisku. PWRiL, Warszawa 1977.

Otrzymano 17 X 1983.

## OBJAŚNIENIA RYCIN

Ryc. 1 i 2. Grupa I doświadczalna. Promielocyt. Reakcja z DAB. Pow. ok. 25 000X.

Ryc. 3. Grupa I doświadczalna. Granulocyt obojętnochłonny. Reakcja z DAB. Pow. ok. 25 000X.

Ryc. 4, 5 i 6. Grupa II doświadczalna. Promielocyt. Reakcja z DAB. Pow. ok. 25 000X.

Ryc. 7 i 8. Grupa III doświadczalna. Promielocyt. Reakcja z DAB. Pow. ok. 25 000X.

Ryc. 9. Grupa III doświadczalna. Komórki szpiku. Reakcja z DAB. Pow. ok. 12 000X.

Ryc. 10. Grupa IV doświadczalna. Promielocyt. Reakcja z DAB. Pow. ok. 25 000×.

Ryc. 11. Grupa IV doświadczalna. Komórki szpiku. Reakcja z DAB. Pow. ok. 12 000×.

Ryc. 12. Grupa V doświadczalna. Komórki szpiku. Reakcja z DAB. Pow. ok. 25 000×.

Ryc. 13. Grupa V doświadczalna. Mielocyt. Reakcja z DAB. Pow. ok. 25 000×.

Ryc. 14. Grupa V doświadczalna. Granulocyt obojętnochłonny. Reakcja z DAB. Pow. ok. 25 000×.

#### OBJAŚNIENIA SYMBOLI

CM — błona komórkowa

ER — retikulum endoplazmatyczne

G — struktury Golgiego

M — mitochondria

MC — komórki szpiku

My — struktury mielinowe

N — jądro komórkowe

SB — struktury błoniaste

Z<sub>1</sub> — ziarnistości I-rzędowe

Z<sub>2</sub> — ziarnistości II-rzędowe

#### РЕЗЮМЕ

Проведены морфологические исследования и цитохимическая оценка миелопероксидазы в развивающихся нейтрофильных гранулоцитах крыс, подверженных острому и подострому отравлению карбариллом. Установлено, что однократное введение дозы карбарила 0,1 LD<sub>50</sub> и 30-кратное введение дозы 0,025 LD<sub>50</sub> не вызывают отклонений от нормы. Более высокие дозы инсектицида: 1×0,5 LD<sub>50</sub>, 1×LD<sub>50</sub> и 30×0,05 LD<sub>50</sub> вызывали расстройство гранулогенеза в исследуемых клетках, которое могло повлиять отрицательно на их функцию. Расстройству гранулогенеза сопутствовали морфологические изменения клеточных структур. Характер наблюдаемых изменений указывает на их обратимость.

#### SUMMARY

Morphologic studies have been carried out, and myeloperoxidase cytologic evaluation has been made of developing neutrophils in rats subject to acute and subacute carbaryl intoxication. It has been shown that after single carbaryl administration at a dose of 0.1 DL<sub>50</sub> and after giving the insecticide 30 times at doses of 0.025 DL<sub>50</sub> there were no differences from normal. Higher carbaryl doses: 1×0.5 DL<sub>50</sub>, 1×DL<sub>50</sub>, and 30×0.05 DL<sub>50</sub> caused granulogenesis disorders in the cells examined, which may exert negative influence on their function. Granulogenesis disorders were accompanied by morphologic changes of some cellular structures. The nature of the changes observed indicated that they are reversible.

## EXPLANATION TO FIGURES

Fig. 1 and 2. Experimental group I. Promyelocyte. Reaction with DAB. Magn. ca 25,000×.

Fig. 3. Experimental group I. Neutrophil granulocyte. Reaction with DAB. Magn. ca 25,000×.

Fig. 4, 5 and 6. Experimental group II. Promyelocyte. Reaction with DAB. Magn. ca 25,000×.

Fig. 7 and 8. Experimental group III. Promyelocyte. Reaction with DAB. Magn. ca 25,000×.

Fig. 9. Experimental group III. Marrow cells. Reaction with DAB. Magn. ca 12,000×.

Fig. 10. Experimental group IV. Promyelocyte. Reaction with DAB. Magn. ca 25,000×.

Fig. 11. Experimental group IV. Marrow cells. Reaction with DAB. Magn. ca 12,000×.

Fig. 12. Experimental group V. Marrow cells. Reaction with DAB. Magn. ca 25,000×.

Fig. 13. Experimental group V. Myelocyte. Reaction with DAB. Magn. ca 25,000×.

Fig. 14. Experimental group V. Neutrophil granulocyte. Reaction with DAB. Magn. ca 25,000×.

## EXPLANATION TO SYMBOLS

CM — cell membrane

ER — endoplasmic reticulum

G — Golgi complex

M — mitochondria

MC — marrow cells

My — myelin structures

N — nucleus

SB — membranous structures

Z<sub>1</sub> — primary granules

Z<sub>2</sub> — secondary granules

