

ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN—POLONIA

VOL. XXXIX, 22

SECTIO D

1984

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

Maciej LATALSKI, Janina HALLIOP,
Daniela OBUCHOWSKA, Alina TOCHMAN

**Ocena charakteru zmian rozwijających się granulocytów
obojętnochłonnych szpiku szczone białego w zatruciu karbarylem. Część II**

Оценка характера изменений в развивающихся нейтрофильных гранулоцитах
костного мозга белой крысы при отравлении карбариллом. Часть II

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

Insektycydy karbaminianowe należą do tych środków ochrony roślin, których toksyczność określana jest jako mała. W szeregu prac doświadczalnych wykazano jednak ich negatywny wpływ na strukturę i funkcję różnych narządów i tkanek (3, 4, 5).

We wcześniejszych badaniach (4) stwierdzono, że karbaryl (związek należący do grupy insektycydów karbaminianowych) zaburza strukturę i funkcję komórek szeregu rozwojowego granulocytów obojętnochłonnych. Wydawało się, że stwierdzone wówczas zmiany miały charakter odwracalny. W związku z tym postanowiono określić czas cofania się zmian wywołanych wpływem karbarylu na granulocyty obojętnochłonne szpiku szczone białego w zależności od dawki i czasu podawania preparatu.

MATERIAŁ I METODYKA BADAŃ

Badania przeprowadzono na szczurach białych, samicach, hodowli własnej, o c.c. 150—200 g. Wśród zwierząt wyodrębniono 4 grupy doświadczalne, po 30 zwierząt w każdej. Karbaryl w postaci emulsji podawano szczurom dożołądkowo przy pomocy sondy w następujących dawkach:

jednorazowo: 0,2 DL₅₀ — grupa I doświadczalna, 0,5 DL₅₀ — grupa II doświadczalna, 1 DL₅₀ — grupa III doświadczalna,

oraz 30-krotnie: 0,05 DL₅₀ — grupa IV doświadczalna.

Jak wspomniano wyżej, obecne badania są kontynuacją wcześniej prowadzonych doświadczeń, choć w układzie grup doświadczalnych wprowadzono pewne zmiany.

Ponieważ wcześniej wykazano, że jednorazowe podanie karbarylu w wysokości 0,1 DL₅₀ oraz 30-krotne w wysokości 0,025 DL₅₀, nie powodowało odchyień od normy w rozwijających się granulocytach obojętnochłonnych, dawki te wykluczono z aktualnych doświadczeń. Wprowadzono natomiast dodatkową dawkę 0,2 DL₅₀, jako pośrednią pomiędzy 0,1 DL₅₀, nie powodującą zmian, a 0,5 DL₉₅, po której podaniu zmiany submikroskopowe były już wyraźnie zaznaczone.

Prowadzono badania morfologiczne i histochemiczne, wykonując reakcję z dwuaminobenzydyną (DAB) na obecność mieloperoksydazy. Szpik z kości udowych pobierano w narkozie eterowej po upływie 3, 7, 10, 14 i 17 dni od podania jednorazowej dawki bądź ostatniej w przypadku podań wielokrotnych, aż do uzyskania prawidłowych i powtarzalnych obrazów poszczególnych form rozwojowych granulocytów obojętnochłonnych. W poszczególnych grupach doświadczalnych pobierano więc materiał w odstępach 3—4-dniowych. Uzyskanie prawidłowych obrazów rozwijających się komórek szeregu granulocytarnego, zarówno w badaniach morfologicznych jak i histochemicznych, przyjęto jako czas cofania się zmian.

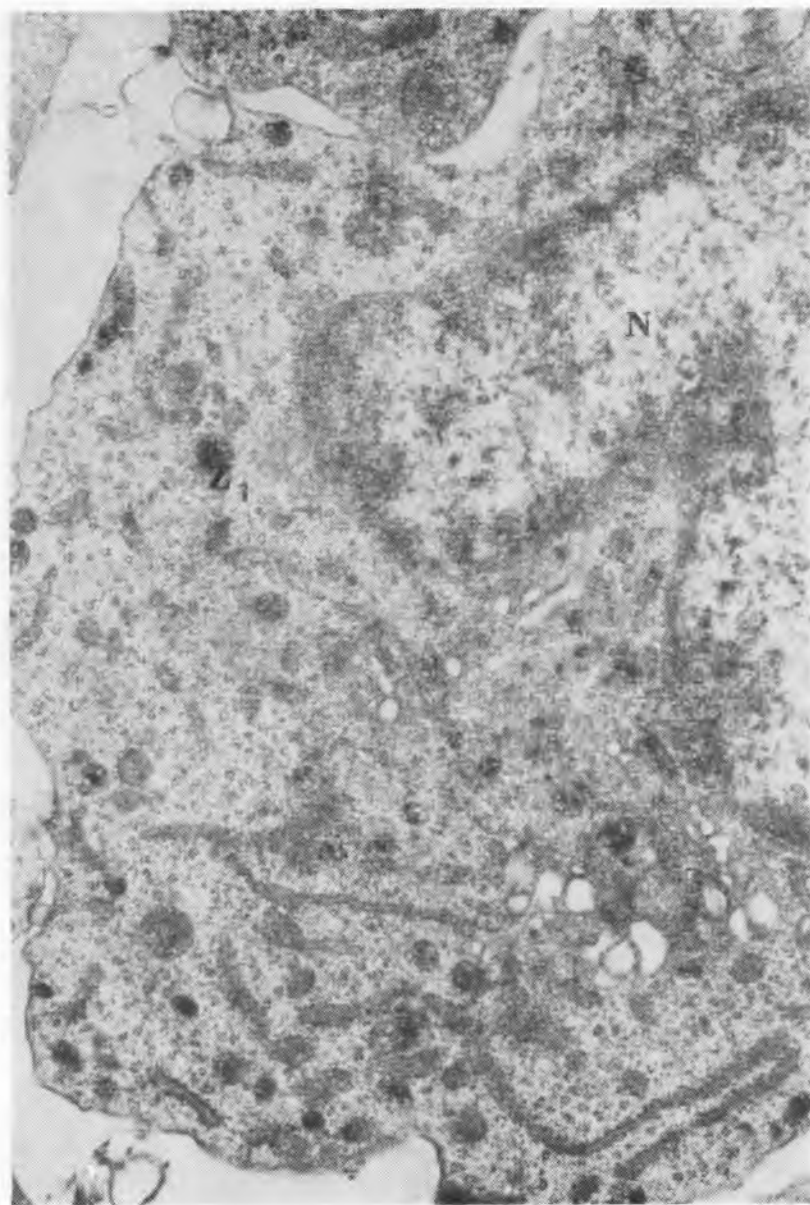
W celu potwierdzenia uzyskanych wyników we wszystkich grupach doświadczalnych prowadzono jeszcze obserwacje szpiku po 3 dniach od czasu, w którym już zmian nie stwierdzono. Uzyskanie prawidłowych obrazów komórek było potwierdzeniem właściwego wyboru czasu cofania się zmian w badanym materiale.

Sposób przygotowywania materiału do badań morfologicznych i histochemicznych został dokładnie opisany w części I (1).

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Celem aktualnych badań była ocena szybkości cofania się zmian w układzie krwiotwórczym spowodowanych podawaniem karbarylu, w zależności od użytej dawki, przy zachowaniu zastosowanych w poprzednich badaniach warunków podawania preparatu. W każdej grupie doświadczalnej dążono więc do uzyskania prawidłowych obrazów badanych komórek. Taki kierunek prowadzenia obserwacji zmusił nas do nieco innej (niż zwykle przyjmowana) formy przedstawienia uzyskanych wyników. Punktem odniesienia są bowiem uprzednio wykazane odchylenia od normy w badanym materiale, opisane w każdej z utworzonych grup doświadczalnych. W tym miejscu podajemy zatem ogólną charakterystykę tych zmian, w kwestiach szczegółowych odsyłając czytelnika do części I (1). Wykazano w niej, że karbaryl powoduje szereg zmian morfologicznych oraz histochemicznych dotyczących aktywności i rozmieszczenia mieloperoksydazy w ziarnistościach cytoplazmatycznych.

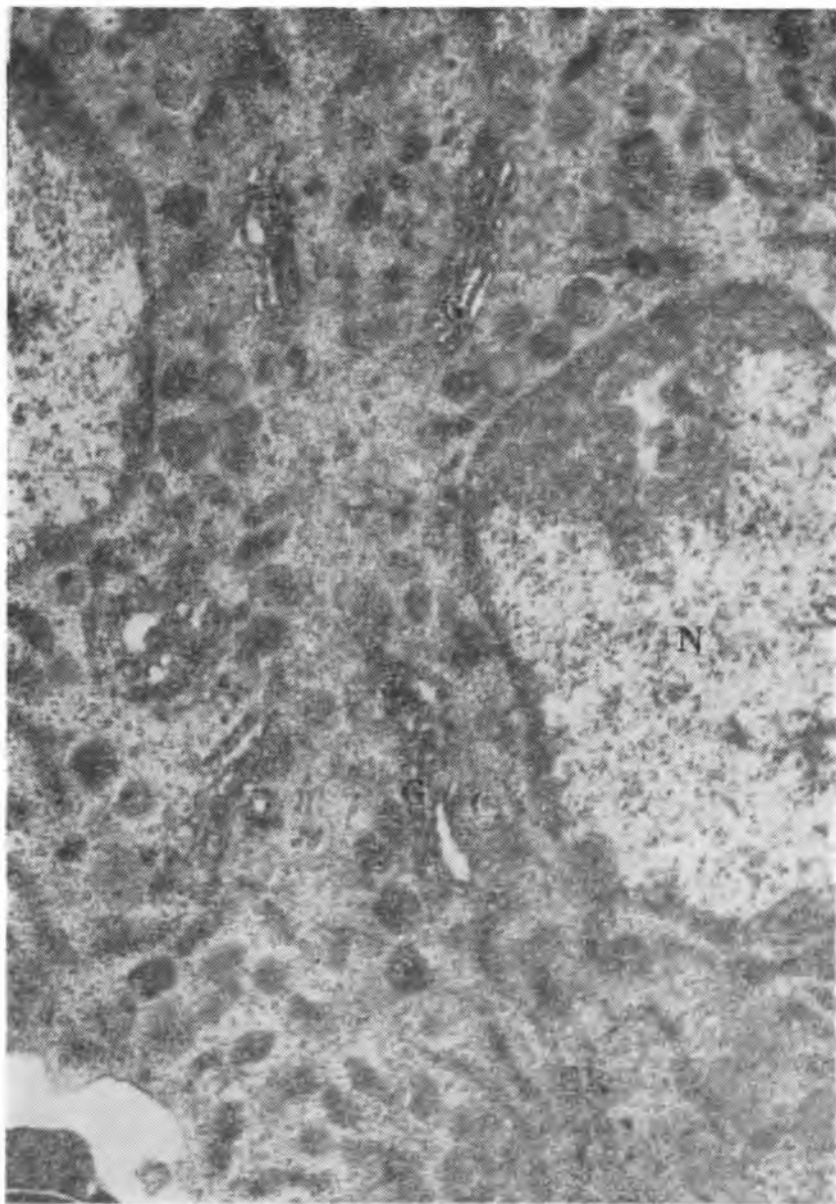
Dowodem zaburzeń w syntezie i rozmieszczeniu mieloperoksydazy, był słaby odczyn na ten enzym w ziarnistościach I-rzędowych granulo-



Ryc. 1



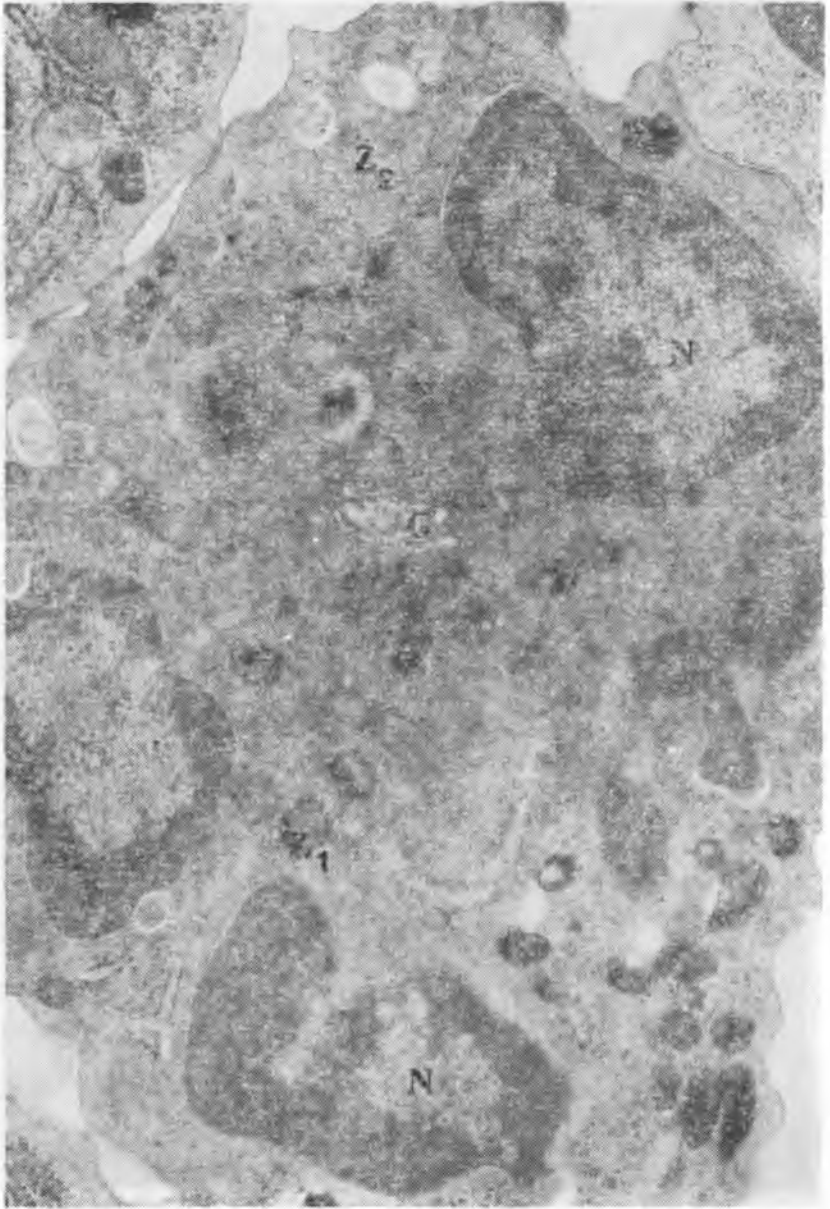
Ryc. 2



Ryc. 3



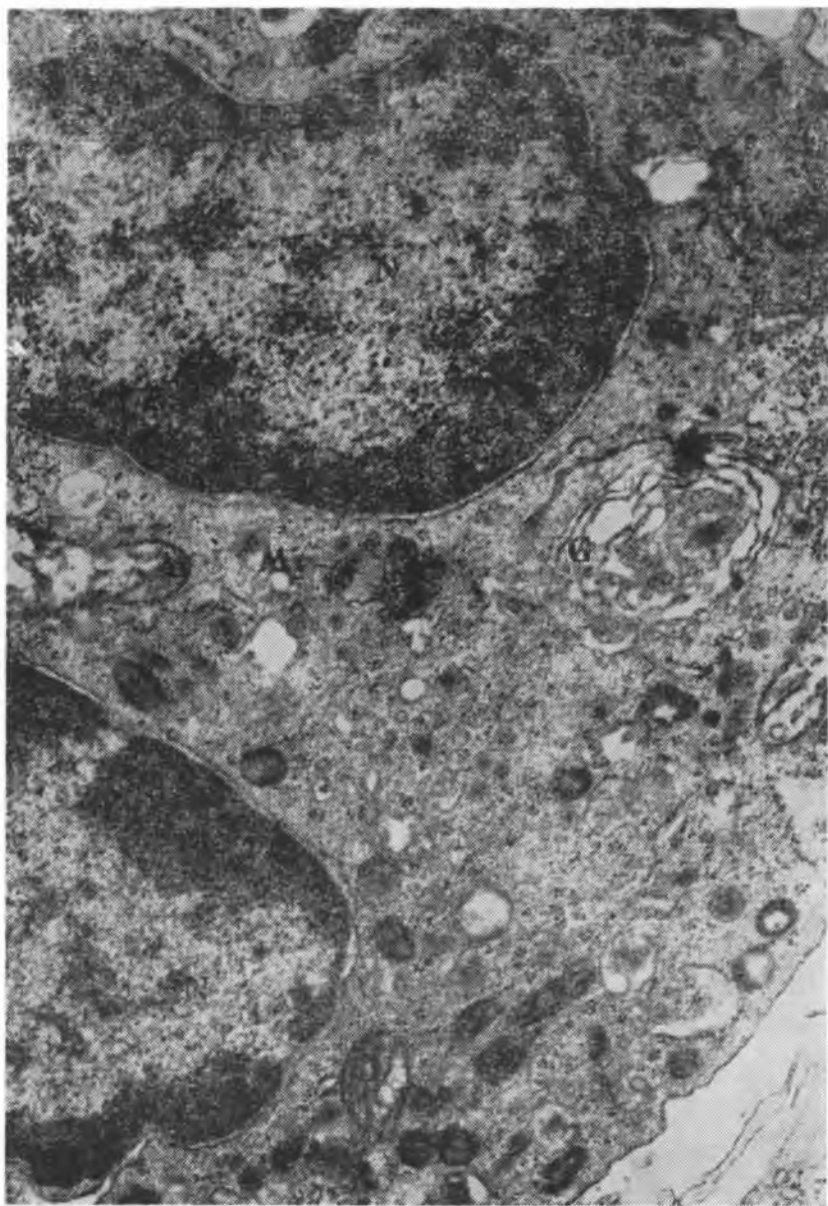
Ryc. 4



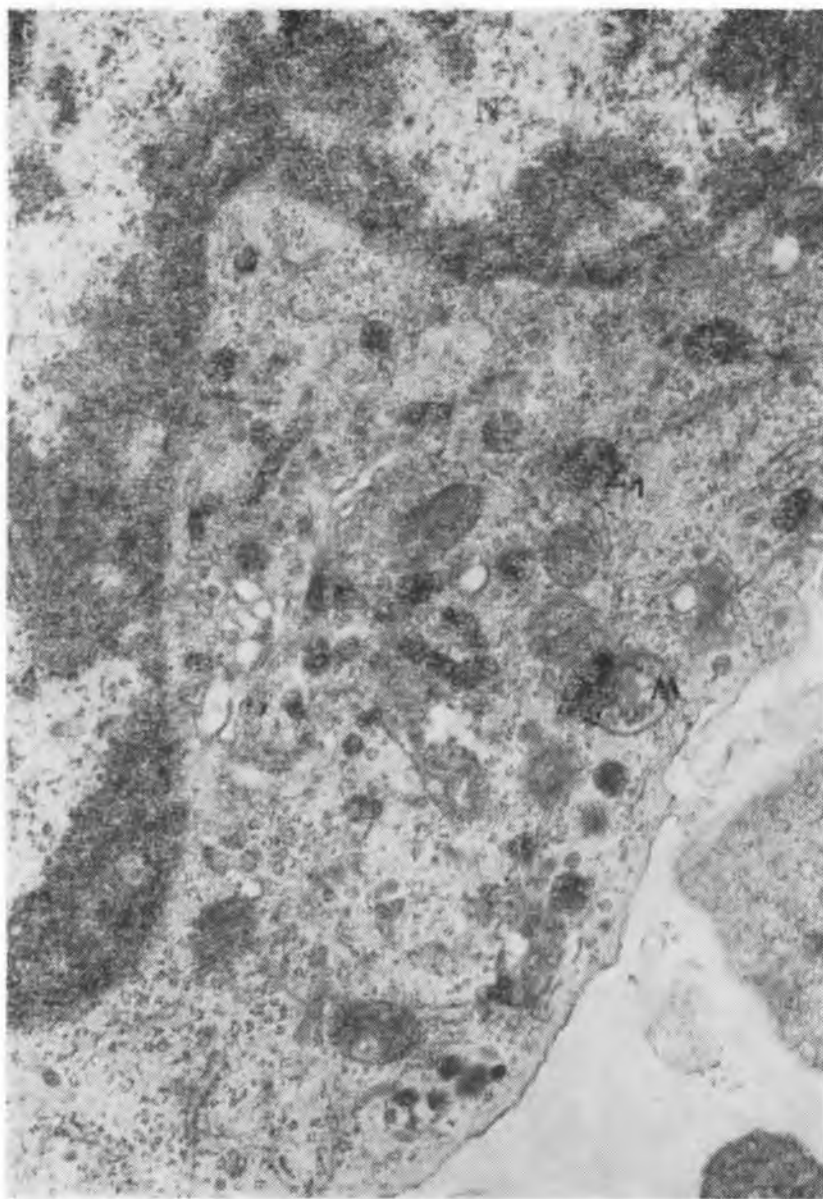
Ryc 5



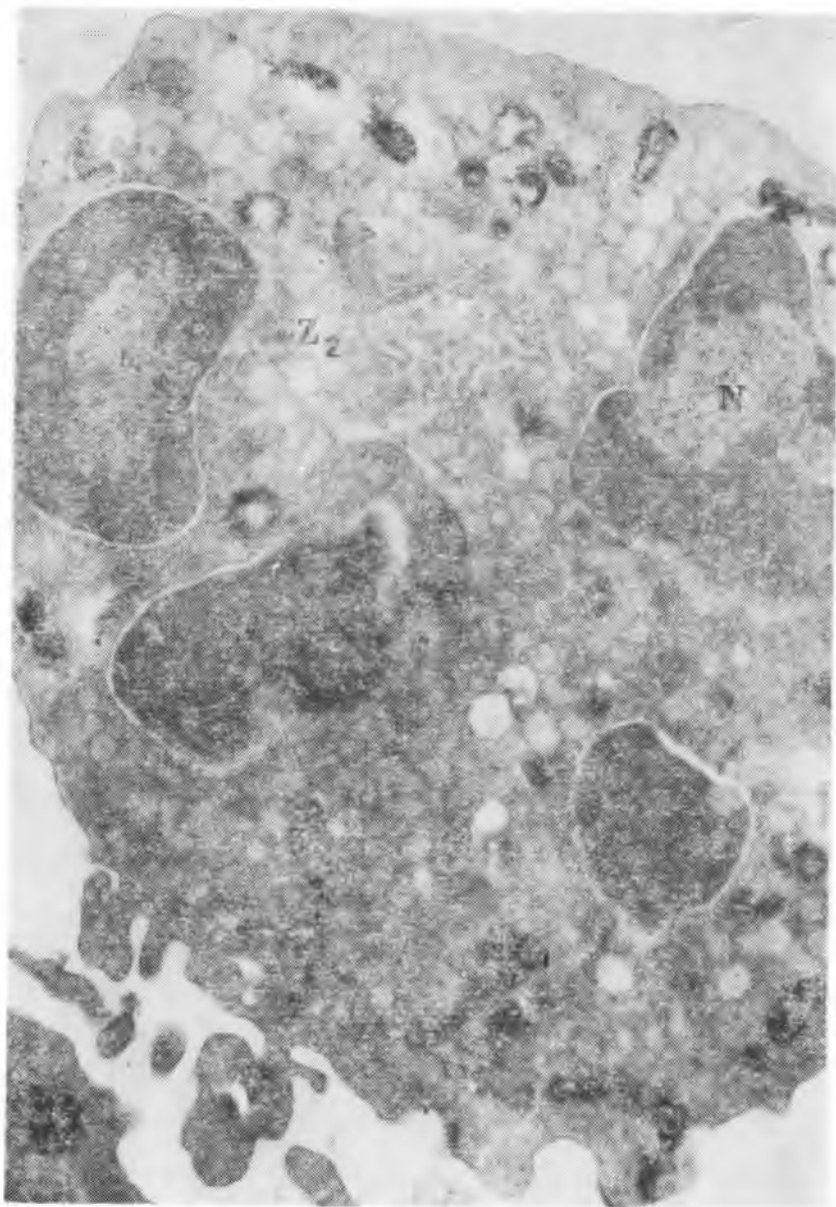
Ryc. 6



Ryc. 7



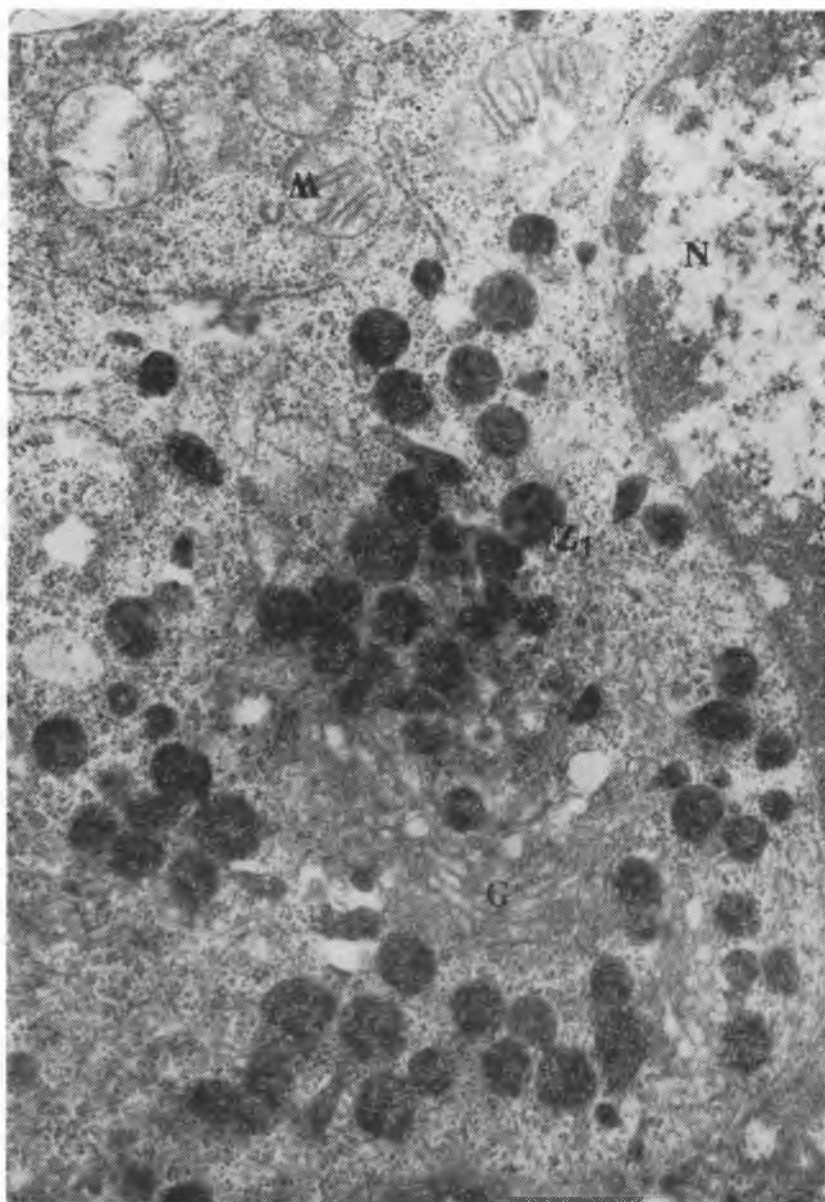
Ryc. 8



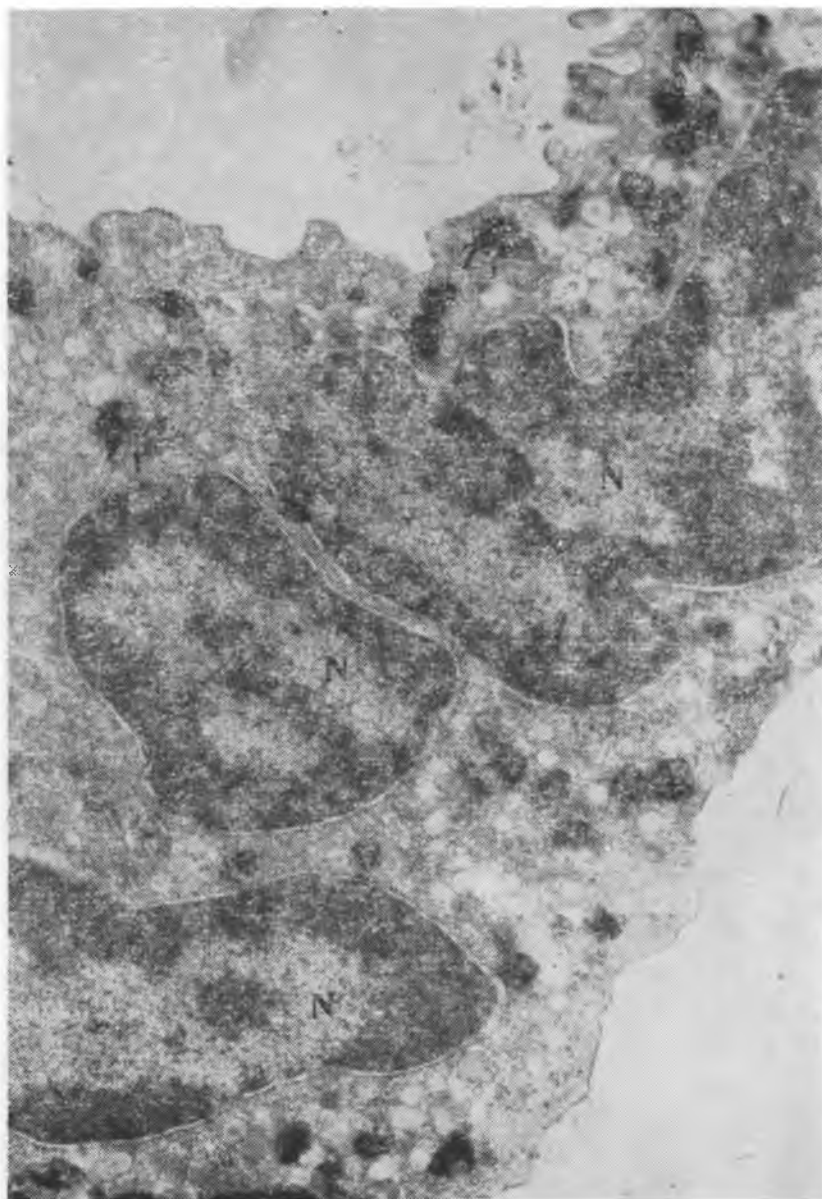
Ryc. 9



Ryc. 10



Ryc. 11



Ryc. 12

cytów, które są jej magazynem oraz w elementach komórkowych zaangażowanych w jej wytwarzanie, takich jak: siatka śródplazmatyczna, otoczka jądrowa i struktury Golgiego. Część ziarnistości posiadała produkt reakcji z DAB jedynie na obwodzie, co także było dowodem na obniżoną w porównaniu z normą ilość enzymu. Ponadto spotykano komórki zawierające znacznie mniejszą niż w kontroli ilość ziarnistości I-rzędowych. Tego rodzaju zmiany dotyczyły głównie promielocytów jako form, w których zachodzi synteza ziarnistości I-rzędowych.

W odniesieniu do ziarnistości II-rzędowych, nie zawierających mieloperoksydazy i syntetyzowanych w stadium mielocyту, wykazano wyraźne zmniejszenie ich ilości, co może świadczyć o zaburzeniu syntezy nie tylko mieloperoksydazy, ale i innych białek enzymatycznych, występujących zwykle w ziarnistościach II-rzędowych. Stwierdzono również działanie karbarylu na błony komórkowe i błoniaste struktury wewnątrzkomórkowe. Przejawiało się ono zwiększonym, wzajemnym przyleganiem komórek, a nawet częściowym uszkodzeniem i zmianą właściwości błon komórkowych. Wówczas w przestrzeniach międzykomórkowych widoczne były twory błoniaste lub mielinowe. Struktury mielinowe spotykano także w obrębie mitochondriów, siatki śródplazmatycznej i strefy Golgiego. Część mitochondriów wykazywała cechy obrzmienia. Zaznaczyć należy, że omówione zmiany miały ten sam charakter we wszystkich grupach doświadczalnych, niezależnie od zastosowanej dawki preparatu. Jej wysokość wpływała natomiast na stopień ich nasilenia, tzn. na natężenie zmian w obrębie komórki oraz na ilość komórek zmienionych.

W tym aspekcie stwierdzono, że najmniejsze dawki jednorazowe karbarylu nie powodowały istotnych zmian w rozwijających się komórkach granulocytów obojętnochłonnych szpiku szczura, pobranego po upływie 24 godz. od podania preparatu. W niektórych promielocytach obserwowano jedynie zmniejszenie ilości produktu reakcji z DAB w otoczce jądrowej, kanałach siatki śródplazmatycznej oraz strukturach Golgiego. Konsekwencją tego było prawdopodobnie zmniejszenie ilości mieloperoksydazy w ziarnistościach I-rzędowych i charakterystyczna w takich przypadkach obwodowa lokalizacja produktu reakcji z DAB w obrębie ziaren. Ilość ziarnistości I-rzędowych nie wykazywała istotnych odchyleń od normy, zaś ilość ziarnistości II-rzędowych w mielocytach i metamielocytach wydawała się nieco mniejsza niż w komórkach grupy kontrolnej. Nie stwierdzono w tej grupie zmian w budowie organelli komórkowych oraz zaburzeń w strukturze błon komórkowych.

Po zastosowaniu wyższych jednorazowych dawek preparatu, tj. 0,5 DL₅₀ i DL₅₀, a także po 30-krotnym podaniu karbarylu w dawce 0,05 DL₅₀, zmiany były bardziej nasilone. Poza wyżej wymienionymi dotyczyły one obniżenia ilości ziarnistości I- i II-rzędowych oraz zaburzeń

w strukturze błon komórkowych i systemów błoniastych wewnątrzkomórkowych.

Analizując uzyskane wyniki, należy wziąć pod uwagę, że komórki szpiku szybko przechodzą z jednego stadium rozwojowego w następne. Wyniki badań izotopowych (2) co do czasu życia poszczególnych form rozwojowych neutrofili pozwalają sądzić, że jeśli bodziec toksyczny zadziałał na komórkę w stadium promielocyta, to po 3 dniach tenże promielocyt obserwowany już będzie w stadium mielocyta. Po 7 i 10 dniach ulegnie on przekształceniu w metamielocyt lub granulocyt o jądrze płotowatym, a po 14 dniach wspomniany wyżej promielocyt powinien już jako dojrzały granulocyt przejść do krążenia obwodowego. W związku z tym obserwacje dotyczyć będą nowej generacji komórek.

W badaniach wykazano, że w przypadku jednorazowej dawki karbarylu — 0,2 DL₅₀ zdecydowana większość komórek badanego szeregu granulocytarnego miała budowę prawidłową po 7 dniach od czasu podania preparatu. Po upływie 3 dni w szpiku zwierząt doświadczalnych można było obserwować jeszcze promielocyty odbiegające od normy, tzn. wykazujące zmniejszenie ilości produktu reakcji z DAB w strukturach biorących udział w syntezie białka (ryc. 1). Mielocyty i metamielocyty były również zmienione i posiadały mniejszą niż w kontroli ilość ziarnistości II-rzędowych (ryc. 2). Komórki dojrzałe zawierały prawidłową ilość ziarnistości I-rzędowych, równomiernie peroksydazododatnich.

Wydaje się zatem, że promielocyty, które wykazywały osłabienie syntezy mieloperoksydazy i, co się z tym wiąże, mniejszą ilość produktu reakcji z DAB w obrębie ziaren, nie zdołały się jeszcze przekształcić w formy dojrzałe. Zmniejszona ilość ziarnistości I- i II-rzędowych w niektórych metamielocytach i dojrzewających granulocytach mogłaby wskazywać, że pochodzą one z mielocytów, które były narażone na działanie karbarylu.

Po 7 dniach wszystkie promielocyty (ryc. 3) i mielocyty (ryc. 4) wykazywały budowę nie zmienioną oraz prawidłową ilość produktu reakcji z DAB w strukturach komórkowych i ziarnistościach I-rzędowych, a także prawidłową ilość ziarnistości obu typów. Niektóre komórki dojrzałe wykazywały mniejszą zawartość ziarnistości II-rzędowych oraz zmienione ziarnistości I-rzędowe (ryc. 5). Naszym zdaniem, nieprawidłowości te nie były jednak bezpośrednią konsekwencją działania karbarylu na te właśnie komórki. Wynikały prawdopodobnie z tego, że te komórki dojrzałe pochodziły ze zmienionych w wyniku eksperymentu promielocytów i mielocytów. Dlatego też, mimo obecności niektórych zmienionych komórek dojrzałych, za okres cofania się zmian w tej grupie doświadczalnej przyjmujemy 7 dni. Uzasadniamy to przede wszystkim prawidłową budową młodych form rozwojowych.

Po jednorazowym podaniu karbarylu w dawkach 0,5 DL₅₀ i DL₅₀, submikroskopowy obraz komórek badanego szeregu rozwojowego granulocytów odpowiadał normie po upływie 14 dni od jego podania.

Po 3, 7, 10 dniach obserwowano jeszcze młode formy rozwojowe z morfologicznymi wykładnikami zaburzonej granulogenezy (ryc. 6, 7, 8). Także ilość ziarnistości cytoplazmatycznych w komórkach była obniżona (ryc. 6, 7). Obraz mitochondriów, które po 24 godz. od podania preparatu wykazywały cechy obrzmienia, wracał już po upływie 3 dni do normy. Struktury mielinowe, choć w ilości znacznie mniejszej jak to obserwowano po 24 godz., spotykano jeszcze zarówno po 3 dniach (ryc. 6), jak i po 7 (ryc. 7) oraz 10 (ryc. 8). Po 14 dniach nie stwierdzano już obecności tych struktur oraz nie obserwowano zaburzeń w granulogenezie i w ilości ziarnistości cytoplazmatycznych w komórkach szeregu rozwojowego od mieloblasta począwszy do mielocyta — co przyjęto za kryterium cofania się zmian. Większość komórek dojrzałych miała budowę prawidłową (ryc. 9). Jedyne nieliczne dojrzałe granulocyty obojętnochłonne były zmienione (ryc. 10). Sądzymy jednak, że podobnie jak w przypadku dawki 0,2 DL₅₀, pochodziły one z tych najmłodszych form rozwojowych, które jako takie uległy uszkodzeniu pod wpływem działania karbarylu. Zgodnie z tym dla jednorazowych dawek karbarylu — 0,5 DL₅₀ i DL₅₀ czas cofania się zmian określono na 14 dni od chwili podania preparatu.

Określając czas cofania się zmian, nie wykazaliśmy istotnych różnic między jednorazowym podaniem wyższej dawki (0,5 DL₅₀ czy DL₅₀) a 30-krotnym podaniem dawki mniejszej (0,05 DL₅₀), co obrazują ryc. 11 i 12. W tym ostatnim przypadku czas ten określono również na 14 dni.

Na podstawie danych z piśmiennictwa (2) wiadomo, że czas powstawania dojrzałych granulocytów obojętnochłonnych z mieloblastów znakowanych ³H-tymidyną wynosi ok. 12—13 dni. W związku z tym w czasie 30-krotnego podawania karbarylu dwie pule rozwijających się komórek opuszczają szpik i dostają się do krwiobiegu. Pobierając materiał po 3 dniach od podania ostatniej dawki obserwowane są więc komórki, które jedynie przez okres 4—6 dni w czasie swojego rozwoju narażone były na działanie preparatu. Po 14 dniach analizujemy już zupełnie nową generację, która w okresie przemian rozwojowych i dojrzewania nie znajdowała się pod jego wpływem.

Ponieważ w komórkach szeregu rozwojowego po upływie 14 dni nie stwierdzono odchyżeń od normy, można na tej podstawie wnioskować, że karbaryl nie uszkadza komórek zapasowych, a działa jedynie na komórki rozwijające się.

Wnioski

1. Przy jednorazowych podaniach karbarylu stwierdzono zależność między wysokością dawki a czasem cofania się zmian w rozwijających się komórkach szeregu granulocytów obojętnochłonnych szpiku szczura.

2. Czas cofania się zmian dla dawki 0,2 DL₅₀ określono na 7 dni, a dla dawek 0,5 DL₅₀ i DL₅₀ na 14 dni od momentu podania preparatu.

3. Nie stwierdzono różnic w szybkości cofania się zmian spowodowanych wysokimi dawkami jednorazowymi (0,5 DL₅₀ i DL₅₀) a 30-krotnymi dawkami małymi (0,05 DL₅₀).

4. Czas cofania się zmian dla 30-krotnej dawki 0,05 DL₅₀ określono na 14 dni od podania preparatu.

5. Na podstawie uzyskanych informacji można sądzić, że karbaryl powoduje zmiany w rozwijających się komórkach szeregu rozwojowego granulocytów obojętnochłonnych, natomiast nie wywiera wpływu na komórki zapasowe.

PIŚMIENNICTWO

1. Halliop J. i wsp.: Ocena charakteru zmian rozwijających się granulocytów obojętnochłonnych szpiku szczura białego w zatruciu karbarylem. Część I. Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, Lublin, Sectio D 39, 141, 1984.
2. Pawełski S., Konopka L., Rechowicz K.: Diagnostyka izotopowa w hematologii. PZWL, Warszawa 1972.
3. Szucki B. i wsp.: Chemiczne środki ochrony roślin. PWRiL, Warszawa 1978.
4. Tochman A. i wsp.: Badania nad wpływem karbofuranu na rozwój granulocytów obojętnochłonnych szczura. Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, Lublin, Sectio D 40, 1985.
5. White - Stevens R.: Pestycydy w środowisku. PWRiL, Warszawa 1977.

Otrzymano 17 X 1983.

OBJAŚNIENIA RYCIŃ

Ryc. 1. Promielocyt. 3 dni po podaniu 1×0,2 DL₅₀ karbarylu. Reakcja z DAB. Pow. ok. 25 000×.

Ryc. 2. Mielocyt. 3 dni po podaniu 1×0,2 DL₅₀ karbarylu. Reakcja z DAB. Pow. ok. 25 000×.

Ryc. 3. Promielocyt. 7 dni po podaniu 1×0,2 DL₅₀ karbarylu. Reakcja z DAB. Pow. ok. 25 000×.

Ryc. 4. Mielocyt. 7 dni po podaniu 1×0,2 DL₅₀ karbarylu. Reakcja z DAB. Pow. ok. 25 000×.

Ryc. 5. Dojrzały granulocyt. 7 dni po podaniu 1×0,2 DL₅₀ karbarylu. Reakcja z DAB. Pow. ok. 25 000×.

Ryc. 6. Promielocyt. 3 dni po podaniu 1×0,5 DL₅₀ karbarylu. Reakcja z DAB. Pow. ok. 25 000×.

Ryc. 7. Promielocyt. 7 dni po podaniu $1 \times DL_{50}$ karbarylu. Reakcja z DAB. Pow. ok. 25 000 \times .

Ryc. 8. Promielocyt. 10 dni po podaniu $1 \times DL_{50}$ karbarylu. Reakcja z DAB. Pow. ok. 25 000 \times .

Ryc. 9. Dojrzały granulocyt. 14 dni po podaniu $1 \times DL_{50}$ karbarylu. Reakcja z DAB. Pow. ok. 25 000 \times .

Ryc. 10. Dojrzały granulocyt. 14 dni po podaniu $1 \times DL_{50}$ karbarylu. Reakcja z DAB. Pow. ok. 25 000 \times .

Ryc. 11. Promielocyt. 14 dni po podaniu $30 \times 0,05 DL_{50}$ karbarylu. Reakcja z DAB. Pow. ok. 25 000 \times .

Ryc. 12. Dojrzały granulocyt. 14 dni po podaniu $30 \times 0,05 DL_{50}$ karbarylu. Reakcja z DAB. Pow. ok. 25 000 \times .

OBJAŚNIENIA SYMBOLI

ER — retikulum endoplazmatyczne

G — struktury Golgiego

M — mitochondria

My — struktury mielinowe

N — jądro komórkowe

Z₁ — ziarnistości I-rzędowe

Z₂ — ziarnistości II-rzędowe

РЕЗЮМЕ

Работа выполнялась с целью определения времени исчезновения изменений, вызванных действием карбарыла на клетки генетического ряда нейтрофильных гранулоцитов костного мозга крысы. Установлено, что время исчезновения изменений при дозе $1 \times 0,2 LD_{50}$ составляло 7 дней, при дозе $1 \times 0,5 LD_{50}$, $1 \times LD_{50}$ и $30 \times 0,05 LD_{50}$ — 14 дней от времени введения препарата. Кроме этого установлено, что применяемый инсектицид действует только на развивающиеся клетки исследуемого генетического ряда, а материнских клеток не повреждает.

SUMMARY

The aim of this paper was to determine the retraction time of the changes caused by carbaryl influence on developing cells of the neutrophil series of the bone marrow of the rat. It has been shown that the time of recovery at the dose of $1 \times 0.2 DL_{50}$ is 7 days, at the dose of $1 \times 0.5 DL_{50}$, $1 \times DL_{50}$, and $30 \times 0.05 DL_{50}$ — 14 days after carbaryl administration. Moreover, it has been stated that the applied insecticide influence only the developing cells of the developmental investigated series, it does not however damage the stem cells.

EXPLANATIONS TO FIGURES

Fig. 1. Promyelocyte. 3 days after $1 \times 0.2 DL_{50}$ carbaryl administration. Reaction with DAB. Magn. ca 25,000 \times .

Fig. 2. Myelocyte. 3 days after $1 \times 0.2 DL_{50}$ carbaryl administration. Reaction with DAB. Magn. ca 25,000 \times .

Fig. 3. Promyelocyte. 7 days after 1×0.2 DL_{50} karbaryl administration. Reaction with DAB. Magn. ca 25,000 \times .

Fig. 4. Myelocyte. 7 days after 1×0.2 DL_{50} karbaryl administration. Reaction with DAB. Magn. ca 25,000 \times .

Fig. 5. Mature granulocyte. 7 days after 1×0.2 DL_{50} karbaryl administration. Reaction with DAB. Magn. ca 25,000 \times .

Fig. 6. Promyelocyte. 3 days after 1×0.5 DL_{50} karbaryl administration. Reaction with DAB. Magn. ca 25,000 \times .

Fig. 7. Promyelocyte. 7 days after $1 \times DL_{50}$ karbaryl administration. Reaction with DAB. Magn. ca 25,000 \times .

Fig. 8. Promyelocyte. 10 days after $1 \times DL_{50}$ karbaryl administration. Reaction with DAB. Magn. ca 25,000 \times .

Fig. 9. Mature granulocyte. 14 days after $1 \times DL_{50}$ karbaryl administration. Reaction with DAB. Magn. ca 25,000 \times .

Fig. 10. Mature granulocyte. 14 days after $1 \times DL_{50}$ karbaryl administration. Reaction with DAB. Magn. ca 25,000 \times .

Fig. 11. Promyelocyte. 14 days after 30×0.05 DL_{50} karbaryl administration. Reaction with DAB. Magn. ca 25,000 \times .

Fig. 12. Mature granulocyte. 14 days after 30×0.05 DL_{50} karbaryl administration. Reaction with DAB. Magn. ca 25,000 \times .

EXPLANATIONS TO SYMBOLS

ER — endoplasmic reticulum
G — Golgi complex
M — mitochondria

My — myelin structures
N — nucleus
 Z_1 — primary granules
 Z_2 — secondary granules