

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

Alina TOCHMAN, Maciej LATALSKI,
Daniela OBUCHOWSKA, Janina HALLIOP

**Badania nad wpływem karbofuranu na rozwój granulocytów
obojętnochłonnych szczura**

Изучение влияния карбофурана на развитие нейтрофильных
лейкоцитов крысы

Studies on Carbofuran Effect on the Development of Neutrophils in Rats

Wiele spośród środków chemicznej ochrony roślin, mimo niskiej toksyczności, posiada negatywny wpływ na narządy i tkanki. Należy do nich między innymi karbofuran z grupy insektycydów karbaminianowych. Mechanizm toksycznego działania związków tej grupy polega na hamowaniu esterazy cholinowej, z którą jednak, w odróżnieniu od związków fosforoorganicznych, nie tworzą stałych kompleksów. Jednocześnie, z uwagi na duże podobieństwo ich budowy chemicznej do acetylocholin, mogą wywierać bezpośredni wpływ na układ nerwowy (1). Stwierdzono toksyczny wpływ preparatów tej grupy, np. karbarylu, na niektóre narządy, takie jak: wątroba, nerka, gonady (2). Karbaryl był również oceniany w naszych eksperymentach w aspekcie jego działania na komórki szpiku kostnego. W czasie kontynuacji badań nad wpływem insektycydów karbaminianowych na szpik kostny, interesujące wydało się prześledzenie wpływu karbofuranu na tę tkankę, tym bardziej że w porównaniu z karbarylem jest on ok. 100× bardziej toksyczny.

MATERIAŁ I METODYKA BADAŃ

Badania przeprowadzono na szczurach białych, samicach, hodowli własnej, o c.c. 150—200 g. Wśród zwierząt wyodrębniono grupę kontrolną oraz 5 grup doświadczalnych, po 15 szczurów w każdej. Zwierzętom doświadczalnym podawano sondą, dożołądkowo, wodny roztwór karbofuranu, zaś zwierzętom kontrolnym —

wodę destylowaną w ilości odpowiadającej objętościowo roztworowi karbofuranu, który otrzymywały zwierzęta doświadczalne. Wskaźnik ostrej toksyczności — DL_{50} dla karbofuranu wynosi 14 mg/kg c.c. (1).

Zwierzęta doświadczalne otrzymywały następujące dawki preparatu:

grupa I doświadczalna — jednorazowa dawka karbofuranu w wysokości równej 0,1 DL_{50} ;

grupa II doświadczalna — jednorazowo w wysokości równej 0,5 DL_{50} ;

grupa III doświadczalna — jednorazowo w wysokości równej DL_{50} ;

grupa IV doświadczalna — 0,025 DL_{50} karbofuranu w ciągu 30 dni;

grupa V doświadczalna — 0,05 DL_{50} w ciągu 30 dni.

Szpik z kości udowych pobierano w narkozie eterowej od szczurów kontrolnych po upływie 24 godz. od momentu podania wody destylowanej, zaś od szczurów doświadczalnych — po upływie 24 godz. od chwili podania ostatniej dawki karbofuranu. Prowadzono badania morfologiczne i histochemiczne, wykonując reakcję z dwuamino-benzydyną (DAB), na obecność mieloperoksydazy.

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

Szpik do badań cytochemicznych utrwalano w 1,5% zbuforowanym roztworze aldehydu glutarowego. Następnie wykonywano reakcję z dwuamino-benzydyną (DAB), inkubując materiał w ciągu 60 min. przy $pH=7,0$ w temp. $+37^{\circ}$. Po inkubacji szpik dotrwalano w 1% OsO_4 , 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 kontrolna

Mieloblasty i wczesne promielocyty posiadały jądra komórkowe o regularnych obrysach i drobnoziarnistej, równomiernie rozmieszczonej, chromatynie, które to cechy charakteryzują młode, niezróżnicowane komórki. Cytoplazma była uboga w organella komórkowe. Spotykano nieliczne przekroje siatki śródplazmatycznej oraz pojedyncze mitochondria. Odczyn na mieloperoksydazę był wyraźny i występował w otoczce jądrowej oraz kanałach siatki śródplazmatycznej (ryc. 1).

W miarę dojrzewania komórek rosła w nich ilość mitochondriów oraz cystern śródplazmatycznych wypełnionych ciemnymi strąkami produktu reakcji z DAB. Poza tym w cytoplazmie późnych promielocytów obecna była duża ilość peroksydazododatnich ziarnistości I-rzędowych zwykle o kształcie okrągłym, różnej wielkości, otoczonych pojedynczą błoną. We wczesnych promielocytach ziarnistości te występowały sporadycznie (ryc. 1). Dojrzałe promielocyty zawierały również dobrze rozwinięte, typowo zbudowane, struktury Golgiego, zawierające produkt reakcji z DAB. W

kolejnym stadium rozwojowym granulocyta obojętnochłonnego — w mielocycie jądra miały najczęściej kształt nieregularny, a chromatyna tworzyła skupienia przylegające do wewnętrznej otoczki błony jądrowej. W cytoplazmie, obok struktur obecnych w promielocytach, pojawił się drugi rodzaj ziarnistości granulocytów obojętnochłonnych — ziarnistości II-rzędowe, nie zawierające mieloperoksydazy (ryc. 2). Produkt reakcji z DAB obecny był w tych komórkach jedynie w obrębie ziaren I-rzędowych (ryc. 2).

Podobny obraz przedstawiały metamielocyty, jednak jądra ich miały, charakterystyczny dla tego stadium, pierścieniowaty kształt i duże brzeżne skupienia chromatyny. Cytoplazma tych komórek zawierała dużą ilość peroksydazododatnich ziarnistości I-rzędowych oraz nie zawierające mieloperoksydazy ziarnistości II-rzędowe.

Dojrzałe neutrofile charakteryzowała obecność wielopłatowego jądra komórkowego, o zbitej chromatynie i bardzo mała ilość organelli komórkowych, trudnych często do identyfikacji z powodu dużego nagromadzenia ziarnistości cytoplazmatycznych. Wśród tych ostatnich występowały peroksydazododatnie ziarna I-rzędowe oraz nie zawierające mieloperoksydazy ziarna II-rzędowe.

Grupa I doświadczalna — 0,1 DL₅₀

Wszystkie formy rozwojowe granulocytów obojętnochłonnych szpiku szczurów, które otrzymały jednorazową dawkę karbofuranu w wysokości 0,1 DL₅₀, nie wykazywały odchyień od normy. Dotyczyło to zarówno ich budowy submikroskopowej jak i aktywności oraz rozmieszczenia mieloperoksydazy.

Grupa II doświadczalna — 0,5 DL₅₀

Po wprowadzeniu do organizmu zwierząt karbofuranu w dawce 0,5 DL₅₀ stwierdzono w komórkach rozwijających się granulocytów obojętnochłonnych pewne odchylenia od stanu prawidłowego tylko we wczesnych formach rozwojowych.

Przy zachowanej nie zmienionej budowie wszystkich organelli komórkowych mieloblasty wykazywały zmniejszenie ilości produktu reakcji z DAB w siatce śródplazmatycznej, a promielocyty — we wszystkich strukturach biorących udział w syntezie białka oraz w ziarnistościach I-rzędowych. Zmniejszeniu ilości produktu reakcji z DAB w ziarnistościach I-rzędowych promielocytów towarzyszyło nierównomierne jego rozmieszczenie w obrębie ziaren. Najczęściej odczyn występował w obwodowej strefie ziaren (ryc. 3).

Ponadto ilość omawianych ziarnistości w promielocytach była w porównaniu z materiałem kontrolnym obniżona. Większość mielocytów nie wykazywała odchyień od normy. Nieliczne tylko posiadały mniejszą ilość ziarnistości II-rzędowych. Metamielocyty i dojrzałe granulocyty były prawidłowe.

Grupa III doświadczalna — DL_{50}

Obraz dojrzewających neutrofilii szpiku tej grupy wskazywał na ten sam charakter zmian co w grupie poprzedniej. W wielu komórkach były one jednak bardziej nasilone. Tak więc w dalszym ciągu obserwowano osłabienie reakcji na mieloperoksydazę w kanałach siatki śródplazmatycznej, strefie Golgiego i w ziarnistościach I-rzędowych we wczesnych stadiach rozwojowych (ryc. 4). Zmniejszeniu uległa także ilość ziarnistości I-rzędowych w promielocytach i II-rzędowych w mielocytach (ryc. 5).

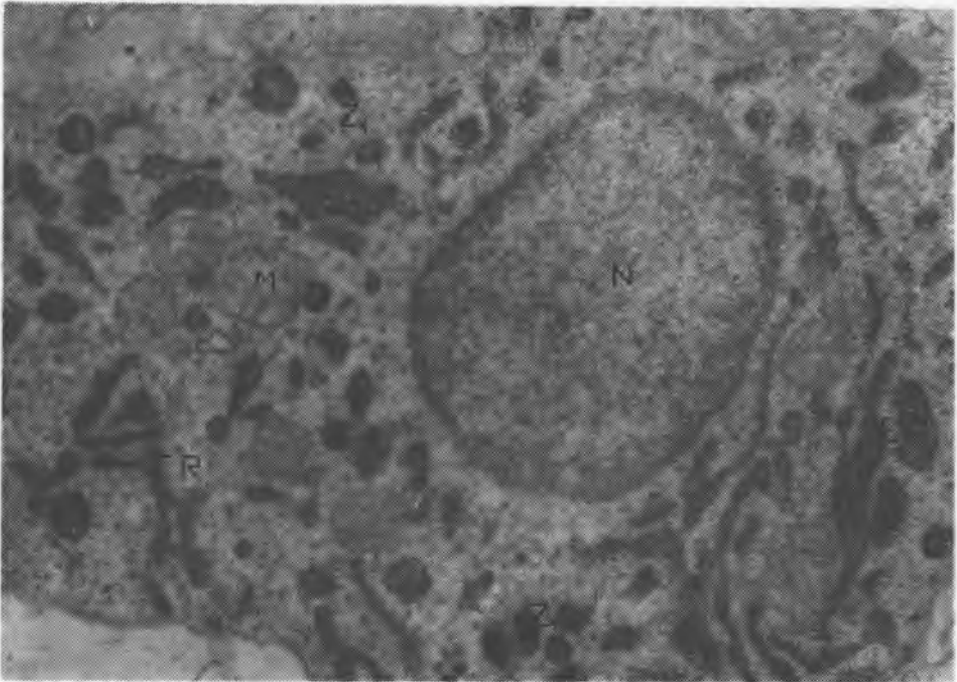
Grupa IV doświadczalna — $30 \times 0,025 DL_{50}$

W wyniku podostrego zatrucia karbofuranem w dawce $0,025 DL_{50}$ zdecydowana większość komórek posiadała budowę prawidłową. W komórkach tych nie odbiegała również od normy ilość ziarnistości cytoplazmatycznych obu typów, oraz rozmieszczenie mieloperoksydazy w ziarnistościach I-rzędowych. Spotykano jednakże pojedyncze komórki o zmienionym wyglądzie. Posiadały one mniej ziarnistości cytoplazmatycznych oraz mniej mieloperoksydazy, która zlokalizowana była na obwodzie ziaren I-rzędowych (ryc. 6). Niekiedy widoczne były młode formy rozwojowe ze słabszym odczynem na mieloperoksydazę w strukturach błoniastych komórki, zaangażowanych w syntezę białek enzymatycznych (ryc. 7).

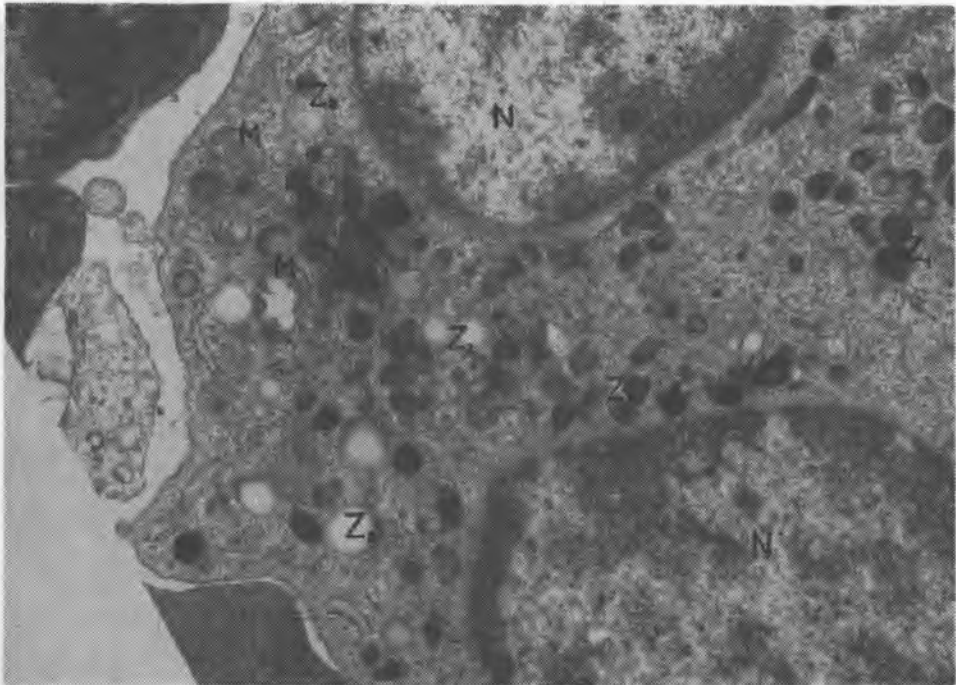
Grupa V doświadczalna — $30 \times 0,05 DL_{50}$

Po 30-krotnym podaniu karbofuranu w dawce $0,05 DL_{50}$ obserwowano zmiany dotyczące granulogenezy oraz ilości ziarnistości cytoplazmatycznych we wszystkich stadiach rozwojowych neutrofilii. Ponadto stwierdzono również zaburzenia w budowie niektórych organelli komórkowych. Promielocyty miały słabszy niż w warunkach fizjologicznych odczyn na mieloperoksydazę w strukturach błoniastych komórki (ryc. 8). Obserwowano zubożenie ziaren I-rzędowych w mieloperoksydazę w promielocytach (ryc. 9).

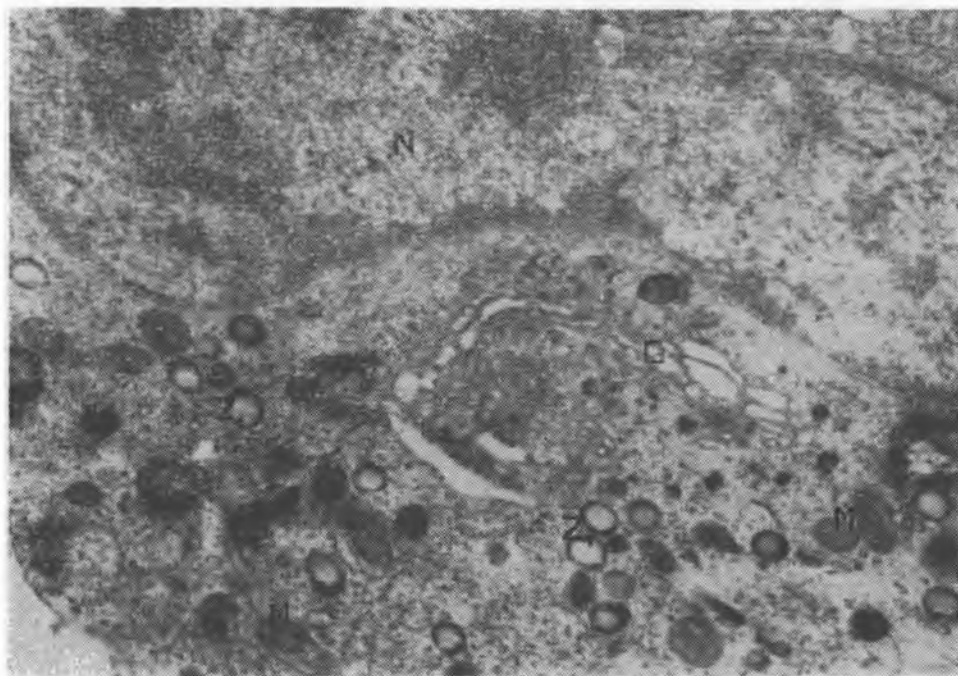
Ponadto jedynie w tej grupie doświadczalnej spotykano ziarnistości I-rzędowe nie zawierające produktu reakcji z DAB (ryc. 8) oraz obrzmiałe mitochondria. Stopień obrzmienia tych organelli był często znaczny,



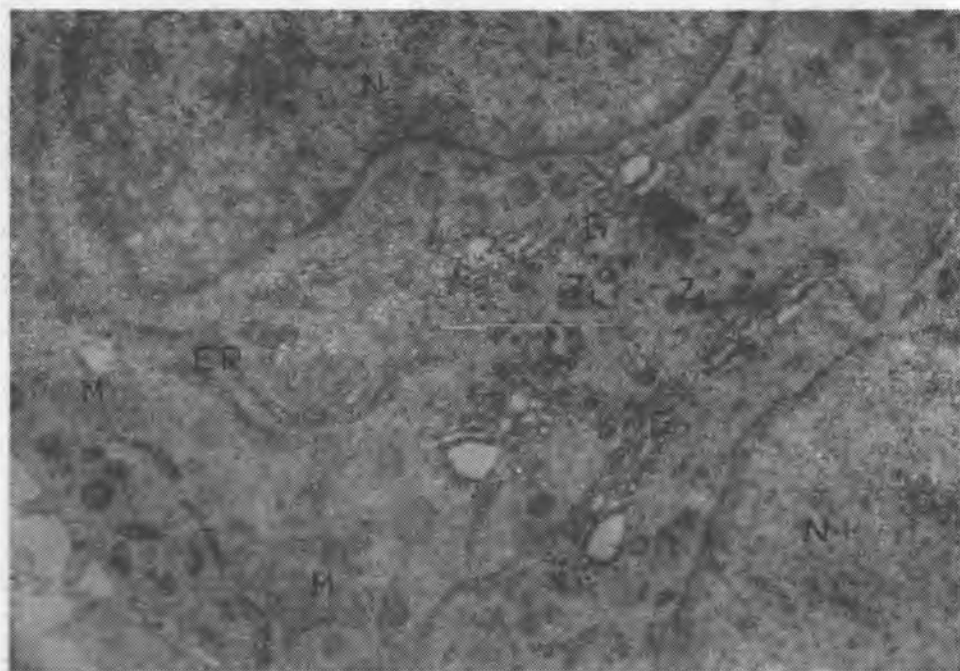
Ryc. 1



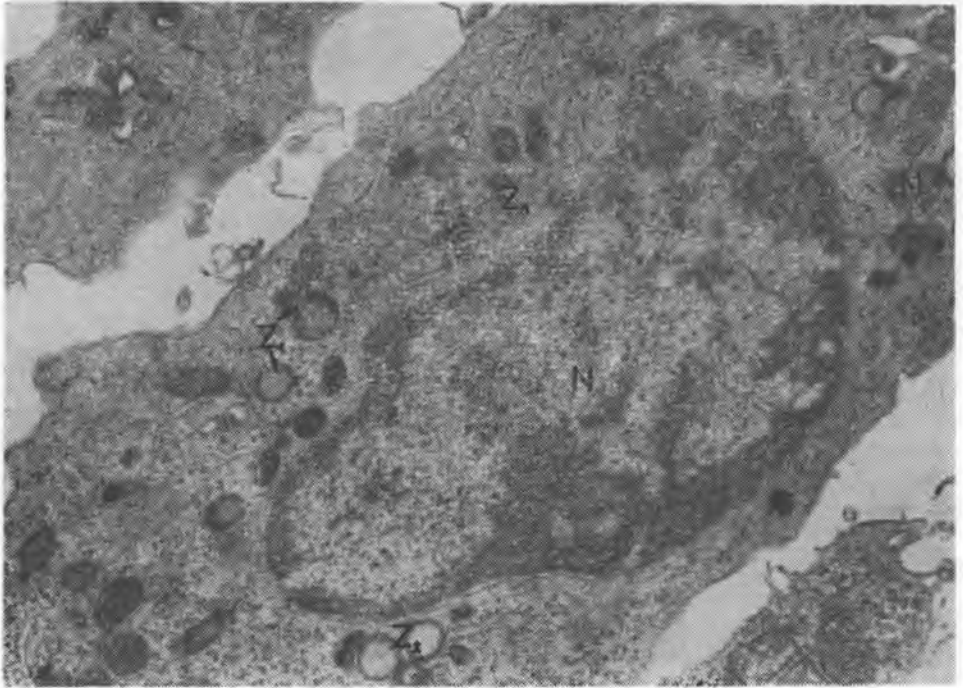
Ryc. 2



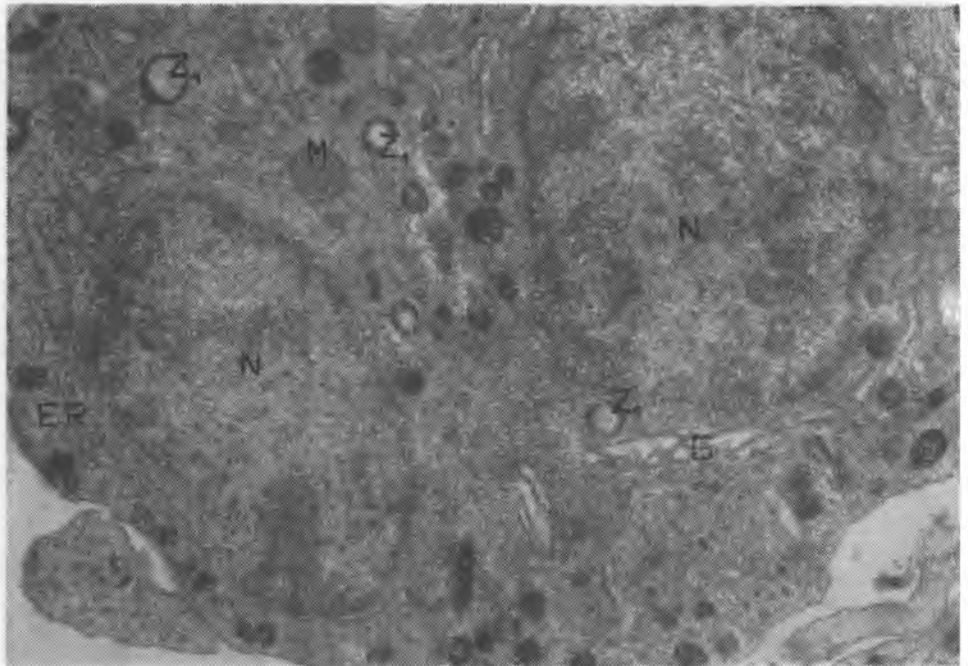
Ryc. 3



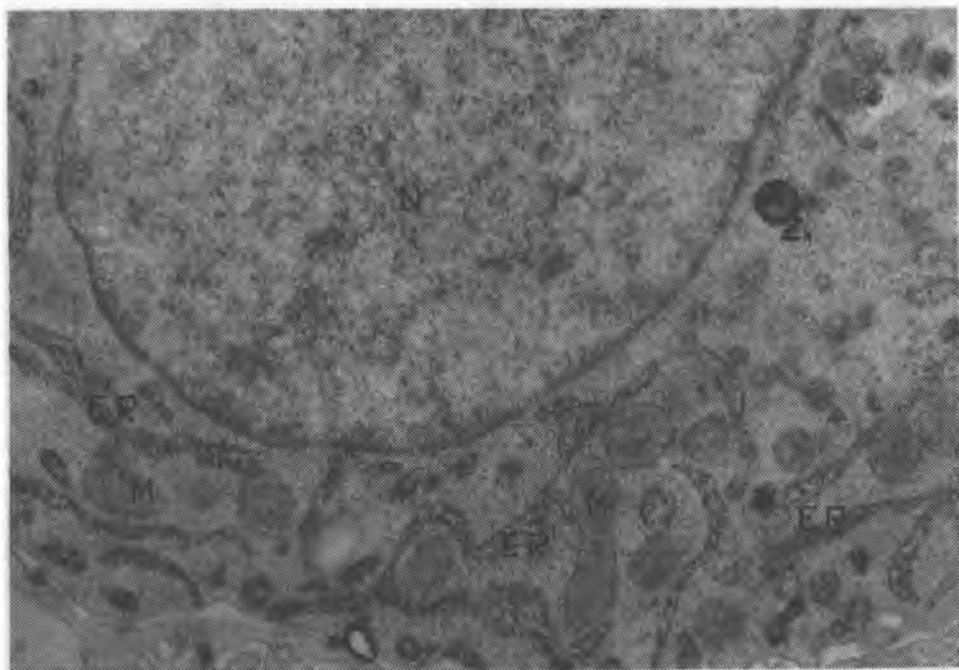
Ryc. 4



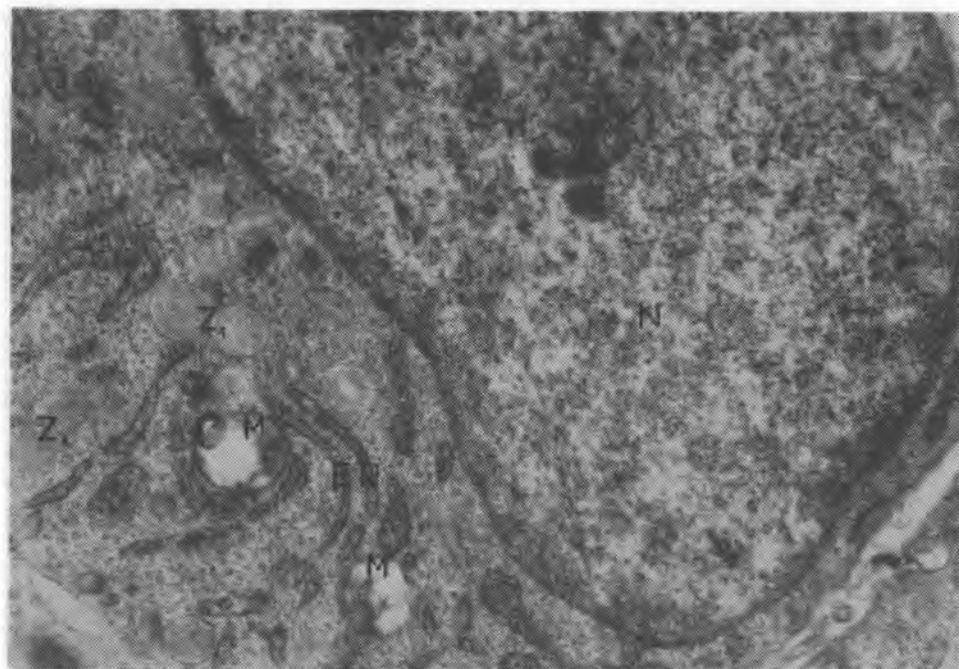
Ryc. 5



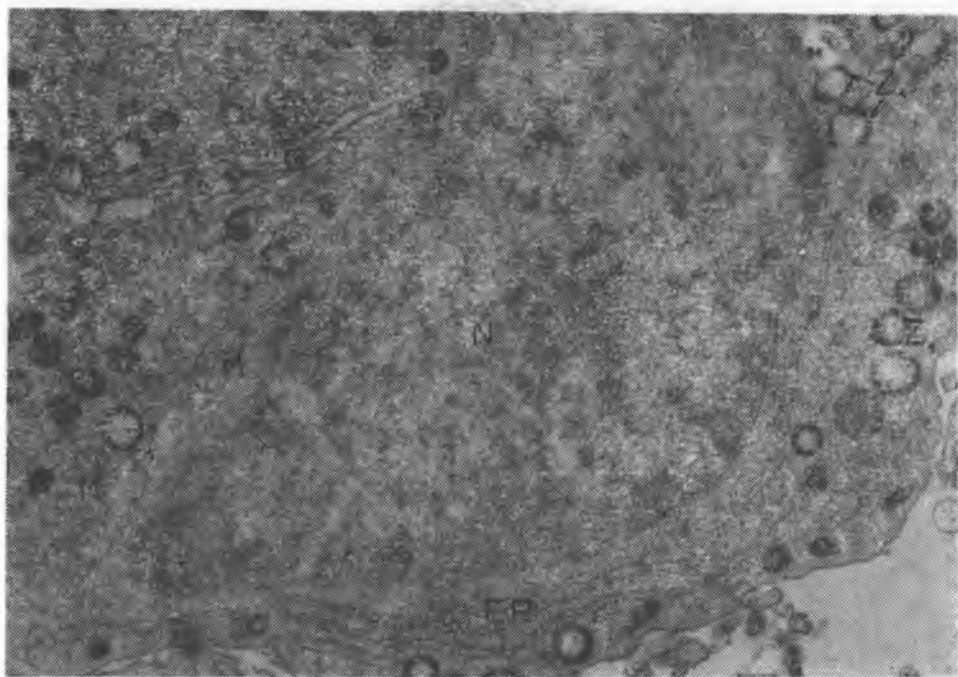
Ryc. 6



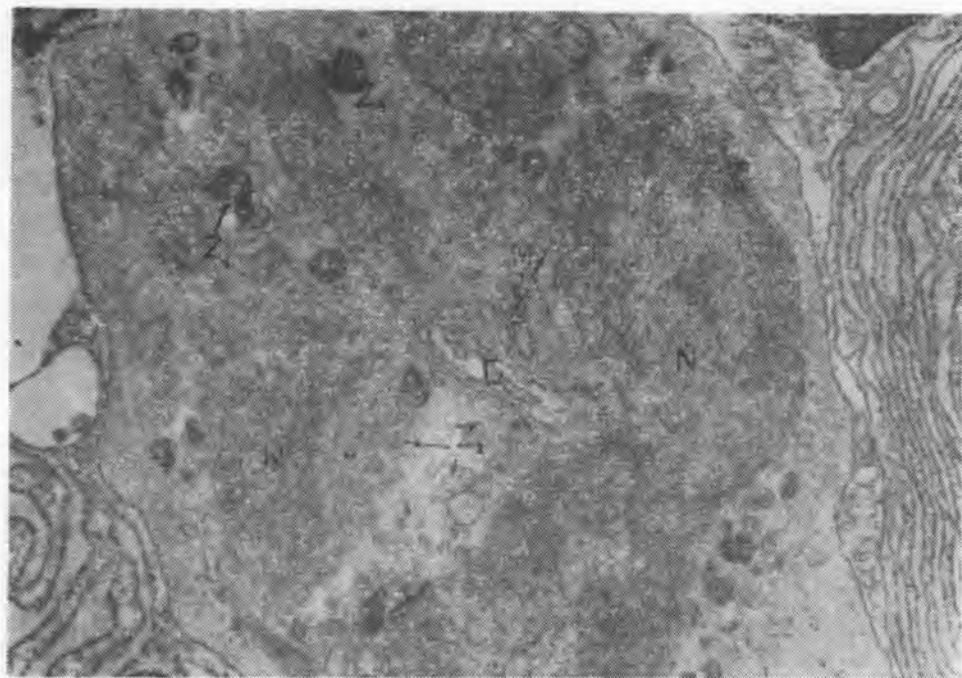
Ryc. 7



Ryc. 8



Ryc. 9



Ryc. 10

związany z całkowitym prawie zanikiem grzebieni (ryc. 8). Tylko w tej grupie doświadczalnej można było obserwować również obecność struktur mielinowych w obrębie mitochondriów (ryc. 8), stref Golgiego (ryc. 9, 10) oraz błon siatki śródplazmatycznej. Ilość ziarnistości I- i II-rzędowych w dojrzałych neutrofilach była mniejsza niż w grupach I—IV (ryc. 10).

OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ

Oprócz niewątpliwych korzyści, płynących ze stosowania środków ochrony roślin, stanowią one pewne zagrożenie dla ludzi zatrudnionych przy ich produkcji, magazynowaniu i dystrybucji oraz przy zabiegach agrotechnicznych. Stąd też badania zmierzające do poznania mechanizmu działania pestycydów na narządy i tkanki są w pełni uzasadnione.

Do środków tych należy między innymi duża grupa związków będących pochodnymi kwasu karbaminowego, a wśród nich — karbofuran. Wykazano, że mechanizm działania karbaminianów polega głównie na blokowaniu cholinesterazy, nie wyjaśniono jednak, czy to jedyna droga ich działania (2). Udowodniono toksyczny wpływ karbaminianów na narządy mięszkowe, takie jak wątroba i nerka (2). Inne tkanki, nie związane wprawdzie bezpośrednio z metabolizmem czy wydalaniem tych substancji, np. szpik kostny, wykazywały również zmiany morfologiczne w przypadku ostrych i podostrych eksperymentalnych zatruc herbicydami (3—6).

Podczas obecnych badań stwierdzono, że także karbofuran wywiera wpływ na niektóre komórki szpiku kostnego, zmieniając ich morfologię, dezorganizując granulogenezę i w ten sposób zaburzając ich funkcję. Zmiany te dotyczyły jedynie komórek szeregu rozwojowego granulocytów obojętnochłonnych, podczas gdy w granulocytach kwasochłonnych odchyień od normy nie obserwowano.

Szczególnie wnikliwie analizowano proces tworzenia ziarnistości w granulocytach obojętnochłonnych, czyli granulogenezę, z tego względu, że ziarnistości cytoplazmatyczne neutrofilii związane są ściśle z pełnioną przez te komórki funkcją obronną w organizmie (7, 8). Reakcja z DAB, świadcząca o obecności mieloperoksydazy, okazała się pomocna zarówno w ocenie granulogenezy w poszczególnych stadiach rozwojowych granulocytów obojętnochłonnych, a także w odróżnieniu ziarnistości I-rzędowych od II-rzędowych (9—11).

W zatruciach ostrych karbofuranem, podawanym w dawce $0,1 \text{ DL}_{50}$ i podostrych — $30 \times 0,025 \text{ DL}_{50}$ — nie stwierdzono zmian w granulogenezie w poszczególnych formach rozwojowych neutrofilii. Natomiast po dawce $0,5 \text{ DL}_{50}$ oraz DL_{50} w zatruciach ostrych i $30 \times 0,05 \text{ DL}_{50}$ w zatruciu

ciach podostrych obserwowano zmniejszenie ilości produktu reakcji z DAB w siatce śródplazmatycznej i strukturach Golgiego mieloblastów i promielocytów, a także w ziarnistościach I-rzędowych tych komórek. Jednocześnie obserwowano mniejszą niż w warunkach prawidłowych ilość ziaren I-rzędowych i II-rzędowych we wszystkich stadiach rozwojowych. Osłabienie syntezy mieloperoksydazy w komórkach, a także zmniejszenie ilości innych białek enzymatycznych, powoduje prawdopodobnie upośledzenie funkcji omawianych komórek.

Podstawową czynnością granulocytów obojętnochłonnych jest ich udział w procesach fagocytozy i trawienia wewnątrzkomórkowego (3). W procesach tych uczestniczą białka enzymatyczne zlokalizowane w ziarnistościach cytoplazmatycznych neutrofilii. Obniżenie więc poziomu tych białek odbija się prawdopodobnie ujemnie na funkcji komórek.

Zaburzeniom granulogenezy towarzyszyło niekiedy obrzmienie mitochondriów. Dotyczyło ono jednakże tylko nielicznych komórek i nieznacznej liczby mitochondriów w tych komórkach. Ważne jest ponadto zachowanie ciągłości błony zewnętrznej tych organelli, co przemawia za odwracalnym charakterem zmian. Struktury mielinowe również nie występowały często, dlatego nie ma podstaw do oceny stwierdzanych zmian, jako zmian wstecznych.

Na podstawie przeprowadzonych obserwacji można sądzić, że zarówno w zatruciach ostrych, jak i podostrych wysyłane są do krwiobiegu niepełnowartościowe granulocyty obojętnochłonne. Jednocześnie należy podkreślić, iż stwierdzone w komórkach szeregu rozwojowego granulocytów obojętnochłonnych zmiany mają prawdopodobnie charakter odwracalny. Biorąc pod uwagę ten fakt oraz to, że komórki szpiku ciągle się wymieniają, można przypuszczać, iż szpik może podjąć prawidłową funkcję z chwilą zaprzestania podawania karbofuranu.

PISMIENNICTWO

1. White-Stevens R.: Pestycydy w środowisku. PWRiL, Warszawa 1977.
2. Szucki B. i wsp.: Chemiczne środki ochrony roślin. PWRiL, Warszawa 1978.
3. 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.
4. Latałski M., Halliop J., Tochman A.: Wpływ ostrego zatrucia herbicydem 2,4-D na proces granulogenezy w granulocytach kwasochłonnych. *Ann. Univ. M. Curie-Skłodowska, Lublin, Sectio D* **35**, 225, 1980.
5. Latałski M., Halliop J.: Obraz ultrastrukturalny komórek szeregu rozwojowego granulocytów obojętnochłonnych w zatruciu fosfamidonem. *Bromat. Chem. Toksykol.* **12**, 323, 1979.

6. Tochman A., Latalski M., Halliop J.: Zaburzenia w procesie rozwoju granulocytów obojętnochłonnych w zatruciu cynkotoxsem. *Bromat. Chem. Toksykol.* **14**, 43, 1981.
7. Clark R. A., Klebanoff S. J.: Myeloperoxidase — H₂O₂ — Halide System: Cytotoxic Effect on Human Blood Leukocytes. *Blood* **50**, 65, 1977.
8. Klebanoff S. J., Clark R. A.: Jodination by Human Polymorphonuclear Leucocytes: a Re-evaluation. *J. Lab. Clin. Med.* **89**, 675, 1977.
9. Ackerman G. A.: Ultrastructure and Cytochemistry of the Developing Neutrophil. *Lab. Inv.* **19**, 290, 1968.
10. Bainton D. F., Farquhar M. G.: Differences in Enzyme Content of Azurophil and Specific Granules of Polymorphonuclear Leukocytes. *J. Cell Biol.* **39**, 299, 1968.
11. Latalski M., Halliop J., Nowakowski A.: Ultrastruktura i cytochemia szeregu rozwojowego granulocytów obojętnochłonnych szpiku szczura białego. *Acta Haemat. Pol.* **6**, 273, 1975.

Otrzymano 14 XI 1984.

OBJASNIENIA RYCIN

- Ryc. 1. Grupa kontrolna. Promielocyt. Reakcja z DAB. Pow. ok. 25 000×.
 Ryc. 2. Grupa kontrolna. Mielocyt. Reakcja z DAB. Pow. ok. 25 000×.
 Ryc. 3. Grupa II doświadczalna. Promielocyt. Reakcja z DAB. Pow. ok. 25 000×.
 Ryc. 4. Grupa III doświadczalna. Promielocyt. Reakcja z DAB. Pow. ok. 25 000×.
 Ryc. 5. Grupa III doświadczalna. Mielocyt. Reakcja z DAB. Pow. ok. 25 000×.
 Ryc. 6. Grupa IV doświadczalna. Promielocyt. Reakcja z DAB. Pow. ok. 25 000×.
 Ryc. 7. Grupa IV doświadczalna. Niedojrzały promielocyt. Reakcja z DAB. Pow. ok. 25 000×.
 Ryc. 8, 9. Grupa V doświadczalna. Promielocyt. Reakcja z DAB. Pow. ok. 25 000×.
 Ryc. 10. Grupa V doświadczalna. Dojrzały granulocyt. Reakcja z DAB. Pow. ok. 25 000×.

OBJASNIENIA SYMBOLI

- | | |
|---------------------------------|--|
| ER — retikulum endoplazmatyczne | N — jądro komórkowe |
| G — struktury Golgiego | Z ₁ — ziarnistości I-rzędowe |
| M — mitochondria | Z ₂ — ziarnistości II-rzędowe |

РЕЗЮМЕ

Целью настоящей работы являлось проанализирование изменений субмикроскопической структуры, а также активности миелопероксидаз, клеток развивающегося ряда нейтрофильных лейкоцитов мозга крысы при остром и подостром отравлении карбофураном. Однократное введение карбофурана 0,1 ДЛ₅₀ и 30-кратное по 0,025 ДЛ₅₀ не вызывало отклонений от правильного гранулогенеза и морфологических изменений в отдельных развивающихся фор-

мах нейтрофилии. После применения более высоких доз 1×0.5 ДЛ₅₀, $1 \times$ ДЛ₅₀, а также 30×0.05 ДЛ₅₀ отметили изменения структуры в некоторых клеточных органеллах, а также расстройство активности миелопероксидаз и количества цитоплазматических зернистостей исследуемых клеток. Предполагаем, что расстройства такого типа могут быть причиной ослабления функции исполняемой нейтрофилами. Одновременно установлено, что характер указанных изменений был обратимый.

SUMMARY

The aim of the paper was to analyse changes in submicroscopical structure and in myeloperoxidase activity of cells of neutrophils' developmental series in rats' marrow, in acute and subacute carbofuran intoxication. A single carbofuran administration at 0.1 DL₅₀, and 30-fold administration of a dose of 0.025 DL₅₀ did not induce deviations in normal granulogenesis nor changes in morphology of particular developmental forms of neutrophils. After application of higher doses — 1×0.5 DL₅₀, $1 \times$ DL₅₀ and 30×0.05 DL₅₀, changes in the structure of some cellular organelle were found, as well as the disturbances in myeloperoxidase activity and the number of cytoplasmic granules in the cells investigated. It seems that disorders of this kind may causes weakness of the functions performed by neutrophils. At the same time it was confirmed that the changes indicated were of reversible character.

EXPLANATION TO FIGURES

Fig. 1. Control group. Promyelocyte. Reaction with DAB. Magn. ca 25 000X.

Fig. 2. Control group. Myelocyte. Reaction with DAB. Magn. ca 25 000X.

Fig. 3. Experimental group II. Promyelocyte. Reaction with DAB. Magn. ca 25 000X.

Fig. 4. Experimental group III. Promyelocyte. Reaction with DAB. Magn. ca 25 000X.

Fig. 5. Experimental group III. Myelocyte. Reaction with DAB. Magn. ca 25 000X.

Fig. 6. Experimental group IV. Promyelocyte. Reaction with DAB. Magn. ca 25 000X.

Fig. 7. Experimental group IV. Non-mature promyelocyte. Reaction with DAB. Magn. ca 25 000X.

Fig. 8, 9. Experimental group V. Promyelocyte. Reaction with DAB. Magn. ca 25 000X.

Fig. 10. Experimental group V. Mature granulocyte. Reaction with DAB. Magn. ca 25 000X.

EXPLANATION TO SYMBOLS

ER — endoplasmic reticulum

G — Golgi complex

M — mitochondria

N — nucleus

Z₁ — primary granules

Z₂ — secondary granules .