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

Maciej LATALSKI, Janina HALLIOP,
Alina TOCHMAN

**Wpływ ostrego zatrucia herbicydem 2,4-D na proces granulogenezy
w granulocytach kwasochłonnych**

**Влияние острого отравления гербицидом 2,4-D на процесс гранулогенеза
в ацидофильных гранулоцитах**

**An Effect of Acute Poisoning with Herbicide 2,4-D on the Granulogenesis
in Eosinophiles**

Kwasy chlorofenoksyoctowe używane są powszechnie w rolnictwie w celu selektywnego, chemicznego zwalczania chwastów. Wykazują one, podobnie jak naturalne auksyny, zdolność regulowania wzrostu roślin. Po podaniu herbicydów z tej grupy obserwuje się zahamowanie podstawowych funkcji fizjologicznych i zamieranie roślin. Spowodowane jest to zachwianiem równowagi hormonalnej przez wprowadzenie związków chemicznych o działaniu analogicznym jak naturalne, roślinne regulatory wzrostu.

Macierzystą substancją kwasów chlorofenoksyoctowych jest kwas 2,4-dwuchlorofenoksyoctowy (2,4-D), którego sole i estry są także często stosowane podczas zabiegów agrotechnicznych.

Znajomość metabolizmu 2,4-D w tkankach roślin i organizmach zwierząt jest bardzo istotna w ochronie zdrowia ludzi i zwierząt narażonych na kontakt z tym preparatem. Ważne jest również poznanie wpływu tego herbicydu na poszczególne narządy i tkanki.

Stwierdzono, że ok. 94% i więcej ogólnej ilości wprowadzonego do organizmu szczura 2,4-D wydalana jest z moczem w formie nie zmienionej (18). Erne (7) wykazał, że po upływie kilku godzin od podania szczurowi jednorazowej dawki 2,4-D w ilości 100 mg/kg ciężaru ciała w nerce można było wykryć znacznie więcej herbicydu niż w innych narządach, np. w wątrobie, mięśniach itp., oraz prawie dwa razy więcej niż w surowicy krwi. Ten sam autor zwrócił również uwagę w doświadczeniach *in vitro* na możliwość gromadzenia się badanego związku w komórkach krwi w ilości ok. 10% tej, która występowała w surowicy.

Narażenie tkanek na toksyczny wpływ 2,4-D oraz wykazanie jego obecności w komórkach krwi skłoniły nas do podjęcia próby prześledzenia procesu powstawania krwinek w szpiku szczura w przypadku ostrych zatruc tym związkami. Obserwacje prowadzone były przy zastosowaniu techniki mikroskopowo-elektronowej uzupełnionej badaniami cytochemicznymi w celu łatwiejszego zanalizowania granulogenezy w wybranych przez nas granulocytach kwasochłonnych.

MATERIAŁ I METODYKA BADAŃ

Wskaźnik ostrej toksyczności DL_{50} dla 2,4-D, podawany przez różnych autorów, waha się w dość dużych granicach, np. 300—1000 mg/kg ciężaru ciała (19). W badaniach naszych przyjęliśmy DL_{50} dla badanego herbicydu równą 400 mg/kg ciężaru ciała przy podaniu dootrzewnowym. Wartość ta określona została przez Podolák (15) przy użyciu soli sodowej kwasu 2,4-dwuchlorofenoksyoctowego dla szczurów hodowli własnej. Taka sama chemiczna postać herbicydu i szczury z tej samej hodowli użyte zostały do naszych doświadczeń.

Obserwacje prowadzone były na 24 szczurach białych, samcach hodowli własnej, o ciężarze ciała ok. 160—180 g. Wśród zwierząt wyodrębniono 3 grupy doświadczalne, po 8 szczurów w każdej. Jako punkt odniesienia dla oceny uzyskanych wyników, służyły nam wykonane wcześniej w warunkach fizjologicznych, morfologicznych i cytochemicznych badania rozwijających się granulocytów kwasochłonnych w szpiku szczurów (8).

Zwierzęta doświadczalne otrzymywały jednorazowo dootrzewnowo herbicyd 2,4-D, w następujących dawkach: grupa I — 0,2 DL_{50} , grupa II — 0,4 DL_{50} , grupa III — 1,0 DL_{50} . Tkankę szpikową z kości udowych pobierano w narkozie eterowej od szczurów wszystkich grup doświadczalnych po upływie 24 godz. od momentu podania preparatu 2,4-D. Prowadzono badania morfologiczne i histochemiczne, wykonując reakcję z dwuaminobenzydyną na obecność mieloperoksydazy.

Materiał do badań morfologicznych utrwalano w 4% aldehydzie glutarowym zbuforowanym buforem kakodylowym do pH 7,2, z 1% dodatkiem sacharozy, przez 1 godz. w temp. 0—+4°C. Po wypłukaniu w takim samym buforze i o tym samym pH , lecz z 7% dodatkiem sacharozy, szpik dotrwalano w 1% roztworze OsO_4 , zbuforowanym do pH 7,2 buforem kakodylowym, z dodatkiem 5% sacharozy. Czas i temperatura były nie zmienione w porównaniu do pierwszego etapu utrwalania. Po analitycznym jak wyżej płukaniu, materiał przenoszono do 0,5% roztworu octanu uranylu w buforze weronalowo-octanowym z dodatkiem 4% sacharozy na okres 1 godz. w temp. pokojowej. Następnie szpik płukano w buforze weronalowo-octanowym z 7% zawartością sacharozy, odwadniano w szeregu alkoholi etylowych o wzrastających stężeniach i zatapiało w Eponie 812.

W celu wykazania aktywności mieloperoksydazy, tkankę utrwalano przez 2 godz. w 1,5% roztworze aldehydu glutarowego w buforze kakodylowym o pH 7,2, z dodatkiem 1% sacharozy, w temp. 0—+4°C. Po 2 godz. płukaniu w wyżej wymienionym buforze, zawierającym 7% sacharozy, wykonywano reakcję z dwuaminobenzydyną w obecności H_2O_2 . Inkubację przeprowadzano w ciągu 60 min. przy pH 7,0 w temp. 37°C. Do płynu inkubacyjnego dodawano 5% sacharozy oraz 1% dwumetylosulfotienku, jako środka ułatwiającego przenikanie substratów przez błony cytoplazmatyczne komórek szpiku. Następnie materiał dotrwalano w 1% OsO_4 i postępowano

dalej tak samo, jak w przypadku przygotowywania tkanki do badań morfologicznych.

Skrawki krojono na ultramikrotomie Tesla BS-490, a preparaty oglądano i fotografowano w mikroskopie elektronowym Tesla BS-613 (CSSR).

BADANIA WŁASNE

Grupa I doświadczalna

Komórki szeregu rozwojowego granulocytów kwasochłonnych nie wykazywały odchyżeń od normy. Obraz morfologiczny struktur wewnątrzkomórkowych był prawidłowy. Granulopoeza także przebiegała podobnie, jak to obserwowano w badaniach wcześniejszych u szczurów (8) w warunkach fizjologicznych. W mieloblastach i promielocytach produkt reakcji z DAB występował w kanałach siatki endoplazmatycznej, strukturach Golgiego oraz we wszystkich ziarnistościach cytoplazmatycznych (ryc. 1). W mielocytach pojawiały się ziarnistości, zawierające rdzeń (krystaloid), w których produkt reakcji cytochemicznej zlokalizowany był w części obwodowej, rdzeń natomiast był go pozbawiony (ryc. 2). W miarę dalszego dojrzewania zwiększała się w komórkach ilość ziarnistości opatrzonych rdzeniem i stanowiły one zdecydowaną większość w formach dojrziałych.

Grupa II doświadczalna

W szpiku szczurów przeważały młode i dojrzałe granulocyty o prawidłowej budowie. Nieliczne mielocyty i bardziej od nich dojrzałe formy zawierały elektronowo jasne wakuole (ryc. 3). Na elektronogramach z wykonaną reakcją na obecność mieloperoksydazy (ryc. 4) można było zauważyć nieprawidłowy obraz ziarnistości nie posiadających rdzenia. Zatracały one swoje wyraźne kontury i przybierały kształt nieregularny. Niekiedy peroksydazo-dodatnia zawartość ziarna była oddzielona od otaczającej ją błony wąską, elektronowo jasną przestrzenią. Czasem również w obrębie wakuoli występował materiał wykazujący obecność produktu reakcji z DAB.

Grupa III doświadczalna

W licznych komórkach rozwijających się granulocytów kwasochłonnych obserwowano cechy różniące je od tego samego typu komórek uzyskanych ze szpiku szczurów stanowiących nasz punkt odniesienia. Dotyczyły one: zmniejszenia ilości peroksydazo-dodatnich ziarnistości, poz-

bawionych rdzenia, oraz obecności licznych i dużych, elektronowo jasných wakuoli, wypełnionych bardzo zróżnicowanym materiałem. Był on drobnoziarnisty, gruboziarnisty, błoniasty, niekiedy omawiane wakuole zawierały liczne, drobne pęcherzyki i przypominały ciała wielopęcherzykowe (ryc. 5). Na preparatach z wykonaną reakcją z DAB w obrębie wakuoli znajdował się materiał wykazujący obecność produktu reakcji (ryc. 6). W promielocytach i mielocytach wzrosła również ilość ziarnistości, w których ich peroksydazo-dodatnia zawartość oddzielona była od błony dość szeroką, elektronowo jasną przestrzenią (ryc. 7). W niektórych komórkach występowały duże struktury mielinowe (ryc. 8). Ziarnistości zawierające rdzeń, jak się wydaje, występowały w ilości podobnej, jak w szpiku zwierząt nie zatrutowanych 2,4-D (8).

OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ

Granulocyty kwasochłonne człowieka i wyższych zwierząt zaangażowane są w pewne, specyficzne dla nich procesy. Stwierdzono wzrost ich liczby w przebiegu niektórych schorzeń pasożytniczych i alergicznych. Szczególne powinowactwo eozynofili do kompleksów antygen—przeciwciała może sugerować udział tych krwinek w procesach immunologicznych (5). Mann (13) wykazał zależność funkcjonalną pomiędzy granulocytami kwasochłonnymi i komórkami tucznymi, polegającą na fagocytowaniu przez wyżej wspomniane leukocyty ziarnistości uwalnianych z komórek tucznych. Może to wskazywać — zdaniem autora — na udział eozynofili bądź w regulowaniu poziomu histaminy, bądź też w stymulowaniu i różnicowaniu komórek tucznych.

Granulocyty kwasochłonne są jednak podobne pod pewnymi względami do obojętnochłonnych. Wspólnymi cechami obu rodzajów krwinek jest na przykład zdolność poruszania się, chemotaksja, zdolność do fagocytozy i wewnątrzkomórkowego trawienia pochłoniętego materiału. Zdolność pochłaniania przez eozynofile egzogenego materiału oraz możliwość wykorzystania zawartości ziarnistości w procesie trawienia w obrębie wakuoli fagocytarnych, zostały udokumentowane przez wielu autorów (5, 6, 9, 17). Ta wspólna cecha funkcjonalna granulocytów kwasochłonnych i obojętnochłonnych znajduje swoje uzasadnienie w podobnym wyposażeniu enzymatycznym ziarnistości obu rodzajów krwinek. Takim wspólnym enzymem, wykazany również i w naszych obserwacjach, jest mieloperoksydaza, syntetyzowana już w stadium promielocytów, zarówno przez eozynofile, jak i neutrofile. Mieloperoksydaza w połączeniu z H_2O_2 i chlorowcopochodnymi (Cl^- , J^-) wywiera efekt bakteriobójczy. zarówno w granulocytach obojętnochłonnych (4, 10), jak i kwasochłon-

nych (3, 14). Wykorzystywana jest zatem w wakuolach fagocytarnych, a dostaje się do ich wnętrza poprzez fuzję błon wakuoli z błonami otaczającymi ziarnistości. Oprócz tego enzymu w ziarnistościach obu rodzajów granulocytów wykryto obecność kwaśnej fosfatazy, wyznacznika enzymów lizosomalnych, oraz inne hydrolazy (1, 2, 11).

Wskazane wyżej podobieństwa funkcjonalne oraz obecność takich samych białek enzymatycznych, potwierdzone obserwacjami cytochemicznymi w mikroskopie elektronowym, skłoniły wielu autorów do badań porównawczych nad tymi rodzajami krwinek. Wyniki tych badań wykazały, że eozynofile nie niszczą jednak pewnych mikroorganizmów (np. *Staphylococcus aureus*) tak efektywnie, jak neutrofile, z powodu mniejszej zdolności fagocytarnej (3). Ci sami autorzy wykazali również różnice funkcjonalne między peroksydazą eozynofili i neutrofilii. Cline i wsp. (5) donoszą o mniejszej zdolności granulocytów kwasochłonnych do fagocytowania pewnych grzybów i niszczenia pochłoniętych mikroorganizmów. Wydaje się zatem, że zaangażowanie w procesy fagocytarne obu rodzajów granulocytów, chociaż bardzo podobne, nie jest jednak identyczne.

Badając wpływ kwasu 2,4-dwuchlorofenoksyoctowego na proces powstawania granulocytów obojętnochłonnych szpiku szczura (12), stwierdziliśmy pojawianie się wakuoli fagocytarnych w rozwijających się komórkach tego rodzaju krwinek oraz udział ziarnistości peroksydazododatnich w trawieniu wewnątrzkomórkowym. Podobne obrazy uzyskaliśmy również w komórkach szeregu rozwojowego granulocytów kwasochłonnych w przypadku ostrych zatruc herbicydem 2,4-D. Obecność wakuoli fagocytarnych można było zaobserwować w promielocytach, mielocytach i dojrzałych krwinkach, w tej grupie zwierząt, które otrzymywały dawkę 0,4 DL₅₀. Po podaniu większej dawki badanego preparatu (DL₅₀) wzrosła ilość i wielkość wakuoli. Wypełnione były one materiałem ziarnistym, włóknistym oraz zawierały struktury mielinowe i drobne pęcherzyki. Wyglądem swoim przypominały lizosomy wtórne i ciała reszkowe, będące produktem lizosomalnego trawienia.

W procesy wewnątrzkomórkowego trawienia, jak się wydaje, są zaangażowane przede wszystkim peroksydazododatnie ziarnistości eozynofili, pozbawione rdzenia. Obserwowano bowiem obecność wakuoli fagocytarnych w stadium promielocyta tzn. wtedy, kiedy komórki jeszcze nie wytwarzały ziarnistości specyficznych, opatrzonych rdzeniem. Poza tym tylko ziarnistości pozbawione rdzenia posiadały często zmieniony wygląd morfologiczny. W takich przypadkach przyjmowały one nieregularny kształt oraz pojawiała się, różnej wielkości, elektronowo jasna przestrzeń, odgraniczająca peroksydazododatnią zawartość ziarna od otaczającej je błony. W formach dojrzałych ponadto, mimo obecności lic-

nych i dużych wakuoli fagocytarnych, ziarnistości posiadające rdzeń, a więc specyficzne, występowały dość licznie. Degenerację tylko ziarnistości specyficznych obserwowali między innymi Presently i wsp. (16) u chorych leczonych solami złota. Znane są więc przypadki, że tylko jeden rodzaj ziarnistości granulocytów kwasochłonnych był zmieniony.

Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że ostre zatrucie herbicydem 2,4-D powoduje zainicjowanie procesów związanych z fagocytozą i trawieniem wewnątrzkomórkowym w rozwijających się i dojrzających komórkach granulocytów kwasochłonnych szpiku szczura.

PIŚMIENNICTWO

1. Bainton D. F., Farquhar M. G.: *J. Cell Biol.* **39**, 299—317, 1968.
2. Bainton D. F., Farquhar M. G.: *J. Cell. Biol.* **45**, 54—73, 1970.
3. Bujak J. S., Root R. K.: *Blood* **43**, 727—736, 1974.
4. Clark R. A., Klebanoff S. J.: *Blood* **50**, 65—70, 1977.
5. Cline M. J., Hanifin J., Lehrer R. I.: *Blood* **32**, 922—934, 1968.
6. Cotran R. S., Litt M.: *J. Exp. Med.* **129**, 1291—1306, 1969.
7. Erne K.: *Acta Vet. Scand.* **7**, 240—256, 1966.
8. Halliop J., Tochman A.: praca nie opublikowana.
9. Klebanoff S. J.: *J. Exp. Med.* **145**, 983—998, 1977.
10. Klebanoff S. J., Clark R. A.: *J. Lab. Clin. Med.* **89**, 675—686, 1977.
11. Latałski M., Nowakowski A., Halliop J.: *Acta Haemat. Pol.* **7**, 311—319, 1978.
12. Latałski M., Halliop J.: praca nie opublikowana.
13. Mann P. R.: *J. Pathol.* **98**, 183—186, 1969.
14. Migler R., Dechatelet L. R., Bass D. A.: *Blood* **51**, 445—456, 1978.
15. Podolak M.: praca nie opublikowana.
16. Presentey B., Jerushalmy Z., De Vries A., Rosin A. J., Perk K.: *Am. J. Clin. Pathol.* **60**, 927—931, 1973.
17. Skinnider L. F., Ghadially F. N.: *Arch. Pathol.* **98**, 58—61, 1974.
18. Szucki B., Majczakowa W., Podolak M., Krzyżanowski J.: *Chemiczne środki ochrony roślin*, PWRiL, Warszawa 1978.
19. Way J. M.: *Residue Reviews*. Edited by F. A. Gunther V. **26**, 37—62, 1969.

Otrzymano 29 IX 1979.

OBJAŚNIENIA RYCIŃ

Ryc. 1. Grupa I doświadczalna. Mieloblast. Produkt reakcji z DAB obecny w kanałach siatki endoplazmatycznej i strukturach Golgiego. Pow. ok. 25 000×.

Ryc. 2. Grupa I doświadczalna. Mielocyt. Produkt reakcji z DAB obecny w ziarnistościach. W ziarnistościach zawierających rdzeń produkt reakcji występuje tylko na obwodzie. Pow. ok. 25 000×.

Ryc. 3. Grupa II doświadczalna. Mielocyt. Pow. ok. 42 000×.

Ryc. 4. Grupa II doświadczalna. Mielocyt. W ziarnistościach produkt reakcji z DAB. Pow. ok. 25 000×.

Ryc. 5. Grupa III doświadczalna. Mielocyt (z lewej), metamielocyt (z prawej). Pow. ok. 20 000×.

Ryc. 6. Grupa III doświadczalna. Mielocyt. Produkt reakcji z DAB w obrębie wakuoli fagocytarnych. Pow. ok. 20 000×.

Ryc. 7. Grupa III doświadczalna. Mielocyt. W ziarnistościach obecny produkt reakcji z DAB. Pow. ok. 20 000×.

Ryc. 8. Grupa III doświadczalna. Mielocyt. Pow. ok. 33 000×.

ОБЪЯСНЕНИЯ СКОРӨТӨВ

F — figury mielinowe	V — wakuole
G — struktury Golgiego	Z ₁ — ziarnistości pozbawione rdzenia
M — mitochondria	Z ₂ — ziarnistości zawierające rdzeń
N — jądro komórkowe	
Re — retikulum endoplazmatyczne	

РЕЗЮМЕ

Проанализирован процесс появления ацидофильных гранулоцитов в костном мозге крысы во время острого отравления гербицидом 2,4-D. В развивающихся и созревших клетках обнаружено наличие многочисленных фагоцитарных вакуолей. Указывает это на начало процессов, связанных с фагоцитозом и внутриклеточным пищеварением. В пределах вакуоли обнаружено наличие материала, проявляющего положительную реакцию при наличии миелопероксидазы. Этот факт, а также изменённый морфологический вид пероксидазо-положительной зернистости, лишённой скопления тёмного вещества, может указывать на участие вышеупомянутых органелл в пищеварительных процессах в пределах фагоцитарных вакуолей.

SUMMARY

Formation of eosinophiles in the marrow of the rat was analysed in acute poisoning with herbicide 2,4-D. The presence of a large number of phagocytic vacuoles was found in developing and mature cells. The appearance of the phagocytic vacuoles points out to an initiated process related both with phagocytosis and intracellular digestion. Within the area of the vacuoles the presence of myeloperoxidase was observed. Both the presence of myeloperoxidase as well as a changed morphological picture of peroxidase-positive granules, without the core, can suggest that the organelles take part in the digestion process within the phagocytic vacuoles.

EXPLANATION TO FIGURES

Fig. 1. Experimental group I. A myeloblast. Peroxidase activity in the endoplasmic reticulum and the Golgi complex. Magn. 25 000×.

Fig. 2. Experimental group I. A myelocyte. Peroxidase activity in the granules.

In the granules with the core peroxidase activity is observed only within the granule except the core. Magn. 25 000 \times .

Fig. 3. Experimental group II. A myelocyte. Magn. 42 000 \times .

Fig. 4. Experimental group II. A myelocyte. Peroxidase activity in the granules. Magn. 25 000 \times .

Fig. 5. Experimental group III. A myelocyte (to the left), a metamyelocyte (to the right). Magn. 20 000 \times .

Fig. 6. Experimental group III. A myelocyte. Peroxidase activity in the phagocytic vacuoles. Magn. 20 000 \times .

Fig. 7. Experimental group III. A myelocyte. Peroxidase activity in the granules. Magn. 20 000 \times .

Fig. 8. Experimental group III. A myelocyte. Magn. 33 000 \times .

EXPLANATION TO THE SYMBOLS

F — myelin figures

G — Golgi complex

M — mitochondria

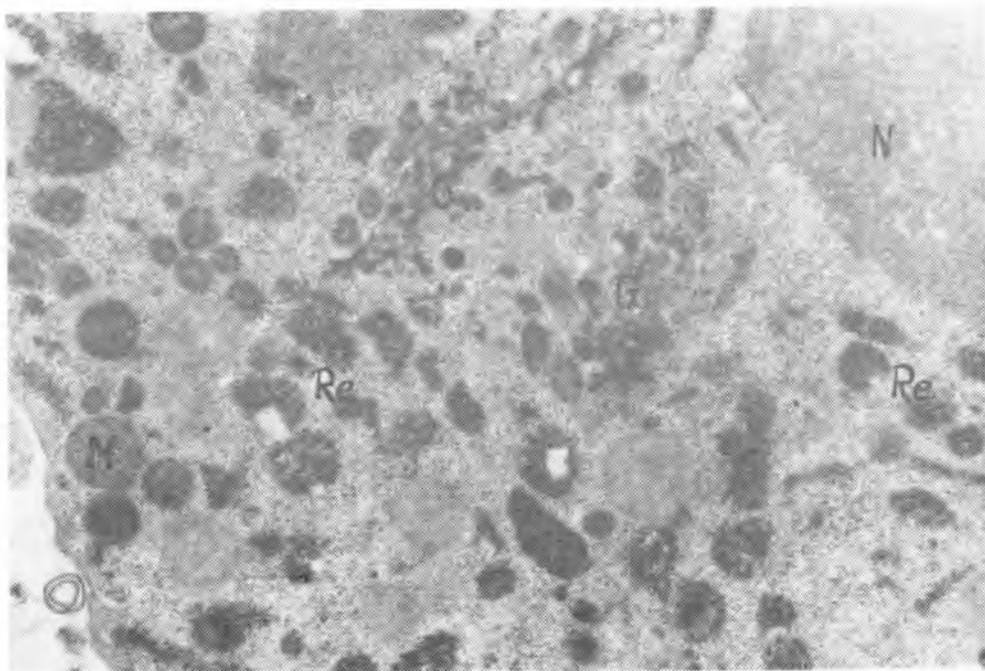
N — nucleus

Re — endoplasmic reticulum

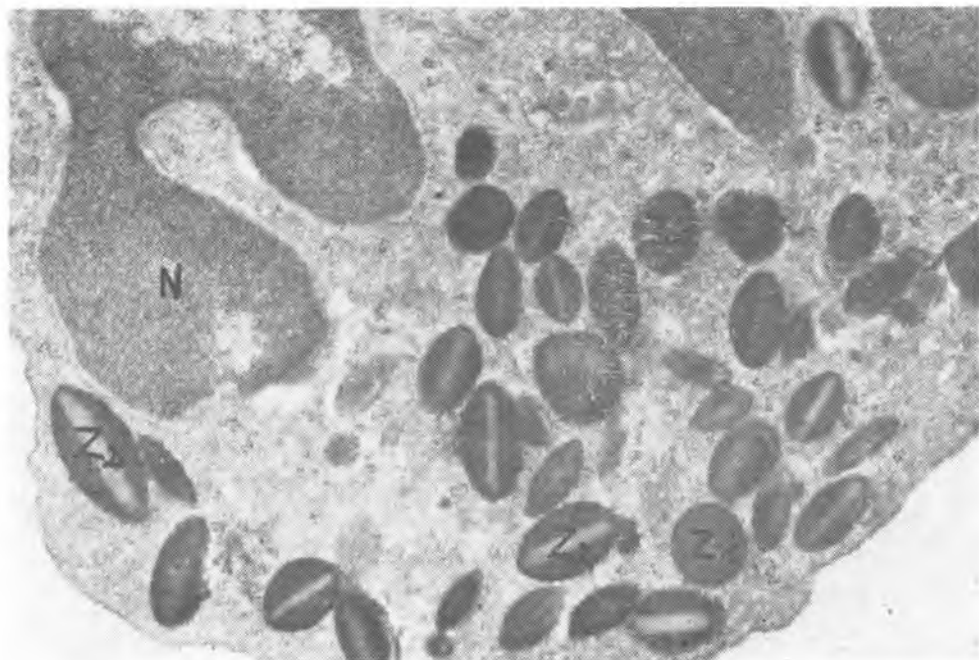
V — vacuoles

Z₁ — granules without the core

Z₂ — granules with the core

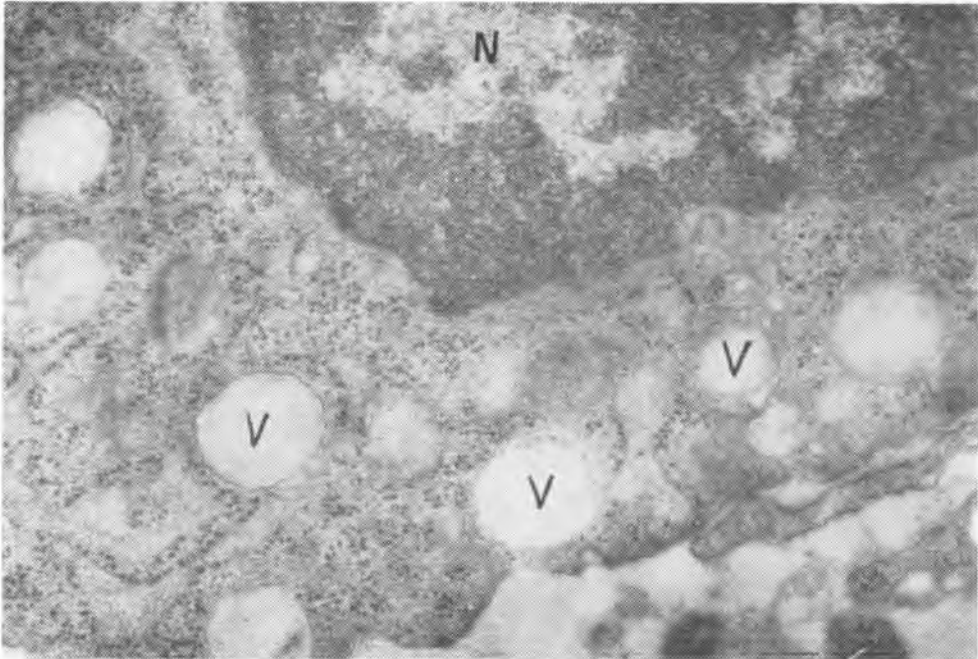


Ryc. 1

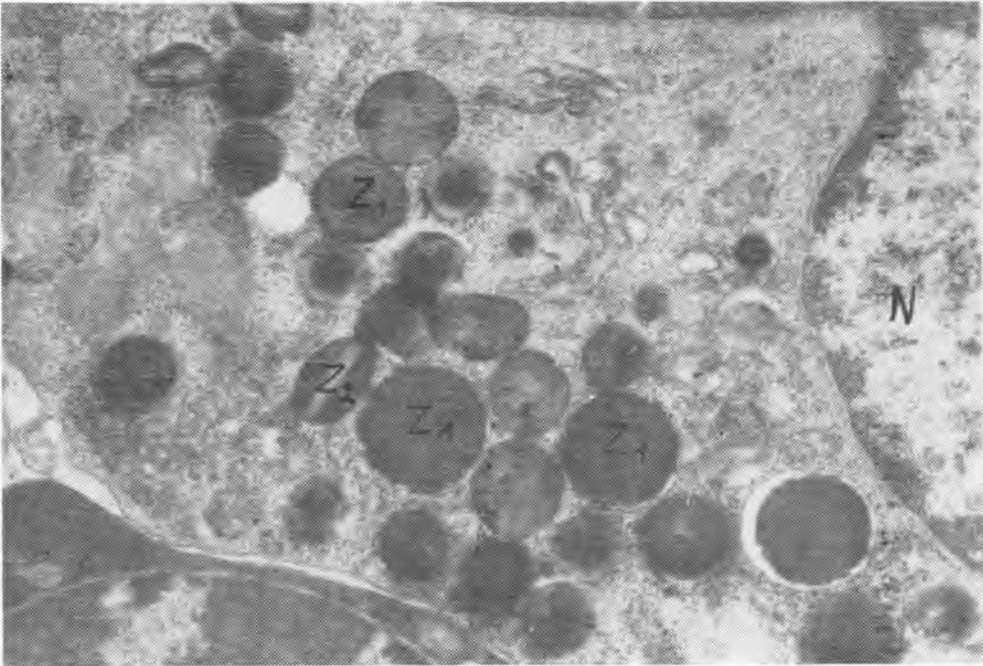


Ryc. 2

Maciej Latański, Janina Halliop, Alina Tochman

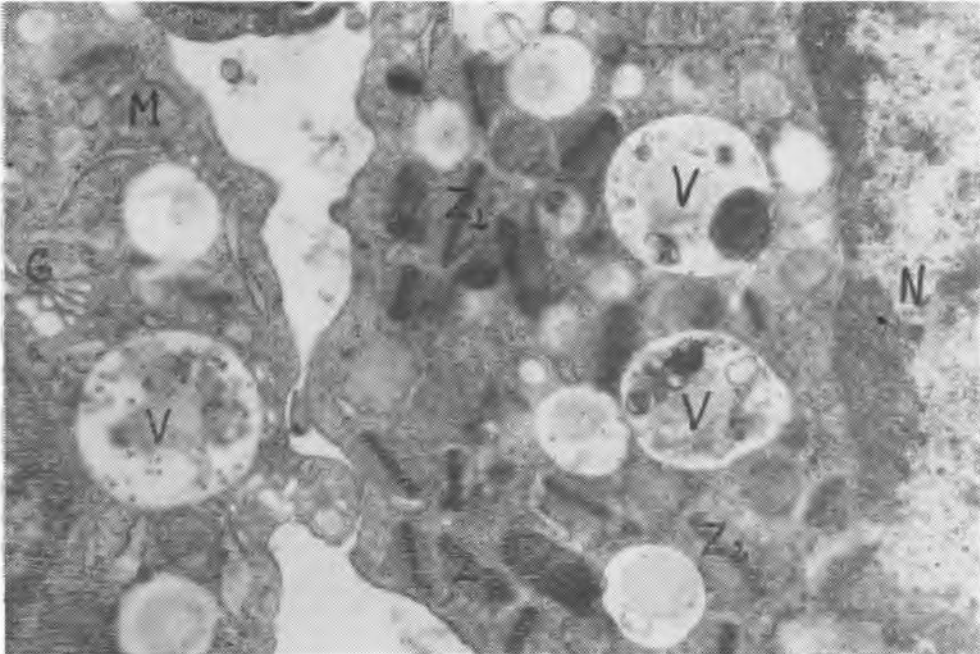


Ryc. 3

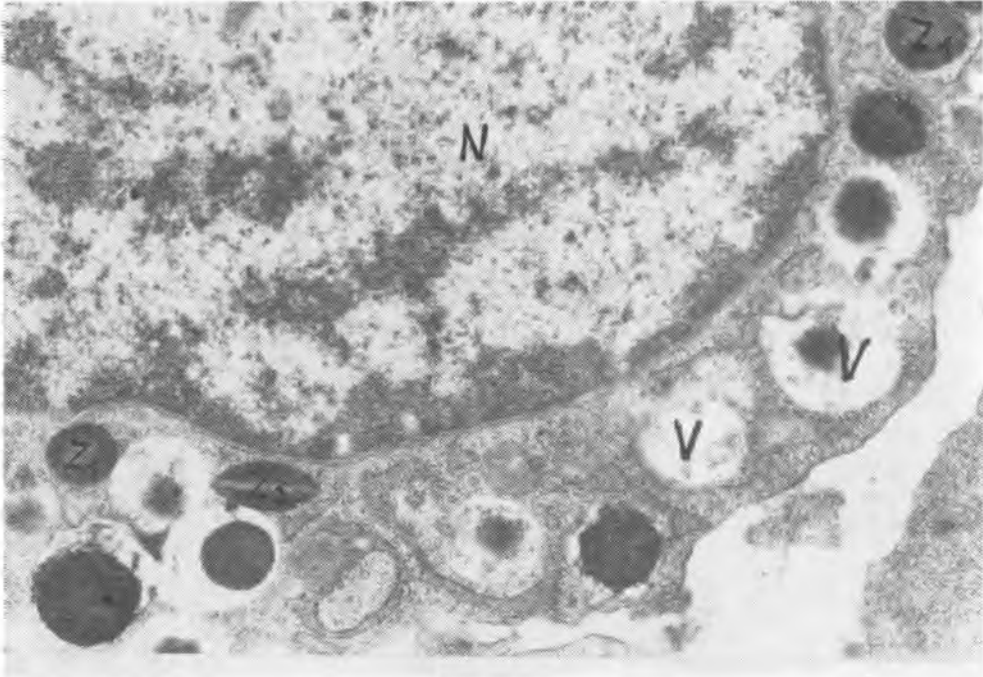


Ryc. 4

Maciej Latański, Janina Halliop, Alina Tochman

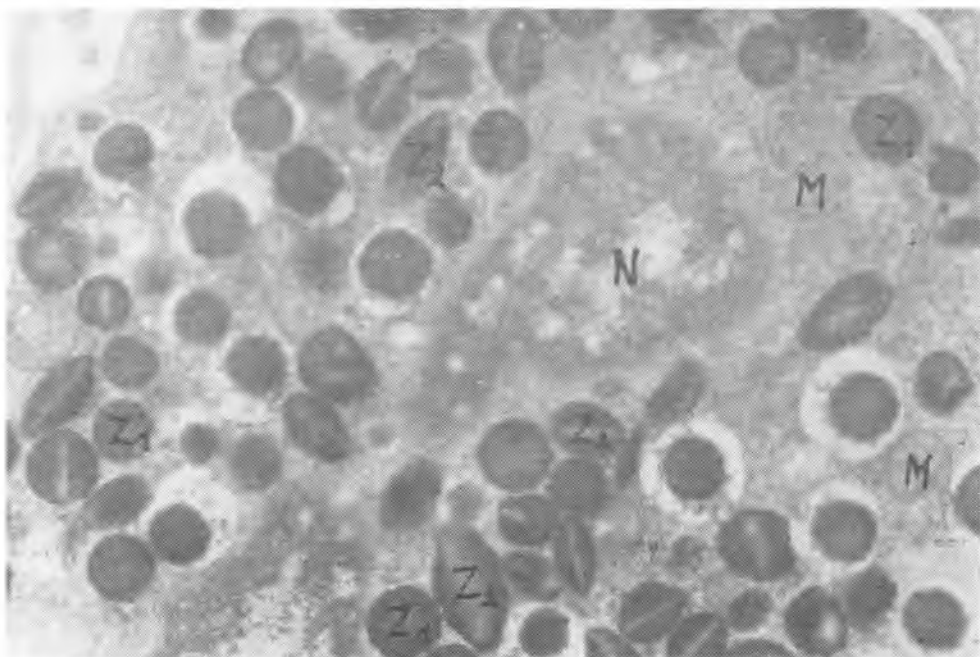


Ryc. 5

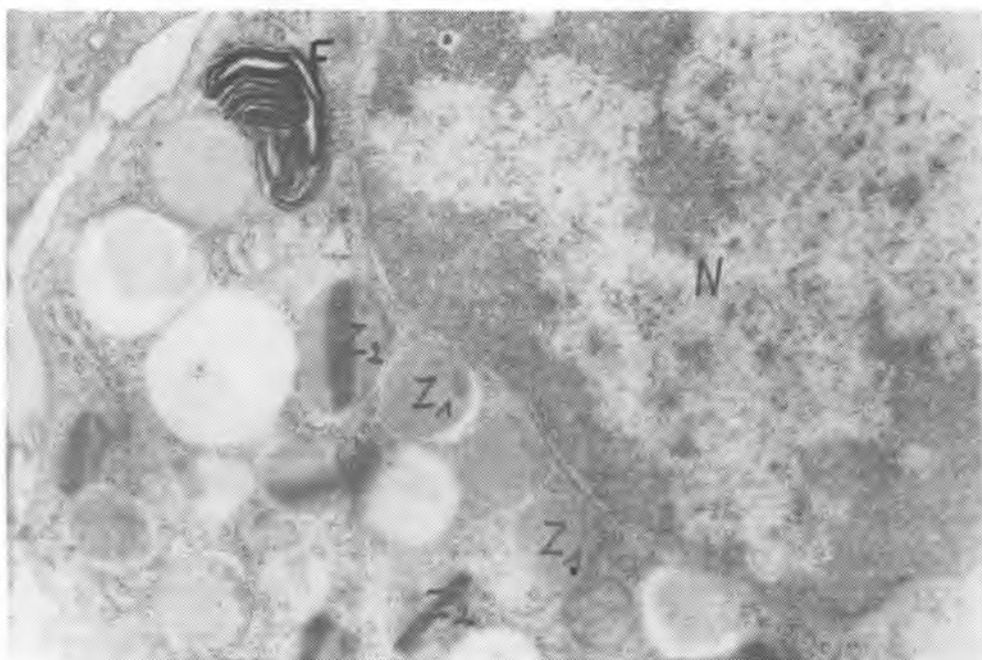


Ryc. 6

Maciej Latałski, Janina Halliop, Alina Tochman



Ryc. 7



Ryc. 8