

# PATOLOGIA I TERAPIA

JANUSZ A. MADEJ, CZESŁAW KASZUBKIEWICZ, BARBARA ŚWIĄTKIEWICZ

## Poziom metali ciężkich i innych pierwiastków w limfocytach białaczkowych w świetle mikroanalizy rentgenowskiej

Z Instytutu Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych Wydziału Weterynaryjnego AR we Wrocławiu  
Z Instytutu Niskich Temperatur i Badań Strukturalnych PAN we Wrocławiu

Oznaczanie zawartości pierwiastków w tkankach zmienionych białaczkowo u zwierząt wykonywano przy pomocy metody polarograficznej (14) lub absorpcji atomowej (7, 8). Niedoskonałość obu tych metod polega na niemożności oznaczeń poziomu pierwiastków w jednej komórce, przy jednoczesnej ocenie histostruktury narządu. Uniwersalną metodą pod tym względem jest mikroanaliza rentgenowska (MAR), którą posłużono się w niniejszej pracy.

W mikroanalizie rentgenowskiej, użytej po raz pierwszy w 1951 r. przez Castainga (3), wykorzystuje się zjawisko wzbudzenia promieniowania rentgenowskiego w toku bombardowania próbki wiązką elektronów. Określanie długości fali tego promieniowania stanowi podstawę analizy jakościowej na drodze selekcji dyspersyjnej za pomocą kryształów (np. RAP, PET itd.). Natężenie promieniowania rentgenowskiego jest wprost proporcjonalne do koncentracji emitującego go pierwiastka zawartego w próbce. Pomiar natężenia tego promieniowania pozwala także na analizę ilościową pierwiastka w badanym obiekcie.

Zastosowanie MAR-u w naukach technicznych jest powszechne. Dynamicznie rozwijają się też badania z użyciem MAR-u w naukach biologicznych (1, 4, 6, 9, 12, 15—21). W Polsce po raz pierwszy mikroanalizator rentgenowski w patomorfologii zastosował w 1947 r. Niepokłomski i wsp. (17), badając zmiany krzemiczne w tkankach ludzi.

Celem badań własnych było oznaczenie poziomu i lokalizacji metali ciężkich i niektórych innych pierwiastków tablicy okresowej Mendelejewa.

### Materiał i metody

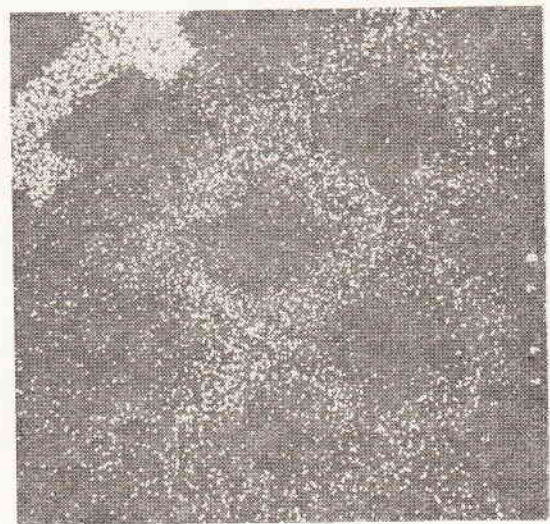
Materiał do badań stanowiły wycinki węzłów chłonnych szyjnych powierzchniowych (*lymphonodi cervicales superficiales*) 12 krów rasy ncb., 4—8-letnich, chorych na białaczkę limfatyczną. Kontrolę stanowiły wycinki węzłów chłonnych 5 zdrowych krów, pochodzących z tego samego rejonu kraju. Do badań w mikroskopie świetlnym materiał utrwalano w 7% zbudowanej formalinie i barwiono rutynowo H+E. Do badań mikroskopowych elektronowo-skaningowych (SEM) materiał utrwalano w 3,6% aldehydzie glutarowym buforowanym do pH 7,4 0,1 M buforem kakodylowym. Następnie materiał płukano w tym buforze i utrwalano dodatkowo w 1% OsO<sub>4</sub>. Z kolei wycinki odwadniano w etanolu i zatapiano w Eponie 812. Skrawki o grubości 3, 5 i 10  $\mu$  pokrywano w próżni

warstwą węgla o grubości 300—500 Å i oglądano w mikroanalizatorze rentgenowskim JXA — 5 A, firmy Joel. Stosowano napięcie przyspieszające elektrony 25 kV i powiększenia od 200 do 2500 razy. Do analizy jakościowej wykorzystano kryształy RAP, PET i LiF. Mikroanaliza obejmowała wszystkie pierwiastki tablicy okresowej Mendelejewa, za wyjątkiem pierwiastków lekkich (H, He, Li, Be, B, C, N, O, F, Ne). W każdym preparacie mikroanalizie poddano 10 komórek. Wykonano zdjęcia fotograficzne rozmieszczenia pierwiastków (X-RAY), wzdłuż linii (PI) oraz elektronekowe kompozycyjne (COMPO).

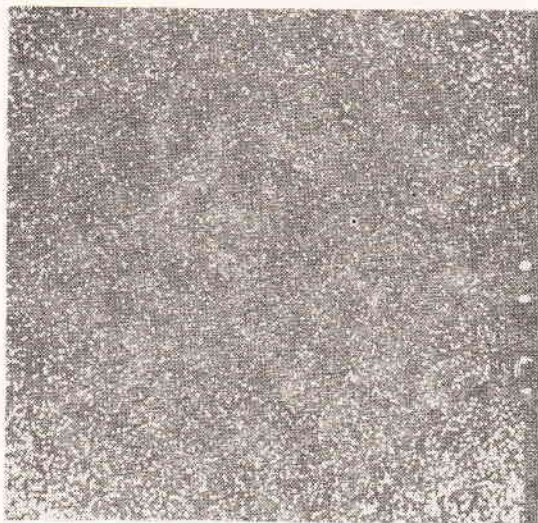
### Wyniki i omówienie

Badaniem mikroskopowym stwierdzono we wszystkich wycinkach węzłów chłonnych krów chorych jednolity nacisk komórek limfoidalnych, charakterystyczny dla białaczki limfatycznej.

Spośród wszystkich pierwiastków tablicy okresowej, w komórkach białaczkowych stwierdzono obecność tylko Cu, Pb, Os, S i Ca w ilościach >0,001%. Zawartość Cu wynosiła 2,127%, Pb — 1,108%, Os — 0,082%, S — 0,817% i Ca — 2,407%. W limfocytach węzłów chłonnych stwierdzono odpowiednio: Cu — 1,841%, Pb — 0,523%, Os — 0,070%, S — 0,818% i Ca — 2,421%. Na zdjęciach fotograficznych oznaczone pierwiastki przybierały postać mgławicy białych punktów na czarnym tle (np. Cu — ryc. 1 i 2). Nakładając punkty świecenia pier-



Ryc. 1. Punkty świecenia Cu (zwierzę białaczkowe) na siatce z mikroskopu elektronowego. MAR, X-RAY, pow. 240 $\times$



Ryc. 2. Ogniskowo układające się (zwłaszcza na obwodzie preparatu) punkty świecenia Cu (zwierzę białaczkowe). MAR, X-RAY, pow. 2000×

wiastków na histostrukturę tkanki uzyskano możliwość topograficznego rozmieszczenia Cu, Pb, Os, S i Ca w układzie komórka—przestrzeń pozakomórkowa. Z przedstawionych zdjęć (ryc. 3 i 4), na których przykładowo przedstawiono zawartość Cu i Os w tkance zmienionej białaczkowo wynika, że oznaczone pierwiastki lokalizują się wyłącznie w komórce, głównie w jej cytoplazmie, na co wskazuje przebieg linii krzywej, wykazującej znaczne odchylenia od linii prostej. Zawartość metali przedstawiono również graficznie na ryc. 5.

Oprócz wirusów, właściwości białaczkotwórcze wykazują także czynniki fizyczne i substancje chemiczne (2). Substancje chemiczne o właściwościach leukozogennych, występujące w środowisku, reprezentują różne grupy związków jak: wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne, N-nitrozwiązki, laktony, ami-

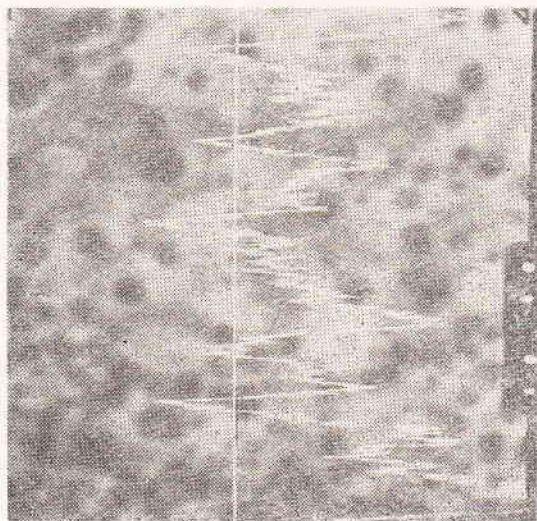
ny aromatyczne, związki metali ciężkich i inne. Do znanych substancji onko- i leukozogennych należą metale ciężkie (5).

Wzrastające stężenie poziomu metali ciężkich w biosferze stwarza zagrożenie dla zdrowia całych populacji. Długotrwałe narażenie na małe ilości metali, wynikające ze stałego przebywania w zanieczyszczonym środowisku, może być przyczyną subklinicznych zmian w organizmie, często nieodwracalnych, ujawniających się dopiero po wielu latach, jak np. białaczki.

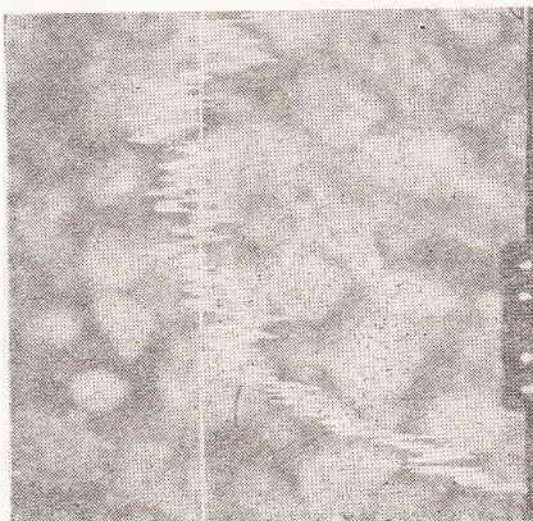
Oznaczeniu zawartości metali ciężkich w tkankach zmienionych białaczkowo poświęcono niewiele prac. Zwiększone stężenie Cu stwierdzono w białaczkach i ziarnicy złośliwej u ludzi oraz w mięsach u zwierząt (13), natomiast Zn w nowotworach eksperymentalnie wywołanych tym metalem (10, 11). O wzroście poziomu Zn, Cu, Pb, Fe i Mn w białaczkowo zmienionych węzłach chłonnych krów donoszą Gibasiewiczowie (7, 8).

Z wcześniej przeprowadzonych badań własnych (14) wynika, że w homogenatach z węzłów chłonnych, wątroby i śledziony zwierząt białaczkowych, wyraźnie wzrasta poziom takich metali ciężkich, jak: Zn, Cd, Cu i Pb. Gromadzenie się tych pierwiastków w tkance zmienionej białaczkowo wskazuje, że w tkankach nowotworowych zanika naturalny antagonizm między poszczególnymi metalami (14).

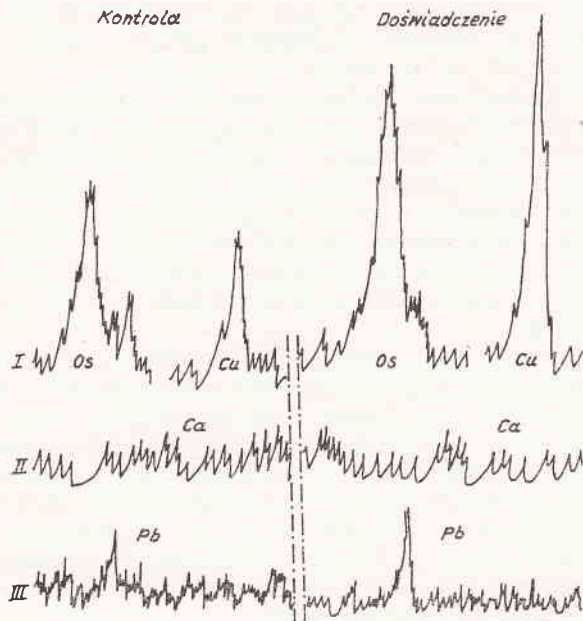
Wykonane dotychczas badania nie dały jednak odpowiedzi odnośnie rozmieszczenia i zawartości metali ciężkich w jednej komórce. Badania z użyciem mikroanalizatora rentgenowskiego pozwoliły na wykrycie w komórkach białaczkowych takich metali ciężkich, jak: Cu, Os i Pb, a ponadto S i Ca. Wszystkie pierwiastki były zlokalizowane wyłącznie w komórkach, głównie w ich cytoplazmie (ryc. 3 i 4). Pozakomórkowo nie ujawniono w MAR-



Ryc. 3. Linia krzywa przedstawiająca rozmieszczenie i koncentrację Cu wzdłuż linii prostej (zwierzę białaczkowe). MAR, COMPO+PI, pow. 2000×



Ryc. 4. Linia krzywa przedstawiająca rozmieszczenie i koncentrację Os wzdłuż linii prostej (zwierzę białaczkowe) MAR, COMPO+PI, pow. 2000×



Ryc. 5. Wykres zawartości Os, Cu, Ca i Pb w węzle chłonny białaczkowym i zdrowym. MAR, kryształy: PET (I), RAP (II) i LiF (III)

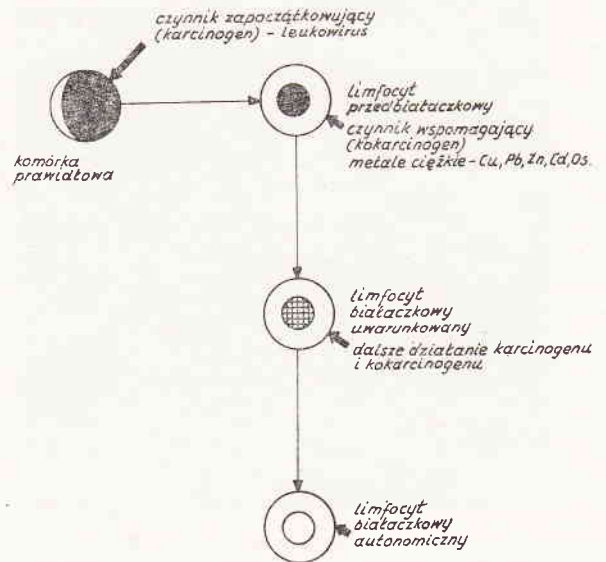
-ze ani jednego pierwiastka z całej tablicy Mendelejewa.

U krów białaczkowych zaznaczył się wzrost poziomu metali ciężkich w komórkach limfoidalnych w porównaniu z limfocytami zwierząt zdrowych. Spośród czterech metali ciężkich (Zn, Cd, Cu i Pb) stwierdzonych w homogenatach tkankowych zwierząt białaczkowych metodą polarograficzną (14), w MAR-ze ujawniono tylko dwa z nich tj. Cu i Pb, a ponadto Os. Być może zawartość Cd i Zn w komórce białaczkowej leży poniżej progu wykrywalności metody.

W ilościach S i Ca, pierwiastków nie odgrywających prawdopodobnie żadnej roli w patogenezie białaczki, nie stwierdzono różnic między zwierzętami chorymi i zdrowymi.

Kumulacja metali ciężkich w tkankach zmienionych białaczkowo ma prawdopodobnie charakter wtórny w stosunku do zakażenia leukowirusem (14). Przyjmuje się bowiem, że chemiczne substancje karcinogenne mogą wywierać swe działanie przez aktywizację onkogennych wirusów latentnych. Do czynników aktywizujących należy np. DMSO (dwumetylosulfotlenek), który ujawnia cząstki R w transformowanych wirusem Polyoma komórkach chomika, czy siarczan hydrazyny, powodujący u myszy powstawanie guzów, w których stwierdza się cząstki C, niewykrywalne w komórkach prawidłowych.

Leukowirus jako czynnik zapoczątkujący proces nowotworzenia prawdopodobnie sprzyja zwiększonemu przenikaniu do nich metali ciężkich, które z kolei jako kokarcinogeny sprzyjają transformacji blastycznej w kierunku komórek białaczkowych. Taki przypusz-



Ryc. 6. Schemat stadium rozwojowego limfocyta białaczkowego

czalny przebieg rozwoju zmian białaczkowych przedstawiono schematycznie na ryc. 6.

P i ś m i e n n i c t w o

1. Aleksandrowicz J., Dobrowolski J., Bolechata P., Bondarek Z., Glowina J.: Pol. Tyg. lek. 47, 1821, 1977.
2. Aleksandrowicz J., Kwiatkowski A.: Problemy 11, 24, 1979.
3. Anderson C. A.: Methods of biochemical analysis. New York 15, 147, 1967.
4. Band C. A., Bang S.: Proc. sixth Inter. Conf. 835, 1972.
5. Berg G. W., Burbank F.: Ann. N. Y. Acad. Sci. 1972, 249, 1966.
6. Farnsworth P. N., Piscopo I., Stoll B., Strafford M., Isaguirre E.: Proc. sixth Inter. Conf. 887, 1972.
7. Gibasiewicz W., Gibasiewicz K.: Medycyna Wet. 34, 500, 1978.
8. Gibasiewicz W., Gibasiewicz K.: Medycyna Wet. 35, 522, 1978.
9. Hall T. A., Cosslett V. E.: Proc. sixth Inter. Conf. 809, 1972.
10. Halme E., Vitalstoff 22, 59, 1961.
11. Halme E., Halme A.: Vitalstoff 4, 138, 1969.
12. Ingram F. D.: J. Histochem. Cytochem. 9, 716, 1972.
13. Ivanova E. N.: Ukr. biochem. Zur. 29, 474, 1957.
14. Jopek Z., Kaszubkiewicz C., Madej J. A.: Arch. exp. VetMed. (w druku).
15. Katsuyama S., Kato Y., Hasegawa S., Nakamura M.: Proc. sixth Inter. Conf. 829, 1972.
16. Lehrer G. M., Berkley C.: J. Histochem. Cytochem. 9, 710, 1972.
17. Niepołomski W., Soñniar M., Gierek A., Białas B.: Pol. Tyg. lek. 29, 257, 1974.
18. Proceedings of the sixth International Conference on x-ray optics and microanalysis. University of Tokyo Press, 1972.
19. Robertson A. J.: Phys. med. Biol. 13, 505, 1968.
20. Saunders R. L. de C. H., Carvallo V. R., Cutmore H.: Proc. sixth Inter. Conf. 895, 1972.
21. Sipponen P., Sipponen J., Isomdlet Y., Sivula A.: Acta histochem. 64, 179, 1979.

Adres autora: dr Janusz A. Madej, ul. Nowowiejska 118/5, 50-340 Wrocław.

Мадей Я., А., Кашубкевич Ч., Сьвѣткѣвич Б. — Уровень тяжелых металлов и других элементов в лейкоэмических лимфоцитах в свете рентгеновского микроанализа.

В лимфатических узлах коров, больных лимфатической лейкемией, определили уровень и локализацию тяжелых металлов, а также других элементов периодической системы Менделѣева (без легких элементов) при помощи рентгеновского микроанализатора (MAR) — JXA-5 А. В цитоплазме лимфоидальных лейкоэмических клеток обнаружили наличие Cu, Pb, Os, O и Ca. Веклеточно не нашли в MAR никаких элементов. У лейкоэмических коров наблюдали рост уровня тяжелых металлов в лимфоидальных клетках по сравнению с лимфоцита-

ми здоровых животных. Кумуляция тяжелых металлов в тканях, измененных лейкемически, носит, правдоподобно вторичный характер по отношению к инфекции лейковирусом. Лейковирус изменяет физико-химические свойства клеток, что способствует, вероятно, проникновению в них тяжелых металлов, которые в свою очередь как кокарциногены способствуют бластической трансформации в направлении лейкемических клеток.

Madaj J. A., Kaszubkiewicz C., Świątkiewicz B. — **The level of heavy metals and other elements in lymphocytes of leukemic cows in the light of the roentgen microanalysis.**

The authors determined the level and localization of heavy metals and other elements of the Mende-

lejev's tabl (excluding light elements) in lymph nodes of cows with lymphocytic leukaemia by the use of the roentgen microanalysis (MAR) JXA<sup>-5</sup> A. In the cytoplasm of lymphoid leukaemic cells were found the following elements: Cu, Pb, Os, S and Ca. Extracellularly were not found any elements. In leukaemic cows an increase of heavy metals in lymphoid cells in comparison to lymphocytes of healthy animals was observed. Accumulation of heavy metals in pathological tissues has probably a secondary character to the infection with a leukovirus. The virus altering physico-chemical properties of cells enables penetration of heavy metals into the cells, and hence heavy metals acting as carcinogenic factors favor blastic transformation of the cells into leukaemic ones.

HENRYK JANOWSKI, JANUSZ MYSZKA, ANDRZEJ KONCICKI

## Wyniki leczenia enzootycznej bronchopneumonii u świń nowym preparatem pn. „Dynamutilin-Squibb-Sons”

Z Instytutu Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych Wydziału Weterynaryjnego AR-T w Olsztynie

W poprzednich badaniach (1, 2) nad wpływem leczniczym i zapobiegawczym preparatu „Dynamutilin” w dyzenterii świń spostrzeżono, że zwierzęta, u których stosowano ten preparat wykazywały również zwiększoną żerność, poprawę kondycji, oraz większe „na oko” przyrosty masy ciała. Odnosiło się to także do świń chorych wśród objawów enzootycznej bronchopneumonii.

Postanowiono zatem zbadać wpływ wymienionego preparatu na kliniczny przebieg enzootycznej bronchopneumonii u świń chorych oraz na dzienne przyrosty ich masy ciała.

### Material i metody

Do badań użyto:

1. Preparat „Dynamutilin” firmy „Squibb-Sons”, którego wzór strukturalny, właściwości fizyko-chemiczne, zakres skuteczności antybakteryjnej oraz sposób stosowania podano w doniesieniu poprzednim (1). Jest to nowy półsyntetyczny antybiotyk, będący pochodną pleuromulinu — naturalnego antybiotyku produkowanego przez grzyby *Pleurotus mutilus*. Lek ten sporządzany jest bądź jako proszek do stosowania per os wraz z wodą lub/i paszą bądź jako płyn do wstrzykiwania domięśniowego pn. „Tiamulin pro inj. W badaniach niniejszych użyto preparatu „Dynamutilin — Pulver” według schematu przedstawionego w tab. 1.

2. Świnie rasy krajowej o masie ciała 60—80 kg, żywiące standardowo, przebywające w chlewni RZD AR-T St. D., u których widoczne były b. wyraźne kliniczne objawy enzootycznej bronchopneumonii. Podzielono je na 7 grup, z których gr. I i gr. VII stanowiły kontrolę, pozostałe zaś były grupami badanymi według schematu podanego w tab. 1.

W celu zbadania wpływu różnego sposobu stosowania preparatu „Dynamutilin-P” na przyrosty masy ciała świń w poszczególnych grupach, każdą z nich ważono czterokrotnie, a mianowicie: przed rozpoczęciem (dzień 0) oraz 7, 19 i 28 dnia po rozpoczęciu leczenia. Następnie obliczano na tej podstawie średnie przyrosty dzienne w okresach między kolejnymi ważeniami oraz w całym okresie 28 dni trwania doświadczenia.

### Wyniki i omówienie

Wyniki uzyskane w badaniach wpływu leczniczego preparatu „Dynamutilin” na świnie chore z objawami enzootycznej bronchopneumonii zebrane są w tab. 2.

Tab. 1. Schemat użycia preparatu „Dynamutilin” u świń chorych na enzootyczną bronchopneumonię

Zwierzęta		Lek i dawka	Sposób i czas podawania leku
grupa	liczba		
I	10	—	zwierzęta kontrolne nie leczone
II	8	„Dynamutilin” 50 mg/kg m.c.	5 dni z wodą i 5 dni z paszą
III	10	„	10 dni z wodą
IV	10	„	10 dni z paszą
V	8	„	5 dni z wodą
VI	9	„	5 dni z paszą
VII	10	Polzomycyna 10 g/szt.	zwierzęta kontrolne leczone przez 5 dni z paszą

Tab. 2. Kliniczne wyniki leczenia enzootycznej bronchopneumonii u świń preparatem „Dynamutilin”

Zwierzęta		Liczba świń z klinicznymi objawami choroby dni doświadczenia				
grupa	liczba	0	7	19	28	60
I	10	10/10*)	10/10	10/10	10/10	10/10
II	8	8/8	8/8	6/8	3/8	1/8
III	10	10/10	9/10	7/10	4/10	1/10
IV	10	10/10	10/10	10/10	9/10	7/10
V	8	8/8	7/8	4/8	3/8	2/8
VI	9	9/9	9/9	8/9	7/9	7/9
VII	10	10/1	10/10	9/10	8/10	6/10

Objaśnienia: \*) licznik oznacza liczbę zwierząt wykazujących kliniczne objawy choroby, mianownik — liczbę zwierząt w grupie.