

## ERITROCITNE INKLUZIJE U KLINIČKOJ I EKSPERIMENTALNOJ TOKSIKOLOGIJI

T. BERITIĆ

Izneseni su rezultati vlastitih ispitivanja eritrocitnih inkluzija koja su vršena kroz posljednjih 20 godina u Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada. Istaknuta je važnost tih inkluzija i njihovo mjesto u kliničkoj i eksperimentalnoj toksikologiji. Dvadesetogodišnja istraživanja obuhvatila su glavne neparazitarne inkluzije, dakle one tvorbe unutar eritrocita i njihovih matičnih stanica koje su morfološke manifestacije intracelularnih biokemijskih zbivanja. To su bazofilne punktacije eritrocita, Heinzova tjelešca, Schmauchova tjelešca te Grünbergove i Pappenheimerove siderotičke granulacije. Dokazano je nesumnjivo mijelogeno podrijetlo bazofilnih punktacija, morfološke sličnosti a biološke razlike Heinzovih i Schmauchovih tjelešaca te postojanje dviju varijanata siderotičkih granulacija.

Upravo se navršava 20 godina otkako je američki biokemičar *Granic* (1) opisujući kemizam i funkciju eritrocita sisavaca rekao da je crvena krvna stanica reagens velike osjetljivosti... Isto se toliko godina već navršilo otkako se u ovom Institutu proučavaju različite promjene eritrocita. U toku tih 20 godina rada pokazalo se da ta naoko homogena stanica periferne krvi, bez uočljive strukture i »gotovo bez života« (2), ali golemog regeneracijskog potencijala, doista može biti »reagens velike osjetljivosti« koji pouzdano otkriva rano djelovanje različitih kemijskih noksaa.

Eritrocit se može proučavati s pomoću morfoloških i s pomoću biokemijskih metoda. Danas, međutim, ta dva pojma nisu više odijeljena kao što su to nekada bila. U međuvremenu je posve jasno postalo da morfološke karakteristike i nisu ništa drugo nego manifestacije biokemijskih zbivanja, odnosno da su neka biokemijska zbivanja postala pristupačna i uočljiva upravo zbog svojih morfoloških manifestacija.

Neparazitske citoplazmatske tvorbe koje se pojavljuju kao morfološki fenomeni poremećenih biokemijskih zbivanja u eritrocitu, nazivljemo zajedničkim imenom eritrocitne inkluzije. To su bazofilne punktacije, Heinzova tjelešca, Schmauchova tjelešca, Grünbergove i Pappenheimerove siderotičke granulacije. Zadatak što smo ga prije 20 godina postavili bilo je proučavanje eritrocitnih inkluzija kao morfoloških

manifestacija biokemijskih zbivanja nastalih djelovanjem različitih egzogenih otrova. Međutim, budući da eritrocitne inkluzije nisu samo posljedica djelovanja egzogene nokse već su često i pratioci endogenih porcmćenja, bilo je potrebno proučiti i njihove biološke karakteristike. Štaviše, kako se neke od tih tvorbi vrlo često među sobom i zamjenjuju, pogotovo kada se pojave u isto vrijeme, trebalo je proučiti i njihove diferencijalne karakteristike.

Svrha je ovog zbirnog prikaza da se iznesu neki rezultati istraživanja o biološkim i diferencijalnim karakteristikama bazofilnih punktacija, Heinzovih tjelešaca, Schmauchovih tjelešaca, Grünebergovih siderotičkih zrnaca i Pappenheimerovih siderotičkih tjelešaca.

### 1. BAZOFILNE PUNKTACIJE

Budući da je pojava bazofilnih punktacija u eritrocitima u najužoj vezi s toksičkim djelovanjem olova, bilo je opravdano da se ta vrsta eritrocitnih inkluzija prva počne proučavati. Premda su danas već neke humoralne biokemijske promjene zbog svoje specifičnosti pouzdaniji znak djelovanja olova, ipak je jednostavno dokazivanje prisutnosti bazofilno punktiranih eritrocita ostalo još uvijek praktički najvažnije dijagnostičko pomagalo.

U vrijeme početka rada Instituta mišljenja o porijeklu i nastanku bazofilnih punktacija još su bila podijeljena. Medicina rada i u to je vrijeme još pod utjecajem klasične monografije o otrovanju olovom *Auba, Fairhalla, Minota i Reznikoffa* iz 1926. god. (3), koji pišu da olovo djeluje na mlade eritrocite u perifernoj cirkulaciji koagulirajući njihovu bazofilnu supstanciju, koja na taj način dobije zrnast izgled. *Hunter* (4) 1944. god. još uvijek podržava to mišljenje, a *Lloyd Davies* 1948. god., u svojoj knjizi »The Practice of Industrial Medicine«, tvrdi (5) da olovo nema nikakva djelovanja na koštanu srž. S druge strane, već su mnogo ranija osnovna hematološka istraživanja ukazivala na mijelogeno porijeklo fenomena bazofilnih punktacija. Naš je prvi zadatak u to vrijeme bio dovesti u sklad rezultate osnovnih, većinom eksperimentalnih, hematoloških istraživanja s potrebnim kliničkim ispitivanjima u medicini rada. Prva iskustva objavili smo već 1948. god. (6) i ukazali na naša opažanja da kod kliničkog otrovanja olovom veliki postotak normoblasta u srži sadržava bazofilne punktacije. Kasnije smo našli (7) da i kod velikog broj eksponiranih, a ne samo kod otrovanih, postoje uvijek u srži eritroblasti s bazofilnim punktacijama; ima ih u većem ili manjem broju, što u pravilu ovisi o stupnju ekspozicije. Time su bila stečena vlastita iskustva koja su nesumnjivo utvrdila mijelogeno porijeklo bazofilno punktiranih eritrocita. Štaviše, daljnjim proučavanjima morfoloških karakteristika koštane srži kod otrovanja olovom našli smo (8) ne samo veliki broj punktiranih eritroblasti već i izrazitu hiperplaziju eritropoetskih stanica srži. Problemi kvalitativnih

promjena u eritroblastima zauzeli su posebno mjesto u našim istraživanjima. U prvom redu trebalo je ispitati na uzorcima koštane srži ljudi otrovanih olovom da li su punktacije citoplazmatskog ili su pak kariogenog porijekla kako je to držala većina starih hematologa. Mislilo se, naime, da bi bazofilne punktacije bile ostaci fragmentirane jezgre eritroblasta (9, 10, 11), što se potkrepljivalo činjenicom da se broj punktiranih eritroblasta i eritroblasta s fragmentiranom (kariorektnom) jezgrom istovremeno povećava ili smanjuje. Premda je ta činjenica neosporna, jedan dio autora ipak već od početka podržava staro *Ehrlichovo* i *Askanazyjevo* mišljenje da su bazofilne punktacije citoplazmatskog porijekla. Naša opažanja na ljudima potvrdila su sumnju koju su izrazili *Stengel*, *White* i *Pepper* (12) da jezgra ne bi u isto vrijeme mogla biti i u stadiju aktivne mitoze i u karioreksi. Mi smo, naime, našli bazofilne punktacije ne samo u ortokromatskim normoblastima kod potpuno intaktne jezgre nego i u mladim polikromatskim stanicama, i to upravo u različitim stadijima mitoze (6, 8). Štaviše, mikrofotografijama smo dokazali da se brižljivim promatranjem razmaza koštane srži kod otrovanja olovom mogu naci svi prijelazi od košaraste ili mrežaste citoplazme do bazofilnih punktacija (8). Citokemijska istraživanja su definitivno dokazala da bazofilne punktacije daju negativnu Feulgenovu nuklearnu reakciju, tj. da se ne sastoje od dezoksiribonukleinske kiseline, već da je njihov afinitet prema bazičkim bojama uvjetovan prisustvom ribonukleinske kiseline, tj. da su one sastojak citoplazme. *Sano* (13) je pokazao da bazofilne punktacije nastaju zbog vitalne agregacije ribonukleinske kiseline oko mitohondrija, koji upravo kod otrovanja olovom persistiraju u eritrocitima, a inače iščezavaju (1). Uostalom, i najnovija istraživanja *Jensena*, *Morena* i *Bessisa* (14) pokazuju da su bazofilne punktacije morfološka varijacija abnormalnih ribosoma.

## 2. HEINZOVA TJELEŠCA

Heinzova tjelešca su poznata već od 1890. god., ali su istom kroz posljednja tri decenija, naročito zaslugom *Moeschlina* (15), privukla pažnju hematologa i toksikologa. Otkriće Heinzovih tjelešaca je, naime, i historijski vezano za toksikološka istraživanja, jer pada u vrijeme kada je čovjek počeo sve češće bivati izvrnut profesionalnom i terapijskom kontaktu s nizom kemijskih spojeva koji izazivlju stvaranje tih tvorbi. Štaviše, toksikološka istraživanja počela su se služiti fenomenom Heinzovih tjelešaca kao testom za toksičko djelovanje, i to ne samo u eksperimentalnim ispitivanjima in vivo nego i in vitro. Ta je posljednja činjenica otvorila široke mogućnosti eksperimentiranja s eritrocitima čovjeka in vitro. Uostalom, pristupačnost takva eksperimentiranja mnogo olakšava i mogućnost morfološkog proučavanja nastalih tvorbi. Vršeci takva ispitivanja in vitro, mi smo već 1951. god. objavili (16) zapažanja da broj i veličina Heinzovih tjelešaca osjetljivo ovise o ke-

mijskoj strukturi i o koncentraciji otrova. Tako smo povećavanjem koncentracije fenilhidrazina postizali sve sitnije i mnogobrojnije tvorbe, dok smo, naprotiv, s hidroksilaminom, povećavajući koncentracije, postizali sve krupnije tvorbe; fenilendiamin je pak uvijek i kod malih koncentracija i kod velikih, izazivao tvorbe slične onima od djelovanja hidroksilamina. Mi smo na ljudskim eritrocitima ponavljali pokuse što su ih s eritrocitima psa vršili *Bratley, Burroughs, Hamilton i Kern* (17) izazivajući u višećoj kapi stvaranje Heinzovih tjelešaca, pa smo opisali spontano izlaženje tvorbe iz eritrocita. Morfološke varijacije Heinzovih tjelešaca bile su inače nešto ranije poznate samo iz radova *Junga* (18), koji ih je detaljno proučavao s pomoću elektronskog mikroskopa. Na temelju promatranja morfoloških zbivanja *Jung* je došao do zaključka da Heinzova tjelešca nisu jedinstvene tvorbe budući da su ona, već prema vrsti i trajanju otrovanja, vrlo različita oblika i lokalizacije. Katkada se uopće i ne radi o distinktnim, kompaktnim, solitarnim ili multiplim »tjelešcima«, već samo s vrlo sitnim, nejednakim zrcima, često vidljivim tek elektronskim mikroskopom, pa *Jung* izbjegava i naziv »Heinzova tjelešca«. Naša su opažanja unutar dometa optičkog mikroskopa bila potpuno u skladu s tim opažanjima dobivenim s pomoću elektronskog mikroskopa. U najnovije vrijeme *Borges i Desforges* (19) pripisuju varijacije u veličini Heinzovih tjelešaca različitoj brzini stvaranja i različitim stadijima razvitka.

Individualne razlike u pojavi Heinzovih tjelešaca kod ljudi zabilježene su i kod kliničkih otrovanja a i kod djelovanja istog otrova in vitro. Na tu su činjenicu ukazali *Markoff*, 1943. (20) i *Reiner*, 1950. god. (21). Nešto kasnije (1956) i mi smo objavili (22) kliničko opažanje da su se pri jednakoj ekspoziciji m-dinitrobenzenu u jedne osobe pojavila brojna Heinzova tjelešca, a u druge se uopće nisu pojavila unatoč činjenici što su obje osobe imale izraženu i izmjerenu methemoglobinemiju. Tu činjenicu da isti otrovi kod nekih osoba uzrokuju stvaranje Heinzovih tjelešaca, a kod drugih ne, iskoristili su *Hochwald, Arnold, Clayman i Alving* (23), *Dern, Weinstein, LeRoy, Talmage i Alving* (24) te *Beuller, Dern i Alving* (25) za izradu jednostavnog laboratorijskog testa kojim se iz krvi in vitro s pomoću acetilfenilhidrazina može »očitati« koje će osobe stvarati Heinzova tjelešca i oboljeti od hemolitičke anemije ako dođu u kontakt s kemijskim spojem koji oksidira i precipitira bjelančevine eritrocita.

### 3. SCHMAUCHOVA TJELEŠCA

Eksperimentalno izazivanje Heinzovih tjelešaca ovisi o specijesu životinje. Mnogi autori navode da je mačka najosjetljivija. Ali vrlo je malo autora koji vode računa o činjenici da su u eritrocitima mačaka i »fiziološki« prisutne tvorbe koje, čini se, potpuno odgovaraju Heinzovim tjelešcima, a koje se u veterinarskoj literaturi nazivlju Schmauchova tjelešca, prema njemačkom patologu *Schmauchu* koji ih je 1899.

god. prvi put detaljno opisao (26). S obzirom na to spontano pojavljivanje Schmauchovih tjelešaca i na golem interes što su ga pobudila Heinzova tjelešca, očekivalo bi se da su Schmauchova tjelešca bila predmetom najdetaljnijeg istraživanja, tim više što se u novije vrijeme sve češće bilježe slučajevi i spontanog nastajanja Heinzovih tjelešaca u čovjeka. Budući da, suprotno očekivanju, nema nikakvih objavljenih radova o usporednom istraživanju Heinzovih i Schmauchovih tjelešaca, to smo tokom posljednjeg decenija zbog toga upravo Schmauchovim tjelešcima posvetili posebnu pažnju.

Od vremena njihova otkrića, Schmauchova tjelešca su pod tim imenom ili pod imenom Heinzova tjelešca bila spomenuta u svjetskoj literaturi samo u 14 publikacija, a samo je u 5 publikacija označen broj pregledanih mačaka; međutim, samo je u jednoj (i to neobjavljenoj) tezi broj ispitanih mačaka bio bar donekle dovoljan (22 životinje), pa ni sam *Schmauch* nije ispitao više od 15 mačaka. Zbog toga smo dugim i upornim skupljanjem nasumce uzetih životinja ispitali incidenciju čak u 94 mačke. Dob smo mogli približno odrediti u 63 mačke; dobni raspon iznosio je od 2 dana do 12 godina.

Morfologiju Schmauchovih tjelešaca proučavali smo upotrebom fazno-kontrastnog mikroskopa i supravitalnim bojadisanjem. Ustanovili smo (27) da se Schmauchova tjelešca, upravo kao i Heinzova, vide i u nativnom, nebojadisanom preparatu. Pogođeni eritrocit sadrži obično jednu okruglastu tvorbu, rijetko dvije ili više nepravilnih. U faznom mikroskopu mogli smo pratiti promjene koje dovode do oslobađanja Schmauchovih tjelešaca. Te promjene potpuno odgovaraju onima koje smo opisali kod oslobađanja Heinzovih tjelešaca izazvanih fenilhidrazinom *in vitro* u eritrocitima čovjeka (16), odnosno promjenama kod oslobađanja Heinzovih tjelešaca što su ih opisali *Bratley* i sur. (17) kod otrovanja pasa pirodinom. Tehnika nativnog prikazivanja Schmauchovih tjelešaca u faznom mikroskopu vjerojatno je u svijetu prvi put upotrijebljena za ovakva proučavanja kod tog rada u našem Institutu. Ta je tehnika od velike vrijednosti upravo za toksikološka ispitivanja jer isključuje svaku mogućnost utjecaja supravitalnih boja na nastajanje Schmauchovih tjelešaca a omogućuje eritrocitu zadržavanje u plazmi. Od kolike je to važnosti pokazali su *Webster, Liljegren* i *Zimmer* (28) ističući koliko je teško naći otopinu koja podržava eritrocite različitih specijesa morfološki nepromijenjene za vrijeme supravitalnog tretiranja. S druge strane, poznato je već od radova *Gutsteina* i *Walbacha* (29) da čak i sulfat nilskog modrila može sam po sebi izazvati stvaranje Heinzovih tjelešaca. Tehnika fazno-kontrastnog mikroskopiranja daje pak prednost direktne i adekvatne vizualizacije nativnih eritrocita koji lebde u svom prirodnom miljeu.

Upravo kao i Heinzova tako se i Schmauchova tjelešca bojadišu supravitalno i metilvioletom i sulfatom niskog modrila, ali su Schmauchova tjelešca naročito uočljiva svojom intenzivnom bazofilijom samo kad se bojadišu sulfatom nilskog modrila. Usporedbom nalaza Schmauchovih tjelešaca u faznoj optici i onih u supravitalnom bojadisanju, vidi

se da native inkluzije u faznoj optici nisu tako striktno ograničene na perifernu lokalizaciju u eritrocitu kao što su u bojadisanom razmazu. Čini se, osim toga, da su u nativnom preparatu te inkluzije manje nego u bojadisanom.

Incidencija Schmauchovih tjelešaca u eritrocitima mačke ne ovisi o dobi životinje. To smo mi dokazali Kruskal-Wallisovim testom (27) pokušavajući kod 63 životinje naći korelaciju incidencije i dobi. U literaturi se, naime, tvrdilo da samo stare mačke imaju Schmauchova tjelešca. Prema svim našim nalazima očito je da su Schmauchove spontane eritrocitne inkluzije morfološki identične s Heinzovim inkluzijama nastalima djelovanjem nekih otrova.

Ostaje, međutim, ipak jedna bitna i izvanredno važna biološka razlika. Poznata je činjenica da je kod ljudi neposredna posljedica pojave Heinzovih tjelešaca hemolitička anemija. Kod mačaka smo, naprotiv, pokazali (30) da ni visoka incidencija Schmauchovih tjelešaca nije popraćena padom eritrocita. Štaviše, kad se mačke koje već imaju Schmauchova tjelešca u eritrocitima otruju hidroksilaminom pa se kod istih tih mačaka tako izazovu još i Heinzova tjelešca, samo se kod polovice životinja izazove hemolitička anemija, ali sve mačke i bez ikakva liječenja prežive dozu otrova koja je inače, preračunato na kilogram tjelesne težine, višestruko smrtna za čovjeka. Prema tome, nama je uspjele dokazati paradoksnu rezistenciju mačkinih eritrocita na otrove koji izazivlju Heinzova tjelešca.

Pretpostavljajući da su za tu neočekivanu otpornost mačkinih eritrocita »zaslužni« stanični redukcionni mehanizmi, mi smo već prije nekoliko godina pristupili određivanju glukoza-6-fosfat dehidrogenaze i katalaze u mačkinim eritrocitima (31, 32). Očekivali smo da ćemo s obzirom na lako stvaranje Schmauchovih pa i Heinzovih tjelešaca naći snižene aktivnosti G-6-PD u eritrocitima mačke u usporedbi s aktivnošću tog enzima u eritrocitima ljudi. Našli smo, međutim, upravo obrnuto – povišene aktivnosti G-6-PD i normalne ili lagano povišene vrijednosti katalaze. Od kakvog su značenja povišene aktivnosti tih enzima – odgovornih za anatomske i funkcionalne integritet eritrocita – u prevenciji brze i opasne hemolize u otrovanih i neotrovanih mačaka – to još treba istražiti.

#### 4. GRÜNEBERGOVE I PAPPENHEIMEROVE SIDEROTIČKE GRANULACIJE

Abnormalno nakupljanje željeza, naročito u mitohondrijima eritroblasta, a katkada i u patološki zaostalim mitohondrijima eritrocita, može se naći kod talasemije major, refraktorne »sideroblastične« anemije, kongenitalne »sideroahrestične« anemije, kod anemije zbog deficita pirodiksina (B<sub>6</sub> vitamina) te kod oblika porfirije nazvanog porfirija kutaneja tarda (Porphyria cutanea tarda). Međutim, zanimljivo je da osim tih uzroka mogu i neke kemijske nokse izazvati nakupljanje željeza u mitohondrijima. Zbog te smo činjenice već od 1954. započeli ispitivanja te vrste eritrocitnih inkluzija.

Najpoznatija kemijska noksa koja dovodi do nakupljanja željeza u mitohondrijima je olovo: zbog djelovanja olova dolazi do inhibicije biosinteze hemoglobina na nekoliko stepenica. Na posljednjoj stepenici zbog inhibicije hemsintetaze ili Goldbergova enzima, ne ugrađuje se željezo. Sličan je uzrok nakupljanju željeza i kod djelovanja izoniazid hidrazida (INH). Kako je poznato, piridoksin je u obliku piridoksal-5-fosfata važan koenzim koji na »prvom koraku« biosinteze hemoglobina posreduje spajanje glicina i sukcinil-koenzima A. Manjak piridoksina može, dakle, spriječiti sintezu porfirina, a time i hemoglobina. Izoniazid hidrazid, kao antagonist piridoksal-5-fosfata, može dovesti do smetnja sinteze hemoglobina sve do ugradnje željeza u porfirinski prsten. Konačno, u najnovije vrijeme u više je publikacija dokazano da i kloramfenikol na neki, do sada još nerazjašnjen način blokira sintezu hemoglobina i dovodi do nakupljanja željeza – dakle do stvaranja siderotičkih granulacija.

Naše je zanimanje za ovu vrstu inkluzija iz razumljivih razloga prvenstveno bilo potaknuto proučavanjem djelovanja olova, pogotovu što je jedan dio autora (33, 34) isticao svojstvo siderotičkih inkluzija da se bojadišu ne samo reakcijom berlinskog modrila već i bojama po Romanowskom. To je dovelo do zabuna, čak i do identifikacije bazofilnih punktacija i siderotičkih granula (35). Odnos siderotičkih zrnaca prema bazofilnim punktacijama u eritrocitima ostao je dugo vremena nejasan uglavnom zbog česte koegzistencije tih dviju vrsta inkluzija i u istim individualnim eritrocitima. Dok su *Doniach*, *Grünerberg* i *Pearson* (36) već 1943. god. bili prilično sigurni da »granula siderocita nemaju nikakve veze s . . . bazofilnim punktacijama«, kasnije se na tu činjenicu nitko više nije obazirao. Istom se radovima vršenim u ovom Institutu (37, 38) utvrdilo da se radi o posve različitim intracelularnim tvorbama, koje se razlikuju ne samo citokemijski nego i po svojoj lokalizaciji u stanici: simultanim prikazivanjem kontrastno obojenih zrnaca i diferencijalnim fokusiranjem uz fotografiranje tzv. optičkih sekcija, pokazalo se (38) da su bazofilne punktacije i siderotička granula smješteni čak i u različitim razinama u stanici. Upravo na tu različitu lokalizaciju u našim nalazima pozivaju se nedavno *Jensen*, *Moreno* i *Bassis* (14) smatrajući naše radove potvrdom svojih rezultata dobivenih s pomoću elektronskog mikroskopa.

U toku tih radova nama je, međutim, uspjelo dokazati ne samo da su bazofilne punktacije i siderotičke granulacije dvije različite vrste inkluzija nego da čak postoje i dvije varijante samih siderotičkih granulacija. Kad je 1941. god. *Grüneberg* otkrio »eritrocite koji sadrže znatnu količinu slobodnog željeza«, nazvao ih je »siderociti«. Nedugo zatim *Pappenheimer*, *Thompson*, *Parker* i *Smith* (39) opisali su »eritrocite koji sadrže tjelešca s pozitivnom reakcijom na željezo«. Od tada se eritrociti sa sidero-pozitivnim inkluzijama vrlo mnogo proučavaju, ali se unatoč tome prešlo preko činjenice da Grünebergove sidero-pozitiv-

ne granulacije nisu identične s Pappenheimerovim tjelešcima, makar i ona daju pozitivnu reakciju na željezo. Mi smo pažljivim prikupljanjem svih objavljenih podataka tim dvjema vrstama sidero-pozitivnih inkluzija definirali čak pet različitih karakteristika: 1) dok se siderotičke granulacije Grünebergovih siderocita »mogu učiniti vidljivima samo s pomoću reakcije berlinskog modrila« (40, 41), dotle su Pappenheimerove inkluzije i bazofilne i siderotičke, tj. one se mogu bojadisati i s jednom od Romanowskijevih boja i s pomoću reakcije berlinskog modrila; 2) u nativnom, neobojenom preparatu Pappenheimerove inkluzije se »lijepo vide kao refraktilne i bezbojne strukture« (34), dok se slobodne željezne granulacije u Grünebergovim siderocitima ne vide u neobojenom razmazu (41); 3) svi se istraživači slažu da se siderotičke granulacije koje je opisao Grüneberg (40, 41) uvijek nađu i u matičnim stranicama crvene loze (»sideroblasti«) (42), čak i kad ih nema u zrelim eritrocitima periferne krvi. Naprotiv, Pappenheimerova tjelešca obojena bojama po Romanowskom rijetko su (ako uopće i jesu) dokazana u matičnim stanicama eritrocita čak i kad su nađena u velikom postotku u zrelim eritrocitima periferne krvi; 4) nema sumnje da se slobodna željezna Grünebergova zrnca kao što se vide u sideroblastima i u retikulocitima kasnije ugrađuju u hem (43, 44) »za vrijeme konačnog dozrijevanja retikulocita« (43), ali je malo vjerojatno da bi Pappenheimerova siderotička zrnca mogla biti upotrijebljena za sintezu hcma. Prema tome se i slobodna željezna zrnca mogu vidjeti u retikulocitima, ali se čini da Pappenheimerova tjelešca u retikulocitima nisu nikada bila opažena; 5) dok se siderotičke granulacije Grünebergovih siderocita nalaze u eritroblastima i eritrocitima bez obzira da li ispitivana osoba ima ili nema slezene, Pappenheimerova su se tjelešca do sada našla uglavnom, možda čak ako ne i jedino, kod splenektomiranih bolesnika. Uprkos tim očitim razlikama, obje vrste eritrocita koji sadrže slobodno željezo nazvane su zajedničkim imenom siderociti, pa je njihovo razlikovanje ostalo kroz mnoge godine zapostavljeno. Ta nas je činjenica potaknula na proučavanje diferencijalnih karakteristika obih vrsta tvorbi.

Rezultati naših višegodišnjih ispitivanja potvrdili su da doista postoje dvije vrste »siderocita«. Budući da je odlučna razlika među njima prisutnost ili odsutnost bazofilije njihovih granulacija, siderocite valja dijeliti u dvije varijante: 1) na siderocite s bazofilnim sidero-pozitivnim granulacijama, i 2) na siderocite s nebazofilnim sidero-pozitivnim granulacijama. Dok im se поближе ne sazna sastav i značenje, te dvije varijante siderocita mogle bi se ipak bar eponimski razlikovati, pa bi ih trebalo nazivati *Grünebergovi siderociti* i *Pappenheimerovi siderociti* (45). Inače bi valjalo prvobitnu Grünebergovu definiciju siderocita nadopuniti ovako: siderociti su svi oni eritrociti u kojima se primjenom reakcije berlinskog modrila otkrije slobodno željezo bilo u kojem obliku, bez obzira da li se prikazane tvorbe vide ili se ne vide i s pomoću neke druge metode prikazivanja (45). Međutim, makar se



siderociti i tako definirali, mislim da treba istaći glavnu razliku između Grünebergove i Pappenheimerove varijante: Grünebergovi siderociti mogu se naći, ma da u izvanredno malom broju, i u zdravih ljudi, dok Pappenheimerovi siderociti vjerojatno nikada nisu bili opisani u zdravih ljudi.

#### ZAKLJUČAK

Iznoseći ovaj prikaz htio sam istaknuti udio naših vlastitih ispitivanja u problemu eritrocitnih inkluzija. Gdje god je to metodika jednostavnog i konvencionalnog hematološkog ispitivanja dopuštala, pokušao sam dovesti u sklad rezultate osnovnih biokemijskih ispitivanja s rezultatima naših morfoloških hematoloških ispitivanja. U tom nastojanju uspjelo je dokazati neke do sada neopisane fenomene, naročito što se tiče kvalitativnih promjena u koštanoj srži kod otrovanja olovom, kod nastajanja Heinzovih tjelešaca djelovanjem različitih otrova te kod pokušaja njihove identifikacije sa Schmauchovim tjelešcima u mačke. Citokemijska ispitivanja siderotičkih inkluzija dovela su do prepoznavanja dviju varijanata tih inkluzija kao i do razlikovanja prema ostalim eritrocitnim inkluzijama.

#### Literatura

1. *Granick, S.*: Chemistry and Functioning of the Mammalian Erythrocyte, *Blood*, 4 (1949) 404.
2. *Ponder, E.*: Hemolysis and Related Phenomena, Grune & Stratton, New York, 1948.
3. *Aub, J., Fairhall, L., Minot, A., Reznikoff, P.*, Lead Poisoning, Williams & Wilkins, London-Baltimore, 1926.
4. *Hunter, D.*: Industrial Toxicology, London, 1944. (izdavač neoznačen).
5. *Lloyd-Davies, T.*: The Practice of Industrial Medicine, Churchill Ltd., London, 1948.
6. *Beritić, T.*: Hematologija trovanja olovom u klinici, patologiji i prevenciji industrijskog saturnizma, *Arh. med. rada*, 3 (1948) 224.
7. *Beritić, T., Vandekar, M.*: Morphologic Changes of Erythropoietic Cells in the Bone Marrow of Workers Exposed to Lead, *Atti XI Congresso Int. Med. Lav.*, Napoli, 1954.
8. *Beritić, T., Vandekar, M.*: Some Observations on the Morphology of Erythropoietic Cells in Human Lead Poisoning, *Blood*, 11 (1956) 114.
9. *Vaughan, U.*: *J. Med. Res.*, 10 (1903) 342., cit. *Beritić, T.*: Toksikološko značenje eritrocitnih inkluzija, *Arh. hig. rada*, 8 (1957) 97.
10. *Cadwalader, W.*: A Study of the Blood in Lead Poisoning with a Description of the Bone Marrow of one Fatal Case, *Bull. Ayer Clin. Lab. Penn. Hosp.*, 3 (1906) 44.
11. *Ferrata, A.*: *Fol. haematol.*, 9 (1910) 253, cit. *Beritić, T.*: Toksikološko značenje eritrocitnih inkluzija, *Arh. hig. rada*, 8 (1957) 97.

12. *Stengel, A., White, C., Pepper, W.*: Am. J. Med. Sci., 123 (1902) 872, cit. *Beritić, T.*: Toksikološko značenje eritrocitnih inkluzija, Arh. hig. rada, 8 (1957) 97.
13. *Sano, S.*: Studies on the Nature of the Basophilic Stippled Cells in Lead Poisoning Report I. Studies on the Cytological Investigation of Basophilic Stippled Cells, Acta Haemat. Jap., 18 (1955) 625.
14. *Jensen, W. N., Moreno, G. D., Bessis, M. C.*: An Electron Microscopic Description of Basophilic Stippling in Red Cells, Blood 25 (1965) 933.
15. *Moeschlin, S.*: Innkörper-Anämien durch Entstehung von Methämoglobin infolge Dagénan-Wirkung (Sulfapyridin), Schweiz. med. Wschr., 70 (1940) 786.
16. *Beritić, T.*: Heinzova tjelešca u kliničkoj i eksperimentalnoj toksikologiji, Arh. hig. rada, 2 (1951) 311.
17. *Bratley, F. G., Burroughs, H. H., Hamilton, D. M., Kern, C.*: The Effect of Pyrodin Poisoning on the Blood and Hemolytopoietic System with Especial Reference to the Formation of Heinz-Ehrlich Bodies in Vivo and Vitro, Am. J. Med. Sci., 182 (1931) 597.
18. *Jung, F.*: Ueber toxische Schädigungen an Erythrocyten, Klin. Wschr., 24/25 (1946-1957) 459.
19. *Borges, A., Desforges, J. F.*: Studies of Heinz Body Formation, Acta haemat., 37 (1961) 1.
20. *Markoff, N.*: Ueber Veränderungen des Blutes im Verlauf der Therapie mit Sulfanilamid und seinen Derivaten, Schweiz. med. Wschr., 73 (1943) 656.
21. *Reiner, E.*: Innkörperbildung, Wien. klin. Wschr., 62 (1950) 656.
22. *Beritić, T.*: Two Cases of m-Dinitrobenzene Poisoning with Unequal Clinical Response, Brit. J. industr. Med., 13 (1956) 114.
23. *Hochwald, R. S., Arnold, J., Clayman, C. B., Alving, A. S.*: Status of Primaquine. 4. Toxicity of Primaquine in Negroes, J. A. M. A., 149 (1952) 1568.
24. *Dern, R., Weinstein, I. M., LeRoy, G. U., Talmage, D. W., Alving, A. S.*: The Hemolytic Effect of Primaquine. I. The Localization of the Drug-Induced Hemolytic Defect in Primaquine-Sensitive Individuals, J. Lab. & Clin. Med., 43 (1954) 303.
25. *Beutler, E., Dern, R. J., Alving, A. S.*: The Hemolytic Effect of Primaquine. VI. An in Vitro Test for Sensitivity of Erythrocytes to Primaquine, J. Lab. Clin. Med., 45 (1955) 40.
26. *Schmauch, G.*: Ueber endoglobuläre Körperchen in den Erythrocyten der Katze, Virchows Arch. Path. Anat., 156 (1899) 201.
27. *Beritić, T.*: Studies on Schmauch Bodies, I. The Incidence in Normal Cats (*Felis domestica*) and the Morphologic Relationship to Heinz Bodies, Blood, 25 (1965) 999.
28. *Webster, H. S., Liljegren, E. J., Zimmer, D. J.*: Heinz Body Formation by Certain Chemical Agents, J. Pharmacol. exper. Therapeut., 95 (1949) 201.
29. *Gutstein, M., Walbach, G.*: Ueber den Bau des Erythrocyten. III. Mitteilung. Untersuchungen über die Heinz-Ehrlichschen hämoglobinämischen Innkörper, Virchow's Arch. Path. Anat., 267 (1928) 144.
30. *Beritić, T., Prpić-Majić, D.*: Heinz Bodies, Schmauch Bodies and Toxic Haemolysis in Cats, Proc. XV Int. Kongress Arbeitsmed., Wien, 1966. A III-80.
31. *Beritić, T., Prpić-Majić, D.*: Heinzova (Schmauchova) tjelešca i aktivnost G-6-PD u eritrocitima mačaka, Izvještaj Šav. fonda za naučni rad br. 2921/1, 1964.
32. *Beritić, T., Prpić-Majić, D.*: Proučavanje pojave eritrocitnih inkluzija u vezi s aktivnosti katalaze u eritrocitima, Izvještaj Republičkom fondu za naučni rad br. 2c, 1963.
33. *Dacie, J. U., Doniach, I.*: The Basophilic Property of the Iron-Containing Granules in Siderocytes, J. Path. Bact., 59 (1947) 684.

34. *McFadzean, A. J. S., Davis, L. J.*: Iron Staining Erythrocyte Inclusions with Especial Reference to Acquired Haemolytic Anaemia, *Glasg. med. J.*, 23 (1947) 237.
35. *Sundberg, R. D., Broman, H.*: The Application of the Prussian Blue Stain to Previously Stained Films of Blood and Bone Marrow, *Blood*, 10 (1955) 160.
36. *Doniach, I., Grüneberg, H., Pearson, J. E.*: The Occurrence of Siderocytes in Adult Human Blood, *J. Path. Bact.*, 55 (1943) 23.
37. *Beritić, T., Grgić, Z., Sirec, A.*: Iron Containing Blood Cells in Human Lead Poisoning, *Proc. XII Int. Congress Occup. Health, Helsinki*, 3 (1957) 184.
38. *Beritić, T.*: Siderotic Granules and the Granules of Punctate Basophilia, *Brit. J. Haemat.*, 9 (1963) 185.
39. *Pappenheimer, A. M., Thompson, W. P., Parker, D. D., Smith, K. E.*: Anaemia Associated with Unidentified Erythrocytic Inclusions, After Splenectomy, *Quar. J. Med. N. S.*, 14 (1945) 75.
40. *Grüneberg, H.*: Siderocytes: A New Kind of Erythrocyte, *Nature* 148 (1941) 114.
41. *Grüneberg, H.*: The Anaemia of Flexed-Tailed Mice (*Mus musculus L.*). II. Siderocytes. *J. Genetics*, 44 (1942) 246.
42. *Kaplan, E., Zuelzer, W. W., Mouriquand, C.*: Sideroblasts. A Study of Stainable Nonhemoglobin Iron in Marrow Normoblasts, *Blood*, 9 (1954) 203.
43. *Mollin, D. L.*: Sideroblasts and Sideroblastic Anaemia, *Brit. J. Haemat.*, 11 (1965) 41.
44. *Dacic, J. U., Mollin, D. L.*: Siderocytes, Sideroblasts and Sideroblastic Anaemia, *Acta med. Scand. Suppl.*, 445 (1966) 237.
45. *Beritić, T.*: The Two Variants of Siderocytes, u štampi.
46. *Beritić, T.*: Siderociti, sideroblasti i sideroblastičke anemije, *Lij. vjes.*, 88 (1966) 1083.