

T. KRZYMOWSKI, H. KRZYMOWSKA

NERWOWA I HUMORALNA REGULACJA PROCESÓW KRWIOTWÓRCZYCH U ZWIERZĄT

II. BADANIA NAD CZYNNIKIEM ERYTROPOETYCZNYM UZYSKANYM Z OSOCZA DOŚWIADCZALNIE ANEMIZOWANYCH OWIEC

Z Katedry Fizjologii Zwierząt Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego
i Laboratorium Fizjologii na terenie Ogrodu Zoologicznego w Warszawie
Kierownik: prof. dr B. Gutowski

W 1906 roku *Carnot* i *Deflandre* ogłosili wyniki badań wykazujące, że osocze pobrane od zanemizowanych przez upusty krwi królików, wstrzyknięte następnie innym, normalnym, pobudza u nich erytropoezę, powodując wzrost liczby erytrocytów i hemoglobiny we krwi (5).

Przez przeszło 50 lat od tego odkrycia prowadzono wielokierunkowe badania nad czynnikiem pobudzającym erytropoezę, nazwanym przez *Carnot* i *Deflandre* hemopoetyną.

Spostrzeżenia autorów francuskich wymagały przede wszystkim potwierdzenia w licznych powtórzeniach, które dały prace *Gibellego* (15) w 1911 roku, *Müllera* (36) w 1912 r., *Yu-Tin-Tei* (42) w 1938 r. i wielu innych. W Polsce w 1934 roku *Rozenfeld* opracowuje „Działanie lecznicze surowicy hemopoetycznej w stanach niedokrwistości w chirurgii” (40), a w rok później *Aleksandrowicz* ogłasza „Wpływ surowicy hemopoetycznej na szybkość odnowy krwi” (1).

Nie wszyscy autorzy podejmujący ten temat powtarzają doświadczenia *Carnot* z wynikiem dodatnim. Brak wpływu osocza anemicznego na pobudzenie erytropoezy podają prace *Boycotta* i wsp. z 1911 r. (4), *Leffkowitz* i wsp. z 1926 r. (31), oraz *Gordona* i wsp. z 1934 r. (19). Mimo kilku cytowanych prac, negujących spostrzeżenie *Carnot* i *Deflandre*, narastają stale doświadczenia, potwierdzające istnienie hemopoetyny i rozszerzające zakres badań nad jej działaniem. Stwierdzono, że na powstawanie hemopoetyny we krwi krążącej wpływa stosunek, jaki zachodzi między ilością dostarczanego, organizmowi tlenu, a zapotrzebowaniem tkanek organizmu na tlen (13, 14). Stąd też najprostszą metodą, służącą do wytworzenia hemopoetyny we krwi krążącej jest niedotlenienie organizmu, powsta-

jące na tle zmniejszenia ilości erytrocytów przez jednorazowe (5, 14), lub wielokrotne skrwawianie zwierzęcia (6, 7, 10, 12, 14, 32). Hemopoetyna (erytropoetyna) powstaje również we krwi zwierząt i ludzi, poddanych wpływowi niskiego ciśnienia, przy odpowiednio niższym ciśnieniu parcjalnemu tlenu. Pierwsze obserwacje tego typu przeprowadził Förster (11), potwierdziło zaś to wielu innych autorów (30, 39, 42 i in.). W ostatnich latach jako bodźca, wywołującego powstawanie erytropoetyny we krwi, używano soli kobaltu (18, 17, 27). Ponadto stosowano też fenylhydrazynę, której iniekcje powodowały anemizację zwierząt (20, 22, 32, 38).

Równocześnie prowadzono badania nad tym, gdzie jeszcze, poza krwią krążącą, można znaleźć w organizmie (poddanym wyżej wymienionym bodźcom) erytropoetynę. Stwierdzono jej obecność w moczu (38) i mleku (38). Nie wykazano obecności erytropoetyny w wyciągach z mózgu, wątroby, śledziony, tarczycy, płuc, mięśni, przewodu pokarmowego i szpiku zwierząt anemizowanych fenylhydrazyną (22, 38 i in.). Nie potwierdzono też dotąd wyników Gordona i wsp. (21), którzy wykazali nieznaczną aktywność hemopoetyczną wyciągów z komórek krwi i wątroby zwierząt anemizowanych.

W warunkach fizjologicznych zwiększony poziom erytropoetyny stwierdzono w osoczu krwi pępowinowej u noworodków ludzkich (2, 8, 41) u płodu owczego (3) i u płodu psa (33).

Szereg autorów usiłuje wyjaśnić budowę chemiczną erytropoetyny i zbadać jej właściwości fizyczne. Carnot i Deflandre uważali, że temperatura 56°C rozkłada erytropoetynę, Doring i wsp. (9) podnoszą tę granicę do 67°C, a Gordon i wsp. (20, 22), oraz inni gotują osocze, zawierające erytropoetynę, w ciągu 10 minut, używając następnie odsączonego filtratu, jako stymulatora erytropoezy. Gley i Delor zaliczają erytropoetynę do grupy sterydów trzy-keto-mono-alkoholowych (16), Erslev i Lavietes uważają, że jest ona związana z albuminami, lub α i β globulinami (10), Hodgson i Toha zaliczają ją hipotetycznie do grupy estrów kwasów tłuszczowych (25). Ostatnie badania Rambacha i wsp. (38) z 1957 r. sugerują, że erytropoetyna, związana z α -2 globuliną (nie wytrącająca się gotowaniem i kwasem nadchlorowym), nie dializuje i należy przypuszczalnie do mukoproteidów.

Badania nad miejscem powstawania erytropoetyny w organizmie prowadzono usuwając dawcom osocza przysadkę mózgową, nadnercza, tarczycę, gonady i śledzionę, a następnie poddając zwierzęta bodźcom działającym na wytworzenie erytropoetyny. Wszystkie te zabiegi, stosowane łącznie, lub oddzielnie, nie zmieniały zdolności organizmu do wytwarzania erytropoetyny (13, 17, 27). Dopiero Jacobson i wsp. w 1957 roku (26) usuwając obie nerki u szczurów, lub królików, stwierdzili następczy zanik zdolności organizmu do wytwarzania erytropoetyny pod wpływem skrwaw-

wiania, lub soli kobaltu. Pozostaje jednak nadal otwartym problemem, czy erytropoetyna powstaje w nerce, w gotowej postaci, czy jako pro-hormon, uczynniany gdzie indziej, czy też powstając w jakiejś innej części organizmu, dopiero w nerce ulega aktywacji.

Osocze zawierające erytropoetyne podawano biorcom w rozmaitych postaciach: pełnego osocza (5, 14, 18), przesącza osocza odbiałczanego na drodze gotowania (20, 25, 38), lub wysalania (10, 38).

Podawanie osocza, lub jego preparatów, stosowano w jednorazowej dużej dawce (5, 13), w trzech kolejnych codziennych dawkach (14, 27, 35), lub w małych dawkach przez dłuższy okres czasu (22, 24, 27). Przygotowane płyny podawano podskórną, dożylną, lub dootrzewnowo, w rozmaitej ilości, obliczonej w stosunku do wagi ciała, lub objętości krwi krążącej.

Dla ustalenia wpływu podawanej erytropoetyny na zmiany we krwi biorcy, początkowo badano u niego tylko wzrost ilości erytrocytów i poziomu hemoglobiny (5), później uzupełniano te dane podawaniem wartości hematokrytu i poziomu retikulocytów. Niektórzy wprowadzają dodatkowo badanie szpiku i śledziona (27). Ostatnio aktywność erytropoetyny oznacza się badając stopień włączania (inkorporacji) Fe^{59} przez nowotworzące się erytrocyty (13, 13, 26, 27, 37). Stwierdzono, że na wpływ erytropoetyny najpodatniejsze są zwierzęta uprzednio hipofizektomowane i głodzone (13, 18), oraz zwierzęta umieszczone w atmosferze tlenu (14), lub z wytworzoną sztucznie policytemią (27). Niepodatne na wpływ erytropoetyny są zwierzęta, którym uprzednio robiono iniekcje dinitrofenolu.

BADANIA WŁASNE

Dotychczasowe badania nie wyjaśniają, czy erytropoetyna działa pośrednio, czy też bezpośrednio na tkankę krwiotwórczą. Przystępując do doświadczeń, których celem ma być odpowiedź na powyższe pytanie, uważaliśmy za konieczne zbadanie możliwości podawania biorcom jak najmniejszych ilości płynu zawierającego erytropoetyne i tak spreparowanego, żeby nie naruszając normalnych procesów fizjologicznych organizmu, oddziaływał wyłącznie erytropoetycznie.

Równocześnie chodziło o wytypowanie dawcy, u którego najprostszymi metodami laboratoryjnymi udałooby się osiągnąć dostateczny stopień produkcji erytropoetyny, przy możliwości otrzymywania naraz dużej ilości plazmy, potrzebnej dla przygotowania stosowanych w doświadczeniu preparatów.

Po opracowaniu części metodycznej przystąpiono do zbadania wpływu przygotowanego preparatu na krew krążącą i układ krwiotwórczy białych myszek i królików.

METODYKA

Badania wykonano na 4 owcach, 22 białych myszkach i 20 królikach.

Uzyskiwanie „normalnego” i „anemicznego” osocza od owiec. Po ustaleniu liczby erytrocytów i poziomu hemoglobiny w krwi owcy, wstrzykiwano jej dożylnie 10 000 jednostek heparyny, po czym przez nakłucie żyły jarzmowej zewnętrznej robiono pierwszy upust krwi w ilości około $\frac{1}{4}$ krwi krążącej. Z krwi tej, po odwirowaniu, uzyskiwano osocze, które nazwano osoczem normalnym. Przygotowanie owiec-dawców osocza „anemicznego” wykonano dwiema metodami, w celu zbadania wpływu dwukrotnego i kilkakrotnego skrwawiania tych zwierząt na aktywność erytropoetyczną otrzymywanego od nich osocza. U dwóch owiec, po otrzymaniu od nich osocza normalnego w wyniku pierwszego upustu, pobierano następnie krew po 24 godzinach i po 48 godzinach, każdorazowo w ilości około 800 ml (przy wadze ciała zwierzęcia około 45 kg). Z krwi tej, po odwirowaniu, otrzymano osocze anemiczne, które następnie poddawano dalszemu zabiegom (patrz str. 6) w celu otrzymania erytropoetycznego zagęszczonego przesącza. Osocze to oznaczono nr 1.

U następnych dwóch owiec anemizacja trwała dłużej. Po wstępnym otrzymaniu osocza normalnego, zwierzęta skrwawiano drugiego, czwartego, piątego i szóstego dnia, po około 600—800 ml krwi dziennie. W sumie w ciągu 6 dni pobierano u każdej owcy ilość krwi równoważną ilości posiadanej przez nią krwi krążącej. Poziom hemoglobiny obniżał się z około 9 gramów do około 4,5 gramów w 100 ml krwi. Po upływie 48 godzin od ostatniego upustu, w ósmym dniu doświadczenia, pobierano od tych owiec maksymalnie dużą ilość krwi (tak, by zwierzęta pozostały żywe), w celu przygotowania z niej osocza anemicznego, oznaczonego nr 2. Osocze normalne oraz anemiczne nr 1 i nr 2 przygotowywano modyfikując nieco metodę Gordona i wsp. Przez dodanie 1 n HCl doprowadzano pH osocza do 5,5 po czym umieszczano je na łaźni wodnej i trzymano w gotującej się wodzie przez 10 minut. Po przesączeniu osad przemywano niewielką ilością gorącej destylowanej wody. Przesącz odparowywano na łaźni wodnej przy temperaturze niższej od 50°C w ciągu około 20 godzin uzyskując dziesięciokrotne zagęszczenie płynu w stosunku do wyjściowej ilości osocza (1 ml zagęszczonego przesącza równa się 10 ml osocza). Zagęszczony przesącz dzielono następnie na dwie części: jedną z nich doprowadzano 1 n NaOH do pH 7,4, drugą do pH 8,4. Obie części zagęszczonego przesącza zagotowywano i zlewano do oddzielnych jałowych naczyń.

Jako biorców użyto białe myszki i króliki. Przygotowany płyn wstrzykiwano zwierzętom podskórnie, stosując następujące dzienne dawki, przypadające na jedno zwierzę doświadczalne:

I grupa (6 myszek) — zagęszczony przesącz normalnego osocza o pH 8,4 w dawce 0,2 ml w ciągu 10 dni.

II grupa (6 myszek) — zagęszczony przesącz anemicznego osocza nr 1, o pH 8,4 w dawce 0,2 ml w ciągu 10 dni.

III grupa (5 myszek) — zagęszczony przesącz normalnego osocza o pH 7,4 w dawce 0,2 ml w ciągu 10 dni.

IV grupa (5 myszek) — zagęszczony przesącz anemicznego osocza nr 1 o pH 7,4 w dawce 0,2 ml w ciągu 10 dni.

V grupa (5 królików) — płyn fizjologiczny w dawce 0,8 ml w ciągu 10 dni.

VI grupa (5 królików) — zagęszczony przesącz normalnego osocza o pH 7,4 w dawce 0,8 ml w ciągu 10 dni.

VII grupa (5 królików) — zagęszczony przesącz anemicznego osocza nr 1 o pH 7,4 w dawce 0,8 ml w ciągu 10 dni.

VIII grupa (5 królików) — zągęszczony przesącz anemicznego osocza nr 2 o pH 7,4 w dawce 0,8 ml w ciągu 10 dni.

Wpływ badanych płynów na krew i układ krwiotwórczy biorców ustalano przez obliczanie liczby ratikuloctów i erytroctów, obliczanie ilości hemoglobiny, hematokrytu i wskaźników hematokrytowych, oraz badanie narządów krwiotwórczych. Badanie narządów krwiotwórczych obejmowało grupy doświadczałne III, IV, VI, VII, przy czym u królików szpik pobierano przyżyciowo, z guza siedzeniowego, u myszek zaś rozmazy szpiku i śledziony pobierano po zabiciu zwierząt. Na rozmazie szpiku obliczano 500 komórek jądrzastych. Ustalano stosunek procentowy między erytroblastami, a pozostałymi komórkami, jak również stosunki pomiędzy poszczególnymi formami rozwojowymi układu erytroblastycznego. Na podstawie powyższych obliczeń sporządzano krzywe rozwoju erytroctów.

Przesącz osocza normalnego i anemicznego poddawano analizie elektroforetycznej i chromatograficznej, w kierunku ustalenia obecności frakcji białkowych i wolnych aminokwasów. Badania elektroforetyczne frakcji białkowych przeprowadzano w buforze weronalowym, o pH 8,6 przy napięciu około 250 Volt i zużyciu na pasek 1,3—1,5 mA. Elektroforegramy wywoływano roztworem alkoholowym błękitu bromofenolowego. Analizę chromatograficzną wolnych aminokwasów przeprowadzano metodą chromatografii jednokierunkowej, wstępującej, używając n-butanolu z kwasem octowym i wodą (4:1:5), oraz metodą chromatografii dwukierunkowej, stosując fenol z buforem o pH 2 i wyżej wymienioną mieszaninę butanolu z wodą i kwasem octowym (28, 34).

Próby na obecność bilirubiny w przesączu osocza anemicznego i normalnego wykonano metodą Van den Bergha.

Wyniki dotyczące ilości erytroctów i retikuloctów poddano analizie statystycznej, obliczając średnie odchylenie od średniej arytmetycznej, średni błąd, oraz wskaźnik istotnej różnicy.

WYNIKI

Pierwszej grupie myszek wstrzykiwano zągęszczony przesącz osocza nr 1 od owiec anemizowanych. Grupa druga, traktowana jako kontrolna, otrzymywała przesącz osocza otrzymywanego od normalnych, nieanemizowanych owiec. Oba płyny doprowadzano do pH 8,4. Po pięciu dniach doświadczenia (5 iniekcji) różnica między grupą doświadczałną i kontrolną wynosiła 1 300 000 erytroctów w mm^3 , oraz 1,5 g hemoglobiny w 100 ml krwi, na korzyść grupy doświadczałnej, z tym jednak, że różnica ta wynikała przede wszystkim z obniżenia się poziomu erytroctów i hemoglobiny w grupie kontrolnej, przy nieznacznym wzroście u grupy doświadczałnej. Na obserwowane zjawisko zmniejszenia się ilości erytroctów i hemoglobiny u myszek kontrolnych, wpływały według naszych obserwacji dwa czynniki: a) ujemny wpływ częstego pobierania krwi do analizy (anemizacja), b) ujemny wpływ pH stosowanego przesączu (zgodnie z metodą Gordona pH to wynosiło 8,4). Po dziesięciu dniach doświadczenia liczba erytroctów w grupie doświadczałnej była już większa tylko o 800 000 od liczby erytroctów w grupie kontrolnej. Zaobserwowano przy tym, że wstrzykiwanie roztworu o pH 8,4 związane jest

z odczuwaniem bólu przez myszki (niepokój, pisk, drapanie się). W czasie doświadczenia i po doświadczeniu u obu grup stwierdzono wypadanie włosów, oraz wyraźne zgrubienia skóry w miejscach iniekcji. W związku z powyższym, aby usunąć czynniki zaciemniające wynik doświadczenia, postanowiono następnym grupom myszek wstrzyknąć roztwór doprowadzony do pH 7,4. Badanie to wykonano na grupie III, otrzymującej iniekcję zagęszczonego przesączu osocza normalnego, oraz grupie IV, otrzymującej zagęszczony przesącz osocza anemicznego nr 1. W czasie iniekcji obu płynów o pH 7,4 nie stwierdzono u myszek wyżej wymienionych objawów bólowych, ani też zmian w skórze. Uzyskane dla tych grup wyniki przedstawiają się następująco:

Tabela I. — Table I

Grupa Group	Eryocyty w milionach Red. cells in mil.		Hemoglobina w g/100 ml Haemoglobin in g/100 ml		Po doświadczeniu After experiment			
	Przed dośw. Before exper	Po dośw. After exper	Przed dośw. Before exper	Po dośw. After exper	Reticulo- cyty % Reticulo- cytes	Hemato- kryt Haemato- crit	Objętość 1 erytro- cytu w Mean corp. vol.	Nasyenie Hb 1 ery- trocytu w Mean corp. haem concentr.
Doświad. IV Experiment IV	9,2	10,6	10,6	10,7	3,6	44,4	43	10,5
Kontrol. III Control. III	9,3	9,1	10,5	10,4	2,6	43,8	48	11,5

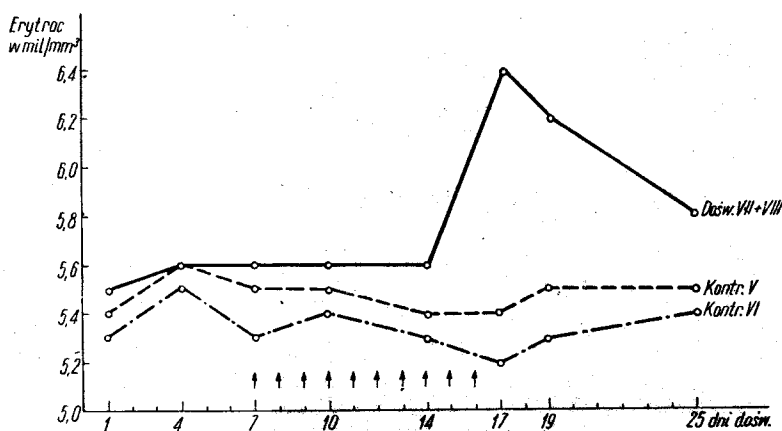
Powyższe wyniki wykazują wyraźny wpływ zagęszczonego przesączu z osocza anemizowanych owiec na liczbę erytrocytów i ich objętość, oraz na liczbę retikulocytów, natomiast nieznaczny wpływ na ilość hemoglobiny w 100 ml krwi, ilość hemoglobiny w 1 erytrocycie, oraz na hematokryt. Badanie rozmazów szpiku i śledziona po zakończonym doświadczeniu wykazuje zwiększoną ilość komórek układu erytoblastycznego w szpiku i śledzionie myszek doświadczalnych w porównaniu do grupy kontrolnej.

Ponadto w czasie badań stwierdzono, że konieczne wielokrotne pobieranie krwi dla ustalenia normy przed doświadczeniem, oraz wyników po zakończonym doświadczeniu, wymaga każdorazowo pobrania około 150 mm³ krwi. Dla myszki stanowi to ubytek wynoszący około 10% krwi

krażącej i nawet przy zachowaniu najdalej idącej ostrożności prowadzi do anemizacji zwierząt zaciemniając obraz doświadczenia.

W związku z powyższym do dalszych badań jako biorców użyto króliki. Badania wykonano na 4 grupach; grupa V otrzymywała iniekcje płynu fizjologicznego, grupa VI — iniekcje zagęszczonego przesącza osocza normalnego, a VII i VIII grupa — iniekcje zagęszczonego przesącza osocza anemicznego nr 1 i nr 2.

Zmiany występujące w liczbie erytrocytów u królików z grup kontrolnych (V i VI), i grup doświadczalnych (VII + VIII) ilustruje ryc. 1.



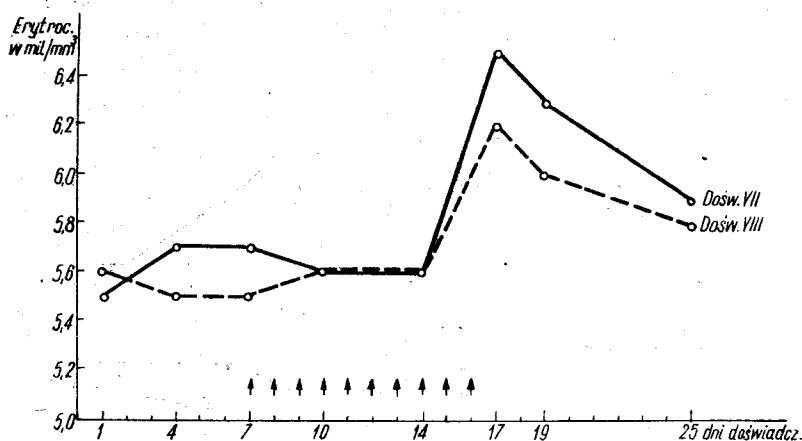
Ryc. 1. Liczba erytrocytów u królików z grup kontrolnych (V i VI) i grup doświadczalnych (VII + VIII) w czasie doświadczenia.

Fig. 1. Red cell count in rabbits from control (V and VI) and experimental (VII and VIII) groups during the experiments.

Krzywa liczby erytrocytów w grupie doświadczalnej (średnie wartości obliczono tu dla 10 królików łącznie z grupy VII i VIII) wykazuje, że wpływ zagęszczonego przesącza osocza anemicznego pojawia się dopiero po 8 iniekcjach, gdy ilość wstrzykniętego płynu odpowiada 65 ml pełnego osocza, co stanowi około 50% krwi krążącej. Wzrost liczby erytrocytów trwa do końca podawania przesącza, poczym liczba erytrocytów obniża się stopniowo, zbliżając się do normy wyjściowej dziesiątego dnia po ostatnim zastrzyku. W tym samym okresie wahania w liczbie erytrocytów u obu grup kontrolnych pozostają w granicach 200 000.

Obliczenia statystyczne wykazały, że zmiany w liczbie erytrocytów u królików doświadczalnych stwierdzone w 24 godziny po ostatniej iniekcji leżą poza granicami błędu doświadczalnego. Obliczone „t” wynosiło 4,6 przy „K” równym 38 — stąd prawdopodobieństwo przypadkowego zaistnienia obserwowanej różnicy było mniejsze od 0,0000.

Analogiczne obliczenia statystyczne przeprowadzone dla grupy V królików kontrolnych wykazały, że istniejące tu drobne wahania w liczbie erytrocytów leżały w granicach błędu doświadczalnego. W danym wypadku $t = 0,335$ przy $K = 18$ — stąd $P = 0,776$. Dla grupy VI królików kontrolnych, otrzymujących przesącz osocza normalnego, obliczone $t = 0,65$ przy $K = 18$ — skąd $P = 0,524$, czyli że otrzymane różnice były tu również nieistotne.



Ryc. 2. Liczba erytrocytów u królików z grupy VII otrzymującej iniekcję zagęszczonego przesączu osocza anemicznego nr 1 i u królików z grupy VIII otrzymującej iniekcję zagęszczonego przesączu osocza anemicznego nr 2.

Fig. 2. Red cell count in rabbits from group VII before and after injections of inspissated filtrate of anaemic plasma No. 1, and in rabbits of group VIII before and after injections of inspissated filtrate of anaemic plasma No. 2.

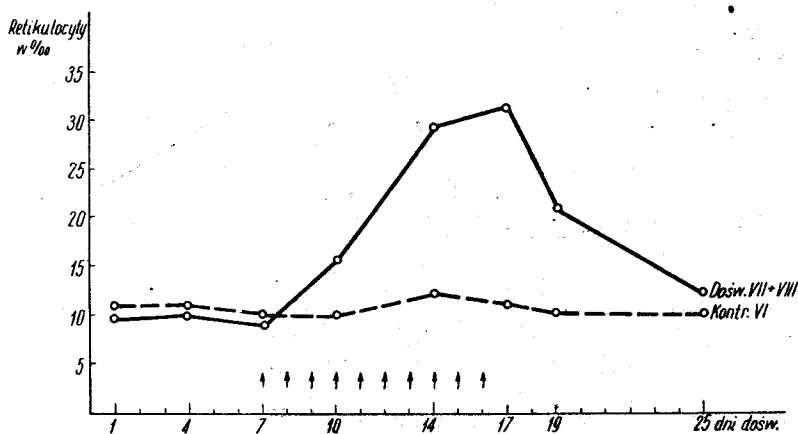
Na ryc. 2 porównano wpływ działania na liczbę erytrocytów zagęszczonego przesączu osocza anemicznego nr 1 (przesącz ten podawano królikom grupy VII) i nr 2 (przesącz ten podawano królikom grupy VIII).

Jak wynika z przytoczonego wykresu u obu grup królików erytropoetyczne działanie podawanego przesączu zaczyna ujawniać się w tym samym okresie doświadczenia, tj. po 8 iniekcjach. W dalszym ciągu doświadczenia efekt wywołany podawaniem zagęszczonego przesączu osocza anemicznego nr 1 jest wyższy od wyników otrzymanych w rezultacie wstrzykiwania zagęszczonego osocza anemicznego nr 2. Średni przyrost liczby erytrocytów wyniósł u królików z grupy VII 950 000 erytrocytów w mm^3 , a w grupie VIII — 700 000 w mm^3 . Po zakończeniu iniekcji powrót liczby erytrocytów do normy wyjściowej przebiegał u obu grup równolegle.

W ciągu trwania iniekcji ilość hemoglobiny oznaczana u królików kontrolnych i doświadczalnych, wahała się w granicach norm fizjologicznych.

Zmiany w ilości retikulocytów we krwi obwodowej u królików kontrolnych i doświadczalnych przedstawia ryc. 3.

Wzrost ilości retikulocytów u grupy doświadczalnej wykazał już pomiar wykonany po upływie trzech dni od rozpoczęcia iniekcji. Największy średni przyrost ilości retikulocytów (łącznie u grupy VII i VIII) zanotowano po 10 iniekcjach. W 10 dni po ostatniej iniekcji poziom retikulocytów powrócił niemal do poziomu wyjściowego.



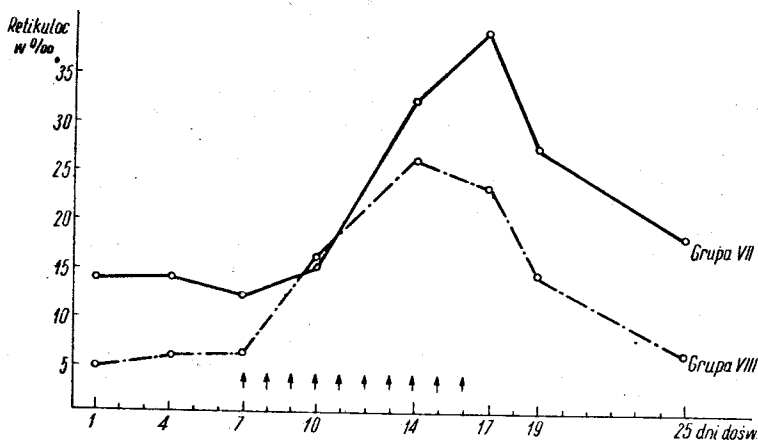
Ryc. 3. Liczba retikulocytów w krwi obwodowej u królików z grupy doświadczalnych i kontrolnych.

Fig. 3. Reticulocyte count in the peripheral blood from experimental and control groups.

Obliczenia statystyczne dowiodły, że różnice w ilości retikulocytów zaobserwowane u grup kontrolnych leżały poza granicami błędu doświadczalnego. Obliczone „t” wynosiło 5,7 przy $K = 38$, skąd prawdopodobieństwo zaistnienia przypadkowego obserwowanej różnicy $P = 0,0000$. Analogiczne obliczenia przeprowadzone dla królików VI grupy kontrolnej wykazały, że średnie arytmetyczne (\bar{x}) obliczone dla pomiarów przeprowadzonych w normie i po 10 stosowanych iniekcjach były takie same, co wyłączało potrzebę dalszych obliczeń statystycznych.

Na ryc. 4 porównano wpływ zagęszczanego przesączu osocza anemicznego nr 1 i nr 2 na przyrost retikulocytów we krwi obwodowej u królików z grupy VII i VIII. Wpływ przesączu osocza anemicznego nr 1 na wzrost liczby retikulocytów był niższy niż w wypadku osocza anemicznego nr 2. Wynosił on 300% normy podczas gdy w drugim wypadku sięgał ponad 400% normy. Znalezione też pewne różnice w narastaniu

liczby retikulocytów w czasie stosowania przesączu. Pod wpływem przesączu osocza anemicznego nr 1 istotny wzrost ilości retikulocytów rozpoczął się dopiero po czwartej iniekcji, podczas gdy pod wpływem osocza anemicznego Nr 2 osiągał ponad 250% normy już po trzech pierwszych iniekcjach. W pierwszym wypadku krzywa retikulocytozy osiągała swe maksimum po 10 zastrzykach, w drugim wypadku — po siedmiu zastrzykach. Mimo wyżej wymienionych różnic w reakcji królików otrzymujących osocze uzyskane od owiec anemizowanych pierwszą lub drugą me-



Ryc. 4. Liczba retikulocytów u królików z grupy VII otrzymującej iniekcję zagęszczonego przesączu osocza anemicznego nr 1 i u królików z grupy VIII otrzymującej iniekcję zagęszczonego przesączu osocza anemicznego nr 2.

Fig. 4. Reticulocyte count in rabbits of group VII before and after injections of inspissated filtrate of anaemic plasma No. 1, and in rabbits from group VIII before and after injections of inspissated filtrate of anaemic plasma No. 2.

todą (ryc. 2 i 4), można wyciągnąć ogólny wniosek, że osocze otrzymane po wielokrotnych upustach krwi jak i osocze po 1—2-krotnym upuście, różnią się nieznacznie w działaniu erytropoetycznym.

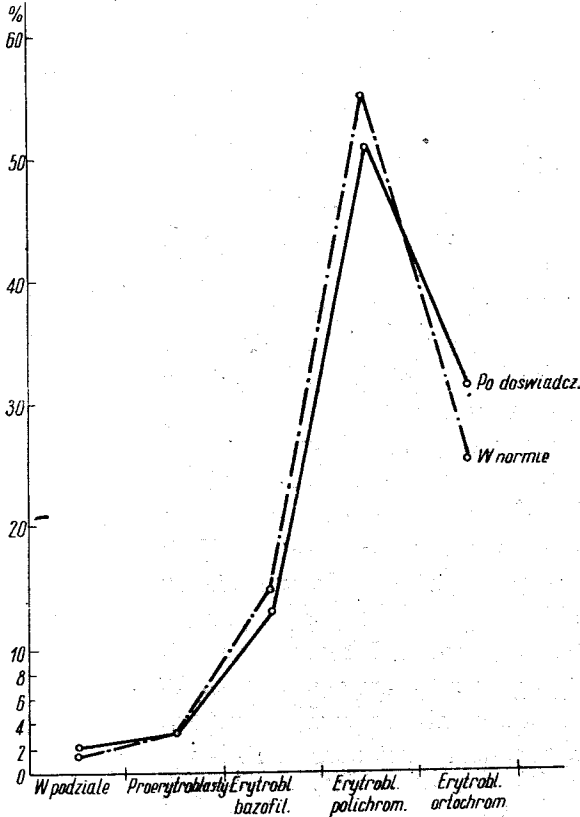
Średnie wartości otrzymane dla hematokrytu u obu grup doświadczalnych (VII + VIII) i grupy kontrolnej (VI) przedstawiały się następująco:

Przedstawione dane dowodzą że, jak to zauważyło już wielu autorów,

Grupy badane	Przed doświadczeniem	Po doświadczeniu
Grupy doświadczalne (VII+VIII)	35	35,5
Grupa kontrolna (VI)	35,2	35

hematokryt nie jest miarodajnym wskaźnikiem pobudzenia erytropoezy wywołanego działaniem erytropoetyny.

Badanie szpiku u królików w normie wykazało, że komórki układu erytroblastycznego stanowią 37,8% mielogramu. Po zakończonych iniekcjach



Ryc. 5. Krzywe rozwoju erytrocytów w szpiku w normie i po zakończeniu iniekcji.

Fig. 5. Curves of red cell development in normal marrow and after injections.

komórki układu erytroblastycznego u królików doświadczalnych stanowiły 42,4% mielogramu, natomiast u królików kontrolnych pozostały bez zmian. Przyjmując wszystkie komórki układu erytroblastycznego za 100% sporządzono dla królików doświadczalnych wykres rozwoju erytrocytów w normie i po zakończeniu iniekcji (ryc. 5).

Krzywe na ryc. 5 wykazują drobne różnice na poziomie komórek w podziale mitotycznym, erytroblastów zasadochłonnych i wielobarwnliwych. Nieco większą różnicę, wynoszącą 5,5% wykazują krzywe na poziomie erytroblastów ortochromatycznych.

Dla ustalenia czy erytropoetyczny wpływ stosowanego przesączu nie wynika w pewnej mierze z obecności w nim bilirubiny (23), poddano przygotowane do iniekcji płyny pochodzące z osocza normalnego i anemicznego, badaniu na obecność bilirubiny. Obie próby wypadły ujemnie co dowodzi, że oba przesącze nie zawierały bilirubiny, mogącej działać erytropoetycznie.

Wobec rozbieżnych zdań, jakie spotyka się w piśmiennictwie na temat powiązania erytropoetyny z poszczególnymi frakcjami białkowymi osocza — stosowane w doświadczeniu osocza anemiczne poddano analizie elektroforetycznej. W wyniku analizy stwierdzono w badanych płynach:

Przy naniesieniu próbki 100 μ l — obecność albumin.

Przy naniesieniu próbki 1 ml — obecność albumin i α -globulin.

Przy naniesieniu próbki objętości 1 ml (równoważnej 10 ml osocza) nie znaleziono w niej β -globulin, z którymi, między innymi, ma być powiązana erytropoetyna, według *Ersleva* i *Lavietesa* (10).

Dla rozszerzenia danych o chemizmie stosowanego przesączu zawierającego erytropoetynę, poddano go analizie chromatograficznej, której wyniki porównano z wynikami analizy chromatograficznej przesączu otrzymanego z normalnego osocza owiec. Na podstawie oceny wizualnej intensywności zabarwienia plam poszczególnych aminokwasów na porównywanych chromatogramach, można stwierdzić, że w przesączu otrzymanym z osocza anemicznego występowało więcej kwasu glutaminowego, glutaminy, glikolu, treoniny, argininy i lizyny, niż w przesączu przygotowanym z normalnego osocza. Intensywność plam pozostałych aminokwasów, występujących w przesączu osocza normalnego, nie różniła się od intensywności plam aminokwasów występujących w przesączu osocza anemicznego. Nie stwierdzono też żadnych różnic jakościowych w występowaniu wolnych aminokwasów w obu porównywanych przesączach. Wobec istniejących w piśmiennictwie wzmianek (23), na temat erytropoetycznego działania tyrozyny — zwrócono szczególną uwagę na występowanie tego aminokwasu w obu porównywanych przesączach. Stwierdzono, że plamy tyrozyny na obu chromatogramach posiadały to samo natężenie barwy i bardzo zbliżoną powierzchnię (obliczoną planimetrycznie), co wskazywałoby na występowanie tyrozyny w jednakowej ilości zarówno w przesączu osocza normalnego jak i anemicznego.

WNIOSKI

1. Anemizowanie owiec 1—2 upustami krwi ($1/3$ krwi krążącej), lub wielokrotnymi upustami w ciągu tygodnia (100% krwi krążącej), powoduje pojawienie się w ich osoczu czynnika erytropoetycznego (erytropoetyny).

2. Osocze uzyskane od owiec anemizowanych dwoma wyżej wymienionymi sposobami działa w równym stopniu erytropoetycznie.

3. Zagęszczony przesącz osocza erytropoetycznego, wstrzyknięty doświadczalnym myszkom lub królikom, pobudza u nich erytropoezę wyrażającą się przyrostem liczby retikulocytów w krwi krążącej o około 300—400% i erytrocytów o około 15%, oraz ogólnym wzrostem liczby komórek erytoblastycznych w szpiku i nieznacznym przesunięciem w procentowym składzie komórek w ramach tego układu.

4. Ze względu na konieczność wielokrotnego pobierania krwi u biorców przesączu erytropoetycznego osocza — stwierdzono, że króliki są bardziej przydatne niż myszki do testowania erytropoetyny.

5. Podawanie skoncentrowanych przesączów osocza może w pełni zastąpić stosowanie dużych ilości pełnego osocza, lub jego przesączów.

6. Gotowanie osocza przez 10 minut, oraz ogrzewanie przesączu tego osocza w ciągu następnych 20 godzin w temperaturze około 45°C, nie niszczy erytropoetyny.

7. Dla uniknięcia niekorzystnego działania ubocznego przesączu osocza na organizm biorcy, należy przed wstrzykiwaniem doprowadzić pH przesączu do 7,4.

8. W zagęszczonym przesączu anemicznego osocza stwierdzono obecność albumin i ślady α -globulin. Nie znaleziono natomiast β i γ -globulin.

9. W przesączu osocza anemicznego występują te same wolne aminokwasy co i w przesączu osocza normalnego. Zauważono natomiast w występowaniu ich pewne różnice ilościowe: w przesączu osocza anemicznego występuje więcej kwasu glutaminowego, glutaminy, glikokolu, treoniny, lizyny i argininy, niż w przesączu osocza normalnego.

10. Nie znaleziono korelacji między działaniem erytropoetycznym przesączu z osocza anemicznego, a poziomem tyrozyny w tym przesączu.

11. Owce mogą być używane jako dawcy dużych ilości osocza erytropoetycznego, co może znaleźć zastosowanie przy produkcji erytropoetyny na większą skalę, z wykorzystaniem owiec rzeźnych.

Т. Кжимовски, Г. Кжимовска

НЕРВНАЯ И ГУМОРАЛЬНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ПРОЦЕССОВ КРОВЕТВОРЕНИЯ У ЖИВОТНЫХ

II Исследование эритропоэтического фактора полученного из плазмы овец с экспериментальной анемией.

Содержание

Исследования проводились на овцах, кроликах и мышах. Отмечено, что анемизирование овец 1—2 кратным кровопусканием (30% циркулирующей крови) или многократными кровопусканиями, производимыми на протяжении недели (100%

циркулирующей крови) приводит к появлению в плазме эритропоэтического фактора. Эритропоэтическая плазма подвергалась 10 минутному кипячению и фильтрации: фильтрат загущался 10-кратно путем отпаривания. Сгущенный фильтрат, впрыснутый кроликам или мышам вызывает у них эритропэз приводя к повышению числа ретикулоцитов на 300—400% (рис. 3) и эритроцитов на 15% (рис. 1).

В костном мозге наблюдается повышение числа клеток эритробластической системы с небольшими колебаниями в процентном составе клеток этой системы (рис. 5). Кроме того исследования показали:

1. Подавание сконцентрированных фильтратов анемизированной плазмы вполне может заместить применение больших количеств целостной плазмы или ее фильтратов.

2. 10-минутное кипячение плазмы и обогрвание ее фильтратов в течение следующих 20 минут в температуре около 45°C не разрушает эритропоэтина.

3. В концентрированной фильтрате эритропоэтической плазмы электрофоретическим методом обнаружено наличие альбуминов и след альфа-глобулинов. Не обнаружено однако бета и гамма-глобулинов.

4. В фильтрате эритропоэтической плазмы содержатся те же свободные аминокислоты что и в фильтрате нормальной плазмы (хроматографические исследования). Отмечены однако некоторые количественные расхождения: в фильтрате эритропоэтической плазмы содержится больше глютаминовой кислоты, глютамина, гликокода лизина и аргинина, чем в фильтратах нормальной плазмы. Не обнаружена корреляция между эритропоэтическим действием фильтрата в анемизированной плазме и уровень тирозина в этом фильтрате.

Овцы могут быть использованы как доноры больших количеств эритропоэтической плазмы, что может найти применение при изготовлении эритропоэтина в большом масштабе с использованием убойных овец.

Т. Krzymowski, Н. Krzymowska

NERVOUS AND HUMORAL REGULATION OF HAEMATOPOIETIC PROCESSES IN ANIMALS

II. Studies on the erythropoietic factor from the plasma of sheep with experimental anaemia

Summary

The studies concerned sheep, rabbits, and mice. Anaemia induced in sheep by 1—2 bleedings (30% of the circulating blood), or repeated bleedings during one week (100% of the circulating blood), caused appearance in the plasma of the erythropoietic factor. The erythropoietic plasma was boiled 10 min., filtered, and inspissated to one tenth of volume. Injected to rabbits or mice, it stimulated erythropoiesis causing reticulocytes to rise by 300—400% (diagram 3), and erythrocytes by 15% (diagram 1). The number of cells of the erythroblastic system increased, showing a slight shift in the percental pattern within the system (diagram 5). Further, the investigations showed that: (1) administration of concentrated filtrates of anaemic plasma may well be administered in the place of large volumes of whole plasma or its filtrates; (2) erythropoietine is not destroyed by 10 min. boiling of the plasma and subsequent 20 hour heating of the filtrate at about 45°C; (3) electrophoresis revealed in the inspissated filtrate of the erythropoietic plasma albumins and traces of α -globulins, but no β - or γ -globulins; (4) chromatography revealed in the filtrate

of the erythropoietic plasma the same free aminoacids as in normal plasma, but with some quantitative changes, namely the former contained more glutamic acid, glutamine, glycocholic acid, lysine, and arginine; (5) there was no correlation between the erythropoietic effects of the anaemic-plasma filtrate and the level of tyrosine in it; (6) sheep may be used as donors of large amounts of erythropoietic plasma, which may be useful in the production of erythropoietine on a major scale, also from slaughter animals.

PIŚMIENNICTWO

1. Aleksandrowicz J.: Pol. Gaz. Lek., 1935, 14, 35. — 2. Althoff H., Werner H.: Acta Haem., 1957, 18, 2, 126. — 3. Bonsdorf E.: Acta Physiol. Scand., 1949, 18, 51. — 4. Boycott A. E., Douglas C. G., Price-Jones C.: Journ. Path. Bact., 1911, 15, 116. — 5. Carnot P., Deflandre C.: Compt. rend. Acad. Sci., 1906, 143, 384. — 6. Crafts E. C., Meineke H. A.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1956, 92, 222. — 7. Dinning J. S., Day P. L.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1956, 92, 115. — 8. Doring G. K.: Arch. f. d. ges. Physiol., 1948, 249, 631. — 9. Doring G. K., Loeschcke H. H.: Arch. f. d. ges. Physiol., 1949, 251, 220. — 10. Erslev A. J., Lavietes P. H.: Blood, 1954, 9, 1055.
11. Förster J.: Biochem. Ztsch., 1924, 145, 309. — 12. Förster J., Kiss F.: Biochem. Ztsch., 1925, 160, 442. — 13. Fried W., Plzak L., Jacobson L. O., Goldwasser E.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1956, 92, 203. — 14. Fried W., Plzak L., Jacobson L. O., Goldwasser E.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1957, 94, 237. — 15. Gibelli C.: Arch. f. exp. Path. u. Pharmak., 1911, 65, 248. — 16. Gley P., Delor J.: Compt. rend. Soc. biol., 1955, 149, 7—8, 635. — 17. Goldwasser E., Jacobson L. O., Fried W., Plzak L.: Science, 1957, 125, 1085. — 18. Goldwasser E., Jacobson L. O., Fried W., Plzak L.: Blood, 1958, 13, 55. — 19. Gordon A. S., Dubin M.: Am. J. Physiol., 1934, 107, 704. — 20. Gordon A. S., Piliro S. J., Kleinberg W., Freedman H. H.: Proc. Soc. Exp. Biol. N. Y., 1954, 86, 225.
21. Gordon A. S., Piliro S. J., Tannenbaum M.: Am. J. Physiol., 1955, 181, 585. — 22. Gordon A. S., Piliro S. J., Medici P. T., Siegel C. D., Tannenbaum M.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1956, 92, 598. — 23. Grant W. C., Root W. S.: Physiol. Rev., 1952, 32, 449. — 24. Hodgson G., Toha J., Gunther B.: Bol. Soc. Biol., 1952 (według 23). — 25. Hodgson G., Toha J.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1954, 86, 255. — 26. Jacobson L. O., Goldwasser E., Fried W., Plzak L.: Nature, 1957, 179, 633. — 27. Jacobson L. O., Goldwasser E., Plzak L., Fried W.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1957, 94, 243. — 28. Kopol-dowa J.: Cas. Lekařu Čes., 1950, 89, 416. — 29. Krafka J.: Jour. Lab. a. Clin. Med., 1931, 17, 428. — 30. Kinard F. W., Ellis D. W.: Anat. Rec., 1949, 105, 556.
31. Leffkowitz M., Leffkowitz A.: Ztschr. f. d. ges. exp. Med., 1926, 48, 276. — 32. Linmann J. W., Bethell F. H.: Blood, 1956, 11, 310. — 33. Loeschcke H. H.: Ztschr. f. Vitamin-Hormon u. Fermentforsch., 1950, 2, 346. — 34. McFaren E. F.: Anal. Chem., 1951, 23, 168. — 35. Mirand E. A., Prentice T. C.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1957, 95, 164. — 36. Müller P. T.: Arch. f. Hyg., 1912 (według 23). — 37. Plzak L. F., Fried W., Jacobson L. O., Bethard W. F.: J. Lab. Clin. Med., 1955, 46, 671. — 38. Rambach W. A., Alt H. L., Cooper J. A.: Blood, 1957, 12, 1101. — 39. Reissman K. R.: Blood, 1950, 5, 372. — 40. Rosenfeld J.: Wiad. Lek., 1934, 8, 212.
41. Seip-Martin: Acta Paediatr., 1955, 44, 6, 507. — 42. Yu-Tin-Tei: J. Chosen M. A., 1938, 28, 129, cyt. w Chem. Abstr., 1938, 33, 213.

Otrzymano dnia: 16. II. 1959 r.