

TADEUSZ KRZYMOWSKI, HALINA KRZYMOWSKA

STWIERDZENIE OBECNOŚCI INHIBITORA ERYTROPOEZY W OSOCZU ZWIERZĄT Z DOŚWIADCZALNĄ POLICYTEMIĄ

Z Zakładu Fizjologii Zwierząt W. S. R. w Olsztynie
p. o. Kierownik: dr T. Krzymowski

Badania Robertsona, Krumbhaara i wsp., Boycotta i wsp. z lat 1917—1933, oraz szeregu innych badaczy wykazały, że polycytemia wywołana transfuzją krwi wiąże się zawsze ze zmniejszeniem ilości retikulocytów w krwi krążącej.

Fakt ten został wykorzystany praktycznie między innymi przez Jacobsona i wsp. i Frieda, którzy do testowania erytropoetyny używali myszek polycytemicznych. Autorzy ci stwierdzili, że kilkakrotne transfuzje erytrocytów robione myszkom dootrzewnowo redukują u nich poziom retikulocytów we krwi krążącej prawie do zera. Podawanie następnie tym myszkom erytropoetyny powodowało wzrost poziomu retikulocytów, zbliżając go do normalnego. Większość badaczy uważa, że polycytemia prowadzi do rozkładu erytropoetyny, lub zahamowania jej produkcji. Wcześniejsze badania własne [6] nad erytropoetyną pozwoliły na pewne spostrzeżenia wskazujące, że polycytemia prowadzi do pojawienia się w osoczu ciała czynnego, antagonistycznego w stosunku do erytropoetyny. W celu udowodnienia swojej hipotezy postanowiliśmy wstrzyknąć osocze uzyskane od zwierząt z doświadczalną policytemią — zwierzętom normalnym i obserwować wpływ tych iniekcji na organizm biorców.

METODYKA

Po wykonaniu podstawowych badań hematologicznych u owiec dawców krwi i biorców, oraz po dokonaniu prób aglutynacyjnych między ich krwią, pobierano krew z żyły jarzmowej od owiec dawców, trzykrotnie w ilości około 500 ml dziennie od sztuki. Odwirowane erytrocyty wstrzykiwano owcom-biorcom jako 80% zawiesinę w płynie fizjologicznym. Erytrocyty wprowadzano dożylnie, w ciągu 3 dni w ilości 400—500 ml dziennie. Ilość ta powodowała silną policytemię, wyrażającą się podwo-

* Wstępne badania do niniejszej pracy zostały wykonane przez autorów w Laboratorium Fizjologicznym Ogrodu Zoologicznego w Warszawie, za co autorzy składają podziękowanie Kierownikowi tego Ośrodka p. prof. dr Bolesławowi Gutowskiemu.

jeniem hematokrytu w czwartym dniu doświadczenia. W 24 godz. po ostatniej transfuzji erytrocytów pobierano krew od owcy policytemicznej, a odwirowane osocze tej krwi traktowano jako „osocze policytemiczne”. Osocze normalne (kontrolne) i policytemiczne umieszczano w lodówce, lub też poddawano dalszym zabiegom w celu uzyskania częściowo odbiałzonego i zagęszczonego przesączu.

W celu odbiałczenia dodawano do osocza 1 n HCl doprowadzając pH do 5,5, poczem umieszczano osocze na łaźni wodnej i trzymano w gotującej się wodzie przez 10 minut. Po przesączeniu osad przemywano niewielką ilością gorącej wody destylowanej. Otrzymany przesącz doprowadzano do pH 7,4 i w tej postaci wstrzykiwano dootrzewnowo królikom (grupa II — przesącz osocza policytemicznego, grupa III — przesącz osocza normalnego).

W drugiej części doświadczenia uzyskany przesącz odparowywano na łaźni wodnej przy temperaturze 40°C, uzyskując 10-krotne zagęszczenie płynu w stosunku do wyjściowej ilości osocza (1 ml zagęszczonego przesączu odpowiada 10 ml osocza). Zagęszczony przesącz doprowadzono 1 n NaOH do pH 7,4 i w tej postaci stosowano go w serii podskórnych zastrzyków (grupy: IV, V, VI, VII).

Jako biorców użyto króliki dorosłe obu płci o wadze około 2 kg. Osocze policytemiczne i przygotowane przesącze wstrzykiwano królikom dootrzewnowo, lub podskórnie w następujących dawkach przypadających na 1 królika:

I grupa — 5 królików — pełne osocze policytemiczne w ilości 10 ml dziennie, przez 3 dni, dootrzewnowo.

II grupa — 5 królików — przesącz osocza policytemicznego w ilości 10 ml dziennie, przez 3 dni, dootrzewnowo. (10 ml przesączu odpowiada około 30 ml osocza).

III grupa — 5 królików — (grupa kontrolna), przesącz osocza normalnego w ilości jak w grupie II.

IV grupa — 8 królików — 10-krotnie zagęszczony przesącz osocza policytemicznego w ilości 0,8 ml dziennie przez 10 dni, podskórnie (1 ml zagęszczonego przesączu odpowiada 10 ml osocza).

V grupa — 7 królików — jak w grupie IV.

VI grupa — 5 królików — 10-krotnie zagęszczony przesącz osocza normalnego w ilości jak w grupie IV i V.

VII grupa — 11 królików — jak w grupie VI.

Wpływ podawanego osocza i jego przesączów na krew i układ krwiotwórczy królików ustalano obliczając liczbę erytrocytów, retikulocytów, ilość hemoglobiny i poziom hematokrytu we krwi krążącej, oraz badając szpik pobierany przyżyciowo przed i po doświadczeniu. Na rozmazie szpiku obliczano 500 komórek jądrzastych, ustalając stosunek procentowy między erytroblastami, a pozostałymi komórkami. Na podstawie obliczonych dalszych 500 erytroblastów ustalono stosunki pomiędzy poszczególnymi formami rozwojowymi układu erytoblastycznego, oraz procent komórek w podziale mitotycznym.

Z osoczem policytemicznym i normalnym wykonano próbę na hemolizę erytrocytów królika. W tym celu do 0,5 ml badanego osocza lub przesączu (w rozcieńczeniu 1 : 1, 1 : 10, 1 : 100, 1 : 1000 i 1 : 10000) dodawano: a) świeże osocze świnki morskiej lub królika w rozcieńczeniu 1 : 10, — 0,3 ml, b) 3% zawiesinę erytrocytów królika w ilości 0,5 ml. Probówki umieszczano w termostacie w temperaturze 37°C. Jednocześnie wykonywano doświadczenia kontrolne, w których zamiast normalnego lub policytemicznego osocza owcy użyto osocza normalnego królika lub płynu fizjologicznego.

Osocze policytemiczne, oraz przesącz z tego osocza poddano analizie chromatograficznej i elektroforetycznej w kierunku ustalenia obecności frakcji białkowych

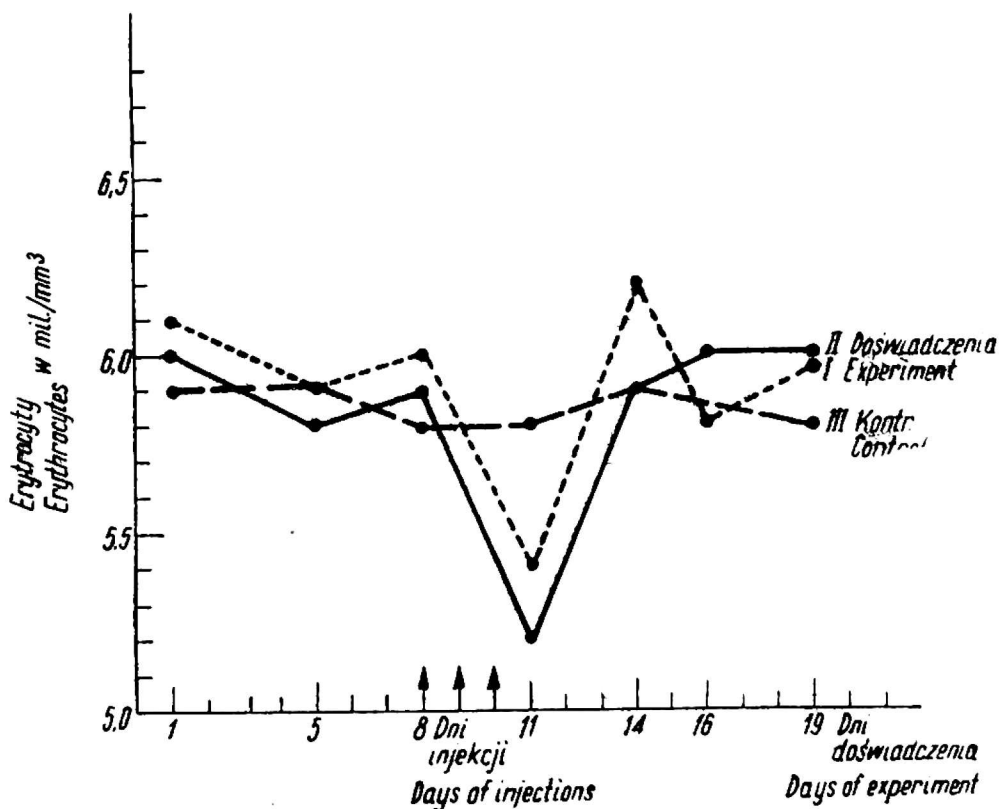
oraz wolnych aminokwasów. W badaniach tych użyto ogólnie przyjętych metod, stosowanych przez autorów w ich wcześniejszej pracy [6].

Próbie na obecność bilirubiny wykonano przy zastosowaniu metody Van den Bergha.

WYNIKI

Całość doświadczeń dzieliła się na dwa etapy. Początkowo poddano badaniom I i II grupę królików, którym wstrzykiwano dootrzewnowo osocze, lub przesącz osocza policytemicznego, w ciągu 3 dni, w ilości 10 ml dziennie. III grupa królików kontrolnych otrzymywała dootrzewnowo tyleż przesączu plazmy normalnej.

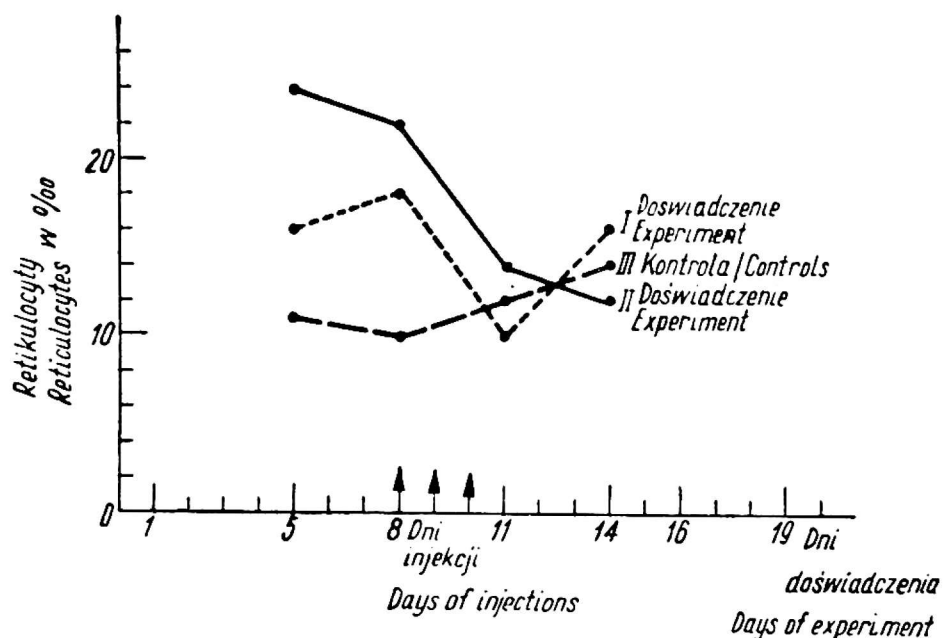
Zmiany, zachodzące pod wpływem stosowanych iniekcji w ilości erytrocytów, retikulocytów, w poziomie hemoglobiny i hematokrytu w krwi krążącej, przedstawiają ryc. 1, 2, oraz tabela 1.



Ryc. 1. Liczba erytrocytów u królików, którym wstrzykiwano dootrzewnowo osocze policytemiczne (I), przesącz osocza policytemicznego (II), oraz przesącz osocza normalnego (III).

Fig. 1. Red cell count in rabbits injected intraperitoneally with polycythemic plasma (I), polycythemic plasma filtrate (II), and normal plasma filtrate (III).

Analizując wyniki przedstawione na ryc. 1, 2 i tab. 1a stwierdza się, że podawanie zarówno przesączu osocza policytemicznego, jak i pełnego osocza policytemicznego, daje rezultaty bardzo zbliżone, wyrażające się przede wszystkim w istotnym obniżeniu się ilości erytrocytów i retikulocytów w krwi obwodowej. Badania statystyczne wyników dowodzą, że różnice



Ryc. 2. Liczba retikulocytów u królików, którym wstrzykiwano dootrzewnowo osocze polycytemiczne (I), przesącz osocza polycytemicznego (II), oraz przesącz osocza normalnego (III).

Fig. 2. Reticulocyte count in rabbits injected intraperitoneally with polycythemic plasma (I), polycythemic plasma filtrate (II), and normal plasma filtrate (III).

Tabela 1. Hemoglobina i hematokryt u królików otrzymujących dootrzewnowo iniekcje osocza polycytemicznego, przesączu osocza polycytemicznego i przesączu osocza normalnego.

Table. 1. Haemoglobine and hematocrit in rabbits injected intraperitoneally with polycythemic plasma, polycythemic plasma filtrate and normal plasma filtrate.

	Grupa królików 1)	Stosowane iniekcje 2)	Dni doświadczenia 3)						
			1	5	8	11	14	16	19
Hemoglobina w g/100 ml	I	pełne osocze polycytemiczne 4)	10,35	10,20	10,20	8,95	9,25	9,65	9,80
	II	przesącz osocza polycytemicznego 5)	10,20	9,80	9,45	8,60	9,25	9,65	9,75
	III	przesącz osocza normalnego 6)	9,15	9,05	9,19	8,67	8,85	—	9,05
Hematokryt w %	I	pełne osocze polycytemiczne 7)	—	—	37,2	34,2	—	—	—
	II	przesącz osocza polycytemicznego 8)	—	—	36,4	33,2	—	—	—

Group of rabbits 1); Injections given 2); Days of experiment 3); Whole polycythemic plasma 4); Filtrate of polycythemic plasma 5); Filtrate of plasma normal 6); Whole polycythemic plasma 7); Filtrate of polycythemic plasma 8),

uzyskane na skutek stosowanych iniekcji w poziomie erytrocytów i retikulocytów u I i II grupy doświadczalnej są istotne (dla erytrocytów I grupy otrzymano $t = 6$, $P < 0,000$, dla retikulocytów I grupy $t = 4,8$, $P = 0,001$. Dla erytrocytów II grupy $t = 4,5$, $P < 0,000$, dla retikulocytów II grupy $t = 2,5$, $P = 0,027$), podczas gdy dla grupy III kontrolnej zauważone różnice znajdują się w granicach błędu doświadczalnego ($\bar{x}_1 = \bar{x}_2$ dla erytrocytów, zaś dla retikulocytów $t = 0,9$, $P = 0,389$).

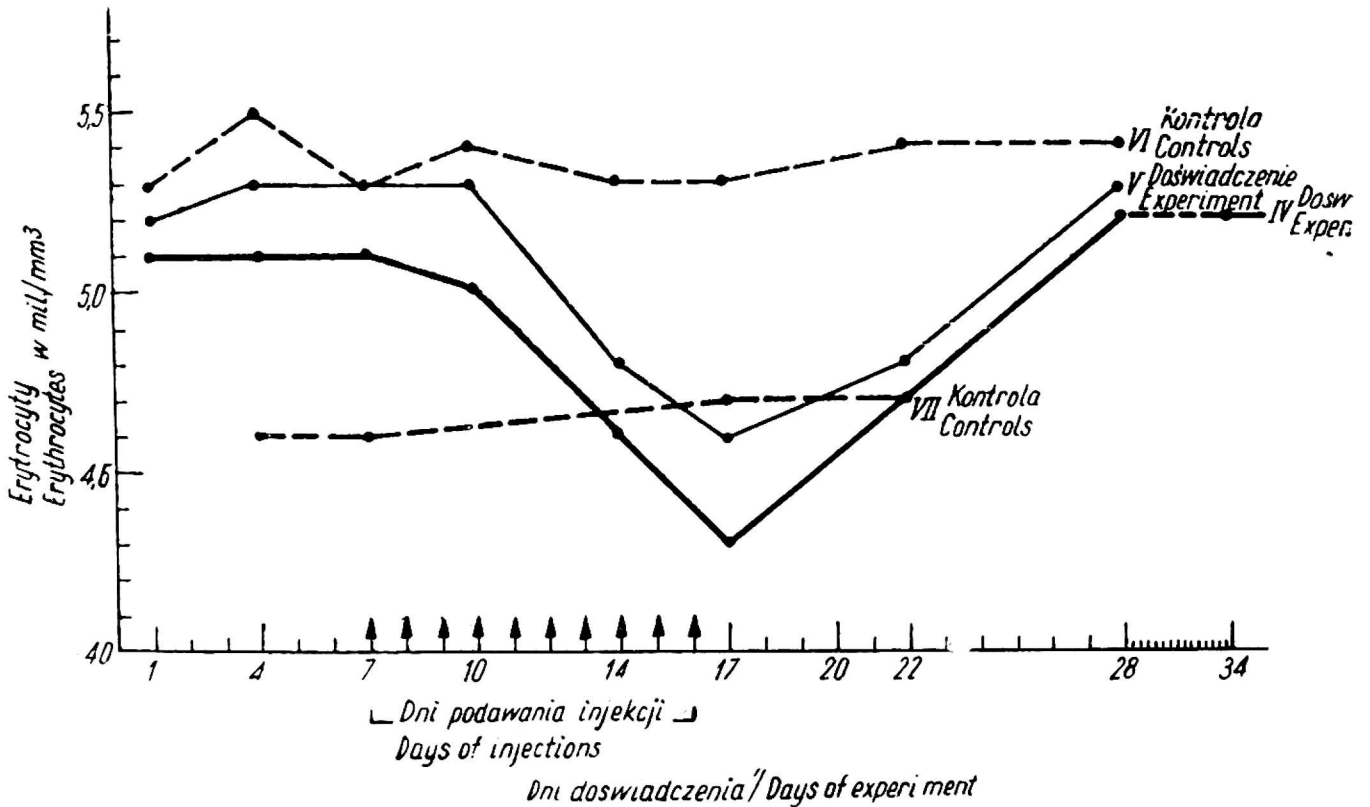
Analiza obrazu szpiku przed i po doświadczeniu u królików II grupy wykazała, że ilość komórek układu erytoblastycznego u zwierząt doświadczalnych zmalała pod wpływem podawanego przesączu osocza policytemicznego z 37% na 29,2% w stosunku do ogólnej ilości komórek szpiku.

W drugim etapie badań posłużono się metodą opracowaną uprzednio przez autorów [6] zagęszczając 10-krotnie przesącz osocza policytemicznego i wstrzykując go królikom podskórnie po 0,8 ml dziennie przez 10 dni (IV i V grupa doświadczalna, łącznie 15 królików). Stosowany przesącz osocza policytemicznego wywołał w krwi i układzie krwiotwórczym u królików doświadczalnych zmiany zilustrowane na ryc. 3, 4, 5 i tab. 2 oraz 3. Na ryc. 3, 4 i tab. 2 przedstawiono jednocześnie dane ilustrujące wyniki uzyskane od dwóch grup królików kontrolnych (łącznie 16 sztuk), którym w analogiczny sposób wstrzykiwano zagęszczony przesącz osocza normalnego.

Analiza otrzymanych wyników dowodzi, że zagęszczony przesącz osocza policytemicznego, wstrzykiwany podskórnie przez okres 10 dni, działa na krew królika podobnie jak osocze lub przesącz osocza policytemicznego stosowane dootrzewnowo, gdy chodzi o erytrocyty, poziom hematokrytu i hemoglobiny. Odmiennie natomiast zachowują się retikulocyty. Pod wpływem zastrzyków zagęszczonego przesączu osocza policytemicznego już po kilku iniekcjach następuje powolny wzrost poziomu retikulocytów w krwi krążącej, który trwa przez okres tygodnia po zakończeniu iniekcji (ryc. 4). U obu grup doświadczalnych otrzymano w danym wypadku bardzo zbliżone wyniki, gdyż po 10 zastrzykach u królików z grupy IV retikulocyty wzrastają do 159% normy, zaś z grupy V — do 156%. Po upływie 6 dni od chwili zakończenia iniekcji poziom retikulocytów u obu grup wynosił 187% normy wyjściowej dla każdej grupy.

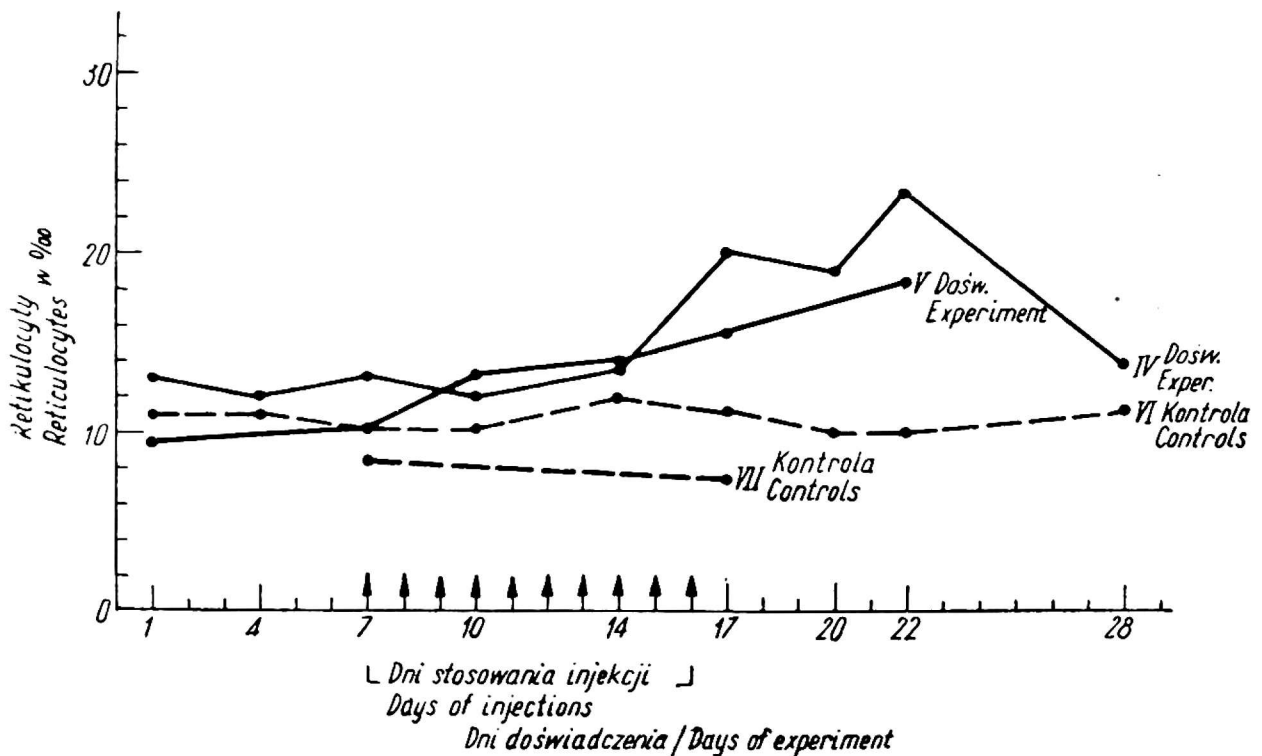
Ten stosunkowo nieznaczny wzrost ilości retikulocytów po zakończeniu iniekcji (przy podawaniu królikom analogicznej ilości zagęszczonego przesączu osocza erytropoetycznego autorzy otrzymywali wzrost ilości retikulocytów sięgający 400% normy [6]), wiąże się naszym zdaniem z zahamowaniem dojrzewania retikulocytów w krwi obwodowej w okresie wstrzykiwania królikom zagęszczonego przesączu osocza policytemicznego.

Analiza statystyczna wyników uzyskanych dla grupy IV i V wykazuje istotność różnic w poziomie erytrocytów ($t = 11,8$, $P < 0,0000$), jak rów-



Ryc. 3. Liczba erytrocytów u królików, którym wstrzykiwano podskórnice zagęszczony przesącz osocza polycytemicznego (IV, V) oraz zagęszczony przesącz osocza normalnego (VI, VII).

Fig. 3. Red cell count in rabbits injected subcutaneously with inspissated filtrate of polycythemic plasma (IV, V), and inspissated filtrate of normal plasma (VI, VII).



Ryc. 4. Liczba retikulocytów u królików, którym wstrzykiwano podskórnice zagęszczony przesącz osocza polycytemicznego (IV, V) oraz zagęszczony przesącz osocza normalnego (VI, VII).

Fig. 4. Reticulocyte count in rabbits injected subcutaneously with inspissated filtrate of polycythemic plasma (IV, V), and inspissated filtrate of normal plasma (VI, VII).

Tabela 2. Hemoglobina i hematokryt u królików otrzymujących podskórnie zagęszczony przesącz osocza polycytemicznego (IV i V grupa), oraz osocza normalnego (VI i VII grupa).

Table 2. Haemoglobine and hematocrit in rabbits injected subcutaneously with inspissated filtrate polycythemic plasma (Group: IV and V) and inspissated filtrate normal plasma (Group: VI and VII).

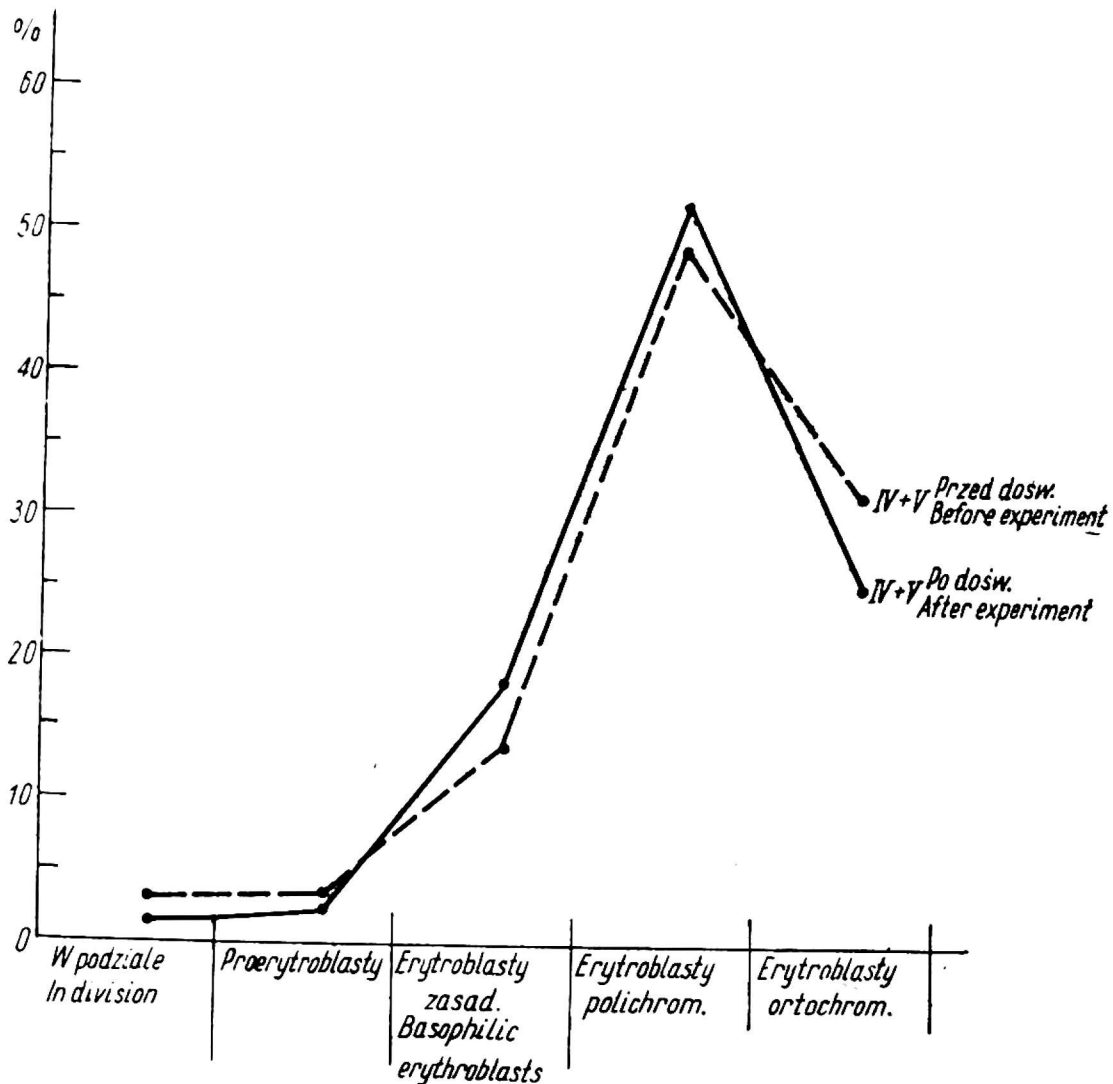
	Grupa królików 1)	Stosowane iniekcje 2)	Dni doświadczenia 3)								
			1	4	7	10	14	17	20	22	28
			Norma przed iniekcjami 4)			w okresie iniekcji 5)	w okresie iniekcji 5)	w 24 godz. po iniekcji 6)	w 4 dni po iniekcji 7)	w 6 dni po iniekcji 8)	w 12 dni po iniekcji 9)
Hemoglobina w g/100 ml	V	zagęszczony przesącz osocza polycytemicznego — podskórnie 11)	—	11,42	11,22	11,37	10,67	10,47	—	—	11,07
	VI	zagęszczony przesącz osocza normalnego — podskórnie 12)	—	9,95	9,80	—	—	9,45	9,25	—	9,45
	VII	osocza normalnego — podskórnie 12)	—	10,12	10,23	9,95	10,35	10,65	—	—	—
Hematokryt w %	IV	zagęszczony przesącz osocza polycytemicznego — podskórnie 11)	33,1	—	33,8	—	—	31,0	—	31,9	—
	V	osocza normalnego — podskórnie 12)	40,2	40,0	39,0	36,6	35,7	33,4	—	33,8	—
	VI	zagęszczony przesącz osocza normalnego — podskórnie 12)	—	—	35,2	—	—	35,0	—	—	—
	VII	osocza normalnego — podskórnie 12)	—	—	35,5	—	—	36,0	—	—	—

Group of rabbits 1); Injections given 2); Days of experiment 3); Norm before injections 4); During injections 5); 24 hours after injections 6); 4 days after injections 7); 6 days after injections 8); 12 days after injections; Inspissated filtrate of polycythemic plasma subcutaneously 11); Inspissated filtrate of normal plasma subcutaneously 12).

niez w poziomie retikulocytów ($t = 2,73$, $P = 0,0069$). Badania statystyczne wyników uzyskanych dla grupy kontrolnej, otrzymującej zagęszczony przesącz osocza normalnego, nie wykazują istotnych różnic między

danymi z okresu poprzedzającego iniekcje i okresu po zakończonych iniekcjach (dla erytrocytów $t = 0,65$, $P = 0,524$, dla retikulocytów obliczenie t jest niemożliwe ponieważ $\bar{x}_1 = \bar{x}_2$).

Badania szpiku u obu grup doświadczalnych (IV i V) przed rozpoczęciem i po zakończeniu iniekcji wykazują, że komórki układu erytroblastycznego stanowią przed doświadczeniem 32,6%, zaś po zakończeniu wstrzykiwań — 22,3% mielogramu. Ponieważ komórki układu erytroblastycznego oblicza



Ryc. 5. Krzywa rozwoju komórek układu erytroblastycznego u królików otrzymujących podskórnie zagęszczony przesącz osocza policytemicznego (przed i po zakończeniu iniekcji).

Fig. 5. Erythroblaste development curve in rabbits injected subcutaneously with inspissated filtrate of polycythemia plasma (before and after injection).

się w stosunku do pozostałych komórek (głównie układu białokrwinkowego), wykonano badania liczby leukocytów w krwi obwodowej przed i po doświadczeniach. Badania te nie wykazały różnic (średnio przed doświadczeniem 7800, po doświadczeniu — 8000 leukocytów w mm^3 krwi). Na podstawie powyższego można uważać, że zmniejszenie procentowej ilości komórek erytroblastycznych w mielogramie wynika z ogólnego zmniejszenia ich ilości w szpiku.

Na podstawie obrazu 500 erytroblastów u każdego królika obliczono stosunki pomiędzy poszczególnymi formami rozwojowymi erytroblastów. Wykres na ryc. 5 przedstawia krzywe dojrzewania (rozwoju) komórek układu erytroblastycznego wykonane przed i po doświadczeniu (średnie dla 12 królików przed i po dośw.).

Krzywa dojrzewania erytroblastów po doświadczeniu, wykazuje istotne różnice procentowej ilości mitoz i erytroblastów ortochromatycznych. Ogólny natomiast charakter krzywej pozostaje bez większych zmian.

Tabela 3. Mitoza komórek erytroblastycznych przed doświadczeniem i po zakończeniu podskórnych iniekcji zagęszczonego przesączu osocza polycytemicznego.

Table 3. Mitosis of erythroblastic cells before the experiment and after the termination of subcutaneous injections of a congested filtrate of polycythemic plasma.

Erytroblasty 1)	Stadia mitozy 2)								Razem 3)	
	profaza		mefaza		anafaza		telofoza		norma 4)	po dośw. 5)
	norma 4)	po dośw. 5)	norma 4)	po dośw. 5)	norma 4)	po dośw. 5)	norma 4)	po dośw. 5)		
Froerytroblasty + Erytroblasty bazofilne	0,22	0,18	0,04	0,06	0,08	0,03	0,08	0,06	0,42	0,33
Erytroblasty polichromatyczne	0,90	0,71	0,20	0,13	0,10	0,03	0,20	0,33	1,40	1,20
Erytroblasty ortochromatyczne	0,44	0,05	0,02	0,01	0,06	0,00	0,30	0,01	0,82	0,07
Razem 3)	1,56	0,94	0,26	0,20	0,24	0,06	0,58	0,40	2,64	1,60

Erythroblast 1); Stadia of mitosis 2); Total 3); Norm 4); After experiment 5).

W celu przeanalizowania aktywności podziałowej komórek erytroblastycznych wykonano analizę mitoz, obliczoną w procentach w stosunku do ogólnej liczby erytroblastów (tab. 3). Obliczenia zawarte w tabeli 3 wykonano na podstawie analizy 500 erytroblastów na każdym preparacie przed i po doświadczeniu (średnie wyniki z 12 000 erytroblastów). Jak wynika z tej tabeli, zmniejszoną aktywność podziałową erytroblastów stwierdza się po doświadczeniu we wszystkich fazach mitozy. Największe jednak zmniejszenie ilości mitoz zauważa się wśród erytroblastów ortochromatycznych. Tabela 4 wykazuje procent jaki stanowią mitozy na poszczególnych etapach rozwojowych erytroblastów.

W celu ustalenia, czy spadek ilości erytrocytów wynika tylko z zahamowania erytropoezy (stwierdzonego w szpiku), czy też wiąże się z ewentualną hemolizą krwinek w związku ze wstrzykiwaniem przesączu osocza

Tabela 4 — Table 4

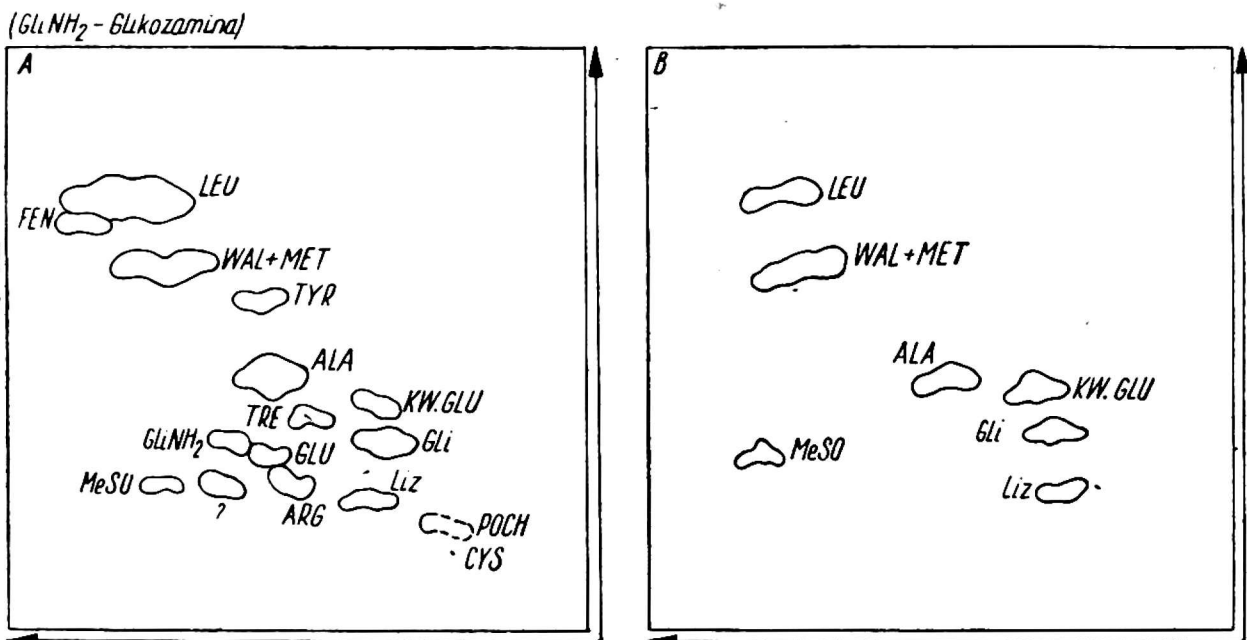
	Erytroblasty w mitozie	
	przed doświadczeniem 1)	po doświadczeniu 2)
Na 100 proerytroblastów i erytroblastów bazofilnych	2,5	1,5
Na 100 erytrobl. polichromatycznych	2,9	2,3
Na 100 erytrobl. ortochromatycznych	2,7	0,3

Before experiment 1); After experiment 2).

owiec, wykonano próbę *in vitro*, na hemolizę erytrocytów królika. Używając jako dopełniacza świeże osocze świnki morskiej lub królika, wykonano próbę ogólnie przyjętymi metodami i stwierdzono, że po 1 godz., 2 godz. i 4 godz. (niezależnie od stopnia rozcieńczenia badanych przesączów osocza) — nie występuje hemoliza krwinek królika. Po 24 godzinach zauważono lekką hemolizę jednak w takim natężeniu, jak i w serii prób kontrolnych (osocze normalne, płyn fizjologiczny).

Badanie elektroforetyczne przesączu osocza policytemicznego, wykazało obecność albumin, oraz śladów alfa globulin, podobnie jak to miało miejsce w przesączach osocza normalnego i anemicznego, stosowanych przez autorów we wcześniejszych pracach [6, 7].

Wyniki chromatograficznych badań wolnych aminokwasów, przedstawione są na schematach chromatogramów wykonanych dla przesączu



Ryc. 6. Schematy chromatogramów wolnych aminokwasów z zagęszczonego przesączu osocza normalnego (A), oraz z zagęszczonego przesączu osocza policytemicznego (B).
Fig. 6. Schemes of chromatograms of free aminoacids of inspissated filtrate of normal plasma (A), and of inspissated filtrate of polycythemic plasma (B).

osocza policytemicznego i normalnego (ryc. 6). W osoczu policytemicznym nie stwierdza się jakichkolwiek dodatkowych aminokwasów w porównaniu z osoczem normalnym. Zauważa się natomiast brak szeregu aminokwasów w osoczu policytemicznym, które występują w osoczu normalnym. Można przypuszczać, że zmniejszenie ilości wolnych aminokwasów w osoczu policytemicznym wiąże się z ich absorpcją na erytrocytach w okresie policytemii.

W celu ustalenia czy hamowanie erytropoezy po iniekcjach przesącza osocza policytemicznego nie wynika w pewnej mierze z obecności w nim bilirubiny (3), poddano przygotowane do iniekcji płyny badaniu na obecność bilirubiny. Próby z przesączem osocza policytemicznego oraz z zagęszczonym przesączem tego osocza wykonane metodą Van den Bergha nie wykazywały obecności bilirubiny.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Na podstawie przytoczonych wyników stwierdziliśmy, że doświadczalna policytemia prowadzi do wytworzenia się w osoczu owiec bliżej nieokreślonego, termostabilnego ciała czynnego, które wstrzyknięte normalnym królikom, powodowało u nich zahamowanie erytropoezy.

Stwierdzone przez nas ciało czynne nazywamy „inhibitor em erytropoezy”.

Obecność inhibitora stwierdziliśmy w osoczu owiec z doświadczalną policytemią, oraz w przesączu tego osocza, częściowo odbiałczonym przez 10-minutowe gotowanie. Inhibitor erytropoezy nie traci również swojej aktywności przy 6—8-godzinnym zagęszczeniu przesącza przez odparowanie w temperaturze 40°C.

Wprowadzany dootrzewnowo w ciągu 3 dni powodował średni spadek liczby erytrocytów o 600 000 w mm³ krwi w grupie I i o 700 000 w grupie II. Ponadto powodował on spadek liczby retikulocytów w krwi krążącej i komórek erytroblastycznych w szpiku.

Inhibitor erytropoezy wprowadzany podskórnie przez okres 10 dni (w ciągu 10 dni królik otrzymał iniekcje zagęszczonego przesącza odpowiadające 80 ml osocza policytemicznego) powodował spadek liczby erytrocytów (o 800 000), liczby hematokrytowej, ilości hemoglobiny oraz ilości komórek erytroblastycznych w szpiku i komórek erytroblastycznych w stadium mitozy. W tym okresie jednak liczba retikulocytów w krwi obwodowej wzrosła do 160% normy.

Na podstawie uzyskanych wyników, a szczególnie wyników badania szpiku (ogólna liczba komórek erytroblastycznych, krzywa dojrzewania, procent erytroblastów w podziale mitotycznym), można wnioskować, że działanie inhibitora erytropoezy sprowadza się do:

1. Zahamowania różnicowania się proerytroblastów z ich komórek macierzystych (spadek ogólnej liczby komórek erytroblastycznych przy zachowaniu ogólnego charakteru krzywej dojrzewania).

2. Zahamowania aktywności podziałowej wszystkich erytroblastów, a szczególnie erytroblastów ortochromatycznych (tab. 3).

Opierając się na wcześniejszych badaniach Pluma, który stwierdził, że retikulocyty dojrzewają w krwi obwodowej pod wpływem swoistego czynnika warunkującego to dojrzewanie, przypuszczamy, że przy długotrwałym podawaniu inhibitora erytropoezy, uzyskuje się działanie hamujące również i na dojrzewanie retikulocytów. Wzrost ich liczby w krwi obwodowej (grupa dośw. IV i V) przy jednoczesnym zahamowaniu erytropoezy w szpiku sugeruje, że mamy tu zjawisko hamowania procesu dojrzewania retikulocytów.

W takim więc ujęciu, można przypuszczać, że przy krótkotrwałym stosowaniu inhibitora, działanie jego sprowadza się głównie do hamowania procesów krwiotwórczych w szpiku, przy dłuższym zaś okresie działania obejmuje i dojrzewanie retikulocytów w krwi obwodowej.

Wyżej podane fakty, wcześniejsze badania własne nad erytropoetyną [6, 7], oraz spostrzeżenia z badań własnych nie ogłoszonych jeszcze drukiem, pozwalają nam wysunąć hipotezę, że w warunkach fizjologicznych równy poziom erytrocytów w krwi utrzymywany jest przez dwa antagonistyczne ciała czynne: erytropoetynę, która pobudza wytwarzanie erytrocytów oraz inhibitor erytropoezy, który to wytwarzanie hamuje.

T. Krzymowski, H. Krzymowska

ОБНАРУЖЕНИЕ НАЛИЧИЯ ИНГИБИТОРА ЭРИТРОПОЭЗА В КРОВЯНОЙ ПЛАЗМЕ У ЖИВОТНЫХ С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ПОЛИЦИТЕМИЕЙ

Содержание

Исследования проводились на 10 овцах и 46 кроликах. У овец предварительно вызывали сильную полицитемию (удвоение величины гематокрита) путем трехкратной трансфузии эритроцитов в виде 80% эмульсии в физиологическом растворе. В 24 часа после последней трансфузии эритроцитов (четвертый день эксперимента) брали от полицитимированной овцы кровь, считая полученную плазму „полицитемической“. Плазму полицитемическую и нормальную хранили в холодильнике шкафу. Часть плазмы лишали белковых веществ путем помещения на 10 минут в кипящей воде. Полученный таким образом фильтрат инъецировали интраперитонеально кроликам в течение трех дней по 10 мл в день. Во второй части исследования выпаривали полученный фильтрат в температуре 40°C получая 10-ти кратную концентрацию жидкости по отношению к исходному количеству плазмы. Концентрированный фильтрат вводили кроликам подкожно в количестве 0,8 мл ежедневно, в течение 10-ти дней. Фильтрат полицитемической плазмы впрыскива-

емый в течение трех дней приводил к снижению количества эритроцитов в среднем на 600—700 тысяч в 1 мм³ крови (Рис. 1).

Кроме того наблюдалось снижение количества ретикулоцитов в циркулирующей крови (Рис. 2) и эритробластических клеток в костном мозгу (с 37 на 29,2%). Концентрированный фильтрат полицитемической плазмы, вырскиваемый подкожно в течение 10-ти дней (за 10 дней кролику подано сгущенный фильтрат в дозе равной по количеству 80 мл полицитемической плазмы) приводил к снижению количества эритроцитов на 800 тысяч в 1 мм³ крови. (Рис. 3), к снижению величины гематокрита, количества гемоглобина (таб. 2) и уменьшению количества эритробластических клеток в костном мозгу и эритробластических клеток в стадии митоза (таб. 3). За этот период количество ретикулоцитов в периферической крови повышилось до 160% нормы. (Рис. 4).

Приведенные результаты указывают, что экспериментальная полицитемия приводит к появлению в плазме овец термостабильной субстанции, которая вприскиваемая нормальным кроликам приводила к замедлению у них эритропоэза. Обнаруженное вещество авторы назвали „ингибитором эритропоэза“. На основании полученных результатов, а особенно результатов исследования костного мозга (общее количество эритробластических клеток, кривая созревания, процент эритробластов в период митотического деления) можно сделать вывод, что действие „ингибитора эритропоэза“ сводится к: 1) замедлению процесса дифференциации проэритробластов и их производных клеток (падение общего количества эритробластов при неизменной кривой созревания). 2) Замедление активности деления всех эритробластов, а в особенности ортохроматических эритробластов (Рис. 3). Предполагается, что при кратковременном применении ингибитора его действие заключается в торможении процессов кроветворения в костном мозгу, а при долговременном применении его действие переносится также на созревание ретикулоцитов в периферической крови. Авторы выдвигают гипотезы, что в физиологических условиях равный уровень эритроцитов в крови контролируется двумя антагоническими активными субстанциями-эритропоэтиномстимулирующим продукцию эритроцитов и ингибитором-тормозящим этот процесс.

T. Krzymowski, H. Krzymowska

DEMONSTRATION OF AN INHIBITOR OF ERYTHROPOIESIS IN THE PLASMA OF ANIMALS WITH EXPERIMENTAL POLYCYTHEMIA

Summary

The investigations concerned 10 sheep and 46 rabbits. Polycythemia (twofold increase of haematocrit) was induced in sheep by triple transfusion of red cells in the form of 80% suspension in physiological saline. Blood was taken from polycythemic sheep 24 hours after the last red cell transfusion (fourth day of experiment), and the centrifuged plasma referred to as „polycythemic plasma“. Polycythemic and normal plasma were kept in a refrigerator. Some of the plasma was deproteinized by keeping 10 min. in boiling water, filtered, and injected intraperitoneally to rabbits in three consecutive 10 ml daily doses. In the second part of the experiment, the filtrate was inspissated at 40°C to 1/10 of volume, and injected subcutaneously to rabbits in 10 consecutive 0,8 ml daily doses. Intraperitoneal administration of polycythemic plasma filtrate (over three days) reduced the red cell count by an average of 600—700 thousand (in 1 cu. mm.) (fig. 1). It also caused a fall in the

number of reticulocytes in the circulating blood (fig. 2) and in erythroblasts in the marrow (from 37 to 29,2%). The inspissated filtrate of polycythemic plasma injected subcutaneously in 10 consecutive daily doses (total dose equivalent to 80 ml of polycythemic plasma per rabbit) diminished the red cell count by 800 thousand (in 1 cu. mm.) (fig. 3), haematocrit value, haemoglobin (tab. 2), number of erythroblasts in the marrow, and number of erythroblasts in mitosis (tab. 3). In that period, the reticulocyte count in peripheral blood rose to 160% of norm (fig. 4).

The results referred to indicate that experimental polycythemia caused appearance in the plasma of sheep of an active thermostabile substance which inhibited erythropoiesis in normal rabbits on injection. We have named this substance „erythropoiesis inhibitor”. The results obtained, especially of marrow examination (total number of erythroblasts, maturation curve, and percentage of erythroblasts in mitosis) suggest that the action of this inhibitor consists in: 1) inhibition of differentiation of proerythroblasts from their mothercells (fall in total erythroblast number with the character of the maturation curve essentially unchanged), and 2) inhibition of the mitotic activity of all, and especially orthochromatic erythroblasts. (Tab. 3). Brief application of the inhibitor is supposed only to inhibit haematopoietic processes in the marrow, and continued administration to affect also maturation of reticulocytes in the peripheral blood. The authors advance the hypothesis that in physiological conditions the even level of erythrocytes in the blood is sustained by two antagonistic active substances: erythropoietin, which stimulates erythrocyte production, and the inhibitor, which inhibits it.

PISMIENNICTWO

1. Boycott A. E., Oakley C. L.: *J. Path. a. Bact.*, 1933, 36, 205.
2. Fried W., Plzak L. F., Jacobson L. O., Goldwasser E.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1956, 92, 203.
3. Grant W. C., Root W. S.: *Physiol. Rev.*, 1952, 32, 449.
4. Jacobson L. O., Goldwasser E., Plzak L. F., Fried W.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1956, 92, 203.
5. Krumbhaar E. B., Chanutin A. J.: *J. Exp. Med.*, 1922, 35, 847.
6. Krzymowski T., Krzymowska H.: *Acta Physiol. Pol.*, 1959, 3, 349.
7. Krzymowska H., Iwańska S., Winnicki A.: *Acta Physiol. Pol.*, 1960 (w druku).
8. Plum C. M.: *Acta Haematol.*, 1949, 2, 317.
9. Robertson O. H.: *J. Exp. Med.*, 1917, 26, 221.

Otrzymano: 13. 10. 1959.