

HALINA KRZYMOWSKA, STEFANIA IWAŃSKA, ALEKSANDER WINNICKI

WPLYW CZYNNIKA ERYTROPOETYCZNEGO,  
UZYSKANEGO Z OSOCZA OWIEC NA ERYTROPOEZĘ U KARPI  
(*CYPRINUS CARPIO* L.)

Z Zakładu Fizjologii Zwierząt Wydziału Zootechnicznego W. S. R. w Olsztynie

p. o. Kierownika: dr *T. Krzymowski*

Z Katedry Ichtiologii Wydziału Rybackiego W. S. R. w Olsztynie

Kierownik: prof. dr *E. Grabda*

Liczne badania, jakie od 1906 r. [1] prowadzono nad działaniem erytropoetycznego osocza na pobudzenie aktywności układu czerwonokrwinkowego dotyczyły dotąd przede wszystkim drobnych zwierząt laboratoryjnych z gromady ssaków.

Erytropoetyczne osocze, otrzymywane od doświadczalnie anemizowanych myszy, królików i szczurów wstrzykiwano następnie zwierzętom tego samego gatunku, osiągając u nich znaczny wzrost ilości erytrocytów i retikulocytów we krwi krążącej [2, 3, 7, 9, 10, 11, 12, 15, 17 i in.], oraz typowe zmiany w szpiku [15, 16 i in.].

Dzięki dotychczasowym badaniom stwierdzono, że zawarty w anemicznym osoczu „czynnik erytropoetyczny” („erytropoetyna”) ma wiele cech hormonu, jakkolwiek, mimo licznych prac na ten temat, dotąd nie zidentyfikowano jeszcze ostatecznie ani istoty chemicznej [5, 8, 13 i in.], ani miejsca wytwarzania tego związku [6, 9, 15 i in.].

Najbardziej umotywowane doświadczalnie wydają się wnioski *Jacobsona* i wsp. [14], którzy wiążą wytwarzanie erytropoetyny z funkcją nerek.

W dziedzinie badań nad chemizmem czynnika erytropoetycznego praca *Rambacha* i wsp. z 1957 r. sugeruje przynależność tego związku do mukoproteidów, powiązanych z alfa-2-globuliną.

Pewnym utrudnieniem w rozszerzeniu badań nad działaniem i istotą erytropoetyny były małe ilości erytropoetycznego osocza, otrzymywanego od doświadczalnie anemizowanych zwierząt i używanego następnie do pobudzenia aktywności układu czerwonokrwinkowego biorców. Zagadnienie to rozwiązało stwierdzenie, że czynnik erytropoetyczny, uzyskiwany z osocza dużych zwierząt (owiec) nadaje się w pełni do stymulacji erytropoezy u zwierząt laboratoryjnych [16].

Stwierdzony w danym przypadku brak specyfiki gatunkowej erytropoetyny w obrębie gromady ssaków skłonił nas do zajęcia się zagadnieniem jej oddziaływania w obrębie innej gromady zwierząt, a mianowicie u ryb.

Liczne badania nad działaniem hormonów, otrzymywanych z organizmów ssaków wykazały jak wiadomo ich bardzo zbliżone działanie na organizmy ryb. Podjęte przez nas doświadczenie nad wpływem czynnika erytropoetycznego, uzyskanego z osocza doświadczalnie anemizowanych owiec na erytropoezę u karpia — miało na celu rozszerzenie wiadomości o istocie hormonalnej erytropoetyny i zasięgu jej działania w świecie zwierzęcym.

### METODYKA

Do badań użyto zagęszczonego przesączu osocza doświadczalnie anemizowanych owiec, który wstrzykiwany podskórnie myszkom i królikom w ilości około 4 ml na 1 kg wagi ciała wywoływał u nich pobudzenie aktywności układu czerwonokrwinkowego, wyrażające się we wzroście ilości erytrocytów (ponad 15%) i retikulocytów (około 400%) we krwi krążącej i w ogólnym wzroście ilości komórek erytroblastów w szpiku. Używany przesącz przygotowywano metodą omówioną w pracy *T. Krzymowskiego i H. Krzymowskiej*.

Dzięki temu że omawiany przesącz był 10-krotnie zagęszczony w stosunku do wyjściowej ilości osocza, można było, stosując iniekcję objętości 0,5 ml, podać rybom o wadze około 80 g w 2 zastrzykach równoważnik 10 ml erytropoetycznego osocza, a więc ilość bardzo znaczną w porównaniu z ilością stosowaną zwykle dla zwierząt laboratoryjnych.

Jako kryterium aktywności układu czerwonokrwinkowego u ryb przyjęto ilość erytrocytów w 1 mm<sup>3</sup> krwi krążącej, oraz ilość erytroblastów obliczoną na 1000 erytrocytów.

Do doświadczeń użyto 122 karpia w wieku około 1 roku i wadze około 80 g. W ciągu zimy karpie te przebywały w ośrodku zarybieniowym w Montowie, pow. Nowe Miasto, woj. olsztyńskie. 27. IV. 1959 r. przywieziono je do pomieszczenia, w którym przeprowadzano badania i umieszczono w akwarium ze stałym przepływem wody o temperaturze około 10°C i nasyceniu tlenem około 6 mg/l. W ciągu okresu adaptacyjnego trwającego 7 dni i w czasie przebiegu doświadczenia karpie nie karmiono. U badanych osobników nie zauważono żadnych objawów chorób zakaźnych. Niezróżnicowane płciowo karpie podzielono losowo na 5 grup, po 20—30 sztuk w grupie. W zależności od ilości wstrzykiwanego rybom erytropoetycznego ekstraktu utworzono 3 różne grupy doświadczalne: I, II, III. Dwie grupy kontrolne IV i V otrzymywały zastrzyki analogicznego ekstraktu normalnej plazmy owczej lub płynu fizjologicznego. Wstrzykiwane rybom płyny wprowadzano domięśniowo w okolicy płetwy grzbietowej.

W I. grupie doświadczalnej (30 sztuk) każdej rybie wstrzyknięto pierwszego dnia po 1 ml dziesięciokrotnie zagęszczonego przesączu osocza erytropoetycznego, a drugiego dnia po 0,5 ml tegoż ekstraktu. Krew do badania pobrano w 22 godziny po drugim zastrzyku (około godz. 13).

W II. grupie doświadczalnej (22 sztuki) każdej rybie wstrzyknięto pierwszego i drugiego dnia doświadczenia po 0,5 ml zagęszczonego przesączu erytropoetycznego

osocza owiec. Krew do badania pobrano w 24 godziny po ostatnim zastrzyku (godz. 14).

W III. grupie doświadczalnej (24 sztuki) każdej rybie wstrzykiwano codziennie w ciągu 4 dni po 0,5 ml zagęszczonego przesączu erytropoetycznego osocza owiec. Krew do badania pobrano w 24 godziny po ostatnim zastrzyku (około godz. 17).

W IV. grupie kontrolnej (22 sztuki) każdej rybie wstrzyknięto pierwszego i drugiego dnia doświadczenia po 0,5 ml zagęszczonego przesączu normalnego osocza owczego. Krew do badania pobrano w 24 godziny po ostatnim zastrzyku, o godz. 14.

W V. grupie kontrolnej (22 sztuki) każdej rybie wstrzyknięto pierwszego i drugiego dnia doświadczenia po 0,5 ml płynu fizjologicznego (0,65% roztwór chlorku sodu). Krew do badania wzięto w 24 godziny po ostatnim zastrzyku, o godz. 13.

Krew do badania od wszystkich ryb pobierano z tętnicy ogonowej. Pobraną przy pomocy pipety Pasteura krew umieszczano na płytce porcelanowej zwilżonej heparyną i następnie wprowadzano od mieszalników Potaina, rozcieńczając ją płynami o następującym składzie:

płyn A — czerwień obojętna 25 mg, chlorek sodu 0,6 g, woda destylowana 100 ml;

płyn B — fiolet krystaliczny 12 mg, cytrynian sodu 3,8 g, formalina 0,4 ml, woda destylowana 100 ml,

przy czym płynu A pobierana 1/3 mieszalnika, a płynu B 2/3.

Ponadto robiono po dwa rozmazy: na erytroblasty i na retikulocyty z błękitem Nilu.

Otrzymane wyniki poddano analizie statystycznej, obliczając „p” — prawdopodobieństwo przypadkowego zaistnienia różnicy między wynikami uzyskanymi dla grup doświadczalnych i IV grupy kontrolnej, otrzymującej zastrzyki przesączu normalnego osocza.

## WYNIKI

W wyniku przeprowadzonych obliczeń ilość erytrocytów w krwi obwodowej u poszczególnych grup doświadczalnych i kontrolnych po zakończeniu iniekcji przedstawiała się w sposób uwidoczniiony na załączonej tabeli 1.

Na podstawie obliczeń statystycznych wykonanych łącznie dla grupy I i II (otrzymujących po 2 wstrzyknięcia przesączu osocza erytropoetycznego) w porównaniu z IV grupą kontrolną (otrzymującą 2 wstrzyknięcia przesączu plazmy normalnej), stwierdzono, że w układzie tym „p” wynosi 0,0001, a więc otrzymane wyniki są istotne. Natomiast obliczenia statystyczne przeprowadzone dla różnicy w poziomie erytrocytów między grupą III doświadczalną (otrzymującą po 4 wstrzyknięcia przesączu erytropoetycznego) i IV grupą kontrolną wykazały, że w danym przypadku „p” wynosi 0,891, czyli że otrzymane tu różnice leżą w granicach błędu doświadczalnego.

W grupie III, której kolejne iniekcje powtarzano przez 4 dni, zanotowano również w czasie trwania doświadczenia wysoki procent śmiertelności ryb (36%), oraz wyciekanie wstrzykiwanego w ostatnich dniach płynu przez otwory powstałe po pierwszych iniekcjach.

Drugim z kolei wskaźnikiem stwierdzającym stopień nasilenia erytropoezy u badanych ryb było występowanie erytroblastów we krwi obwodowej po zakończeniu iniekcji. Wyniki tego badania ilustruje tabela 2.

Tabela 1. Ilość erytrocytów we krwi obwodowej u poszczególnych grup doświadczalnych ryb po zakończeniu iniekcji.

Table 1. The number of red cells in the peripheral blood in particular experimental groups of fishes after termination of injections.

Grupa 1)	Ilość badanych ryb 2)	Wstrzykiwane płyny 3)	Średnia ilość erytrocytów w 1 mm <sup>3</sup> 4)	Różnica pomiędzy ilością erytrocytów u danej grupy, a ilością u IV grupy kontrolnej 5)	
				w tysiącach 6)	w procentach 7)
I	20	Przesącz erytropoetyczny 8)	998.000	+ 162.000	+ 19
II	20	„	1010.000	+ 174.000	+ 20,8
III	15	„	906.000	+ 70.000	+ 8
IV	19	Przesącz normalny 9)	836.000	—	—
V	21	Płyn fizjologiczny 10)	857.000	+ 21.000	+ 2

Group 1); number of fishes examined 2); liquids injected 3); average red cell count in 1 q. mm. 4); differences in red cell count between particular experimental groups and control group IV 5); in thousands 6); in per cents 7); erythropietic filtrate 8); normal filtrate 9); physiological saline 10).

Tabela 2. Ilość erytroblastów we krwi obwodowej u poszczególnych grup doświadczalnych ryb po zakończeniu iniekcji.

Table 2. The number of erythroblasts in the peripheral blood of particular experimental fishes after termination of injections.

Grupa 1)	Ilość badanych ryb 2)	Wstrzykiwane płyny 3)	Średnia ilość erytroblastów w ‰ 4)	Różnica między średnią ilością erytroblastów w danej grupie, a ilością u IV grupy kontrolnej 5)	
				w sztukach ‰ 6)	w procentach 7)
I	20	Przesącz erytropoetyczny 8)	9,30	+ 5,25	129
II	20	„	11,65	+ 7,60	187
III	15	„	6,66	+ 2,61	64
IV	19	Przesącz normalny 9)	4,05	—	—
V	21	Płyn fizjologiczny 10)	4,90	+ 0,85	20

Group 1); number of fishes examined 2); liquids injected 3); average number of erythroblasts in ‰ 4); differences in the number of erythroblasts between particular groups and control group IV 5); in absolute figures ‰ 6); in per cents 7); erythropietic filtrate 8); normal filtrate 9); physiological saline 10).

Obliczenia statystyczne wykazały, że „p” obliczone dla grupy I i II w porównaniu z grupą IV wyniosło 0,0003, a więc otrzymane różnice są istotne. Natomiast różnica między wynikami obliczonymi dla grupy III i IV leży w granicach błędu doświadczalnego.

U wszystkich badanych grup ryb we krwi obwodowej przeważała ilość erytroblastów ortochromatycznych. U grup doświadczalnych było ich procentowo znacznie więcej niż u kontrolnych. Erytroblasty polichromatyczne spotykano znacznie rzadziej, a bazofilnych nie spotykano u żadnego badanego osobnika.

Podział erytroblastów według stopnia ich rozwoju u poszczególnych grup ryb przedstawia się następująco:

Tabela 3. Podział erytroblastów według stopnia ich rozwoju.

Table 3. Erythroblasts according to degree of development.

Grupa 1)	Ilość badanych 2)	Wstrzykiwany płyn 3)	Średnia ilość erytroblastów w ‰ 4)	
			polichromatycznych 5	ortochromatycznych 6)
I	20	Przesącz erytropoetyczny 7)	0,55	8,75
II	20	„ „	2,75	8,90
III	15	„ „	0,66	6,00
IV	19	Przesącz normalny 8)	0,42	3,60
V	21	Płyn fizjologiczny 9)	1,38	3,52

Group 1); number of fishes examined 2); liquid injected 5); average number of erythroblasts in ‰ 4); polychromatic 5); orthochromatic 6); erythropoietic filtrate 7); normal filtrate 8); physiological saline 9).

Próba ustalenia aktywności układu czerwonokrwinkowego u badanych ryb na podstawie obliczenia ilości retikulocytów we krwi krążącej nie dała pozytywnego rezultatu. Spośród 92 rozmazów zabarwionych przyżyciowo błękitem Nilu, tylko na 2 znaleziono prawidłowo wybarwione retikulocyty.

#### OMÓWIENIE WYNIKÓW

Przytoczone wyniki, ilustrujące nasilenie procesów erytropoetycznych u badanych ryb na podstawie obliczenia ilości erytrocytów i erytroblastów we krwi krążącej dowodzą, że:

1. Zastosowany przesącz osocza anemizowanych doświadczalnie owiec

działa erytropoetycznie również w obrębie innej gromady zwierząt, a mianowicie na ryby.

2. Zastosowane 4-krotnie większe (w stosunku do wagi ciała) dawki przesączu erytropoetycznego od dawek podawanych uprzednio zwierzętom laboratoryjnym z gromady ssaków (króliki, myszy) wywołały przyrost ilości erytrocytów we krwi krążącej u ryb o około 20% normy, a więc w granicach obserwowanych u innych zwierząt doświadczalnych [16]\*.

3. Stosowanie jednorazowo większych od 0,5 ml ilości przesączu działało ujemnie na ryby, powodując wzrost śmiertelności. Te same skutki wywoływały kilkakrotne (4-krotne) iniekcje, po których nie obserwowano ponadto pobudzenia erytropoezy (grupa III doświadczalna).

4. W naszych badaniach przyżyciowe barwienie retikulocytów błękitem Nilu nie dało zadowalających rezultatów.

*Г. Кржимовска, С. Иваська, А. Винницки*

#### ВЛИЯНИЕ ЭРИТРОПОЭТИЧЕСКОГО ФАКТОРА ПЛАЗМЫ ОВЕЦ НА ЭРИТРОПОЭЗ У КАРПА (*Cyprinus carpio* L.)

##### *Содержание*

Продолжая исследования эритропоэтина произведено эксперименты с целью выяснения его действия по отношению к животным другого класса. Рыбам (*Cyprinus carpio* L.) в возрасте I года вприскивали внутримышечно загущенный фильтрат эритропоэтической плазмы полученной от искусственно анемизированных овец.

Прилагаемые результаты отображают динамику эритропоэтических процессов у исследуемых рыб на основании подсчёта эритроцитов и эритробластов в циркулирующей крови. Выводы:

1. Применяемый фильтрат плазмы искусственно анемизированных овец усиливает эритропоэз и у животных другого класса, а именно у рыб:

2. Применение учетверенной (по отношению к весу животного) дозы эритропоэтического фильтрата по сравнению с дозами применяемыми до того у лабораторных животных из класса млекопитающих (кролики, мыши) привело к увеличению содержания эритроцитов в циркулирующей крови у рыб на 20% нормы, Такие же пределы наблюдались у других лабораторных животных.

3. Однократное применение больше чем 0,5 мл фильтрата оказывает у рыб незначительное действие и сочетается со значительной смертностью. Такие же результаты получались после многократных (4 раза) инъекций, которые не приводили к усилению эритропоэза.

\* Wynik ten potwierdza spostrzeżenie szeregu autorów, przeprowadzone w czasie badań na zwierzętach laboratoryjnych, że zwiększenie dawek czynnika erytropoetycznego ponad pewne optimum nie powoduje dalszego równoległego wzrostu pobudzenia erytropoezy [4, 18].

H. Krzymowska, S. Iwańska, A. Winnicki

THE EFFECT OF THE ERYTHROPOIETIC FACTOR FROM SHEEP PLASMA  
ON ERYTHROPOIESIS IN CARPS (*CYPRINUS CARPIO* L)

Summary

In continuing studies on erythropoietine, its action within a different class of animal was investigated. A concentrated filtrate of erythropoietic plasma from experimentally anaemized sheep was injected to carp (*Cyprinus carpio* L.) yearlings.

The results, based on counts of erythrocytes and erythroblasts in the circulating blood, show that:

1. The filtrate also promoted erythropoiesis in animals belonging to a different class, viz., in fishes.

2. Per — body — weight doses four times more than given earlier to mammals (rabbits and mice) increased the number of red cells in the circulating blood of fishes by roughly 20%, that is, gave an increasment within the limits noted in other experimental animals.

3. Single doses of more than 0.5 ml. and killed a notable percentage of the fishes. Repeated (4) injections had the same effect and failed to stimulate erythropoiesis.

PIŚMIENNICTWO

1. Carnot P., Deflandre C.: C. R. Acad. Sci., 1906, 143, 384.
2. Crafts R. C., Meineke H. A.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1956, 92, 222.
3. Dinning J. S., Day P. L.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1956, 92, 115.
4. Erslev A. J.: Blood, 1953, 8, 349.
5. Erslev A. J., Lavietes P. H.: Blood, 1954, 9, 1055.
6. Fried W., Plzak L., Jacobson L. O., Goldwasser E.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1956, 92, 203.
7. Fried W., Plzak L., Jacobson L. O., Goldwasser E.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1957, 94, 237.
8. Gley P., Delor J.: C. R. Soc. Biol., 1955, 149, 7—8, 635.
9. Goldwasser E., Jacobson L. O., Fried W., Plzak L.: Sci., 1957, 125, 1085.
10. Goldwasser E., Jacobson L. O., Fried W., Plzak L.: Blood, 1958, 13, 55.
11. Gordon A. S., Piliero S. J., Kleinberg W., Friedman H. H.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1954, 86, 225.
12. Gordon A. S., Piliero S. J., Medici P. T., Siegel C. D.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1956, 22, 52.
13. Hodgson G., Toha J.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1954, 86, 255.
14. Jacobson L. O., Goldwasser E., Fried W., Plzak L.: Nature, 1957, 179, 633.
15. Jacobson L. O., Goldwasser E., Plzak L., Fried W.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1957, 94, 243.
16. Krzymowski T., Krzymowska H.: Acta Physiol. Pol., 1959, 3, 349.
17. Linmann J. W., Bethell F. H.: Blood, 1956, 11, 310.
18. Plzak L. F., Fried W., Jacobson L. O., Berthard W. F.: J. Lab. Clin. Med., 1955, 40, 671.
19. Rambach W. A., Alt H. L., Cooper J. A.: Blood, 1957, 12, 1101.

Otrzymano: 15. 9. 1959.