

FRANCISZEK PRZAŁA, JAN KOTWICA

# Dynamizm wchłaniania krwinek czerwonych znakowanych $^{59}\text{Fe}$ do krwioobiegu po ich dootrzewnowym wlewie

Z Instytutu Fizjologii i Biochemii Zwierząt Wydziału Weterynaryjnego AR-T w Olsztynie

Jama otrzewnowa jest miejscem, gdzie podane płyny ustrojowe i roztwory fizjologiczne intensywnie się wchłaniają. Nie wnikając głębiej w sam mechanizm wchłaniania stwierdzić należy, że dootrzewnowe wlewy nie są dziś rzadkością. Podaje się tą drogą różne płyny elektrolitowe w stanach nadmiernego odwodnienia organizmów np. u cieląt po długotrwałej biegunce (9). Znana jest również i opisywana perfuzja jamy otrzewnowej, stosowana najczęściej w schorzeniach nerek, jako jedna z dróg pozwalająca na oddializowanie nadmiernego stężenia niektórych składników moczu nagromadzonych w płynach ustrojowych (2, 4).

Efekt otrzewnowej dializy sprawdzono również metodą izotopową z użyciem  $^{137}\text{Cs}$  (3). Dootrzewnowo można podawać także, w celach terapeutycznych, roztwory różnych leków, szczególnie w praktyce weterynaryjnej.

W ostatnich latach jamę otrzewnową wykorzystano jako miejsce wchłaniania zawiesin komórkowych. Tą drogą bowiem najczęściej wprowadza się zawiesiny krwinek czerwonych zwierzętom, u których wywołuje się doświadczalną policytemię (1, 5, 6, 7, 8, 10). Spośród różnych metod wywoływania policytemii u zwierząt doświadczalnych — które są używane jako bardzo czuły materiał biologiczny do testowania humoralnych czynników pobudzających erytropoezę — metoda ta jest najmniej kłopotliwa i stosunkowo szybka (1, 8, 10).

Intensywność wchłaniania zawiesiny krwinek czerwonych nie jest jednak dokładnie poznana. Nie znany był również fakt, w jaki sposób aktualny stan erytropoezy i zapotrzebowanie organizmu biorcy na krwinki czerwone, mogą wpływać na intensywność wchłaniania materiału komórkowego podanego dootrzewnowo. Dlatego w niniejszej pracy postawiono sobie za cel przebadanie dynamizmu wchłaniania zawiesiny krwinek czerwonych po ich dootrzewnowym wlewie, w zależności od nasilenia procesów erytropoezy u biorców.

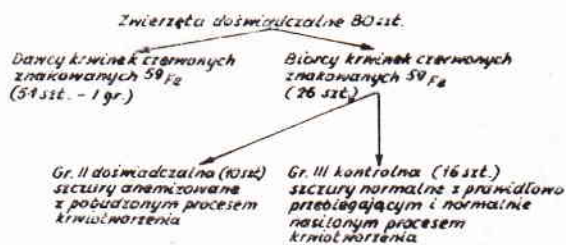
## Materiał i metody

Doświadczenie wykonano na 80 szczurach kapturowych, samcach o c.c. 170—230 g., pochodzących z przykładowej hodowli wsobnej, żywionych mieszaną granulowaną LSM dla gryzoni. Szczury podzielono na grupy (ryc. 1).

1. Produkcja i przygotowanie do iniekcji krwinek czerwonych napiętnowanych  $^{59}\text{Fe}$ .

Aby uzyskać dużą ilość napiętnowanych  $^{59}\text{Fe}$  krwinek, grupę szczurów dawców anemizowano trzykrotnymi upustami krwi. Upustów (w pierwszym, drugim i czwartym dniu doświadczenia) dokonano z żył ogonowych w łącznej ilości od 5—7 ml. W piątym dniu doświadczenia szczurom tym podano dootrzewnowo 0,5  $\mu\text{Ci}$  cytrynianu  $^{59}\text{Fe}$ , a po upływie następnych czterech dni szczury usypiano eterem i pobierano od nich krew przez punkcję serca po otwarciu klatki piersiowej. Krew wirowano, a uzyskane napiętnowane  $^{59}\text{Fe}$  krwinki czerwone przemywano 2 $\times$  płynem fizjologicznym i sporządzono z nich 80% zawiesinę w 0,9% NaCl, którą podawano szczurom — biorcom dootrzewnowo.

2. Badanie intensywności wchłaniania z jamy otrzewnowej.



Ryc. 1.

Grupy szczurów — biorców (II i III, ryc. 1) otrzymały jednorazowy dootrzewnowy zastrzyk 80% zawiesiny znakowanych krwinek czerwonych w ilości 2% ciężaru ich ciała. Anemizację zwierząt gr. II przeprowadzono metodą opisaną wcześniej.

Szybkość przechodzenia krwinek czerwonych z jamy otrzewnowej do krwioobiegu badano przez pomiar radioaktywności kolejno pobieranych próbek krwi. Pobierano je w 2, 4, 8, 14, 20, 24, 36, 48 i 72 godz. (w ilości 0,2—0,3 ml) licząc od chwili wprowadzenia zawiesiny krwinek czerwonych. Pomiaru radioaktywności próbek krwi dokonano przy pomocy licznika scyntylacyjnego — typ SE-Z/2. Równolegle w tych samych godzinach oznaczano wskaźnik hematokrytowy oraz zawartość hemoglobiny. Badania te wykonano ogólnie przyjętymi metodami.

3. Badania towarzyszące.

W celu upewnienia się, czy proces wchłaniania krwinek czerwonych z jamy otrzewnowej do krwioobiegu nie jest zaciemniany przez inne towarzyszące temu zjawisku czynniki wykonano dodatkowo:

a. Pośrednie badania stopnia fagocytozy i hemolizy podawanych znakowanych krwinek czerwonych.

W tym celu w niektórych godzinach u różnych sztuk zwierząt pobierano próbki krwi w nieco większej objętości (ok. 0,3—0,5 ml) uzyskaną krew wirowano, odciągano osocze i oznaczano jego radioaktywność na liczniku scyntylacyjnym.

b. Badanie radioaktywności płynu zawartego w jamie otrzewnowej

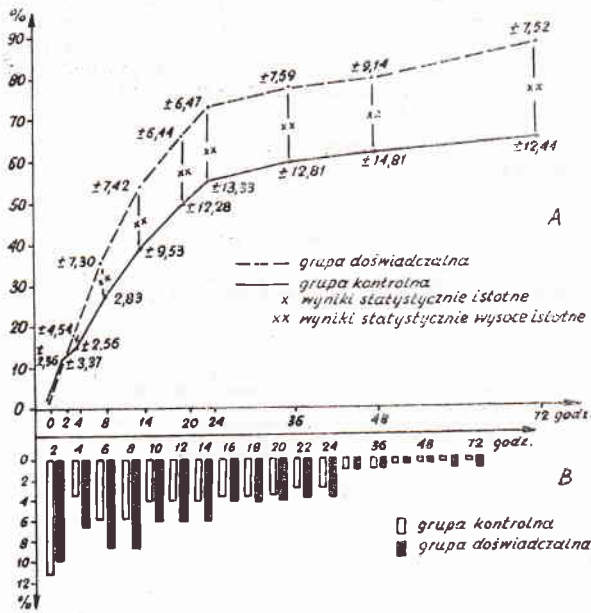
W tym celu w 72 godz. doświadczenia szczurom w uśpieniu eterowym wprowadzono określoną objętość

plynu fizjologicznego do jamy otrzewnowej. Następnie wykonywano lekki masaż jamy otrzewnowej przez palpację, po czym otwierano ją i pobierano próbkę płynnej zawartości, której radioaktywność określano licznikiem scyntylicyjnym.

c. Wpływ pobierania próbek krwi na proces wchłaniania z jamy otrzewnowej.

Każdorazowe pobieranie próbek krwi uszczuplało ogólną radioaktywność krwi obwodowej u zwierząt biorców. Celem wyeliminowania tego błędu uaktualniano pulę radioaktywności krwi obwodowej, dodając do niej radioaktywność próbek krwi pobranych wcześniej. W ten sposób obliczona pula obrazowała właściwą dynamikę wchłaniania krwinek czerwonych.

d. Badania statystyczne między grupą kontrolną a doświadczalną oraz szybkość wchłaniania w obrębie zwierząt każdej grupy określono testem Studenta. Dla różnic wysokości istotnych przyjęto  $P > 0,01$ , dla istotnych  $P > 0,05$ .



Ryc. 2.

Objaśnienia: A = krzywa narastania radioaktywności krwi obwodowej; B = procent wchłoniętych krwinek czerwonych w poszczególnych przedziałach czasowych.

Wyniki i omówienie

Wykonane badania pozwoliły na prześledzenie po raz pierwszy dynamiki wchłaniania znakowanych krwinek czerwonych z jamy otrzewnowej do krwiobiegu. Ryc. 2A przedstawia krzywą narastania radioaktywności w krwi

obwodowej u zwierząt, którym uprzednio podano znakowane <sup>59</sup>Fe krwinki. Z wykresu tego wynika, że około 50% podanych krwinek wchłania się w pierwszych 14 godz. doświadczenia. Podczas następnej doby krzywa narastania radioaktywności we krwi wykazuje tendencję stabilizacji, co świadczy o zmniejszeniu się procesu wchłaniania w tym okresie czasu. Właściwy ilościowy przebieg procesu wchłaniania obrazuje jednak ryc. 2B. Okres doświadczalny podzielono tu na dwugodzinne interwały (2, 4, 6, 8... 72 godz.) i w stosunku do nich drogą odpowiednich przeliczeń w procentach wyrażono ilość wchłoniętych krwinek. Interpretacja dynamizmu wchłaniania po takim skorygowaniu jest bardzo prosta i wykazuje jednoznacznie, że największą krwinek wchłonięto się w interwale pierwszych dwóch godzin. Śledząc następne etapv ilościowego wchłaniania zauważyć można zmniejszenie tego procesu aż do 48 godziny doświadczenia włącznie. Wyjątek stanowi tu tylko czasokres między 2—4 godz., w którym to okresie wchłanianie z niewiadomych przyczyn było niższe niż w następnych przedziałach czasowych (ryc. 2B). W 72 godzinie zauważamy niewielki ponowny wzrost radioaktywności krwi obwodowej. Ten ostatni wzrost wskazuje wyraźnie na proces reutilizacji <sup>59</sup>Fe uwolnionego z krwinek czerwonych, które uległy destrukcji bądź fagocytozie (5) w pierwszym okresie doświadczenia. Za taką interpretacją przemawiają badania dodatkowe, z których wynika (tab. 2), że w jamie otrzewnowej nie było już wówczas radioaktywnych krwinek czerwonych, które wchłonięte do krwiobiegu mogłyby podwyższać radioaktywność krwi obwodowej. Natomiast potwierdzeniem istnienia procesu częściowej destrukcji i fagocytozy materiału wprowadzonego do jamy otrzewnowej jest fakt, że w badaniach ilościowych nie znaleziono we krwi obwodowej całej puli radioaktywności uprzednio podanej, lecz jedynie jej około 60—90% (ryc. 2A).

Zjawiska destrukcji nie można było jednak wykryć pośrednio, przez badanie radioaktywności osocza (badania dodatkowe (tab. 2), ponieważ radioaktywne <sup>59</sup>Fe uwalniane z produktów rozpadu krwinek czerwonych jest w większości po odpowiednich przemianach kierowane do

Tab. 1. Procentowy wzrost Hm i Hb w kolejnych godzinach doświadczenia, przyjmując dane z godziny zerowej za 100%

Wskaźnik	Grupa	wartości bezwzgl. %	Godziny pobrania próbek									
			0	2	4	6	14	20	24	36	48	72
Wskaźnik Hm	kontrolna	wartości bezwzgl. %	37,8	39,8	40,8	42,9	44,0	44,7	46,3	45,3	44,0	47,4
	doświadczalna	wartości bezwzgl. %	30,2	30,8	32,0	33,6	38,5	40,8	41,3	41,4	41,4	40,0
Wskaźnik Hb	kontrolna	wartości bezwzgl. %	11,30	11,79	13,72	13,82	13,74	13,75	14,35	13,30	13,04	12,77
	doświadczalna	wartości bezwzgl. %	8,20	8,50	8,91	9,96	10,67	11,44	11,19	11,81	11,32	11,44
			100	105,2	107,9	113,5	116,4	118,2	122,5	119,2	116,4	112,2
			100	101,9	106,0	115,5	127,4	135,0	136,7	135,8	135,8	132,4
			100	104,3	116,0	120,5	121,6	121,6	127,0	117,6	115,3	113,0
			100	103,6	108,6	121,3	130,1	132,5	136,5	144,0	138,0	139,5



Tab. 2. Zestawienie wyników badań uzupełniających

Charakter badań towarzyszących	Ilość badanych zwierząt		Godzina doświadczenia							
			2	4	8	14	20	24	36	
Posrednie badanie stopnia hemolizy i fagocytozy podanych znakowanych krwinek czerwonych	12	% radioaktywności osocza w stosunku do puli wchłoniętych krwinek czerwonych	0,07	0,3	1,8	-	-	-	-	
Wpływ pobierania próbek krwi na proces wchłaniania z jamy otrzewnowej	16	% błędu w danej godzinie obliczony w stosunku do całej puli podanej	dóśw. kontr.	- -	0,25 0,28	0,66 0,63	1,47 1,26	2,76 2,18	4,31 3,44	6,00 4,60
Radioaktywność płynu w jamie otrzewnowej obliczonej w stosunku do całej puli podanej	9	0,04%	Badanie wykonano po 12 godzinach							

magazynów żelaza. Badania dodatkowe (tab. 2) wykazały również, że uaktualnienie puli radioaktywności krwi obwodowej przez dodanie impulsów utraconych w czasie pobierania próbek krwi nie zaciemniło badanego procesu wchłaniania.

Drugi ważny aspekt omawianych wyników dał jednoznaczna odpowiedź na postawione w założeniach pytanie, że intensywność procesu wchłaniania krwinek czerwonych jest zależna od aktywności erytropoezy biorców.

Wykazano bowiem (ryc. 2A i 2B), że zwierzęta anemiczne, czyli z pobudzoną erytropoezą, wchłonięły ilościowo o 30% erytrocytów więcej niż szczury grupy kontrolnej (różnica statystycznie wysoko istotna  $p > 0,01$ ). Ponadto dynamika procesu wchłaniania u zwierząt anemicznych różni się w sposób zasadniczy od zaobserwowanej u zwierząt kontrolnych. Analizując bowiem ryc. 2A i 2B, można zauważyć, że w pierwszych dwóch godzinach intensywniej wchłaniały się krwinki podane zwierzętom normalnym (o ok. 10%), poczynszys jednak od 4-tej godziny aż do końca doświadczenia wchłanianie u zwierząt anemizowanych z jamy otrzewnowej przebiega o wiele intensywniej. U zwierząt tych wchłonoło się w pierwszych 2—4 godzinach doświadczenia o około 50% więcej erytrocytów.

W tab. 1 przedstawiono dane dotyczące wzrostu wskaźnika hematokrytowego oraz poziomu Hb. I tak stwierdzono np. wzrost zawartości Hb o 44% w 36 godz. doświadczenia w grupie zwierząt anemicznych oraz znaczny wzrost wskaźnika hematokrytowego wskazujący wyraźnie, że w krwioobiegu biorców pojawiły się w dużej ilości elementy komórkowe krwinek czerwonych, zdolne do podjęcia swej funkcji.

Zbadanie problemu wchłaniania krwinek czerwonych z jamy otrzewnowej wydaje się być interesującym również z punktu widzenia przetaczania krwi u zwierząt. Nie zawsze bowiem przetaczanie dożylnie musi być koniecznie stosowane. W niektórych przypadkach podawanie dootrzewnowe jest bardziej wskazane. Czasami można podawać część krwi dożylnie, a drugą część dootrzewnowo, przy czym obydwie zabiegi mogą być wykonywane w jednakowym czasie, bez dwu- i więcej krotnego stresowania zwierząt. Podanie jednorazowo dożylnie dużej ilości krwinek czerwonych wywołuje okresową hyperwolemię ze wszystkimi jej następstwami, co ujemnie wpływa na organizm zwierzęcy. Pomijając jednak ten aspekt, jest to zabieg trudny i stosunkowo czasochłonny. Dootrzewnowe podanie jest stosunkowo proste,

można go stosować bez środków narkotycznych w stosunkowo krótkim czasie, stosując najprostsze metody ujarzmięcia zwierząt.

## Piśmiennictwo

1. Dusza L., Iwańska S., Krzymowska H.: Acta Physiol. Pol. 22, 814, 1971.
2. Dziuk E., Siekierzyński M.: Acta Physiol. Pol. 24, 465, 1973.
3. Dziuk E.: Pol. Arch. Med. wew. 46, 417, 1971.
4. Knochel J. P.: J. Appl. Physiol. 27, 223, 1969.
5. Krzymowska H.: Acta Physiol. Pol. 11, 790, 1960.
6. Krzymowska H., Przala J.: Acta Physiol. Pol., 16, 329, 1965.
7. Krzymowski T., Czarnyszewicz J.: Acta Physiol. Pol. 15, 140, 1964.
8. Krzymowski T., Przala J., Polubiec A., Olk J., Rostkowska J.: Acta Physiol. Pol. 14, 461, 1963.
9. Markiewicz K., Depta A.: Materiały Wlengierskiej Konferencji II. Oktjabr str. 199—205, 1972.
10. Przala J., Krzymowska H.: Acta Physiol. Pol. 22, 806, 1971.
11. Ruszczyk Z.: Metodyka doświadczeń zootechnicznych. PWRiL, Warszawa 1970.

Adres autora: dr Franciszek Przala, 10-728 Olsztyn-Kortowo, Instytut Fizjologii i Biochemii Zwierząt AR-T.

Пшала Ф., Котвица Я. — Динамика поглощения меченных изотопом  $^{59}\text{Fe}$  эритроцитов и перехода их до кровеносных сосудов после интраперитонеальной их инфузии.

Установили что около 50% инъцированных интраперитонеально эритроцитов включается в кровообращение в 12—14 часов. Динамика процесса зависит в большой степени от актуальной интенсивности эритропоэза крыс-реципиентов; у животных с экспериментально вызванной анемией этом процесс является но 30% более интенсивным. Авторы внушают возможность применения интраперитонеальной трансфузии крови также у других животных подчеркивая что этот метод является по сравнению с интравенозным менее затруднительным и позволяет избежать временной гиперволеми.

Przala F., Kotwica J. — Dynamics of absorption of the erythrocytes labelled with  $^{59}\text{Fe}$  by the blood circulation following intraperitoneally infusion.

The authors have found that about 50 per cent of erythrocytes given intraperitoneally was absorbed by the blood circulation within 12—14 hours. The dynamics of the process depended on actual erythropoiesis in rats-recipients. It was stated that in the animals with anaemia the process was more intensive at about 30 per cent. It is suggested to apply this method of transfusion as less troublesome and rapid, and which allows to avoid a transient hypervolaemia that is related with intravenous transfusion.