

Piotrowska K. — Karotenoidenspiegel im Kälberserum zur Zeit des Überganges von der Winter- zur Sommerfütterung.

Karotenoidenspiegel im Kälberserum im letzten Zeitraum der Winterfütterung (8—17 Mai) machte

85.2 µg — 100 ml Blutserum aus. In 24 Stunden nach der Weide hat sich derselbe auf 160.0 µg — 100 ml erhöht und nach 10 Tagen Weidezeit 442.5 µg — 100 ml Blutserum erreicht.

## FIZJOLOGIA

ZBIGNIEW JARA

Wrocław

### Wyniki badań nad układem krzepnięcia krwi karpia (*Cyprinus carpio L.*)

Autoreferat \*)

W procesie krzepnięcia krwi wyróżnia się trzy fazy: 1. powstawanie trombokinazy, 2. powstawanie trombin, 3. powstawanie fibryny. Większość autorów wyróżnia także fazę fibrynolizy wytworzonego skrzepu pod wpływem enzymów zawartych w osoczu.

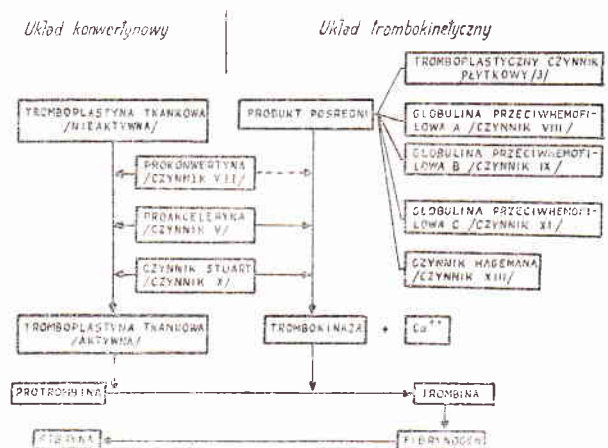
Liczne prace wykonane w ostatnich piętnastu latach, głównie na materiale klinicznym, pozwoliły na wyróżnienie w układzie krzepnięcia krwi człowieka, oprócz dawniej znanych ciał, całego szeregu czynników uczestniczących w procesie aktywacji protrombiny. Według zestawień podawanych we współczesnych opracowaniach podręcznikowych należą do nich: globulina przeciwhemofilowa A (czynnik VIII, AHG, PTF, trombokinaza osoczowa, plazmokinaza, ko-faktor płytkowy I); globulina przeciwhemofilowa B (czynnik IX, czynnik Christmas, PTC, ko-faktor płytkowy II); globulina przeciwhemofilowa C (czynnik XI, czynnik Kollera, PTA); czynnik Hagemana (czynnik XIII, czynnik szkła, czynnik kontaktu); proakceleryna (czynnik V, czynnik chwiejny, Ac-globulina osoczowa, ko-faktor tromboplastyny Honorato); prokonwertyna (czynnik VII, SPCA, ko-tromboplastyna Manna, czynnik trwały, czynnik Jacoxa, trombotropina Kudriaszowa); czynnik Stuart (czynnik X, czynnik Prower).

Proakceleryna, prokonwertyna oraz czynnik Stuart tworzą razem z protrombiną układ protrombinowy, jako zespół ciał koniecznych dla prawidłowego czasu protrombinowego\*\*).

Według Soulier w procesie formowania trombokinazy powstaje w wyniku interakcji czynnika tromboplastycznego krwinek płytkowych

oraz globulin przeciwhemofilowych, produkt pośredni, tj. nieaktywna (niekompletna) trombokinaza, porównywalna choć nie identyczna z tromboplastyną tkankową. Aktywacja produktu pośredniego dokonuje się pod wpływem ciał układu protrombinowego, podobnie jak i aktywacja tromboplastyny pochodzenia tkankowego. Jednak produkt pośredni może być aktywowany i w nieobecności prokonwertyny, której obecność jest niezbędna dla krzepnięcia przy współudziale tromboplastyny tkankowej. Dało to podstawę do przyjęcia istnienia dwu mechanizmów konwersji: konwertynowego i trombokinetycznego.

Wstępem do tworzenia produktu pośredniego ma być aktywacja globuliny przeciwhemofilowej C i czynnika Hagemana w następstwie zetknięcia z obcymi powierzchniami.



Do dziś nie ma jeszcze jednolitego poglądu na kinetykę przemiany protrombiny. Istotą tej przemiany jest proteoliza cząsteczki protrombiny, połączona z przyrostem reszty azotowej. Do ugruntowania tego poglądu sformułowanego po raz pierwszy przez *Fergusona* w 1943 r. przyczyniły się w znacznej mierze badania *Kowarzyka* i jego szkoły.

*Seegers* i *Roka* uważają konwersję za proces autokatalityczny. Według *Seegersa* polega on na

\*) Niniejszy referat jest streszczeniem wyników trzech prac: 1) Jara Z.: The blood coagulation system in carp, Zool. Pol., 8, 113, 1957. 2) Marciniakówna E., Jara Z.: Trombina i trombokinaza krwi karpia, Post. Hig. Med. Dośw., 14, 329, 1960. 3) Jara Z.: Badania nad mechanizmem trombino-genyzy w krwi karpia, Zool. Pol. 1961, w druku.

Zawarte w części ogólnej referatu, dane pochodzą z wielu prac polskich i zagranicznych, zestawionych w spisach piśmiennictwa trzech wyżej wymienionych prac własnych.

\*\*\*) Czas protrombinowy jest to czas krzepnięcia osocza szczawianowego pod wpływem wapniowanej tromboplastyny tkankowej (mózgowej). Wyciągi tkankowe mają jak wiadomo, własności trombokinetyczne.

tym, że pod wpływem trombiny następuje rozpad protrombiny na trombinę oraz produkty pośrednie zwane autoprotrombiną I i II. Autoprotrombina I przypomina pod każdym względem czynnik VII, autoprotrombina II jest akceleratorem trombinogenezy w obecności zawiesiny płytek, globuliny przeciwhemofilowej A, czynnika V i wapnia.

Argumentów na korzyść poglądu o autokatalitycznym przebiegu trombinogenezy dostarczają ostatnie prace Kowarzyka i Marciniaków. Wyniki badań tych autorów wskazują na to, że w czasie trombinogenezy w normalnym osoczu ludzkim zadaniem kefalinami i wapniem, powstaje ciało zbliżone do autoprotrombiny II Seegersa, katalizujące proces trombinogenezy. Warunkiem działania tego ciała jest obecność czynnika V. Cytowani autorzy nadali temu ciału nazwę autoprotrombina C.

Istnieje szereg prac, z których wynika, że układ krzepnięcia w obrębie gromady ssaków jest w zasadzie taki sam jak u człowieka. Występujące różnice są z reguły natury ilościowej i dotyczą poziomu poszczególnych składników układu krzepnięcia. A więc np. krew człowieka zawiera najwięcej protrombiny (Nicola), natomiast jest uboższa od krwi zwierząt ssących w czynnik V, którego poziom jest najwyższy u psa. Wg Sjolina krew konia nie wykazuje obecności czynnika Hagemana, a wg Didisheima i wsp. krew krowy i owcy cechuje wysoki poziom globuliny przeciwhemofilowej A.

Układ krzepnięcia krwi ptaków, jak to wynika z prac Buluka, Wartelle, Marciniaków i Czerwińskiej oraz Didisheima i wsp., jest podobny do układu krzepnięcia krwi ssaków. Różnice jakie stwierdzili, niektórzy spośród wymienionych autorów, wyrażają się brakiem globuliny przeciwhemofilowej B w krwi kury i kaczki, a w związku z tym upośledzeniem wytwarzania trombokinazy i upośledzeniem zużycia protrombiny. Przy tym, jak wykazały badania Marciniaków i Czerwińskiej, trombina u kury wytwarza się tylko w śladach.

Już w 1906 r. Nolf na podstawie badań własnych oraz prac Delzenne'a (1897) i Rodiera (1900) wykonanych na różnych kręgowcach, a wśród nich także na rybach, postawił jako pierwszy tezę, że mechanizm krzepnięcia krwi w obrębie podtypu kręgowców jest w zasadzie jednakowy. Występujące różnice dają się zdaniem Nolfa tłumaczyć brakiem płytek, zastąpionych we krwi ryb i ptaków (a także płazów i gadów) przez łatwo dające się odwirować i mniej skłonne do rozpadu komórki wrzecionowate.

Na temat układu krzepnięcia krwi ryb danych w literaturze jest niewiele. Poza Nolfem, Delzenne'em, Rodierem układem krzepnięcia krwi ryb zajmowali się Saito (1954), Kudriaszow, Andrejenko i Ulitina (1958) oraz Wolf

(1959). Ponadto jeszcze kilku innych autorów przy okazji różnych badań na rybach wspomina ogólnie o własnościach krwi oraz o czasie jej krzepnięcia, o zawartości fibrynogenu itp. Wśród tych wszystkich danych utrzymuje się na ogół zgodne przekonanie, że czas krzepnięcia całej krwi ryb jest bardzo krótki.

Wyrażony uprzednio pogląd Nolfa o zasadniczym podobieństwie układu krzepnięcia krwi u wszystkich zwierząt kręgowych, znajduje potwierdzenie także w wynikach badań układu krzepnięcia krwi ryb. Zarówno Kudriaszow i wsp. jak i Wolf stwierdzają, że układ krzepnięcia krwi ryb jest podobny do układu krzepnięcia krwi ssaków. Jedynie Saito uważa go za bardziej prymitywny. Należy tu jednak stwierdzić, że autor ten pogląd swój zbudował na podstawie wyników badania układu krzepnięcia krwi ryb Spodoustych (*Elasmobranchii*), które stanowią filogenetycznie pierwotną grupę ryb.

Referowane prace własne wykonano w oparciu o doświadczenie, jakie w dziedzinie badania krzepliwości krwi posiada Zakład Patologii Ogólnej Akademii Medycznej we Wrocławiu, kierowany przez prof. Kowarzyka.

W wyniku najwcześniejszych badań własnych (Jara, 1957) przekonano się, że w krwi karpia istnieje układ protrombinowy zawierający podobnie jak u ssaków, obok protrombiny, prokonwertynę (czynnik VII), i czynnik chwiejny (V), lub ich homologi funkcyjne. Stwierdzono również, że w roztworze globulin po rekalcytacji następuje wzrost reszty azotowej, oraz że wytworzony w takich warunkach skrzep ulega fibrylizacji. Na tej podstawie, a także na podstawie stwierdzenia aktywności fibrynolitycznej materiału trombinowego izolowanego z roztworu globulin krwi karpia, wobec krzepnącego pod jego wpływem roztworu fibrynogenu bydłęcego — przyjęto obecność proteazy trombinowej w układzie krzepnięcia krwi karpia.

Występowanie w krwi karpia w miejsce trombocytów dużych nie ulegających łatwo rozpadowi, a dających się łatwo odwirować trombocytoblastów, umożliwia otrzymywanie osocza naturalnego, tj. osocza nie krzepnącego spontanicznie bez dodatku środków przeciwskrzepowych. Okazało się, że osocze naturalne krzepnie po rozcieńczeniu wodą, przy czym najkrótszy czas krzepnięcia uzyskuje się przy zmieszaniu 1 objętości osocza z 3 objętościami wody. Wytworzony w takich warunkach skrzep jest lity i sztywny. W przeciwieństwie do wody roztwór fizjologiczny NaCl nie powoduje krzepnięcia osocza naturalnego.

Przeciwnie aniżeli w krwi ssaków, w której raz zaczęty proces krzepnięcia jako reakcja autokatalityczna przebiega aż do całkowitego wykrzepienia krwi, wytworzenie śladów trombiny w krwi karpia nie musi doprowadzić procesu krzepnięcia do końca. U człowieka zja-

wisko takie znane jest tylko w warunkach patologicznych, a mianowicie w przypadkach hemofilii. Występuje natomiast także w prawidłowej krwi kury. Surowica krwi karpia zawiera wobec tego zawsze duże ilości protrombiny, którą w surowicy ludzkiej stwierdzić można tylko w śladach.

Przeciwstawiając autokatalitycznemu typowi układu krzepnięcia krwi ssaków, typ układu krzepnięcia krwi karpia i kury określił *Kowarzyk* jako homeostatyczny.

Dzięki rozwojowi metod badania krzepliwości krwi, następane dwie prace (*Marciniakówna, Jara, 1960, Jara, 1961*) pozwoliły poznać bliżej układ trombokinetyczny oraz mechanizm trombinogenezy w krwi karpia.

Wykonane na osoczu próby z użyciem kefalin bydlęcych wykazały, że w układzie krzepnięcia krwi karpia powstawanie trombokinazy jest procesem szybkim i sprawnym. Pomimo sprawnego wytwarzania trombokinazy, zużycie protrombiny w osoczu nie jest zupełne. W ciągu 15 minut od momentu zadania osocza szczawianowego kefaliną i wapniem tylko  $\frac{2}{3}$  protrombiny ulega zużyciu. Na poziomie  $\frac{1}{3}$  wyjściowej ilości protrombiny, konsumpcja przechodzi w fazę asymptotyczną. Podobnie upośledzoną konsumpcję stwierdza się w prawidłowym osoczu kury oraz w ludzkim osoczu hemofilowym. Tę upośledzoną konsumpcję zarówno w osoczu hemofilika jak i prawidłowym osoczu karpia i kury można uczynić dodatkiem preparatu trombiny. Zużycie protrombiny upodabnia się wtedy do zużycia w prawidłowym osoczu człowieka, tzn. staje się zupełne.

Według przytoczonego uprzednio poglądu *Kowarzyka i Marcinkówny (1961)* ciałem aktywującym konsumpcję protrombiny jest zawarta w preparacie trombiny autoprotrombina C. Warunkiem jej działania jest obecność czynnika V. Zgodnie z tym także i u karpia okazało się, że preparat trombiny z krwi tej ryby aktywuje konsumpcję tylko wtedy, gdy jest dodany do badanego układu w fazie, w której obecny jest jeszcze czynnik V. Czynnik ten jako chwiejny ulega z czasem zanikowi; i stąd w późniejszej fazie próby, aktywację konsumpcji uzyskać można tylko przez dodanie do układu-niepostarzałego, adsorbowanego osocza (\*\*\*) karpia, jako źródła czynnika V.

Stosując „Stypven”, tj. preparat z jadu węża *Vipera russelli*, wykazano, że krew karpia zawiera również czynnik Stuart (czynnik X), lub jego homolog funkcyjny.

Oznaczony przy okazji omawianych badań poziom protrombiny w osoczu karpia, okazał się bardzo zbliżony do poziomu protrombiny prawidłowego osocza ludzkiego. Należy w tym miejscu stwierdzić, że *Warner* i wsp. na pod-

stawie badań wykonanych w 1939 r., ocenili zawartość protrombiny w krwi ryb zaledwie na kilka procent normy człowieka.

Wszystkie wykonane w referowanych pracach własnych pomiary czasu protrombinowego wskazują zgodnie na dużą aktywność układu protrombinowego karpia. Czas protrombinowy osocza tej ryby wynosi bowiem średnio 7 sekund, czyli jest 2—2,5 razy krótszy aniżeli czas protrombinowy osocza człowieka lub kury. Krótki czas protrombinowy osocza rybiego stwierdził także *Kudriaszow* w badaniach białomorskich ryb kostnoszkieletowych.

Stwierdzone w pierwszej z referowanych prac podobieństwo układu protrombinowego krwi karpia do układu protrombinowego krwi ssaków, potwierdzono także w ostatniej z referowanych prac; i to zarówno powtarzając uprzednio wykonane próby jak i przeprowadzając próby w poprzednich dwu pracach nie wykonywane.\*\*\*)

Generacja trombiny w pełnym osoczu karpia zadaniem wapniowaną tromboplastyną jest szybka i wydajna, a zużycie protrombiny zupełne. Generacja trombiny w pełnym osoczu karpia zadaniem kefaliną i wapniem jest słaba, a zużycie protrombiny znacznie upośledzone. Rozcieńczenie osocza pobudza trombinogenezę w obecności kefalin i wapnia, i zwiększa konsumpcję protrombiny, która w osoczu rozcieńczonym 4-krotnie i więcej, staje się zupełna. W związku z wpływem rozcieńczenia na trombinogenezę u karpia, stwierdza się, że czas krzepnięcia osocza rozcieńczonego zadanego kefaliną i wapniem, jest krótszy aniżeli osocza nierozcieńczonego. To skrócenie czasu kefalinowego dotyczy zarówno osocza szczawianowego, rozcieńczonego buforem boranowym (pH 7,5) jak i osocza naturalnego rozcieńczonego wodą lub fizjologicznym roztworem NaCl. Rozcieńczenie osocza naturalnego wodą powoduje jednak znaczniejsze skrócenie czasu kefalinowego, aniżeli rozcieńczenie roztworem fizjologicznym NaCl. Łączy się to zapewne z faktem opisanym poprzednio, że samoistnie nie krzepnące pełne osocze naturalne można pobudzić do krzepnięcia, rozcieńczając go samą tylko wodą, czego nie można osiągnąć stosując zamiast wody roztwór fizjologiczny soli kuchennej. Udaje się to natomiast przy użyciu hypotonicznego roztworu soli, przy czym czas krzepnięcia osocza jest proporcjonalny do stężenia dodanego roztworu soli.

Przypuszczać więc należy, iż w osoczu karpia jest obecne ciało o własnościach antykoagulan-

\*\*\*) Osocze adsorbowane jest to osocze pozbawione protrombiny, prokonwertyny i globuliny przeciwhemofilowej B, drogą adsorpcji na BaCO<sub>3</sub>.

\*\*\*\*) Chodzi tu mianowicie o próbę *Quicka* na obecność czynnika chwiejnego (V), próbę *Kudriaszowa* na obecność „trombotropiny” i próbę *Jacoxa* na obecność czynnika konwersji protrombiny (PcF). Opierając się o doświadczenie Zakładu Patologii AM we Wrocławiu oraz o dane z piśmiennictwa, dodatnie wyniki dwu ostatnich prób uznano za dowodzące występowania w układzie protrombinowym krwi karpia prokonwertyny czyli czynnika VII (SPCA).

tu, utrudniające reakcję nie rozcieńczonego osocza szczawianowego z kefaliną w obecności wapnia. Prawdopodobnie to samo ciało blokuje kefaliny osoczowe, powodując w ten sposób niekrzepliwość osocza naturalnego. Ciało to zanika w miarę rozcieńczenia osocza. Zapoczątkowanie procesu krzepnięcia w osoczu naturalnym łączy się w sposób bliżej nie wyjaśniony nie tylko z rozcieńczeniem osocza, ale przede wszystkim z obniżeniem jego siły jonowej. Według obserwacji dokonanych w trakcie wykonywania referowanych badań wydaje się, że poziom antykoagulantu utrudniającego reakcję osocza z kefalinami w obecności wapnia, jest zmienny i zależy od stanu fizjologicznego ryb, a tym samym od pory roku.

Sprawność mechanizmu trombinogenezy zależy u karpia podobnie jak i u ssaków od dwu procesów: powstawania autoprotrombiny C i zanikania czynnika V. Na powstawanie autoprotrombiny wpływa u karpia rozcieńczenie osocza, zanikanie czynnika V zachodzi zarówno w osoczu pełnym jak i rozcieńczonym, i jest funkcją czasu.

Utrudniona obecnością antykoagulantu reakcja z kefaliną osocza nierozcieńczonego, staje się przyczyną niedoboru powstającej w trakcie trombinogenezy autoprotrombiny C, która jak wiadomo z badań Kowarzyka i Marcinkówny jest aktywatorem trombinogenezy. Dwu- i trzykrotne rozcieńczenie osocza, powodując zanikanie antykoagulantu pobudza nieco trombinogenezę, ale towarzyszące jej powstawanie autoprotrombiny jest zbyt powolne i wyprzedzane zanikaniem czynnika V. W nieobecności tego czynnika, obecność autoprotrombiny jest bez wpływu na wydajność trombinogenezy. Dopiero rozcieńczenie osocza do  $\frac{1}{4}$  lub powyżej, powoduje dostatecznie szybkie (i obfite) powstawanie autoprotrombiny, która nie wyprzedzana zanikiem czynnika V działa jako aktywator trombinogenezy. Autokatalityczny w tych warunkach przebieg tego procesu łączy się z zupełnym zużyciem protrombiny.

Wpływ rozcieńczenia na krzepnięcie stwierdzany *in vitro* na osoczu naturalnym i szczawianowym obserwuje się także *in vivo*. U karpia silnie wykrwawionych i pozostawionych w wodzie, następuje znaczne rozcieńczenie krwi przenikającą przez skrzela do krwiobiegu wodą. Z rozcieńczonej w ten sposób krwi, nie udaje się bez stosowania środków przeciwskrzepowych otrzymać niekrzepnącego osocza naturalnego, co jak wiadomo z poprzednich uwag, w nie rozcieńczonej, normalnej krwi udaje się zupełnie łatwo.

Zjawisko zwiększenia krzepliwości krwi w organizmie wykrwawionym znane także i u ssaków, jest wynikiem napływu do układu naczyniowego znacznej ilości cieczy tkankowej. U ryb jako zwierząt wodnych ten sam efekt jest wynikiem napływu do układu naczyniowego wody ze środowiska zewnętrznego.

W konkluzji niniejszego referatu należy stwierdzić, że wyniki przeprowadzonych badań przemawiają zgodnie za istnieniem w układzie krzepnięcia krwi ryb wszystkich tych samych, lub homologów funkcyjnych wszystkich tych samych ciał, jakie występują w układzie krzepnięcia człowieka i zwierząt ssących. Oczywiście nie ma dowodów odrębności poszczególnych białek i nic nie przemawia przeciwko temu, aby przyjąć, że np. jedna i ta sama cząsteczka białka, dajmy na to protrombiny, pełni rolę czynników: VII, IX i X, a inna jest analogiem czynników V i VIII łącznie.

Nie stojąca w sprzeczności z twierdzeniem o zasadniczym podobieństwie układu krzepnięcia krwi ryb i ssaków zależność wydajności trombinogenezy od rozcieńczenia osocza, oraz zależność krzepnięcia osocza naturalnego od obniżenia jego siły jonowej, mogą — jak się zdaje — być interpretowane jako wyraz przystosowania ryb w zakresie układu krzepnięcia krwi, do życia w środowisku wodnym. Pogląd taki wydaje się biologicznie uzasadniony.

Adres autora: dr Zbigniew Jara, Wrocław, Norwida 29.

## Z ZAGRANICZNEJ WETERYNARII

### Szok u zwierząt domowych\*)

Szok u leczonego lub operowanego zwierzęcia, jakkolwiek u zwierząt nie występuje tak często jak u ludzi z reguły nieoczekiwany, jest problemem, który wymaga bliższego poznania i wyjaśnienia.

Słowo szok pojawia się jako określenie medyczne w XVI w. we Francji, (hoc), w XVIII w. w Anglii (shoc) i w XIX w. w Niemczech (Schock). We wszystkich językach oznacza wstrząs, uderzenie, w roz-

mieniu medycznym wstrząs nerwowy. Francuzi początkowo mieszając skutek z przyczyną jako szok określali pozorną śmierć (petit mort, mort apparent). Jako główną przyczynę przyjęli uraz w czasie wypadku. Anglicy od początku uważali szok za wpływ wypadku i urazu.

Jak stwierdza Brass na podstawie światowej literatury medycznej, na temat przyczyny szoku istnieją dziesiątki poglądów, przy czym każda specjalność ocenia szok z punktu widzenia własnej dyscypliny. Jak dotąd nie ma ogólnie obowiązującej krótkiej definicji szoku i przyczyn tego stanu. Jeszcze ciągle zdarza się pomieszanie szoku ze stanami szokopodo-

\*) Na podstawie artykułu pt. Schock bei Haustieren, J. A. Hoffmann, Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift, 73, 21, str. 409—413, 22, 428—433, 23, 453—456, (1960).