

FR. ŁABENDZIŃSKI, U. MACKIEWICZ

BADANIA NAD ODCZYNYEM BAZOFILÓW SZPIKU KOSTNEGO I KRWI KRAŻĄCEJ U KRÓLIKA PO DOŻYLNYM WSTRZYKNIĘCIU HEPARYNY

Z III Kliniki Chorób Wewnętrznych A. M. w Poznaniu

Kierownik: prof. dr *Fr. Łabendziński*

Z Pracowni Farmakodynamiki A. M. w Poznaniu

W poprzedniej pracy (4) zostały przedstawione zmiany liczbowe leukocytów zasadochłonnych (bazocytów) krwi krążącej w pewnych odstępach czasu po wprowadzeniu dożylnym 50—100 mg heparyny u osób zdrowych i chorych. Wyniki były uzyskane przez ocenę odsetkową w grubej kropli, w której, w prawidłowych warunkach obraz bazocytów jest bardzo zmienny i łatwo wpadający w oczy, co wobec małej ich liczby znacznie ułatwia wyliczenie. Charakterystyczny obraz powstaje przez przeniknięcie wodorozpuszczalnej granulacji bazocytów do siatki fibryny, otaczającej tę krwinkę, i zabarwienie tej siatki. Doświadczenia te wykazały, że w grubej kropli pobranej już kilkanaście minut po wstrzyknięciu heparyny, liczba widocznych poprzednio siateczek wybitnie się zmniejszała, lecz w następnych próbach stopniowo wracała mniej więcej do pierwotnego poziomu.

To przejściowe zmniejszenie się liczby siateczek mogło mieć za przyczynę albo zmianę rozmieszczenia bazocytów, lub tylko pozbawienie ich specyficznej substancji metachromatycznej, dalszą możliwością było niewytworzenie się siatki fibrynowej dzięki działaniu przeciwkrzepliwemu heparyny, przez co ginęła zdolność powstawania swoistych siateczek. Ostatnią wreszcie ewentualnością był wzmożony rozpad bazocytów. Biorąc pod uwagę tę ostatnią możliwość, wolno było przypuszczać, że w takim wypadku musiała by w szpiku kostnym ukazać się zwiększona odnowa bazocytów, która powinna by się wyrazić w ich zwiększonej liczbie.

Powtarzanie w krótkich odstępach czasu nakłucia szpiku było wykonalne tylko na zwierzęciu. Wykorzystaliśmy w tym celu metodę, podaną niedawno przez jednego z nas (7). Poza tym badane były na zawartość odsetkową bazocytów grube krople oraz rozmazy krwi obwodowej.

METODYKA

Do doświadczeń zostało użytych 19 zdrowych królików własnego chowu wagi od 2,0 do 4,8 kg.

U każdego królika zostały wykonane następujące badania:

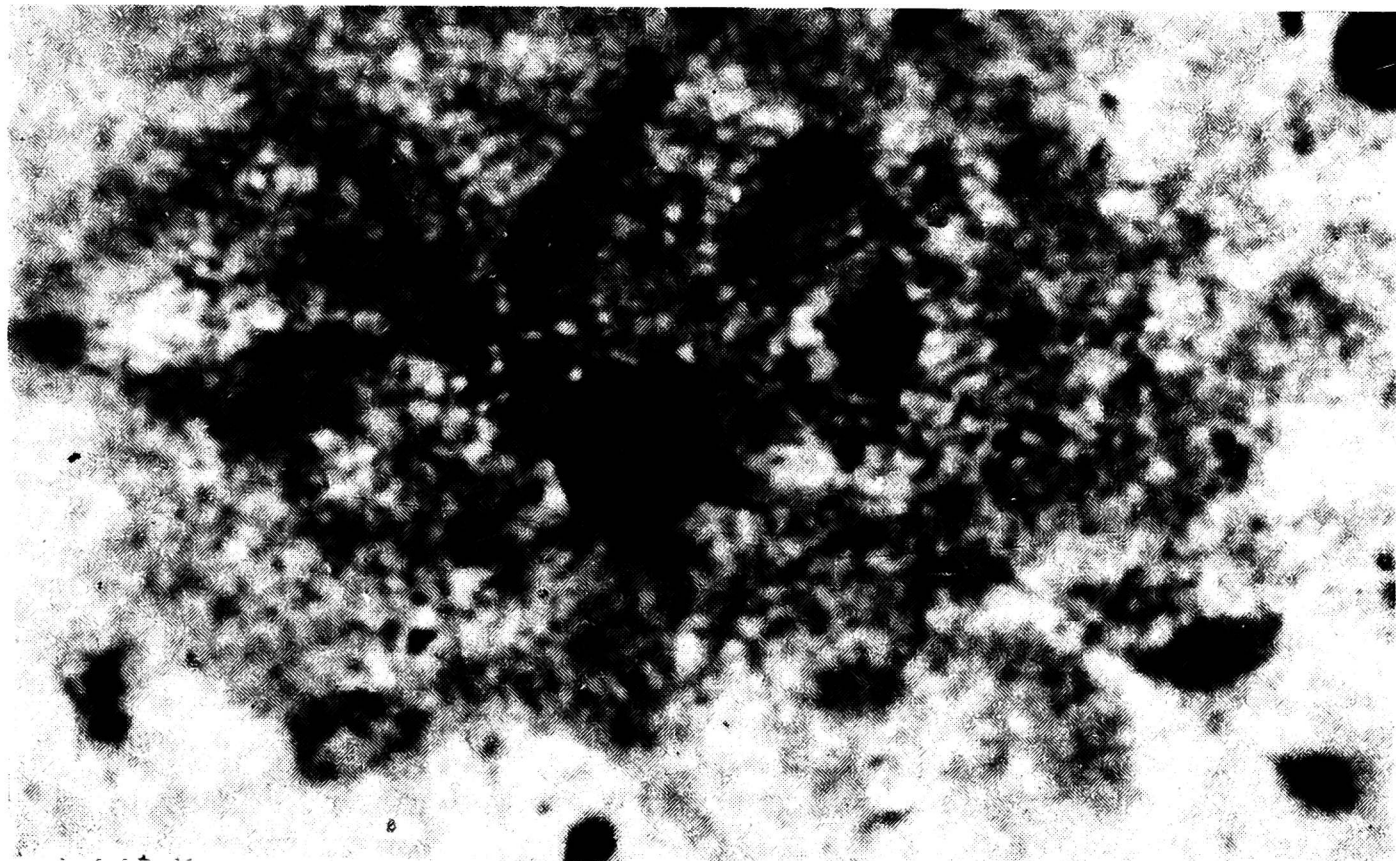
Na wstępie zostały zbadane w krwi z żyły ucha czas krzepnięcia, liczba białych ciałek oraz wykonane grube krople na szkiełkach podstawowych. Następnie zostało wykonane w narkozie eterowej nakłucie kości piszczelowej i wykonane rozmazy uzyskanego szpiku.

Po 20 minutach następował zastrzyk dożylny heparyny (Leo) w ilości początkowo 1—2 mg/kg wagi zwierzęcia, później w ilości 2—3 mg/kg wagi.

Po upływie 30 minut powtórzono ten sam zespół badań jak przed wstrzyknięciem heparyny, z tym, że nakłucie jamy szpikowej odbywało się na drugiej kości piszczelowej. W odstępach 60 i 120 minut wykonywano jeszcze 2 dalsze grube krople krwi obwodowej.

Króliki zniosły te zabiegi bez wyjątku dobrze i ich następowa obserwacja nie wykazała żadnych objawów chorobowych.

1) Postępowanie przy nakłuciu: do zabiegu królik został na stoliku operacyjnym ułożony na grzbiecie, skrepowany i otrzymywał narkozę eterową. Usuwano sierść



Ryc. 1. Obraz bazocyta w grubej kropli przed wstrzyknięciem heparyny. Królik nr 15a 3000 : 1.

Fig. 1. The picture of a basocyte in a thick drop before injection of heparin. Rabbit No. 15a 3000 : 1.

w okolicy stawu kolanowego i nakłuwano górną nasadę kości piszczelowej kończyny tylnej po stronie przyśrodkowej.

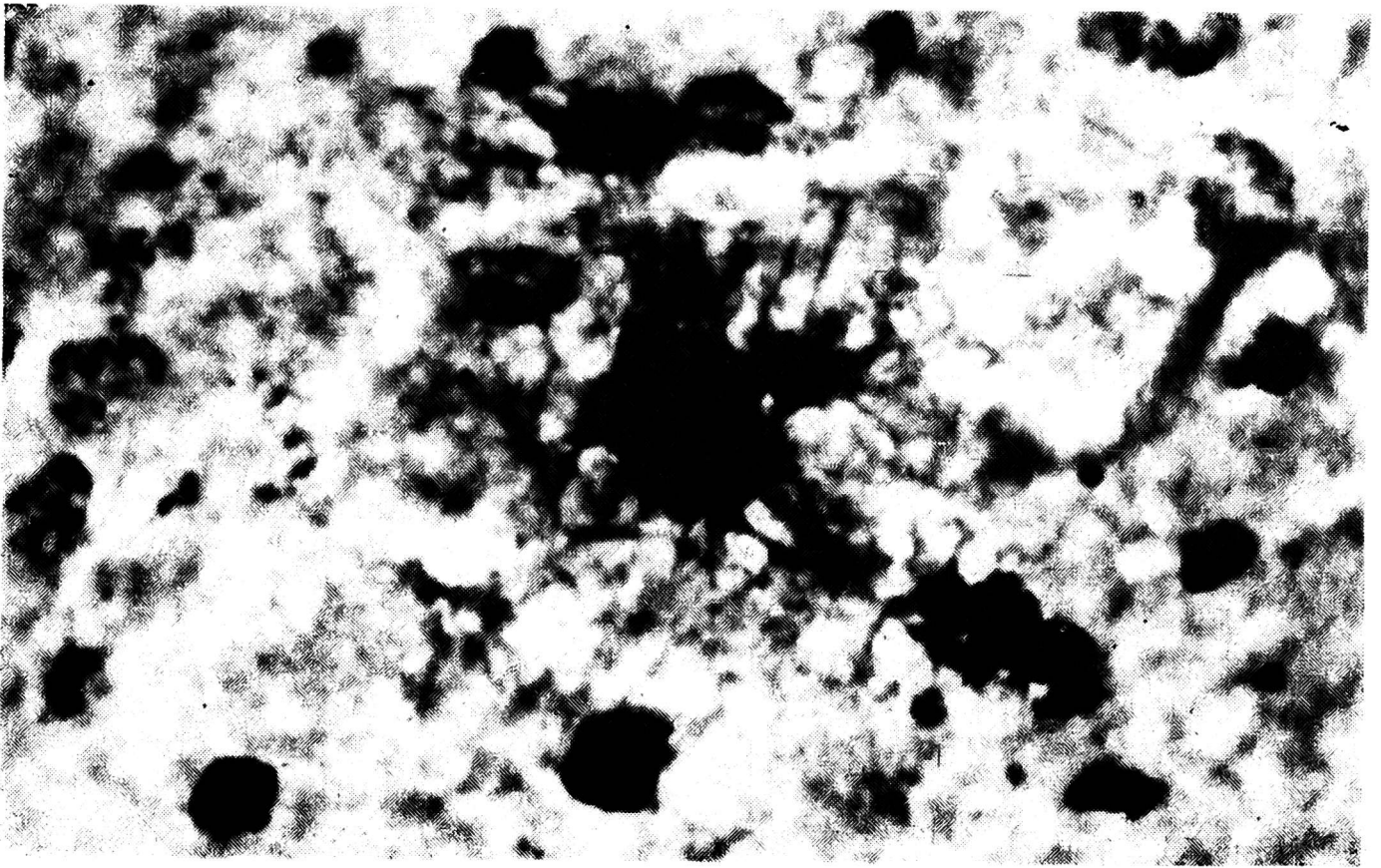
2) Technika grubej kropli jest opisana w Nowinach Lekarskich 1940, (5), w Le Sang 1956, (3). — Obrazy grubej kropli u królika różniły się pod dwoma względami od wyglądu tej barwnej plamy w preparatach krwi człowieka. W normalnej krwi królika, obraz metachromatycznie zabarwionej siatki fibrynowej jest bardzo wyraźny i rozległy, o przeciętnej średnicy 50μ (ryc. 1). Natomiast w grubej kropli, wykonanej w 30 minut po zastrzyku heparyny, wskutek braku skrzepu i nitek fibryny, metachromazja ogranicza się do ograniczonego zabarwienia białek w najbliższym otoczeniu jądra (ryc. 2). Wobec tego preparaty wymagają oglądania w korzystnych warunkach mikroskopu binokularowego.

3) W preparatach szpiku królika, przy braku wprawy, inne krwinki mogły być omyłkowo uważane za zasadochłonne. Mianowicie należy bazocyty uważnie odróżniać.

a) Od krwinek pseudoeozynochłonnych, których postacie młodsze mogą jeszcze posiadać ciemną granulację. Od pomyłek chroni stwierdzenie obecności podstawowych ziarenek.

b) Od promyelocytów, których granulacja bywa niekiedy bardzo ciemna, lecz które posiadają protoplazmę o odcieniu wyraźnie niebieskim. Decyzja, jaki rodzaj granulocytu powstanie z danego promyelocyta, jest niemożliwa.

c) Niekiedy od limfocytów o nagich jądrach, w których czasem spotyka się zagęszczenia w postaci ziarenek. Porównanie z innymi limfocytami uchroni od pomyłek.



Ryc. 2. Obraz bazocyta w grubej kropli w 30' po wstrzyknięciu heparyny. Królik nr 12b 3000 : 1.

Fig. 2. Te picture of a basocyte in a thick drop 30' after heparin injection. Rabbit No. 12b 3000 : 1.

WYNIKI

Wyniki są zestawione na tabeli 1.

1. Wśród 19 królików zbadano u 8 czas krzepnięcia krwi, który wykazał rozpiętość od 3 do 7 minut przed, a po 10 minutach od czasu wstrzyknięcia heparyny wydłużał się na 20 do 35 minut, przyczym nie udało się stwierdzić ścisłego stosunku między ilością użytej heparyny (1,0—3,5 mg/kg), a długością czasu krzepnięcia.

2. Liczby białych ciałek wynosiły początkowo od 4,0 do 10,0 tysięcy, wyjątkowo dużo u 2 królików, 12,5 i 21,9 tysięcy. Według zestawienia u Schermera (11), tak wysokie liczby znajdowało wielu autorów u zdrowych królików. W pół godziny po wstrzyknięciu heparyny, poziom leukocytów wzrósł u 9 zwierząt, u 6 spadł, u 4 zmiany były nieznamienne.

3. W szpiku kostnym, liczby odsetkowe bazocytów zostały obliczone przez przegląd 1000 krwinek. Dla ich zidentyfikowania zastosowano kry-

Tabela I

Lp.	Waga królika kg	Ilość heparyny w mg na 1 kg wagi	4		5		6		7				Gruba kropła liczba ba
			Czas krzepnięcia w minutach		Liczba białych ciałek w 1 mm ³ (× 10 ³)		Szpic kostny liczba % ba		Gruba kropła liczba % ba				
			a	b	a	a	a	b	a	b	c	d	
1	4 650	1,0	—	7,1	8,1	1,0	1,0	8,8	9,3	8,6	—	616	753
2	3 200	1,5	—	7,6	9,0	1,8	1,7	6,0	5,6	7,0	7,0	456	504
3	2 800	2,0	—	9,3	8,4	0,6	0,6	2,8	2,7	—	2,2	260	226
4	2 750	2,0	—	6,8	6,6	1,2	1,6	4,8	4,6	4,2	5,4	326	303
5	2 900	2,0	—	9,9	5,6	2,0	2,0	2,0	1,8	—	2,5	198	100
6	4 800	1,0	—	6,2	9,3	1,5	1,0	5,2	4,6	5,2	4,0	322	428
7	3 000	1,7	—	7,2	5,0	0,9	1,0	4,4	3,0	3,2	2,9	288	150
8	2 850	2,0	—	5,3	6,4	1,5	2,0	2,6	2,3	2,4	2,6	138	147
9	2 500	2,0	7	5,6	5,3	0,7	0,8	1,5	1,8	1,7	1,5	84	95
10	2 000	2,5	5	4,3	6,6	1,6	1,4	1,5	1,8	1,4	1,6	65	119
11	2 900	2,0	5	7,9	13,5	2,6	2,3	6,0	6,3	6,2	6,0	684	850
12	3 200	2,0	4	7,5	14,3	2,1	1,9	3,5	3,9	3,6	4,6	262	557
13	3 150	2,0	7	4,8	7,8	1,4	2,0	3,4	3,2	3,5	2,5	163	249
14	3 000	3,5	3	3,6	5,8	1,4	1,7	5,2	4,8	5,1	4,8	187	278
15	3 400	2,0	—	12,5	11,0	1,2	1,25	4,0	3,8	3,9	3,8	500	418
16	3 500	3,0	—	5,0	4,0	0,9	0,6	4,2	3,4	—	3,3	210	136
17	3 000	3,3	—	21,9	14,6	0,5	0,4	4,5	5,1	4,3	4,6	985	745
18	2 250	3,0	5	6,1	4,7	3,2	2,8	7,3	6,2	4,7	4,9	445	291
19	3 500	3,0	4	6,1	5,7	1,3	1,5	5,3	3,8	5,9	5,7	323	216

Legenda: 1) a = 20' przed zastrzykiem heparyny, b = 30' po zastrzyku, c = 60' po zastrzyku d = 120' po zastrzyku

2) w rubryce 8 obliczenie $L \times \frac{ba}{100}$

teria podane wyżej w dziale „metodyka“. Wyniki są następujące: przed zastosowaniem heparyny było bazocytów 0,5—2,6%, ze średnią 1,4%, tj. liczbą prawie równą średniej (1,3) uzyskanej przez Mackiewiczową w r. 1957 (7). W 30 minut po wstrzyknięciu heparyny nie było znaczniejszych zmian ilościowych zasadochłonnych w szpiku, przy podobnym rozrzućie 0,4—2,8%, i średniej 1,4%.

4. W krwi krążącej, czterokrotne badania (w czasie —20', +30', +60', +120') bazocytów, przeprowadzone metodą grubej kropli, dały następujące rezultaty: Pierwsze podstawowe wielkości wynosiły 1,5 do 8,8%. Są to, w porównaniu z krwią ludzką, liczby wprawdzie wysokie, lecz u królików bardzo częste (Scherner (11)). Wyliczenia bazocytów dokonane w terminach +30', +60' i +120' nie wykazały wahań bazocytów ani proporcjonalnych do wyjściowych, ani nawet wyraźnie jednokierunkowych. Przeważnie wahania są tak niewielkie, że mogą być uważane za leżące w granicach błędu, lub wahań indywidualnych dobowych.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

1. Przeprowadzone doświadczenia miały na celu zbadanie, czy u królika wśród bazocytów po zastrzyku heparyny można wykazać powstanie zmian ilościowych lub jakościowych. To zagadnienie stało się aktualne w związku z twierdzeniem autorów, że nie tylko bazochłonne tkankowe (2), lecz także bazocyty krwi (8, 12) zawierają w swych ziarenkach heparynę, która albo w nich jest wytwarzana lub tylko magazynowana.

2. Krwinki zasadochłonne są wytwarzane w szpiku, skąd przechodzą do krwi. Badając ich obecność w szpiku, przed i po zastrzyku heparyny, wychodziliśmy z założenia (podobnie jak Ruppel (10) w stosunku do eozynochłonnych), że ich ew. wzmożony odpływ ze szpiku dał by się poznać przez zmianę ich ilości lub ich morfologii. Doświadczenia wykazały, że spodziewane wahania ilościowe w szpiku nie powstają. Co do zmian jakościowych niesposób zaprzeczyć, że wskutek bardzo niewyraźnych granic jąder, orzeczenie o stopniu rozwoju (mielocyt → segmentowany) bazocytów jest problematyczny. Dlatego też po wielu próbach dokonania podziału wg wieku krwinki odstąpiliśmy ostatecznie od tego zadania obarczonego nieprzekonywującymi wynikami i ograniczyliśmy się do obliczeń ilościowych, które są podane w poprzednim rozdziale.

3. W krwi krążącej uzyskaliśmy za pomocą obliczenia odsetka bazocytów grubej kropli wyniki, upoważniające nas do stwierdzenia, że u królika, przez dożylne wstrzyknięcie heparyny, nie powstają poważniejsze zmiany w poziomie odsetka bazocytów. Pod tym względem zachodzi różnica z krwią ludzką, w której brak skrzepu po wstrzyknięciu heparyny powoduje zupełne zniknięcie metachromazji w otoczeniu wielu bazocytów, przez co ginie możliwość stwierdzenia ich obecności. — Wykazało się, że w krwi królika ślad charakterystycznego „halo“ metachromatycznego utrzymuje się także w tej fazie pobierania krwi (por. ryc. 2), co pozwala na odpowiednie wyliczenie bazofilów.

4. Przeliczenie tych danych odsetkowych na liczby bezwzględne bazocytów, przy użyciu cyfr białych ciałek z rubryki 5 na tabeli 1, wykazuje również niejednolity przebieg ruchu zasadochłonnych. W 8 przypadkach nastąpił słaby lub silniejszy wzrost, w 7 spadek absolutnych liczb bazocytów, w 4 przypadkach zmiany były zbyt ograniczone, by mogły być wzięte w rachubę.

5. Posiłkując się bezpośrednim wyliczeniem bazofilów w komorze cytometrycznej (w oparciu o metodę Moora i James'a (9), Angeli i wsp. (1) uzyskali w krwi ludzkiej mniejszy lub większy wzrost bezwzględnych liczb bazofilów po wstrzyknięciu 100 mg heparyny. Wzrost ten jest także przejściowy i kończy się w połowie przypadków już po 60 minutach, w reszcie najdalej po 2—3 godzinach, powrotem do liczb wyjściowych.

Ani próby podejmowane przez nas, ani też przez wspomnianych właśnie autorów, nie dają podstaw do zrozumienia przyczyn mniejszych lub większych wahań w liczbach bazocytów w szpiku kostnym i krwi obwodowej. Wydaje się, że te wahania są raczej przypadkowe i nie wyrażają poważniejszego wpływu heparyny na centralną czy obwodową regulację bazocytów. Zachowanie się bazocytów jest więc zupełnie inne, niż po podaniu kortykotropiny, gdzie, jak wykazaliśmy (6), spadek liczby bazocytów ma przebieg podobny do testu Thorna.

Ф. Лавендзински, У. Мацкевич

ИССЛЕДОВАНИЕ РЕАКЦИИ КОСТНОГО МОЗГА И КРУЖАЩЕЙ КРОВИ КРОЛИКА ПОСЛЕ ДОВЕНОЗНОЙ ИНЪЕКЦИИ ГЕПАРИНА

С о д е р ж а н и е

Исследовано поведение базоцитов в костном мозгу и кружащей крови кролика под влиянием гепарина. У 19 кроликов произведено методом, описанным в предыдущей работе 7 уколов в обе верховые кости перед и в тридцать минут после довенозной инъекции 1—3 мг/кг гепарина. В тех же двух сроках и по 60 и 120 минутам взята была кровь из уха кролика для изготовления препаратов толстых капель. Во всех препаратах исчислением 1000 эритроцитов установлено процентные количества базоцитов, представленные на таблицы. Количества, констатированные у отдельных животных не представляют однозначных колебаний, которые свидетельствовали бы об определенном влиянии гепарина на уровень базоцитов в крови кролика.

F. Łabendziński, U. Mackiewicz

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DAS VERHALTEN DES KNOCHENMARKS UND DES STRÖMENDEN BLUTS VON KANINCHEN NACH INTRAVENÖSER INJECTION VON HEPARIN

Z u s a m m e n f a s s u n g

Es wurde das Verhalten der basophilen Leukocyten im Knochenmark und im strömenden Blut von Kaninchen untersucht. Bei 19 gesunden Kaninchen wurden beide Tibien punktiert mit Hilfe einer früher beschriebenen Technik, und zwar vor und 30 Minuten nach einer i. v. Injektion von 1—3 mg/kg Heparin. Ausserdem wurden zu derselben Zeit, dazu noch nach 60 und 120 Minuten aus dem Ohrblut der Kaninchen dicke Tropfen angefertigt. In allen Präparaten wurde die Zahl der während der Durchsicht von 1000 Leukocyten gefundenen Basocyten gezählt. Die bei den einzelnen Tieren erhaltenen Ziffern geben keine einheitlichen Resultate und erlauben keine sicheren Schlüsse über die Wirkung von Heparin auf das Verhalten der Basocyten im Mark und im Blute von Kaninchen.

F. Łabendziński, U. Mackiewicz

STUDIES ON THE REACTION OF BASOPHILES OF BONE MARROW
AND CIRCULATING BLOOD IN RABBIT AFTER INTRAVENOUS
ADMINISTRATION OF HEPARIN

Summary

The behaviour of basocytes in the bone marrow and circulating blood of a rabbit under the influence of heparin was investigated. In 19 rabbits punctures of both tibia bones were made before and 30 minutes after intravenous injection of heparin in a dose of 1—3 mg/kg. The method employed was described in the previous study (7). Prior to the injection and 30, 60, and 120 minutes after the intravenous heparin administration blood was taken from a rabbit's ear for large drop preparations. In all the preparations the per cent numbers of basocytes were ascertained by counting 1000 blood corpuscles (presented by the table). The numbers obtained in individual animals do not show identical deviations which would prove definite influence of heparin on the level of basocytes in the blood of rabbits.

PISMIENNICTWO

1. *Angeli G., Tedeschi G., Cavazzatti F.*: Min. Med. 1955, 46, 757. — 2. *Holmgren H., Wilander O.*: Ztschr. f. mikr. anat. Forsch., 1937, 42, 242. — 3. *Łabendziński F.*: Le Sang, 1956, 27, 432. — 4. *Łabendziński F., Brzozowska W.*: Acta Physiol. Pol., 1956, 7, 508. — 5. *Łabendziński F.*: Now. Lek., 1949, 56, 251. — 6. *Łabendziński F., Brzozowska W.*: Pol. Arch. Med. Wewn., 1957, 27, 463. — 7. *Mackiewicz U.*: Acta Physiol. Pol., 1957, 4, 747. — 8. *Martin H., Roka L.*: Acta Haematol., 1953, 10, 26. — 9. *Moore J., James G.*: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1953, 82, 601. — 10. *Ruppel W.*: Schweiz. Med. Wchschr., 1951, 38, 926.

11. *Schermer S.*: Die Blutmorphologie der Laboratoriumstiere. Leipzig 1954. — 12. *Taubert M., Behrens M.*: Klin. Wchschr., 1952, 30, 76.

Otrzymano dnia: 13. VIII. 1958 r.