

ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN — POLONIA

VOL. XXIV, 5

SECTIO DD

1969

Z Katedry Fizjopatologii Wydziału Weterynaryjnego WSR w Lublinie
Kierownik: doc. dr Adam Kądziołka

Tadeusz RUCIŃSKI, Romualda PRUSZKOWSKA

**Wpływ podostrego zatrucia preparatem E 605 — Emulsion (Bayer)
na niektóre wskaźniki układu krzepnięcia krwi u królików**

Влияние подострого отравления препаратом E 605-Emulsion (Bayer)
на некоторые показатели системы свертывания крови у кроликов

Influence of Subacute Poisoning with E 605 — Emulsion (Bayer)
on some Indices of Blood Cloting System in Rabbits

Liczne obserwacje kliniczne oraz wyniki badań doświadczalnych dowodzą istnienia związku między układem krzepnięcia krwi a stanem czynnościowym układu wegetatywnego.

Perlick (10) podaje, że silne, nietypowe i nieregularne pobudzenie systemu cholino- lub adrenergicznego może być przyczyną powstania krwotoków albo zakrzepów. Według tego autora pilokarpina i acetylocholina zwiększają poziom protrombiny i prowadzą do zwiększenia krzepliwości krwi. Natomiast zdaniem innych badaczy (Zunz, Czubalski, Plattner i Kodera oraz inni, cyt. wg Gaertnera, 3) środki te powodują zmniejszanie krzepliwości krwi.

Istniejące w piśmiennictwie znaczne rozbieżności oraz pewne spostrzeżenia własne, poczynione nad działaniem na ustrój zwierzęcy inhibitorów hydrolazy acetylocholiny, insektycydów fosforoorganicznych (IFO), skłoniły nas do bliższego zainteresowania się wpływem tych środków na proces krzepnięcia krwi.

Już na samym początku braliśmy pod uwagę trudności, jakie mogą powstać przy wyciąganiu końcowych wniosków, a to dlatego, że działanie IFO nie jest jeszcze wystarczająco poznane i oddziaływanie znacznej ilości acetylocholiny w zatrutym ustroju jest bardzo złożone. Wiadomo bowiem (1), że acetylocholina wywiera zarówno działanie muskarynowe, jak i nikotynowe. O ile działanie muskarynowe charakteryzuje się pobu-

dzeniem zakończeń nerwów parasympatycznych, bez wpływu na zwoje układu wegetatywnego, to działanie nikotynowe dotyczy pobudzenia zwojów układu wegetatywnego i zakończeń nerwów ruchowych.

MATERIAŁ I METODY

Do doświadczeń użyto 16 królików o wadze 2,0—2,5 kg, płci obojga. Po 24-godzinnym głodzeniu krew do pomiarów wyjściowych pobierano z naczyń usznych, a następnie przy pomocy sondy podawano do żołądka zawiesinę preparatu E 605-Emulsion (Bayer) w 20 ml wody destylowanej. Preparat dawkowano w ilości 25 mg substancji czynnej na 1 kg wagi ciała, zakładając, że DL_{50} wynosi 50 mg substancji (V u i l l a u m e, 14).

Kolejne pomiary przeprowadzano w 3, 6, 9 i 24 godzinie. W pobranych próbkach krwi oznaczono: czas krzepnięcia krwi wg Lee-White'a (12), wskaźnik protrombinowy w oparciu o pomiary czasu protrombinowego wg I-stopniowej metody Quicka z użyciem homologicznej tromboplastyny (11) oraz fibrynogen wg G a c z e w a (2).

W czasie testowania przygotowanej tromboplastyny ustalono, że czas protrombinowy, uzyskany przy jej pomocy z krwią królików klinicznie zdrowych, był zawarty w granicach od 12 do 18 sekund. Do doświadczeń użyto więc tylko tych królików, u których czas protrombinowy w pomiarach wyjściowych mieścił się w owych granicach.

Czas protrombinowy przeliczano następnie na wskaźnik protrombinowy na podstawie wzoru: $W\% = \frac{N - 8,7}{B - 8,7} \times 100$, gdzie N odpowiadało czasowi protrombinowemu wyjściowemu oraz B — czasowi protrombinowemu uzyskanemu w kolejnym pomiarze.

Przy pobieraniu krwi i oznaczaniu czasu krzepnięcia krwi posługiwano się próbkówkami Pyrex, Cat. No 9820, f-my Corning Glass Works.

Otrzymane wyniki poddano analizie statystycznej (O j w i n, 9), obliczając średnie arytmetyczne (M), ich odchylenia standardowe (s) oraz średnie błędy (m). Istotność różnic pomiędzy wartościami wyjściowymi a otrzymanymi z kolejnych pomiarów obliczono przy pomocy testu Studenta, przyjmując za istotne różnice, gdy $t^{\circ} > t_{0,05}$.

WYNIKI BADAŃ

Na ogólną liczbę 16 królików użytych do badań jeden padł po upływie około 1,5 godziny, a dwa dalsze — między 9 a 24 godziną doświadczenia.

W tab. 1 oraz na ryc. 1 przedstawiono średnie wartości czasu krzepnięcia krwi w pomiarze wyjściowym oraz w kolejnych pomiarach, wykonanych po podaniu preparatu E 605. Już w 3 godzinie doświadczenia

wystąpiło wyraźne skrócenie czasu krzepnięcia do 54,40%, a następnie w 6 godzinie czas krzepnięcia stopniowo wydłużał się i w 9 godzinie zbliżył się do wartości wyjściowych. W 24 godzinie ponownie zaznaczyła się tendencja wzrostu krzepliwości krwi. Statystycznie istotne różnice w porównaniu ze stanem wyjściowym wystąpiły w 3 i 6 godzinie.

Tab. 1. Czas krzepnięcia krwi (w minutach)
Blood clotting time (in minutes)

Czas pomiaru	Wartości skrajne	M	s	m	t°
0h	3,0—5,5	4,167	0,765	0,198	—
3h	1,0—4,5	2,267	0,835	0,216	6,419 **
6h	1,5—4,0	2,900	0,761	0,196	4,557 **
9h	1,5—6,5	3,867	1,109	0,286	0,862
24h	2,5—3,0	3,654	0,753	0,209	1,753

M — średnia arytmetyczna, s — odchylenie standardowe, m — średni błąd, ° — różnice statystycznie istotne.

M — arithmetic mean, s — standard deviation, m — mean error, * — statistically significant differences.

Zmiany średnich wartości wskaźnika protrombinowego osocza zawiera tab. 2 i ryc. 2. Wyraźny, sięgający do 250%, wzrost tego wskaźnika przypadał na 3 godzinę. W dalszym ciągu wskaźnik protrombinowy ulegał zmniejszeniu i w 9 godzinie osiągnął wartość wyjściową. Druga faza jego wzrostu pojawiła się w 24 godzinie, przyjmując wartość 200%. Różnice

Tab. 2. Wskaźnik protrombinowy (w procentach)
Prothrombin index (in %)

Czas pomiaru	Wartości skrajne	M	s	m	t°
0h	—	100,0	0,000	0,000	—
3h	60,5—488,8	248,7	104,205	26,647	5,580 **
6h	95,4—620,0	230,4	142,610	36,819	3,542 *
9h	37,3—176,0	103,3	40,608	10,484	0,315
24h	91,6—460,0	199,7	96,542	26,775	3,724 *

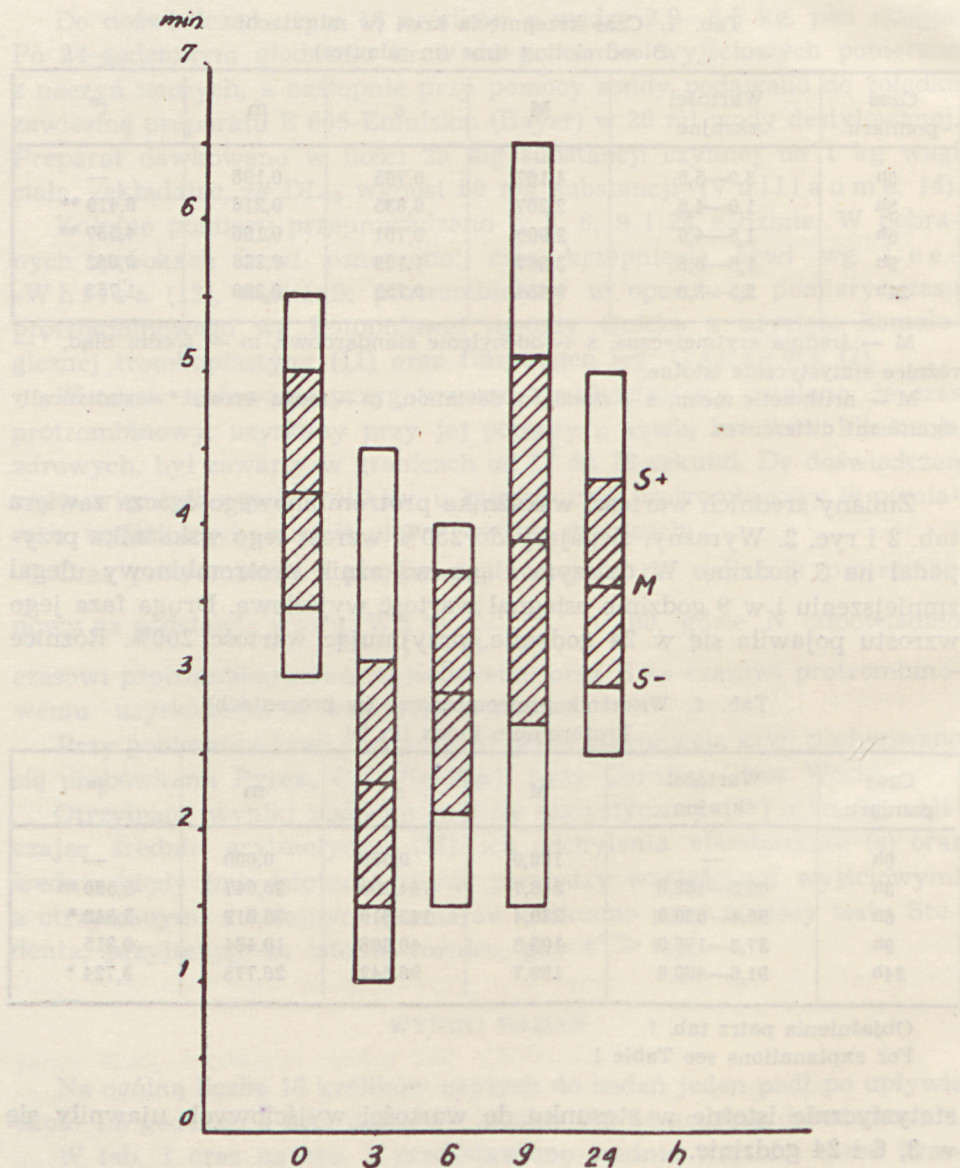
Objaśnienia patrz tab. 1.

For explanations see Table 1.

statystycznie istotne w stosunku do wartości wyjściowych ujawniły się w 3, 6 i 24 godzinie.

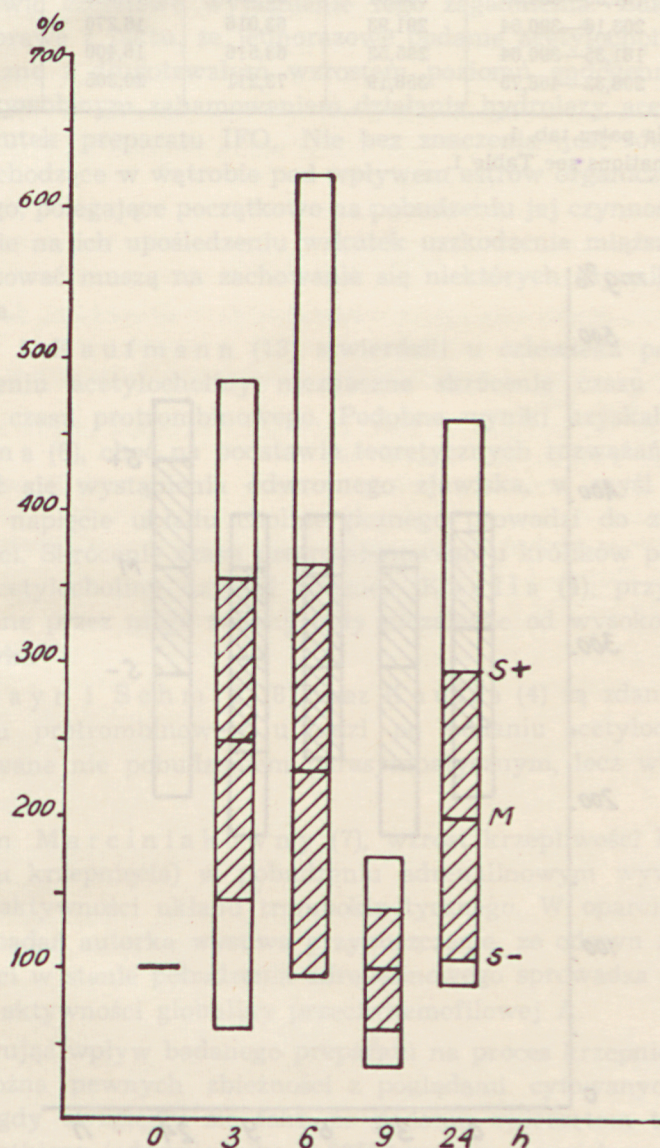
Średnie wartości poziomu fibrynogenu w ciągu okresu doświadczenia obrazuje tab. 3 i ryc. 3. Do 9 godziny poziom fibrynogenu utrzymywał

się nieco poniżej wartości wyjściowych, a jego minimum przypadło na 6 godzinę (91,27%). Następnie stopniowo wzrastał i w 24 godzinie osiągnął 112,39%. We wszystkich pomiarach zmiany w odniesieniu do wartości wyjściowych były statystycznie istotne.



Ryc. 1. Czas krzepnięcia krwi (w minutach)
Blood clotting time (in minutes)

Godnym uwagi jest fakt, że najbardziej charakterystyczne zmiany w czasie krzepnięcia krwi i wartości wskaźnika protrombinowego ujawniały się w 3 godzinie doświadczenia i występowały szczególnie jaskrawo u tych królików, które w czasie pobierania krwi znajdowały się w okresie nasilenia objawów klinicznych zatrucia.



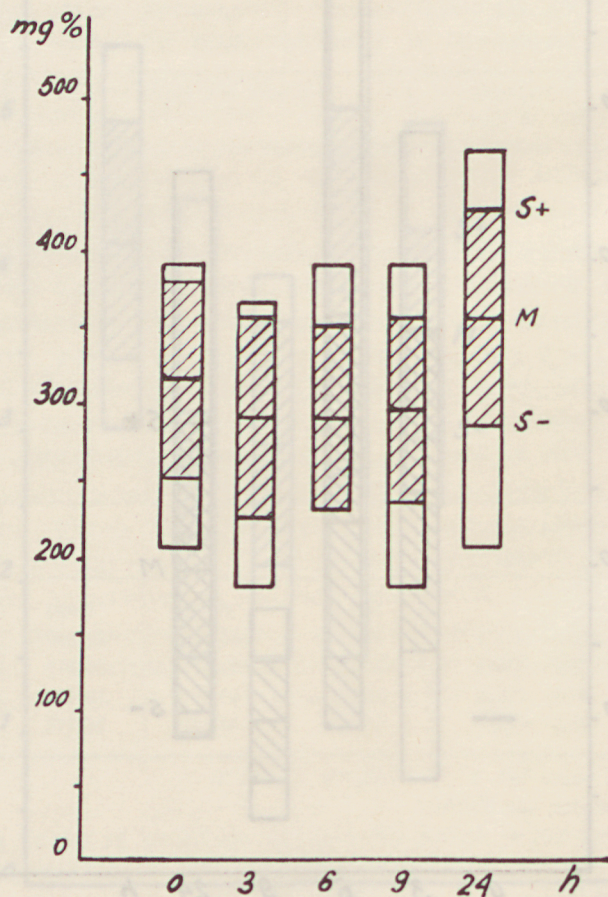
Ryc. 2. Wskaźnik protrombinowy (w procentach)
Prothrombin index (in %/%)

Tab. 3. Fibrynogen (w mg %)
Fibrinogen (in mg %)

Czas pomiaru	Wartości skrajne	M	s	m	t°
0h	208,32—390,64	318,71	66,917	17,278	—
3h	181,35—364,57	392,61	69,204	17,865	5,708 **
6h	203,16—390,64	291,93	63,016	16,270	4,606 **
9h	181,35—390,64	295,52	63,516	16,400	4,257 **
24h	208,32—468,75	358,19	73,211	20,305	3,703 *

Objaśnienia patrz tab. 1.

For explanations see Table 1.



Ryc. 3. Fibrynogen (mg%)
Fibrinogen (in mg%)

OMÓWIENIE

Szczupłość i fragmentaryczność w dostępnej literaturze danych odnoszących się do działania IFO na układ krzepnięcia nie pozwala na konfrontację naszych wyników z wynikami innych autorów. Jedynie badania nad wpływem acetylocholino na krzepnięcie krwi (6, 12) w pewnej mierze mogą ułatwić częściowe wyjaśnienie tego zagadnienia. Zdajemy sobie również sprawę z faktu, że jednorazowe podanie acetylocholino nie jest równoznaczne z długotrwałym wzrostem poziomu endogennej acetylocholino, wywołanym zahamowaniem działania hydrolazy acetylocholinowej na skutek preparatu IFO. Nie bez znaczenia jest również to, że zmiany zachodzące w wątrobie pod wpływem estrów organicznych kwasu fosforowego, polegające początkowo na pobudzeniu jej czynności, a w dalszym etapie na ich upośledzeniu wskutek uszkodzenia miąższu wątrobowego, rzutować muszą na zachowanie się niektórych czynników układu krzepnięcia.

U h r y i K a u f m a n n (13) stwierdzili u człowieka po dożylnym wprowadzeniu acetylocholino nieznaczne skrócenie czasu krzepnięcia krwi oraz czasu protrombinowego. Podobne wyniki uzyskała M a r c i n i a k ó w n a (6), choć na podstawie teoretycznych rozważań należałoby spodziewać się wystąpienia odwrotnego zjawiska, w myśl zasady, że wzmożone napięcie układu cholinergicznego prowadzi do zmniejszenia krzepliwości. Skrócenie czasu protrombinowego u królików po dożylnym podaniu acetylocholino uzyskał również K a u l l a (4), przy czym zaobserwowane przez niego zmiany były niezależne od wysokości zastosowanej dawki.

N e u m a y r i S c h m i d (8) oraz K a u l l a (4) są zdania, że skrócenie czasu protrombinowego u ludzi po podaniu acetylocholino jest uwarunkowane nie pobudzeniem parasympatycznym, lecz wtórną adrenalinemią.

Zdaniem M a r c i n i a k ó w n y (7), wzrost krzepliwości krwi (skrócenie czasu krzepnięcia) w pobudzeniu adrenalinowym wywołany jest wzrostem aktywności układu trombokinetycznego. W oparciu o wyniki własnych badań autorka wysuwa przypuszczenie, że odczyn zwiększonej krzepliwości w stanie pobudzenia adrenalinowego sprowadza się do podwyższenia aktywności globuliny przeciwhemofilowej A.

Rozpatrując wpływ badanego preparatu na proces krzepnięcia, doszukać się można pewnych zbieżności z poglądami cytowanych autorów, zwłaszcza gdy uwzględni się fakt, że podaniu zwierzętom toksycznych dawek Parathionu (odpowiednika E 605) towarzyszy zwiększenie poziomu adrenaliny we krwi (5). Jednak do wyciągnięcia bardziej konkretnych wniosków konieczne są dalsze badania w tym kierunku.

Zachowanie się fibrynogenu u badanych królików nie wskazuje na istnienie prostej zależności między czasem krzepnięcia, wskaźnikiem protrombinowym a stwierdzonymi zmianami w jego poziomie. Być może, że zmiany te należałoby tłumaczyć w oparciu o teorię Petermana (cyt. wg Zielińskiej, 15), która głosi, że na poziom fibrynogenu wywiera wpływ tromboplastyna oraz substancje reagujące z nią. Według tego autora zależność między tromboplastyną a fibrynogenem kształtuje się w stosunku odwrotnie proporcjonalnym. W świetle tej teorii obniżenie poziomu fibrynogenu, przy istniejącej w tym czasie zwiększonej krzepliwości, wskazywałoby na istnienie w ustroju mechanizmu wyrównawczego, którego zadaniem byłoby utrzymywanie stanu równowagi między zwiększoną i zmniejszoną krzepliwością.

PIŚMIENNICTWO

1. Dadlez J., Kubikowski P.: *Farmakologia i toksykologia leków*. PZWL, Warszawa 1964.
2. Gaczew E.: Prosto i toczny metod opriedielenija fibrinogena w krowi. *Lab. Dieło*, 4, 2, 3—6, 1958.
3. Gaertner H.: Krzepnięcie krwi. *Fizjologia i patologia układu hemostatycznego*. Praca habilitacyjna. Kraków 1960.
4. Kaulla K. N.: Über Hyperprothrombinämie. *Klin. Wschr.*, 22, 646—648, 1943.
5. Ludemann H. H., Filbert M. G., Cornblath M.: Application of a Fluorometric Method for Adrenaline-like Substances in Peripheral Plasma. *J. Applied Physiol.*, 8, 1, 59—66, 1966.
6. Marciniakówna E.: Zagadnienie sterowania krzepliwości krwi przez układ vegetacyjny. *Post. Hig. i Med. Dośw.*, 10, 173—189, 1956.
7. Marciniakówna E.: Wpływ adrenaliny na krzepliwość krwi. *Acta Physiol. Pol.*, 1, 17—40, 1957.
8. Neumayr A., Schmid J.: Vergleiche der Prothrombinzeit mit der zirkulierenden Blutmenge unter Wirkung verschiedener Pharmaka. *Wien. Zeitschr. für Inn. Med.*, 28, 3, 93—102, 1947.
9. Ojwin A.: Statisticheskaja obrabotka riezultatow ekspierimentalnych issledowanij. *Patoł. Fizjoł. Eksp. Tier.*, 4, IV, 76—85, 1960.
10. Perlick E.: *Angiologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1959.
11. Pinkiewicz E.: Vergleichende Untersuchungen über die Normalwerte der Gerinnungsfaktoren der I. Phase (Prothrombin, Faktor V und Faktor VII) beim Hund. *Zentralblatt für Veter.-Med.*, VIII, 4, 327—340, 1961.
12. Tulczyński M.: *Metody laboratoryjne diagnostyki klinicznej*. PZWL, Warszawa 1962.
13. Uhry P., Kaufmann H.: Effect anticoagulant des sympatholytiques. *Bull. et Memoires de la Soc. Med. des Hopitaux de Paris*, 69, 1—2, 13—21, 1953.
14. Vuillaume R.: Maladies et accidents chez le bétail causés par diverses substances utilisées dans la pratique agricole. *Bull. de l'Office Intern. des Epizooties.*, XLVI, 258, 1956.
15. Zielińska C.: Badania nad współzależnością między poziomem fibrynogenu a czasem krzepnięcia krwi. *Ginekologia Polska*, XXXIII, 841—851, 1952.

РЕЗЮМЕ

Предпосылкой к работе было изучение влияния подострого отравления препаратом Е 605 Bayer (Parathion) на процесс свертывания крови. У 16 кроликов определяли время свертывания крови, протромбиновый показатель и фибриноген перед введением препарата и после внутрижелудочного введения через 3, 6, 9 и 24 часа. Результаты подвергли статистическому анализу. На 3-й час наблюдали статистически значимые уменьшения средних величин времени свертывания крови, потом возвращение к норме и на 24 час вновь уменьшение. Самое большое статистически существенное увеличение средних величин протромбинового показателя происходило также на 3-й час, возвращение до первоначального состояния на 9-й час и новое увеличение на 24-й час. Средние величины фибриногена подвергались в течение 5-ти часов умеренному, но статистически существенному уменьшению, а потом постепенно увеличивались, незначительно превышая в конце суток (24 час) первоначальные величины.

SUMMARY

The aim of the present paper was to study the influence of subacute poisoning with Parathion on the process of blood clotting.

In the blood of 16 rabbits blood clotting time, prothrombin index and fibrinogen were determined before and after 3, 6, 9 and 24 hours of the gastric introduction of preparation. The results underwent statistical analysis.

During the 3rd hour there was observed a statistically significant decrease of mean values of blood clotting time, then return to the normal, and again a decrease during the 24th hour.

The highest statistically significant increase of mean values of prothrombin index occurred during the 3rd hour, return to the normal during the 9th hour, and once more an increase during the 24th hour.

Until the 6th hour mean values of fibrinogen were undergoing a small but statistically significant decrease, then they were gradually increasing being above the normal in the 24th hour.