

ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN—POLONIA

VOL. XXVIII, 9

SECTIO DD

1973

Instytut Nauk Fizjologicznych Wydziału Weterynaryjnego Akademii Rolniczej w Lublinie

Stanisław PATYRA,
Krystyna RADYMSKA-WAWRZYŃIAK

Ocena odczynu fagocytarnego i leukergicznego u królików po kumarynie

Оценка фагоцитарной и лейкоергической реакции у кроликов
после применения кумарина

The Evaluation of Phagocytic and Leukergic Reaction in Rabbits
after the Administration of Coumarin

Kumaryna (α -benzo-piron; $C_9H_6O_2$) i szereg jej pochodnych mają wieloraki wpływ na organizm zwierzęcia. Związki te działają spazmolitycznie, żółcio- i limfopędnie, zmieniają przepuszczalność śródbłonna, działają także uspokajające (1, 2, 10, 11, 15). Wykazano również, że zarówno kumaryna, jak i wyciąg z nostrzyka wpływają korzystnie na przebieg miejscowych procesów zapalnych i ropnych (2, 3, 4, 8). Zwrócono też uwagę na łagodniejszy przebieg salmonellozy u kur otrzymujących kumarynę doustnie (8). W innych obserwacjach stwierdzono, że dootrzewnowe lub dożylnie podanie kumaryny w ilości 0,025 g/kg powodowało leukocytozę, której towarzyszył wzrost ilości granulocytów obojętnochłonnych. Największe nasilenie tych zmian następowało po 6 godzinach od podania preparatu (12).

Biorąc pod uwagę korzystny wpływ kumaryny na przebieg niektórych procesów chorobowych i fakt że powoduje ona wzrost ilości komórek o zdolnościach żernych, postanowiono prześledzić, czy taki charakter jej działania nie wiąże się z wpływem na odczyn fagocytarny i leukergiczny.

MATERIAŁ I METODY

Doświadczenia przeprowadzono na 20 królikach obu płci, mieszańcach, wieku około jednego roku, o ciężarze 2,8–3,5 kg. Żywiono je ustaloną dietą. Zwierzęta podzielono na trzy grupy. Pierwsza liczyła 10 królików. Podawano im jednorazowo dootrzewnowo najpierw płyn fizjologiczny, a następnie roztwór kumaryny. Druga, złożona z 5 sztuk, otrzymywała trzykrotnie w odstępach 24 godz. dootrzewnowo płyn fizjologiczny, a następnie roztwór kumaryny. Trzecia, licząca 5 sztuk, otrzymywała oba roztwory jednorazowo w iniekcjach dożylnych. Płyn fizjologiczny podawano w ilościach takich jak roztwór kumaryny. Kumarynę rozpuszczoną w 0,9% NaCl otrzymywały zwierzęta w roztworze 0,5% w ilości 0,025 g/kg.

U badanych zwierząt oznaczano ilość krwinek białych, obraz Schillinga, odczyn fagocytny i leukergiczny. Oceniano najpierw wymienione wskaźniki u zwierząt przed iniekcją, a następnie po podaniu 0,9% NaCl i z kolei po wprowadzeniu roztworu kumaryny. Po każdej iniekcji przeprowadzano oznaczenia po 6 i 24–36 godzinach, pobierając krew do oceny z żyły brzożnej ucha.

Ilość krwinek białych i obraz Schillinga określano według ogólnie przyjętych zasad. Odczyn leukergiczny wykonywano w oparciu o metodę podaną przez Pinkiewicz (13). Odczyn fagocytny przeprowadzano według Huddlesona (7) i Harrisa (6) metodą podaną również przez Wołoszyna (15). Odczyn ten przeprowadzano z gronkowcem złocistym, pochodzącym ze szczepu wzorcowego *Staphylococcus aureus* 209 P. Posługiwano się splecioną bakteryjną, o gęstości 900 000 000 komórek w 1 ml zawiesiny, którą sporządzano w dniu pobierania krwi z 24-godz. hodowli agarowej. Odpowiednią ilość zawiesiny bakteryjnej, zmieszanej z krwią, wstawiano na 30 minut do łaźni wodnej o temp. 37°C. Potem sporządzano rozmazy i barwiono preparat. W trzech rozmazach każdej próbki krwi odszukiwano po 50 granulocytów obojętnochłonnych, obliczając w każdym z nich ilość sfagocytowanych bakterii, a wynik końcowy fagocytozy zapisywano jako średnią otrzymaną z trzech preparatów.

Stopień fagocytozy u każdego królika określano przez ustalenie liczby granulocytów obojętnochłonnych, w których nie stwierdzono bakterii oraz liczby leukocytów, które sfagocytowały od 1 do 5 bakterii, od 6 do 15, od 16 do 30 i powyżej 30. Następnie obliczano wskaźnik fagocytny dla każdego zwierzęcia przy zastosowaniu współczynnika, przyjętego dla nefagocytykujących granulocytów, za 0, dla leukocytów fagocytykujących bakterie od 1 do 5 za 1, od 6 do 15 za 2, od 16 do 30 za 3, a powyżej 30 za 4. Wskaźnik fagocytny jest sumą wszystkich fagocytykujących leukocytów, a sposób jego obliczania podaje tab. 1. Wyniki poddano analizie statystycznej. Kumaryna pochodziła z firmy The General and Pharmaceutical Co Ltd. Zawiesinę szczepu wzorcowego przygotowano w Instytucie Chorób Zakaźnych Wydz. Wet. AR w Lublinie.

Tab. 1

Ilość sfagocytowanych bakterii	Ilość fagocytykujących leukocytów średnia z 3 rozmazów	Współczynnik	Wynik końcowy ilości fagocytykujących leukocytów
0	38	0	0
1–5	6	1	6
6–15	3	2	6
16–30	2	3	6
<30	1	4	4
Wskaźnik fagocytny = 22			

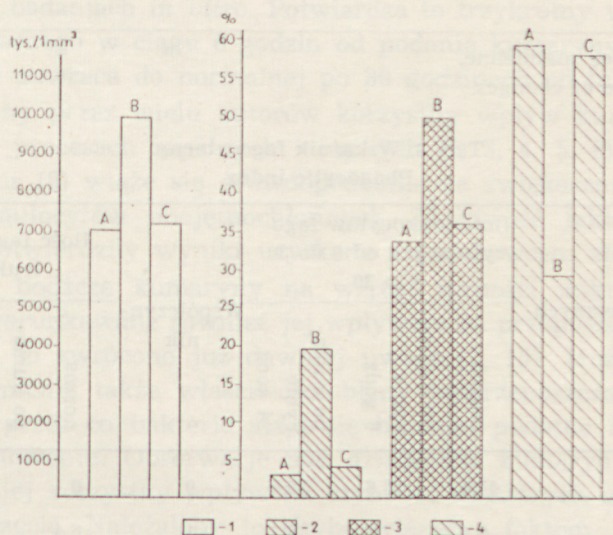
WYNIKI

Wartości wyjściowe badanych parametrów obliczono z oznaczeń wykonanych przed i po podaniu płynu fizjologicznego, ponieważ kształtowały się one podobnie u wszystkich królików. Nie stwierdzono też istot-

nych różnic w wynikach po jednorazowym lub trzykrotnym podaniu kumaryny w iniekcjach dootrzewnowych i dożylnych, a więc i w tym przypadku wyniki oceniano łącznie z każdego oznaczenia.

Porównując wartości wyjściowe badanych wskaźników z otrzymanymi po 6 i 36 godzinach od podania 0,025 g/kg kumaryny, stwierdzono że ilość krwinek białych wzrosła znamienne po 6 godzinach z 7000 do 10000 w 1 mm³ i powróciła do wartości wyjściowej po 36 godz. Jednocześnie nastąpił istotny wzrost ilości granulocytów obojętnochłonnych z jądrem pałeczkowatym z 3% do 20%, a granulocytów z jądrem segmentowanym z 34% do 50%. Powrót do wartości wyjściowej następował po 36 godzinach. Zmianom tym towarzyszył w pierwszych 6 godzinach spadek ilości limfocytów z 58% do 29%, a ponowny wzrost do wartości normalnej następował także po 36 godzinach. Otrzymane wyniki dotyczące krwinek białych są przedstawione jako średnie wartości ze wszystkich oznaczeń (ryc. 1, tab. 2).

Przeprowadzona ocena wskaźnika fagocytarnego wykazała, że po 6 godzinach od podania kumaryny wzrósł on trzykrotnie w porównaniu z wartością wyjściową (z 10,3 do 30). Przede wszystkim wzrosła znacznie ilość granulocytów fagocytujących bakterie od 6 do 15 i od 16 do 30. Poja-



Ryc. 1. Liczba krwinek białych (1), granulocytów obojętnochłonnych z jądrem pałeczkowatym (2) i segmentowanym (3) oraz limfocytów (4); A — przed iniekcją kumaryny, B — 6 godz. po iniekcji kumaryny, C — 36 godz. po iniekcji kumaryny
Number of leucocytes (1), lympho-indifferent granulocytes with bacilliform (2) and segmented nucleus (3) and lymphocytes (4); A — before a coumarin injection, B — 6 hours after a coumarin injection, C — 36 hours after a coumarin injection

Tab. 2. Ilość krwinek białych oraz granulocytów obojętnochłonnych z jądrem pałeczkowatym, segmentowanym oraz limfocytów
 Number of leucocytes, lympho-indifferent granulocytes with bacilliform and segmented nucleus and lymphocytes

Czas pobierania krwi	Leukocyty				Granulocyty obojęt- nochłonne z ją- drem pałeczkowa- tym				Granulocyty obojętnochłonne z jądrem seg- mentowanym				Limfocyty			
	średnia ilość w 1 mm ³ krwi	istotność różnic p	odchylenie standardowe	średnie ilości wyrażone w %	istotność różnic p	odchylenie standardowe	średnie ilości wyrażone w %	istotność różnic p	odchylenie standardowe	średnie ilości wyrażone w %	istotność różnic p	odchylenie standardowe				
Przed iniekcją ku- maryny (norma)	7 000		±0,15	3		±0,43	34		±1,22	58		±1,10				
6 godzin po iniek- cji kumaryny	10 000	0,001*	±0,13	20	0,001*	±0,86	50	0,001*	±1,21	29	0,001*	±1,24				
24—36 godzin po iniekcji kuma- ryny	7 200	0,2	±0,49	4	0,1	±0,54	36	0,3	±2,6	53	0,1	±1,73				

* Zmiany wysoce znamienne.

* A high degree of changes.

Tab. 3. Wskaźnik fagocytarny
 Phagocytic index

Ilość sfagocytowanych bakterii	Ilość leukocytów fagocytujących od 0 do 30 i > 30				Współczynnik	Ilość fagocytujących leukocytów			
	norma	po kumarynie 6 godz.	po kumarynie 24 godz.			norma	po kumarynie 6 godz.	po kumarynie 24 godz.	
0	41,4	26,6	39,5	0	0	0	0	0	
1—5	6,4	7,7	6,7	1	6,4	7,7	6,7		
6—15	2,5	10,6	3,8	1,5	3,7	15,9	5,7		
16—30	0,1	3,9		2	0,2	7,8			
< 30		1,2		3		3,6			
Wskaźnik fagocytarny						10,3	30,0	12,4	

wiły się również leukocyty fagocytujące powyżej 30 bakterii. Wraz z powrotem do wartości wyjściowych krwinek białych wskaźnik fagocytarny malał i po 36 godzinach kształtował się podobnie jak przed podaniem kumaryny. Wskaźnik fagocytarny przedstawiono jako średnią ze wszystkich oznaczeń w poszczególnych okresach (tab. 3). Nie stwierdzono odczynu leukergicznego krwinek białych po kumarynie i po 0,9% NaCl.

OMÓWIENIE

Stwierdzono, że podanie kumaryny dootrzewnowo lub dożylnie w ilości 0,025 g/kg powoduje leukocytozę ze znacznym wzrostem procentu granulocytów obojętnochłonnych z jądrem pałeczkowatym i segmentowanym, czemu towarzyszy spadek ilości limfocytów. Zmiany te narażają w ciągu 6 godzin od iniekcji i po 36 godzinach wracają do stanu wyjściowego. Charakter tych przesunięć w obrazie białokrwinkowym w pełni potwierdza wyniki otrzymane poprzednio (12).

Jednocześnie wykazano, że z pojawieniem się leukocytozy i granulocytozy po iniekcji kumaryny zwiększa się również zdolność fagocytarna mikrofagów krwi w stosunku do zjadliwego gronkowca złocistego, co wykazano w badaniach *in vitro*. Potwierdza to trzykrotny wzrost wskaźnika fagocytarnego w ciągu 6 godzin od podania kumaryny. Zwiększona jego wartość powraca do normalnej po 36 godzinach od iniekcji.

Podkreślany przez wielu autorów korzystny wpływ kumaryny i pochodnych w procesach zapalnych i ropnych (2, 3, 4, 5, 9) oraz w salmonelozie kur (8) wiąże się prawdopodobnie ze zwiększeniem zdolności żernych granulocytów obojętnochłonnych. Możliwość takiego działania kumaryny potwierdziły wyniki uzyskane z gronkowcem złocistym.

Działanie bodźcze kumaryny na wzrost żerności mikrofagów krwi może być uwarunkowane również jej wpływem na przepuszczalność śródbłonek, na co zwrócono już dawniej uwagę (2, 15). Można sądzić, że kumaryna zmienia także właściwości błony półprzepuszczalnej komórki bakteryjnej, przez co bakterie stają się bardziej podatne i łatwiej ulegają sfagocytowaniu. Obserwacje nad działaniem kumaryny wydają się potwierdzać jej korzystny wpływ na czynność niektórych układów organizmu zwierzęcia. Należałoby to chyba wiązać z faktem, że kumaryna lub jej pochodne mogą wpływać na poziom grup — SH i na tej drodze oddziaływać na procesy metaboliczne organizmu (11, 14).

Podanie płynu fizjologicznego nie wpływa na ilość krwinek białych, obraz Schillinga, odczyn fagocytarny i leukergiczny. Natomiast kumaryna daje istotne zmiany w obrazie białokrwinkowym i w odczynie fagocytarnym, nie wpływa jednak na odczyn leukergiczny.

WNIOSKI

1. Kumaryna podana dożylnie lub dootrzewnowo w dawce 0,025 g/kg powoduje znamienny wzrost ilości granulocytów obojętnochłonnych z jądrem pałeczkowatym i segmentowanym i spadek ilości limfocytów, przy ogólnym zwiększeniu liczby krwinek białych. Zmiany te osiągają swoje maksimum po 6 godzinach od iniekcji preparatu. Po 36 godzinach zmienne wartości krwinek białych wracają do wyjściowych.
2. Powyższa dawka kumaryny powoduje również wzrost wartości wskaźnika fagocytarnego, który osiąga swoje maksimum po 6 godzinach od iniekcji i wraca do normy po 36 godzinach.
3. Kumaryna pobudza zdolność fagocytarną mikrofagów krwi wobec zjadliwego gronkowca złocistego.
4. Kumaryna w dawce 0,025 g/kg nie wpływa na odczyn leukergiczny.

PIŚMIENNICTWO

1. Deltour G., Charlier R., Binon F.: Recherches dans la série des benzofuranes. X. Étude pharmacologique et toxicologique de l'ethyl-2 (hydroxy-4 benzoyl)-benzofuranne. Arch. Int. Pharmacodyn. **154**, 94, 1965.
2. Földi M., Zoltan O. T.: Über den Wirkungsmechanismus eines *Melilotus* — Präparates. Arzneimittel. Forsch. **8**, 899, 1965.
3. Földi M., Zoltan O. T.: Experimentelle Thrombophlebitis und deren therapeutische Beeinflussung. Arzneimittel. Forsch. **8**, 897, 1965.
4. Földi M., Zoltan O. T., Obal F.: Experimentelle lymphostatische Encephalopathie als Folgeerscheinung einer cervikalen Lymphagithrombophelbitis und deren Therapie mit Cumarin aus *Melilotus officinalis*. Arzneimittel. Forsch. **20**, 1626, 1970.
5. Földi M., Zoltan O. T., Pinkovich I.: Wirkung von Rutin und Cumarin auf den Verlauf einer experimentellen Thrombophlebitis. Arzneimittel. Forsch. **20**, 1629, 1970.
6. Harris H. I.: Brucellosis (Undulant Fever). New York 1950.
7. Huddleson I. F.: Brucellosis in Man and Animals. New York 1964.
8. Kądziołka A., Patyra S., Ruciński T., Kostarz T.: Wpływ kumaryny na związki tłuszczowe osocza kogutów żywionych dietą aterogenną. Ann. UMCS, sectio DD, vol. XVII, 123, 1972.
9. Kiro Shimamoto, Shuji Takoari: Pharmakologische Untersuchungen mit einem *Melilotus*-Extract. Arzneimittel. Forsch. **8**, 895, 1965.
10. Mathur C. N., Mitra C. R., Krishnaswamy Kulshreshitha R. K., Arora R. B.: The Effect of some Coumarin Derivatives on the Coronary Flow and their Structure Activity Relationship. Arch. Int. Pharmacodyn. **153**, 218, 1956.
11. Patyra S.: Antagonizm kumaryny i grup sulfhydrylowych w surowicy krwi królików i w czynności izolowanych jelit. Pol. Arch. Wet. **11**, 122, 1968.
12. Patyra S.: Zachowanie się krwinek czerwonych i białych w krwi obwodowej królika po kumarynie. Ann. UMCS, sectio DD, vol. XXIII, 135, Lublin 1968.
13. Pinkiewicz E.: Leukergy in Breeding Pigs. Ann. UMCS, sectio DD, vol. XI, 98, 1956.

14. Pohl R.: Das Wuchsstoff (Hemmstoffproblem) der höhern Pflanze. Naturwissenschaften 1, 1, 1962.
15. Selleri R., Caldini O., Spano R., Cascio G., Pallazzo Adriano M.: Synthesis of New Derivatives of Coumarin and Analysis of their Action. Arzneimittel. Forsch. 8, 910, 1965.
16. Wołoszyn S.: Spostrzeżenia nad odczynem fagocytarnym u bydła szczepionego S 19 oraz zakażonego brucellozą. Ann. UMCS, sectio DD, vol. XV, 191, Lublin 1960.

Wpł. 28 XII 72

РЕЗЮМЕ

Опытам подвергли 20 кроликов. Животные получили внутривенно или внутривентально 0,025 г/кг кумарина в растворе 0,5%. Кумарин растворяли в физиологическом растворе.

Определено количество лейкоцитов, картину Шеллинга, фагоцитарную и лейкокергическую реакцию. Фагоцитарную реакцию оценивали путем подсчитывания фагоцитарного показателя, употребляя ядовитый золотистый стафилококк. Вышеупомянутые показатели определяли у животных перед инъекцией, после 0,9% NaCl, а затем после введения раствора кумарина.

Определено, что физиологический раствор не изменяет величины исследованных параметров. Зато раствор кумарина в дозе 0,025 г/кг повлиял на рост количества лейкоцитов, нейтрофильных лейкоцитов с палимфоцитов. Самое большое перемещение в лейкоцитной системе на лочковидным и сегментированным ядрам, а также вызвал уменьшение ступило по истечении 6-ти часов после инъекции кумарина.

Возвращение к исходной величине наступало после 36 часов от применения препарата. Одновременно с изменениями в лейкоцитной картине возрастал фагоцитарный показатель, что зависило от роста прожорливости микрофагов крови, по отношению к ядовитому золотистому стафилококку.

Повышенный фагоцитарный показатель снижался к исходной величине после 36 часов. Применяемая доза кумарина не вызывала изменений лейкокергической реакции.

SUMMARY

Experiments were carried out on 20 rabbits. The animals received intravenously or intraperitoneally 0.025 g/kg of coumarin in a 0.5% solution. Coumarin was dissolved in physiological fluid.

The number of leucocytes, Schilling's image, phagocytic and leukergic reactions were determined. Phagocytic reaction was estimated by calculating the phagocytic indices using a virulent strain of *staphylococcus aureus*.

The indices mentioned above were determined in the animals before injection, and then after the administration of 0.9% NaCl and introduction of coumarin solution.

It was shown that the physiological fluid did not change the values of the parameters studied. However, coumarin at a dosage of 0.025 g/kg caused a significant increase in the number of leucocytes, lympho indifferent granulocytes with bacilli form and segmented nucleus, and a decrease in the number of lymphocytes. The largest change in the leucocytic system took place after 6 hrs. from the injection of coumarin. The return to the initial values occurred after 36 hrs. from the application of the preparation. Simultaneously with the changes in the leucocytic picture the phagocytic index increased, which was conditioned by the increase of phagocytosis of blood macrophages in relation to the virulent *staphylococcus aureus*. The above phagotic index returned to the initial state after 36 hrs. The dose of coumarin used did not cause any changes in the leukergic test.