

JAROSŁAW BILLEWICZ-STANKIEWICZ, ANDRZEJ JASIŃSKI

O ZMIANACH AKTYWNOŚCI ESTERAZ CHOLINOWYCH KRWI POD WPŁYWEM HISTAMINY

Z Zakładu Patologii Ogólnej i Doświadczalnej A. M. w Lublinie
Kierownik: prof. dr J. Billewicz-Stankiewicz

Wielostronne działanie na ustrój histaminy, o charakterze w znacznej mierze parasympatykomimetycznym, wzbudziło nasze zainteresowanie zagadnieniem, jaki wpływ wywiera histamina na esterazy cholinowe krwi. W dostępnym nam piśmiennictwie znaleźliśmy trzy prace, w których znajdują się krótkie wzmianki: 1) że histamina hamuje aktywność cholinesterazy osocza (*Werle i Stüttgen*), 2) że histamina pozostaje bez wpływu na cholinesterazę osocza (*Aron i Herschberg*), oraz 3) że hamuje ona cholinesterazę krwinek (*Maier*). Brak dokładniejszych opracowań tematu i istniejące rozbieżności wyników skłoniły nas do bardziej szczegółowego zajęcia się niniejszym zagadnieniem. Po ukończeniu przez nas części doświadczalnej pracy, ukazała się świeża publikacja *Engelhardta, Hahna i Sakai*, dotycząca aktywności cholinesterazy krwi w przebiegu wstrząsu uczuleniowego u królika. Drobnym, potraktowanym marginesowo fragmentem tej pracy, stanowią nieliczne pomiary wpływu histaminy na aktywność cholinesterazy osocza i erytrocytów. Autorzy doszli do wyników podobnych do naszych. Praca ta budzi jednak zastrzeżenia. 1) Autorzy nie dokonują pomiarów aktywności enzymu przed podaniem histaminy, a jedynie posługują się wartością przeciętną, wziętą z danych piśmiennictwa czy też z innych pomiarów własnych. Wiadomo jednak, że aktywność cholinesterazy u różnych osobników tego samego gatunku, a nawet u tego samego osobnika podlega wahaniom w szerokich granicach. Dlatego też w doświadczeniach, w których badany osobnik nie jest sam dla siebie osobnikiem kontrolnym, tkwi duże źródło błędów. 2) Podane przez autorów wyniki pomiarów w 5, 15, 30 i 60 minut po wstrzyknięciu histaminy są nieliczne, a różnice wartości średnich, które posłużyły do wykreslenia krzywych są, jak wykazała przeprowadzona przez nas analiza, statystycznie zupełnie nieznamienne.

METODYKA

Doświadczenia wykonaliśmy na białych szczurach wagi 100—150 g. Krew pobieraliśmy z ogona w ilości 0,04 ml. Aktywność cholinesterazy (ChE) oznaczaliśmy w osoczu i erytrocytach posługując się metodą podaną przez *Jasińskiego*. Zasada metody polega na oznaczeniu ilości kwasu octowego, powstałego z acetylocholiną dodanej do badanej próbki. Aktywność ChE wyrażona jest w mikrorównoważnikach (μ Eq) rozłożonej acetylocholinie.

Wszystkie substancje farmakologiczne za wyjątkiem atofanu podawaliśmy dotrzewnowo.

Objętość procentową krwinek i osocza oznaczaliśmy zwykłą metodą przy pomocy hematokrytu. Do mieszaniny zawierającej 0,08 ml 0,9% NaCl z 0,08 ml 0,1% wodnego roztworu szczawianu sodu dodawaliśmy 0,16 ml krwi pobranej z ogona szczura. Po dokładnym wymieszaniu całości wypełnialiśmy rurki hematokrytu i wirowaliśmy przez 20 min. przy 3000 obrotów na minutę. Odczytaną wartość mnożyliśmy przez 2.

Wartości średnie szeregów pomiarowych porównywaliśmy ze sobą posługując się sprawdzianem „t” znamienności różnicy średnich dla małej próby. Wartość „t” dla danych liczebności szeregów pomiarowych odczytywaliśmy z tablic Kollera.

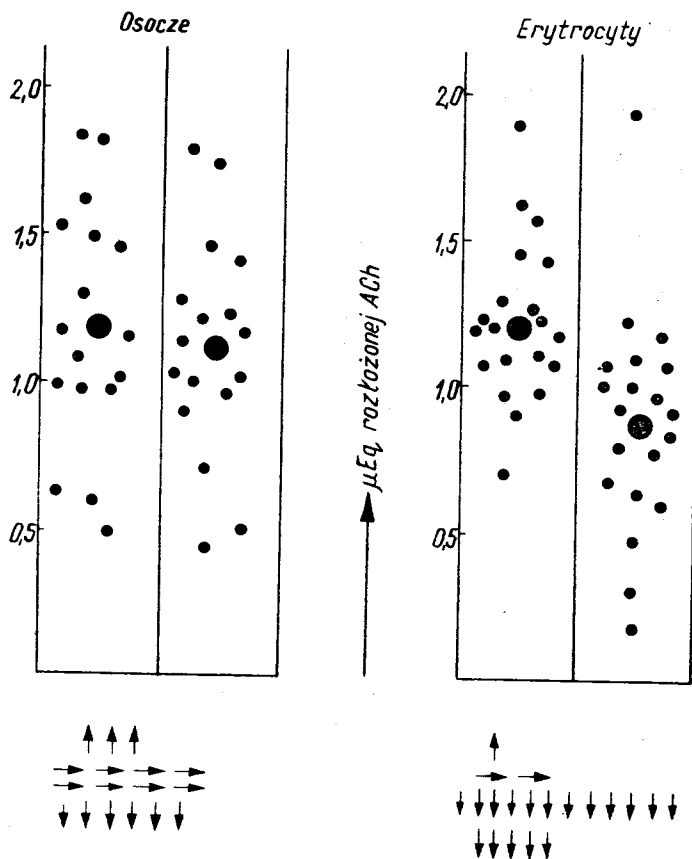
CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

W pierwszej grupie doświadczeń pobieraliśmy u zwierząt krew, bezpośrednio po czym podawaliśmy 2 mg histaminy na szczura, uwzględniając małą wrażliwość tych zwierząt na histaminę. Wstrząs miał przebieg łagodny: w kilka minut po wprowadzeniu histaminy zwierzę kładło się na boku, oddech był przyspieszony, pojawiały się pojedyncze skurcze kloniczne mięśni. Po 20—30 minutach powyższe objawy stopniowo cofały się, tak że po 40 minutach w zachowaniu się zwierzęcia nie widać było już żadnych nieprawidłowości. Po upływie jednej godziny od podania histaminy pobieraliśmy krew po raz drugi, po czym w obu próbkach oznaczaliśmy aktywność ChE osocza i erytrocytów.

Przeprowadziliśmy 17 doświadczeń, w których oznaczaliśmy aktywność ChE osocza, przy czym nie stwierdziliśmy wyraźnych jednokierunkowych zmian. W 3 doświadczeniach wystąpił nieznaczny wzrost aktywności, w 8 — aktywność pozostała bez zmian, w 6 — stwierdziliśmy nieznaczne jej obniżenie. Średnia aktywność ChE przed podaniem histaminy wynosiła 1,18 μ Eq, po histaminie 1,11 μ Eq. Jak wykazała analiza statystyczna różnica średnich nie jest znamienna (ryc. 1 „osocze”).

W wykonanych doświadczeniach z oznaczaniem aktywności ChE erytrocytów wystąpiło po histaminie wyraźne jej obniżenie. W 17 doświadczeniach wystąpił znaczny spadek aktywności, przekraczający nieraz 70% wartości początkowej. W 2 doświadczeniach aktywność pozostała bez zmian, w 1 doświadczeniu wystąpił nieznaczny jej wzrost. Średnia aktywność ChE erytrocytów przed podaniem histaminy wynosiła 1,23 μ Eq,

po histaminie 0,88 μEq . Różnica średnich jest statystycznie znamiennej (ryc. 1 „erytrocyty”). Ponieważ stwierdziliśmy, że pod wpływem histaminy występują istotne zmiany aktywności tylko ChE erytrocytów, lecz



Ryc. 1. Wpływ histaminy na aktywność ChE osocza i erytrocytów. Średnia aktywność dla osocza przed histaminą $M_1 = 1,18 \pm 0,097$. Średnia aktywność dla osocza po histaminie $M_2 = 1,11 \pm 0,09$. Ilość par pomiarów 17. $(M_1 - M_2) : \sqrt{s_{m_1}^2 + s_{m_2}^2} = 0,54$ $t_{17} = 3,26$, a więc różnica statystycznie nieznamiennej. Średnia aktywność ChE dla erytrocytów przed histaminą $M_3 = 1,23 \pm 0,061$, średnia aktywność erytrocytów po histaminie $M_4 = 0,88 \pm 0,082$. Ilość par pomiarów 20 $(M_3 - M_4) : \sqrt{s_{m_3}^2 + s_{m_4}^2} = 3,3$ $t_{20} = 3,21$, a więc różnica statystycznie znamiennej.

Fig. 1. The effects of histamine on plasma and erythrocyte cholinesterase (ChE) activity. Mean plasma ChE activity before histamine $M_1 = 1.18 \pm 0.097$; mean plasma ChE activity after histamine $M_2 = 1.11 \pm 0.09$. Number of determinations: 17. $(M_1 - M_2) : \sqrt{s_{m_1}^2 + s_{m_2}^2} = 0.54$ $t_{17} = 3.26$, consequently, the difference is statistically insignificant. Mean erythrocyte ChE activity before histamine $M_3 = 1.23 \pm 0.061$; mean erythrocyte ChE activity after histamine $M_4 = 0.88 \pm 0.082$. Number of determinations: 20×2 . $(M_3 - M_4) : \sqrt{s_{m_3}^2 + s_{m_4}^2} = 3.3$ $t_{20} = 3.21$, consequently, the difference is statistically significant.

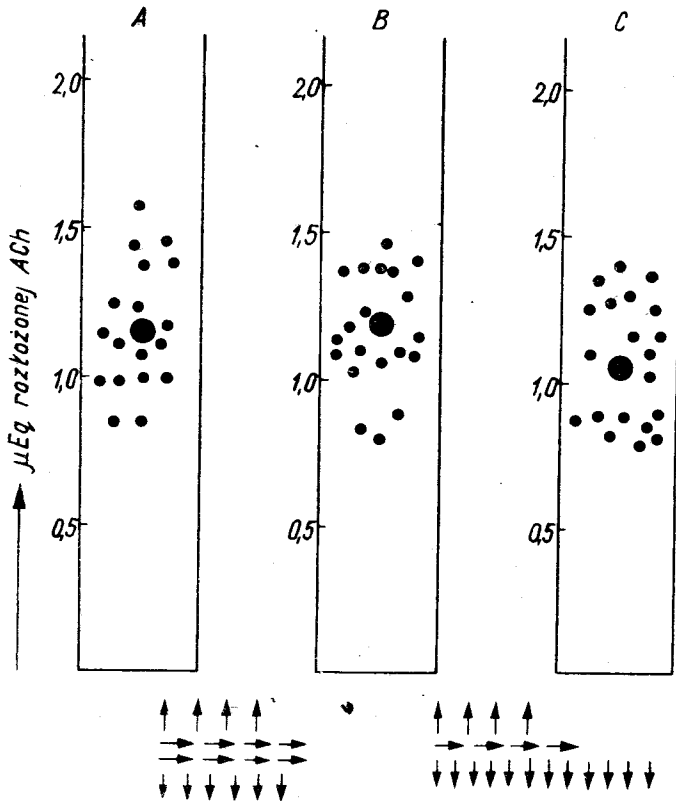
nie osocza, w następnych grupach doświadczeń zajęliśmy się wyłącznie zmianami aktywności ChE krwinek.

W drugiej grupie doświadczeń badaliśmy jak wpływa histamina na aktywność ChE krwinek u zwierząt, którym podano 0,02 g siarczanu atropiny. W tej grupie doświadczeń krew pobieraliśmy trzykrotnie: bezpośrednio przed podaniem atropiny, w godzinę później, tzn. bezpośrednio przed podaniem histaminy (2 mg), oraz w godzinę po podaniu histaminy, czyli w 2 godziny po atropinie. Wykonaliśmy 20 tego rodzaju doświadczeń, przy czym w 2 doświadczeniach nie została oznaczona aktywność ChE przed atropiną. Jak wynika z 18 doświadczeń aktywność ChE erytrocytów pod wpływem atropiny nie ulega wyraźnym zmianom. W 4 doświadczeniach wystąpiło pewne wzmoczenie aktywności, w 8 — aktywność pozostała bez zmian, w 6 — zaszło nieznaczne zmniejszenie. Średnia aktywność ChE przed atropiną i w godzinę później nie uległa zmianie (1,17 μ Eq i 1,18 μ Eq) (ryc. 2 A, B). W 20 doświadczeniach oznaczaliśmy u zwierząt zatrutych atropiną zmiany aktywności ChE występujące po podaniu histaminy. W 4 doświadczeniach aktywność nie zmieniła się, w 4 — wystąpił pewien wzrost, w 12 — nastąpiło jej zmniejszenie. Średnia aktywność ChE przed podaniem histaminy wynosiła 1,18 μ Eq, po histaminie 1,08 μ Eq. Jak wynika z analizy statystycznej różnica średnich jest zupełnie nieznamienista i leży w granicach wahań przypadkowych (ryc. 2 B, C).

W trzeciej grupie doświadczeń badaliśmy jak wpływa histamina na aktywność ChE erytrocytów u zwierząt, którym podano uprzednio dwuhydroergotoksynę (etanosulfonian) — (redergam *Richter*), w ilości 0,1 mg na szczura. Sposób prowadzenia doświadczeń był analogiczny jak w poprzedniej grupie, tzn. że krew pobierano trzykrotnie: bezpośrednio przed wprowadzeniem redergamu, w godzinę później, bezpośrednio przed histaminą (2 mg), oraz w godzinę po podaniu histaminy, a w 2 godziny po redergamie. Wykonaliśmy 20 tego rodzaju doświadczeń. Okazało się, że w 1 godzinę po podaniu redergamu w 12 doświadczeniach nie było zmian w aktywności ChE, a w 8 — wystąpiło pewne jej zmniejszenie. Średnia aktywność przed redergamem wynosiła 1,06 μ Eq, a w 1 godzinę później 1,00 μ Eq. Różnica średnich jest tak nieznaczna, że można uznać, iż średnia aktywność pod wpływem dwuhydroergotoksyny nie ulega zmianom (ryc. 3 A, B). Jeżeli chodzi o dalszy przebieg tych doświadczeń okazało się, że histamina u zwierząt zatrutych dwuhydroergotoksyną po 1 godzinie we wszystkich 20 pomiarach spowodowała znaczne zmniejszenie aktywności ChE krwinkowej. Średnia aktywność przed histaminą wynosiła 1,00 μ Eq, zaś po podaniu histaminy 0,54 μ Eq. Różnica średnich wykazuje bardzo znaczną znamienność statystyczną (ryc. 3 B, C). Odnieśliśmy wrażenie, że histamina obniża aktywność ChE krwinek u zwierząt, które

otrzymały redergam w stopniu znaczniejszym niż u zwierząt normalnych.

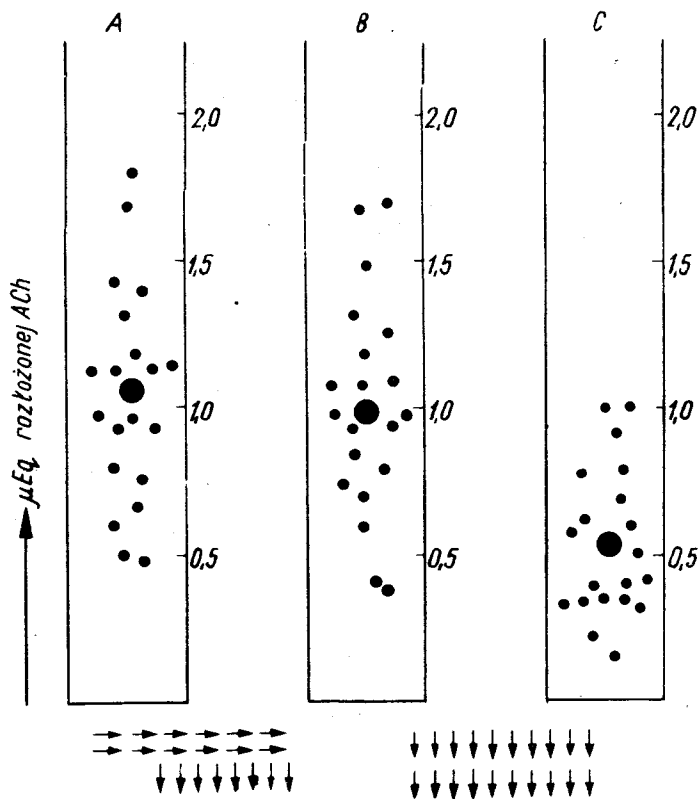
W czwartej grupie doświadczeń podawaliśmy zwierzętom efedrynę w ilości 1 mg na szczura i badaliśmy jak zachowuje się u nich aktywność ChE krwinek po wprowadzeniu histaminy. Bieg doświadczeń był podobny jak w dwóch grupach poprzednich. Krew pobieraliśmy bezpośrednio przed podaniem efedryny, w godzinę później bezpośrednio przed histaminą (2 mg) i po dalszej godzinie, tzn. po 2 godzinach od podania efedryny. Wykonaliśmy 20 doświadczeń. Stwierdziliśmy, że w godzinę po podaniu



Ryc. 2. Wpływ atropiny na aktywność ChE erytrocytów szczurów poddanych wstrząsowi histaminowemu. A — przed atropiną, średnia $M_1 = 1,17 \pm 0,047$, B — po atropinie a przed histaminą średnia $M_2 = 1,18 \pm 0,044$, C — po histaminie średnia $M_3 = 1,08 \pm 0,049$. Ilość pomiarów 3×20 . $(M_2 - M_3) : \sqrt{\frac{s_{m_2}^2 + s_{m_3}^2}{2}} = 1,67$ $t_{20} = 3,21$, a więc różnica nieznamienista

mine shock. A — before atropine, mean $M_1 = 1,17 \pm 0,047$; B — after atropine and before histamine, mean $M_2 = 1,18 \pm 0,044$; C — after histamine, mean $M_3 = 1,08 \pm 0,049$. Number of determinations: 3×20 . $(M_2 - M_3) : \sqrt{\frac{s_{m_2}^2 + s_{m_3}^2}{2}} = 1,67$ $t_{20} = 3,21$, consequently, the difference is statistically insignificant.

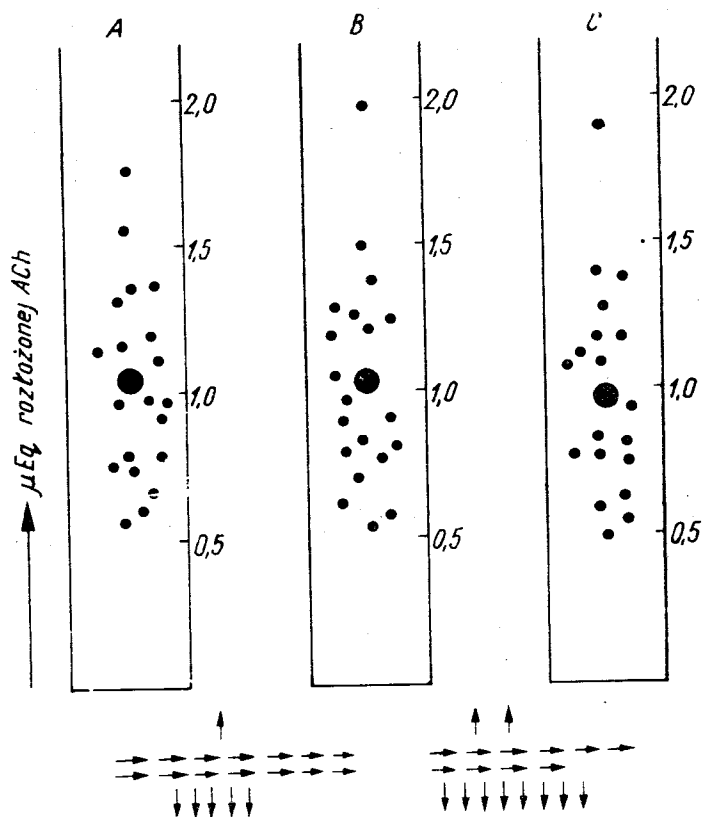
efedryny w 14 doświadczeniach nie zaszły żadne zmiany w aktywności ChE, w 1 doświadczeniu nastąpił wzrost, a w 5 — nieznaczny spadek aktywności. Po 1 godzinie od podania histaminy w 10 doświadczeniach nie było zmian aktywności, w 2 doświadczeniach nastąpił wzrost, a w 8 — nieznaczne jej zmniejszenie. Średnia aktywność ChE przed efedryną wynosiła $1,05 \mu\text{Eq}$, w godzinę później $1,03 \mu\text{Eq}$, w godzinę po podaniu histaminy $0,97 \mu\text{Eq}$. Różnice średnich nie są istotne i praktycznie rzecz biorąc, średnia aktywność enzymu w czasie doświadczeń nie uległa zmianie (ryc. 4).



Ryc. 3. Wpływ dwuhydroergotoksyny (redergamu) na aktywność ChE erytrocytów szczurów poddanych wstrząsowi histaminowemu. A — przed redergamem średnia $M_1=1,06 \pm 0,074$; B — po redergamie, a przed histaminą $M_2=1,00 \pm 0,082$; C — po histaminie średnia $M_3=0,54 \pm 0,059$. Ilość pomiarów 3×20 . $(M_2 - M_3) : \sqrt{s_{m_2}^2 + s_{m_3}^2} = 4,9$ $t_{20}=3,21$, a więc różnica statystycznie znamienne.

Fig. 3. The effect of dihydroergotoxine (Redergam) on erythrocyte cholinesterase activity in rats in histamine shock. A — before Redergam, mean $M_1=1.06 \pm 0.074$; B — after Redergam and before histamine, mean $M_2=1.00 \pm 0.082$; C — after histamine, mean $M_3=0.54 \pm 0.059$; Number of determinations: 3×20 . $(M_2 - M_3) : \sqrt{s_{m_2}^2 + s_{m_3}^2} = 4.9$ $t_{20}=3.21$, consequently, the difference is statistically significant.

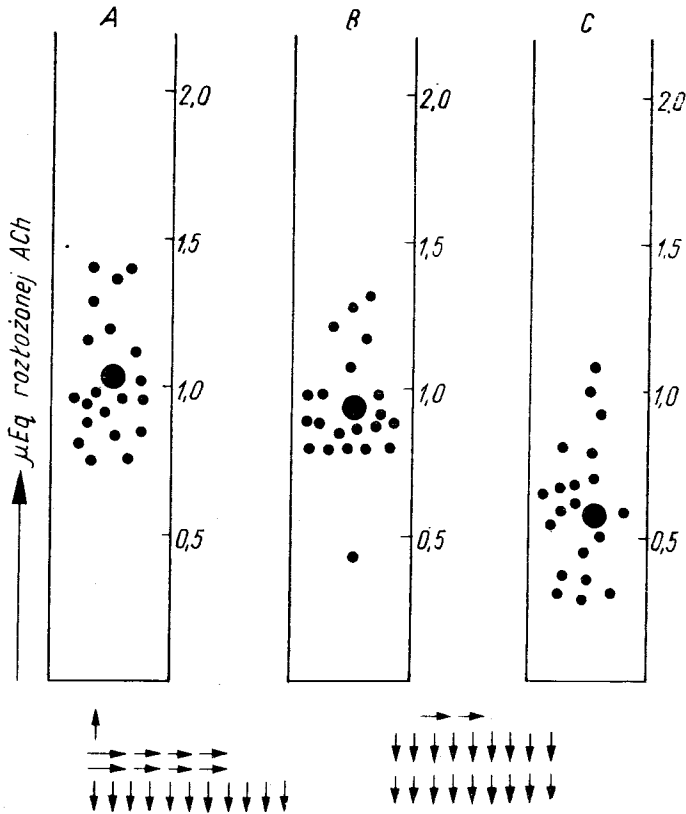
W piątej grupie doświadczeń podawaliśmy szczurom codziennie w ciągu 10 dni po 25 mg soli sodowej atofanu podskórnice, oraz w kilku następnych dniach, gdy były dokonywane doświadczenia z histaminą. Bieg doświadczeń był podobny jak w grupach drugiej, trzeciej i czwartej. Krew pobierano bezpośrednio przed podaniem atofanu (25 mg), w godzinę później, tzn. bezpośrednio przed podaniem histaminy (2 mg), oraz po dalszej godzinie. Wykonaliśmy 20 doświadczeń. Dziesięciodniowe podawanie atofanu nie spowodowało zmian w aktywności ChE erytrocytów. Wszystkie wartości wyjściowe po dziesięciodniowym okresie leżały w tych samych



Ryc. 4. Wpływ efedryny na aktywność ChE erytrocytów szczurow poddanych wstrząsowi histaminowemu. A — przed efedryną średnia $M_1 = 1,05 \pm 0,085$; B — po efedrynie, a przed histaminą średnia $M_2 = 1,03 \pm 0,08$; C — po histaminie średnia $M_3 = 0,97 \pm 0,083$. Ilość pomiarów 3×20 . $(M_2 - M_3) : \sqrt{s_{m_2}^2 + s_{m_3}^2} = 0,51 < t_{20} = 3,21$, a więc różnica statystycznie nieznamienista.

Fig. 4. The effect of ephedrine on erythrocyte cholinesterase activity in rats in histamine shock. A — before ephedrine, mean $M_1 = 1.05 \pm 0.085$; B — after ephedrine and before histamine, mean $M_2 = 1.03 \pm 0.08$; C — after histamine, mean $M_3 = 0.97 \pm 0.083$. Number of determinations: 3×20 . $(M_2 - M_3) : \sqrt{s_{m_2}^2 + s_{m_3}^2} = 0.51 < t_{20} = 3.21$, consequently, the difference is statistically insignificant

granicach, co u zwierząt normalnych (ryc. 5 A). W godzinę po podaniu atofanu w 8 doświadczeniach nie było żadnych zmian aktywności ChE. W 1 doświadczeniu wystąpił nieznaczny wzrost, w 11 nieznaczny spadek aktywności enzymu (ryc. 5 A, B). Średnia aktywność przed atofanem wynosiła $1,02 \mu\text{Eq}$, w godzinę później $0,93 \mu\text{Eq}$. To nieznaczne zmniejszenie średniej jest statystycznie nieistotne. W godzinę po podaniu histaminy w 2 doświadczeniach nie zaszły zmiany aktywności enzymu, w 18 natomiast wystąpiło wyraźne jej zmniejszenie (ryc. 5 B, C). Średnia aktywność po histaminie wynosiła $0,62 \mu\text{Eq}$, co stanowi statystycznie znamienne ob-

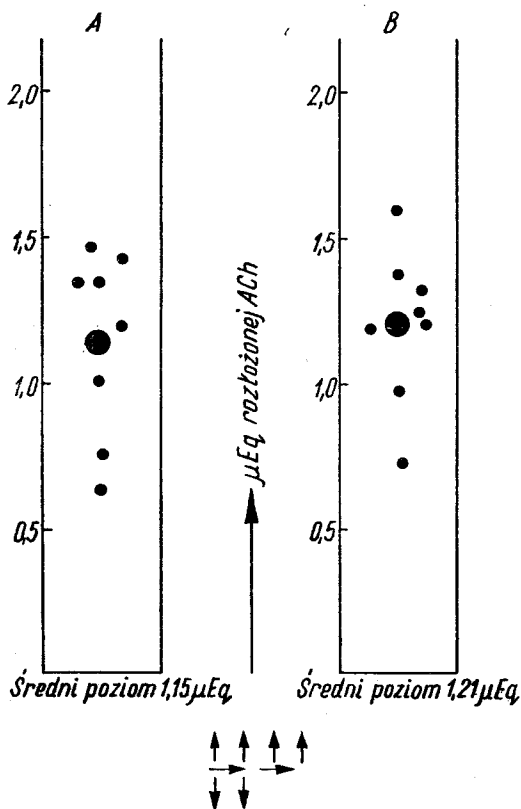


Ryc. 5. Wpływ atofanu na aktywność ChE erytrocytów szczurów poddanych wstrząsowi histaminowemu. A — przed atofanem średnia $M_1=1,02 \pm 0,07$; B — po atofanie, a przed histaminą średnia $M_2=0,93 \pm 0,064$; C — po histaminie średnia $M_3=0,62 \pm 0,06$. Ilość pomiarów 3×20 . $(M_2-M_3) : \sqrt{s_{m_2}^2 + s_{m_3}^2} = 3,25 > t_{20}=3,21$, a więc różnica statystycznie znamienne.

Fig. 5. The effect of atophan on erythrocyte cholinesterase activity in rats in histamine shock. A — before atophan, mean $M_1=1.02 \pm 0.07$; B — after atophan and before histamine, mean $M_2=0.93 \pm 0.064$; C — after histamine, mean $M_3=0.62 \pm 0.06$. Number of determinations: 3×20 . $\sqrt{s_{m_2}^2 + s_{m_3}^2} = 3.25 > t_{20}=3.21$, consequently, the difference is statistically significant.

nizienie w porównaniu ze średnią aktywności ChE przed podaniem histaminy.

W szóstej grupie doświadczeń badaliśmy, czy istnieje wpływ atofanu na aktywność ChE krwinek *in vitro*. Przyjmując przypuszczalne największe stężenie atofanu w osoczu za 0,25 mg/ml dodawaliśmy do zawiesiny krwinek z 0,02 ml krwi w płynie buforowym atofan w ilości 0,25 mg na 1 ml

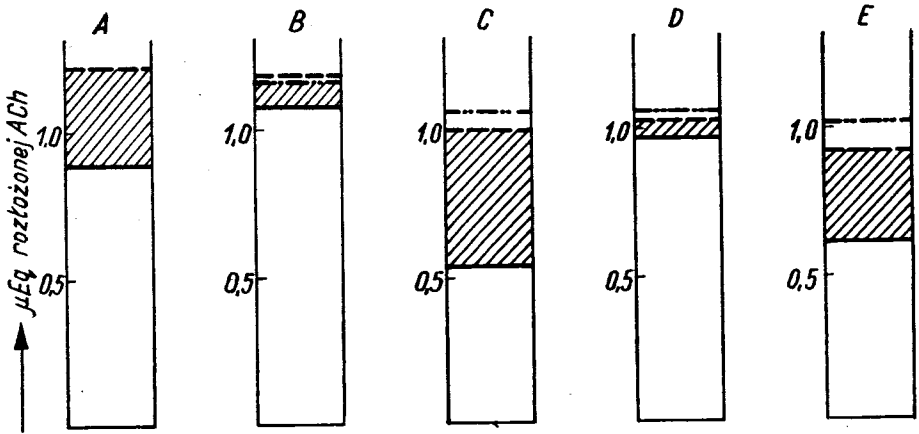


Ryc. 6. Wpływ atofanu na aktywność ChE erytrocytów szczurów *in vitro*. A — erytrocyty nie poddane działaniu atofanu $M_1=1,15 \pm 0,112$; B — erytrocyty poddane działaniu atofanu $M_2=1,21 \pm 0,078$. Ilość par pomiarów 8, $(M_1-M_2) : \sqrt{\frac{s_{m_1}^2}{8} + \frac{s_{m_2}^2}{8}} = 0,52 < t_8=3,64$, a więc różnica statystycznie nieznamienista.

Fig. 6. The effect of atophan on erythrocyte cholinesterase activity *in vitro*. A — red cells not treated with atophan, $M_1=1.15 \pm 0.112$; B — red cells treated with atophan, $M_2=1.21 \pm 0.78$. Number of determinations: 8×2 $(M_1-M_2) : \sqrt{\frac{s_{m_1}^2}{8} + \frac{s_{m_2}^2}{8}} = 0.52 < t_8=3.64$, consequently, the difference is statistically insignificant.

zawiesiny. Po upływie godziny badaliśmy aktywność ChE krwinek z dodatkiem i bez atofanu. Z ośmiu par pomiarów otrzymaliśmy średnią aktywność 1,21 μEq dla krwinek poddanych działaniu atofanu i 1,15 μEq krwinek bez atofanu. Różnica średnich jest nieduża i statystycznie nieznamienista (ryc. 6).

W siódmej grupie doświadczeń badaliśmy wpływ histaminy na ChE erytrocytów *in vitro*. Przyjmując, że po podaniu 2 mg histaminy na szczura przypuszczalne największe jej stężenie w osoczu wynosiło 1,25 mg%, działaliśmy na krwinki *in vitro* histaminą w tym samym stężeniu. W tym celu do zawiesiny krwinek z 0,02 ml krwi w 5 ml płynu buforowego do-



Ryc. 7. Porównanie działania różnych czynników farmakologicznych na ChE erytrocytów szczurów, gdzie ----- poziom ChE przed histaminą, -.-.-.-.- poziom ChE przed: B atropiną, C — redergamem, D — efedryną i E — atofanem. ——— poziom ChE po podaniu histaminy.

Fig. 7. Comparison of the effects of the various drugs on rat erythrocyte cholinesterase activity. ----- activity before histamine; -.-.-.-.- activity before; B — atropine, C — Redergam, D — ephedrine, and E — atofanem; ——— activity after histamine.

dawaliśmy 62,5 µg histaminy. W równoległych oznaczeniach kontrolnych pobieraliśmy w tym samym czasie od tego samego zwierzęcia tę samą ilość krwi i mieszałyśmy ją również z 5 ml płynu buforowego, lecz bez dodatku histaminy. Następnie oznaczaliśmy w obu próbkach aktywność ChE erytrocytów, po upływie jednogodzinnej inkubacji w cieplarni w temp. 37°C.

Wykonaliśmy 14 tego rodzaju podwójnych oznaczeń. W 10 oznaczeniach aktywność ChE erytrocytów z dodatkiem histaminy i bez niej była praktycznie taka sama. W 4 oznaczeniach aktywność ChE erytrocytów z dodaną histaminą była nieco mniejsza. Średnia aktywność ChE erytrocytów poddanych działaniu histaminy wynosiła 0,98 µEq, średnia aktywności erytrocytów nie poddanych jej działaniu — 1,00 µEq, czyli praktycznie pozostała bez zmian (tab. 1).

W ósmej grupie doświadczeń oznaczaliśmy przy pomocy hematokrytu procentową objętość krwinek bezpośrednio przed podaniem 2 mg histaminy i w godzinę później. Wykonaliśmy 12 podwójnych oznaczeń. W 5 doświadczeniach objętość procentowa erytrocytów pozostała bez zmian,

w 5 — nastąpił pewien wzrost, a w 2 — nieznaczny spadek objętości. Średnia objętość erytrocytów przed podaniem histaminy wynosiła 56%, po podaniu 58,5%. Różnica 2,5% jest bardzo mała i statystycznie nieistotna (tab. 2).

Tabela 1. Wpływ histaminy na aktywność ChE erytrocytów krwi szczurów in vitro
Table 1. The effects of histamine in vitro on erythrocyte ChE activity.

Data 1)	Nr szczura 2)	Erytrocyty 3)	
		poddane działaniu histaminy 4)	nie poddane działaniu histaminy 5)
19. X. 59	1	1,32	1,28
„	2	0,89	1,08
20. X. 59	3	1,07	1,10
„	4	0,81	0,97
21. X. 59	1	0,98	1,07
„	2	1,17	1,12
„	5	1,01	0,99
26. X. 59	3	0,68	0,72
„	4	0,71	0,75
29. X. 59	1	0,85	0,80
„	2	0,99	1,05
6. XI. 59	3	1,07	1,00
„	4	1,11	1,03
„	5	0,97	1,07
Średnia 6)		$M_1=0,98$	Średnia $M_2=1,00$
Średni błąd wartości średniej 7)		$s_{m_1}=0,047$	$s_{m_2}=0,041$

Kryterium znamienności: $M_1-M_2: \sqrt{s_{m_1}^2 + s_{m_2}^2} = 0,33$.

Dla 14 pomiarów, ażeby różnica między średnimi była statystycznie znamienna, kryterium to powinno wynosić co najmniej 3,37, a więc różnica ta nie jest znamienna.

Statistical significance criterion: $M_1-M_2: \sqrt{s_{m_1}^2 + s_{m_2}^2} = 0,33$.

For the difference between averages to be statistically significant in 14 determinations, the criterion should be at least 3,37; consequently, the difference is statistically not significant.

Date 1); Rat No. 2); Erythrocytes 3); Treated with histamine 4); Not treated with histamine 5); Mean 6); Standard error of mean 7).

Tabela 2. Wpływ histaminy na zawartość procentową objętościową erytrocytów (wskaźnik hematokrytowy) krwi szczurów.

Table 2. The effect of histamine on the haematocrit value of the blood of rats.

Data 1)	Nr szczura 2)	Objętość erytrocytów w % 3)	
		przed histaminą 4)	po histaminie 5)
2. XII. 59	6	58	59
„	7	60	60
4. XII. 59	8	54	57
„	9	55	56
„	10	61	61
„	6	62	60
5. XII. 59	7	59	52
„	8	52	64
„	9	56	59
7. XII. 59	10	51	57
„	6	52	54
„	7	52	62
Średnia 6)		$M_1=56$	$M_2=58,5$
Średni błąd wartości średniej 7)		$s_{m_1}=0,98$	$s_{m_2}=1,12$

Kryterium znamienności: $M_1-M_2: \sqrt{s_{m_1}^2 + s_{m_2}^2} = 1,67$ dla pomiarów, ażeby różnica między średnimi była statystycznie znamienna, kryterium to powinno wynosić co najmniej 3,41 a więc różnica ta nie jest znamienna.

Statistical significance criterion: $M_1-M_2: \sqrt{s_{m_1}^2 + s_{m_2}^2} = 1,67$. For the difference between averages to be statistically constant in the case of 12 determinations, the criterion must be at least 3,41; thus, the difference is not statistically significant.

Date 1); Rat No. 2); Red cell volume in % 3); Before histamine 4); After histamine 5); Mean 6, Standard error of mean 7).

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Jak wynika z pierwszej grupy pomiarów, po podaniu histaminy nie występują u szczurów wyraźne jednokierunkowe zmiany aktywności cholinesterazy osocza. Różnica wartości średnich aktywności przed i po podaniu histaminy jest nieznaczna i statystycznie nieistotna. Wszystko

wskazuje na to, że histamina w dawkach wywołujących u szczura objawy wstrząsu nie powoduje charakterystycznych zmian w aktywności cholinesterazy osocza. W tej samej grupie pomiarów stwierdziliśmy, że po przebytych wstrząsie histaminowym aktywność cholinesterazy erytrocytów prawie zawsze obniża się. Spadek aktywności jest duży i może przekraczać 70% wartości przed wstrząsem. Średnia aktywność po wstrząsie histaminowym jest znacznie niższa, a różnica średnich przed i po wstrząsie jest statystycznie znamienne.

Jak wiadomo, erytrocyty zawierają przede wszystkim swoistą cholinesterazę rozkładającą wyłącznie estry choliny (*Richterich*). Wobec tego, że swoista cholinesteraza odgrywa zasadniczą rolę w czynności układu nerwowego środkowego i obwodowych zakończeń cholinergicznym, interesujące było dla nas zagadnienie czy i jak na pohistaminowe zmiany aktywności ChE krwinek wpływają substancje farmakologiczne działające na układ vegetatywny. Dlatego w drugiej grupie pomiarów podawaliśmy szczurom atropinę jako środek blokujący większość efektorów vegetatywnych, wrażliwych na działanie acetylocholino. Pod wpływem atropiny aktywność ChE nie zmienia się. Jednak jak się okazało, atropinowe zablokowanie układu przywspółczulnego bardzo znacznie łagodzi pohistaminowy spadek aktywności ChE erytrocytów.

Widzimy więc, że stwierdzony dawniej antagonizm między atropiną a histaminą wyrażający się zmniejszeniem pohistaminowego wydzielania soku żołądkowego [9], jak również niwelacja pohistaminowego spadku ciśnienia krwi u kota i królika [2] przejawia się również w zakresie wpływu histaminy na aktywność ChE erytrocytów. Druga grupa doświadczeń sugeruje myśl, że pomiędzy hamującym działaniem histaminy na cholinesterazę erytrocytów a układem nerwowym vegetatywnym istnieje pewna współzależność. Odnosimy wrażenie, że ten wpływ histaminy odbywa się głównie za pośrednictwem układu parasympatycznego. Swego czasu *Zinnitz* wyraził przypuszczenie, że każda substancja obniżająca ciśnienie krwi działa pośrednio przez hamowanie czynności cholinesterazy i że to jest istota działania wogomimetycznego. Jednak późniejsze badania nad hipotonią wywołaną kalikreina (*Werle i Stüttgen*) oraz długotrwałym kroplowym podawaniem acetylocholino (*Richert i Frisch*) nie potwierdziły hipotezy *Zinnitza*. Celem zbadania jakie istnieją korelacje między układem vegetatywnym a hamującym działaniem histaminy na ChE erytrocytów wykonaliśmy trzecią grupę pomiarów u zwierząt zatrutych *redergamem* (etanosulfonianem dwuhydroergotoksyny), jako substancją blokującą większość obwodowych zakończeń współczulnych. Jak się okazuje *sam redergam* nie powoduje istotnych zmian w aktywności ChE erytrocytów. Natomiast histamina na tle działania *redergamu* bardzo wyraźnie obniża aktywność cholinesterazy, przy czym odnieśliśmy wrażenie, że

spadek aktywności jest znaczniejszy niż bez redergamu. Z tego można wnioskować, że w mechanizmie hamowania ChE przez histaminę układ współczulny odgrywa rolę antagonistyczną. Potwierdzeniem słuszności tego poglądu była czwarta grupa doświadczeń, w których podawaliśmy zwierzętom efedrynę, jako substancję sympatykomimetyczną. U zwierząt po podaniu efedryny nie zachodziły istotne zmiany aktywności enzymu. Histamina podana tym zwierzętom nie powodowała charakterystycznego spadku aktywności ChE. A więc wzmożone napięcie układu współczulnego przeciwstawia się hamującemu wpływowi histaminy na cholinesterazę.

W innej pracy (Billewicz-Stankiewicz i Tyburczyk) zostało wykazane, że w erytrocytach znajduje się nie tylko swoista, lecz również pewna ilość nieswoistej esterazy, rozkładającej tributyrinę. Wahania aktywności tego enzymu uzależnione są od sprawnie działającego miąższu wątroby. Przejściowe uszkodzenia wątroby atofanem według sposobu podanego przez Churchillilla i Wegenera [wg 7] powodują znikanie wzrostu aktywności nie swoistej esterazy krwinek w czasie wysiłku fizycznego [3].

Uważaliśmy za pożądane przekonanie się, jak wpływa histamina na aktywność ChE erytrocytów w czasie przejściowego poatofanowego uszkodzenia wątroby. W tym celu wykonaliśmy piątą grupę doświadczeń z których wynika, że w zatruciu atofanem histamina powoduje takie same obniżenie aktywności enzymu, jak u szczurów zdrowych. Stąd można wnioskować, że histamina działa raczej na frakcję enzymu swoistego, który nie pochodzi z tkanki wątrobowej. Jako doświadczenie kontrolne (szósta grupa doświadczeń) przeprowadziliśmy pomiary nad wpływem atofanu na ChE erytrocytów *in vitro*. Okazało się, że atofan działając *in vitro* na erytrocyty w tym stężeniu, które przypuszczalnie osiąga w osoczu szczura ($1 : 4.10^3$) nie wpływa w sposób znamieny na aktywność cholinesterazy. Również badania kontrolne (siódma grupa doświadczeń) nad wpływem histaminy na ChE erytrocytów *in vitro* w tym stężeniu, które odpowiada przypuszczalnemu maksymalnemu jej stężeniu w osoczu szczurów ($1,25.10^{-5}$) wykazały, że nie działa ona bezpośrednio na aktywność enzymu. Wpływ ten najprawdopodobniej jest pośredni poprzez oddziaływanie histaminy na ustrój, a nie bezpośrednio na krążący enzym. Nasze wyniki w tym względzie nie są zgodne z wynikami Engelhardta, Hahna i Sakai, którzy badając *in vitro* wpływ histaminy na ChE erytrocytów królika widzieli hamujący jej wpływ w stężeniu 1.10^{-6} . Przyczyn rozbieżności dopatrujemy się w tym, że wspomniani autorzy wykonali trzykrotnie mniejszą liczbę pomiarów od nas i z ich pracy wynika, że przy porównywaniu wartości średnich nie posługiwali się ścisłymi kryteriami oceny statystycznej. Jak zaznaczyliśmy w innym miejscu pracy, objawy wstrząsu histaminowego były łagodne. Przy ponawianym podawaniu histaminy stawały się nieraz prawie niewidoczne. Tym nie mniej chcieliśmy

się przekonać, czy histamina w stosowanych dawkowaniach nie wywołuje zmian w zawartości wody we krwi i przeprowadzaliśmy oznaczenia wskaźnika hematokrytowego przed podaniem histaminy i w godzinę później (ósma grupa doświadczeń). Doświadczenia wykazały, że pod wpływem stosowanych dawek histaminy zachodzi bardzo nieznaczne, statystycznie nieznamienne zagęszczenie krwi. Stąd można wnioskować, że opisane przez nas zmiany aktywności enzymatycznej są istotne i nie są spowodowane zmienną koncentracją krwi.

WNIOSKI

Podsumowując wyniki niniejszej pracy dochodzimy do następujących wniosków:

1. Histamina nie wywołuje u szczurów charakterystycznych zmian aktywności cholinesterazy osocza.
2. Histamina powoduje prawie zawsze wyraźne obniżanie się aktywności cholinesterazy erytrocytów, przy czym spadek średniej aktywności jest statystycznie znamienne.
3. Podawanie szczurom atropiny znacznie osłabia lub znosi hamujący wpływ histaminy na cholinesterazę erytrocytów.
4. Podawanie dwuhydroergotoksyny (redergamu) nie tylko nie znosi, ale raczej pogłębia hamujący wpływ histaminy na cholinesterazę erytrocytów.
5. Podawanie efedryny działa podobnie do atropiny i znacznie osłabia lub znosi hamujący wpływ histaminy na cholinesterazę erytrocytów.
6. Przejściowe uszkodzenie wątroby atofanem nie odbija się na hamującym działaniu histaminy na cholinesterazę krwinek. Atofan nie działa również na cholinesterazę erytrocytów *in vitro*.
7. Histamina w stężeniu $1,25 \cdot 10^{-5}$ nie powoduje charakterystycznych zmian w aktywności cholinesterazy erytrocytów *in vitro*.
8. Pod wpływem stosowanych dawek histaminy stosunek objętości krwinek i osocza nie ulegał istotnym zmianom.
9. Hamujący wpływ histaminy na cholinesterazę erytrocytów *in vivo* jest zjawiskiem złożonym, uzależnionym najprawdopodobniej od układu vegetatywnego, jak to wynika z doświadczeń z substancjami działającymi na ten układ.

Graficzne zestawienie wyników przedstawione jest na ryc. 7.

Я. Биллевич-Станкевич, А. Ясински

ИЗМЕНЕНИЯ АКТИВНОСТИ ХОЛИНЭСТЕРАЗ КРОВИ ПОД ВЛИЯНИЕМ ГИСТАМИНА

Содержание

Опыты свои авторы проводили на белых крысах, веса около 150 г. Все фармакологические препараты подавались внутривенно, за исключением атофана, который вприскивали подкожно.

Принято следующие дозы веществ: гистамин 2,0 мг, атропин 20 мг, дигидроерготоксин (этаносульфониан) 0,1 мг, эфедрин 1,0 мг, атофан 25,0 мг на одну крысу. Определение активности холинэстеразы производилось в плазме и в эритроцитах по потенциометрическому микрометоду Ясинского. Цифровые данные отдельных серий измерений сравнены статистически.

Выводы настоящей работы следующие:

1. Гистамин не вызывает у крыс характеристических изменений активности холинэстеразы плазмы.

2. Гистамин вызывает почти всегда понижение активности холинэстеразы эритроцитов.

3. Атропин значительно ослабляет или купирует тормозящее влияние гистамина на холинэстеразу эритроцитов.

4. Дигидроерготоксин усиливает тормозящее влияние гистамина на холинэстеразы эритроцитов.

5. Эфедрин значительно ослабляет или купирует тормозящее влияние гистамина на холинэстеразы эритроцитов.

6. Некроз печени, вызванный отравлением атофаном не отражается на тормозящей деятельности гистамина на холинэстеразы эритроцитов. Атофан не действует также на холинэстеразы эритроцитов.

7. Гистамин в концентрации $1,25 \cdot 10^{-5}$ не вызывает характеристических изменений активности холинэстеразы.

8. Под влиянием применяемых доз гистамина объемное отношение кровяных телец и плазмы не подвергалось существенным изменениям.

9. Тормозящее влияние гистамина на холинэстеразы эритроцитов представляет собой сложное явление, зависимое по всей вероятности от вегетативной нервной системы.

J. Billewicz-Stankiewicz, A. Jasiński

CHANGES CAUSED IN THE ACTIVITY OF BLOOD CHOLINESTERASES BY HISTAMINE ADMINISTRATION

Summary

The experiments were made on albino rats weighing about 150 g. each. Atophan was given subcutaneously, and all the other preparations intraperitoneally. The dosage was for histamine 2 mg., atropine (sulphate) 0.02 g., dihydroergotoxine (ethanesulphonate) 0.1 mg., ephedrine 1 mg., and atophan (sodium salt) 25 mg pro animal. Plasma and erythrocyte cholinesterase activity was determined by Jasiński's

potentiometric micromethod, and the results in particular series were compared statistically.

The following conclusions are drawn:

1. Histamine causes no characteristic changes in the plasma cholinesterase activity in rats.
2. Histamine nearly always depresses erythrocyte cholinesterase activity.
3. Atropine depresses or even altogether suppresses the inhibitory effects of histamine on erythrocyte cholinesterase activity.
4. Dihydroergotoxine emphasizes the inhibitory effects of histamine on erythrocyte cholinesterase activity.
5. Ephedrine markedly depresses or abolished the inhibitory effects of histamine on erythrocyte cholinesterase activity.
6. Temporary liver damage caused by atophan does not modify the inhibitory effects of histamine on erythrocyte cholinesterase activity; neither is this activity itself affected by atophan.
7. In $1.25 \cdot 10^{-5}$ concentrations, histamine causes in vitro no characteristic changes in cholinesterase activity.
8. In the doses employed, histamine caused no significant changes in haematocrit values.
9. The in vivo inhibitory effects of histamine on erythrocyte cholinesterase activity are a complex phenomenon which probably depends on the autonomic nervous system.

PIŚMIENNICTWO

1. Aron E., Herschberg A. O.: *La Presse Med.*, 1947, 55, 314.
2. Billewicz-Stankiewicz J.: *Annales U. M. C. S. Sect. D.*, 1955, 10, 471.
3. Billewicz-Stankiewicz J., Tyburczyk W.: *Internat. Z. Angew. Physiol.* 1961, 18, 361.
4. Engelhardt G., Hahn G., Sakai F.: *Naunyn-Schmiedeberg's, Arch. Exp. Path. Pharmak.*, 1959, 237, 49.
5. Jasiński A.: *Acta Physiol. Polon.*, 1959, 10, 647.
6. Koller S.: *Graphische Tafeln zur Beurteilung statistischer Zahlen.* Dresden, 1943. Steinkopf.
7. Łazarew N. W.: (pod red.). *Wywoływanie chorób u zwierząt dla badań doświadczalno-leczniczych.* Warszawa, 1957, PZWL.
8. Maier E.: *Klin. Wschr.*, 1952, 30, 182.
9. Poulsson, Liljestrand G.: *Lehrbuch der Pharmakologie.* Leipzig, 1949, Hirzel.
10. Richert W., Frisch W.: *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Exp. Path. Pharmak.*, 1942, 200, 235.
11. Richterich R.: *Enzymopathologie.* Berlin—Göttingen—Heidelberg, 1958. Springer.
12. Werle E., Stüttgen G.: *Klin. Wschr.*, 1942, 21, 821.
13. Zinnitz F.: *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Exp. Path. Pharmak.* 1940, 194, 316.

Otrzymano: 7. 2. 1960.

Adres autorów: Zakład Patologii Ogólnej i Doświadczalnej Akademii Medycznej w Lublinie, ul. Staszica 4.