

WPLYW EGZOGENNEJ HISTAMINY NA PRZENIKANIE KOMÓREK *E. COLI* WZGLĘDNIE ICH FRAGMENTÓW ORAZ CYTOPLAZMY PRZEZ ŚCIANĘ JELITOWĄ ŚWINEK MORSKICH I BIAŁYCH SZCZURÓW

MARIAN DECOWSKI, EDWARD GOGACZ

Pracownia Radiobiologii Instytutu Weterynarii w Puławach

Kierownik: doc. dr M. Decowski

Histamina jest normalnym składnikiem ustroju zwierzęcego. Magazynowana jest głównie w komórkach tucznych rozsianych w tkance łącznej zwłaszcza w bezpośrednim sąsiedztwie małych naczyń krwionośnych. Transportowana jest przez komórki zasadochłonne. Istnieje kilka sposobów jej wytwarzania w ustroju. W największej ilości powstaje wskutek dekarboksylacji histydyny w tkankach, które posiadają swoisty enzym dekarboksylazę, może być jednak wytwarzana również w tkankach zawierających nieswoistą dekarboksylazę działającą na aromatyczne aminokwasy. Trzecim czynnikiem mogą być drobnoustroje w przewodzie pokarmowym obdarzone zdolnością do dekarboksylowania histydyny. Jednak w ten sposób wytworzona histamina prawdopodobnie przechodzi w stanie wolnym bezpośrednio do moczu i w ustroju nie odgrywa większej roli.

Istnieją różne czynniki, zdolne do wyzwolenia zmagazynowanej histaminy z komórek. Zaliczyć do nich można stress, wszelkie uszkodzenia skóry w postaci ran, oparzeń, napromieniań i odmrożeń; dalej różne środki chemiczne zwłaszcza wolno działające depresory (np. związek 40/80), jady węzów i pszczoł, różne czynniki, które potęgują zapotrzebowanie tkanek na krew, co prowadzi do powstawania histaminy indukowanej w tkankach ubogich w komórki tuczne, przede wszystkim zaś reakcja *in vivo* antygeny z przeciwciałem umiejscowionym w pobliżu lub na komórce oraz działanie endotoksyny.

Wyzwalanie histaminy przebiega gwałtownie. Już po 1 minucie 3/4 jej zapasu w komórkach tucznych przechodzi do płynów ustrojowych

lecz działanie jej jest bardzo krótkie. W stanie wolnym ulega szybkiemu zniszczeniu (podobnie jak histamina egzogenna) przez enzym histaminazę mający swe źródło w nerkach i łożysku. Histamina i histaminaza występują razem w szeregu narządów a wysoka aktywność enzymu w śluzówce jelit może stanowić ochronę przed histaminą.

Działanie pozakomórkowej histaminy na ustrój jest różnorakie, często charakterystyczne dla danego gatunku zwierząt. Powoduje ona rozszerzanie włosowatych naczyń krwionośnych ze zwiększaniem ich przepuszczalności, skurcze wielu mięśni gładkich zwłaszcza jelit, spadek ciśnienia krwi i spadek temperatury. Prócz tego pobudza czynność wydzielniczą gruczołów. Odpowiednio duże ilości histaminy powodują powstawanie szoku anafilaktycznego. Szczegółowe dane dotyczące biologicznych właściwości histaminy i jej działania zaczerpnąć można w piśmiennictwie.

W dostępnym dla autorów piśmiennictwie nie napotkano na prace nad wpływem histaminy na przepuszczalność ściany jelitowej dla drobnoustrojów i pochodzących z nich elementów. Biorąc pod uwagę zdolność rozszerzania naczyń włosowatych łącznie ze zwiększeniem ich przepuszczalności oraz wywoływanie skurczów mięśni gładkich jelit można przypuścić, że właściwości te mogą spowodować zaburzenia w fizjologicznej funkcjonalności ściany jelitowej i ułatwić przez to penetrację elementów bakteryjnych do wnętrza ustroju. Przebadanie tego zagadnienia jest celem niniejszej pracy pomyślanej jako wstępnej dla stwierdzenia czy są celowo zaplanowane dalsze prace nad wpływem endogennych biologicznych czynników wyzwalanych w ustroju w wyniku reakcji antygen — przeciwciało (endogenna histamina, „slow reacting substance — SRS-A, bradykinina, serotonina) na przenikanie bakterii przez ścianę jelita.

MATERIAŁ I METODY

Z w i e r z ę t a. Badania przeprowadzono na dorosłych świnkach morskich i białych szczurach. Te dwa gatunki zwierząt dobrano z uwagi na różnice w ich florze bakteryjnej. W jelicie świnki morskiej *E. coli* występuje wyłącznie w stanach patologicznych, zwierzę jest zatem przydatne do badań z zastosowaniem chorobotwórczych bodźców.

S z c z e p y. Do badań użyto hemolityczny szczep *E. coli* 725 — E. 68. II o budowie antygenowej 0141a(b)K85(B), wyosobniony z przypadku kolibakteriozy prosiąt.

H o d o w l e. Stosowano podłoże w ilości 750 ml o składzie: neopeptone Difco 1%, polypeptone BBL 1%, glikoza 0,1%, sól kuchenna 0,2%,

sodu fosforan dwuzasadowy 0,3%, pH 8,0. Posiewano je 0,5 ml 18-godzinnej hodowli na takim samym podłożu i inkubowano przez noc w temperaturze 37°.

Znakowanie komórek. Komórki bakteryjne piętnowano radiochromem — 51 — stosując metodę Gogacza (6). Radiochrom — 51 jest emitерem promieniowania gamma o energii 320 KeV — jego półokres trwania wynosi 27 dni.

Odwirowany (10 tys. obr./min.) i 3-krotnie przepłukany rozcieńczonym płynem Ringera (1 : 4), osad bakteryjny pokrywano 20 ml nierozcieńczonego płynu Ringera, dodawano 100 μ C radiochromu i inkubowano 18 godzin w 37°. Następnie komórki odwirowywano, 3-krotnie przemywano osad rozcieńczonym płynem Ringera i komórki zawieszano w potrzebnej ilości mleka. Dla kontroli radioaktywności pobierano 1 ml tej zawiesiny do miseczki, suszono w podczerwieni i mierzono ilość impulsów promieniowania gamma.

Dla otrzymania znakowanej cytoplazmy, gęstą zawiesinę radioaktywnych komórek *E. coli* rozbijano w ciągu 6 godzin w młynku bakteriologicznym, następnie całość odwirowywano (16.000 obr/min) dla oddzielenia stałych elementów, a płyn zawierający znakowaną cytoplazmę poddawano 24-godzinnej dializie dla usunięcia radiochronu w postaci jonowej. Następnie cytoplazmę zagęszczano w prądzie powietrza do otrzymania w niej radioaktywności stosownej do przeprowadzenia eksperymentu.

Stosowanie znakowanych substratów. Zarówno zawiesina piętnowanych komórek *E. coli* w mleku jak i cytoplazma wprowadzane były lekko nakarmionym zwierzętom dożołądkowo przez sondę w ilości po 1 ml, po czym celem przepłukania sondy wprowadzano dodatkowo 1 ml fizjologicznego roztworu soli. Jedno zwierzę z każdej partii usypiano w kilkanaście minut po zabiegu i wybierano cały przewód pokarmowy. Próbkę ta po spopieleniu służyła jako porównawczy standard. Po sondowaniu zwierzęta dzielono na 2 grupy. Jednej z nich wstrzykiwano podskórnice w 3 i 18 godz. od chwili sondowania histaminę w ilości 2 mg/kg żywej wagi świnkom morskim i 500 mg/kg białym szczurom. Druga grupa stanowiła kontrolę przenikania *E. coli* w warunkach normalnych. Po 24 godz. zwierzęta usypiano, wybierano w całości przewody pokarmowe (wraz z treścią) i umieszczono je łącznie z zebrany m wydalonym kałem w pojemnikach wykonanych z cienkiej folii aluminiowej celem spopielenia. Spalano w temperaturze 250° a następnie spopielało w 400° co trwało 4—5 dni. Następnie brzegi pojemników zaginano do wnętrza i zaklepywano do postaci krążków gotowych już do pomiarów.

Pomiary radioaktywności. Mierzono ilość impulsów promieniowania gamma przy użyciu licznika typu SE-2 z kryształem NaJT1, sprzężonym z przelicznikiem typu PEL-5. Obydwa przyrządy produkcji krajowej. Z różnicy ilości impulsów krążka standardowego i krążków z popielonymi próbkami obliczano procenty pozostałej w przewodach pokarmowych radioaktywności. Wartości ich odjęte od 100 dawały procenty radioaktywności przemieszczonych do wnętrza ustrojów.

WYNIKI

Badania przeprowadzono na 16 świnkach morskich i 6 szczurach. Uzyskane wyniki ilustruje tab. 1, w której przedstawiono w średnich wartościach procent radioaktywności przemieszczonej do wnętrza ustroju obydwu grup użytych zwierząt.

Tabela 1

Wpływ histaminy na przepuszczalność ściany jelitowej świnek morskich i białych szczurów wyrażony w średnich procentach przemieszczonej do wnętrza ustrojów radioaktywności

	Ilość zwierząt	Grupa I po histaminie	Ilość zwierząt	Grupa II kontrolna bez histaminy
Świnki morskie				
Komórki <i>E. coli</i>	5	55% (± 7.6)	7	9.5% (± 1.4)
Cytoplazma	2	69% (± 10.6)	2	8.5% (± 2.12)
Białe szczury				
Komórki <i>E. coli</i>	3	40.5% (± 6.1)	3	11.3% (± 3.57)

Jak wynika z tab. 1 wpływ histaminy na zwiększenie przepuszczalności ścian jelitowych użytych w doświadczeniu zwierząt jest bezsporny mimo że obserwowano różnice indywidualne w reakcji poszczególnych zwierząt zwłaszcza u szczurów. Ponieważ wcześniej wykazano, że Cr-51 nie może istnieć w przewodzie pokarmowym w stanie jonowym lecz łączy się natychmiast ze składnikami treści pokarmowej w sposób trwały oraz, że praktycznie w stanie wolnym nie przenika przez śluzówkę jelita, można z dużym prawdopodobieństwem przypuścić, że ubytek radioaktywności w przewodzie pokarmowym spowodowany został ubytkiem Cr-51 związanego z komórkami *E. coli*, który przeniknął do wnętrza ustroju. Jednak nie stwierdzono czy zaszedł fakt penetracji całych komórek żywych czy martwych czy też tylko poszczególnych fragmentów ich metabolizmu lub rozpadu. Zagadnienie to zaplanowano do rozwiązania w trakcie następnych prac.

Uzyskane wyniki zachęcają do kontynuowania doświadczeń nad endogenną histaminą i pozostałymi czynnikami szokotwórczymi jak SRS-A, bradykinina, serotonina wyzwolonymi lub wytworzonymi w ustroju w wyniku reakcji antygen-przeciwciało lub działaniem endotoksyny w kierunku ich wpływu na zmianę fizjologicznej funkcjonalności ściany jelitowej oraz wykrycie ich możliwej roli w patogenezie kolibakteriozy.

Powyższe zagadnienia są przedmiotem współczesnych badań tutejszej Pracowni.

WNIOSKI

Przy zastosowaniu komórek *E. coli* i ich cytoplazmy znakowanych Cr-51 stwierdzono wpływ egzogennej histaminy na zmianę w funkcjonalności ściany jelitowej świnek morskich i białych szczurów w kierunku zwiększenia jej przepuszczalności co umożliwia penetrację znakowanych elementów w głąb ustroju.