

B. GUTOWSKI

OBSERWACJE WOLNYCH AMINOKWASÓW W SUROWICY ORAZ KRWINEK I HEMOGLOBINY KRWI U PROSIĄT W OKRESIE ACHLORHYDRII WZROSTOWEJ

Z Katedry Fizjologii Zwierząt Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie

Kierownik: prof. dr B. Gutowski

Doniesienie tymczasowe

A. W. Kwaśnicki (1) stwierdził inny przebieg wydzielania i składu chemicznego soku żołądkowego u prosiąt osesków niż u świń dorosłych. U prosiąt wyraźnie zaznacza się faza odruchowego wydzielania soku żołądkowego dopiero w 3-cim miesiącu ich życia, zaś sok żołądkowy, mimo obecności w nim pepsynogenu, nie zawiera wolnego kwasu solnego i z tego powodu nie wykazuje trawiącego działania. W 25—33 dniu życia prosiąt pojawia się w soku żołądkowym wolny kwas solny, osiągając w 60—75 dniu życia prosiąt stężenie wolnego kwasu solnego u świń dorosłych (0,3%). Z chwilą obecności wolnego kwasu solnego znika achlorhydria rozwojowa, a sok żołądkowy jest pełnowartościowy fizjologicznie. Jednak u prosiąt w okresie achlorhydrii wzrostowej może pojawić się przedwcześnie wolny kwas solny w soku żołądkowym pod wpływem histaminy, wstrzykniętej podskórnie, jak to wykazała H. Hoffman (2) w Zakładzie Fizjologii Zwierząt SGGW. Gdy minie działanie histaminy powraca achlorhydria wzrostowa i trwa do czasu naturalnej dojrzałości gruczołów żołądkowych. Macierzystą substancją histaminy jest histydyna (B. Baldwin (3)). Histamina powstaje także w wyniku działalności bakterii w przewodzie pokarmowym. W okresie achlorhydrii wzrostowej istnieją również zmiany w ilości erytrocytów i hemoglobiny. Wielu badaczy a także H. Bieguszewski, J. Chudy, St. Iwańska (4) znaleźli u 6 prosiąt najmniejszą ilość erytrocytów i hemoglobiny między 9—14 dniem życia prosiąt. Wobec powstawania histaminy z histydyny i zmian w ilości erytrocytów i hemoglobiny, postanowiłem oznaczyć wolne aminokwasy surowicy krwi prosiąt oraz liczbę erytrocytów i ilość hemoglobiny w celu zbadania możliwego związku czynnościowego między achlorhydrią wzrostową a zmianami w krwi wolnych aminokwasów, a przede wszystkim histydyny.

METODYKA

Prosięta doświadczalne. Badania przeprowadzono w majątku doświadczalnym SGGW Brwinów na 10 prosiętach rasy puławskiej tego samego miotu, urodzonych 14. III. 1958 r.¹ W okresie ssania, poczynając od 3. IV. 58 r. prosięta

¹ Maciora i prosięta pochodzą z hodowli trzody chlewnej, znajdującej się pod kierunkiem prof. F. Małego.

Składam także podziękowanie mgr M. Kotarbińskiej, mgr H. Krzymowskiej, kand. nauk wet. T. Krzymowskiemu i asyst. W. Barejowi za pomoc w okresie prowadzonych doświadczeń.

otrzymywały dodatkowo mleko krowie. W ciągu 3 dni podawano 3 razy dziennie dla wszystkich prosiąt po $\frac{1}{2}$ litra mleka pełnego. W ciągu następnych 3 dni dosypywano stopniowo do mleka mieszanki treściwej w następującej ilości. Od 28 do 35 dnia życia prosiąt dodawano dla każdego prosięcia 0,4 l mleka pełnego i 80 g mieszanki treściwej (M. T.).

Od 35—42 dnia życia dodawano na jedno prosię dziennie 0,8 l mleka pełnego i 180 g mieszanki treściwej.

Od 49—56 dnia dodawano na jedno prosię 0,4 l mleka pełnego, 0,8 l mleka odciąganego i 400 g M. T. Od 56 dnia odjęto prosiętom mleko pełne, a podawano 1 litr mleka odciąganego i stopniowo zwiększano ilość M. T. do 800 g. Prosięta odstawiono od maciory w 56 dniu życia.

Skład mieszanki treściwej (M. T.) podawanej prosiętom:

Śruta jęczmienna	40%
Śruta owsiana	20%
Otręby pszenne	15%
Mączka rybna	15%
Okруchy z siana	10%
Kreda szlamowana	2%

Pobieranie krwi. Krew w ilości 10 ml pobierano z żyły czołowej dogłowej (*v. cava cranialis*) zawsze o godz. 8 rano. Do pobrania krwi kładziono prosięta na grzbiecie w rynienkowatym stole operacyjnym. Dwóch pomocników trzymało prosięta za jednostronnie ściągnięte kończyny a trzeci za głowę. Po oczyszczeniu skóry na brzusznej powierzchni szyi, odkażano ją 70% etanolem, 5% jodyną. Następnie igłę nr 3 długości 3,5 cm, osadzoną na 10 ml strzykawce (Record) wkłuwano pod kątem około 60° w skórę po prawej stronie szyi w punkcie odległym od rękoności mostka 2—3 cm, a od linii środkowej szyi o 1,5 cm. Ostrze wkłutej igły kieruje się przez wpust klatki piersiowej dogrzebietowo i doogonowo, aby trafiła ona do żyły czołowej. Podczas wkłuwania igły odciąga się tłok strzykawki o 1 cm w celu wytworzenia w niej podciśnienia w momencie nakłucia żyły. Strzykawkę wypełnioną krwią opróżniano do wyparafinowanej probówki wirowniczej. Po przewiezieniu probówek do laboratorium (po jednej godzinie), wirowano je ze skrzepłą krwią na wirówce o 3500 obrotach na minutę w ciągu 15 minut. Surowicę odmierzoną pipetą miarową zalewano 10-krotną ilością 96% etanolu i pozostawiono na przeciąg 2 godzin. Odbiałzoną surowicę odparowano na łaźni wodnej przy temp. poniżej 50°C. Suchą pozostałość rozpuszczano w 70% etanolu (zakwaszonym 6 n HCl) w ilości odpowiadającej 20-krotnemu zagęszczeniu początkowej objętości surowicy. W otrzymanej probówce oznaczano aminokwasy metodą chromatografii bibułowej. Dwukierunkowe chromatogramy wolnych aminokwasów rozwijano pierwszy kierunek w układzie rozpuszczalników: fenol + bufor o pH 2. Bufor przygotowano z 5 objętości 0,067 M wodnego roztworu KCl na 10,66 objętości 0,067 M wodnego roztworu HCl, Subramaniam i wsp. (5). Drugi kierunek chromatogramów rozwijano w układzie rozpuszczalników n — butanol + H₂O + kwas octowy lodowaty (4 : 5 : 1). Chromatogram wywołymano 0,2% roztworem ninhydryny w 96% etanolu.

WYNIKI I OMÓWIENIE WYNIKÓW

Wolne aminokwasy, oznaczane w surowicy krwi badanych prosiąt na chromatogramach dwukierunkowych, przedstawiono w dwóch tabelach: Ia i Ib.

Wśród aminokwasów wymienionych w tab. Ia jedynie tryptofan i histydyna nie ujawniły się na chromatogramach w okresie doświadczalnym. Ślady tryptofanu wykryto odczynnikiem Ehrlicha p-dwumetyl-aminobenzaldehydem. Histydyny nie wykryto ninhydryną ani też wodą bromową ani sulfanilamidem. Przy rozwijaniu chromatogramów w układzie fenol + woda i wywoływaniu ninhydryną, minimalna ilość histydyny do ujawnienia na chromatogramie wynosi 25 μg Hais i Macek (6), Ledever (8), Blaut-Opieńska (7). Dla tryptofanu minimalna ilość wynosi 2 μg .

Aminokwasy istotne wykrywalne na chromatogramach wykazują różne natężenia plam aminokwasów, zależnie od poszczególnych prosiąt i ich

Tabela Ia

Wolne aminokwasy istotne w surowicy badanych prosiąt

Numery prosiąt oznaczone cyframi rzymskimi; w takiej samej kolejności oznaczono cyframi arabskimi natężenie barw plam aminokwasów odpowiednich prosiąt, przy czym znak + oznacza ślad plam aminokwasów a znak — aminokwasy nie ujawnione na chromatogramach

Data pobrania krwi	Wiek prosiąt	Numery prosiąt	Tryptofan	Lizyna	Histydyna	Fenylalanina	Leucyna Isoleucyna	Arginina	Metionina Walina	Treonina
25. III. 58	12 dni	IV, V, VI, VIII	—	—2,2,2	—	2,2,2,4	7,6,5,6	7,5,5,5	7,6,6,6	4,4,4,3
3. IV. 58	21 dni	I, III, VII	—	3,1,4,	—	2,2,2	5,7,6	4,4,4	5,7,6	3,5,4
12. IV. 58	30 dni	II, V, VI, VII	—	5,6,6,4	—	3,3,4,3	5,8,7,8	5,6,6,4	6,8,7,8	3,4,4,4
22. IV. 58	40 dni	III, IV, VII, X	—	3,4,4,5	—	2,2,2,3	7,7,7,7	5,5,5,6	7,7,7,7	4,4,4,5
6. V. 58	54 dni	II, V, VIII	—	3,4,5	—	2,2,2	6,7,7	5,4,5	5,7,7	4,4,4
13. V. 58	61 dni	I, IV, VII, X	—	6,7,2,6	—	2,3,2,2	6,8,6,7	6,7,5,6	6,8,6,7	4,4,3,3
30. V. 58	68 dni	I, IV, V, VIII	—	4,5,6,4	—	2,3,2,3	6,8,7,6	5,7,6,5	6,8,8,6	3,4,4,4

wieku. Intensywność plam lizyny a w przybliżeniu jej ilość jest najmniejsza w 12 dniu życia prosiąt, a zwiększa się w 21 dniu. W tym czasie rozpoczęto stopniowo dokarmianie prosiąt mlekiem krowim, do którego od 27 dnia dodawano mieszanki treściwej. Natężenie plam fenylalaniny, leucyny, izoleucyny, argininy, metioniny + waliny oraz treoniny utrzymuje się w okresie doświadczalnym na ogół na jednakowym poziomie.

Z aminokwasów wymienionych w tabeli Ib nie zawsze ujawniają się na chromatogramach kwas asparaginowy, kwas α -aminomasłowy, γ -aminomasłowy i cytrulina. Wymienione aminokwasy nie ujawniają się zupełnie na chromatogramach z surowicy krwi, pobranej w 12 dniu życia prosiąt. Kwas asparaginowy i kwas γ -aminomasłowy ujawniają się w śladach w 21. dniu. W 30. dniu życia prosiąt na chromatogramach zaznacza się wyraźnie kwas α -aminomasłowy a w śladach — cytrulina. Barwy plam pozostałych aminokwasów, zawartych w tabeli Ib mają w przybliżeniu jednakową intensywność z wyjątkiem glukozaminy, której plama występuje wyraźnie u wszystkich prosiąt dopiero w 21 dniu życia.

Tabe

Tabela I b stanowi ciąg dalszy tab. I a i
plam aminokwasów w kolejności odpo
w określonym

Data po- brania krwi	Wiek prosiąt	Numery prosiąt	Cystyna	Kwas aspa- raginowy	Seryna	Kwas glu- taminowy	Glikokol	Alanina
25. III. 58	12	IV, V, VI, VIII	2,1,2,1	—,—,—,—	3,2,2,4	4,4,3,4	7,4,4,6	8,7,7,6
3. IV. 58	21	I, III, VII	1,1,1	—,+,—	—,3,3	3,3,4	5,5,6	5,6,7
12. IV. 58	30	II, V, VI, VII	1,1,2,1	—,—,—,—	3,5,5,4	4,6,5,5	5,4,6,6	6,7,8,6
22. IV. 58	40	III, IV, VII, X	1,3,2,4	+,—, 1,—	4,3,3,—	4,4,5,6	6,7,6,7	7,7,7,9
6. V. 58	54	II, V, VIII	3,2,2	—,—,—,—	4,4,3	5,3,5	6,5,6	6,6,6
13. V. 58	61	I, IV, VII, X	2,2,2,2	—,—,—,—	4,4,2,5	6,5,5,7	5,7,7,7	6,8,7,8
30. V. 58	68	I, IV, V, VIII	1,1,1,1	+,+,+, 1	2,4,4,4	5,5,5,5	5,7,7,7	7,9,9,6

W czasie pobierania krwi do chromatoficznej analizy wolnych aminokwasów pobrano od tych samych prosiąt i osobników, krew z ucha do ilościowego oznaczenia krwinek i hemoglobiny. Jedynie w dn. 25. III. pobrano krew od prosięcia IX. Wyniki oznaczeń zawiera tabela II.

W 12 dniu życia krew prosiąt zawiera najmniejszą ilość erytrocytów i hemoglobiny. Szybki wzrost ilości erytrocytów i hemoglobiny zaznacza się w 21 i 30 dniu życia prosiąt. W okresie tym średnie ilości leukocytów utrzymują się prawie na jednakowym poziomie, wykazując w dalszych oznaczeniach bardziej rozległą zmienność. Z wiekiem prosiąt znacznemu zwiększeniu ulega odsetek limfocytów w porównaniu do neutrocytów.

WNIOSKI

Zbieżność czasowa zmian w ilości erytrocytów i hemoglobiny z pojawieniem się wolnego kwasu solnego w soku żołądkowym przypada w czasie wyrównania spadku erytrocytów i hemoglobiny, tj. w 3 dekadzie życia prosiąt. Jednak przedwczesne pojawienie się wolnego kwasu solnego w soku żołądkowym pod wpływem histaminy świadczy o zdolności wydzielania kwasu solnego przez gruczoły żołądkowe w świetle wyników przytoczonych doświadczeń oraz doświadczeń wykonanych w Zakładzie Fizjologii Zwierząt SGGW przez H. Hoffman, achlorhydrię wzrostową można uważać za skutek zachwiania równowagi układu krwiotwórczego, bądź równowagi aminokwasowej. Wyrównanie ilości erytrocytów i hemoglobiny przypada na okres pełnowartościowej czynności gruczołów żołądkowych. Natomiast stwierdzenie zachwiania i wyrównania w tym okresie równowagi aminokwasów wymaga dalszych badań, które są w toku.

I a I b

zawiera natężenie barw (cyfry arabskie)
wiadającej numerom badanych prosiąt
dniu ich życia

Glutamina	Gluko- zamina	Tyrozyna	Kwas L- α amino masłowy	Prolina	Hydroksy- prolina	Cytrulina	Peptyd	Kwas γ amino masłowy	Niewyjaśnio- nego pocho- dzenia plamy
7,7,6,6	2,—,—,—	5,4,3,4	—,—,—,—	2,3,2,5	1,+,,+,1	—,—,—,—	1,1,1,1	—,—,—,—	1,—,3,1
4,6,5	3, 4, 4	3,4,4	—,—,—,—	2,4,4	+,+,1	—,—,—,—	—,1,2	—,—,+	—,2,2
6,7,7,6	2,—, 1, 3	3,3,4,4	1,+, 2, 1	3,2,3,3	3,+,1,1	—,+,+,—	1,1,2,1	—,—,—,—	—,+,1,1
6,6,6,8	4, 5, 4, 4	3,3,3,3	—,—,—,—	3,2,3,3	+,1,1,2	—,+,—,+	1,—,2,2	—,—,—,—	2,3,2,—
6,5,6	2, 4, 4	2,4,4	1,+, 1	4,3,3	1,1,1	—,—,—	+,+,1	—,—,—	+,—,2
6,8,6,8	—, 5, 3, 4	3,4,3,3	1, 1,—,2,	2,3,3,3	1,1,1,1	—,+,—,—	1,2,1,1	—,—,—,—	2,2,2,2
6,7,7,5	4, 4, 3,—	2,4,4,3	—,—,—	2,2,2,2	1,1,+,+	—,—,—,—	2,1,2,2	—,—,—,—	2,3,3,1

B. Г у т о в с к и

ИССЛЕДОВАНИЕ СВОБОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ В СЫВОРОТКЕ
И КРОВЯНЫХ ТЕЛЕЦ И ГЕМОГЛОБИНА КРОВИ ПОРОСЯТ В ПЕРИОДЕ
ВОЗРАСТНОЙ АХЛОРГИДИИ

B. G u t o w s k i

OBSERVATIONS ON FREE AMINOACIDS IN THE SERUM AND OBSERVATIONS
ON BLOOD CORPUSCLES AND HEMOGLOBIN IN YOUNG PIGS DURING
GROWTH ACHLORHYDRIA

PIŚMIENNICTWO

1. Baldwin B.: Dynamic aspects of biochemistry, 1957. — 2. Bieguszewski H., Chudy J., Iwańska St.: Acta Physiol. Pol., 8, 3—3a, s. 282. — 3. Blaut-Opieńska J.: Chromatografia, Warszawa 1957. — 4. Hais I. M., Macek K.: Papirowa chromatografie, Praha, 1954. — 5. Hoffman H.: Acta Physiol. Pol., 1957, VIII. 3—3a, s. 355. — 6. Kwaśnicka A. W.: Fizjologia trawienia u świń, Moskwa 1951. — 7. Lederer E., Lederer M.: Chromatography, 1957. — 8. Subramanian N. i współ.: J. Sci. Ind. Res. B. India, 1955, 14, s. 566.

Otrzymano dnia: 10. VII. 1958 r.

Tabela II

Oznaczenia krwinek i hemoglobiny u prosiąt doświadczalnych

Data badania krwi	25. III. 58	3. IV. 58	12. IV. 58	22. IV. 58	6. V. 58	13. V. 58	30. V. 58
Wiek prosiąt	12 dni	21 dni	30 dni	40 dni	54 dni	61 dni	78 dni
Numery prosiąt	Nr II, IV, V, VI, VIII	Nr I, III, VII	Nr II, V, VI, VIII	Nr I, III, IV, X	Nr II, V, VIII	Nr I, IV, VII, X	Nr I, IV, V, VIII
Średnia ilość erytrocytów w milionach	4,26	5,5	6,92	7,27	7,86	7,42	7,82
Minimalna i maksymalna ilość erytrocytów	4,1—4,5	5,3—5,8	6,6—7,3	7,1—7,6	7,5—8,2	7,1—8,0	7,5—8,0
Ilość hemoglobiny oznaczona elektrometrycznie w gramoprocenciech	5,41	9,74	9,86	10,52	10,47	11,38	11,7
Średnia ilość leukocytów w tysiącach w 1mm ³	10,82	11,93	8,55	23,7	13,56	12,87	20,1
Odszetek poszczególnych form białych krwinek i erytroblastów							
Średnia ilość leukocytów w tysiącach 1 mm ³	10,82	11,93	8,55	23,7	13,56	12,87	20,1
Średnia ilość neutrofilów pałczkowatych	1,4	2,0	14,75	3,5	1,66	1,5	1,0
Średnia ilość neutrafilów segmentowanych	19,8	25,33	43,75	25,25	22,6	15,2	16,5
Ogólna ilość neutrofilów	21,2	27,33	58,50	28,75	24,3	16,75	17,5
Średnia ilość eozynofilów pałczkowatych	0,6	0,33	—	2,0	2,33	1,0	0,5
Średnia ilość eozynofilów segmentowanych	—	0,33	0,33	1,5	0,66	0,75	1,25
Ogólna ilość eozynofilów	0,6	0,66	0,33	3,5	3,0	1,75	1,75
Średnia ilość bazofilów	—	—	—	1,0	0,66	0,25	0,25
Średnia ilość limfocytów	74,2	66,33	38,0	63,0	68,3	79,5	78,5
Średnia ilość monocytów	3,2	5,66	3,25	3,75	3,66	1,75	2,0
Średnia ilość erytroblastów na 100 leukocytów	6,2	14,66	2,5	0,25	—	1,0	—