

## BADANIA NAD ROLĄ I UDZIAŁEM HISTAMINY W PATOGENEZIE KOLIENTEROTOKSEMII PROSIĄT

### CZEŚĆ II. WPŁYW FRAKCJI LIPOWIELOCUKROWEJ (FLW) PAŁECZEK OKRĘŻNICY NA POZIOM HISTAMINY WE KRWI PROSIĄT

T A D E U S Z   J A N I A K ,   L E O P O L D   U G O R S K I ,   A N D R Z E J   Z A L E S I Ń S K I

Zakład Diagnostyki Chorób Wewnętrznych WSR — Wrocław

Kierownik: doc. dr T. Janiak

Katedra Chorób Wewnętrznych WSR — Wrocław

Kierownik: prof. dr B. Gancarz

Zakład Higieny Weterynaryjnej we Wrocławiu

Kierownik: dr L. Ugorski

Za punkt wyjścia dla poniższych badań przyjęto wyniki prac Hinshaw'a i wsp. nad rolą histaminy we wstrząsie endotoksycznym i pracy Greisman'a nad aktywacją czynnika uwalniającego histaminę przez endotoksyny *E. coli*.

Hinshaw i wsp. stwierdzili, że dożylna iniekcja psom letalnej dawki endotoksyny pał. okrężnicy (2 mg/kg, w.c.) wywołuje wstrząs typu anafilaktoidalnego, przebiegający z uwolnieniem się histaminy z jej endogennych połączeń, przy czym narastające stężenie histaminy prowadzi do wstrząsu septycznego (toksycznego). Powyższe dane potwierdzają tym samym hipotezę Schayer'a uwzględniającą możliwość uczestniczenia histaminy w tego rodzaju szoku.

Zróznicowanie kliniczne zmian toksycznych od alergicznych następuje poważne trudności z powodu braku odpowiednich testów diagnostycznych (test histaminopeksji niekiedy zawodzi). Tym niemniej czynnik toksyczny w przeciwieństwie do alergenu różni się tym, że działa dopiero w większych stężeniach i wywołuje odczyn już po pierwszym zadziałaniu (Rosenberg 1960).

Greisman (1960) wykazał, że frakcja lipowielocukrowa pałeczek okrężnicy dodana *in vitro* do świeżo heparynizowanego osocza zdolna jest aktywować czynnik uwalniający histaminę w przeciągu kilku se-

kund. Otrzymane przez Greismana tą drogą wyniki sugerują, że działanie frakcji lipowielocukrowej *E. coli* jest adekwatne do działania innych wielkocząsteczkowych polisacharydów oraz usprawiedliwiają hipotezę, że aktywacja czynników uwalniających histaminę może się zdarzyć w pewnych określonych stanach patofizjologicznych charakterystycznych dla reakcji na endotoksynę.

Jak podano w części I pracy uwalnianie histaminy z jej endogennych połączeń dokonuje się na drodze rozbicia lub rozszczepienia wiązań utrzymujących ją w obrębie komórek bez ich uszkodzenia, względnie uszkodzenia struktury komórkowej do zniszczenia samej komórki włącznie.

W ostatnim przypadku wraz z histaminą uwalniają się również i inne mediatory komórkowe jak serotonina, bradykinina, acetylocholina, heparyna, SRS-A. Sprawcami tych zjawisk mogą być tak wielkocząsteczkowe liberatory histaminy, jak i czynniki uszkodzające tkanki wskutek niedotlenienia, lub martwicy. Szczęólnego znaczenia wśród w/w czynników nabierają zakażenia bakteryjne, a wśród nich zakażenia wywołane pał. okrężnicy, powodujące dodatkowo wzmożoną biosyntezę histaminy przez bakteryjne dekarboksylazy histydyny. Dodatkowym jeszcze przy tym źródłem histaminy może być jej biosynteza poprzez komórkowe dekarboksylazy histydyny.

Z punktu widzenia naszych zainteresowań szczególnego znaczenia dla naszych rozważań nabierają wykonane przez Hinshaw'a i wsp. badania porównawcze nad wpływem histaminy, liberatora 48/80 oraz endotoksyny *E. coli* na efekt hemodynamiczny u psów.

Autorzy we wszystkich trzech przypadkach rejestrowali: wczesny wzrost ciśnienia krwi w żyłę wrotnej współistniejący ze zmniejszeniem nawrotu żylnego, gwałtowny spadek ciśnienia tętniczego krwi oraz wzrost wartości hematokrytu.

Szybkość występowania powyższych objawów po endotoksynie i liberatorze 48/80 podobnie jak to miało miejsce po histaminie wskazuje na wspólny mechanizm działania tych związków. Fakty te przemawiają na korzyść sugestii o uwalnianiu się histaminy w endotoksycznym szoku.

Założeniem niniejszej pracy było prześledzenie dynamiki uwalniania się histaminy endogennej pod wpływem FLW pał. okrężnicy w różnych warunkach eksperymentu.

## BADANIA WŁASNE

Do badań użyto 14 prosiąt w wieku od 7—9 tygodni życia. Frakcję lipowielocukrową (FLW) otrzymano z betahemolitycznego serotypu

Tabela 1

Nr prosięcia	Dawka FLW i droga podania	Poziom wyjściowy histaminy w gamma %	Minuta pobrania krwi oraz poziom histaminy we krwi pełnej						Ilość płynu przesączonego i poziom histaminy w gamma %		U w a g i
			bezp.	60	90	120	180	240	w jamie brzusznej	w klatce piersiowej	
1	5 ml. dż.	11,0		17,5		27,5					Przeżył
2	20 ml. dż.	56,25	27,5								Padło bezp. po iniekcji Krew do badań pobrano po śmierci (płynna)
3	30 ml. dż.	84,0	47,0		33,0						Padło w 2 dniu po podaniu frakcji lipowielocukrowej
4	30 ml. dż.	52,5									Padło bezp. po podaniu frakcji lipowie-locukrowej
5	45 ml. dż. w czasie 1,5 godz. (5+10+5+5+5+5+5)	23,5					17,0				Padło w 10 minut po ostatniej dawce
6	20 ml. dż. 3-dniowej hodowli E. coli	81,5			39,0	29,5			15 ml. 360,0	10 ml. 94,0	Padło po 7 godz.

Tabela 2

Nr	Dawka i droga podania	Poziom wyjściowy histaminy w gamma %	Minuta lub dzień pobrania krwi oraz poziom histaminy we krwi pełnej						Ilość płynu przesączynowego i histaminy w gamma %		Uwagi		
			60	90	120	180	240	360	3 dni	30 dni		w jamie brzusznej	w klatce piersiowej
1	5 ml. dm.	38,0	113,0		50,5					42,0			Przeżyło
2	10 ml. dm.	127,0	118,0					73,0				10 ml. 86,25	Padło po 2 godz.
3	15 ml. dm.	132,0	84,0	57,0	34,0							15 ml. 912,0	Padło po 2 godz. prawdopodobnie na skutek embolii w czasie pobierania krwi
4	15 ml. dm.	94,5	46,0						56,5				Ten sam co pod poz. nr 1. Padło w 3 dniu od chwili podania frakcji lipowielocukrowej.
5	15 ml. dm.	120,0		74,0									Padło po 8 godz.
6	25 ml. dm. w czasie 45 min. (10+5+5+5) Po 4,5 godz. 5 ml. dż.	43,0	23,5									30 ml.	Padło po 5 godz.

*E. coli* 0138 : K81(B) na drodze ekstrakcji fenolem i wodą wg metodyki Westphala (1952), LD-50 otrzymanej FLW wyniosło  $10^{-2}$ /ml.

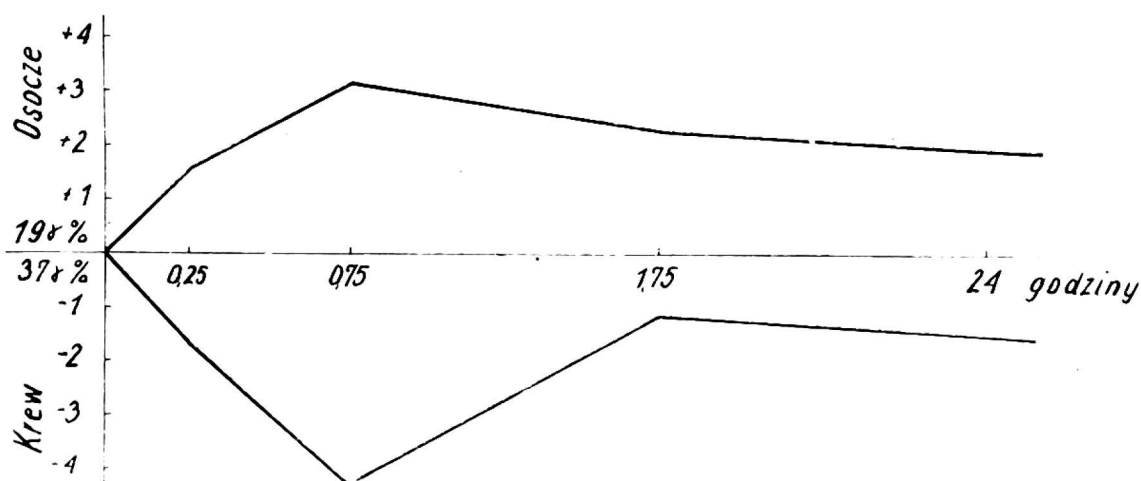
Histaminę oznaczono metodą Code'a na wyizolowanym jelicie świnki morskiej.

FLW wprowadzono 6 prosiętom domięśniowo, 5 innym dożylnie. Jedno prosię zamiast FLW otrzymało dożylnie zawiesinę serotypu 0138 w ilości 20 ml (gęstość  $10^9$  drobnoustrojów w 1 ml).

Szczegółowe parametry dotyczące ilości podanej FLW poszczególnym prosiętom oraz czasu pobierania krwi dla dokonania pomiarów jak i uzyskane wyniki zestawiono w tabelach 1 i 2.

Na dwu prosiętach przeprowadzono nadto pomiary poziomu histaminy we krwi pełnej i osoczu, raz po dożylnym, drugi po domięśniowym wprowadzeniu FLW — nanosząc uzyskane wyniki na rys. 1 i 2.

U prosiąt, u których po zejściu śmiertelnym na sekcji stwierdzono przesieki do jam ciała, pobrano płyn i oznaczono w nim poziom histaminy (tab. 1 i 2).

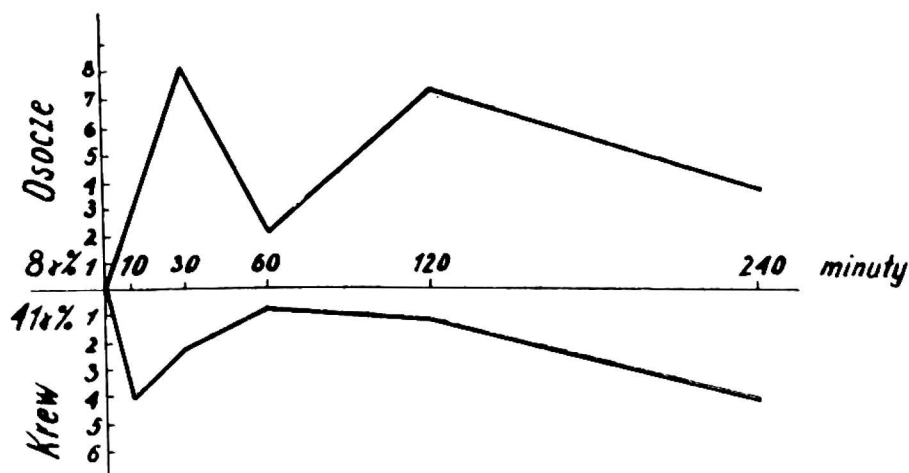


Rys. 1. Poziom histaminy wolnej w krwi pełnej i w osoczu po domięśniowym podaniu 10 ml frakcji lipowielocukrowej. Cyfry na osi rzędnych oznaczają wielokrotność stężenia histaminy w stosunku do wartości wyjściowych + oznacza wzrost stężenia — oznacza spadek stężenia

Z analizy przedstawionego materiału wynika, że niezależnie od drogi podania po dawkach 5 ml FLW poziom histaminy we krwi pełnej stopniowo rośnie do około 2 godz. od chwili iniekcji.

Po dawce 10 ml FLW efekty mogą być różne, tzn. może nastąpić wzrost względnie spadek poziomu histaminy we krwi.

Po wyższych ilościach FLW (15 ml) poziom histaminy we krwi pełnej gwałtownie spada. W dwu przypadkach poziom histaminy oznaczony prawie bezpośrednio po dożylnym podaniu FLW obniżył się o około



Rys. 2. Poziom histaminy wolnej w krwi pełnej i w osoczu po dożylnym podaniu 10 ml frakcji lipowielocukrowej. Cyfry na osi rzędnych oznaczają wielokrotność stężenia histaminy w stosunku do wartości wyjściowych + oznacza wzrost stężenia — oznacza spadek stężenia

50%. To samo zjawisko o nieco mniejszym natężeniu stwierdza się po domięśniowym wprowadzeniu FLW.

Analiza wyników równoczesnego oznaczania histaminy we krwi pełnej i w osoczu po dożylnym i domięśniowym podaniu FLW wykazała gwałtowny spadek poziomu histaminy we krwi pełnej z równoczesnym wzrostem poziomu w osoczu. W płynie przesączynowym pobranym z jamy brzusznej wykazano bardzo duże ilości histaminy.

Obraz zmian anatomopatologicznych u prosiąt padłych po parenteralnym podaniu FLW w przeważającej ilości przypadków ograniczał się do obrzęku powiek, przekrwienia płuc, nacieczenia krezki i ścian jelit, obecności płynu przesączynowego w jamach ciała.

## OMÓWIENIE WYNIKÓW

Analizując otrzymane wyniki można stwierdzić, że zachowanie się poziomów histaminy we krwi prosiąt po parenteralnym podaniu FLW uzależnione jest od wielkości dawek wymienionego sympleksu.

Dawki określone przez nas jako tzw. małe (do 10 ml) powodują w krótkim czasie po ich podaniu wzrost poziomu histaminy we krwi, tzw. duże (od 10 ml wzwyż) gwałtowny jej spadek.

Wydaje się, że rejestrowane przez nas w pierwszym przypadku wyższe stężenia histaminy we krwi pełnej należy łączyć prawdopodobnie z towarzyszącą temu zjawisku leukocytozą (neutrofilia) — normalnym responsem na zadziałanie czynnika toksycznego.

Spadek stężenia histaminy we krwi pełnej po dużych dawkach FLW wydaje się być następstwem rozpadu komórkowych transporterów histaminy i przejściem do osocza, w którym stwierdzono znaczny jej wzrost.

Obecność płynu przesączynowego w jamach ciała znajduje swoje pełne wytłumaczenie w obniżającym oporność kapilarów wpływie histaminy.

Zgodnie z wynikami szeregu autorów w osoczu krwi ludzkiej znajdują się jedynie ślady histaminy. U świni ilość histaminy osoczowej waha się w granicach 8—18  $\gamma$ ‰. Ilości oznaczone w osoczu pochodzą z uwolnienia histaminy z jej połączeń z aminokwasami i białkami, z którymi wiąże się przy pomocy połączeń peptydowych. Wiązanie między grupą  $\text{NH}_2$  histaminy a grupą  $\text{COOH}$  aminokwasów ma być silniejsze niż z białkami. Niektórzy z autorów przyjmują także istnienie systemu enzymatycznego katalizującego wymianę grupy amidowej glutaminy z histaminą, serotoniną i putrestyną.

W cytoplazmie komórkowej histamina jest wiązana przez kwasy nukleinowe, zwłaszcza RNA oraz kwaśne połączenia fosforowe. Wśród nich szczególną rolę odgrywa ATP z uwagi na możliwość łączenia się z histaminą w środowisku obojętnym jak i zasadowym. Histamina wreszcie jest magazynowana śródkomórkowo zwłaszcza w mitochondriach i zasadowych ziarnistościach cytoplazmy. Najwięcej histaminy zawierają komórki tuczne w połączeniu z heparyną. Pewne ilości histaminy zawarte są także w granulocytach obojętnochłonnych, kwasochłonnych i płytkach krwi.

Stwierdzona przez nas zwyżka poziomu histaminy w osoczu nie wyjaśnia jednak w pełni deficytu jej we krwi pełnej. Nie tłumaczy go także przejście histaminy do płynu przesączynowego. Gdyby bowiem całą ilość krwi u badanych prosiąt przyjąć arbitralnie za 1 litr, to np. u prosięcia nr 3 wyjściowa ilość histaminy we krwi pełnej wyniosła 1320  $\gamma$ , bezpośrednio przed zejściem śmiertelnym stwierdzono ubytek 980  $\gamma$  (1320—340). Ponieważ w 15 ml płynu przesączynowego w jamie brzusznej wykazano 136,8  $\gamma$  histaminy, deficyt wynosi jeszcze 843,2  $\gamma$ . Ilość ta uległa prawdopodobnie częściowo detoksykacji (tj. tlenowej dezaminacji i metylacji), częściowo zaś została wydalona z moczem. Należy także przyjąć, że pewna ilość przeszła do tkanek (tzw. nacieczenia tkankowego).

W sumie otrzymane przez nas wyniki upoważniają do stwierdzenia, że FLW uwalnia histaminę z jej endogennych połączeń poprzez uszkodzenie względnie zniszczenie struktury komórkowej.

W obecnej fazie prowadzonych przez nas badań nie jesteśmy w stanie jednak odpowiedzieć na pytanie, czy przyczyną nacieczenia tkanko-

wego jest bezpośrednio uszkodzenie kapilarów przez FLW czy też pośrednio poprzez uwolnienie histaminy endogennej.

Opierając się jednak na pracach Hinshawa i wsp. należy przyjąć bezpośredni udział histaminy w procesie wzmożonej przepuszczalności naczyń (kapilarów).

Ponieważ uwalnianie się histaminy i pełny rozwój jej aktywności biologicznej ma charakter eksplozujący, wstrząsowy przebieg kolienterotoksemii prosiat może w przedstawionych przez nas badaniach znaleźć również swoje racje.

### WNIOSKI

1. Małe dawki FLW (do 10 ml) podane dożylnie lub domięśniowo powodują wzrost poziomu histaminy we krwi.
2. Duże dawki FLW (powyżej 10 ml) obniżają poziom histaminy we krwi pełnej i powodują wzrost jej poziomu w osoczu krwi.
3. Po dużych dawkach FLW podanych dożylnie, spadek poziomu histaminy następuje bezpośrednio po podaniu.
4. FLW powoduje uszkodzenie struktury komórek i uwolnienie histaminy z jej endogennych połączeń.
5. Zmniejszenie oporności kapilarów jest następstwem działania histaminy.
6. Stężenie histaminy w płynie przesączynowym pobranym z jamy brzusznej przekracza około 10-krotnie stężenie jej we krwi.