

## EFEKTI ASKORBINSKE KISELINE NA BLASTNU TRANSFORMACIJU LIMFOCITA

*Voja Pavlović\*, Zoran Pavlović\*\* i Zorica Antić\*\*\**

Proučavan je uticaj askorbinske kiseline na intenzitet blastne transformacije limfocita indukovane Con-A i LPS mitogenima. Za oglede su korišćeni limfociti slezine C3H/HEJ miševa. Čelije su izlagane delovanju različitih koncentracija askorbinske kiseline, a proces sinteze DNK meren je kratkotrajnim obeležavanjem kulture tritiliranim timidinom (<sup>3</sup>H-TdR) nukleozidom, koji se ugrađuje u novostvorenu DNK. Količina ugrađenog <sup>3</sup>H-TdR određivana je scintilacijskim merenjem u tekucem scintilacijskom beta brojaču.

Dobijeni rezultati pokazuju da askorbinska kiselina pokazuje stimulatívno delovanje na blastnu transformaciju limfocita u doziod 0,075 do 0,175 gama/2,5x10<sup>5</sup> čelija. Sa progresivnim povećanjem doze askorbinske kiseline, progresívno raste inhibitorni efekat askorbinske kiseline na intenzitet blastne transformacije limfocita. Askorbinska kiselina pokazuje snažnije delovanje na T, nego na B limfocite. Ovi rezultati sugeriraju na zaključak da askorbinska kiselina ima značajan uticaj na intenzitet mitogenima stimulísane limfocitne aktivnosti. *Acta Medica Scandinavica* 2003; 42 (3): 5-8.

*Ključne reči: askorbinska kiselina, blastna transformacija limfocita*

Institut za fiziologiju Medicinskog fakulteta u Nišu\*  
Hematološka klinika Kliničkog centra u Nišu\*\*  
Medicinski fakultet u Nišu\*\*\*

*Kontakt.* Voja Pavlović  
Institut za fiziologiju Medicinskog fakulteta  
Braće Tasković 81,18000 Niš, Srbija i Crna Gora  
Tel.: 018/334-221, e-mail: vojapav@yahoo.com

### Uvod

Poznato je da askorbinska kiselina igra značajnu ulogu u odvijanju procesa celularne i humoralne imunosti u organizmu. Tokom poslednjih nekoliko decenija XX veka u medicinskoj literaturi aglomeriralo se obilje podataka, eksperimentalnih i kliničkih studija, o korisnim efektima visokih doza askorbinske kiseline u sprečavanju razvoja respiratornih infekcija (1), kao i o porastu vremena preživljavanja bolesnika u terminalnoj fazi malignih oboljenja (2, 3). Takođe, postoje mnogobrojni podaci o ulozi askorbinske kiseline u sintezi adrenalnih steroida, kao i o uticaju vitamina C na regulaciju odbrambene funkcije imunog sistema. Danas je poznato da se pod dejstvom vitamina C povećava motilitet normalnih neutrofila i monocita (4), stimuliše aktivnost heksozomonofosfatnog Santa (5), stimuliše antimikrobna aktivnost u čelijama *in vitro* (6) i inhibira mijeloperoksidazom posredovana joinacija ingestiranih proteina (7). Askorbinska kiselina je neophodna za diferentovanje limfoidnih organa u toku rasta i regeneracije limfoidnog tkiva posle X-zračenja (8), kao i za stimulaciju produkcije antitela (9), sintezu CI komponentu komplekta (10) i sintezu interferona (11).

Rezultati dosadašnjih kliničkih i eksperimentalnih istraživanja efekata askorbinske kiseline na aktivnost limfocita su dosta kontradiktorni. Yonemoto (12) i Anderson (13) su pokazali da peroralni unos askorbinske kiseline dovodi do porasta intenziteta blastne transformacije limfocita na stimulaciju mitogenima (LPS i Con-A). Slične rezultate saopštili su i Siegel i Morton (14). Međutim, Nungester i sar. (15) su pokazali da velike doze askorbinske kiseline inhibišu blastnu transformaciju limfocita pod dejstvom fitohemaglutinina.

### Cilj rada

Imajući u vidu ove literaturne podatke pokušali smo u ovom radu da proučimo efekat različitih doza askorbinske kiseline na blastnu transformaciju limfocita, pod dejstvom konkalina (Con-A) i lipopolisaharida (LPS).

### Materijal i metod rada

Za oglede smo koristili C3H/HEJ miševе, muškog pola, starih 6 do 7 nedelja, prosečne telesne mase od 20 do 30 g na početku eksperimenta. Miševi su bili u grupama od 4 do 5 u jednom kavezu. Bili su na uobičajenoj ishrani i živeli pod laboratorijskim uslovima.

### Izdvajanje limfocita

Za eksperimente smo koristili limfocitne slezine. Zivotinje smo mehanički žrtvovali, a izvadene slezine

macerirali, ispirali PBS-om (Dulbeck). Dobijeni rastvor centrifugirali smo 10 minuta na 3.000 g. Supernatant je dekantiran, a ćelije su resuspendovane u RPMI-1640 (Grand Island Co. NY) tako da bi se dobilo 4.000.000 ćelija/ml (Stock). Od ovoga stoka pripremano je razblaženje u RPMI-1640 (1:8). Na taj način dobijana je koncentracija mononuklearnih ćelija od  $2.5 \times 10^5$  ćelija/ml medijuma obogaćenog BCS (Bovine Calf Serum, Biologic. Lab. Rocviller, Md). Za mikrokulture limfocita koristili smo sterilne, specijalne plastične mikrotube za kulture tkiva (10x75 mm, Falcon).

U svaku epruvetu dodavano je po  $2,5 \times 10^5$  limfocita i po 10 mikrolitara RPMI 1640 medijuma. Sve kulture su rađene u triplikatu.

Kulture su bile podeljene u tri grupe:

Prvoj grupi, ovako pripremljenih kultura limfocita, dodavali smo po 10 fig medijuma. Nije dodavan mitogen. Ona je služila kao kontrola (grupa A).

Drugoj grupi kultura dodavali smo po 5 ug Con-A (National Biochemical Corp., Cliveland, Ohio). Bile su to kulture grupe B.

Trećoj grupi dodavali smo po 2,5 ug LPS (lipopolisaharid, Escherichia coli, National Biochemical Corp, Cliveland, Ohio, USA). Bile su to kulture grupe C.

Kulturama grupa B i C dodavana je različita koncentracija askorbinske kiseline: 0,05; 0,1; 0,5; 1,0; 10,0 i 100,0 gama. Kulture su inkubirane u atmosferi sa 5% CO<sub>2</sub> na temperaturi od 37°C u toku 72 h. Sest sali pre kraja inkubacije svakoj kulturi smo dodavali po 2 (aCi tritilirano) timidina (H-TdR, New England Nuclear). Kulture su potom prane na +4°C, jednom u 2,5 ml DPBS, a potom tretirane dva puta u 2,5 ml 5% trihlorsircetnoj kiseline (Bacer). Precipitati trihlorsircetne kiseline su potom rastvarani u 1,0 ml N NaOH, u toku 20 minuta na 37°C, neutralizirani sa 0,1 ml 2 N HCl. Sest sati nakon tretmana trihlorsircetnom kiselinom i NaOH, određivana je količina ugrađenog H-TdR scintilacijskim merenjem u tekućem scintilacijskom beta brojaču LKB-1219 (Rachbeta, Finland). Ugradnja radioaktivno obeleženog H-TdR prikazana je kao vrednost impulsa u minuti (cpm-counter per minute). Dobijene srednje vrednosti stimulacije triplikatnih uzoraka, za svaku kulturu, su sabirani, a dobijeni rezultati

su prikazani kao srednje vrednosti impulsima stimulacije u minuti.

Od rezultata cpm, dobijenih za stimulisane kulture, oduzimani su rezultati dobijeni za nestimulisane kulture, i tako dobijeni odnos je označavan kao indeks stimulacije.

### Nasi rezultati

Kulture iz slezina dobijenih limfocita podeljene su u tri grupe: A, B i C. Limfociti kultura grupe A nisu dobijali stimulaciju mitogenima, limfociti kultura grupe B dobijale su stimulaciju mitogenom Con-A, a limfociti kultura grupe C bile su stimulisane mitogenom LPS. Sve kulture su bile u triplikatu. Kulture grupa B i C dodatno su dobijale različite koncentracije askorbinske kiseline.

Dobijeni rezultati kultura stimulisanih mitogenom Con-A i dodvanih različitih koncentracija askorbinske kiseline prikazani su na tabeli 1.

Iz tabele se vidi da doza askorbinske kiseline od 0,05 gama askorbinske kiseline pokazuje manju stimulaciju od Con-A, dok najsnažniju stimulaciju blastne transformacije limfocita pokazuje doza od 0,1 gama askorbinske kiseline. Međutim, sa daljim povećanjem doze askorbinske kiseline nastaje postepeno opadanje intenziteta blastne transformacije limfocita. Ovaj efekat askorbinske kiseline još bolje se zapaža na sledećem grafikonu (grafikon 1).

Slični rezultati su dobijeni i pri dodavanju mitogena LPS i askorbinske kiseline (tabela 2 i grafikon 2).

Sa gornje tabele zapaža se da najjaču stimulaciju izaziva dodavanje askorbinske kiseline u dozi od 0,1 gama po kulturi. Sa porastom doze dodavane askorbinske kiseline progresivno opada intenzitet stimulacije blastne transformacije limfocita.

### Diskusija

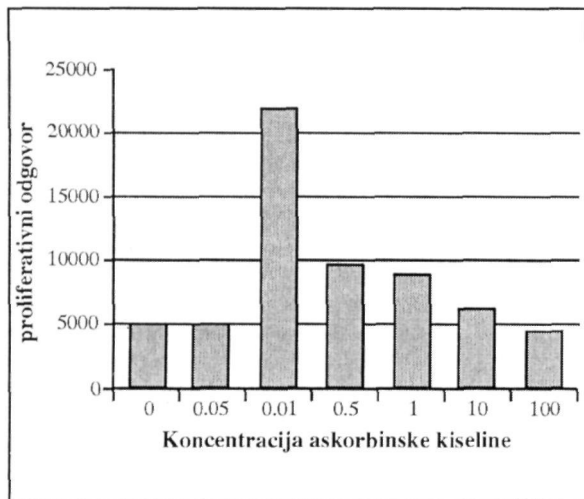
U medicinskoj literaturi aglomerirano je mnoštvo, često puta, kontradiktornih podataka o uticaju askorbinske kiseline na blastnu transformaciju limfo-

Tabela 1. Efekat askorbinske kiseline i Con-A na blastnu transformaciju limfocita (index stimulacije)

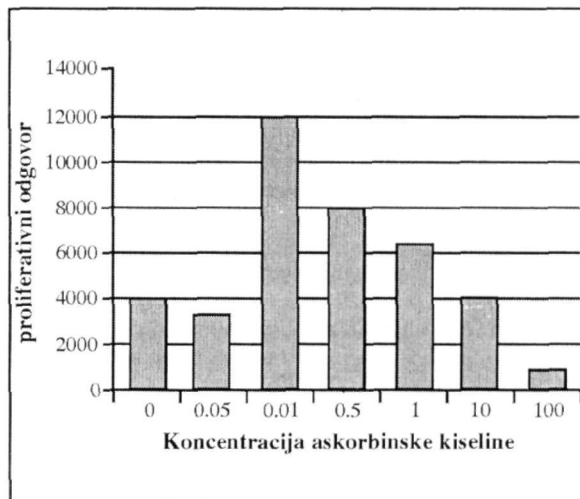
Con-A (ug)	5	5	5	5	5	5	5
Askorb. kis. (gama)	0	0.05	0.1	0.5	1.0	10	100
Sred. vr.	5312	5000	23125	9500	8750	6750	4375
SD	1159	1192	7312	1319	2390	1991	276

Tabela 2. Efekat askorbinske kiseline i LPS na blastnu transformaciju limfocita (index stimulacije)

LPS (ug)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Askorb. kis. (gama)	0	0.05	0.1	0.5	1.0	10	100
Sred. vr.	4000	3200	12000	8200	6600	6000	800
SD	1275	352	3752	2492	1075	2090	74



Grafikon 1. Efekat askorbinske kiseline i Con-A na blastnu transformaciju limfocita



Grafikon 2. Efekat askorbinske kiseline i LPS-a na blastnu transformaciju limfocita

cita. Neki autori su ukazali na činjenicu da askorbinska kiselina stimuliše mitogenima indukovanu blastnu transformaciju limfocita periferne krvi (16, 10, 13) i limfocita slezine miša (11), dok druga grupa istraživača ukazuje na suprotne efekte. Naime, ovi autori ukazuju da dijetetske količine askorbinske kiseline menjaju efekte askorbinske kiseline na blastnu transformaciju T limfocita, indukovanu mitogenima (8) i limfocitima zamoraca. Rezultati dobijeni u toku *in vitro* eksperimenata takođe su kontradiktorni. Prema nekim autorima askorbinska kiselina stimuliše blastnu transformaciju limfocita periferne krvi (16, 17, 18, 19), dok druga grupa autora ukazuje na inhibitorni uticaj askorbinske kiseline na blastnu transformaciju (15).

Rezultati našeg rada pokazuju da doza askorbinske kiseline od 0,05  $\gamma$ /2,5x10<sup>5</sup> ćelija, ima manji intenzitet blastne transformacije limfocita nego što je intenzitet blastne transformacije samo sa Con-A. Međutim, sa porastom doze aplikovane askorbinske kiseline raste i intenzitet mitogenima indukovane blastne transformacije limfocita. Najveći intenzitet askorbinske kiseline/2,5x10<sup>5</sup> limfocitnih ćelija. Daljim povećanjem doze aplikovane askorbinske kiseline nastaje progresivno opadanje intenziteta blastne transformacije limfocita. Primena najveće doze askorbinske kiseline (100  $\gamma$ ) praćena je najnižim intenzitetom blastne transformacije.

Izgleda da askorbinska kiselina u dozi od 0,075 do 1,175  $\gamma$  značajno povećava intenzitet blastne transformacije T i B limfocita, stimulisanih mitogenima Con-A i LPS. Međutim, veće doze askorbinske kiseline inhibiraju inkorporaciju H<sup>3</sup> timidina od strane T i B limfocita. Najveća doza primenjene askorbinske kiseline praćena je najnižim intenzitetom blastne transformacije.

Ovi rezultati su u skladu sa nalazima Panush-a i sar. (17), koji su zapazili da askorbinska kiselina, u dozi

od 5-15  $\mu$ g/ml, stimuliše inkorporaciju H<sup>3</sup> timidina od strane humanih limfocita, dok porast doze askorbinske kiseline (više od 15  $\mu$ g/ml) inhibira blastnu transformaciju. Takođe su u skladu i sa nalazima Siegel-a i Morton-a (14) koji su ukazali da askorbinska kiselina povećava sintezu DNA u T limfocitima slezine, kod pacova koji su hranjeni hranom bogatom askorbinskom kiselinom.

Rezultati dobijeni stimulacijom blastne transformacije limfocita mitogenima pokazuju snažnu stimulaciju T limfocitne populacije u odnosu na blastnu transformaciju B limfocitne populacije. Najjači stepen blastne transformacije, kako T tako i B limfocitne populacije, pokazuje koncentracija askorbata od 0,075 do 1,175  $\gamma$ /2,5x10<sup>5</sup> ćelija. Porast koncentracije askorbinske kiseline progresivno inhibiše blastnu transformaciju T i B limfocita.

#### Zaključak

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti:

Askorbinska kiselina, u dozi od 0,05  $\gamma$ /2,5x10<sup>5</sup> limfocita, ima manji intenzitet blastne transformacije nego što je intenzitet blastne transformacije indukovane samo mitogenom Con-A.

Sa porastom doze askorbinske kiseline raste intenzitet blastne transformacije.

Najveći intenzitet mitogenima indukovane blastne transformacije izaziva aplikacija 0,1  $\gamma$  askorbinske kiseline na 2,5 x 10<sup>5</sup> limfocitnih ćelija.

Sa porastom doze askorbinske kiseline progresivno opada intenzitet mitogenima indukovane blastne transformacije. Najniži intenzitet se zapaža kada je aplikovana najveća koncentracija askorbinske kiseline (100  $\gamma$ ) na 2,5 x 10<sup>5</sup> ćelija.

## Literatura

- Pauling L. Vitamin C the common cold and the flu. *J Am Med Assoc* 1971;216:332-39.
- Cameron E, Pauling L. Supplemental ascorbate in the supportive treatment of cancer: prolongation of survival times in terminal human cancer. *Proc Nat Acad Sci USA* 1976;73:3685-89.
- Cameron E, Pauling L. *Cancer and vitamin C*. Linus Pauling Institute of Science and Medicine: Palo Alto; 1979.
- Siegel B V. Enhancement of interferon production by poly (rI)-poly (rC) in mouse cell cultures by ascorbic acid. *Nature (London)* 1975; 254: 531-5.
- Goetzi EJ, Wasserman SI, Gigli I, Austen KF. Enhancement of random migration and chemotactic response of human leukocytes by ascorbic acid. *J Clin Invest* 1974; 53: 813-8.
- Siegel BV, Morton JJ. Vitamin C and the immune response. *Experientia* 1977; 15; 393-6.
- Anderson R. Effects of ascorbate on normal and abnormal leukocyte functions. *New Clin Appl Immunol., Lipid metabolism and Cancer*, Bern 1982; 23-24.
- Dieter MP. Further studies on the relationship between vitamin C and thymic humoral factor. *Proc Soc Exptl Biol Med* 1971; 136:316-22.
- Miller TE. Killing and lysis of Gram-negative bacteria through the synergistic effect of hydrogen peroxide, ascorbic acid, and lysozyme. *J Bacteriol* 1969; 98: 949-55.
- Panush RS, Delafuente JC, Katz P, Johanson J. Modulation of certain immunologic response by vitamin C. *New Clin. Appl Immun Lip Metabol Cancer*, Bern 1992; 35-42.
- Prinz W, Bortz R, Bragin B, Hersch M. The effect of ascorbic acid supplementation on some parameters of the human immunological defence system. *Inter J vit Nutr Res* 1977;47:248-56.
- Yonemoto RH, Chretien PB, Fehniger TF. Enhanced lymphocyte blastogenesis by oral ascorbic acid. *Proc Am Assoc Cancer Res* 1976; 17: 288-93.
- Yonemoto RH. Vitamin C and immunological response in normal controls and in cancer patients (in Portuguese). *Medico Dialogo* 1979; 2: 23-30.
- Dieter MP, Breitenbach RP. Vitamin C in lymphoid organs of rats and cockerels treated with corticosterone or testosterone. *Proc Soc Exptl Biol Med* 1971; 137: 341-45.
- Fraser RC, Pavlovic S, Kurahara CG, Murata A, Peterson NS, Taylor KB, et al. The effect of variations in vitamin C intake on the cellular immune response of Guinea pigs. *Am J Clin Nutr* 1980; 33: 839-47.
- Feigen GA, Smith BH, Dix CE, Flynn CJ, Peterson NS, Rosenberg LT, et al. Enhancement of antibody production and protection against anaphylaxis by large doses of vitamin C. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1982; 38(2): 313-33.
- Pavlovic Z, Pavlovic S. The influence of ascorbic acid on the level of the complement during the sensitization of Guinea pigs. *Acta medica Medianae*. 1988; 6: 19-33.
- Racek J, Holecek V, Trefil L. Antioxidative properties of ascorbic acid. *Cas Lek Cesk* 2000; 139(19): 583-7.
- Sauberlich HE. Pharmacology of vitamin C. *Annu Rev Nutr* 1994; 14: 371-82.
- De la Fuente M, Ferrandez MD, Burgos MS, Soler A, Prieto A, Miquel J. Immune function in aged women is improved by ingestion of vitamins C and E. *Can J Physiol Pharmacol* 1998; 76(4): 373-80.

## THE EFFECT OF ASCORBIC ACID ON BLAST TRANSFORMATION OF LYMPHOCYTES

*Voja Pavlović, Zoran Pavlović and Zorica Antić*

The impact of ascorbic acid on the intensity of blast transformation of lymphocytes induced by Con-A and LPS mitogens was considered. For the experiments the spleen lymphocytes C3H/HEJ mouse were used. The cells were explored to the impact of different ascorbic acid concentration, and the process of DNA synthesis was measured by frequent marking of <sup>3</sup>H-TdR, which were incorporated into a newly synthesized DNA. The quantity of the incorporated <sup>3</sup>H-TdR was measured by scintillation in the beta counter.

The achieved results show that ascorbic acid exemplifies the stimulative influence on blast transformation lymphocyte in dose from 0,075 to 0,175 gamma/2,5x10<sup>5</sup> cells. With progressive increase of ascorbic acid dosage, the inhibitory effect of ascorbic acid progressively increases. Ascorbic acid shows a stronger effect on T than on B lymphocytes. These results lead to a conclusion that ascorbic acid has an important effect on the intensity of stimulated lymphocyte activity by mitogen. *Acta Medica Medianae* 2003; 42 (3): 5-8.

*Key words: ascorbic acid, blast transformation of lymphocytes*