

UTICAJ Na-ASKORBATA NA OSLOBADANJE HISTAMINA U TOKU ANAFILAKSE

Voja Pavlovic¹ i Zorica Pavlović²

Kod 25 Hartley zamoraca, muškog pola, telesne težine 300 do 400 g, ranije ničim tretiranih, koji su bili na normalnoj ishrani i živeli pod uobičajenim laboratorijskim uslovima izvršena je pasivna imunizacija intraperitonealnom aplikacijom 1,0 ml anti-oval antitelom (2,7 mg proteina/ml). Sve životinje su bile podcijene u dve grupe: kontrolna (10 zamoraca) i eksperimentalna grupa (15 zamoraca). Osamnaest časova nakon pasivne senzibilizacije svi zamorci su mehanički žrtvovani, izvađeni njihovi ileumi i od ileuma napravljeni su snopići, koji su, kod kontrolne grupe, potapani u Tyrod-ov rastvor, a kod životinja eksperimentalne grupe u rastvore različitih koncentracija Na-askorbata (od 10^{-1} M do 10^{-4} M) u Tyrod-ovom rastvoru. Svakom snopiću, kontrolne i eksperimentane grupe, dodavano je po 0,42 mg proteina antigena/10 ml. Posle reagovanja dodatog antigena, sa prethodno fiksiranim antitelima, određivana je količina oslobođenog histamina hemijskom metodom Shorea i sar.

Kod pasivno senzibilisanih zamoraca, primena različitih doza Na-askorbata, dovodi do redukcije oslobađanja histamina pri reakciji antitela i specifičnog antigena. Uzorci tankog creva, tretirani Na-askorbatom, oslobađaju manju količinu histamina na g osušenog tkiva, u odnosu na uzorke osušenog ileuma zamoraca koji nisu tretirani Na-askorbatom. *Acta Medica Medianae* 2004; 43(2): 43-45.

Ključne reči: Na-askorbat, anafilaksa, senzibilizacija, histamin

Institut za fiziologiju Medicinskog fakulteta u Nišu
Dom zdravlja u Nišu²

Kontakt: Voja Pavlovic
Institut za fiziologiju Medicinskog fakulteta
Bulevar Dr Zorana Đinđića 81, 18000 Niš, Srbija i Crna Gora
Tel.: 018/334-221, e-mail: vojapap@yahoo.com

Uvod

Pitanje reakcije antigen-antitelo, kao i oslobađanje medijatora pri alergijskim reakcijama, i danas je interesantan problem savremene medicine za čije rešavanje živo interesovanje pokazuju, kako kliničari, tako i oni lekari koji se bave problemima bazične imunologije. U medicinskoj literaturi postoje mnogobrojni podaci o terapijskim efektima različitih medikamentoznih sredstava kojima se pokušava da se predupredi pojava, ili smanji oslobađanje medijatora, pri reakciji antigen-antitelo. Među ovim supstancama dosta pažnje posvećeno je i delovanju askorbinske kiseline i njenih derivata na tok i ishod anafilaktičkih reakcija (3,8,9).

U želji da se pojasni delovanje askorbinske kiseline, na tok i ishod oslobađanja histamina u toku anafilaktičkih reakcija, preduzeta su ova istraživanja.

Materijal

Životinje

Za oglede su korišćeni normalni Hartley zamorci, muškog pola, telesne težine od 300 do 400 g,

koji ranije nisu bili ničim tretirani, a bili su na normalnoj ishrani i živeli pod uobičajenim laboratorijskim uslovima.

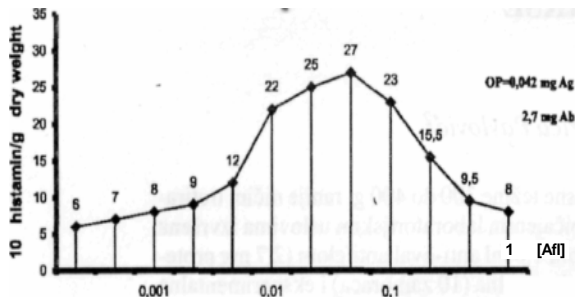
Hemikalije

Sve hemikalije, koje su korišćene u eksperimentu, bile su za analitičku upotrebu (p.a.). Tyrod-ov rastvor je pripreman svakog dana od p.a. hemikalija, a Na-askorbat (USP, Bronson) i askorbinska kiselina (Metheson, Coleman and Bell) bili su komercijalni proizvodi. Antitela za pasivnu imunizaciju zamoraca dobijena su imunizacijom zečeva oval-albuminom (Immun. Gr Parks Daviš).

Metod rada

Na početku oglada kod 12 Hartley zamoraca, intraperitonealnom aplikacijom sa po 1,0 ml anti-oval antitelima, u kojoj količini je bilo po 2,7 mg proteina antitela/ml, izvršena je pasivna imunizacija zamoraca. Osamnaest časova posle pasivnog transfera antitela, zamorci su žrtvovani udarcem u glavu i vađeni njihovi ileumi. Od izvađenih ileuma pravljeni su snopići koji su potapani u organ-kupatila sa Tyrod-ovim rastvorom. U svako organ-kupatilo sa snopićem dodavana je različita koncentracija specifičnog antigena. Za antigen je korišćen ovalbumin pet puta kristaliziran (Povvder, 8111, Nutritional Biochemical Corporation, Cleveland, Ohio). Oslobođeni histamin, iz reakcije antigen-anti-

telo, testiran je hemijskom metodom Shorea i sar.(5). Za svaku ispitivanu koncentraciju antigena urađeno je po tri eksperimenta. Upoređivanje koncentracije dodatnog antigena (mg proteina/ml) sa koncentracijom oslobođenog histamina na gram tkiva dobija se na slici 1.



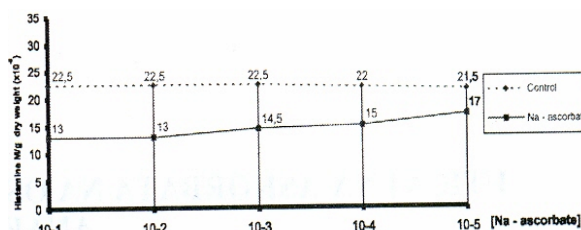
Slika 1. Uticaj koncentracije antigena na oslobađanje histamina pri konstantnoj koncentraciji antitela

Rezultati dobijeni u predeksperimentu pokazuju da pri pasivnom transferu konstantne koncentracije antitela (2,7 mg/ml) i različitim koncentracijama specifičnog antigena, najveća količina histamina oslobađa se pri aplikaciji 0,042 mg/ml specifičnog antigena.

Ekspiriment

Dobijeni rezultati u predeksperimentu korišćeni su u eksperimentu za proučavanje efekata Na-askorbata na oslobađanje histamina u toku reakcije antigen-antitela.

Kod 25 Hartlev zamoraca, muškog pola, telesne težine 300 do 400 g, ranije ničim tretiranih, koji su bili na normalnoj ishrani i živeli pod uobičajenim laboratorijskim uslovima, izvršena je pasivna imunizacija intraperitonealnom aplikacijom 1,0 ml antioval antitelom (2,7 mg proteina/ml). Sve životinje bile su podcijene u dve grupe: kontrolna (10 zamoraca) i eksperimentalna grupa (15 zamoraca). Osamnaest časova nakon pasivne senzibilizacije svi zamorci su žrtvovani udarcem u glavu i potom izvađeni njihovi ileumi. Iz isečenih ileuma napravljeni su snopići od po 8 uzoraka tankog creva i potapani u organ-kupatila. Snopići dobijeni od životinja kontrolne grupe potapani su Tyrodov rastvor, a od životinja eksperimentalne grupe u rastvore različitih koncentracija Na-askorbata (od 10^{-1} M do 10^{-4} M) koji su sveže pripremani u Tyrodov-om rastvoru. Za svaku koncentraciju Na-askorbata urađena su po tri ogleđa. Deset minuta nakon adaptacije snopića u rastvorima dodavana je, svakom snopiću kontrolne i eksperimentalne grupe, po 0,42 mg proteina antigena/10 ml. Posle reagovanja dodatog antigena, sa prethodno fiksiranim antitelima, određivana je količina oslobođenog histamina hemijskom metodom Shorea i sar. (5). Rezultati dobijeni upoređivanjem količine oslobođenog histamina na gram osušenog tkiva ileuma, pri različitim koncentracijama Na-askorbata, prikazani su na slici 2.



Slika 2. Efekat Na-askorbata na oslobađanje histamina

Rezultati, prikazani na gornjem grafikonu, pokazuju da postoji značajna razlika u oslobađanju histamina kod kontrolne i eksperimentalne grupe. Evidentno je slabije oslobađanje histamina u grupi snopića koji su bili tretirani Na-askorbatom, nego u grupi snopića tretiranih samo Tyrod-ovim rastvorom. Najmanja koncentracija histamina oslobođena je pri najvećoj koncentraciji Na-askorbata (10^{-1} M). Sa smanjenjem koncentracije Na-askorbata raste koncentracija oslobođenog histamina.

Diskusija

Mehanizam oslobađanja medijatora u toku anafilakse studiran je mnogim i različitim modelima in vitro, koristeći tkiva aktivno i pasivno senzibilisanih životinja. Još su Dale i Laidwal (2), kao i Schultz (1) dosta davno zapazili da histamin izaziva veoma slične sistemske promene koje se zapažaju i kod anafilakse, kao i da uterus senzibilisanih zamoraca, posle dodira sa specifičnim antigenom, reaguje snažnom kontrakcijom i oslobađanjem histamina (1,2). Kontrakcija glatke muskulature senzibilisanih zamoraca povezana je sa eksplozivnom degranulacijom mastocita i bazofilnih leukocita i oslobađanjem histamina, serotonin, SRS-A, bradikinin i drugih medijatora alergijske reakcije. Količina oslobođenih medijatora, prema Uvnas-u (7) zavisi od stanja membrane granula i elektrolitičkog stanja medijuma. Smatra se da količina oslobođenog histamina iznosi oko 20 mili-mikro-grama/čeliju. Oslobađanje histamina iz šoknog tkiva glatke muskulature je veoma brzo i maksimum dostiže 5 minuta posle challenge-a (7). Međutim, histamin se veoma brzo razgrađuje u dodiru sa seroznim površinama creva, pod dejstvom tkivne histaminaze, koje mogu biti blokirane pomoću raznih hemijskih supstanci (4,6).

Oslobađanje histamina iz granula i njihov ulazak u ekstracelularni medijum usko je zavisano od koncentracije jona Na. Jonska koncentracija Na može da oslobodi, ali i da vrati, histamin u njegove granule (4). S obzirom da količina oslobođenog histamina ima vidnog udela u anafilaktičkoj reakciji i reakciji glatke muskulature na oslobođeni histamin, pitanje blokade tkivne histaminaze i sprečavanja razgradnje oslobođenog histamina bilo je dosta izučavano (3,7,6). Danas je poznato nekoliko supstanci koje imaju svojstvo inhibicije tkivne histaminaze, a među njima je dosta pažnje posvećeno i efektu semikarbazida (4). Ova supstanca, primenjena u dozi od 20 mg/ml, bez efekta je na anafilaktičku reakciju, i nije interferirana sa mnogim

hemijskim procesima. Dodata u toj dozi semikarbazid omogućava uzorku creva da prezivljava u Tyrod-ovom rastvoru dosta dugo. To je i razlog zbog čega smo ga koristili u ovim eksperimentima.

Anafilaktičke reakcije, kao i alergijske reakcije uopšte, su enzimski procesi čije mnogobrojne karike još uvek nisu dovoljno razjašnjene. Kad se tačno otkriju i razjasne enzimski sistemi koji učestvuju, u odigravanju u toku reakcija antigen/antitela, biće moguće da se shvate i kontrolišu za čoveka neprijatne, teške i veoma često po život opasne alergijske manifestacije (8,9).

Zaključak

Kod pasivno senzibilisanih zamoraca, primena različitih doza Na-askorbata, dovodi do redukcije oslobađanja histamina pri reakciji antitela i specifičnog antigena. Uzorci tankog creva, tretirani Na-askorbatom, oslobađaju manju količinu histamina na g osusenog tkiva, u odnosu na uzorke osušenog ileuma zamoraca koji nisu tretirani Na-askorbatom.

Literatura

- Schultz, WH. Physiological Studies in Anaphylaxis. I. The reaction of smooth muscle of the guinea pig sensitized with Horse Serum 1910; 1:549-56.
- Dale HH, Laidlaw I. The Anaphylactic Reaction of Plain Muscle in the Guinea pigs. J Pharmacol and Exper Therap 1910; 4: 167-72.
- Feigen GA, Nielsen CB. Passive sensitization in vitro: Effect of antibody concentration on the lag period and velocity. Science 1966; 154: 767-73.
- Nielsen CB, Feigen GA. Studies on the kinetics of histamine release from normal and sensitised tissues. J Immunol 1962; 88:377-81.
- Shore PA, Bukhalter A, Cohn VH. A Method for the Fluorometric Assay of Histamine in Tissues. J Pharmacol and Exp Therap 1959; 127: 182-90.
- Vurek GG, Prager DJ, Feigen GA. Antibody concentration and temperature as determinants of in vitro sensitization and histamine release in isolated cardiac tissues. J Immunol. 1967; 99: 1243-50
- Uvnas B, Thon LI. Mechanisms of release of Biogenic Amines, Pergamon: Oxford; 1966: 361-76.
- 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: 839-18.
- Feigen GA, Smith BH, Dix CE, Flynn CJ, Peterson NS, Rosenberg LT, et al. Res Commun Chem Pathol Pharmacol 1982; 38: 313-23.

THE EFFECT OF Na-ASCORBATE ON THE HISTAMINE RELEASING DURING THE ANAPHYLAXIS

Voja Pavlovic and Zorica Pavlovic

In the case of 25 male Hartley guinea pigs of initial weight between 300-400 g, not having been treated before, living under the normal laboratory conditions, the passive immunisation was done by intraperitoneal application of 0.1 ml anti-oval antibody (2.7 mg protein/ml). All animals were divided into two groups. The control group (10 guinea pigs) and the experimental group (15 guinea pigs). Eighteen hours after passive sensitisation all guinea pigs were sacrificed; they were hit on the head and their ileums were taken out. Eight samples were made out of those ileums and they were soaked in the bowl. The control groups were soaked in Tyrod's solution, and those belonging to the animals of experimental group in the solutions with different concentrations of Na-ascorbate (from 10^{-1} M to 10^{-4} M) which were ready made in Tyrod's solution. Three experiments were done for each concentration of Na-ascorbate. Ten minutes after the adaptation of the groups in the solution, 0.42 mg of protein antigen/10 ml was added to both control and experimental groups. After the reaction of the added antigen, with previously fixed antibodies, the quantity of the released histamine was established by chemical method of Shore and associates. The results were achieved by comparing the quantity of the released histamine on the dried ileum tissue, due to different concentrations of Na-ascorbate. *Acta Medica Medianae 2004; 43(2):43-45.*

Key words: Na-ascorbate, histamine release antibody, antigen