

UTICAJ CA-ASKORBATA NA PROMENU SENZITIVNOSTI ILEUMA ZAMORACA

Voja Pavlović

Kod normalnih, ranije ničim tretiranih Hartley zamoraca, muškog pola, telesne težine od 250 do 300 g, koji su živeli pod uobičajenim laboratorijskim uslovima, proučavan je efekat različitih koncentracija Ca-askorbata, na promenu senzitivnosti terminalnog dela ileuma, prema histaminu. Primenjene su različite koncentracije Ca-askorbata, od 10^{-6} M do 10^{-1} M, a senzitivnost terminalnog dela ileuma je određivana Schultz-Dale-ovom reakcijom.

Uzorci ileuma tretirani su histaminom 10^{-5} M i dobijena kontrakcija creva služila je kao maksimalan odgovor (100%). Uzorak ileuma je ispiran Tyrode-ovim rastvorom, medijum je zamenjivan različitim koncentracijama Ca-askorbata i, pomoću Schultz-Dale-ove reakcije, određivan je intenzitet kontrakcije ileuma.

Dobijeni rezultati pokazuju da sa porastom koncentracije Ca-askorbata, od 10^{-6} M do 10^{-3} M, postoji blag porast koncentracije histamina, radi dobijanja 50% doze odgovora. Međutim, posle porasta koncentracije Ca-askorbata od 10^{-3} M naglo raste potreba za histaminom, radi dobijanja 50% odgovora, i ona je najveća kada je primenjena koncentracija Ca-askorbata od 10^{-1} M.

Ovi rezultati pokazuju da primena Ca-askorbata smanjuje osetljivost terminalnog dela ileuma prema histaminu. *Acta Medica Medianae 2004; 43 (4): 13–17.*

Ključne reči: Ca-askorbat, vitamin C, askorbinska kiselina, histamin, ileum, senzibilizacija, Schultz-Dale-ova reakcija

Institut za fiziologiju Medicinskog fakulteta u Nišu

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

Uvod

Rezultati dosadašnjih kliničkih i eksperimentalnih istraživanja, o efektima askorbinske kiseline na celularnu i humoralnu imunost organizma, ukazuju na značajnu ulogu ove supstance u modulaciji imunosti (1,2). Tokom ovih istraživanja dobijeni su veoma različiti, u dosta slučajeva potpuno kontradiktorni rezultati. Neki od tih nalaza ukazuju na činjenicu da askorbinska kiselina, aplikovana u fiziološkim ili mega dozama, modifikuje imunost, štiti od anafilaktičkog, traumatskog i hemoragijskog šoka (3,4,13), za razliku od drugih nalaza koji ukazuju na svojstvo vitamina C da pojačava intenzitet anafilaktičkog šoka (7,22,24).

Aglomeracija ovako kontradiktornih nalaza o efektima askorbinske kiseline na aktivnost ćelija, tkiva i organa, kao i nerešeno pitanje efekata delovanja fizioloških i mega doza askorbinske kiseline, predstavlja interesantan problem savremene medicine i zahvalno područje za dalja naučna proučavanja.

Cilj rada

Imajući u vidu ove činjenice, pokušali smo u ovom radu, da proučimo uticaj Ca-askorbata na senzitivnost terminalnog dela ileuma nesenzibilisanih zamoraca.

Materijal i metod rada

Za oglede smo koristili normalne, ranije ničim tretirane Hartley zamorce, muškog pola, starosti od 3 do 4 meseca, telesne mase od 250 do 300 g, koji su živeli pod uobičajenim laboratorijskim uslovima i bili na normalnoj ishrani.

Životinje smo žrtvovali udarcem u glavu. Nakon otvaranja abdomena preparirani ileum stavljali smo u vodeno kupatilo (vol. 3,0 ml), sa prethodno na 37°C zagrejanim Tyrode-ovim rastvorom, u koji je stalno dovođena mešavina kiseonika (99%) i ugljen dioksida (1%). Posle adaptacije creva, od 5 do 10 minuta, izvodili smo Schultz-Dale-ovu reakciju po šemi: start kimografa, 1 minut kasnije dodavali smo ispitivanu supstancu, a posle 30 sekundi zaustavljali smo rad kimografa, 3 puta ispirali uzorak creva Tyrode-ovim rastvorom, a zatim smo pravili pauzu od 3 minuta, da bi se crevo oporavilo.

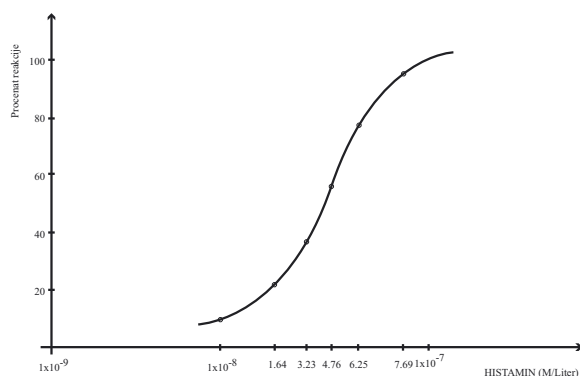
Za dobijanje osnovne krivulje reakcije creva na histamin, posle adaptacije creva u kupatilu, dodavali smo 0,15 ml histamina 10^{-5} M, registrovali

nastalu kontrakciju (to je maksimalni odgovor za ovu supstancu, 100%), zaustavljali kimograf i ispirali crevo 3 puta toplim Tyrode-ovim rastvorom. Posle 3 minuta ogleđ smo ponavljali sa 5 x 0,05 ml histamina 10^{-6} M, potom sa volumenom od 0,1, 0,15, 0,20, 0,25 ml iste koncentracije histamina.

Posle registracije kontrakcije ileuma, različitim dozama histamina, uzorak ileuma smo ispirali tri puta toplim Tyrode-ovim rastvorom, a sadržaj vodenog kupatila od 3.0 ml zamenjivali smo određenom koncentracijom Ca-askorbata, rastvorenog u Tyrode-ovom rastvoru.

Nakon postizanja maksimalne koncentracije, ogleđ smo ponavljali sa dodavanjem koncentracije Ca-askorbata od 10^{-6} M do 10^{-1} M. Za svaku koncentraciju Ca-askorbata, od 10^{-6} M do 10^{-1} M, urađeno je po 5 ogleđ, a dobijene vrednosti kontrakcija prikazane su kao srednje vrednosti.

Ako se kao maksimalan odgovor uzorka creva označi vrednost registrovane kontrakcije, dobijene posle dodavanja 0.15 ml histamina 10^{-5} M, i ako se ta vrednost označi kao 100% odgovor, može se, pomoću ove vrednosti, izračunati procenat odgovora za svaku pojedinačnu dozu standardnog rastvora histamina 10^{-6} M. Iz dobijenih vrednosti formira se standardna kriva Dose Response za histamin kojom se izračunava procenat za svaku dodatnu koncentraciju histamina (Grafikon 1).

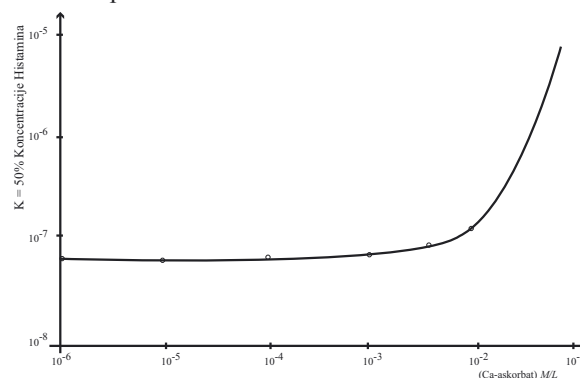


Grafikon 1. Doza odgovor ileuma zamoraca na histamin

Pomoću ove krivulje izračunavali smo koncentraciju histamina nepoznatog uzorka u kupatilu. Ako se dobijena kontrakcija sa histaminom 10^{-5} M prihvati kao 100% (maksimalan) odgovor, onda se prema njemu izračunava procentni odnos koncentracije za svaki nepoznati uzorak ileuma. Dobijena vrednost se označava kao y , njenom podelom sa $1-y$ ($y/1-y$) dobija se količnik koji se, pomoću Krogh-ovog metoda (8), koristi za izračunavanje koncentracije histamina kod 50% odgovora (k -vrednost) za svaki ispitivani uzorak, kao i zavisnost između koncentracije ispitivane supstance i maksimalne koncentracije histamina. Iz vrednosti koncentracije ispitivanih supstanci (M/L), i vrednosti $1/k$, dobija se krivulja senzitivnosti između različitih koncentracija ispitivanih supstanci i senzitivnost glatke muskulature ileuma zamoraca. Ako se od k vrednosti eksperimentalne grupe oduzme k vrednost kontrolne grupe dobija se vrednost diference odgovora (diferenca).

Naši rezultati

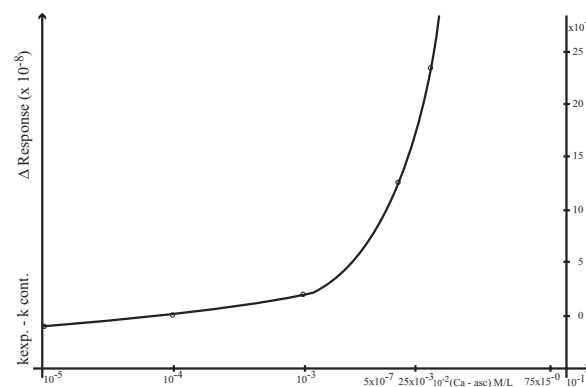
Kod normalnih, ranije ničim tretiranih Hartley zamoraca, izolovali smo ileum i u Tyrode-ovom rastvoru u vodenom kupatilu, volumena od 3,0 ml, proučavali odnos između različitih koncentracija Ca-askorbata i količine dodavanog histamina radi dobijanja 50% vrednosti doze odgovora. Dobijene rezultate prikazali smo na Grafikonu 2.



Grafikon 2. Odnos između koncentracije Ca-askorbata i koncentracije histamina, k

Rezultati pokazuju da sa porastom koncentracije Ca-askorbata raste i koncentracija potrebnog histamina, radi dobijanja 50% doze odgovora. Pada u oči da sa porastom koncentracije Ca-askorbata, od 10^{-6} M pa do 10^{-3} M, postoji dosta blag porast potrebne koncentracije histamina. Međutim, posle porasta koncentracije Ca-askorbata od 10^{-3} M, a posebno posle porasta koncentracije Ca-askorbata od 10^{-2} M, naglo raste potreba za histaminom, radi dobijanja 50% odgovora. Najveća koncentracija histamina je potrebna, da se izazove isti efekat, ako je uzorak creva prethodno tretiran Ca-askorbatom 10^{-1} M, a najmanja kada je u pitanju Ca-askorbat 10^{-6} M.

Ako se od k vrednosti eksperimentalne grupe oduzme k vrednost kontrolne grupe dobija se vrednost diference odgovora. Dobijene vrednosti diference prikazane su na Grafikonu 3.



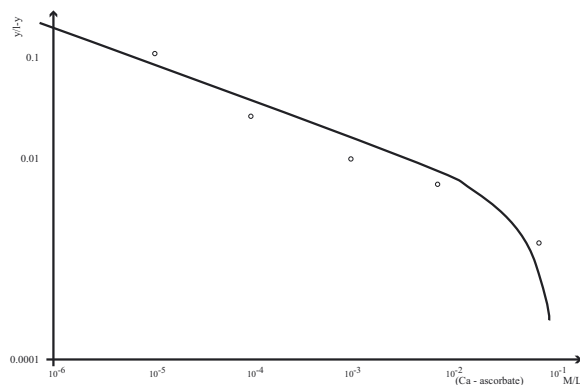
Grafikon 3. Doza odgovora između koncentracije Ca-askorbat i koncentracije histamina (Δ response)

Rezultati pokazuju da sa porastom koncentracije Ca-askorbata raste i vrednost diference. Taj porast diference je veoma izražen pri porastu koncentracije Ca-askorbata od 10^{-3} M do 10^{-1} M.

Upoređivanjem koncentracije upotrebljenog Ca-askorbata od 10^{-1} M i diference doze odgovora

zapaža se da njena vrednost iznosi 3.991. To znači da je 50% odgovora na histamin, koji se dobija posle primene Ca-askorbata od 10^{-1} M, 3.991 puta slabiji od onog odgovora koji se dobija na istom uzorku creva, sa istom dozom histamina, ali bez tretiranja Ca-askorbatom. Ova razlika je statistički visoko značajna ($p < 0,001$).

Iz odnosa koncentracije Ca-askorbata (M/L) i $1/k$ (50% od vrednosti odgovora za svaku koncentraciju) može se dobiti krivulja zavisnosti između različitih koncentracija ispitivane supstance i senzitivnosti glatke muskulature ileuma prema histaminu (Grafikon 4).



Grafikon 4. Odnos između koncentracije Ca-askorbata i senzitivnosti ileuma

Očigledno je da sa porastom doze Ca-askorbata kontinuirano opada senzitivnost uzoraka terminalnog dela ileuma. Povećanjem koncentracije Ca-askorbata od 10^{-6} M do 10^{-3} M nastaje kontinuirani pad senzitivnosti terminalnog ileuma. Međutim, dalji porast koncentracije Ca-askorbata dovodi do naglog pada senzitivnosti terminalnog dela ileuma. Najveći pad senzitivnosti verifikovan je pri primeni Ca-askorbata u koncentraciji od 10^{-1} M. Najveća koncentracija histamina je potrebna, da se izazove isti efekat, ako je prethodno uzorak creva tretiran Ca-askorbatom 10^{-1} M, a najmanja kada je u pitanju koncentracija Ca-askorbata 10^{-6} M.

Diskusija

Još na početku prošlog veka Schultz (9) i Dale (10), nezavisno jedan od drugoga, zapazili su da glatka muskulatura senzibilisanih zamoraca, izolovana u vodenom kupatilu, snažno se kontrahuje nakon dodavanja specifičnog antigena. Schultz je ovaj fenomen registrovao kod ileuma, a Dale kod uterusu. Od tada pa do danas dokazano je da, ova specifična kontrakcija glatke muskulature, nije direktni efekat antigen-antitelo reakcije na efektorne (mišićne) ćelije, već je posledica oslobađanja fiziološki aktivnih supstanci od drugih ćelija, obično lokalizovanih u istim tkivnim kompleksima, specifično osetljivim na imune reakcije. Zbog toga je Schultz-Dale-ov fenomen jedan specifičan slučaj tkivne anafilakse.

Danas je veoma dobro poznato da su mnogi tipovi ćelija specifično vulnerabilni, uključujući eritrocite, leukocite, trombocite i mastocite. Međutim, mastociti,

bazofilni leukociti i trombociti su najvulnerabilnije ćelije koje igraju ključnu ulogu u oslobađanju medijatora u anafilaksi (11).

Od svih medijatora, izolovanih iz tkiva u toku anafilaktičke reakcije, samo četiri i to: histamin, serotonin, spororegujuća supstanca anafilakse i bradikinin, igraju signifikantnu ulogu u tim procesima (12). Među ovim supstancama histamin je istorijski i praktično najvažniji. Mastociti, bazofilni leukociti i trombociti sadrže histamin i serotonin u njihovim finalnim, farmakološkim aktivnim oblicima unutar ćelija i one oslobađaju ove agense u njihovoj aktivnoj formi kada su izazvani.

Zbog poznate činjenice da postoji paralelizam između anafilaktičkog i histaminskog šoka, kao i porasta broja pristalica histaminske teorije šoka, opredelili smo se za korišćenje Schultz-Dale-ove reakcije u ovim istraživanjima. Odabrali smo zamorce zbog poznate činjenice da su ove životinje veoma senzitivne, a nisu sposobne da sintetišu askorbinsku kiselinu za svoje potrebe (13). Uvek smo uzimali deo terminalnog ileuma, iste dužine i sa istog odstojanja od Payer-ovih ploča (20 cm), pošto je poznato da nije svaki deo ileuma podjednako osetljiv (11).

Naši rezultati pokazuju veliku osetljivost terminalnog dela ileuma na aplikaciju različitih koncentracija histamina. Međutim, izlaganje terminalnog dela ileuma različitim koncentracijama Ca-askorbata, ta osetljivost na histamin značajno se smanjuje. Sa porastom koncentracije Ca-askorbata paralelno raste i potrebna koncentracija histamina, radi dobijanja standardnog odgovora. Najveća koncentracija histamina je potrebna, da bi se izazvao isti efekat, ako je prethodno uzorak creva tretiran Ca-askorbatom od 10^{-2} M, a najmanja kada je u pitanju koncentracija od 10^{-6} M Ca-askorbata. Rezultati dobijeni analizom uticaja koncentracije Ca-askorbata, na senzitivnost terminalnog ileuma, jasno pokazuju da, sa porastom koncentracije Ca-askorbata, postepeno opada senzitivnost terminalnog dela ileuma zamoraca.

Međutim, kakav je mehanizam antihistaminskog delovanja Ca-askorbata za sada nije dovoljno poznato. Noffet i sar. (14) su, još 1972. godine, ukazali na činjenicu da je askorbinska kiselina jedna od supstancija koja, vezujući se za aktivnu grupu fosfodiesteraze, inhibira hidrolizu cAMP-a i prevenira redukciju njegove koncentracije. Celularna koncentracija cAMP može da varira od c, 10^{-6} M do 10^{-4} M. Pri unosu mega doza askorbinske kiseline nivo askorbata u krvi može da se kreće od c, 0,8 mg do c, 2,4 mg /100 ml krvi. Kada je prosečna koncentracija askorbata 2 mg/100 ml seruma onda je to ekvivalentno koncentraciji od 10^{-4} M askorbatu. Porast koncentracije cAMP-a inhibira oslobađanje histamina (15). Takođe je ukazano na činjenicu da su, askorbinska kiselina i nikotinamid, kod zamoraca, najpotentnije antihistaminske supstance (16,21).

Chatterjee i sar. (17) izučavali su uticaj vitamina C na nivo histamina u plazmi zamoraca. Rezultati njihovih studija su pokazali da, sa postepenim opadanjem koncentracije askorbinske kiseline u krvi, raste nivo histamina u krvi zamoraca, a verifikuju se

i predklinički i klinički simptomi skorbuta. Smatra se da nedostatak vitamina C remeti pretvaranje histamina u hidantion-5-sirćetnu kiselinu, koja se razgrađuje na uobičajene metaboličke produkte (18, 20, 22). Slične rezultate dobili su i Johnston i sar. (21), kao i Clementson, koji je, proučavao korelaciju između nivoa askorbinske kiseline i histamina u krvi gravidnih žena (19), kao i toku nastanka ateroskleroze i koronarne insuficijencije (23).

Zaključak

Primena različitih koncentracija Ca-askorbata smanjuje osetljivost terminalnog dela ileuma zamoraca prema histaminu.

Najmanja koncentracija Ca-askorbata (10^{-6} M) izaziva najmanje smanjenje osetljivosti, a najveća koncentracija Ca-askorbata (10^{-1} M) izaziva najveći pad senzitivnosti terminalnog dela ileuma zamoraca.

Ca-askorbat smanjuje osetljivost ileuma zamoraca.

Literatura

- 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; 33:839–48.
- Pavlovic S, Fraser R. Effects of different level of vitamin C intake on the vitamin C concentration in guinea pigs plasma and the effect of vitamin C intake on anaphylaxis. *Med Interne* 1988; 26(3):235–44.
- Feigen GA, Smith BH, Dix CE, Flinn CJ, Peterson NS, Rosenberg LT, et al. Enhancement of Antibody Production and Protection Against Systemic Anaphylaxis by Large Doses of vitamin C. *Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology* 1982; 38:313–33.
- Feigen GA, Nielsen ChB. Passive Sensitization in vitro: Effect of Antibody concentration on the Lag Period and Velocity. *Science* 1966; 154:676–84.
- 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.
- Hochwald A, Schwartz K. Versuche Uber die anticorperbildung nach zufuhr von scorbinsaure. *Ztschr Immunitatsforsch* 1939; 91:227–32.
- Giroud A, Giroud P, Ratsimmanga R, Rabinovicz. Pouvoir antianaphylactique de l'acide ascorbique chez le cobay. Importance de l'alimentation et du taux de l'acide ascorbique sur sensibilite de l'organisme. *C R Soc Biol* 1936; 123:1146–52.
- Von Krogh M. *Colloidal Chemistry and Immunology*. J Infec Dis 1916, 19:452–65.
- Schultz WH. Physiological studies in Anaphylaxis. I. The reaction of Smooth Muscle of the Guinea Pigs Sensitized with Horse serum. *J Pharmacol Exp Ther* 1910; 1:549–56.
- Dale HH. The Anaphylactic Reaction of Plain Muscle in Guinea Pigs. *J Pharmacol Exp* 1913; 4:167–77.
- Feigen G. *Anaphylaxis in isolated Tissues and Cells. Methods in Immunology and Immunochemistry*, New York; 1976.
- Austin KF, Humphry. KH. In vitro studies of the mechanism of Anaphylaxis. *Adv Immunology* 1963; 3:1–21.
- Nandi BK, Subrananian N, Majumder AK, Chatterjee IB. Effect of ascorbic acid on detoxification of histamine under stress conditions. *Biochem Pharmacol* 1976; 23:643–59.
- Noffat AC, Petterson DA, Currey AS, Oven P. Inhibition in vitro of cyclic 3',5' nucleotide phosphodiesterase activity by drugs. *European J Toxicol* 1972; 5(3):160–70.
- Shimizu H, Daly HW, Creveling CR. A radioisotopic methods for measuring the formation of adenosine 3',6'-cyclic monophosphate in incubated slices of brain. *J Neurochem* 1963; 16:1609–18.
- Businco L. Azioni Antistaminiche Nei Tessuti. *Bolletino Societa Italiana Di Biologia Sperimentale* 1949; 25:274–89.
- Chatterjee IB, Das Gupta S, Majumder AK, Nandi BK, Subramanian N. Effect of Ascorbic Acid on Histamine Metabolism in Scorbutic Guinea Pigs. *J Physiol* 1975; 251:271–83.
- Subramanian N, Nandi BK, Mujumder AK, Chatterjee IB. Effect of ascorbic acid on detoxification of histamine in rats and guinea pigs under drug treated conditions. *Biochim Pharmacol* 1974; 23: 637–46.
- Clemetson CAB. Histamine and Ascorbic Acid in Human Blood. *J Nutr* 1980; 110:662–78.
- Dawson W, West GB. The Influence of ascorbic acid on histamine metabolism in guinea pigs. *Brit J Pharemacol* 1965; 24:725–84.
- Johnston CS, Martin LJ, Cai X. Abntihistaminic effect of supplemental ascorbic acid and neutrophil chemotaxis. *J Am Coll Nutr* 1992; 11(2):172–6.
- Lee SH, Oc T, Blair IA. Vitamin C–induced decomposition of lipid hydroperoxides to endogenous genotoxins. *Science* 2001;292(5524):2083–6.
- Clemetson CA. The key role of histamine in the development of atherosclerosis and coronary heart disease. *Med Hypotheses* 1999; 52(1): 1–8.
- Carr A, Frei B. Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological condition? *Faseb J* 1999;13(9):1007–24.