

UTICAJ Na-ASKORBATA NA PROMENU SENZITIVNOSTI ILEUMA

Voja Pavlović¹, Zorica Pavlović² i Goran Ranković¹

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 Na-askorbata, na promenu senzitivnosti terminalnog dela ileuma, prema histaminu. Primenjene su različite koncentracije Na-askorbata, od 10^{-6} M do 10^{-1} M, a senzitivnost terminalnog dela ileuma određivana je Schultz-Dale-ovom reakcijom.

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

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

Ovi rezultati pokazuju da primena Na-askorbata smanjuje osetljivost terminalnog dela ileuma prema histaminu. *Acta Medica Medianae* 2005;44(2):17–21.

Ključne reči: Na-askorbat, vitamin C, histamin, ileum, senzibilizacija, Schultz-Daleova reakcija

Institut za fiziologiju Medicinskog fakulteta u Nišu¹
Dom zdravlja u Nišu²

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 veoma 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), za razliku od drugih nalaza koji ukazuju na svojstvo Na-askorbata da pojačava intenzitet anafilaktičkog šoka (4,5).

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

Cilj rada

Imajući u vidu ove činjenice, pokušali smo da u ovom radu proučimo uticaj različitih koncentracija Na-askorbata na senzitivnost terminalnog dela ileuma kod zamoraca.

Materijal

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

Različite koncentracije Na-askorbata (p.a.) i histamina (p.a.) pripremali smo neposredno pri upotrebi.

Metod rada

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 Tirode-ovim rastvorom, u koji je stalno dovođena mešavina kiseonika (99%) i ugljen dioksida (1%).

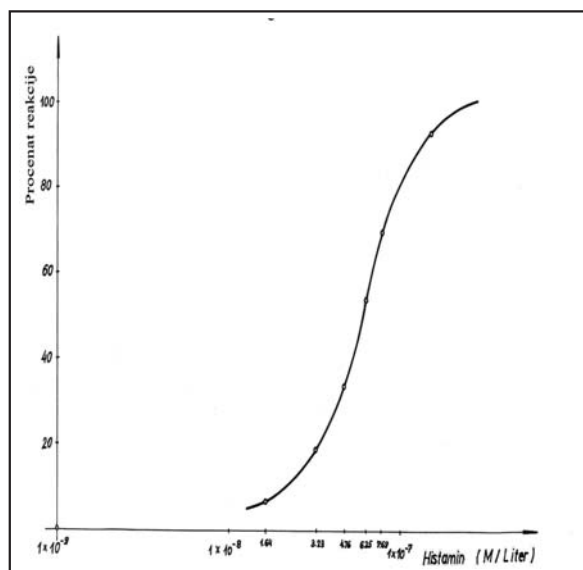
Posle adaptacije creva, od 5 do 10 minuta, izvodili smo Schultz-Dale-ov ogled po šemi: start kimografa, jedan minut kasnije smo dodavali ispitivanu supstancu, registrovali nastalu kontrakciju ileuma, a posle 30 sekundi zaustavljali smo rad kimografa, 3 puta ispirali uzorak ileuma Tirode-ovim rastvorom i 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 rad kimografa i ispirali uzorak ileuma tri puta toplim Tirode-ovim rastvorom. Posle 3 minuta ogled smo ponavljali sa 0.05 ml histamina 10^{-6} M, zatim sa volumenom 0.1, 0.15, 0.20, 0.25 ml iste koncentracije histamina.

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

Posle postizanja maksimalne kontrakcije, ogled smo ponavljali sa dodavanjem koncentracije Na-askorbata od 10^{-6} M do 10^{-2} M. Međutim, samo dodavanje Na-askorbata od 10^{-1} M dovelo je do kontrakcije ileuma, dok dodavanje ostalih koncentracija Na-askorbata, od 10^{-6} M do 10^{-2} M, nije dovelo ni do kakvih kontrakcija creva. Za svaku koncentraciju Na-askorbata, od 10^{-6} M do 10^{-2} M, urađeno je po 5 ogleda, a dobijene vrednosti koncentracije potrebnog histamina, prikazane su kao srednje vrednosti.

Ako se kao maksimalan odgovor uzorka creva uzme 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 za svaku pojedinačnu dozu standardnog rastvora histamina 10^{-6} M. Iz dobijenih vrednosti formira se standardna kriva doze odgovora za histamin, kojim se izračunava procenat za svaku dodatnu koncentraciju histamina (Slika 1).

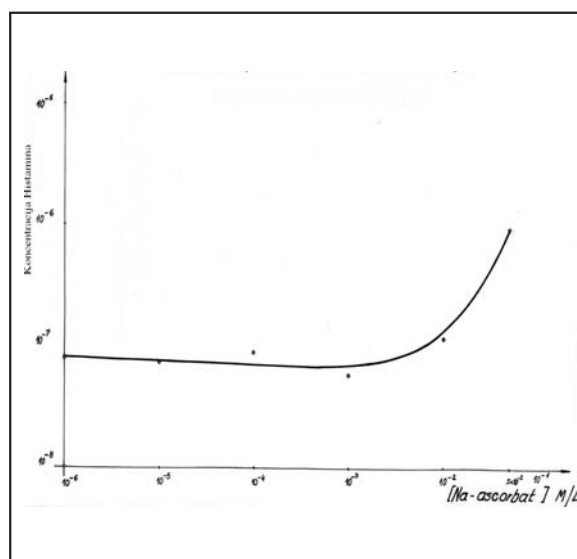


Slika 1. Doza odgovor ileuma zamoraca na histamin

Pomoću ove krivulje izračunavali smo koncentraciju histamina nepoznatog uzorka u kupatilu. Ako se dobijena vrednost kontrakcije za histamin od 10^{-5} M označi kao 100% (maksimalan) odgovor, onda se prema njemu izračunava procentni odnos koncentracije histamina 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, 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 koncentracija ispitivanih supstanci (M/L) i vrednosti 1/k, dobija se krivulja senzitivnosti, između različitih koncentracija ispitivanih supstanci i senzitivnosti glatke muskulature ileuma zamoraca. Ako se od k-vrednosti eksperimentalne grupe oduzme k-vrednost kontrolne grupe, dobija se vrednost difference odgovora.

Naši rezultati

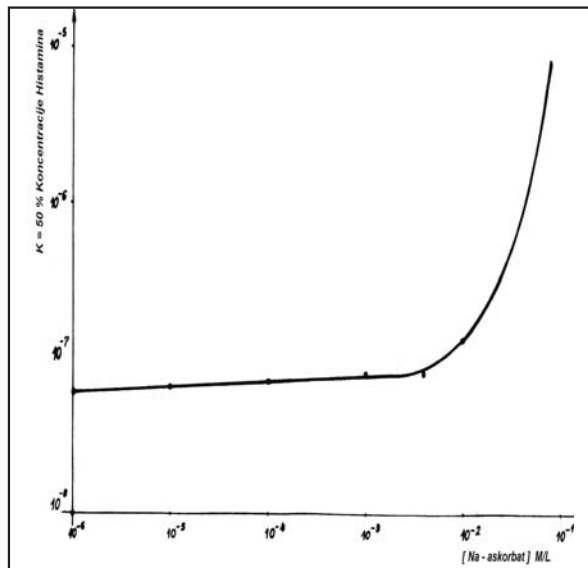
Kod normalnih, ranije ničim tretiranih Hartley zamoraca, izolovali smo terminalni deo ileuma i, u vodenom kupatilu sa Tirode-ovim rastvorom, volumena 3.0 ml, proučavali odnos između različitih koncentracija Na-askorbata i količine dodavanog histamina, radi dobijanja 50% vrednosti doze odgovora. Dobijene rezultate prikazali smo na Slici 2.



Slika 2. Odnos između koncentracije Na-askorbata i koncentracije histamina

Rezultati prikazani na Slici 2, pokazuju da sa porastom koncentracije Na-askorbata raste i koncentracija dodavanog histamina, radi dobijanja 50% doze odgovora. Pada u oči da sa porastom koncentracije Na-askorbata, od 10^{-6} ; pa do 10^{-3} M, postoji dosta blag porast potrebne koncentracije histamina. Međutim, posle porasta koncentracije Na-askorbata od 10^{-3} M, a posebno posle primenjene koncentracije Na-askorbata od 10^{-2} M, naglo raste potreba za histaminom, radi dobijanja 50% odgovora. Najveća koncentracija

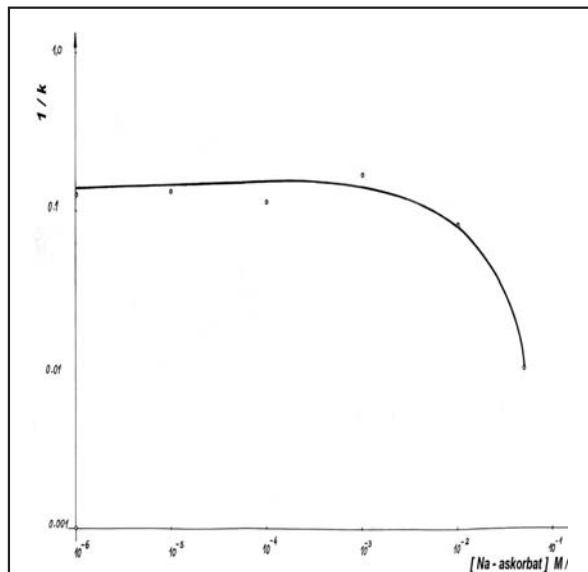
cija histamina je potrebna, da se izazove isti efekat, ako je uzorak creva prethodno tretiran Na-askorbatom od 10^{-2} M, a najmanja kada je u pitanju Na-askorbat od 10^{-6} M. Interesantan je nalaz da samo dodavanje Na-askorbata, koncentracije 10^{-1} M, izaziva kontrakciju ileuma. Ako se od k-vrednosti eksperimentalne grupe oduzme k-vrednost kontrolne grupe, dobija se vrednost diference odgovora. Dobijene vrednosti diference prikazali smo na Slici 3.



Slika 3. Doza odgovor između koncentracije Na-askorbata i koncentracije histamina

Upoređivanjem odnosa između koncentracije Na-askorbata i koncentracije histamina, zapaža se da, sa porastom koncentracije Na-askorbata, paralelno raste i koncentracija histamina.

Iz odnosa između koncentracije Na-askorbata (M/L) i $1/k$ (50% od vrednosti za svaku koncentraciju) dobija se kriva zavisnosti između različitih koncentracija ispitivane supstance i senzitivnosti glatke muskulature ileuma prema histaminu (Slika 4).



Slika 4. Odnos između koncentracije Na-askorbata i senzitivnosti ileuma.

Očigledno je da sa porastom koncentracije Na-askorbata kontinuirano opada senzitivnost uzoraka terminalnog dela ileuma. Ovaj pad senzitivnosti dosta je blag pri koncentracijama od 10^{-6} M do 10^{-3} M, a zatim naglo pada posle primene 10^{-2} ; Na-askorbata, kada je senzitivnost najniža. Ovi nalazi pokazuju da askorbinska kiselina smanjuje senzitivnost terminalnog dela ileuma, prema histaminu.

Diskusija

Još na početku prošloga veka Schultz i Dale su, nezavisno jedan od drugoga, zapazili da se glatka muskulatura senzibilisanih zamoraca, izolovana u vodenom kupatilu, snažno kontrahuje nakon dodavanja specifičnog antigena u in vitro uslovima. Schultz je ovaj fenomen registrovao kod ileuma, a Dale kod uterusu (3). Od tada pa do danas dokazano je da, ova specifična kontrakcija glatke muskulature, nije direktan efekat antigen-antitelo reakcije na efektorne ćelije, već je to 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 anafilaktičkim reakcijama. Od svih medijatora, izolovanih iz tkiva u toku anafilaktičke reakcije, samo četiri i to: histamin, serotonin, sporeoreagujuća supstanca i bradikinin, igraju signifikantnu ulogu u tim procesima. Među ovim medijatorima anafilaktičke reakcije, histamin igra krucijalnu ulogu (6). Mastociti, bazofilni leukociti i trombociti sadrže histamin i serotonin u njihovim finalnim, farmakološki 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 zbog porasta broja pristalica histaminske teorije šoka, mi smo se, u ovim istraživanjima, opredelili za korišćenje Schultz-Dale-ove, reakcije. Odabrali smo zamorce zbog poznate činjenice da su ove životinje veoma senzitivne, i da nisu sposobne da sintetišu askorbinsku kiselinu za svoje potrebe. Uvek smo uzimali uzorak terminalnog dela ileuma sa istog odstojanja od Peyer-ovih ploča (20 cm), pošto je poznato da nije svaki deo ileuma podjednako osetljiv.

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

Rezultati, dobijeni analizom uticaja koncentracije Na-askorbata, na senzitivnost terminalnog dela ileuma, jasno pokazuju da, sa porastom koncentracije Na-askorbata, postepeno opada senzitivnost terminalnog dela ileuma zamoraca.

Danas je dobro razjašnjena uloga askorbinske kiseline u hematopoezi, u čišćenju slobodnih radikala u tečnoj fazi (5,9), njeno snažno antioksidativno svojstvo (1,6,8), njena uloga u sintezi kolagena (3), interferona, antitela i raznih citokina (3,4), što sugerise da askorbinska kiselina može da modulira celularnu i humoralnu imunost organizma (7).

Međutim, kakav je mehanizam antihistaminskog delovanja Na-askorbata za sada nije dovoljno poznato. Međutim, Noffet i su, još 1972. godine, ukazali na činjenicu da je askorbinska kiselina jedna od supstanca koja, vezujući se za aktivnu grupu fosfodiesteraze, inhibira hidrolizu cAMP-a. Porast koncentracije cAMP-a inhibira oslobađanje histamina (3). Takođe je ukazano na činjenicu da su, askorbinska kiselina i nikotinamid, kod zamoraca, najpotentnije antihistaminske supstance (7).

Chatterjee i sar. su izučavali 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 poredklinički 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 (3,11). Slične rezultate dobili su i Johnston i sar. (6), kao i Clementson, koji je, proučavao korelaciju između nivoa askorbinske kiseline i histamina u toku nastanka ateroskleroze i koronarne insuficijencije (10).

Zaključak

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

Najmanja koncentracija Na-askorbata ($10^{-6}M$) izaziva najmanje smanjenje osetljivosti, a najveća koncentracija Na-askorbata ($10^{-2}M$) izaziva najveći pad senzitivnosti terminalnog dela ileuma zamoraca.

Na-askorbat smanjuje osetljivost ileuma zamoraca.

Literatura

1. Racek J, Holecek V, Trefil I. Antioxidative properties of ascorbic acid. *Cas Lek Cesk* 2000; 139(19):583–7.
2. De la Fuente M, Ferrandez MD, Burgos MS, Soler A, Prieto A, Miquel J. Immune function in aged women is improved by ingestion of vitamin C and E. *Can J Physiol Pharmacol* 1998; 76(4):373–80.
3. Sauberlich HE. Pharmacology of vitamin C. *Annu Rev Nutr* 1994; 14:371–91.
4. Nieman DC, Henson DA, Butterworth DE, Warren BJ, Davis JM, Fagoaga Or, et al. Vitamin C supplementation does not alter the immune response to 2.5 hours running. *In J Sport Nutr* 1997; 7(3):173–84.
5. Yokoyama T, Date C, Kokubo Y, Yoshiike N, Matsumura Y, Tanaka H. Serum vitamin C concentration was inversely associated with subsequent 20-year incidence of stroke in a Japanese rural community. The Shibata study. *Stroke* 2000; 31(10): 2287–94.
6. Johnston CS, Solomon RE, Corte C. Vitamin C depletion is associated with alterations in blood histamine and plasma free carnitine in adults. *J Am Coll Nutr* 1996; 15(6):586–91.
7. Leung DY. Molecular basis of allergic diseases. *Mol Genet Metab* 1998; 63(3):157–67.
8. Podmore ID, Griffiths HR, Herbert KE, Mistry N, Mistry P, Lunec J. Vitamin C exhibits pro-oxidant properties. *Nature* 1998; 392 (6676):559–68.
9. Lee SH, Oc T, Blair IA. Vitamin C-induced decomposition of lipid hydroperoxides to endogenous genotoxins. *Science* 2001; 292(5524):2083–86.
10. Clementson CA. The key role of histamine in the development of atherosclerosis and coronary heart disease. *Med Hypotheses* 1999; 52(1): 1–8.
11. Clementson CA. Elevated blood histamine caused by vaccinations and Vitamin C deficiency may mimic the shaken baby syndrome. *Med Hypotheses* 2004; 62(4):533–6.

THE INFLUENCE OF Na-ASCORBATE ON CHANGING THE ILEUM SENSITIVITY

Voja Pavlovic, Zorica Pavlovic and Goran Rankovic

In the case of previously mentioned Hartley guinea pigs, male gender, weight from 250 to 300 g, which lived under normal lab's conditions, The effect of different Na-ascorbate concentrations was studied. Various Na-ascorbate concentrations were used starting from 10^{-6} M to 10^{-1} M, while the sensitivity of terminal part of ileum was determined by Shultz-Dale's reaction.

The samples of ileum treated by 10^{-5} M histamin and the induced contraction served as a maximal response (100%). The ileum sample was rinsed by Thyrode's solution, the media was exchanged by different concentrations of Na-ascorbate, and with the help of Shulzt-Dale's reaction, the intensity of ileum contraction was determined.

The obtained results show that, with the increase of Na-ascorbate concentration from 10^{-6} M till 10^{-3} M, there is a mild increase of histamin concentration in order to get 50% of response.

However, after the applied vitamin C concentration of 10^{-3} M, the need for histamine suddenly increases in order to get 50% of response, and it achieves its maximum after the 10^{-1} M Na-ascorbate concentration has been applied.

These results show that the application of Na-ascorbate lessens the sensitivity of terminal part of ileum. *Acta Medica Medianae 2005;44(2): 17-21.*

Key words: *Na-ascorbic, vitamin C, histamine, ileum, sensibilisation, Schultz-Dale's reaction*