

Wanda Ficek*, Renata Podgórska*, Jadwiga Leśniewska*

Zawartość witaminy C w grasicy, węzłach limfatycznych, śledzionie i nadnerczach myszy po podaniu serotoniny

Streszczenie

Doświadczenia wykonano na myszach, 6-miesięcznych samcach, szczepu CBA. Zwierzętom doświadczalnym podawano w iniekcji dootrzewnowej serotoninę (5-HT), w ilości 0,3 mg 5-HT/100 g ciała, lub 1,5 mg 5-HT/100 g ciała.

Zawartość witaminy C (kwas askorbinowy) badano w grasicy, węzłach limfatycznych, śledzionie i nadnerczach. We wszystkich badanych tkankach po iniekcji serotoniny występowało obniżenie zawartości witaminy C. W grupie zwierząt, które otrzymywały większą dawkę serotoniny spadek witaminy C w badanych tkankach był większy niż w grupie zwierząt otrzymujących 0,3 mg 5-HT.

Wstęp

Serotoninę (5 hydroksytryptaminę, 5-HT) wytwarzają komórki błony śluzowej przewodu pokarmowego, gdzie znaleziono ją w największych ilościach. Z innych tkanek, w których występuje 5-HT należy wymienić tkankę ośrodkowego układu nerwowego, śledzionę, płuca, nerki oraz płytki krwi, w których 5-HT ulega tylko gromadzeniu. W znacznych ilościach spotyka się serotoninę również w mastocytach myszy i szczurów (Lambrecht-Hall i wsp. 1990) oraz w granulach wydzielniczych chromochłonnych komórek nadnerczy (Delarue i wsp. 1992). Receptory dla serotoniny były wykryte w różnych typach tkanek i obejmowały centralny system nerwowy, przewod

* Zakład Fizjologii Zwierząt Instytutu Zoologii Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków.

Praca wykonana w ramach: DS/JZ/Z.F.Zw./1995-1997.

pokarmowy, głównie żołądek i jelita, naczynia krwionośne, trombocyty, zakończenia nerwów układu autonomicznego i mięsień sercowy (Van Zwieten 1987).

Serotonina jest hormonem o wielokierunkowym działaniu. Uważana jest za neurohormon biorący udział w przewodzeniu impulsów w ośrodkowym układzie nerwowym oraz neurohormonem, który kontroluje funkcję osi podwzgórze-przysadka-nadnercza (Budziszewska i Jaworska 1989). Serotonina działa również jako pośrednik między ośrodkowym układem nerwowym a układem autonomicznym przywspółczulnym (Papara 1962).

Asaka i wsp. (1991) podają, że serotonina odgrywa istotną rolę również w sytuacjach stresowych. Podczas poddawania szczurów stresowi, zaobserwowali wzrost ilości katecholamin i serotoniny w śluzówce żołądka i w osoczu krwi. Stwierdzili również pojawienie się wrzodów żołądka. Douglas (1980) wykazał, że podczas stresu doświadczalnego, wykonanego na zwierzętach, występuje niedokrwienie śluzówki żołądka, na skutek zwężenia naczyń krwionośnych przez serotoninę.

Badania ostatnich lat wykazują istnienie interakcji pomiędzy układem immunologicznym i układem neuroendokrynnym. Już wcześniej wykazano obecność receptorów dla histaminy na powierzchni limfocytów (Wang i wsp. 1983) oraz zdolność modulowania aktywności limfocytów przez histaminę (Askenase i wsp. 1981). Bonnet i wsp. (1987) wykazali, że limfocyty myszy posiadają również miejsca receptorowe także dla serotoniny. Parę lat wcześniej Saulson i wsp. (1984) opisali, że w przeprowadzonych badaniach uzyskali hamowanie proliferacji ludzkich limfocytów przez serotoninę.

Przedmiotem wielu badań było także zagadnienie roli 5-HT w patogenezie procesu alergicznego. Wykazano, że podskórne wstrzyknięcia serotoniny wywołują zmiany naczyniowe, zwiększając miejscową przepuszczalność ściany naczyń włosowatych i powodują zwiększone przesączenie wstrzykniętych barwników (Kopeć-Szłezak 1990).

Bogate jest piśmiennictwo dotyczące roli serotoniny w ośrodkowym układzie nerwowym, natomiast mniej publikacji spotyka się na temat roli tej aminy biogennej na tkanki obwodowe, zaś wpływ 5-HT na układ limfoidalny jest mało poznany; dlatego w tej pracy podjęto badania zawartości kwasu askorbinowego po obciążeniu organizmu myszy różnymi dawkami serotoniny. Badaniem objęto układ limfoidalny tj. grasnicę, węzły limfatyczne i śledzionę. Do tych badań dołączono również nadnercza – gruczoły bogate w witaminę C, które szybko reagują na wszelkie zmiany zachodzące w organizmie.

Material i metody

ZWIERZĘTA I INIEKCJA

Material doświadczalny stanowiły myszy szczepu CBA. Były to 6-miesięczne samce o wadze 31 ± 1 g. Myszy pochodziły z Instytutu Pediatrii Akademii Medycznej w Krakowie. Zwierzęta podzielono na grupy. Jedna z grup stanowiła kontrolę podstawową, zaś następne grupy były zwierzętami doświadczalnymi, którym podawano dootrzewnowo serotoninę. Serotoninę rozpuszczano w wodnym roztworze soli fizjologicznej (0,9% NaCl) i podawano zwierzętom w jednej iniekcji 0,3 ml roztworu. Iniekcję stosowano zawsze w godzinach południowych.

Grupa I – kontrola podstawowa (n=7) otrzymywała w iniekcji dootrzewnowej 0,3 ml wodnego roztworu soli fizjologicznej. Iniekcję stosowano przez 10 dni w odstępach co 24 godz.

Grupa II – grupa doświadczalna (n=7). Zwierzętom tym podawano dootrzewnowo serotoninę przez okres 10 dni, w odstępach co 24 godz. w ilości 0,3 mg na 100 g ciężaru ciała.

Grupa III – grupa doświadczalna (n=7). Zwierzętom tym podawano dootrzewnowo serotoninę przez 10 dni w odstępach co 24 godz. w ilości 1,5 mg na 100 g wagi ciała.

Material do badań pobierano w godzinach przedpołudniowych w następnym dniu po wykonaniu ostatniej iniekcji. Myszy usypiano lekko narkozą eterową, a następnie pobierano takie narządy jak: grasice, węzły limfatyczne, śledziony i nadnercza, Wszystkie narządy były ważone i porównywane z grupą kontrolną.

ODCZYNNIKI CHEMICZNE

Do badań witaminy C użyto następujących odczynników: Serotoninę (*Serotonin creatinine sulphate*) – Budapest – Węgry. Kwas meta-fosforowy (*meta-Phosphoric acid p.a.*) firmy International Enzyme limited – Windsor – Anglia. Kwas trójchlorooctowy, 2,2-dwupirydył (cz. d. a.), kwas ortofosforowy i chlorek żelazowy pochodziły z Polskich Odczynników Chemicznych z Gliwic.

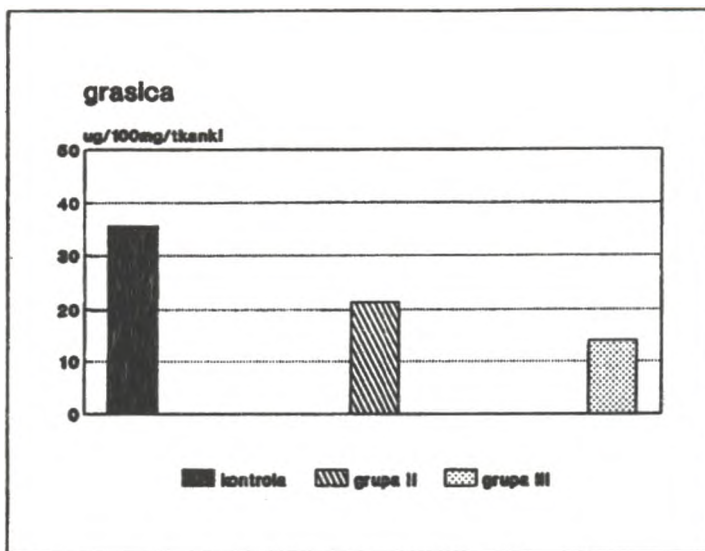
BADANIA BIOCHEMICZNE

Do wykrywania witaminy C w poszczególnych tkankach zastosowano metodę Omaye i wsp. (1979). Jest to metoda biochemiczna, ilościowego oznaczania kwasu askorbinowego w tkankach zwierzęcych, w surowicy, w osoczu krwi i innych płynach ustrojowych. Opiera się ona na redukcyjnym działaniu kwasu askorbinowego. Kwas askorbinowy w roztworze kwaśnym redukuje jon żelazowy (Fe^{+3}) do jonu żelazawego (Fe^{+2}), dając barwny czerwonopomarańczowy kompleks chelatujący z dwupirydylem, który wykazuje charakterystyczną absorbancję przy długości fali 525 nm.

Ilość witaminy C zawartej w poszczególnych tkankach odczytywano przy pomocy krzywej wzorcowej, wykorzystując liniową zależność pomiędzy absorbancją a koncentracją kwasu askorbinowego. Do krzywej wzorcowej użyto witaminę C (cz. d. a.) produkcji „Polfy” w Krakowie. Zawartość witaminy C podano w $\mu\text{g}/100$ mg tkanki. Wszystkie wyniki obliczono testem t- Studenta-Gosseta i podano poniżej.

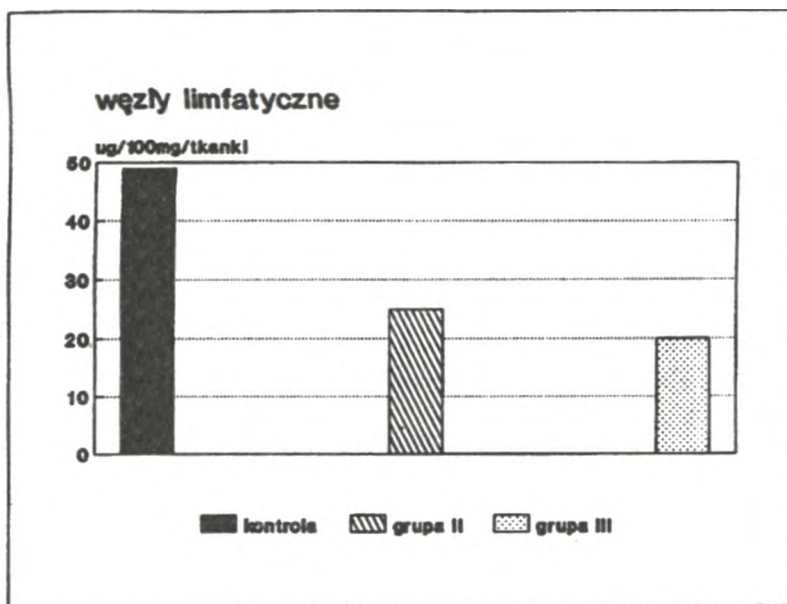
WYNIKI

Grasica. Średni ciężar grasic kontrolnych wynosił 24,4 mg, w grupie II grasic ważyły 33 mg, a w grupie III – 36,5 mg. W grupie II ciężar grasic wzrósł o 34%, a w grupie III o 48% w stosunku do grupy I (tj. kontroli podstawowej). Są to wyniki statystycznie istotne: $p < 0,01$ (ryc. 5). Zawartość witaminy C w grasicach poszczególnych grup wynosiła: dla grupy kontrolnej – 35,5 $\mu\text{g}/100$ mg tkanki świeżej, dla grupy II (po padaniu 0,3 mg 5-HT) – 21,4 $\mu\text{g}/100$ mg tkanki świeżej, dla grupy III (po podaniu 1,5 mg 5-HT) – 14,0 $\mu\text{g}/100$ mg tkanki. W obliczeniach procentowych jest to dla grupy II o 41% mniej, a dla grupy III o 60,5% mniej niż w grupie kontrolnej. Wszystkie wyniki są statystycznie istotne: $p < 0,001$ (ryc. 1).



Ryc. 1. Średnie zawartości witaminy C w $\mu\text{g}/100\text{ mg}$ grasicy zwierząt kontrolnych i doświadczalnych

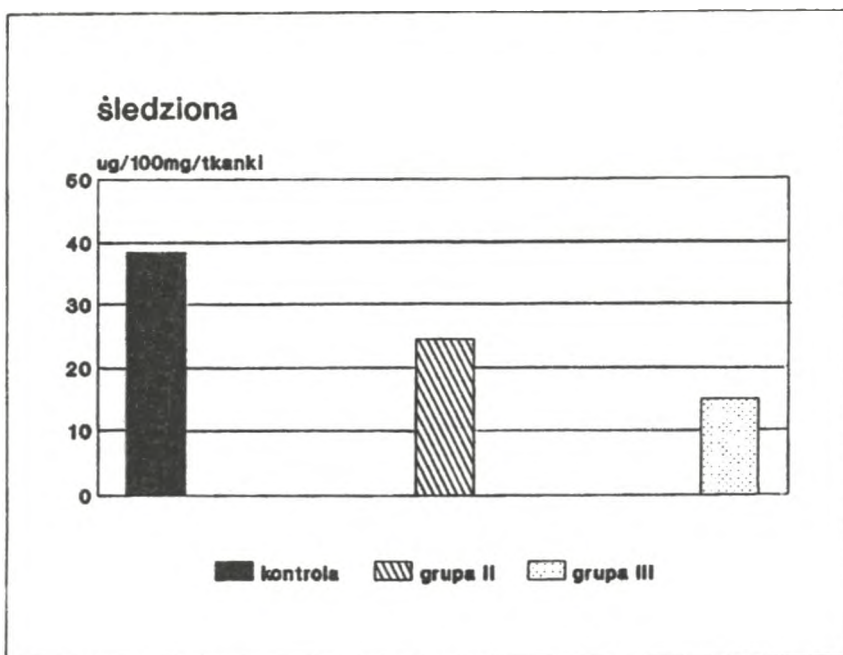
Węzły limfatyczne. Średni ciężar wyizolowanych węzłów limfatycznych wynosi w grupie kontrolnej – 11 mg, w grupie II – 15,3 mg, a w grupie III – 18,2 mg. W procentowych przeliczeniach ciężar węzłów limfatycznych wzrósł w grupie II – o 39%, a w grupie III – o 65% w porównaniu do kontroli podstawowej. Wyniki te są statystycznie istotne: $p < 0,001$ (ryc. 5). Po podaniu serotoniny zmieniła się również zawartość kwasu askorbinowego w węzłach limfatycznych. Wyniki były następujące: dla grupy kontrolnej – 49,0 μg witaminy C/100 mg tkanki świeżej, dla grupy II (po podaniu 0,3 mg 5-HT) – 25,0 $\mu\text{g}/100\text{ mg}$ tkanki świeżej, dla grupy III (po podaniu 1,5 mg 5-HT) – 20,5 μg witaminy C/100 mg tkanki. U zwierząt doświadczalnych nastąpiło obniżenie witaminy C i wynosiło: w grupie II o 49% mniej a w grupie III o 68,2% mniej w porównaniu z kontrolą podstawową (ryc. 2). Wyniki te są statystycznie istotne: $p < 0,001$.



Ryc. 2. Średnia zawartość witaminy C w $\mu\text{g}/100\text{ mg}$ węzłów limfatycznych myszy kontrolnych i doświadczalnych

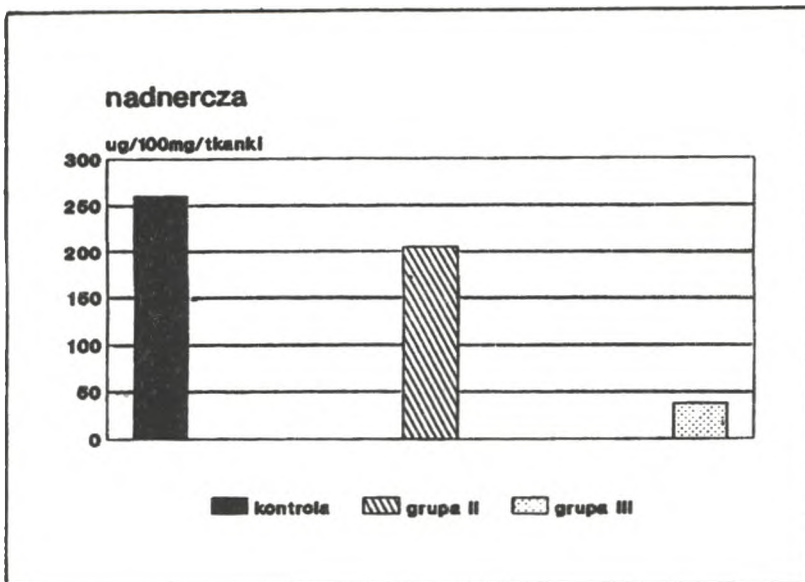
Śledziona. Średni ciężar śledzion dla grupy kontrolnej wynosił 85 mg, dla grupy II – 89 mg, a dla grupy III – 97 mg. Po podaniu zwierzętom serotoniny ciężar śledzion wzrastał i w obliczeniach procentowych przedstawiał się następująco: dla grupy II wzrost wynosił 5%, a dla grupy III 14%. Tylko dla grupy III był to wynik statystycznie istotny: $p < 0,01$ (ryc. 5).

Po podaniu zwierzętom serotoniny, w śledzionie również nastąpił spadek witaminy C. Wyniki przedstawiały się następująco: dla grupy kontrolnej – 38,5 μg witaminy C/100 mg świeżej tkanki, dla grupy II (po podaniu 0,3 mg 5-HT) – 24,6 μg witaminy C/100 mg tkanki, dla grupy III (po podaniu 1,5 mg 5-HT) – 21,5 μg witaminy C/100 mg tkanki. W obliczeniach procentowych jest to dla grupy II o 37% mniej, a dla grupy III o 45% mniej niż w kontroli podstawowej (ryc. 3). Wyniki te są statystycznie istotne: $p < 0,001$.

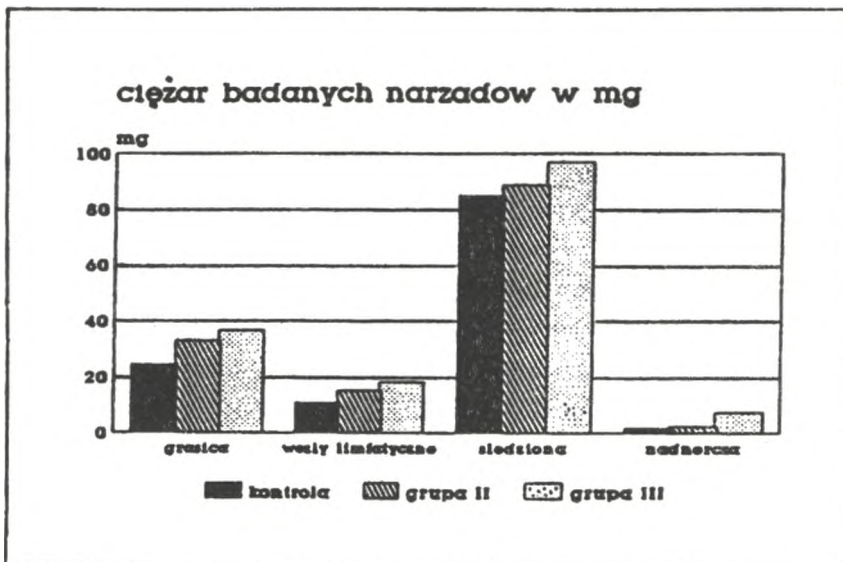


Ryc. 3. Średnia zawartość witaminy C w µg/100 mg śledziona zwierząt kontrolnych i doświadczalnych

Nadnercza. Średni ciężar nadnerczy dla grupy kontrolnej wynosił 2 mg, dla grupy II – 2,5 mg, a dla grupy III – 7,5 mg. Po podaniu serotoniny nastąpił wzrost ciężaru nadnerczy dla grupy II o 27%, a dla grupy III o 275% (ryc. 5). Są to wyniki statystycznie istotne: $p < 0,001$. U myszy otrzymujących serotoninę nastąpił spadek witaminy C w gruczole nadnerczowym. Wyniki przedstawiały się następująco: w grupie kontrolnej było – 260 µg witaminy C/100 mg świeżej tkanki, w grupie II (po podaniu 0,3 mg 5-HT) było – 205 µg witaminy C/100 mg tkanki, w grupie III (po podaniu 1,5 mg 5-HT) – 37 µg/100 mg tkanki. W obliczeniach procentowych był to wynik: dla grupy II o 22% mniej, a dla grupy III o 85% mniej witaminy C w porównaniu z kontrolą (ryc. 4). Wyniki te są statystycznie istotne: $p < 0,001$.



Ryc. 4. Średnia zawartość witaminy C w $\mu\text{g}/100 \text{ mg}$ nadnerczy myszy kontrolnych i doświadczalnych



Ryc. 5. Średni ciężar badanych narządów w mg zwierząt kontrolnych i doświadczalnych

Dyskusja

Grasica ssaków zaliczana jest do centralnego narządu limfoidalnego. Gruczoł ten wykazuje zapotrzebowanie na liczne biokatalizatory-mikroelementy oraz witaminy. Zdaniem niektórych badaczy, jednym z niezbędnych czynników do rozwoju grasicy oraz do odpowiedniej i optymalnej czynności tego gruczołu, niezbędny jest kwas askorbinowy (Ficek 1982, Park i Kimler 1991).

Kwas askorbinowy bierze udział w procesach oksydoredukcyjnych; bierze udział w procesach metabolicznych, jest aktywatorem przemian białkowych i węglowodanowych, jest też niezbędny przy wytwarzaniu przeciwciał.

Kwas askorbinowy jest niezbędny do prawidłowego funkcjonowania grasicy, węzłów limfatycznych i śledziony.

W grasicy przebiegają intensywne procesy biochemiczne związane zwłaszcza z przemianami białek oraz aminokwasów, a witamina C jest jednym z koniecznych aktywatorów tych procesów. Zadaniem tej witaminy jest też utrzymywanie jonów metali na odpowiednim stopniu utlenienia. Witamina C nie wpływa bezpośrednio na substraty reakcji, jedynie aktywuje enzymy biorące udział w tych procesach (England i wsp. 1986, Haskell i wsp. 1991).

W doświadczeniach własnych stwierdzono, że dootrzewnowe podanie myszom serotoniny powoduje znaczne obniżenie zawartości witaminy C w grasicy, węzłach limfatycznych, śledzionie i nadnerczach. Należałoby przyjąć, że kilkukrotne podanie serotoniny, stanowi dla organizmu myszy czynnik stresowy, powodujący mobilizację nadnerczy i układu limfoidalnego.

W śledzionie kwas askorbinowy jest niezbędny do stymulacji układu odpornościowego. Stąd też witamina C zaliczana jest do substancji odpornościowych, przeciwwzakaźnych. Zostało udowodnione, że kwas askorbinowy bierze udział we wszystkich procesach biochemicznych warunkujących odporność ssaków na różnego rodzaju czynniki chorobotwórcze (Yonemoto i wsp. 1976).

Witamina C jest również niezbędna dla węzłów limfatycznych oraz wszystkich krwinek białych znajdujących się w krwi obwodowej lub płynach i tkankach ustrojowych. Cooper i Adorol (1971) wykazali, że witamina C dodana w określonej ilości do hodowli *in vitro* białych krwinek stymuluje boczny łańcuch heksozy monofosforanowej, co jest niezbędnym

procesem do prawidłowego przebiegu przemian metabolicznych w tych komórkach.

W badaniach własnych wykazano, że w nadnerczach wystąpił znaczny spadek witaminy C po podaniu zwierzętom serotoniny. Jest to wynik niekorzystny dla organizmu, ponieważ nadnercza wykazują wyjątkowe zapotrzebowanie na kwas askorbinowy. W nadnerczach witamina C jest niezbędnym aktywatorem w procesach hydroksylacji przy wytwarzaniu noradrenaliny. W ostatnim etapie tej syntezy zostają zużyte równe ilości dopaminy, kwasu askorbinowego i tlenu (Levine i wsp. 1985). Przypuszcza się również, że witamina C bierze udział w procesie transmetylacji noradrenaliny do adrenaliny (Kuemerle i wsp. 1976). Ponadto kwas askorbinowy odgrywa ważną rolę w utrzymaniu hormonów rdzenia w stanie zredukowanym, chroniąc je przed utlenieniem do adrenochromów. Dotychczasowe badania sugerują również udział witaminy C w procesach hydroksylacji na terenie kory nadnerczy przy wytwarzaniu hormonów sterydowych (Englard i wsp. 1986, Jalukar i wsp. 1991).

W przeprowadzonych własnych doświadczeniach zanotowano zwiększony ciężar badanych narządów. Dla układu limfoidalnego jak również dla nadnerczy takie zjawisko występuje w czasie poddania zwierząt na działanie stresu. W grasicy, węzłach limfatycznych i śledzionie występuje sygnał do obrony organizmu, co wiąże się z wytwarzaniem zwiększonej produkcji hormonów obronnych. Zatem podawanie myszom przez kilka dni serotoniny prowadzi w układzie limfoidalnym i nadnerczach do obniżenia witaminy C, tak jak w reakcjach stresowych.

Literatura

- Asaka M., Takada H., Ohtaki T., Miydzaki T., Natsumoto M., Togashi H., Saito H., Minami M., 1991, *Plasma and gastric mucosal catecholamines during the development of stress ulcer in rats*. Biogenic Amines 8, 87–94.
- Askenase P.W., Siegel J.N., Schwartz A., Gershon R.K., 1981, *Role of histamine in the regulation of cell mediated immunity*, Int. Arch. Allergy Appl. Immun. 66 (S) 225–233.
- Bonnet M., Lespinats G.G., Burtin C., 1987, *Evidence for serotonin (5-HT) binding sites on murine lymphocytes*. Int. J. Immunopharmac. 5, 551–58.

- Budziszewska B., Jaworska L., 1989, *Rola serotoniny w regulacji i sekrecji niektórych hormonów przysadkowych (adrenokortykotropiny, tyreotropiny, hormonu wzrostu i prolaktyny)*. Srotonina, Mogilany - Kraków.
- Cooper M.R., Adorol B., 1971, *Simulation of leucocyte hexose monophosphate activity by ascorbic acid*. Infect. Immun. 3, 851–853.
- Delarue C., Becquet D., Idres S., Henry F., Vaudry H., 1992, *Serotonin synthesis in adrenochromaffin cells*. Neurosci 92, 495–500.
- Douglas W.W., 1980, *Histamine and 5-hydroksytryptamine and their antagonists. In The Pharmacological Basis of Therapeutics*, Goodman A.G. Gilman L.S., Rall T.W. and Murad F. eds. Macmillan N.Y., 605–638.
- Englard S., Seifter S., 1986. *The biochemical functions of ascorbic acid*. Am. Rev. Nutr. 6, 346–406.
- Ficek W., 1982, *Histochemical studies on vitamin C distribution in the thymus of immature rats*. Zool. Jb. Anat. 108, 11–18.
- Haskell B.E., Johnston C.S., 1991, *Complement component C1q activity and ascorbic acid nutriture in guinea pigs*. Nutr Canc. 15, 262–263.
- Jalukar V., Kelly P.M., Njus D., 1991, *Reaction of ascorbic acid with cytochrome b561*. J. Biol. Chemistry 266, 6878–6882.
- Kopeć-Szlęzak J., 1990, *Komórki tuczne-wszelobecne i malo znane*. Problemy 532, 66–11.
- Kuemerle H.P., Garrett E.R., Spitzky K.H., 1976, *Farmakologia kliniczna i farmakoterapia*. PZWL, Warszawa. 314–318.
- Lambrecht-Hall L., Konstantinidou A.D., Theoharides T.C., 1990, *Serotonin release from rat brain mast cells in vitro*. Neurosci 39, 199–207.
- Levine M., Morita K., Pollard H., 1985, *Enhancement of norepinefrine biosynthesis by ascorbic acid in cultured bovine chromaffin cells*. J. Biol. Chem. 260, 12942–12947.
- Omaye S.T., Turnbull J.D., Howende E., Sauberlich E., 1979, *Selected methods for the determination of ascorbic acid in animal cells, tissues and fluids*. Methods Enzymol. 62, 1–10.
- Papara T., 1962, *Serotonina (5-hydroksytryptamina)*. Pol. Tyg. Lek; 17, 106–108.
- Park C.H., Kilmer B.F., 1991, *Growth modulation of human leukemic and proleukemic progenitor cells by L-ascorbic acid*. Nutr. Canc. 15, 264–265.
- Slauson D.S., Walker C., Kristensen F., Wang Y., de Weck Y., 1984, *Mechanism of serotonin induced lymphocytes proliferation inhibition*. Cell Immun. 84, 240–252.
- Van Zwieten P.A., 1987, *Pathophysiological relevance of serotonin*. J. Cardiovasc. Pharmacol. 10 (S) 19–25.

Wang Y., Kristensen F., Joncourt F., Slauson D.O., de Weck Y., 1983, *Analysis of 3H-histamine interaction with lymphocytes: receptor binding or uptake.* Clin Exp. Immun. 54, 501–508.

Yonemoto R.H., Chretien P.B., Fehnigger T.F., 1976, *Enhanced lymphocyte blastogenesis by oral ascorbic acid.* Proc. Am. Assoc. Canc. Res. 17, 288–289.

Wanda Ficek, Renata Podgórska, Jadwiga Leśniewska

Vitamin C Content in the Thymus, Lymph Nodes, Spleen and Adrenal Glands after Administration Serotonine

Summary

The experiments involved CBA – strain 6-month-old male mice. Each experimental animal received 0,3 mg serotonine (5-HT) per 100 g body weight or 1,5 mg 5-HT per 100 g body weight.

Vitamin C content was studied in the thymus, lymph nodes, spleen and adrenal glands.

Vitamin C content dropped sfter serotonine injection in all studied tissues. In animal receiving 1,5 mg 5-HT the decline of vitamin C concetration was more profound than in those injected with 0,3 mg 5-HT.