

J. IWANOWSKA, A. GROCHULSKI, E. SAMOJLIK

WPŁYW WĘGLANU WAPNIA I WERSENIANU NA POWSTAWANIE KRZYWICY DOŚWIADCZALNEJ U SZCZURÓW

Z Zakładu Badania Organopreparatów i Witamin Instytutu Leków w Warszawie

Kierownik: mgr J. Iwanowska

Dyrektor Instytutu: prof. dr P. Kubikowski

Metody biologiczne stosowane jako najbardziej selektywne w analizie leków i innych produktów zawierających witaminę D, są jak wiadomo bardzo czasochłonne i długotrwałe ze względu na trudności w wywołaniu krzywicy doświadczalnej u zwierząt. Nasuwa to potrzebę skrócenia czasu powstawania krzywicy przy jednoczesnym otrzymywaniu wyraźnego jej obrazu.

Wzmianki napotkane w piśmiennictwie (1, 2) wprowadziły bardzo lakoniczne, dotyczące krzywiczotwórczego działania jonów Ca podawanych jako węglan wapnia i związków kompleksowych, nasunęły nam myśl zastosowania węglanu wapnia i kwasu etyleno-dwuamino-czterooctowego zwanego wersenianem jako czynników przyspieszających rozwijanie się krzywicy.

W tym celu przeprowadzono równoległe dwie serie doświadczeń, w jednej badano działanie krzywiczotwórcze węglanu wapnia i jonów Ca a w drugiej działanie wersenianu. W obu wypadkach doświadczenia przeprowadzono na szczurach młodych, albinosach wagi od 40—50 g. Zwierzęta przez cały czas doświadczenia począwszy od 21 dnia życia pozostały na diecie Mc Colluma pozbawionej całkowicie witaminy D o składzie:

kukurydza żółta pełna mielona	33 g
pszenica pełna mielona . . .	33 g
gluten pszenny mielony . . .	15 g
Ca = CO ₃	3 g
NaCl	1 g

Zawiesinę wodną węglanu wapnia i wodny roztwór wersenianu podawano szczurom przy pomocy sondy.

W pierwszej serii doświadczenia węglan wapnia podawano szczurom podzielonym na cztery grupy w trzech dawkach: 10 mg, 15 mg, 25 mg Ca na szczura w ciągu 15 dni. Czwarta grupa zwierząt jako kontrolna nie otrzymywała węglanu wapnia. Rozwój krzywicy u zwierząt badano przy pomocy zdjęć rentgenowskich wykonując co 5 dni pomiary grubości chrząstki nasady kości długich (3). Obraz otrzymywany na kliszy rzutowano na ekran i mierzono szerokość tkanki chrzęstnej. Uzyskane wartości porównywano z wartościami otrzymanymi analogicznie dla grupy kontrolnej. Otrzymane wyniki przedstawia tabela I. Pomiary szerokości tkanki chrzęstnej wykazują krzywicę zarówno w grupie kontrolnej jak i w grupach doświadczalnych, przy czym grupy doświadczalne wykazują nieco mniejsze zmiany krzywiczne. Świadczy to, że węglan wapnia nie posiada

Tabela I

Rozwój krzywicy w zależności od dawek Ca
Szczyry na diecie Mc Colluma

Ilość dni od rozpoczęcia podawania Ca	Kontrola	D a w k i Ca					
		10 mg		15 mg		25 mg	
		szerokość tkanki chrzęstnej	% zwiększenia tkanki chrzęstnej w stosunku do kontroli	szerokość tkanki chrzęstnej	% zwiększenia tkanki chrzęstnej w stosunku do kontroli	szerokość tkanki chrzęstnej	% zwiększenia tkanki chrzęstnej w stosunku do kontroli
5	13	14	7.7	12	-7.7	12	-7.7
10	23	21	-8.7	20	-13	19	-17.4
15	28	28	0	26	-7.1	24	14.3

Dane cyfrowe podane w tabelce są wynikami średnimi 3 doświadczeń.

działania krzywiczotwórczego, natomiast w niewielkim stopniu wpływa hamująco na rozwój krzywicy. Uzyskane zmiany w kościach są wynikiem tylko niedoboru pokarmowego witaminy D.

Tabela II

Rozwój krzywicy w zależności od dawek Ca
Szczyry na diecie Mc Colluma z dodatkiem kwasu winowego

Ilość dni od rozpoczęcia podawania Ca	Kontrola	D a w k i Ca					
		10 mg		15 mg		25 mg	
		szerokość tkanki chrzęstnej	% zwiększenia tkanki chrzęstnej w stosunku do kontroli	szerokość tkanki chrzęstnej	% zwiększenia tkanki chrzęstnej w stosunku do kontroli	szerokość tkanki chrzęstnej	% zwiększenia tkanki chrzęstnej w stosunku do kontroli
5	12	12	0	11	-8.3	11	-8.3
10	22	21	-4.5	19	-13.6	20	-9
15	26	25	-3.8	25	-3.8	24	-7.6

Dane cyfrowe w tabelce są wynikami średnimi 3 doświadczeń.

Tabela III

Ilość Ca wydalonego w dobowym moczu i kale wyrażona w mg/100 g wagi szczura

Grupa I dawka dzienna Ca — 43,1 mg				Grupa II dawka dzienna Ca — 55,2 mg				Grupa III dawka dzienna Ca — 66,6 mg				Grupa IV kontrolna dawka dzienna Ca — 25 mg			
Ilość wydalonego Ca z kałem	z mo- czem	Razem	Różnica w stosunku do podawanego Ca	Ilość dobową wydalonego Ca z kałem	z mo- czem	Razem	Różnica w stosunku do podawanego Ca	Ilość dobową wydalonego Ca z kałem	z mo- czem	Razem	Różnica w stosunku do podawanego Ca	Ilość dobową wydalonego Ca z kałem	z mo- czem	Razem	Różnica w stosunku do podawanego
53,0	8,8	61,8	-18,7	60,4	9,4	69,8	-17,6	81,7	4,8	86,5	-19,9	67,9	5,3	67,2	-42,2
54,8	9,3	64,1	-21,0	104,5	10,4	104,9	-62,7	83,3	6,0	89,3	-22,7	58,3	9,2	67,5	-42,5
59,6	8,9	68,5	-25,4	80,6	10,1	90,7	-38,5	85,1	6,8	91,9	-25,3	53,9	6,3	60,2	-35,2
98,0	9,7	106,7	-63,6	110,0	11,5	121,5	-69,3	87,3	6,9	96,2	-29,6	76,8	10,4	87,2	-62,2
82,0	9,0	91,0	-47,9	103,5	11,4	114,9	-62,7	73,4	10,2	83,6	-17,0	80,7	16,5	97,2	-72,2
66,3	15,8	82,1	-39,0	91,5	18,9	110,4	-58,2	102,6	16,5	119,1	-52,7	115,4	6,9	122,3	-97,3
55,4	13,3	68,7	-85,6	93,9	18,7	112,6	-60,4	91,4	20,6	122,0	-45,4	69,8	10,2	80,0	-55,0
125,6	8,9	134,5	-91,4	78,0	20,0	98,0	-45,8	94,9	8,1	103,0	-36,7	78,8	8,8	87,6	-62,6
83,6	8,0	91,6	-48,5	101,7	17,3	119,0	-66,8	93,2	10,9	104,1	-37,5	83,6	14,1	97,7	-72,7
68,6	8,8	77,4	-34,3	78,0	17,1	95,1	-42,9	97,1	12,2	109,3	-42,7	79,0	15,0	94,0	-69,0
86,2	9,8	96,0	-52,9	89,4	15,7	105,1	-52,9	90,8	12,6	103,4	-36,8	106,0	15,8	121,8	-96,8
121,2	12,4	133,6	-90,5	104,6	17,2	121,8	-69,6	89,4	14,7	104,1	-37,5	69,0	16,8	85,8	-60,8
77,2	18,0	95,2	-52,1	97,8	18,9	116,7	-64,5	88,6	18,4	107,0	-40,4	76,7	19,3	96,0	-71,0
81,2	17,0	98,2	-55,1	90,0	19,0	107,0	-56,8	93,2	21,4	111,6	-48,0	75,6	11,5	87,1	-62,1
68,4	8,7	77,1	-33,0	76,4	10,7	87,1	-34,9	61,1	12,2	73,3	-6,7	54,7	11,6	66,3	-41,3

Brak wpływu węglanu wapnia na powstawanie krzywicy przypisywano początkowo niedostatecznej adsorpcji tego związku przez ustrój. Aby ułatwić przyswajanie węglanu wapnia do diety próbowano dodawać cukru mlekowego w ilości 7 g/kg diety i kwasu winowego w ilościach 5 g/kg diety jednakże i w tym wypadku krzywiczotwórczego działania węglanu wapnia nie stwierdzono.

Stan krzywicy w tych doświadczeniach przedstawia tabela II. Próby podawania zwierzętom wapnia w postaci chlorku wapnia w ilościach analogicznych w przeliczeniu na jon Ca, również nie wykazały wpływu na rozwój krzywicy.

Chcąc prześledzić proces przyswajania względnie wydalania przez ustrój jonów wapnia podawanych w nadmiarze, wykonano oznaczenia poziomu wapnia w moczu i kale dobowym szczurów, oraz wyliczono bilans wapniowy (tab. III).

Aby wykonać te oznaczenia szczury podzielone na cztery grupy, umieszczano w klatkach metabolicznych, a dietę podawano im dwa razy dziennie w postaci kulek wagi 6 g każda. W ten sposób zapobiegano stratom diety przez rozsypywanie. Analogicznie do doświadczeń poprzednich trzem grupom zwierząt podawano w ciągu 15 dni węglan wapnia sondą w dawkach odpowiadających 10 mg, 15 mg i 25 mg Ca/szczura. Czwarta grupa była kontrolną.

Wapń w moczu i kale oznaczano codziennie, strącając jon Ca w moczu jako szczawian wg metody *Truszkowskiego, Blauth-Opieńskiej i Iwanowskiej* (4). do tej metody wprowadzono nieznaczne modyfikacje. Wapń w kale oznaczano metodą opisaną przez *Asatianiego* (5). Uzyskane tą drogą wyniki potwierdzają wyniki otrzymane za pomocą zdjęć rtg.

W drugiej serii doświadczeń dotyczących wpływu wersenianu na powstawanie krzywicy, poszczególnym grupom zwierząt podawano następujące dawki wersenianu: 2 mg, 4 mg, 6 mg, 8 mg i 12 mg na szczura, przy czym okres podawania wynosił 10 i 15 dni. Dawki podawanego wersenianu wyliczono stechiometrycznie z ilości tego związku potrzebnej na związanie 1 gramo-atomu wapnia na związek kompleksowy. Rozwój krzywicy badano tak jak i w pierwszej serii doświadczeń wykonując co 5 dni pomiary rentgenowskie grubości chrząstki nasady kości długich i mierząc szerokość tkanki chrzęstnej. Otrzymane wyniki ilustruje tab. IV.

Chcąc zbadać aktywność krzywiczotwórczą wersenianu szczurom pozostającym na pełnowartościowej diecie hodowlanej, podawano dziennie po 6 mg i 8 mg wersenianu na szczura jednakże objawów powstawania krzywicy nie stwierdzono. Wskazuje to, że wersenian przyspiesza powstawanie krzywicy, ale nie posiada własności krzywiczotwórczych. Próby otrzymania pokolenia szczurów z krzywicą od urodzenia nie dały również wyniku. Matki, które po kopulacji pozostawały na diecie *Mc Colluma* nie były w stanie urodzić żywego potomstwa prawdopodobnie wskutek zbyt wielkiej hipowitaminozy.

Aby zbadać mechanizm krzywiczotwórczego działania wersenianu i uzyskać potwierdzenie wyników rentgenologicznych wykonano oznaczenia poziomu wapnia w dobowym moczu i kale oraz surowicy krwi zwierząt doświadczalnych. W tym celu zwierzęta umieszczano w klatkach metabolicznych w warunkach identycznych jak w doświadczeniach z węglanem wapnia. Poziom wapnia oznaczano tymi samymi metodami co w pierwszej serii doświadczeń. Otrzymane wyniki tak, jak i w serii poprzedniej potwierdzają wyniki rtg.

WNIOSKI

Z uzyskanych wyników doświadczeń przedstawionych na tabelach I, II i III wynika, że:

1) węglan wapnia nie wykazuje działania krzywiczotwórczego, natomiast daje się zauważyć niewielki wpływ jonów Ca hamujący rozwój krzywicy,

Tabela IV

Rozwój krzywicy w zależności od dawek wersenianu
Szczury na diecie Mc Colluma

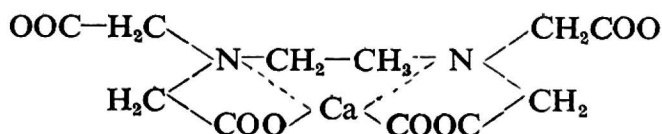
Ilość dni od rozpoczęcia podawania wersenianu	Kontrola	Dawki wersenianu									
		2 mg		4 mg		6 mg		8 mg		12 mg	
		szer. tkanki chrzęstnej	% zwiększ. tkanki chrzęstnej w stosunku do kontroli	szer. tkanki chrzęstnej	% zwiększ. tkanki chrzęstnej w stosunku do kontroli	szer. tkanki chrzęstnej	% zwiększ. tkanki chrzęstnej w stosunku do kontroli	szer. tkanki chrzęstnej	% zwiększ. tkanki chrzęstnej w stosunku do kontroli	szer. tkanki chrzęstnej	% zwiększ. tkanki chrzęstnej w stosunku do kontroli
5	12	12	0	12	0	12	0	13	8,3	16	33,3
10	16	16	0	18	12,5	20	25	21	31,2	23	43,7
15	20	20	0	21	5	24	20	26	30	29	45

Dane cyfrowe podane w tabelce są wynikami średnimi trzech doświadczeń.

2) z różnicy pomiędzy ilością wapnia wydalonego a ilością wapnia podanego wynika, że jony Ca podawane jako węglan są całkowicie wydalane z moczem i kałem.

3) krzywica w grupach zwierząt otrzymujących węglan wapnia wydaje się pochodzić tylko z niedoboru pokarmowego,

4) wersenian w dawkach od 4—12 mg/szczura wyraźnie przyspiesza powstawanie krzywicy u zwierząt pozostających na diecie pozbawionej witaminy D. Działanie jego prawdopodobnie polega na wiązaniu jonów wapnia w ustroju na związek kompleksowy prawdopodobnie o wzorze



Dawką skracającą normalny 15-dniowy okres powstawania krzywicy na

tle niedoboru pokarmowego do 5 dni jest dawka 12 mg wersenianu dziennie na szczura.

5) krzywiczotwórczego wpływu wersenianu w dawkach 6 i 8 mg/szczura przy pełnowartościowej diecie nie stwierdzono.

Я. Ивановска, А. Грохульски, Е. Самойлик

ВЛИЯНИЕ УГЛЕКИСЛОГО КАЛЬЦИЯ И ВЕРСЕНИЯНА НА ВОЗНИКНОВЕНИЕ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО РАХИТА У КРЫС

J. Iwanowska, A. Grochulski, E. Samojlik

THE INFLUENCE OF CALCIUM CARBONATE AND VERSENE ON THE
DEVELOPMENT OF RICKETS IN RATS

PIŚMIENNICTWO

1. Woolly D. W.: A Study of Antimetabolites, 26—27, 1952. — 2. Haris L. J.: Les Anti-vitamines, 188—200, 1949. — 3. Rakowska M.: Praca niepublikowana. — 4. Truszkowski R., Blauth-Opieńska J., Dobrowolska Z., Iwanowska J.: Bioch. J., 32, 1293, 1938. — 5. Asatiani W. S.: Metody biochimizeskich isledowanij, 47—48, 1956.

Otrzymano dnia: 11. IX. 1958 r.