

Год. зб. Биол	кн.55/56	с. 135-150	Скопје	2002-2003
God. zb. Biol		р.	Skopje	

ISSN 1409 - 6889

CODEN: GZPBEJ

УДК: 577.164.2:599.323.4

Оригинален научен труд

**АНТИОКСИДАНТЕН ЕФЕКТ НА ВИТАМИНОТ С ВРЗ  
НЕКОИ ОД БИОМАРКЕРИТЕ НА ЛИПИДНАТА  
ОКСИДАЦИЈА ВО ФУНКЦИЈА НА ВОЗРАСТА И  
АКУТНАТА ХИПЕРТЕРМИЧКА ЕКСПОЗИЦИЈА КАЈ  
БЕЛИОТ ЛАБОРАТОРИСКИ СТАОРЕЦ**

**Митко Младенов <sup>a,\*</sup>, Ицко Ѓорѓоски <sup>a</sup>, Јорданка  
Димовска <sup>a</sup> Васе Танска <sup>a</sup>, Трајче Стафилов <sup>b</sup>**

<sup>a</sup>*Institute of Biology,*

<sup>b</sup>*Institute of Chemistry,*

*Faculty of Natural Sciences and Mathematics, "Sts, Cyril and  
Methodius"*

*University, P.O. Box 162, Skopje 1000, Macedonia*

**Abstract :** Free radical produced during the hiperthermic stress and the aging play an important role in the degenerative process. To investigate the correlation between the oxidative damages caused by the acute heat exposure and the aging, and protective effect of vitamin C on those processes, we have determined the lipid peroxidation and content of endogenous ascorbic acid in the plasma and PGF<sub>2α</sub>, in the liver and kidney from the Wistar rats, at age of 35 days and 22 - 24 months. The duration of heat exposure (40 ± 0.5°C) for heat exposed animals, was approximately two hours. Aging and acute heat exposure significantly increased production of lipid hidroperoxides in rats plasma, but there were no significant differences in plasma lipid hidroperoxides level at young and old heat exposed rats, depending on treatment with vitamin C. The present study suggest that the aging and the heat exposure of rats causes lipid peroxidation and induced apoptotic processes in the

cells. On the other side the protective effect of vitamin C by heat exposed rats reduces lipid peroxidation much more than the process of apoptosis.

**Abbreviations:** AsA, ascorbic acid; GSH, glutathione; PGF<sub>2α</sub>, prostaglandine F<sub>2α</sub>; LHP, lipid hydroperoxide; ROS, reactive oxygen species.

**Keywords:** Vitamin C; Aging; heat exposure; liver; kidney; rats;

## ВОВЕД

Витамином С е моќен антиоксиданс кој реагира со реактивните материји како што се слободните радикали и тоа: хидроксилните радикали, водните пероксилни радикали и супероксидните анјони. Докажано е дека *in vivo* во екстрацелуларната течност, витаминот С реагира со слободните радикали (Cross и сор., 1991) а исто така, испитивана е и улогата на витаминот С *in vivo* во услови на оксидативен стрес (Lykkesfeldt и сор., 1997). Во реакциите на деактивација на реактивните кислородни видови витаминот С врши регенерација на некои мали антиоксидантни молекули како што се α-токоферолот, GSH, уратот и β-каротенот од нивните соодветни радикални форми (Halliwell, 1996). Исто така, докажана е и улогата на витаминот С во заштедата на GSH при зголемен оксидативен стрес во *in vivo* услови (Meister, 1991).

Витамином С претставува идеален антиоксиданс поради две главни одлики. Прво поради нискиот едноелектронски редукционен потенцијал на аскорбатот и неговиот едноелектронски оксидационен продукт аскорбил радикалот, и второ, бидејќи аскорбилниот радикал формиран при реакцијата на аскорбатот и реактивниот кислород има ниска реактивност. Аскорбил радикалот веднаш по неговото формирање се редуцира до аскорбат. Ваквата реакција е катализирана од NADH-зависна семидехидроаскорбат редуктаза (Wells & Jung, 1997), и NADPH-зависната селеноензим тиоредоксин редуктаза (May, 1998) и трета, бидејќи аскорбил радикалот може да помине во аскорбат и преку неензимски реакции при кои истиот дисмутира во стабилен аскорбат и дехидроаскорбинска киселина која може да се редуцира до аскорбат со помош на GSH или со GSH-зависните ензими (Wells & Jung, 1997).

Физиолошките механизми поврзани со возраста кои се одговорни за контролата на оксидативниот стрес сеуште не се целосно дефинирани (Hall и сор., 2000). Постојат голем број на хипотези кои укажуваат на фактот дека целуларната акумулација на оксидативните метаболити е во директна корелација со намалениот функционален капацитет на постарите организми (Ames и сор., 1993; Sohal & Weindruch, 1996). Во однос на оваа, значајно е да се

разбере дека целуларната дистрибуција на клучните антиоксиданси во живите организми е во функција на возраста. Докажано е дека еден од најзначајните клеточни антиоксиданси е аскорбинската киселина AsA, која според некои автори е окарактеризирана и како биомаркер на оксидативниот стрес (Lykkesfeldt и сор., 1995). Иако постојат голем број испитувања во оваа насока, сеуште не е докажана јасната врска помеѓу концентрацијата на AsA и возрасата (Barja, 1996). Постојат истражувања кои укажуваат на намалување на нивото на AsA во функција на возраста кај машки стаорци додека кај женските скоро и да нема промени (Rikkans & Moore, 1988).

Jayachandran и сор. (1996) докажале дека третманот со витамин С го зголемува антиоксидантниот капацитет на организмот. Имено, во таквите истражувања констатирано е дека, при зголемено ниво на оксидативен стрес, старите стаорци имаат намалена способност да ја активираат антиоксидантната одбрамбена линија за разлика од младите. Исто така, треба да се напомене дека екстерното додавање на витамин С доведува до зголемување на концентрацијата на AsA во организмот (Jayachandran и сор., 1996). Во контекст на оваа е и зголементата термотолерантност кај стаорците третирани со витамин С во однос на нетретираниите (Gjorgoski и сор., 2001).

Хипертермичкиот стрес доведува до зголемено создавање на слободни радикали кои предизвикуваат оштетување (липидна пероксидација на полинезаситените масни киселини) на клеточната мембрана (Laudicina & Marnett., 1990). Од друга страна докажано е дека експозицијата на висока надворешна температура доведува до намалување на концентрацијата на антиоксидантните витамини (витамин С и витаминот Е). Според општо прифатената антиоксидантна теорија, во услови кога доаѓа до намалување на концентрацијата на антиоксидантните витамини, липидната пероксидација во плазмата и ткивата се зголемува. Во прилог на тоа се и резултатите добиени од истражувањата на (Jayachandran и сор., 1996) според кои, липидната пероксидација се зголемува со зголемувањето на возраста кај стаорците, а истото се случува и при дефициентност на AsA.

Најчесто мерените маркери на липидната пероксидација се алдехидите, малондиалдехидот (MDA) и 4-хидроксинонеалот (HNE). Меѓутоа во поново време F<sub>2</sub>-изопропаните, како што е 8-еріPGF<sub>2α</sub> имаат водечка улога како специфични биомаркери на липидната пероксидација (De Zwart и сор., 1999). Според истиот автор, ослободувањето на волатилните јагледородороди како што се пентанот и етанот исто така, можат да се искористат како индикатори на *in vivo* липидната пероксидација. Постојат релативно мал број на испитувања кои укажуваат на тоа дека витаминот С во плазмата ја намалува продукцијата на липидни хидропероксиди (LHP) како и 8-ері-PGF<sub>2α</sub> во физиолошки услови. Меѓутоа изненадувачки е податокот дека се поголем број на испитувања упатуваат на фактот дека витаминот С маркантно ја супримира продукцијата на липидни хидропероксиди и PGF<sub>2α</sub> во услови на оксидативен стрес (Berger и сор., 1996). Голем број на истражувања исто така, укажуваат на намалување на ендогените количества на MDA (малондиалдехидот) и TBARS (tiobarbituric reactive substances) кај морските прасиња и генетички скорбутичните стаорци (Osteogenic disorder Shionogi, или ODS) по една подол-

готрајна суплементација со витамин С (Kimura и сор., 1992; Varja и сор., 1996; Tamaka и сор., 1997). Протективното дејство на витаминот С особено доаѓа до израз кај животните подложни на оксидативен стрес (Helen & Vijayammall, 1997). Резултатите од некои истражувања упатуваат на фактот дека суплементацијата со витамин С нема ефект врз липидната пероксидација (Cadeuas и сор., 1996), меѓутоа денешните истражувања кај морските прасиња во услови на косуплементација на витаминот С со железото покажуваат намалување на *ex vivo* MDA акумулацијата (Collis и сор., 1997) како и намалување на нивото на  $PGF_{2\alpha}$  во различни ткива (Frei и сор., 1991). Непобитен е фактот што произлегува од овие истражувања, дека недостатокот на витамин С кај морските прасиња условува зголемена концентрација на  $PGF_{2\alpha}$  во црниот дроб и плазмата, која што значајно се намалува после неколку дневна суплементација со витамин С. Во испитувањата кои биле направени по добивањето на ваквите констатации, било утврдено дека нивото на витамин С во црниот дроб кај стаорците е инверзно поврзано со нивото на  $PGF_{2\alpha}$  во овој орган, спротивно од онаа на железото.

Целите на нашето истражување произлегоа од нашите претпоставки дека третманот со витамин С може да ја зголеми термотолерантноста како резултат на редуцијата на оксидативниот стрес и ткивните оштетувања. На ваквата хипотеза и претходеа резултатите од нашите претходни истражувања кои укажуваа на редуција на морталитетот во услови на хипертермички стрес кај стаорците третирани со витамин С.

Со цел да се утврди антиоксидантното значење на витаминот С при експозиција на висока надворешна температура, беа испитувани различните биомаркери за липидни оксидативни нарушувања. Исто така наша цел беше да утврдиме дали промените во концентрацијата на витаминот С во зависност од возраста, корелираат со промените на параметрите на оксидативниот стрес.

## МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ

Експериментот беше изведен на бели лабораториски стаорци, (сој Wistar) од машки пол ( $n = 120$ ). Сите експериментални животни беа поделени во осум експериментални групи. Четирите групи беа стаорци на возраст од 14 дена, поделени во зависност од третманот со витамин С и хипертермичката експозиција на: 1. млади нетретирани и неекспонирани {[МН] – [контрола]}, 2. млади нетретирани експонирани [МНex], 3. млади третирани и неекспонирани [МТ], и 4. млади третирани и експонирани [МТex] стаорци. Другите четири групи стаорци на возраст од 20 - 22 месеци беа поделени на ист начин како и младите стаорци на: 1. стари нетретирани и неекспонирани {[СН] – [контрола]}, 2. стари нетретирани експонирани [СНex], 3. стари третирани и неекспонирани [СТ], и 4. стари третирани и експонирани [СТex] стаорци.

Витаминот С (ICN Galenika) беше инјектиран интраперитонеално (1,5 mg на 100 g телесна маса) секој ден во период од 21 ден пред експозицијата на

висока надворешна температура. За време на третманот сите животни престојуваа на собна температура ( $20 \pm 2$ ) °C и светлосен режим 12 : 12 часа, а беа хранети со стандардна лабораториска храна и вода *ad libitum*.

Експериментите беа изведувани 24 часа по последното хранење и третман со витамин С. Експонирањето на висока надворешна температура се вршеше индивидуално, во специјални топлински комори, со можност за одржување на константна температура од  $40 \pm 1$  °C. За време на хипертермичката експозиција беше следена ректалната температура [ $T_{re}$ ]. Телесната температура беше мерена на секои 10 минути до  $41,5 \pm 0,4$  °C, а потоа на секои 2 минути. Моментот кога ќе беше измерена  $T_{re}$  од  $42,5 \pm 0,4$  °C беше сметан како крај на хипертермичката експозиција.

По хипертермичкиот стрес и третманот со витамин С, експерименталните животни беа наркотизирани со етерна наркоза и беа жртвувани. За анализа на AsA, и LHP, беше земена крв од абдоминалната аорта која беше колекционирана во хепаринизирани вакутанери. Ткивата од органите за анализа се собираа веднаш по жртвувањето, при што парчињата беа перфундирани во физиолошки раствор, и замрзнати во течен азот, а потоа чувани на -80 °C. Замрзнатите ткива на денот на анализирањето беа хомогенизирани со ултрасоничен хомогенизатор (Cole – Parmer Instrument – 4710) на температура од 0 - 4°C.

### **1. Ойределување на концентрацијата на AsA**

Концентрацијата на AsA беше одредена по методата на (Kampfinkel и сор. (1995). Принципот на методот за определување на концентрацијата на AsA се состои во редукцијата на  $Fe^{3+}$  до  $Fe^{2+}$  со аскорбинска киселина, при што спектрофотометриската детерминација на  $Fe^{2+}$  се врши преку негово комплексирање со 0.015 mol/l Ferrozine.

Хомогенатите од црниот дроб и бубрезите беа центрифугирани на 10 000 g 10 мин на собна температура. Добиениот супернатант беше користен за анализа на концентрацијата на аскорбинската киселина. Анализата во плазмата беше извршена директно.

### **2. Ойределување на концентрацијата на $PGF_{2\alpha}$**

За квантитативна анализа на  $PGF_{2\alpha}$  беше применувана ELISA метода. Определувањето на концентрацијата на  $PGF_{2\alpha}$  е на принципот на конкуренција помеѓу ензимскиот коњугат и  $PGF_{2\alpha}$  во примерокот за лимитираниот број на врзувачки места на антителата фиксирани во секое бунарче од microplate плочката.

Најнапред примерокот или стандардниот раствор се додава во microplate бунарчињата. Во нив се додаваат дилуираните ензимски коњугати. Мешавината се инкубира на собна температура со постојано мешање. По инкубацијата microplate плочките се испираат, при што се отфрла неповрзаниот материјал. Врзаниот ензимски коњугат се детектира со додавање на

супстрат кој што генерира оптимално обојување во следните 30 минути. Квантификацијата се врши со мерење на апсорбанцата на примероците која се споредува со апсорбанцата на стандардите на microplate reader на 650 nm. Јачината на развиеното обојување е обратно пропорционално на количината на  $PGF_{2\alpha}$  во примерокот и стандардот. На пример, отсуството на  $PGF_{2\alpha}$  во примерокот резултира со светло виолетово обојување, а присуството на  $PGF_{2\alpha}$  со намалување на интензитетот или целосно обезбојување на примерокот.

### 2.1. Екстракција на $PGF_{2\alpha}$

1. Најнапред ткивата се хомогенизираат во 15 % метанол во 0,1 mol/l фосфатен пуфер, pH 7,5 (100 mg во 1ml фосфатен пуфер). Потоа хомогенатот се центрифугира 5. мин, а супернатантот се аспирира во стерилни епрувети.

2. Прекондиционирањето на  $C_{18}$  Sep-Pak<sup>®</sup> колоните (Amersham<sup>®</sup> Corporation) беше извршено со испирање на колоните со 2 ml метанол и 2 ml вода.

3. По апликацијата на соодветните примероци во колоните проточната рата беше регулирана на 1 ml/min.

4. Колоните се испираат со 2 ml 15% метанол во вода, а потоа со 2ml петрол етер.

5. Елуирањето на  $PGF_{2\alpha}$  се вршеше со 2 ml метил формијат.

6. Евапорацијата на метил формијатот од елуентот се вршеше со проток на гасовит азот.

7. Сувиот остаток се раствараше во 1 ml разреден пуфер за екстракција, при што за квантификација се земаат дупликати од по 50  $\mu$ l.

Тест процедурата, како и определувањето на добиените вредности, се вршеше, според инструкциите на производителот Neogen<sup>®</sup> Corporation Prostaglandin  $F_{2\alpha}$  – ELISA (Kit Instruction, product # 404710).

### 3. Определување на концентрацијата на LHP

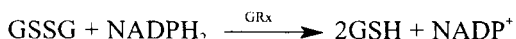
Најдиректен начин за мерење на липидната пероксидација се обезбедува со квантификацијата на примарните продукти на липидната пероксидација, како што се липидните хидропероксиди (LHP) (Coudray и сор., 1995). Ваквите продукти се релативно стабилни и најчесто настануваат како резултат на атакот на слободните радикали врз поли-незаситените масни киселини или како резултат на активноста на ензимите липоксигенази. Токму затоа нивното мерење може да даде информации за степенот на пероксидација. Една од неколкуте референтни методи кои користат директна оксидација на јодидите со LHP е опишана од (Gebicki & Guille, 1989). Меѓутоа, истата не се одликува со висока сензитивност во присуство на атмосферски кислород. Покрај, оваа метода, една од најчесто експлоатираниите е методата по (Heath & Tappel, 1976) подоцна модифицирана од (Allen и сор., 1990). Принципот на оваа метода се состои во збирната реакција на глутатион пероксидазата и глутатион редуктазата. Меѓутоа овие ензими најчесто постојат во испитуваните примероци во концентрации кои значително влијаат врз резултатот.

Оптимизацијата по (Coudray и сор., 1995) го елиминира ваквиот недостаток со третирање на примерокот за анализа и инактивирање на присутните ензими, со цел да се обезбеди подобра стандардизација на постапката, а воедно би се задоволите и аналитичките критериуми.

Глутатион пероксидазата ја катализира редукцијата на LHP (ROOH) во присуство на глутатион (GSH), до соодветни алкохоли:



Реакцијата е проследена со обновување на глутатионот преку оксидација на NADPH<sub>2</sub> во присуство на глутатион редуктаза:



Намалувањето на апсорбанцата на NADPH<sub>2</sub> на 340 nm е во директна функционална зависност од концентрацијата на LHP присутни во реакционата смеса. Концентрацијата на LHP се одредува со помош на калибрациона крива од tertciereen-butyl hidroperoksid како стандард.

#### 4. Ой̄ределување на концен̄трацијата на вкӯини й̄рош̄еини

Методата се базира на градење обоени производи од ароматични аминокиселини со Folin – Ciocalten реагенсот во комбинација со биуретна реакција за пептидни врски. Како стандарден р-р беше користен BSA растворен во соодветен медиум за хомогенизација во концентрации од 0,1 – 1 mg/l. Резултатите беа изразени како mg/g ткиво.

#### 5. С̄татистичка анализа

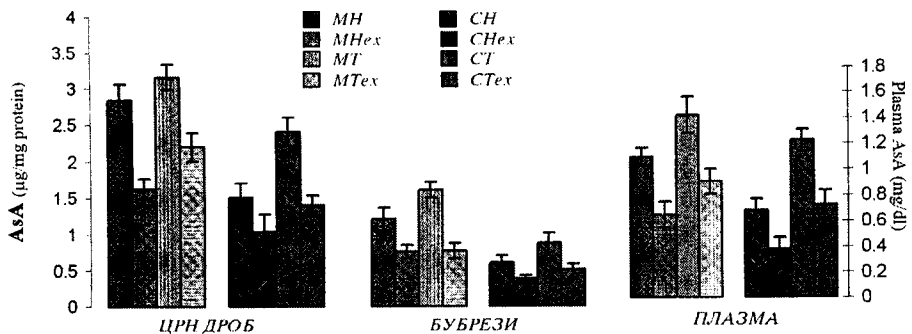
Резултатите се претставени како средни вредности ± стандардна грешка (SE). Влијанието на возраста, ефектот на третманот со витамин С и акутната хипертермичка експозиција беа определени со примена на *One way analysis of variance (ANOVA)*. Студентовиот *t-test* со Bonferoni корекција беше применет за детерминација на разликите помеѓу групните парови. Статистичката сигнификантност беше дефинирана за  $p < 0.050$ .

## РЕЗУЛТАТИ

### 1. Влијанието на возраст̄а, витамин̄ С и акутната хипертермичка експозиција врз ниво̄то на AsA

Резултатите од истражувањата за влијанието на возраста, витаминот С и акутната хипертермичка експозиција врз нивото на AsA се прикажани на

слика 1. Од истите јасно се гледа дека возраста кај белиот лабораториски стаорец условува високо сигнификантно намалувањето на концентрацијата на AsA како во крвната плазма ( $p < 0,001$ ), така и во црниот дроб ( $p < 0,001$ ) и бубрезите ( $p = 0,001$ ). Може да се констатира дека кај младите стаорци витаминот С предизвика сигнификантно зголемување на AsA во крвната плазма ( $p < 0,001$ ), и бубрезите ( $p < 0,001$ ), додека во црниот дроб зголемувањето беше статистички несигнификантно ( $p = 0,300$ ). За разлика од тоа, третманот со витамин С кај старите стаорци предизвика статистички значајно зголемување на AsA во плазмата ( $p < 0,001$ ), црниот дроб ( $p < 0,001$ ) и бубрезите ( $p = 0,0139$ ). Што се однесува до значењето на витамин С третманот во однос на возраста истиот доведе до покачување на концентрацијата на AsA во крвната плазма кај старите третирани до онаа на младите третирани стаорци, така што помеѓу овие две групи на стаорци во плазмата не постоеше сигнификантна разлика ( $p = 0,093$ ), додека во црниот дроб и бубрезите постоеа високо сигнификантни разлики ( $p < 0,001$ ). Од добиените резултати се гледа дека експозицијата на висока надворешна температура доведе до сигнификантно намалување на концентрацијата AsA кај младите стаорци, и тоа во плазмата, црниот дроб и бубрезите ( $p < 0,001$ ) соодветно. Кај старите стаорци, акутната хипертермичка експозиција доведе до сигнификантно намалување на концентрацијата на AsA во плазмата ( $p = 0,001$ ), и црниот дроб ( $p = 0,0136$ ), додека во бубрезите намалувањето беше несигнификантно ( $p = 0,0637$ ).



**Слика.1** . Концентрација на AsA во хепар, бубрези и плазма. МН-млади нетретирани, МНех-млади нетретирани хипертермички експонирани, МТ-млади третирани, МТех-млади третирани хипертермички експонирани; СН-стари нетретирани, СНех-стари нетретирани хипертермички експонирани, СТ-стари третирани, СТех-стари третирани хипертермички експонирани стаорци.

Концентрацијата на AsA во однос на возраста и по хипертермичката експозиција го задржа трендот на намалување, така што беше забележано високо сигнификантно намалување во плазмата ( $p = 0,004$ ), како и во црниот дроб и бубрезите ( $p < 0,001$ ). Во однос на третманот со витамин С, акутната хипертермичка експозиција предизвикува високо сигнификантно намалување на концентрацијата на AsA во плазмата, црниот дроб и бубрезите ( $p <$

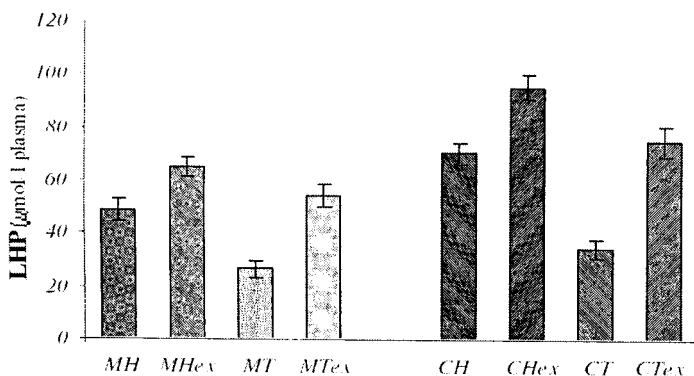


0,001) кај младите и старите третирани хипертермички експонирани во однос на младите и старите третирани стаорци. Трендот на сигнификантно намалување при акутна хипертермичка експозиција во однос на возраста и третманот со витамин С остана во истите рамки при што во плазмата имавме несигнификантно намалување ( $p = 0,194$ ) додека во црниот дроб ( $p < 0,001$ ) и бубрезите ( $p = 0,013$ ) намалувањето беше сигнификантно.

## 2. Влијанието на возраста, витаминот С и акутната хипертермичка експозиција врз нивото на LHP во крвната плазма

Резултатите од истражувањата за влијанието на возраста, витаминот С и акутната хипертермичка експозиција врз нивото на LHP се прикажани на слика 2.

Со зголемувањето на возраста концентрацијата на LHP во плазмата сигнификантно се зголеми ( $p < 0,001$ ). Третманот со витамин С доведе до високо сигнификантно намалување ( $p < 0,001$ ) кај младите и старите третирани во однос на младите и старите нетретирани стаорци, соодветно.

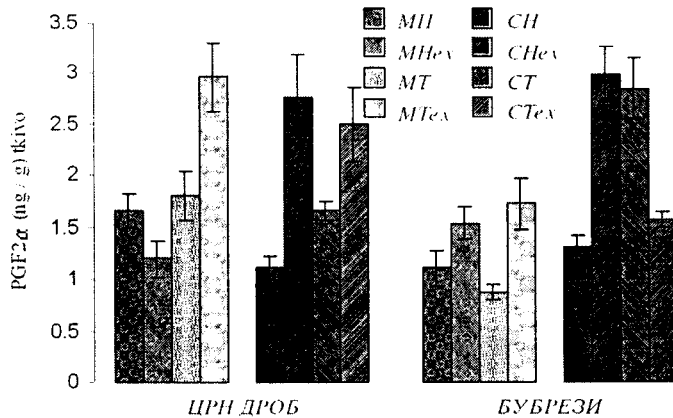


Слика 2. Концентрацијана LHP во крвната плазма. (Легендата е иста како на слика 1.)

Од добиените резултати може да се заклучи дека витаминот С предизвика, намалување на LHP концентрацијата кај старите третирани во рамките на онаа кај младите третирани стаорци, така што во нивото на LHP помеѓу младите и старите третирани стаорци не постоеше статистички значајна разлика ( $p = 0,116$ ). Акутната хипертермичка експозиција предизвика високо сигнификантно зголемување ( $p < 0,001$ ) на LHP концентрацијата во плазмата независно од староста. Третманот со витамин С, не доведе до промена на високо статистички сигнификантното зголемување ( $p < 0,001$ ) во однос на возраста при акутната хипертермичка експозиција.

### 3. Влијанието на возрастa, витаминот С и акутна хипертермичка експозиција врз нивоа на $PGF_{2\alpha}$ во црниот дроб и бубрезите

Резултатите од истражувањата за влијанието на возраста, витаминот С и акутната хипертермичка експозиција врз нивоа на  $PGF_{2\alpha}$  се прикажани на слика 3. Од истите јасно се гледа дека староста речиси воопшто не влијае врз концентрацијата на  $PGF_{2\alpha}$  и во црниот дроб и во бубрезите, при што ( $p = 0,062$ ) за црниот дроб, и ( $p = 1,000$ ) во бубрезите. Третманот со витамин С не доведе до статистички сигнификантни промени на  $PGF_{2\alpha}$  концентрацијата во црниот дроб ( $p = 1,000-0,061$ ) кај младите и старите третирани во однос на младите и старите нетретирани стаорци. Во бубрезите несигнификантната промена остана кај младите третирани во однос на младите нетретирани ( $p = 1,000$ ), додека кај старите третирани во однос на старите нетретирани стаорци, промената во  $PGF_{2\alpha}$  концентрацијата беше високо сигнификантна ( $p < 0,001$ ). Третманот со витаминот С и во однос на возраста не доведе до сигнификантни промени на  $PGF_{2\alpha}$  концентрацијата во црниот дроб ( $p = 1,000$ ). Во бубрезите благодарение на особено високото зголемување  $PGF_{2\alpha}$  кај старите третирани стаорци, третманот со витаминот С доведе до висока сигнификантна разлика помеѓу младите и старите третирани стаорци ( $p < 0,001$ ). Кај младите стаорци акутната хипертермичка експозиција не предизвика никакви сигнификантни промени ниту во црниот дроб ( $p = 0,255$ ) ниту во бубрезите ( $p = 0,924$ ).



Слика 3. Концентрацијана  $PGF_{2\alpha}$  во црниот дроб и бубрезите. (Легендата е иста како на слика 1.)

Кај стрите стаорци, акутната хипертермичка експозиција доведе до високо сигнификантно зголемување ( $p < 0,001$ ) и во црниот дроб и во бубрезите. Акутната хипертермичка експозиција допринесе да несигнификантната разлика во концентрацијата на  $PGF_{2\alpha}$  во зависност од возраста помине во високо сигнификантна ( $p < 0,001$ ) по хипертермичката експозиција. Ефектот на акутната хипертермичка експозиција во однос на третманот со витамин С

е покомплексен. Имено истата, предизвика сигнификантно зголемување на  $\text{PGF}_{2\alpha}$  концентрацијата во црниот дроб ( $p < 0,001$ ) кај младите и старите третирани хипертермички експонирани во однос на младите и старите третирани неекспонирани стаорци, соодветно. Во бубрезите ваквото зголемување беше несигнификантно ( $p = 0,133$ ) кај младите третирани хипертермички експонирани во однос на младите третирани неекспонирани, додека кај старите третирани хипертермички експонирани во однос на старите третирани неекспонирани стаорци, настана високо сигнификантно намалување ( $p < 0,001$ ). Третманот со витамин С во однос на хипертермичката експозиција придонесе да дојде до сигнификантно зголемување на  $\text{PGF}_{2\alpha}$  во црниот дроб ( $p < 0,001$ ) кај младите третирани хипертермички експонирани во однос на младите нетретирани хипертермички експонирани стаорци. Во бубрезите помеѓу истите групи постоеше несигнификантна разлика ( $p = 0,917$ ). Кај соодветните групи од старите стаорци третманот со витамин С во однос на акутната хипертермичка експозиција влијаеше во спротивна насока така што во црниот дроб предизвика несигнификантно намалување ( $p = 0,295$ ), додека во бубрезите ваквото намалување беше високо сигнификантно ( $p < 0,001$ ).

## ДИСКУСИЈА

Според поставената цел нашите истражувања беа насочени кон утврдување на липидната оксидација и антиоксидантниот систем во крвната плазма, црниот дроб и бубрезите кај белиот лабораториски стаорец, при третман со витамин С. Третманот со витамин С во основа резултираше со зголемување на нивото на AsA кај двете третирани групи. Позитивната релација на AsA со липидните индикатори на оксидативниот стрес на ниво на крвната плазма, хепарот и бубрезите, не упатува на фактот дека ваквата улога на детерминантата на оксидативниот стрес е индиректна и ваквата индукција претставува рефлексивна на процесот на стареење.

Познато е дека AsA е хидрофилен антиоксидант и истиот може директно да стапува во реакција со  $\text{O}_2$ , OH $\cdot$  и LHP. Концентрацијата на AsA е мошне ниска во клетките богати со митохондри како што се хепатоцитите. Причината за ваквата состојба лежи во тоа што, митохондриите претставуваат значајни места во создавањето на кислородни радикали. AsA е многу посилен антиоксиданс отколку протеинските тиоли и токоферолот во плазмата во *in vitro* услови (Frei и сор., 1991). Концентрацијата на AsA опаѓа со зголемувањето на возраста, што секако е поврзано со зголемените оксидативни нарушувања од најразличен тип. Имено во овие услови AsA ја превзема улогата во борбата со создадените слободни радикали, а тоа условува зголемување на содржината на GSH. Ваквата сразмерност во зголемувањата на концентрациите на AsA и GSH при третманот со витамин С во нормални физиолошки услови се должи на тоа што GSH во основа ја овозможува редукцијата на 2-електронскиот оксидационен продукт на AsA дехидроаскорбинската

киселина која по редукцијата преминува во аскорбат. Согласно со ова колку реакциите на деоксигенација на слободните радикали се поинтензивни толку продукцијата на дехидроаскорбат е поголема, а напоредно со тоа и потрошувачката на аскорбат и GSH е сразмерно зголемена. Во прилог на оваа се и резултатите од истражувањата на (Meister, 1994). Во овие истражувања е констатирано дека кај GSH дефициентните новородени стаорци, [GSH дефициентноста е постигната преку администрација со фосфорилирна форма на L-buthionine-(SR)-sulfoximine-(BSO)], се јавуваат целуларни оштетувања на ниво на црниот дроб, бубрезите и мозокот, па истите угинуваат до петтиот ден од животот. Според истите истражувања, смртта и ткивните оштетувања би можеле да бидат превенирани со егзогено додавање на аскорбат. Meister (1994), ваквата состојба ја објаснува со фактот дека дефициентноста на GSH е придружена со дефициентност на AsA која на ниво на хепатоцитите изнесува дури 80%. Со егзогеното додавање на AsA доаѓа до покачување на нивото на AsA во црниот дроб, што и би се очекувало. Во контекст на оваа е и фактот дека со стереоењето на организмите исто така е поврзано и значителното покачување на концентрацијата на витамин Е (двата витамини не беа последователно следени), за чие што регенерирање од неговата оксидирана форма е одговорен витаминот С.

Постојат голем број на истражувања за начинот на кој аскорбатот и дехидроаскорбатот се пренесуваат низ клеточната мембрана. Имено се поголем е бројот на сознанијата кои укажуваат на фактот дека основна транспортна форма на аскорбатот низ клеточната мембрана претставува дехидроаскорбатот. При тоа констатирано е дека аскорбатот најнапред треба да се оксидира до дехидроаскорбат, и како таков ја поминува клеточната мембрана. Во клетката дехидроаскорбатот се редуцира до аскорбат со помош на GSH.

Кај AsA дефициентните стаорци опишани се митохондријални дегенерации и мултиоргански оштетувања пропратени со намалена синтеза на колаген и коскено ткиво. Ваквите промени се поврзуваат со оксидативна инактивација на пролил хидроксилаза-та чиј што коензим  $Fe^{2+}$  во вакви услови се оксидира до  $Fe^{3+}$ . Истражувањата покажале дека пролил хидроксилаза-та е изградена од  $\alpha$  и  $\beta$  субединица. Првата,  $\alpha$  субединицата е таа која претрпува оксидативна инактивација, па затоа истата може да биде реактивирана од страна на аскорбатот, кој во основа врши редукција на  $Fe^{3+}$  до  $Fe^{2+}$  кој е кофактор за активноста на prolyl hydroxylasa-та (Koivu и сор., 1987). За разлика од тоа,  $\beta$  субединицата има GSH-зависна протеин дисулфидна изомеразна активност (Wells & Jung 1992). На овој начин GSH зависната редукција на дехидроаскорбатот формиран во реакцијата на реактивација на prolyl hydroxylasa-та, може да биде катализирана од  $\beta$  субединицата на prolyl hydroxylasa-та.

Според нашите резултати LHP во плазмата се со значително повисока концентрација кај постарите во однос на помладите стаорци. Тоа претставува само уште една потврда дека со процесот на стареење, кај организмите настануваат значителни промени во метаболизмот на липидите.

LHP може да се создаде во организмот како резултат на апстракција на еден водороден атом од полинезаситените масни киселини како и при

реакциите на големиот број слободни радикали со полинезаситените масни киселини. За овие органски молекули се знае дека се инволвирани во голем број на процеси кои резултираат со различни дегенеративни нарушувања што го забрзуваат процесот на стареење (Ames и сор., 1993).

Истражувањата на (Hansen и сор., 1991), покажале дека, аскорбинската киселина претставува антиоксиданс што е растворлив во вода, со способност да спречува оксидативни нарушувања на клеточната мембрана, кои многу често можат да бидат индуцирани од различни слободни радикали. Хидрофилната аскорбинска киселина, меѓутоа не е во состојба да ги спречи штетните влијанија на липофилните слободни радикали во самата клеточна мембрана. Но сепак, докажано е нејзиното значење во процесите на регенирање на  $\alpha$ -токоферолот од неговата оксидирана форма, правејќи го на тој начин способен за континуирана интеракција со липофилните слободни радикали (Hansen и сор., 1991). Во контекст на оваа се и нашите резултати од кои се гледа дека зголемувањето на концентрацијата на LHP како резултат на стареењето на организмите, е пропратено со намалување на концентризцијата на AsA во плазмата.

Несомнено, еден од значајните фактори за настанување на процесот на апоптоза е интрацелуларниот оксидативен стрес. Постојат голем број на истражувања од кои јасно може да се заклучи дека создавањето на реактивни кислородни радикали ROS, е резултат на влијанието на различни типови на физички стрес. На ваквите слободни радикали во поново време, покрај индукцијата на антиоксидантната одбрана, се повеќе им се препишува и значајна улога во процесот на апоптоза (Gossens и сор., 1995 и Jacobson, 1996). Ваквите интрацелуларни ROS молекули се контролирани од антиоксидантните одбрамбени механизми, помеѓу кои значајно место има и  $\text{PGF}_{2\alpha}$ .

Според нашите резултати може да се констатира дека кај младите стаорци во услови на висока надворешна температура, третманот со витамин С доведува до супресија на процесот на апоптоза, за разлика од тоа кај старите вакви манифестации не беа констатирани. Од друга страна, третманот со витамин С предизвика енормно намалување на концентрацијата на LHP во плазмата (Rappo и сор., 1979). Истражувањата потврдиле дека ваквото намалување се должи, покрај другото и на реакцијата на 5-LO која го катализира разградувањето на LHP во присуство на редокс агенс каков што е и витаминот С. Иницијален чекор во оваа реакција е хемолитичкото кинење на пероксидната врска при што доаѓа до создавање на алкоксилен радикал. За време на ваквата реакција нативната феро-5-липоксигеназа се редуцира до нејзината фери форма. Алкоксилните радикали при тоа субсеквентно се распаѓаат формирајќи секундарни продукти и тоа: (КЕТЕ)-кетодиени, кратко-синцирести алдехиди, алкани како и оксидирани димери на масни киселини. Витаминот С врши редукција на фери ензимската форма до феро-форма, така што самиот каталитички циклус може повторно да започне.

**ЛИТЕРАТУРА**

Allen, K., Hung, C., and Morin, C., 1990. Determination of picomole quantities of hydroperoxides by a coupled glutathione peroxidase and glutathione reductase and glutathione disulfide specific glutathione reductase assay. *Anal. Biochem.* 186: 108-111.

Ames, B.N., Shigenaga, M.K., Hagen, T.M., 1993. Oxidants, antioxidants and degenerative disease of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90, 481 – 485.

Barja, G. 1996. Ascorbic acid and aging. In "Subcellular Biochemistry" (J.R.Harris, eds), Vol. 25, pp.157-158. Plenum press, New York.

Berger, T.M., Polidori, M.C., Dabbagli, A., Evans, P.J., Halliwell, B., Morrow, J.D., Roberts, L.J., and Frei, B., 1997. Antioxidant activity of Vitamin C in iron overloaded human plasma. *J. Biol. Chem.* 272, 15656-15660.

Cadeuas, D., Stocker, R., England, L., Ames, B.N., 1996. Ascorbate: the most effective antioxidant in human plasma. In: Emerit, I., Packer, L., Auclair, C, editors. *Antioxidants in therapy, and preventive medicine.* New York: Plenum Press, 1991, p. 155-164.

Cross, C. E., van der Vliet, A., O'Neill, C.A., Louie, S., and Halliwell, B., 1991. Oxidants, antioxidants and respiratory tract lining fluids. *Environ. Health Perspect.* 102, 185-191.

Collis, C.S., Yang, M., Diplock, A.T., Hallinan, T., and Rice-Evans, C.A., 1997. Effects of co-supplementation of iron with ascorbic acid on antioxidant-pro-oxidant balance in the guinea pig. *Free. Rad. Res.* 27, 113-121.

Coudray, C., Richard, M.J., Favier, A.E., 1995. Determination of primary and secondary lipid peroxidation products: Plasma lipid hydroperoxides and thiobarbituric acid reactive substances; *Analysis of free Radicals in Biological Systems*, 2; 185 - 200.

De Zwart, L.L., Meerman, J.H.N., Commandeur, J.N. M., and Vermeulen, N.P.E., 1999. Biomarkers of free radical damage: applications in experimental animals and in humans. *Free Rad. Biol. Med.* 26, 202-226.

Frei, B., Stocker, R., England, L., Ames, B.N., 1991. Ascorbate: the most effective antioxidant in human plasma. In: Emerit, I., Packer, L., Auclair, C, editors. *Antioxidants in therapy, and preventive medicine.* New York: Plenum Press, 1991, p. 155-164.

Gossens, V., Grooten, J., Vos, K.D., and Fiers, W., 1995. Direct evidence for tumor necrosis factor induced mitochondrial reactive oxygen intermediates and their involvement in cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92, 8115-8119.

Gjorgoski, I.K., Mladenov, M., Dimovska, J., 2001. The importance of some antioxidant enzyme at rats treated with vitamin C and hypertermic exposed. 53-54; 103 -110.

Gebicki, J., and Guille, J., 1989. Spectrophotometric and high-performance chromatographic assays of hydroperoxides by iodometric technique. *Anal. Biochem.* 176; 360-364.

Halliwell, B. 1996., Vitamin C: antioxidant or pro-oxidant *In vivo* ? *Free. Rad. Res.* 25, 139 – 151.

Hall, D.M., Buettner, G.R., Oberley, L.W., Hu, L., Matthes, R.D., Gisolfi, C.V., 2000. Mechanisms of circulatory and intestinal barrier dysfunction during whole body

hyperthermia. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 280, 509 – 521

Heath, R., and Tappel, A.H., 1976. A new sensitive assay for the measurement of hydroperoxides. *Anal. Biochem.* 7: 184-191.

Helen, A., and Vijayammall. P.L., 1997. Vitamin C supplementation on hepatic oxidative stress induced by cigarette smoke. *J. Appl. Toxicol.* 17, 289-295.

Hensen, B., Labugger R, Aebischer CP, Skepper JN, Bachschmid M, Spitzer V, Kilo J, Altwegg L, Ullrich V, Luscher TF., 1991. Cardiovascular aging is associated with vitamin E increase. *Circulation.* 9;105(14): 1635-8.

Jacobson, M.D., 1996. Reactive oxygen species and programmed cell death. *TIBS* 21, 83-86.

Jayachandran, M., Jayanthi. B., Sundaravadeivel, B., Panneerselvam. C., 1996. Status of lipids, lipid peroxidation, and antioxidant systems with vitamin C supplementation during aging in rats. *Nutr. Biochem.* 7, 270 - 275.

Kampfenkel K, Van Montagu M, Inze D., 1995. Extraction and determination of ascorbate and dehydroascorbate from plant tissue. *Anal Biochem.* 10; 225 (1): 165-7.

Kimura, H., Yamada. Y., Morita, Y., Ikeda, H., and matsuo, T., 1992. Dietary ascorbic acid depresses plasma and low density lipoprotein lipid peroxidation in genetically scorbutic rats. *J. Nutr.* 122, 1901-1909.

Koivu, M., Yu, Z., ferrans, V.J., Irani, K., and Finkel, T., 1987. Requirement for generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for platelet –derived growth factor signal transduction. *Science.* 270, 296-299.

Luadicina, D.C, & Marnett, L.J., 1990. Enhancement of hydroperoxide-dependent lipid peroxidation in rat liver microsomes by ascorbic acid. *Arc Biochem. Biophys.* 278, 73-80.

Lykkesfeldt, J., Loft, S.,Nielsen, J.B., and Poulsen, H.E., 1997. Ascorbic acid and dehydroascorbic acid as biomarkers of oxidative stress caused by smoking. *Am. J. Clin. Nutr.* 65; 959-963.

Lykkesfeldt, J., Loft, S., and Poulsen, N.E., 1995. Determination of ascorbic acid and dehydroascorbic acid in plasma by high –performance liquid chromatography with coulometrics detection- are they reliable biomarkers of oxidative strss? *Anal. Biochem.* 229, 329-335.

May, T.S., 1998. The redox couple between glutathione and ascorbic acid. A chemical and physiological perspective. *Free Radical Biol Med* 17: 333-349.

Meister, A., 1991. Gltathione – ascorbic acid antioxidant system in animals. *J. Biol. Chem.* 269, 9397-9100.

Meister, A., 1994. Glutathione ascorbic acid antioxidant system in animals. *J Bio, Chem* 269: 9397-9400.

Rapport S.M., Schewe T., Wiesner R., Halangk W., Ludwig P., Janicke – Hohne M., Tannert C., Hiebsch C. and Klatt D., 1979: *Eur. J. Biochem* 96: 545 – 561. In: Prostaglandins, Leukotrienes and other eicosanoids: from biogenesis to clinical application / Friedrich Marks; Gerhard Furstenberger (ed.). – Weinheim; New York; Chichester; Brisbane; Singapore; Toronto: Wiley-VCH, 1999.

Rikans, L.E., and Moore, D.R., 1988. Effects of aging on aqueous phase anti-oxidants in tissues of male Fisher rats. *Biochim. Biophys. Acta.* 966, 269-275.

Sohal RS and Weindruch R 1996. Oxidative strss, caloric restriction, and aging. *Science (Wash DC)* 273: 59-63.

Tanaka, K., Hashimoto, T., Tokumaru, S., Iguchi, H., and Kojo, S., 1997. Interactions between vitamin C and vitamin E are observed in tissues of inherently scorbutic rats. *J. Nutr.* 127, 2060-2061.

Wells, W.W., & Jung, C., 1997. Regeneration of vitamin C. In *Vitamin C in Health and Disease* (Packer, L., and Fuchs, J., eds) pp. 109-121, Marcel Dekker, Inc., New York.