

Год. зб. Биол God. zb. Biol	кн.55/56	с. 119-134 р.	Скопје Skopje	2002-2003
--------------------------------	----------	---------------------	------------------	-----------

ISSN 1409 - 6889

CODEN: GZPBEJ

УДК: 577.164.2:599.323.4

Оригинален научен труд

**ВИТАМИНОТ С И НЕГОВИОТ СУПРИМИРАЧКИ
ЕФЕКТ ВРЗ ПРОЦЕСОТ НА АПОПТОЗА КАЈ БЕЛИОТ
ЛАБОРАТОРИСКИ СТАОРЕЦ
ВО ФУНКЦИЈА НА ВОЗРАСТА И АКУТНАТА
ХИПЕРТЕРМИЧКА ЕКСПОЗИЦИЈА**

**Ицко Ѓорѓоски ^a, Митко Младенов ^{a*}, Јорданка
Димовска ^a, Тања Витковска ^a, Трајче Стафилов ^b**

*^aInstitute of Biology,
^bInstitute of Chemistry,
Faculty of Natural Sciences and Mathematics, "Sts,
Cyril and Methodius"
University, P.O. Box 162, Skopje 1000, Macedonia*

Abstarct: The hiperthermic stress and the aging implyes degenerative process by production of free radicals. Our results show that treatment with vitamin C increased concentration of GSH in the liver and kidney. Namely, due to the our experimental conditions (aging and acute heat exposure), AsA has a great role in a sparing of produced free radicals. Although, this process provide increasing of tissue GSH concentration at Wistar rats, at age of 35 days and 22 - 24 months. The duration of heat exposure ($40 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$) for heat exposed animals, was approximately two hours. Taken together, we have demonstrated that the application of the hyperthermic stress causes induction of the apoptotic process. The importance of AsA as a hydrophilic antioxidant for young heat exposed rats, is in the protection of the apoptosis, if it is determine across the LTC4 changes. In contrary, at old heat exposed rats, vitamin

C treatment not suppress the apoptotic processes. This fact suggests the important role of vitamin C treatment in protection of the cell from the free radical damage. Presumably, oxidative and apoptotic processes in the cell, as a result of the acute heat exposure is subject of ascorbic acid deficiency.

Abbreviations: AsA, ascorbic acid; GSH, glutathione; LTC₄ leucotriene C₄; ROS, reactive oxygen species.

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

ВОВЕД

Голем број на хипотези укажуваат на фактот дека целуларната акумулација на оксидативните метаболити е во директна корелација со намалениот функционален капацитет на постарите организми (Ames и соp., 1993; Sohal & Weindruch, 1996). Физиолошките механизми поврзани со возраста кои се одговорни за контролата на оксидативниот стрес сеуште не се целосно дефинирани (Hall и соp., 2000). Во однос на оваа, значајно е да се разбере дека целуларната дистрибуција на клучните антиоксиданси во живите организми е во функција на возраста. Експозицијата на висока надворешна температура исто така доведува до намалување на концентрацијата на антиоксидантните витамини (витамин С и витаминот Е) (Sahin & Kucuk., 2001).

Аскорбинската киселина и GSH се најактивните редуцирачки супстанции во животинските ткива (Meister, 1994; Winkler и соp., 1994). Овие два биохемиски агенси учествуваат во *in vivo* редокс циклусите. Така на пример токсичниот ефект на GSH би можел да биде превениран со додавање на аскорбинска киселина, од што може да се заклучи дека аскорбинската киселина и GSH имаат компензаторен ефект (Meister, 1994). Од друга страна пак, GSH може да послужи и за регенерација на аскорбинската киселина, од нејзината оксидирана форма дехидроаскорбат (Meister, 1994; Winkler и соp., 1994). Во основата на механизмот на ваквата редуција лежи двоелектронската редуција на дехидроаскорбатот со GSH со истовремено формирање на интермедиерниот коњугат GSH-аскорбинска киселина.

Леукотриените претставуваат моќни биолошки медиатори кои што настануваат како одговор на најразлични имунолошки и инфламаторни стимуланси (Piper, 1984; Denzlinger и соp., 1985).

Брзото отстранување на леукотриенските деривати на цистеинот од воспалените ткива е еден од најзначајните механизми во нивната инактивација. Леукотриенските деривати на цистеинот може да се инактивираат со:

интраваскуларна деградација, хепатична и ренална апсорпција од циркулацијата, интрацелуларен метаболизам и хепатична и ренална екскреција на деградираните производи од LTC_4 (Huber и сор., 1989).

По влегувањето во циркулацијата LTC_4 многу брзо се метаболизира до LTD_4 и LTE_4 , производи кои потоа се апсорбираат од страна на црниот дроб и бубрезите (Denzlinger и сор., 1986b; Orning и сор., 1986). По делумното метаболирање истите се екскретираат во жолчката и урината. Делот од леукотриените што преку ентерохепатичната циркулација се екскретира во жолчката е со неразјаснета физиолошка улога (Denzlinger и сор., 1986.a). Експериментално е потврдено дека во изолирани гломерули од стаорци, LTC_4 брзо се метаболизира до N-ацетил- LTE_4 (Fauler и сор., 1991). Кај човек инактивацијата на LTC_4 со негово претварање во LTE_4 настанува најнапред во крвта. Maуатеpek & Pecher (1993) овој процес го демонстрирале во култури од клетки на бубрежните тубули кај стаорци. Зголемено ниво на LTC_4 , LTD_4 , LTE_4 и N-ацетил LTE_4 е забележано во услови на гломеруларна инфламација (Petric & Hitchinson., 1994). Системското додавање на цистеински леукотриени кај стаорците доведува до намалување на реналната циркулација и гломеруларниот филтрационен капацитет (Badr, 1992). Редуцијата на гломеруларниот капиларен ултра-филтрационен коефициент се препишува на ефектот на леукотриенските деривати на цистеинот врз гломеруларните клетки: *in vitro* LTC_4 и LTD_4 вршат контракција на гломеруларните клетки (Barnett и сор., 1986). Зголемување на нивото на леукотриенските деривати на цистеинот е забележано кај анимални модели на гломерулонефритис и нефротоксичен нефритис. Исто така утврдено е дека леукотриените претставуваат клучни медиатори и при воспалителни процеси на црниот дроб (Kerpler и сор., 1985).

Наша цел беше да ги испитаме: промените во концентрацијата на GSH во црниот дроб и бубрезите во функција на возраста, да го испитаме начинот на дистрибуција на GSH и неговиот ендеген коњугат (LTC_4) при хипертермички стрес во функција на возраста и при третман со витаминот С, како и 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, (со 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 [МHex], 3. млади третирани и неекспонирани [MT], и 4. млади третирани и експонирани [MТех] стаорци. Другите четири групи стаорци на возраст од 20 - 22 месеци беа поделени на ист начин.

како и младите стаорци на: 1. стари нетретиран и неекспониран $\{[CH] - [контрола]\}$, 2. стари нетретиран експониран $[CHex]$, 3. стари третиран и неекспониран $[CT]$, и 4. стари третиран и експониран $[CTex]$ 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 ± 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 ± 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. 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 (Kampfenkel 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.

2. Ойределување на концентрацијата на GSH

Определувањето на концентрацијата на GSH се базира на развивањето на жолто обојување со додавањето на 5,5' - ditiobis (2-nitrobenzoeva kiselina) (Ellman's-ov реагенс, DTNB) на тиолните соединенија. Развиената боја е стабилна околу 10 минути, за кое време се отчитува апсорбанцата на 412 nm.

Хомогенатите од црниот дроб и бубрезите беа центрифугирани на 6000g 15 min на 4 °C. За анализа на концентрацијата на GSH беше користен добиениот супернатант. Концентрацијата на GSH беше одредена по методата опишана од (Dacie, 1991).

3. Определување на концентрацијата на LTC₄

За квантитативна анализа на LTC₄ беше применувана ELISA метода. Определувањето на концентрацијата на LTC₄ е на принципот на конкуренција помеѓу ензимскиот коњугат и LTC₄ во примерокот за лимитираниот број на врзачки места на антителата фиксирани во секое бунарче од microplate плочката.

Екстракција на LTC₄

Најнапред ткивата се хомогенизираат во апсолутен етанол (5ml/gm). Хомогенатот се центрифугира 5 min. Потоа 1 ml од супернатантот се разредува со 5 ml дејонизирана вода и се закиселува до pH 3,5 со 1mol/l HCl.

Преконачно кондиционирањето на C₁₈ Sep-Pak[®] колоните (Amersham[®] Corporation) беше извршено со испирање на колоните со 2 ml етанол проследено со 2 ml вода.

По апликацијата на соодветните примероци во колоните проточната количина беше регулирана на 1 ml/min. Редукцијата на проточноста под 0,5 ml/min може да доведе до намалување на степенот на екстракција. Некои примероци може да доведат до запушување на колоните, па затоа истите мора да се разредат 1 : 5 со дејонизирана вода.

Колоните се испираат со 1 ml вода, а потоа со 1ml petrol eter.

Елуирањето на eikosanoidite се вршеше со 2 ml апсолутен metanol.

Евапорацијата на метанолот од елуентот се вршеше со проток на гасовит азот.

Сувиот остаток се раствара со 1 ml разреден пуфер за екстракција, при што за квантификација се земаат дупликати од по 50 µl.

Тест процедурата, како и определувањето на добиените вредности, се вршеше според инструкциите на производителот Neogen[®] Corporation Leukotriene C₄ – ELISA (Kit Instruction, product # 406210).

4. Статистичка анализа

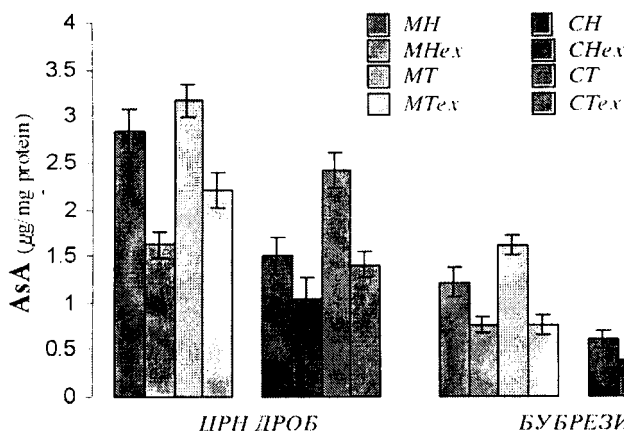
Резултатите се претставени како средни вредности ± стандардна грешка (SE). Влијанието на возраста, ефектот на третманот со витамин С и акутната хипертермичка експозиција беа определени со примена на *One way analysis of variance (ANOVA)*. Студентовиот *t-test* со Bonferoni корекција беше применет за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

РЕЗУЛТАТИ

Влијанието на возраста, витаминот С и акутната хипертермичка експозиција врз нивото 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 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 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 црниот дроб ($p < 0,001$) и бубрезите ($p = 0,0139$). И покрај предизвиканите промени на концентрацијата на AsA како резултат на третманот со витамин С, во црниот дроб и бубрезите во однос на возраста и по третманот постоја високо сигнификантни разлики ($p < 0,001$).



Слика.1. Концентрација на AsA во црн дроб и бубрези. МН-млади нетретирани. МНex-млади нетретирани хипертермички експонирани, МТ-млади третирани, МТex-млади третирани хипертермички експонирани; СН-стари нетретирани, СНex-стари нетретирани хипертермички експонирани, СТ-стари третирани, СТex-стари третирани хипертермички експонирани стаорци.

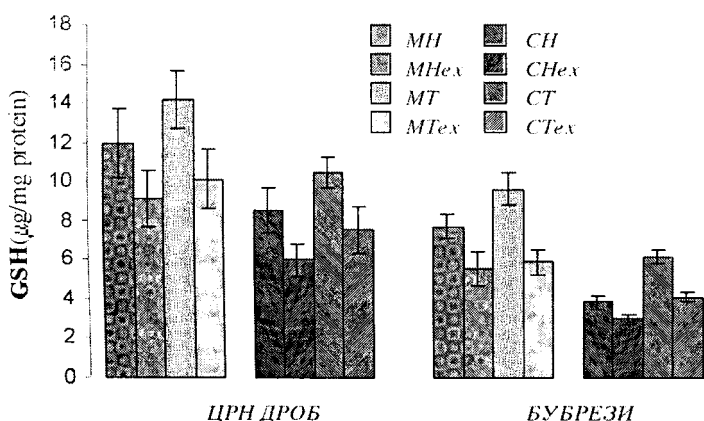
Од добиените резултати се гледа дека експозицијата на висока надворешна температура доведе до сигнификантно намалување на концентрацијата AsA кај младите стаорци, и тоа и во црниот дроб и во бубрезите ($p < 0,001$). Кај старите стаорци, акутната хипертермичка експозиција доведе до сигнификантно намалување на концентрацијата на AsA во црниот дроб ($p = 0,0136$), додека во бубрезите намалувањето беше несигнификантно ($p = 0,0637$). Концентрацијата на AsA во однос на возраста и по хипертермичката експозиција го задржа трендот на намалување, така што беше забележано високо сигнификантно намалување 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 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 и во црниот дроб ($p < 0,001$) и во бубрезите ($p = 0,013$) намалувањето беше сигнификантно.

Влијанието на возраста, витаминот С и акутната хипертермичка експозиција врз нивото на GSH

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

Сигнификантно намалување на концентрацијата на GSH во однос на возраста кај белиот лабораториски стаорец може да се забележи во црниот дроб ($p = 0,0059$) и бубрезите ($p < 0,001$). Од друга страна третманот со витамин С доведе до статистички сигнификантно зголемување на концентрацијата на GSH во бубрезите ($p < 0,001$) кај младите и старите третирани стаорци. Во црниот дроб ($p = 0,323 - 0,631$) кај младите и старите третирани стаорци соодветно, зголемувањето беше статистички несигнификантно. Што се однесува до значењето на возраста врз зголемувањето на GSH во однос на третманот со витамин С, истата го задржа трендот во однос на нетретираниите, како во црниот дроб ($p < 0,003$) така и во бубрезите ($p < 0,001$).



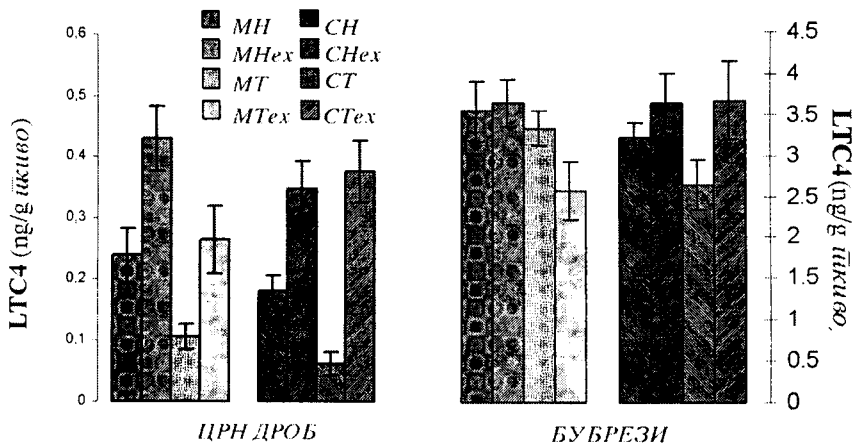
Слика 2. Концентрација на GSH во црн дроб и бубрези. (Легендата е иста како на слика 1.)

Снижувачкиот ефект на акутната хипертермичка експозиција особено дојде до израз кај младите хипертермички експонирани стаорци каде во однос на младите неекспонирани, беше забележано високо сигнификантно намалување во бубрезите ($p < 0,001$), како и во црниот дроб ($p = 0,048$). Кај старите хипертермички експонирани во однос на старите неекспонирани стаорци, намалувањето беше несигнификантно во црниот дроб и бубрезите ($p = 0,139 - 0,510$). Намалувањето на концентрацијата на GSH во однос на

возраста и по хипертермичката експозиција го задржа трендот на сигнификантност, така што во црниот дроб ($p = 0,018$) истото беше сигнификантно и високо сигнификантно во бубрезите ($p < 0,001$). Акутната хипертермичка експозиција, предизвика високо сигнификантно намалување на GSH во црниот дроб и бубрезите ($p < 0,001$), кај младите и старите третирани хипертермички експонирани во однос на младите и старите третирани неекспонирани стаорци, соодветно. Трендот на сигнификантно намалување при акутна хипертермичка експозиција во однос на возраста и третманот со витамин С се задржа само во бубрезите ($p < 0,001$) при што истото беше несигнификантно во црниот дроб ($p = 0,108$).

Влијанието на возраста, витаминот С и акутната хипертермичка експозиција врз нивоа на LTC_4 во црниот дроб и бубрезите

Резултатите од истражувањата за влијанието на возраста, витаминот С и акутната хипертермичка експозиција врз нивоа на LTC_4 се прикажани на слика 3. Од истите може да се забележи дека возраста немаше никакво влијание на концентрацијата на LTC_4 ниту во бубрезите ($p = 0,893$) ниту во црниот дроб ($p = 0,919$). Третманот со витамин С доведе до високо сигнификантно зголемување на LTC_4 во црниот дроб ($p < 0,001$) кај младите и старите стаорци. Во бубрезите, кај младите намалувањето на концентрацијата на LTC_4 беше несигнификантно ($p < 1,000$), како и кај старите ($p = 0,232$). Третманот со витамин С во однос на возраста не предизвика некаква разлика помеѓу третираниите и нетретираниите стаорци. Имено витаминот С не доведе до сигнификантна разлика ($p < 1,000$) помеѓу младите и старите третирани стаорци во црниот дроб како и во бубрезите кај истите групи стаорци ($p = 0,068$).



Слика 3. Концентрација на LTC_4 во црн дроб и бубрези. (Легендата е иста како на слика 1.)

Акутната хипертермичка експозиција од своја страна пак доведе до високо сигнификантно зголемување на концентрацијата на $LTС_4$ во црниот дроб ($p < 0,001$) кај младите и старите нетретирани, додека во бубрезите и кај младите и кај старите ваквото зголемување беше несигнификантно ($p = 1,000$). Влијанието на витаминот С на ниво на црниот дроб и бубрезите кај младите стаорци се реперкуира и после акутната хипертермичка експозиција каде се појави сигнификантна разлика ($p < 0,005 - 0,001$) помеѓу младите и старите стаорци. Влијанието на акутната хипертермичка експозиција, врз стаорците третирани со витамин С во однос на нивото на $LTС_4$, може да се согледа од сигнификантната разлика во истата во црниот дроб и тоа кај младите ($p < 0,001$) и старите стаорци. Исто така, и во бубрезите имавме сигнификантно зголемување ($p < 0,001$) кај старите, додека кај младите стаорци имавме сигнификантно намалување ($p < 0,001$). Влијанието на третманот со витамин С врз супресијата на синтезата на $LTС_4$ при акутната хипертермичка експозиција, може да се согледа во статистички сигнификантното намалување на концентрацијата на $LTС_4$ во црниот дроб и бубрезите, кај младите третирани хипертермички експонирани во однос на младите нетретирани хипертермички експонирани стаорци ($p < 0,001$). Кај старите третирани хипертермички експонирани во однос на старите нетретирани хипертермички експонирани стаорци, не беа забележани никакви промени ниту во црниот дроб ниту во бубрезите ($p < 1,000$).

ДИСКУСИЈА

Концентрацијата на AsA опаѓа со зголемувањето на возраста, што секако е поврзано со зголемените оксидативни нарушувања од најразличен тип. Во контекст на оваа е и фактот дека со стареењето 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 (Der Loo и сор., 2002).

Растот и развојот на организмите во основа доведува до намалување на концентрацијата на вкупните тиоли, а со тоа и на GSH како во полната крв така и во бубрезите. Ваквото намалување е во тесна релација со зголемените оксидативни нарушувања, што беше проследено низ испитуваните маркери на липидна и протеинска оксидација. Исто така во релација со ваквото намалување е и процесот на апоптозата во чија основа лежи процесот на тиолната модулација (Strek, 1996), при кој пак доаѓа до зголемена продукција на слободните радикали (Kazutetsu и сор., 1999).

При истражувањата констатиравме дека витаминот С доведува до зголемување на концентрацијата на GSH во црниот дроб и бубрезите. Оваа секако се должи на фактот што сразмерно со зголемувањето на концентрацијата на AsA се зголемува и содржината на GSH . 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 C 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 фосфорилрна форма на γ -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 егзогено додавање на AsA доаѓа до покачување на нивото на AsA во црниот дроб, што и би се очекувало, меѓутоа напоредно со тоа констатирано е и изненадувачки зголемено ниво и на GSH. Имено, примената на комбинирана администрација на [(BSO) + AsA] условува зголемување на митохондријалното GSH ниво за 2.7 до 6 пати кај спомнатите ткива во споредба со новородените стаорци третираните само со BSO. Во прилог на оваа се и нашите истражувања со возрасни стаорци кај кои GSH дефициентноста е пропратена со AsA дефициентност. Меѓутоа, треба да се истакне дека кај старите GSH дефициентни стаорци има сигнификантно зголемување на нивото на дехидроаскорбатот. Во прилог на оваа констатација, се и сознанијата дека кај стаорци хранети со "скорбутична" храна (храна дефициентна со витамин C), и истовремено третирани со естри на GSH, доаѓа до забавување на губењето на содржината на AsA во ткивата во споредба со нетретираниите со GSH. Во основата на ваквото намалување на содржината на AsA лежи реакцијата на зголемување на редукцијата на дехидроаскорбатот при зголемена концентрација на GSH. Имено GSH-зависната редукција на дехидроаскорбатот е катализирана од страна на протеински дисулфидни изомерази (Wells и соp., 1992). Фактот што GSH дефициентноста *in vivo* доведува до намалување на концентрација на AsA во ткивата, укажува на стабилизирачката улога која ја имаат тиолите во однос на аскорбатот.

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 GSH 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 prolyl hydroxylasa-та чиј што коензим Fe^{2+} во вакви услови се оксидира до Fe^{3+} . Истражувањата покажале дека prolyl hydroxylasa-та е изградена од α и β субединица. Првата, α 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 сop., 1987). За разлика од тоа, β субединицата има GSH-зависна протеин дисулфидна изомеразна активност (Wells и сop 1992). На овој начин GSH зависната редукција на дехидроаскорбатот формиран во реакцијата на реактивација на prolyl hydroxylasa-та, може да биде катализирана од β субединицата на prolyl hydroxylasa-та.

Од добиените резултати при истражувањето на влијанието на витаминот C, јасно се гледа дека истиот предизвикува сигнификантно зголемување во концентрацијата на тиолите кај младите и старите стаорци. Кај старите стаорци зголемувањето беше нешто повисоко така да истото доведе до несигнификантна разлика по однос на тиолниот статус помеѓу младите и старите третирани стаорци. Според досегашните сознанија тоа се должи на директната инволвираност на витаминот C во тиолниот метаболизам. Од особено значење е да се напомене инволвираноста на тиолните молекули во процесот на програмирана клеточна смрт (апоптоза). Во таа насока се и нашите претпоставки дека оксидативните нарушувања што се резултат на акутниот хипертермички стрес имаат импликација во индукцијата на процесот на апоптоза.

Несомнено, еден од значајните фактори за настанување на процесот на апоптозата 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 сop., 1995 & Jacobson, 1996).

Посебен механизам на тиолната регулација на процесот на апоптоза претставува, модулацијата на протеин киназната активност. Имено, докажана е модулацијата на тирозинската фосфорилација кај голем број на сигнални молекули под дејство на интрацелуларните тиолни молекули (Monterio и сop., 1991; и Kanner и сop., 1992;). Денес со сигурност се знае дека постојат две различни митоген активирачки протеин кинази (MAPK), и тоа p38-MAPK и c-Jun N-терминална киназа (c-JNK). Докажано е дека и двете се активираат преку фосфорилација на треонинските и тирозинските остатоци. Kyriakis & Avruch (1996) констатирале дека овие кинази се инволвирани во индукцијата на процесот на апоптозата што е резултат на различни стресни фактори како што се: егзогено додавање на цитокини, акутната хипертермичка експозиција и радијацијата. Ikeуama и сop. (2002) доаѓаат до заклучок дека процесот на стареење е последица на намалувањето на одбрамбената моќ на организмот, пред се во однос на оксидативните нарушувања. До ваков заклучок е дојдено

при испитувањата на хепатоцити од млади (на возраст од 4-6 месеци) и стари (на возраст од 24-26 месеци) стаорци. При тоа е констатирано дека во хепатоцитите од постарите животни индуцирањето на процесот на апоптоза настанува многу побрзо и со многу поголем интензитет во споредба со хепатоцитите од младите. Објаснувањето на ваквата состојба се бара во сознанието дека со текот на стреењето доаѓа до редукција на активноста на споменатите кинази, за кои се знае дека имаат протективно дејство во однос на слободните радикали. Во прилог на оваа е и фактот дека при инхибиција на овие две кинази со фармаколошки инхибитори доаѓа до зголемено индуцирање на апоптозата и кај хепатоцитите од младите стаорци. Намалувањето на интрацелуларниот тиолен пул во култури од стаоречки фибробласти поттикнува апоптоза преку механизмите на ROS акумулација, продукција на леукотриени и p-38-MARK фосфорилација (Kazutetsu и сор., 1999). Овие истражувања сугерираат дека доколку во медиумите со култури од фибробласти настане разградување на тиолите со примена на некој стресоген фактор, консеквентно настанува и процесот на апоптоза. Истата состојба може да изостане доколку во самите медиуми со фибробласти се додадат инхибитори на 5-липоксигеназите и p-38-MARK фосфорилазите. Уште повеќе ваквите резултати упатуваат на заклучок дека акумулацијата на ROS ја активира продукцијата на (LT) леукотриени, пред се со активација на 5-липоксигеназата 5-LO, што од своја страна понатаму ја стимулира p-38-MARK фосфорилацијата. Во прилог на овие констатации е и фактот дека активноста на некои ензими кои учествуваат во продукцијата на еикосаноидите е регулирана од редокс нивото на самата клетка. Имено, 5-LO - ензим кој учествува во синтезата на цистеинските леукотриени, како своја активна страна содржи еден железен атом поради што истата е под директна контрола на клеточниот редокс статус (Strek, 1996).

Од друга страна интрацелуларните ROS се тесно поврзани со сигналните молекули кои учествуваат во регулацијата на клеточната пролиферација (Simon и сор., 1997). Стимулирањето на клетките со факторите на раст покажало дека истите почнуваат да продуцираат H_2O_2 (Sundaresan и сор., 1995). Ваквите резултати укажуваат на фактот дека продукцијата на интрацелуларните ROS започнува штом клетките се стимулираат на пролиферација, под дејство на најразлични надворешни стимуланси, на пример акутната хипертермичка средина. Во такви случаи во клетките започнува процесот на апоптоза кој ќе доведе до трајни оштетувања, па и смрт на самата клетка.

Во нашите истражувања не беа забележни промени во концентрацијата на LTC_4 во бубрезите и црниот дроб во зависност од возраста, за разлика од тоа третманот со витамин С предизвика намалување на концентрацијата на леукотриените во црниот дроб, додека во бубрезите не беа констатирани сигнификантни промени. Намалувањето на нивото на леукотриените во црниот дроб под дејство на витаминот С, се должи на фактот што витаминот С доведува до зголемена продукција на тиолниот пул (пред се на GSH), а воедно и намалувањето на слободните радикали. Свкупно, витаминот С ја намалува и активноста на 5-LO а со тоа и индукцијата на синтезата на LTC_4 . Влијанието на витаминот С врз намалувањето на синтезата на LTC_4 во услови

на хипертермички стрес, посебно е изразено кај младата популација каде се забележува редуција на намалувањето на нивото на GSH. Од своја страна оваа доведува до инхибиција на активноста на 5-LO што условува инхибиција на процесот на апоптозата. Сосема е спротивна состојбата кај старите животни. Според нашите сознанија ваквата појава кај старите животни се должи на зголемената интрацелуларна акумулација на ROS. Следењето на LTC₄ во основа беше со цел да се увиде дали апликацијата на хипертермички стрес доведува до интензивирање на процесот на апоптоза. 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.

ЛИТЕРАТУРА

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.

Badr K.F., 1992: *J. Am. Soc. Nephro.* 3: 907-915. 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.

Barnett R., Goldwasser P., Dada K., and Schlondorff D., 1986. *Am. J. Physiol.* 250: F838 – F 844. 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.

Dacie, V., Lohn., 1991 *New approach for determination of Vitamin C.* Marcel Dekker, Inc., New York. 29: 109-121.

Denzlinger C, Guhlmann A, Scheuber PH, Wilker D, Hammer DK and Kepler D., 1986a. Metabolism and analysis of cysteinyl leucotrienes in the monkey. *J Biol Chem* 261: 15601-15606.

Denzlinger C, Guhlmann A, Haggmann W, Scheuber PH, Scheyerl F, Wilker D, Hammer DK and

Denzlinger C, Rapp S, Haggmann W and Kepler D., 1985. Leukotrienes as mediators in tissue trauma. *Science (Wash. DC)* 230:330-332.

Fauler J., Wiemeyer A., Yoshizawa M., Schurek H.J. and Frolich J.C., 1991: *Prostaglandins* 42: 239 –249. 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.

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.

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.

- Huber P.J., Brunner U.T., Schaub M.C., 1989. Disulfide formation within the regulatory light chain of skeletal muscle myoBiochemistry. 14; 28 (23): 9116-23.
- Ikeyama, D., Stocker, R., Ames, B.N., 2002. 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.
- Jacobson, M.D., 1996. Reactive oxygen species and programmed cell death. TIBS 21, 83-86.
- 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.
- Kanner, S.B., Kavanagh, T.J., Grossmann, A., Husbolen, J.B., Rabinovitch, P.S., and Ledbeterr, J.A., 1992. Sulfhydryl oxidation down-regulates T – cell signaling and inhibits tyrosine phosphorylation of phospholipase $\text{C}\gamma 1$. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89, 300-304.
- Kazutetsu, A.R., Fanburg, B.L., and Cochran, B.H., 1999. Oxidative stress and cell proliferation. In Oxygen, Gene Expression, and Cellular Function. Lung Biology in Health and Disease. Vol. 105. Clerch, L.B., and Massaro, D.J., editors. Marcell-Dekker, New York 123-138.
- Keppler D, Hagmann W, Rappo S, Denzlinger C and Koch HK., 1985. The relation of leukotrienes to liver injury. Hepatology 5:883-891.
- Koivu J, Myllyla R, Kivirikko KI., 1987. A simple procedure for the isolation of protein disulphide-isomerase. Biochem J. 247(1): 237-9.
- Kyriakis, J.M., and Avruch, J., 1996. Sounding the alarm: protein kinase cascades activated by stress and inflammation. J. Biol. Chem. 271, 24313-24316.
- Mayatepek E., and Pecher G., 1993: Clin Chim. Acta. 218: 185 – 192. In: Prostaglandins, Leukotrienes and other eicosanoids: from biogenesis to clinical application / Friedrich Marks;
- Gerhard Furstemberger (ed.). – Weinheim; New York; Chichester; Brisbane; Singapore; Toronto: Wiley-VCH, 1999.
- Meister A., 1994. Glutathione ascorbic acid antioxidant system in animals. J Bio, Chem 269: 9397-9400.
- Monterio, 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.
- Orning L, Norin E, Gustafsson B and Hammarstrom S., 1986. In vivo metabolism of leukotriene C_4 in germ-free and conventional rats: Fecal excretion of N-acetylleukotriene E_4 . J Biol Chem 261: 766-771.
- Petric R. and Ford Hutchinson A.W., 1994: Kedney Int. 46: 1322 – 1329. In: Prostaglandins, Leukotrienes and other eicosanoids: from biogenesis to clinical application / Friedrich Marks; Gerhard Furstemberger (ed.). – Weinheim; New York; Chichester; Brisbane; Singapore; Toronto: Wiley-VCH, 1999.
- Piper P.J., 1984. Formation and actions of leukotrienes. Physiol Rev 64: 744-761.
- Sahin K, Kucuk O., 2001 Effects of vitamin C and vitamin E on performance, digestion of nutrients and carcass characteristics of Japanese quails reared under chronic heat stress (34 degrees C). J Anim Physiol Anim Nutr (Berl). 85 (11-12): 335-41.

Simon, A.R., Fanburg, B.L., and Cochran, B.H., 1997. Oxidative stress and cell proliferation. In *Oxygen, Gene Expression, and Cellular Function. Lung Biology in Health and Disease*. Vol. 105. Clerch, L.B., and Massaro, D.J., editors. Marcell-Dekker, new York 123-138.

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

Strek, M.E., 1996. Leukotriene receptor antagonists and synthesis inhibitors in asthma. In *Pulmonary and Critical Care Pharmacology and Therapeutics*. A. R. Leff, editor. Mc. Graw-Hill, New York. 663-668.

Sundaresan, M., Yu, Z., ferrans, V.J., Irani, K., and Finkel, T., 1995. Requirement for generation of H₂O₂ for platelet -derived growth factor signal transduction. *Science*. 270, 296-299.

Van der Loo B, Labugger R, Aebischer CP, Skepper JN, Bachschmid M, Spitzer V, Kilo J, Altwegg L, Ullrich V, Luscher TF., 2002. Cardiovascular aging is associated with vitamin E increase. *Circulation*. 9;105(14): 1635-8.

Wells, D., Stocker, R., England, L., Ames, B.N., 1992. 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.

Winkler BS, Orselli SM and Rex TS., 1994. The redox couple between glutathione and ascorbic acid. A chemical and physiological perspective. *Free Radical Biol Med* 17: 333-349.