

ВЛИЯНИЕ ВИТАМИНОВ С И Е НА СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫЕ ПРОЦЕССЫ В КРОВИ КРЫС ПРИ ОСТРОЙ УМЕРЕННОЙ ГИПОТЕРМИИ

© 2019 г. Н. К. Кличханов^{*,@}, Ж. Г. Исмаилова^{*}, М. Д. Астаева^{*}, Ш. И. Чалабов^{*,**}

^{*}Дагестанский государственный университет, кафедра биохимии и биофизики,
ул. Гаджиева, 43а, Махачкала, 367000 Россия

^{**}Институт эволюционной физиологии и биохимии им. Сеченова,
просп. Тореза, 44, Санкт-Петербург, 194223 Россия

@E-mail: klich-khan@mail.ru

Поступила в редакцию 31.01.2018 г.

После доработки 23.04.2018 г.

Принята к публикации 30.01.2019 г.

Изучена интенсивность свободнорадикальных процессов в крови крыс при острой кратковременной гипотермии 30°C после внутрибрюшинного введения в течение 7 сут витаминов С (100 мг/кг) и Е (E-Selenium, 40 мг/кг). Отмечено, что гипотермия способствует развитию окислительного стресса (ОС) в эритроцитах, стимулируя процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ) и окислительной модификации белков (ОМБ), снижая содержание восстановленного глутатиона (GSH) при параллельном увеличении активности супероксиддисмутазы (СОД). Обнаружено, что раздельное введение витаминов С и Е предотвращает понижение уровня GSH и повышение активности СОД в эритроцитах при гипотермии, но при этом витамин С увеличивает степень ПОЛ и ОМБ мембран эритроцитов (МЭ), а витамин Е — степень ОМБ МЭ. Установлено, что совместное курсовое введение витаминов С и Е полностью предотвращает развитие ОС в эритроцитах при гипотермии.

DOI: 10.1134/S0002332919060080

Эритроциты постоянно подвергаются воздействию как эндогенных, так и экзогенных активных форм кислорода (АФК) (Pandey, Rizvi, 2011). Несмотря на то что эритроциты имеют эффективную антиоксидантную систему защиты, окислительные повреждения мембранных белков и липидов способствуют преждевременному старению нормальных красных клеток и приводят к сокращению продолжительности их жизни (Mohanthy *et al.*, 2014). Основным источником внутриклеточных АФК в эритроцитах — процесс аутоокисления оксигемоглобина, дающий супероксид, после дисмутации которого образуется перекись водорода (H₂O₂) (Kuhn *et al.*, 2017). Эти восстановленные формы кислорода реактивные и могут взаимодействовать с гемоглобином (Hb) и другими клеточными компонентами. Образующиеся в самих эритроцитах и поступающие из экстраклеточного пространства АФК нейтрализуются развитой антиоксидантной системой, представленной низкомолекулярными антиоксидантами — глутатионом, α-токоферолом (витамин Е — вит. Е) и аскорбиновой кислотой (витамин С — вит. С), а также антиоксидантными ферментами — супероксиддисмутазой

(СОД), каталазой, глутатионпероксидазой и пероксиредоксином-2 (Kuhn *et al.*, 2017).

Установлено, что в интактных эритроцитах небольшая часть Hb, связанная с мембранами, способствует генерации труднейтрализуемых АФК, поскольку в примембранном пространстве они менее доступны для клеточной антиоксидантной системы, которая локализована в основном в цитоплазме. Образуюсь, АФК могут привести к повреждению мембраны эритроцитов и/или выйти из клетки и повредить другие клетки и ткани. При экстремальных состояниях количество Hb, связанного с мембранами эритроцитов, может возрастать. Так, нами показано, что при гипотермии существенно возрастает доля Hb, связанного с мембранами (Кличханов и др., 2001). Это может быть причиной активации свободнорадикальных процессов в эритроцитах на начальных этапах снижения температуры тела у крыс, о чем свидетельствует повышение уровня продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и окислительной модификации белков (ОМБ) мембран эритроцитов (МЭ), а также снижение активности антиоксидантной защиты клеток (Aslan, Meral, 2007; Эмирбеков, Кличханов, 2011). Возможно, окислитель-

ные повреждения эритроцитов — причина повышения осмотической хрупкости эритроцитов (Аль-Раби и др., 2015б) и ускорения их внутрисосудистого гемолиза (Эмирбеков и др., 1991) при гипотермии.

Один из способов коррекции дисбаланса прооксидантно-антиоксидантного равновесия при состояниях, сопровождающихся окислительным стрессом (ОС), в том числе и при гипотермии, — назначение антиоксидантной терапии. Интерес вызывают вит. С и вит. Е, мощные антиоксиданты с высокой биологической активностью (Warzyniak *et al.*, 2013). Вит. Е — мощный липофильный антиоксидант, который обнаружен в биологических мембранах. α -Токоферол — наиболее активный изомер, который быстро истощается в организме, что требует регенерации через другие антиоксиданты, присутствующие в водорастворимой части клетки, такие как аскорбиновая кислота (Niki, 2014). Последняя, эффективный водорастворимый антиоксидант (Rice, 2000), обнаружена в цитозоле и внеклеточной жидкости, способна взаимодействовать непосредственно со свободными радикалами, предотвращая окислительные повреждения. Из-за различий в субклеточной локализации комбинация экзогенных вит. Е и вит. С может оказать лучшее антиоксидантное действие, чем каждый из них в отдельности.

Экспериментально показано, что как введение крысам вит. Е (Василькова, Кухта, 1988), так и кормление им (Aslan, Meral, 2007) приводили к снижению интенсивности процессов ПОЛ в эритроцитах при гипотермии. Однако влияние курсового раздельного и совместного введения этих витаминов на свободнорадикальные процессы в эритроцитах при умеренной гипотермии не изучено, а следовательно не установлена рациональная схема их использования при ОС.

Цель исследования — изучение возможности предупреждения развития ОС в крови крыс при кратковременной гипотермии 30°C путем введения витаминов С и Е.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты были проведены на самцах крыс Вистар массой 180–200 г, которых содержали в стандартных условиях вивария со свободным доступом к воде и пище. При исследовании были соблюдены все нормы и правила выполнения экспериментальных работ с использованием лабораторных животных (Директива 2010/63/EU Совета Европейского Сообщества по защите животных, используемых в экспериментальных и других научных целях).

Общую гипотермию вызывали путем наружного охлаждения животных в плексигласовых камерах с рубашкой, через которую циркулировала

холодная вода. Температуру тела крыс, которую равномерно (0.23°C/мин) снижали до 30°C (кратковременная умеренная гипотермия), измеряли в прямой кишке на глубине 4–5 см ректальным цифровым термометром марки MS 6501. Животные были разделены на следующие группы: 1 — интактные животные; 2 — животные с температурой тела 30°C; 3 — животные с температурой тела 30°C, которым ежедневно в течение 7 сут внутрибрюшинно вводили аскорбиновую кислоту (фармакопейный препарат, лиофилизированный, для инъекций) в дозе 100 мг/кг массы тела; 4 — животные с температурой тела 30°C, которым ежедневно в течение 7 сут внутрибрюшинно вводили α -токоферол (фармакопейный препарат E-Selenium, где концентрация вит. Е составила 50, а селена — 0.5 мг/мл) в дозе 40 мг/кг массы тела; 5 — животные с температурой тела 30°C, которым ежедневно в течение 7 сут совместно внутрибрюшинно вводили витамины С и Е в тех же дозах. В каждой серии было использовано по 8 крыс. На 8-е сутки после инъекций витаминов животное принимало участие в эксперименте. Интактным и гипотермизированным до 30°C животным вместо витаминов вводили соответствующий объем физиологического раствора.

Свободновытекающую кровь после декапитации животного собирали в пробирку с гепарином (50 ед./мл). Эритроциты осаждали центрифугированием при 2000 об./мин в течение 10 мин, а затем трижды промывали физиологическим раствором при 4°C. Отмытые эритроциты гемолизировали в 10 mM трис-HCl-буфере, pH 7.4, содержащем 1.5 mM ЭДТА (Казеннов и др., 1984). Тени эритроцитов осаждали при 20000 g в течение 20 мин при 4°C, а затем пятикратно отмывали 10 mM трис-HCl-буфером, pH 8.2. Белые тени эритроцитов хранили при –70°C до использования.

Об интенсивности ПОЛ в плазме крови и эритроцитах судили по содержанию малонового диальдегида (МДА) (Андреева и др., 1988). Об интенсивности ОМБ МЭ судили по накоплению в них карбонильных групп, реагирующих с 2,4-динитрофенилгидразином (Venditti *et al.*, 2004). При определении ОМБ использовали два показателя: исходный уровень окислительной модификации и окислительную модификацию белков, индуцированную реактивом Фентона ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{ЭДТА}$). Содержание восстановленного глутатиона (GSH) в эритроцитах определяли методом Элмана (Арутюнян и др., 2000). В гемолизатах определяли активность ключевых антиоксидантных ферментов — СОД и каталазы. Активность СОД оценивали по способности фермента ингибировать процесс восстановления тетразолиевого нитросино в условиях генерации супероксидного аниона (Дубинина, 1988). Активность фермента выражали в усл. ед./мг гемоглобина. Активность каталазы

Таблица 1. Содержание малонового диальдегида (мкмоль/л) в плазме крови и эритроцитах крыс при гипотермии и введении витаминов С и Е

Состояние животного	Плазма крови	Эритроциты
Контроль	1.80 ± 0.04	42.22 ± 2.36
Гипотермия	2.38 ± 0.11*	57.63 ± 0.81*
Гипотермия + витамин С	1.57 ± 0.09*	63.26 ± 0.74*
Гипотермия + витамин Е	2.24 ± 0.1*	47.76 ± 1.9
Гипотермия + витамин Е + витамин С	1.55 ± 0.09*	45.06 ± 1.92

* Достоверные ($p < 0.05$) различия относительно соответствующего контроля; для табл. 1 и 2.

Таблица 2. Содержание восстановленного глутатиона, активность СОД и каталазы в эритроцитах крыс при гипотермии 30°C и введении витаминов С и Е

Состояние животного	Глутатион, ммоль/л	Активность СОД, усл. ед./мг Нб	Активность каталазы, мкмоль/(мг Нб · мин)
Контроль	2.62 ± 0.12	2.75 ± 0.52	55.55 ± 2.88
Гипотермия	2.01 ± 0.05*	3.39 ± 0.19*	52.07 ± 3.12
Гипотермия + витамин С	3.16 ± 0.08	2.35 ± 0.72	57.64 ± 3.42
Гипотермия + витамин Е	2.65 ± 0.04	2.41 ± 0.10	58.20 ± 1.83
Гипотермия + витамин Е + витамин С	2.73 ± 0.06	2.21 ± 0.12	55.51 ± 2.79

определяли методом, основанным на взаимодействии H_2O_2 с молибдатом аммония, приводящем к образованию окрашенного комплекса с максимумом поглощения при 410 нм (Королук и др., 1988). За ферментативную единицу принимали количество фермента, необходимого для превращения 1 мкмоль субстрата в 1 мин на 1 мг гемоглобина при 37°C. Содержание гемоглобина определяли с использованием набора реагентов фирмы “Ольвекс Диагностикум” (Россия), содержание белка в мембранах эритроцитов – методом Лоури (Lowry *et al.*, 1951).

Статистическую обработку данных проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с использованием пакета СТАТИСТИКА. Достоверность различия определяли с помощью критерия Фишера на уровне значимости $P = 0.05$. В таблицах результаты представлены как средние значения (M) ± стандартная ошибка (m).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Кратковременное снижение температуры тела крыс до 30°C сопровождалось достоверным повышением уровня МДА в плазме крови на 32.2% и в эритроцитах на 36.5% относительно контроля (табл. 1).

При гипотермии существенно возрастала степень ОМБ МЭ. Так, исходный уровень карбонильных групп в белках МЭ при гипотермии возрастал на 43% относительно контроля. При этом возрастала окисляемость мембранных белков в

условиях *in vitro*: при гипотермии достоверно увеличивался прирост карбонильных групп в белках МЭ под действием генерируемых в среде инкубации оксидантов. Эти данные согласуются с предыдущими нашими исследованиями (Аль-Раби и др., 2015a) и свидетельствуют о том, что при кратковременной умеренной гипотермии в эритроцитах активируются процессы образования АФК.

При гипотермии содержание одного из главных низкомолекулярных антиоксидантов эритроцитов – GSH – снижается на 23.3% (табл. 2). Поскольку внутриклеточный уровень GSH обратно пропорционален содержанию H_2O_2 и других пероксидов (Galno, Alvarez-Idaboy, 2011), то снижение содержания GSH в эритроцитах при гипотермии свидетельствует о повышении уровня АФК в клетках.

Анализ ферментативного звена антиоксидантной защиты эритроцитов выявил достоверное повышение (на 23.3%) активности СОД при гипотермии, но активность каталазы при этом не изменялась (табл. 2). Совокупность полученных результатов свидетельствует о том, что при кратковременной умеренной гипотермии в эритроцитах крыс развивается ОС.

Для защиты эритроцитов от ОС гипотермию вызывали на фоне предварительного введения витаминов-антиоксидантов. В табл. 1 приведены данные о влиянии витаминов С и Е на процессы ПОЛ в плазме крови и эритроцитах. Как видно, курсовое введение вит. С не только предотвращает рост содержания МДА в плазме крови при гипо-

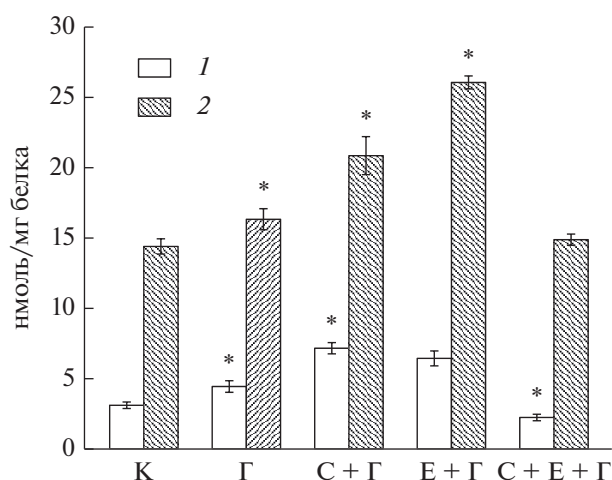


Рис. 1. Содержание карбонильных групп (нмоль/мг белка) в белках мембран эритроцитов крыс при гипотермии и введении витаминов С и Е. 1 – исходный уровень карбонильных групп; 2 – прирост карбонильных групп за 15 мин в присутствии Fe^{2+} – H_2O_2 ; К – контроль; Г – гипотермия 30°C; С + Г – гипотермия 30°C на фоне введения витамина С; Е + Г – гипотермия 30°C на фоне введения витамина Е; С + Е + Г – гипотермия 30°C на фоне совместного введения витаминов С и Е. * – достоверные ($p < 0.05$) различия относительно соответствующего контроля.

термии, но и способствует достоверному снижению его уровня относительно контроля. Однако в эритроцитах аскорбат вызвал проокислительный эффект (табл. 1). На фоне введения вит. С содержание МДА в эритроцитах при гипотермии возрастало в большей степени, чем при гипотермии без введения витамина.

Введение вит. Е оказало на процессы ПОЛ в крови действие, противоположное действию вит. С (табл. 1). Так, при гипотермии вит. Е не влиял на уровень МДА в плазме крови, но предотвращал увеличение его содержания в эритроцитах относительно гипотермии без введения витамина. Наиболее эффективное антиоксидантное действие на процессы ПОЛ в крови при гипотермии оказывало совместное введение витаминов С и Е (табл. 1). При этом в плазме крови существенно снижалось содержание МДА, а в эритроцитах был предотвращен его рост.

Анализ влияния витаминов на степень ОМБ показал, что раздельное курсовое введение витаминов С и Е потенцирует ОМБ МЭ при гипотермии (рис. 1). Сочетанное введение витаминов С и Е не только препятствует повышению степени ОМБ, но и достоверно снижает исходное количество карбониллов в белках при гипотермии, а также препятствует повышению окисляемости мембранных белков при низкой температуре тела.

В табл. 2 приведены данные о влиянии витаминов С и Е на ферментативное и неферментативное звенья антиоксидантной защиты эритроцитов. Обнаружено, что как раздельное, так и сочетанное введение витаминов С и Е предотвращают снижение содержания GSH в эритроцитах при гипотермии. Следует отметить, что введение вит. С приводит к достоверному повышению уровня GSH в эритроцитах при гипотермии относительно контроля.

Анализ ферментативной антиоксидантной системы показал, что раздельное и совместное введение витаминов С и Е предотвращает повышение активности СОД эритроцитов при гипотермии (табл. 2). Такое действие витаминов косвенно свидетельствует о снижении образования АФК в эритроцитах. Раздельное и совместное введение витаминов С и Е не влияло на активность каталазы эритроцитов при гипотермии.

Таким образом, приведенные данные свидетельствуют о том, что курсовое совместное введение витаминов С и Е способно эффективно предотвращать развитие ОС в эритроцитах при умеренной гипотермии.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Случайная, или непреднамеренная, гипотермия, возникающая у гомеотермных организмов, в том числе и у человека, в условиях переохлаждения, способствует развитию холодового стресса. В результате этого активируется гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая система (Frank *et al.*, 2002; Мохаммед Т. Джабер Маяхи, Кличханов, 2012), запускающая катаболические процессы, направленные на предотвращение снижения температуры тела. В этих условиях наряду с запуском окислительных процессов происходит активация и свободнорадикальных реакций (Эмирбеков, Кличханов, 2011; Blagojević, 2014).

Существенное повышение уровня маркеров окислительной деструкции липидов и белков МЭ, а также снижение содержания GSH и повышение активности СОД в эритроцитах при гипотермии свидетельствуют об интенсификации образования АФК в крови и эритроцитах в ходе снижения температуры тела. Выше было отмечено, что в эритроцитах АФК могут накапливаться как за счет аутоокисления Hb, так и за счет его поступления из плазмы. В норме антиоксидантная система эритроцитов способна эффективно нейтрализовать такие потоки АФК. Сложнее нейтрализовать АФК, генерируемые в примембранной области мембраносвязанным Hb (Rifkind *et al.*, 2015). Необходимо отметить, что при гипотермии существенно возрастает доля мембраносвязанного Hb в эритроцитах (Кличханов и др., 2001). Можно предположить, что этот мембраносвязанный Hb за счет избыточ-

ной генерации АФК способствует окислительной модификации мембранных липидов и белков эритроцитов при гипотермии. Ранее нами была обнаружена отрицательная корреляция между количеством мембраносвязанного Hb и активностью Na, K-АТФазы эритроцитов при гипотермии (Кличханов и др., 2001). Ингибирование Na, K-АТФазы в этих условиях, видимо, также связано с влиянием АФК, поскольку этот фермент весьма чувствителен к действию радикалов кислорода (Bogdanova *et al.*, 2006).

Основным экзогенным источником АФК для эритроцитов при гипотермии могут стать эндотелиальные клетки сосудов. Показано, что вазоконстрикторные реакции сосудов при гипотермии происходят при участии АФК, образующихся в митохондриях эндотелиальных клеток (Bailey, 2005).

Окислительные модификации липидов и белков МЭ при гипотермии могут происходить и под влиянием экстраклеточного Hb, уровень которого в плазме крови при кратковременной умеренной гипотермии существенно возрастает из-за усиленного внутрисосудистого гемолиза (Эмирбеков и др., 1991). Сильный гемолиз может привести к поступлению в плазму до 20 мкМ Hb (Kumar, Bandyopadhyay, 2005). После лизиса эритроцитов двухвалентное железо внеклеточного Hb окисляется до трехвалентного железа с образованием метгемоглобина, от которого легко отделяется гем (Umbreit, 2007). Из-за высокой гидрофобности свободный гем может встраиваться в клеточные мембраны, способствуя генерации АФК (Balla *et al.*, 1993). Как только гем встраивается в клеточную мембрану, пероксид водорода из таких источников, как активированные лейкоциты, может разорвать кольцо гема и высвободить “свободное” редокс-активное железо, которое может каталитически усилить продукцию АФК внутри клетки (Halliwell, Gutteridge, 1984). Накопление в плазме Hb и продуктов его деструкции (гем, гемин), а также усиление продукции АФК редокс-активным железом может непосредственно приводить к дополнительному повреждению липидов и белков мембран клеток крови, в том числе и эритроцитов (Kumar, Bandyopadhyay, 2005; Орлов, 2008), а также ряда других тканей (Ciccoli *et al.*, 2008).

Один из главных низкомолекулярных антиоксидантов эритроцитов — GSH, который не только поддерживает антиоксидантную защиту, но также является важным сульфгидрильным буфером, поддерживающим SH-группы мембранных белков, Hb и ферментов эритроцитов в восстановленном состоянии (Galno, Alvarez-Idaboy, 2011). При гипотермии содержание GSH в эритроцитах достоверно снижается (табл. 2), причем это снижение может происходить как из-за его окисления в реакциях нейтрализации АФК, так и вслед-

ствие снижения количества НАДФН, необходимого для его восстановления. Установлено, что при кратковременном снижении температуры тела крыс до 28°C активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, образующей НАДФН, в эритроцитах крыс существенно снижается (Dede *et al.*, 2002).

Среди антиоксидантных ферментов эритроцитов важнейшие роли в поддержании антиоксидантного статуса играют СОД, которая осуществляет антирадикальную защиту и ингибирует ПОЛ на стадии зарождения цепи, а также каталаза, расщепляющая H_2O_2 (Çimen, 2008). В отличие от активности каталазы активность СОД эритроцитов достоверно возрастает при гипотермии (табл. 2). Повышение активности СОД не связано с синтезом новых молекул фермента, так как в эритроцитах крыс нет белоксинтезирующей системы. Между уровнем GSH в эритроцитах и активностью СОД обнаружена отрицательная корреляция ($r = -0.65$). Поскольку в молекуле СОД имеется редокс-чувствительная тиоловая группа (De Beus *et al.*, 2004), то повышение активности фермента при гипотермии можно связать с восстановлением важной для катализа SH-группы глутатионом.

Экспериментально показано, что при ОС при низкой концентрации GSH происходит активация не только ПОЛ, но и гемолиза эритроцитов (Ciccoli *et al.*, 2008). Не исключено, что при гипотермии лизируются те клетки, у которых низкая активность СОД, в результате чего остаются эритроциты с высокой активностью фермента.

Для предотвращения развития ОС при умеренной гипотермии были использованы витаминно-антиоксиданты. Результаты исследования показали, что курсовое раздельное введение вит. С не только предотвращает рост содержания МДА в плазме крови при гипотермии 30°C, но и способствует достоверному снижению его уровня относительно контроля (табл. 1). Кроме того, в эритроцитах введение вит. С достоверно повысило содержание GSH в клетке при гипотермии, а также предотвратило повышение активности СОД (табл. 2).

Содержание аскорбата — мощного антиоксиданта в биологических жидкостях, функционирующего в качестве окислительно-восстановительного кофактора и катализатора, — в плазме составляет 20–50 мкМ (Frei *et al.*, 1989). Аскорбат перехватывает такие активные формы кислорода, азота и липидов, как $O_2^{\cdot-}$, $\cdot OH$, пероксинитрит ($ONOO^-$), $LO^\cdot$, $LOO^\cdot$, а также такие радикалы антиоксидантов, как α -токофероксильный радикал, тиольный радикал, радикал урата, бета-каротина и др. (Carr, Frei, 1999). Совокупность этих свойств приводит к тому, что вит. С в форме аскорбат-иона — наиболее важный эндогенный антиоксидант плазмы крови, защищающий липиды

от окислительной деструкции (Linster, Van Schaftingen, 2007).

Следует отметить, что крысы способны сами синтезировать аскорбиновую кислоту (Rice, 2000). Так, внутрибрюшинная инъекция аскорбиновой кислоты в дозе 500 мг/кг массы тела приводила к пиковым концентрациям ~3 мМ в плазме крови, т.е. в 30 раз превышающим концентрации, получаемые при пероральном введении (50–100 мкМ) (Chen *et al.*, 2007). В этих условиях методом ЭПР было зарегистрировано образование радикалов аскорбата и H_2O_2 в экстрацеллюлярной жидкости, но не в плазме крови и эритроцитах, что связывают с наличием эффективной антиоксидантной системы. После однократного внутрибрюшинного введения крысам вит. С в дозе 500 мг/кг Маркович с соавт. (Marković *et al.*, 2010) также не обнаружили повышения уровня супероксид-аниона и H_2O_2 в плазме и эритроцитах, в то же время в плазме крови возрастал уровень пероксинитрита. В плазме крови крыс существенно увеличивался уровень МДА, в эритроцитах достоверно возрастало отношение GSSG/GSH из-за повышения активности глутатионпероксидазы и снижения активности глутатионредуктазы. Авторы считают, что прооксидантные эффекты вит. С способствуют снижению эффективности глутатионовой антиоксидантной системы, в результате чего в эритроцитах значительно увеличивается число телец Гейнца из-за окисления Hb и его денатурации.

Несмотря на то что мы уменьшили дозу вводимой животным аскорбиновой кислоты в 5 раз, это не предотвратило проявление ее прооксидантных эффектов. Так, введение вит. С способствовало активации процессов ПОЛ, а также ОМБ плазмы и МЭ при гипотермии (табл. 1, рис. 1).

Опубликованные данные свидетельствуют о том, что аскорбат способен стимулировать выработку АФК и липидов в присутствии свободного железа, высвобожденного из метHb (III), запуская реакцию Фентона (Dua *et al.*, 2012). Восстановление ферри-иона (трехвалентного железа) аскорбатом может иметь пагубные последствия из-за образования $\cdot\text{OH}$ и $\text{LO}\cdot/\text{LOO}\cdot$ при взаимодействии восстановленного железа (Fe^{2+}) с H_2O_2 или LOOH , что способствует свободнорадикальному окислению мембранных липидов и белков (Dua *et al.*, 2012). Эти данные свидетельствуют о том, что аскорбиновая кислота может выступать как антиоксидант, так и как прооксидант в зависимости от соотношения аскорбат/железо. При высоких концентрациях аскорбат может подвергаться самопроизвольному окислению с образованием H_2O_2 даже в отсутствие металлов переменной валентности (Ogawa *et al.*, 2004).

При гипотермии после курсового раздельного введения вит. Е уровень процессов ПОЛ в плазме крови в отличие от эритроцитов не снижается

(табл. 1). Различие в действии вит. Е в плазме крови и эритроцитах объясняется преимущественным его накоплением в мембранах эритроцитов, где он действует как антиоксидант. При гипотермии на фоне введения вит. Е уровень антиоксидантной защиты эритроцитов не изменяется относительно контрольных значений (табл. 2).

Вит. Е реализует свою высокую антиокислительную активность прежде всего путем перехвата липидного пероксильного радикала (Niki, 2014). Токоферол успешно и эффективно защищает липидные структуры мембран и липопротеинов, в частности полиненасыщенные жирные кислоты, от продолжения цепных реакций ПОЛ, вторично защищает от радикальной атаки мембраносвязанные ферменты.

Использованный нами препарат вит. Е содержал еще и селен. Исследования Эль-Демердаш (El-Demerdash, 2004) показали, что вит. Е и Se снижают образование МДА и увеличивают активность глутатион-S-трансферазы и общее содержание SH-групп в крови и тканях крыс. Se — важная часть фермента глутатионпероксидазы (Rayman, 2012), которая разрушает пероксиды прежде, чем они могут повредить ткани организма. Раздельное введение вит. Е, как и вит. С, способствует стимуляции процессов ОМБ МЭ при гипотермии (рис. 1).

Известно, что антиоксидантная активность α -токоферола увеличивается в восстановительной среде, способствующей переходу окисленного α -токоферола (радикала токоферола) обратно в восстановленную форму. Активность известных синергистов природного происхождения, механизм действия которых сводится к восстановлению α -токоферокислых радикалов, изменяется в ряду аскорбиновая кислота > цистеин > глутатион (Перевозкина, 2014). При гипотермии могут возникнуть сильные прооксидантные условия и заметное сокращение количества восстановителей, что приводит к снижению содержания GSH в эритроцитах, обнаруженному нами и другими исследователями (Василькова, Кухта, 1988; Dede *et al.*, 2002).

При накоплении радикалов токоферола наблюдается увеличение ПОЛ — пероксидация, опосредованная токоферолом (Stocker, 1999). Этот процесс возможен в плазме крови при гипотермии. Липиды, подвергшиеся пероксидации при накоплении радикалов α -токоферола, могут продуцировать ряд АФК, способных повреждать макромолекулы. H_2O_2 , генерируемая в этих условиях, способна переходить через мембраны и взаимодействовать с металлами переменной валентности (Fe, Cu) с образованием в реакции Фентона гидроксильных радикалов, участвующих в ОМБ (Дубинина, 2006). Кроме того, показано, что Cu, Zn-СОД, когда она окислительно повреждена,

выделяет свободную медь, что может привести к увеличению образования $\cdot\text{ОН}$. Было показано, что формирование α -токофероксильных радикалов способствует повреждению белков в атеросклеротических бляшках (Giessauf *et al.*, 1996).

Можно предположить, что в условиях гипотермии при высокой концентрации вит. Е и относительно низкой концентрации вит. С последний не успевает полностью восстановить α -токофероксильные радикалы и предотвратить окислительные повреждения мембранных белков. Об этом свидетельствуют данные, полученные при совместном введении вит. С и вит. Е. Так, при гипотермии после курсового совместного введения витаминов С и Е в плазме крови и эритроцитах не происходит активации процессов окислительной модификации липидов и белков, уменьшения содержания GSH и повышения активности СОД (табл. 1, 2, рис. 1). Как известно, α -токоферол способен прервать цепные реакции за счет образования стабильного радикала. Отдавая лабильный атом водорода липидному пероксильному радикалу, токоферол превращается в α -токофероксильный радикал (константа скорости этой реакции может достигать значений $5 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ (Niki, 2014). α -токофероксильный радикал — малоактивное соединение (его время жизни 12.5 с) (Ingold *et al.*, 1993). Образующийся радикал α -токоферола энергетически стабилен и обладает низкой реактивностью по отношению к другим молекулам мембраны. Окисленный α -токоферол восстанавливается в исходную форму при участии аскорбиновой кислоты (Niki, 2014). Именно синергизмом между вит. Е и вит. С объясняется их высокий антиоксидантный эффект при гипотермии при их совместном введении.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты, полученные при изучении интенсивности свободнорадикальных процессов в эритроцитах после снижения температуры тела крыс до 30°C, доказывают, что гипотермия стимулирует окислительную деструкцию липидов и белков МЭ. Раздельное курсовое введение витаминов С и Е оказывает как антиоксидантное, так и прооксидантное действие в эритроцитах при острой гипотермии. Только совместное курсовое введение витаминов С и Е предотвращает активацию свободнорадикальных процессов в крови и защищает мембрану эритроцита от окислительных повреждений при кратковременной умеренной гипотермии, что обосновывает перспективность их применения при использовании гипотермии в клинической практике.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Аль-Раби М.А.М., Астаева М.Д., Кличханов Н.К. Свободнорадикальные процессы в крови крыс при умеренной гипотермии разной длительности // Естеств. науки. 2015а. № 1 (50). С. 35–42.
- Аль-Раби М.А.М., Чалабов Ш.И., Астаева М.Д., Кличханов Н.К. Осмотическая резистентность эритроцитов крыс и концентрация тиоловых групп белков их мембраны зависят от длительности умеренной гипотермии // Соврем. проблемы науки и образования. 2015б. № 3; URL: www.science-education.ru/123-17364.
- Андреева Л.И., Кожемякин А.А., Кишкун А.А. Модификация метода определения перекисей липидов в тесте с тиобарбитуровой кислотой // Лаб. дело. 1988. № 11. С. 41–43.
- Арутюнян А.В., Дубинина Е.Е., Зыбина Н.Н. Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма. Методические рекомендации. СПб.: ИКФ Фолиант, 2000. 104 с.
- Василькова Т.У., Кухта В.К. Колькасць прадуктаў перакіснага акіслення ліпідаў і стан антыакісляльнай ахоўнай сістэмы эрытрацытаў в аумовах ахаладжэння арганізма // Весці АН БССР. Сер. біал. наук. 1988. № 5. С. 64–67.
- Василькова Т.В., Кухта В.К. Применение α -токоферола ацетата для коррекции процесса перекисного окисления липидов эритроцитов при общей гипотермии организма // Здоровоохранение Белоруссии. 1988. № 8. С. 45–48.
- Дубинина Е.Е. Активность и свойства супероксиддисмутазы эритроцитов и плазмы крови человека в онтогенезе // Укр. биохим. журн. 1988. Т. 60. № 3. С. 20–24.
- Дубинина Е.Е. Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток. Жизнь и смерть, созидание и разрушение: монография. СПб.: Медпресса, 2006. 400 с.
- Казеннов А.М., Маслова М.Н., Шалабодов А.Д. Исследование активности Na, К-АТФазы в эритроцитах млекопитающих // Биохимия. 1984. Т. 49. № 7. С. 1089–1095.
- Кличханов Н.К., Халилов Р.А., Мейланов И.С. Влияние гипотермии на активность Na, К-АТФазы и связывание гемоглобина в мембранах эритроцитов крыс // Биофизика. 2001. Т. 46. № 6. С. 1092–1095.
- Королюк М.А., Иванова Л.Н., Майорова И.Г., Токарев В.Е. Метод определения активности каталазы // Лаб. дело. 1988. № 1. С. 16–19.
- Мохаммед Т. Джабер Маяхи, Кличханов Н.К. Влияние даларгина на содержание гормонов гипофизарно-надпочечникового и гипофизарно-тиреоидного эндокринного комплексов в крови крыс при гипотермии // Изв. СамарНЦ РАН. 2012. Т. 14. № 5. С. 273–277.
- Орлов Ю.П. Внутрисосудистый гемолиз эритроцитов в развитии органных дисфункций при критических состояниях // Общ. реаниматология. 2008. Т. 4(2). С. 88–93.
- Перевозкина М.Г. Тестирование антиоксидантной активности полифункциональных соединений ки-

- нетическими методами. Монография. Новосибирск: Изд-во СИБАК, 2014. 240 с.
- Эмирбеков Э.З., Кличханов Н.К. Свободнорадикальные процессы и состояние мембран при гипотермии. Ростов н/Д.: Изд-во Южн. фед. ун-та, 2011. 200 с.
- Эмирбеков Э.З., Сфиев А.А., Кличханов Н.К. Исследование устойчивости эритроцитов крыс при гипотермии // Проблемы криобиологии. 1991. № 4. С. 31–33.
- Aslan L., Meral I. Effect of oral vitamin E supplementation on oxidative stress in guinea-pigs with short-term hypothermia // Cell Biochem. Function. 2007. V. 25. Iss. 6. P. 711–715.
- Bailey S.R., Mitra S., Flavahan S., Flavahan N.A. Reactive oxygen species from smooth muscle mitochondria initiate cold-induced constriction of cutaneous arteries / Ed. Bailey S.R. // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 2005. V. 289. P. H243–H250.
- Balla J., Jacob H.S., Balla G., Nath K., Eaton J.W., Vercellotti G.M. Endothelial-cell heme uptake from heme proteins: induction of sensitization and desensitization to oxidant damage // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1993. V. 90. P. 9285–9289.
- Blagojević D. Free radical biology in hypothermia // Systems biology of free radicals and antioxidants / Ed. Laher I. Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag, 2014. P. 376–392.
- Bogdanova A., Petrushanko I., Boldyrev A., Gassmann M. Oxygen- and redox-induced regulation of the Na/K ATPase // Curr. Enzyme Inhibit. 2006. V. 2. P. 37–59.
- Carr A., Frei B. Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions? // FASEB J. 1999. V. 13. P. 1007–1024.
- Chen Q., Espey M.G., Sun A.Y., Lee J.H., Krishna M.C., Shacter E., Chovke P.L., Pooput C., Kirk K.L. Ascorbate in pharmacologic concentrations selectively generates ascorbate radical and hydrogen peroxide in extracellular fluid in vivo // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2007. V. 104. P. 8749–8754.
- Ciccoli L., Leoncini S., Signorini C., Comporti M. Iron and erythrocytes: physiological and pathophysiological aspects // Oxidants in Biology. A Question of Balance / Eds Valacchi G., Davis P.A. Berlin: Springer, 2008. P. 167–181.
- Çimen M.Y.B. Free radical metabolism in human erythrocytes // Clin. Chim. Acta. 2008. V. 390. P. 1–11.
- De Beus M.D., Chung J., Colon W. Modification of cysteine 111 in Cu/Zn superoxide dismutase in altered spectroscopic and biophysical properties // Protein Sci. 2004. V. 13. P. 1347–1355.
- Dede S., Deger Y., Meral I. Effect of short-term hypothermia on lipid peroxidation and antioxidant enzyme activity in rats // J. Vet. Med. 2002. V. A49. P. 286–288.
- Dua J., Cullena J.J., Buettner G.R. Ascorbic acid: Chemistry, biology and the treatment of cancer // Biochim. Biophys. Acta. 2012. V. 1826(2). P. 443–457.
- El-Demerdash F.M. Antioxidant effect of vitamin E and selenium on lipid peroxidation, enzyme activities and biochemical parameters in rats exposed to aluminium // J. Trace Elem. Med. Biol. 2004. V. 18. P. 113–121.
- Frank S.M., Cattaneo C.G., Wieneke-Brady M.B., El-Rahmany H., Gupta N., Lima J.A.C., Goldstein D.S. Threshold for adrenomedullary activation and increased cardiac work during mild core hypothermia // Clin. Sci. 2002. V. 102. P. 119–125.
- Frei B., England L., Ames B.N. Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1989. V. 86. P. 6377–6381.
- Galno A., Alvarez-Idaboy J.R. Glutathione: mechanism and kinetics of its non-enzymatic defense action against free radicals // RSC Adv. 2011. V. 1. P. 1763–1771
- Giessauf A., vanWickern B., Simat T., Steinhart H., Esterbauer H. Formation of N-formylkynurenine suggests the involvement of apolipoprotein B-100 centered tryptophan radicals in the initiation of LDL lipid peroxidation // FEBS Lett. 1996. V. 389. P. 136–140.
- Halliwel B., Gutteridge J.M. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease // Biochem. J. 1984. V. 219. P. 1–14.
- Ingold K.U., Bowry V.W., Stocker R., Walling C. Autooxidation of lipids and antioxidant by α -tocopherol and ubiquinol in homogenous solution and in aqueous dispersions of lipids – unrecognized consequences of lipid particle size as exemplified by oxidation of human low density lipoproteins // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1993. V. 90. P. 45–49.
- Kuhn V., Diederich L., Keller T.C.S., Kramer C.M., Lückstädt W., Panknin C., Suvorova T., Isakson B.E., Kelm M., Cortese-Krott M.M. Red blood cell function and dysfunction: redox regulation, nitric oxide metabolism, anemia // Antioxid. Redox Signal. 2017. V. 26. № 13. P. 718–741.
- Kumar S., Bandyopadhyay U. Free heme toxicity and its detoxification systems in human // Toxicol. Lett. 2005. V. 157(3). P. 175–188.
- Linster C.L., van Schaftingen E. Vitamin C. Biosynthesis, recycling and degradation in mammals // FEBS J. 2007. V. 274(1). P. 1–22.
- Lowry D.H., Rosebrough H.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. 1951. V. 193. P. 265–275.
- Marković S.D., Đačić D.S., Cvetković D.M., Obradović A.D., Žižić J.B., Ognjanović B.I., Štajn A.Š., Saičić Z.S., Spasić M.B. Effects of acute treatment of vitamin C on redox and antioxidative metabolism in plasma and red blood cells of rats // Kragujevac J. Sci. 2010. V. 32. P. 109–116.
- Mohanty J.G., Nagababu E., Rifkind J.M. Red blood cell oxidative stress impairs oxygen delivery and induces red blood cell aging // Front. Physiol. 2014. V. 5. Art. 84. P. 100–105.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00084.eCollection>
- Niki E. Role of vitamin E as a lipid-soluble peroxy radical scavenger: *in vitro* and *in vivo* evidence // Free Radic. Biol. Med. 2014. V. 66. P. 3–12.
- Ogawa E., Sugimoto Y., Agar N.S. Effects of ascorbic acid on high-GSH and normal-GSH dog erythrocytes (II) // Comp. Clin. Path. 2004. V. 13. P. 19–23.
- Pandey K.B., Rizvi S.I. Biomarkers of oxidative stress in red blood cells // Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub. 2011. V. 155(2). P. 131–136.
- Rayman M.P. Selenium and human health // Lancet. 2012. V. 379(9822). P. 1256–1268.

- Rice M.E. Ascorbate regulation and its neuroprotective role in the brain // Trends Neurosci. 2000. V. 23. P. 209–216.
- Rifkind J.M., Mohanty J.G., Nagababu E. The pathophysiology of extracellular hemoglobin associated with enhanced oxidative reactions // Front. Physiol. Oxidant Physiol. 2015. V. 5. Art. 500.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00500>
- Stocker R. The ambivalence of vitamin E in atherogenesis // Trends Biochem. Sci. 1999. V. 24(6). P. 219–223.
- Umbreit J. Methemoglobin – it's not just blue: A concise review // Am. J. Hematol. 2007. V. 82. P. 134–144.
- Venditti P., Rosa R.D., Meo S.D. Effect of cold-induced hyperthyroidism on H₂O₂ production and susceptibility of stress conditions of rat liver mitochondria // Free Rad. Biol. Med. 2004. V. 36. №. 3. P. 348–358.
- Wawrzyniak A., Gornicka M., Hamulka J., Gajevska M., Drywien M., Pierzynowska J., Gronowska-Senger A. α -Tocopherol, ascorbic acid and β -carotene protect against oxidative stress but reveal no direct influence on p53 expression in rats subjected to stress // Nutrition Res. 2013. V. 33. P. 868–875.

Influence of Vitamins C and E on Free Radical Processes in Blood Rats in Acute Moderate Hypothermia

N. K. Klichkhanov^{1,*}, J. G. Ismailova¹, M. D. Astaeva¹, and Sh. I. Chalabov^{1,2}

¹Dagestan State University, Department of Biochemistry and Biophysics, ul. Gadzhieva 43a, Makhachkala, 367000 Russia

²Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, prosp. Toreza, 44, St. Petersburg, 194223 Russia

*e-mail: klich-khan@mail.ru

We assessed the effect of intraperitoneal administration of ascorbic acid (vitamin C, 100 mg/kg/day) and α -tocopherol (vitamin E-Selenium, 40 mg/kg/day), given alone or in combination for 7 days, on the intensity of free-radical processes in the blood of rats in acute short-term hypothermia of 30°C. Hypothermia contributes to the development of oxidative stress in erythrocytes, stimulating the peroxidation of lipids (POL) and proteins (OMP), reducing the content of glutathione (GSH) with increasing the activity of SOD in erythrocytes. Separate administration of vitamins prevents the decrease in the level of GSH and an increase in the activity of SOD in erythrocytes in hypothermia, but vitamin C stimulates of POL and OMP, and vitamin E stimulates of OMP of the erythrocyte membranes. Co-administration of vitamins C and E completely prevents the development of oxidative stress in erythrocytes during hypothermia.