

Wpływ wysokich dawek witaminy C i ozonu na przebieg stresu oksydacyjnego u szczurów

MARIA JEDLIŃSKA-KRAKOWSKA

Zespół Patofizjologii Katedry Patologii i Farmakologii Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UWM,
ul. Oczapowskiego 13, 10-718 Olsztyn

Jedlińska-Krakowska M.

Influence of high doses of vitamin C and ozone on the course of oxidative stress in rats

Summary

The aim of the study was to determine whether high doses of Vitamin C may alleviate the effects of oxidative stress caused by ozone, or whether they actually intensify its course and demonstrate pro-oxidative activity. The experiment was conducted on adult male rats divided into 6 groups: Group I – control animals; Group II and III – animals which were simultaneously ozonated and administered intramuscular injections of Vit C in doses of 20 and 40 mg/rat respectively; Group IV and V – non-ozonated animals, which were administered the above doses of Vit C every fifth day for a period of 35 days; Group VI – rats ozonated without Vit C.

The results of the study indicated that the highest level of indexes defining the intensity of oxidative stress occurred both in animals which were ozonated and given high doses of Vit C as well as in non-ozonated animals which were given high doses the vitamin. AST activity and glucose levels were also highest in the above groups and displayed a similar pattern. It may thus be assumed that high doses of Vit C do not prevent organisms from ozone-induced oxidative stress, and may even increase its intensity.

Keywords: ozone, oxidative stress, Vitamin C

Jednym z bardziej toksycznych składników zanieczyszczeń powietrza jest ozon. Gaz ten jest głównym elementem smogu fotochemicznego i charakteryzuje się wysoką reaktywnością chemiczną. Jego bezpośrednie oddziaływanie na organizm zachodzi poprzez układ oddechowy. Szkodliwy wpływ tego gazu na inne niż płuca tkanki i narządy wiąże się z uruchomieniem kaskady reakcji, w wyniku których powstają wolne rodniki tlenowe (ROS), cechujące się obecnością niesparowanego elektronu. Reagując z molekułami biologicznymi, generują one powstawanie kolejnych wolnych rodników, co prowadzi do zaburzeń struktury i funkcji tych cząsteczek. Zjawisko to dotyczy wszystkich głównych szlaków metabolicznych, przede wszystkim lipidów, białek i węglowodanów (12, 18).

Jednym z ważniejszych markerów stresu oksydacyjnego jest końcowy produkt peroksydacji lipidów – dialdehyd malonowy (MDA). Związek ten uszkadza polipeptydy, moduluje zjawisko cross-linking w białkach, działa mutagennie i karcynogennie (5).

Organizmy żywe wykształciły szereg mechanizmów obronnych, przerywających reakcje wolnorodnikowe i chroniących je przed stresem oksydacyjnym. Jednym z powszechnie występujących i stosowanych antyoksydantów jest witamina C (kwas askorbinowy) redukująca reaktywne formy tlenowe, a jednocześnie aktywnie uczestnicząca w szeregu przemian metabolicznych (1, 7).

Celem badań było określenie, czy wysokie dawki witaminy C łagodzą skutki stresu oksydacyjnego wywołanego przez ozon oraz czy wywierają wpływ na jego przebieg.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono na 36 dorosłych szczurach samcach rasy Wistar Hannover, o średniej masie ciała 420 ± 10 g i wieku 12 miesięcy. Wszystkie zwierzęta zostały losowo podzielone na 6 grup, oznaczonych następującymi skrótami (w każdej $n = 6$): I (K) – zwierzęta kontrolne; II (20C + Oz) i III (40C + Oz) – zwierzęta ozonowane i otrzymujące domięśniowe iniekcje witaminy C (Vitaminum C, Pliva Kraków) w dawkach odpowiednio 20 i 40 mg/szczura oraz IV (20C) i V (40C) – zwierzęta nieozonowane, otrzymujące ww. dawki witaminy C co 5 dni przez okres 35 dni; VI (Oz) – szczury ozonowane bez iniekcji witamin. Szczury z grupy II i III i VI eksponowano na $0,5 \pm 0,2$ ppm ozonu przez okres 35 dni po 5 h dziennie.

Ozon wytwarzano ze sprężonego powietrza w ozonatorze typu IMPOZ-4 (Instytut Mechaniki Precyzyjnej, Warszawa) i dostarczano go do uszczelnionego chemicznie neutralną folią polietylenową pomieszczenia, gdzie ulegał samorzutnemu przemieszaniu z obecnym tam powietrzem. Stężenie ozonu w komorze ekspozycyjnej kontrolowano metodą jodometryczną (14). Podczas ozonowania zwierzęta miały swobodny dostęp do wody, natomiast pasza, ze względu na utleniający wpływ ozonu, była odstawiana. Poza pięcioma godzinami ekspozycji wszystkie szczury przebywa-

ły w identycznych warunkach uwzględniających skład powietrza, temperaturę i sposób żywienia. Po zakończeniu doświadczenia od wszystkich szczurów, będących w narkozie halotanowej (Narcotan, Leciva Czechy), pobrano maksymalną ilość krwi metodą punkcji serca. Bezpośrednio po skrwawieniu zwierzęcia wycięto fragment wątroby, nerki oraz gonady w celu oznaczenia w nich koncentracji dialdehydu malonowego (MDA) (16). MDA oznaczano w 20% ho-

mogenacie z ww. tkanek, sporządzonym na bazie płynu fizjologicznego. W pełnej krwi, zaraz po jej pobraniu, oznaczono aktywność peroksydazy glutationowej (GPx) (10), zaś w osoczu krwi określono koncentrację dialdehydu malonowego (16) i glukozy (zestaw diagnostyczny Biochem-

test, Polskie Odczynniki Chemiczne, Gliwice) oraz aktywność aminotransferazy alaninowej (ALT) i asparaginianowej (AST) (zestawy diagnostyczne Pointe Scientific, Pointe Scientific Polska sp. z o.o., Warszawa).

Statystyczne opracowanie wyników obejmowało wyliczenie średnich arytmetycznych, błędu standardowego średniej i istotności różnic w stosunku do grupy kontrolnej.

Badania na zwierzętach wykonano zgodnie z wytycznymi ustawy o ochronie zwierząt i zaleceniami Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach przy UWM w Olsztynie (Opinia nr 26/N, wyd. 29.04.2005).

Wyniki i omówienie

U wszystkich ozonowanych szczurów zaobserwowano wzrost aktywności peroksydazy glutationowej oraz podwyższoną koncentrację dialdehydu malonowego, zarówno w tkankach, jak i we krwi (tab. 1). Najwyższa aktywność GPx miała miejsce u zwierząt ozonowanych oraz w grupach otrzymujących najwyższe dawki witaminy C. Podobnie kształtowała się koncentracja MDA w osoczu, osiągając najwyższe wartości u szczurów ozonowanych i otrzymujących iniekcje kwasu askorbinowego (AA). Wzrost poziomu obu tych wskaźników we krwi następuje zwykle równolegle – wzrostowi aktywności GPx towarzyszy wzrost poziomu MDA (13). Wiąże się to, z jednej strony, ze zwiększonym zużyciem antyoksydantów i zredukowanego glutationu, z drugiej zaś, z nasileniem procesu peroksydacji lipidów (1). W tkankach najwyższy poziom dialdehydu malonowego zaobserwowano w nerkach, gdzie wzrósł on statystycznie istotnie (s.i.) we wszystkich grupach doświadczalnych, w przeciwieństwie do wątroby, gdzie zanotowano tylko niewielkie, nieistotne jego wahania. Z kolei w jądrach najwyższą koncentrację MDA zanotowano u zwierząt ozonowanych oraz otrzymujących najwyższe dawki witaminy C.

Zarówno wątroba, jak i nerki, będąc magazynami glikogenu, odgrywają kluczową rolę zarówno w syntezie, jak i metabolizmie askorbinianów. Istnieje wyraźna współzależność między ich podażą a syntezą

Tab. 1. Poziom wybranych wskaźników stresu oksydacyjnego u szczurów ($\bar{x} \pm \text{SEM}$)

Wskaźnik/ Grupa	GPx (U/l)	MDA osocze ($\mu\text{M/l}$)	MDA jądra ($\mu\text{M/l}$)	MDA nerki ($\mu\text{M/l}$)	MDA wątroba ($\mu\text{M/l}$)
K	2192 $\pm$ 50,2	6,50 $\pm$ 0,13	2,20 $\pm$ 0,02	3,20 $\pm$ 0,22	3,60 $\pm$ 0,12
20C + Oz	2315 $\pm$ 29,4	7,05* $\pm$ 0,22	2,10 $\pm$ 0,06	5,10** $\pm$ 0,28	3,50 $\pm$ 0,20
40C + Oz	2439** $\pm$ 65,3	8,10** $\pm$ 0,29	2,40* $\pm$ 0,02	5,00** $\pm$ 0,22	4,00 $\pm$ 0,08
20C	2095 $\pm$ 85,5	6,65 $\pm$ 0,08	2,20 $\pm$ 0,02	4,35** $\pm$ 0,22	4,10 $\pm$ 0,13
40C	2450** $\pm$ 29,8	6,60 $\pm$ 0,44	3,40** $\pm$ 0,11	4,55** $\pm$ 0,11	3,80 $\pm$ 0,18
Oz	2433* $\pm$ 53,9	6,90* $\pm$ 0,02	3,00** $\pm$ 0,15	4,35** $\pm$ 0,22	4,20 $\pm$ 0,42

Objaśnienia: * – $p \leq 0,05$, ** – $p \leq 0,01$ w porównaniu do grupy kontrolnej

i katabolizmem. Przy wzroście stężenia askorbinianów (zarówno endo-, jak i egzogennych) spada aktywność oksydazy L-gulonolaktonu, a więc i ich wytwarzanie, głównie w wątrobie (1). Ponadto pobieranie witaminy C przez różne tkanki nie jest jednakowe. Największe jej ilości wychwytywane są przez narządy o wysokiej aktywności metabolicznej. W związku z tym anty- bądź prooksydacyjne działanie kwasu askorbinowego będzie zróżnicowane w poszczególnych tkankach. Z kolei główną drogą eliminacji AA i jego metabolitów, jak również wysoce toksycznego MDA są nerki (1, 3), stąd ich narażenie na stres oksydacyjny jest stosunkowo wysokie.

W dostępnej literaturze istnieją zróżnicowane dane dotyczące zarówno anty-, jak i prooksydacyjnego działania różnych dawek witaminy C. W dużych dawkach, w obecności metali aktywnych w reakcjach redox, może ona działać jako prooksydant, przyczyniając się do formowania rodników hydroksylowych, jednej z najbardziej aktywnych form ROS. Zachodzi to poprzez reakcję Fentona, gdzie jony metali przejściowych są systematycznie redukowane przez askorbiniany. Prowadzi to do nasilenia procesów utleniania lipidów, białek czy DNA. W układach biologicznych żelazo rzadko występuje w stanie wolnym, lecz przeważnie w połączeniu z białkami, co nie dopuszcza do katalizowania procesów peroksydacji. Zarówno egzogenne metale przejściowe, jak i askorbiniany zwiększają uwalnianie żelaza z białek wiążących, co nasila te procesy (reakcja Fentona) (2, 9). Istniejące w literaturze rozbieżności dotyczące ochronnego działania witaminy C na lipidy, białka i DNA mogą wynikać z różnej zdolności makromolekuł do wiązania jonów metali i natężenia reakcji redox zachodzących z udziałem tych jonów (2, 9). Nie we wszystkich więc narządach taka sama dawka witaminy będzie wywierała identyczne działanie. Według Suresh i wsp., w wątrobie tylko wysokie dawki zapobiegają szkodliwym skutkom stresu oksydacyjnego (15). Z kolei wcześniejsze badania własne wykazały, że duże dawki kwasu askorbinowego prowadzą w jądrach do uszkodzeń nabłonka plemnikotwórczego i przedwczesnej spermiacji, nawet w grupach zwierząt nie ekspozowanych na ozon (6).

Wykazano, że witamina C w dawkozależny sposób stymuluje syntezę tlenku azotu (NO). W dużych stę-

Tab. 2. Poziom wybranych wskaźników biochemicznych w osoczu krwi szczurów ($\bar{x} \pm \text{SEM}$)

Wskaźnik/ Grupa	Glukoza (mg/dl)	ALT (U/l)	AST (U/l)
K	55,7 $\pm$ 2,17	33,60 $\pm$ 2,82	102,5 $\pm$ 4,46
20C + Oz	74,22** $\pm$ 4,69	25,60 $\pm$ 2,32	167,15* $\pm$ 20,50
40C + Oz	81,40** $\pm$ 6,60	42,80* $\pm$ 2,12	144,0* $\pm$ 14,00
20C	66,35 $\pm$ 6,57	36,80 $\pm$ 2,82	111,7 $\pm$ 19,90
40C	66,72 $\pm$ 1,27	36,50 $\pm$ 2,32	118,7 $\pm$ 11,90
Oz	79,30** $\pm$ 7,07	41,07 $\pm$ 4,86	137,5* $\pm$ 11,70

Objaśnienia: jak w tab. 1.

zeniach działa on prooksydacyjnie, gdyż pod wpływem aktywnych form tlenu tworzą się nadazotyny, które same inicjują procesy peroksydacji. Ponadto NO, podobnie jak kwas askorbinowy, hamuje aktywność niektórych enzymów antyoksydacyjnych (8, 17). Zjawiska tego nie obserwowano przy łącznym podawaniu askorbinianów i witaminy E (4). Wcześniejsze badania własne wykazały, że w niższych dawkach AA wykazuje działanie antyoksydacyjne, najskuteczniejsze przy podawaniu łącznym właśnie z witaminą E (6).

We wszystkich doświadczalnych grupach zwierząt zaobserwowano wzrost poziomu glukozy, najsilniejszy u szczurów ozonowanych oraz ozonowanych pod osłoną witaminy C (tab. 2). Podobnie kształtowała się aktywność aminotransferazy asparaginianowej. Z kolei aminotransferaza alaninowa wykazywała najwyższą aktywność u zwierząt ozonowanych i otrzymujących najwyższe dawki kwasu askorbinowego.

Glukoza jest podstawowym substratem w syntezie kwasu askorbinowego, jednakże przy tak wysokiej podaży zewnętrznej AA proces ten ulega zahamowaniu. Wzrost jej poziomu może w niespecyficzny sposób wskazywać na istniejący w organizmie stan stresu, przebiegający z uruchomieniem układu współczulno-rdzeniowo-nadnerczowego, a następnie podwzgorzowo-przysadkowo-korowo-nadnerczowego. Ponadto sama witamina C uczestniczy w syntezie katecholamin i steroidów nadnerczowych, pośrednio wpływając na koncentrację glukozy we krwi. Wykazano również, że w stanie stresu oksydacyjnego dochodzi do upośledzenia funkcji białka wiążącego insulinę, które jest ważnym elementem transportera glukozy do wnętrza komórki (11).

Podobnie nieswoistym, chociaż bardzo czułym wskaźnikiem zmian patologicznych zachodzących w tkankach jest aktywność aminotransferaz. Stosunek poziomów AST i ALT może wskazywać na uszkodzenie innych niż wątroba tkanek, takich jak: mięsień sercowy, nerki czy płuca. Wiadomym jest, że MDA sam będąc produktem patologicznego metabolizmu lipidów, przekształca strukturę wielu biomolekuł, m.in. nasilając procesy miażdżycowe i uszkodzając mięsień sercowy (3).

Na podstawie uzyskanych wyników można przypuszczać, iż wysokie dawki witaminy C nie tylko nie zapobiegają wystąpieniu stresu oksydacyjnego indukowanego przez ozon, ale wręcz zwiększają jego natężenie.

Piśmiennictwo

1. Banhegyi G., Braun L., Csala M., Puskas F., Mandl J.: Ascorbate metabolism and its regulation in animals. *Free Radical Biol. Med.* 1997, 23, 793-803.
2. Carr A., Frei B.: Does vitamin C act as pro-oxidant under physiological conditions? *FASEB J.* 1999, 13, 1007-1024.
3. Del Rio D., Stewart A. J., Pellegrini N.: A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 2005, 15, 316-328.
4. Gorbunov N. V., Osipov A. N., Sweetland M. A., Day B. W., Elsayed N. M., Kagan V. E.: NO-redox paradox: direct oxidation of α -tocopherol and α -tocopherol-mediated oxidation of ascorbate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996, 219, 835-841.
5. Hipkiss A. R., Preston J. E., Himswoth D. M., Worthington V. C., Abbot N. J.: Protective effect of carnosine against malondialdehyde-induced toxicity towards cultured rat brain endothelial cells. *Neurosci. Lett.* 1997, 238, 135-138.
6. Jedlińska-Krakowska M., Bomba G., Jakubowski K., Rotkiewicz T., Jana B.: The impact of oxidative stress and supplementation with vitamins E and C on testes morphology in rats. *J. Reprod. Dev.* 2006, 52, 203-209.
7. Madej E., Grzęda M.: Właściwości, niedobór i zakres zastosowań witaminy C w lecznictwie. *Medycyna Wet.* 2000, 56, 627-631.
8. Mizutani A., Maki H., Torii Y., Hitomi K., Tsukagoshi N.: Ascorbate-dependent enhancement of nitric oxide formation in activated macrophages. *Nitric Oxide* 1998, 2, 235-241.
9. Naidu A. K.: Vitamin C in human health and disease is still a mystery? An overview. *Nutr. J.* 2003, 2, 7.
10. Paglia D. E., Valentine W. N.: Studies on quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.* 1967, 70, 158-169.
11. Pessler D., Rudich A., Bashan N.: Oxidative stress impairs nuclear proteins binding to the insulin responsive element in the GLUT4 promoter. *Diabetologia* 2001, 44, 2156-2164.
12. Pryor W. A., Squadrito G. L., Friedman M.: The cascade mechanism to explain ozone toxicity: the role of lipid ozonation products. *Free Radical Biol. Med.* 1995, 19, 935-941.
13. Quej D., Aliakbarpour H. R., Kalavi K.: Relationship between malondialdehyde level and glutathione peroxidase activity in diabetic rats. *Clin. Chim. Acta.* 2004, 340, 79-83.
14. Saltzman B. E., Gilbert N.: Iodometric microdetermination of organic oxidants and ozone. *Anal. Chem.* 1959, 31, 1914-1920.
15. Suresh M. V., Sreeranjit Kumar C. V., Lal J. J., Indira M.: Impact of massive ascorbic acid supplementation on alcohol induced oxidative stress in guinea pigs. *Toxicol. Lett.* 1999, 104, 221-229.
16. Ward A. P., Till O. G., Hatherill J. R., Annersley T. M., Kunkel R. G.: Systemic complement activation, lung injury and products of lipid peroxidation. *J. Clin. Invest.* 1985, 76, 517-527.
17. Zajac M., Pawelczyk E.: Chemia leków. Akademia Medyczna im. K. Marcinkowskiego, Poznań 2000, 629-635.
18. Zieliński H.: Ozon – jego znaczenie i toksyczność. *Medycyna Wet.* 1997, 53, 323-329.

Adres autora: dr Maria Jedlińska-Krakowska, ul. Oczapowskiego 13, 10-718 Olsztyn; e-mail: maried@uwm.edu.pl