

УДК 612 116+16.716  
©Коллектив авторов

## СОДЕРЖАНИЕ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ И ЕЕ ОКИСЛЕННЫХ ФОРМ ПРИ СТАРЕНИИ ЭРИТРОЦИТОВ, ПРОДУЦИРОВАННЫХ В УСЛОВИЯХ НОРМАЛЬНОГО И НАПРЯЖЕННОГО ЭРИТРОПОЭЗА

*А.М. Кудряшов<sup>1</sup>, Н.М. Титова<sup>2</sup>, А.А. Савченко<sup>2</sup>, Е.В. Кудряшова<sup>2</sup>*

<sup>1</sup> Краевой наркологический диспансер, 660048, Красноярск, ул. Комбайностроителей, 5; факс: (3912) 211440; эл.почта: anti\_krasu@mail.ru  
<sup>2</sup> Красноярский государственный университет, кафедра биохимии и физиологии человека и животных, 660041, Красноярск, пр. Свободный, 79, факс: (3912) 448781

Исследовали изменение уровня аскорбиновой кислоты (АК) и ее окисленных форм - дегидроаскорбиновой (ДАК) и дикетогулоновой (ДКГК) кислот, а также суммы этих метаболитов и АК (ΣАК) в процессе старения эритроцитов, образованных в физиологических условиях и при стресс-воздействии (массивная кровопотеря). Показано, что старение эритроцитов интактных животных приводит к накоплению ДКГК и снижению АК, ДАК и ΣАК. При сравнении молодых клеток со старыми, образованными до и после кровопотери, обнаружено более выраженное снижение концентрации АК (52%) и менее выраженное накопление ДКГК (27%) на 7 сутки. Эритроциты на 7, 20, 30 сутки после кровопотери характеризуются повышенной концентрацией ДАК, ДКГК, ΣАК, на фоне наименьшего содержания АК, в сравнении с эритроцитами интактных кроликов. Подобные изменения исследованных параметров были наиболее выражены на 7 сутки, менее на 20 и к 30 суткам достигали контрольных величин.

**Ключевые слова:** аскорбиновая кислота, дегидроаскорбиновая кислота, дикетогулоновая кислота, эритроцит, старение, эритропоэз.

**ВВЕДЕНИЕ.** Физиологическая функция эритроцитов, образованных в условиях нормального эритропоэза, неразрывно связана с образованием активных форм кислорода (АФК), играющих важную роль в механизме окислительного повреждения биомолекул данных клеток. Указанная возможность окисления биомолекул в эритроцитах в значительной степени ограничивается низкомолекулярным звеном антиоксидантной системы [1].

Одним из важнейших компонентов данного звена является L-аскорбиновая кислота (2,3-дигидро-L-гулоновая кислота, витамин С, АК) [2]. По химическому строению L-аскорбиновая кислота представляет ненасыщенный полиокси-γ-лактон кислоты со структурой, близкой структуре глюкозы. Наличие в АК двух енольных гидроксильных у 2-го и 3-го углеродного атомов обуславливает ее способность к обратимому окислению, продуктом которого является дегидроаскорбиновая кислота (ДАК). Этот процесс не сопровождается снижением витаминной активности. Разрыв лактонной связи в ДАК приводит к необратимому образованию 2,3-дикетогулоновой кислоты (ДКГК), лишенной биологической активности. При окислении ДКГК расщепляется на щавелевую и L-треоновую кислоты [3]

При действии экстремальных факторов на организм меняется интенсивность свободнорадикального окисления (СРО) в системе красной крови и, как следствие этого, в эритроцитах, в зависимости от их возраста, происходит изменение в содержании АК и ее окисленных форм. Изучение динамики изменений уровня различных форм аскорбиновой кислоты может внести вклад в понимание роли витамина С в механизмах неспецифической реакции данных клеток на экстремальное воздействие.

К экстремальным факторам, обладающим способностью активировать свободнорадикальные реакции в эритроцитах, относится гипоксический шок, вызываемый массивной кровопотерей [4-8]. При гипоксии активируется симпатико-адреналовая система, выработка гормонов кроветворения, которые в комплексе повышают интенсивность эритропоэза [9, 10]. Чем больше доля потерянной крови, тем значительнее усиление эритропоэза, активирование свободнорадикальных реакций в циркулирующих клетках красной крови. Эритроциты, продуцированные при напряженном эритропоэзе, отличаются от клеток, образованных в условиях нормального эритропоэза, укороченным сроком жизни, измененными физико-химическими свойствами, рядом метаболических особенностей [11]. В месте с тем направленность метаболизма АК и ее окисленных форм при старении эритроцитов в физиологических условиях и при действии экстремальных факторов не исследована.

В связи с этим целью данной работы явилось изучение содержания аскорбиновой кислоты и ее окисленных форм (дегидроаскорбиновой и дикетогулоновой кислот) в эритроцитах разного возраста, образованных в условиях нормального и напряженного эритропоэза.

**МЕТОДИКА.** В работе использовали хлорид натрия, натрий-фосфатный буфер "ICN" (США), 2,4-динитрофенилгидразин, 2,6-дихлорфенолиндифенолят натрия "Merck" (Германия), унитиол "Sigma" (США). "Аналитически чистые" трихлоруксусная кислота, серная кислота, тиомочевина были произведены в России. Объектом исследования служили полуторагодовалые кролики-самцы породы Шиншилла весом 2,5-3,0 кг. Всего в работе использовано 36 животных. Стимуляцию эритропоэза у экспериментальных животных вызывали массивной кровопотерей [12]. Объем кровопотери определяли относительно объема крови (43% от общего объема крови), исходя из того, что объем крови у теплокровных животных составляет около 7% от массы тела [13]. Затем, через определенные временные интервалы осуществляли повторное взятие крови у анемизированных животных на 7-е сутки после кровопотери (1 группа животных), на 20-е сутки (2 группа животных) и на 30-е сутки (3 группа животных). Кровопотерю у интактных, а также повторное взятие крови у анемизированных кроликов производили из уха путем надрезания краевой ушной вены; антикоагулянт служил гепарин. Концентрацию аскорбиновой кислоты и ее окисленных форм (ДАК, ДКГК) и суммы всех аскорбиновых кислот ( $\Sigma$ АК) определяли во фракционированной крови фракции молодых (ФМЭ), фракции старых эритроцитов (ФСЭ), образованных в условиях нормального и напряженного эритропоэза. Для получения клеток разного возраста кровь подвергали фракционированию согласно методике разработанной на кафедре биохимии и физиологии человека и животных Красноярского государственного университета [14]. Принцип метода основан на том, что старение эритроцитов сопровождается увеличением удельного веса данных клеток. Поэтому при центрифугировании цельной крови происходит распределение клеток в соответствии с их удельным весом. В верхней части эритроцитарного столба собираются наиболее молодые клетки, в нижней части - наиболее старые. Метод заключается в многократном центрифугировании эритроцитов, взвешенных в плазме, и последовательном отборе верхней и нижней частей эритроцитарного столба. Фракционирование контролировали путем подсчета ретикулоцитов [15]. Для количественного определения АК, ДАК, ДКГК в эритроцитах использовали метод Roe и Kuethler (1946) в модификации Соколовского [16]. Метод основан на

взаимодействии 2,4-динитрофенилгидразина с дегидроаскорбиновой кислотой (ДАК) и образованием в серной кислоте соответствующего озазона. Точно также протекает реакция с дикетогулоновой кислотой (ДКГК). Озазоны ДАК и ДКГК дают красное окрашивание, которое регистрировали спектрофотометрически при длине волны 540 нм. Для вычисления суммы всех кислот их окисляли 2,6-дихлорфенолиндофенолятом натрия. Содержание АК определяли по разности между содержанием суммы всех аскорбиновых кислот (АК, ДАК, ДКГК) и концентрацией окисленных форм аскорбиновой кислоты (ДАК, ДКГК). Для дифференциального определения ДАК и ДКГК смесь подвергали действию унитиола, при этом восстанавливается в АК только ДАК. Используя соответствующую величину гематокрита [15] каждой фракции, рассчитывали концентрацию аскорбиновых кислот в эритроцитах и выражали в микромоль на миллилитр клеток.

Достоверность различий оценивали по непараметрическим ранговым критериям Вилкоксона-Манна-Уитни. Для оценки взаимосвязи между исследованными параметрами проводили корреляционный анализ по Пирсону. Достоверность различий коэффициентов корреляции оценивали с помощью t-критерия Стьюдента.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ** Нами проведена оценка изменений содержания различных форм аскорбиновых кислот в эритроцитах разного возраста в условиях нормального эритропоза и после стресс-воздействия (напряженный эритропоз), вызванного массивной однократной кровопотерей. Исследования проводили на 7, 20 и 30 сутки после кровопотери. Выбор этих временных интервалов после кровопотери интересен тем, что на 7 сутки в периферической крови присутствуют две популяции эритроцитов, продуцированные при нормальном - ФСЭ (в прошлом молодые клетки, образованные до кровопотери, преждевременно постаревшие в созданных условиях после глубокого стресса) и напряженном - ФМЭ эритропозе (это резерв, выброшенный в кровоток в ответ на кровопотерю). На 20 сутки после кровопотери, по данным иммунных эритрограмм, из кровяного русла уходит популяция клеток, образованных в условиях нормального эритропоза, она заменяется популяцией эритроцитов, продуцированных при напряженном эритропозе, в которой уже образовалась ФСЭ (в прошлом молодые клетки, выброшенные в первые дни после кровопотери) и ФМЭ (выброшенные в последующие дни, когда напряжение стресса на кроветворные органы и эритроциты спало). К 30 суткам с момента кровопускания концентрация гемоглобина и количество эритроцитов в кровяном русле приходят к первоначальному (контрольному) уровню [17]. Принимая во внимание время нахождения эритроцитов кролика в кровотоке в течение 60 суток [18,19].

Исследование содержания АК, ДАК, ДКГК, а также суммы всех кислот во фракции молодых, старых эритроцитов интактных кроликов показало, что старение эритроцитов сопровождается падением концентрации АК, ДАК и суммы всех кислот, на фоне повышения ДКГК (табл. 1).

Приведенные в таблице 1 результаты позволяют говорить о том, что фракция молодых эритроцитов интактных кроликов характеризуется наименьшим содержанием ДКГК и наибольшим - АК, ДАК и суммы всех кислот ( $\Sigma$ АК). Если их уровень во ФМЭ принять за 100%, то содержание АК, ДАК и суммы всех кислот во ФСЭ будет снижено на 46%, 37%, 32%, а концентрация ДКГК повышена на 97% соответственно. При сравнении между собой молодых клеток со старыми, образованными до и после кровопотери, обнаружено более выраженное снижение концентрации АК (52%) и менее выраженное накопление ДКГК (27%) на 7 сутки (табл. 1). Интересно, что отношение восстановленной и окисленных форм аскорбиновой кислоты (АК/ДАК+ДКГК) снижается в направлении фракция молодых, фракция старых эритроцитов, образованных в условиях как нормального, так и напряженного эритропоза (рис. 1). В этом снижении основную роль играет восстановленная АК по сравнению с ее окисленными формами.

## АСКОРБИНОВАЯ КИСЛОТА ПРИ СТАРЕНИИ ЭРИТРОЦИТОВ

Таблица 1. Содержание аскорбиновой, дегидроаскорбиновой, дикетогулоновой и суммы всех кислот (мкмоль/мл клеток) во фракции молодых, старых эритроцитов у интактных животных (контроль) и анемизированных животных на 7, 20, 30 сутки после кровопотери.

	Контроль (n=36)		7 сутки (n=12)		20 сутки (n=12)		30 сутки (n=12)	
	ФМЭ I	ФСЭ II	ФМЭ III	ФСЭ IV	ФМЭ V	ФСЭ VI	ФМЭ VII	ФСЭ VIII
АК	28,59±1,50	15,47±0,63 p <sub>I</sub> < 0,001	17,79±1,06** p <sub>III</sub> < 0,001 (- 52%)	8,59±0,66**	23,83±0,54* p <sub>V</sub> < 0,001 (- 48%)	12,45±0,42*	27,93±0,24 p <sub>VII</sub> < 0,001 (- 45%)	15,32±0,18
ДАК	25,49±0,32	15,94±0,19 p <sub>I</sub> < 0,01	34,96±1,39** p <sub>III</sub> < 0,001 (- 37%)	21,90±0,93**	30,95±0,41* p <sub>V</sub> < 0,001 (- 40%)	18,60±0,24*	25,27±0,25 p <sub>VII</sub> < 0,01 (- 38%)	15,76±0,18
ДКГК	4,03±0,16	7,94±0,14 p <sub>I</sub> < 0,01	12,96±0,18** p <sub>III</sub> < 0,01 (+ 27%)	16,45±0,23**	7,36±0,51* p <sub>V</sub> < 0,01 (+ 66%)	12,20±0,77*	4,12±0,16 p <sub>VII</sub> < 0,01 (+ 96%)	8,07±0,17
ΣАК	58,11±0,62	39,35±0,23 p <sub>I</sub> < 0,01	65,72±3,82** p <sub>III</sub> < 0,01 (- 29%)	46,94±2,63**	62,14±1,98* p <sub>V</sub> < 0,01 (- 30%)	43,25±1,83*	57,32±1,60 p <sub>VII</sub> < 0,01 (- 32%)	39,15±1,26

Примечание: \* - p<0,01; \*\* - p<0,001 по отношению к соответствующим фракциям эритроцитов контрольной группы животных; p<sub>I</sub>, p<sub>III</sub>, p<sub>V</sub>, p<sub>VII</sub> - (различия ФСЭ/ФМЭ); значения указанные в круглых скобках представляют процентные изменения (+ - повышение, - снижение) ФСЭ по сравнению с соответствующей ФМЭ, принятой за 100%

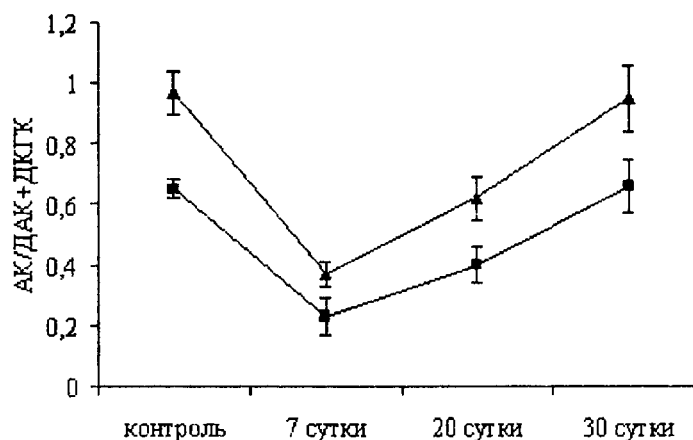


Рисунок 1

Изменение соотношения концентраций восстановленной и окисленных форм аскорбиновой кислоты во фракции молодых и старых эритроцитов, образованных в условиях нормального (контроль) и напряженного эритропоэза (7, 20, 30 сутки). По оси ординат - отношение АК/ДАК+ДКГК; -▲- Фракция молодых эритроцитов; -■- Фракция старых эритроцитов

Анализируя разные по возрасту эритроциты на 7, 20 и 30 сутки после кровопотери, нами обнаружено повышенное содержание ДАК, ДКГК, ΣАК на фоне наименьшей концентрации АК, по сравнению с соответствующими фракциями интактных кроликов. Подобные изменения исследованных параметров были более выражены на 7 сутки, менее на 20 и к 30 суткам достигали контрольных величин.

В ходе проведенного корреляционного анализа между различными формами аскорбиновой кислоты при старении эритроцитов, продуцированных в разных условиях кроветворения, были выявлены следующие взаимосвязи изображенные на рисунке 2

Приведенные статистические данные (рис. 2) свидетельствуют об изменении метаболизма аскорбиновой кислоты от восстановления в сторону окисления в зависимости от возраста эритроцитов, образованных в условиях нормального эритропоэза. Сходные статистические результаты получены при исследовании влияния массивной кровопотери на метаболизм аскорбиновой кислоты в

эритроцитах разного возраста. Однако, необходимо отметить выявленную взаимосвязь между АК и ДКГК ( $r = -0,83$ ,  $p < 0,01$ ) во ФМЭ на 7 сутки после кровопотери. Приняв во внимание наличие подобной корреляции, а также обнаруженные концентрации АК и ДКГК во ФМЭ в этот период времени, можно предположить существование частичной инверсии функциональной активности АК, т.е. когда витамин не подавляет, а сам принимает участие в развитии свободнорадикальных процессов в эритроцитах при стресс-воздействии.

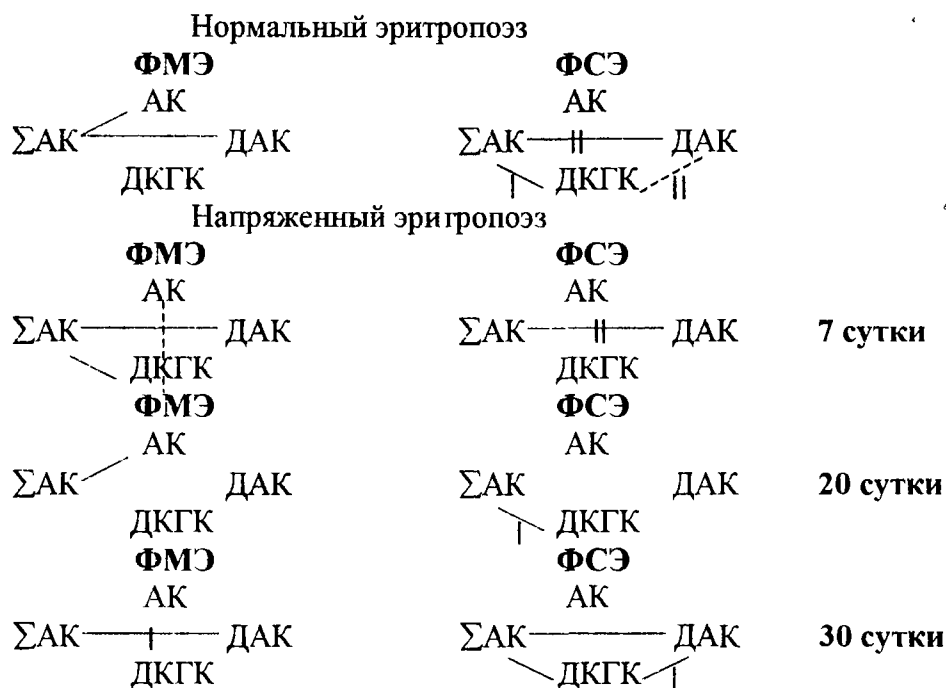


Рисунок 2

Корреляционные связи между различными формами аскорбиновой кислоты во фракциях молодых и старых эритроцитов, полученных от интактных кроликов и анемизированных животных на 7, 20, 30 сутки после кровопотери I -  $p < 0,001$ , II -  $p < 0,05$ , остальные  $p < 0,01$   
 ----- отрицательная      ————— положительная

Как следует из представленных результатов, сумма всех форм аскорбиновой кислоты во ФМЭ складывается, главным образом, из окисленной (ДАК) и восстановленной формы (АК). Прежде всего, это связано с активным восстановлением дегидроаскорбиновой кислоты, о чем свидетельствует превалирование содержания АК над концентрацией ДАК во ФМЭ. При этом известно, что в отличие от ядросодержащих клеток, в которых уровень аскорбата поддерживается благодаря активному транспорту ДАК против градиента концентраций, в эритроцитах внутриклеточная концентрация сохраняется за счет пассивного транспорта ДАК и соответствует таковой в плазме [18]. Поэтому, снижение содержания ДАК в молодых клетках, в ходе ее восстановления, и частичного окисления до ДКГК будет приводить к уравниванию баланса между вне- и внутриклеточным уровнем ДАК. С другой стороны, результатом возраст-зависимого усиления окислительного метаболизма во ФСЭ [11] является спад суммарной концентрации всех форм аскорбиновой кислоты, который может развиваться за счет нарушения поступления ДАК в клетку и резкого снижения эффективности восстановления дегидроаскорбиновой кислоты в клетке.

Возможной причиной нарушения поступления ДАК в старых эритроцитах может быть увеличение скорости перекисного окисления липидов (ПОЛ) в плазматической мембране этих клеток, что способствует появлению (флип-флоп) на внешней стороне

мембраны отрицательно заряженного фосфатидилсерина [19]. Происходит "размывание" отрицательного заряда на цитоплазматической поверхности мембраны, обеспечивающее возможность выхода заряженной АК из клетки и снижение скорости пассивного транспорта нейтральной ДАК из плазмы в клетку.

Причиной снижения эффективности восстановления ДАК могут быть возраст-зависимые посттрансляционные изменения эритроцитарных ферментов, участвующих в редукции ДАК в АК: NADPH-зависимой тиоредоксинредуктазы и тиолтрансферазы, редуцирующей ДАК в АК с участием восстановленного глутатиона (GSH).

Также, при старении эритроцитов снижается содержание АТР, отношение  $NAD^+/NADH$  [17], GSH с одновременным падением активности ферментов, восстанавливающих глутатион и NADP [11], что приводит к снижению скорости восстановления ДАК с последующим ее окислением до ДКГК.

С уменьшением активности метгемоглобинредуктазы при старении эритроцитов, в клетках происходит накопление метгемоглобина [21], на неферментативное восстановление которого используется часть АК. Более того, АК расходуется в процессе восстановления витамина Е и нейтрализации АФК.

В ответ на гипоксический шок, вызванный массивной кровопотерей, повышается активность симпатико-адреналовой системы. Последняя способствует мобилизации из тканевого депо АК. Данная связь отчасти объясняет факт увеличения ДАК во ФМЭ на 7 сутки после кровопотери, по сравнению с концентрацией ДАК в молодых клетках интактных животных. Другими причинами, способными привести к накоплению ДАК в клетке, является повышенное использование восстановленной АК в окислительных процессах, а также падение эффективности восстановления ДАК в ходе резкого снижения концентрации GSH. Возрастание содержания ДАК в эритроцитах, в некоторой степени, может свидетельствовать о низкой скорости ПОЛ на плазматической мембране. Однако, низкое содержание АК и высокое для ДКГК в эритроцитах разного возраста, полученных на 7 сутки после кровопотери, по сравнению с соответствующими показателями во фракциях молодых, старых клеток интактных и анемизированных животных на 20, 30 сутки после кровопотери свидетельствует об активном образовании в этих клетках свободных радикалов. Такая двойственность, возможно, объясняется существенным активированием ферментов гликолиза, пентозофосфатного пути, а также всего ферментативного звена антиоксидантной системы эритроцитов [11, 22]. В комплексе они способны сдерживать атаку свободных радикалов на "стратегически" важную структуру данных клеток - плазматическую мембрану. Накопление ДКГК особенно во ФСЭ на 7 сутки после кровопотери, по сравнению с соответствующими фракциями эритроцитов, образованными в условиях нормального и напряженного эритропоэза, объясняется усиленным окислительным метаболизмом [11], который приводит к более активному окислению аскорбиновых кислот в направлении от АК до ДКГК.

Менее выраженный характер экспериментальных и статистических данных среди исследованных параметров при старении эритроцитов на 20 и 30 сутки, по сравнению с величинами соответствующих фракций на 7 сутки, может быть связан с лизисом старых эритроцитов, образованных еще до кровопотери, и функционально неприспособленных к транспорту кислорода эритроидных клеток, выброшенных в ответ на кровопотерю. Исходя из этого, 20 и 30 сутки можно охарактеризовать как восстановительный период после стресс-воздействия.

Анализ полученных в работе данных показал, что АК является естественным и необходимым участником метаболизма в онтогенезе эритроцитов. Старение красных клеток крови, а также их реакция на действие физиологического стресса на молекулярном уровне характеризуется накоплением в этих клетках ДАК, ДКГК и дефицитом АК. В тоже время мобилизация аскорбиновой кислоты из тканевого депо оказывает защитный эффект от окислительного повреждения эритроцитов АФК и тем самым обеспечивает возможность коррекции продолжительности функционирования эритроцитов.

# ЛИТЕРАТУРА

1. *Chen S.X., Schopfer P.T., Cheng H.Y.* (1999) *Eur. J. Biochem.*, **260**, 726-735.
2. *May J.M., Qu Z.-C., Whitesell R.R.* (1995) *Biochim. Biophys. Acta.*, **238**, 127-136.
3. *May J.M., Qu Z.-C., Cobb C.E.* (2001) *Free Radic. Biol. Med.*, **31**, 117-124.
4. *Матвеев С.Б., Марченко В.В.* (1999) *Вопр. мед. химии*, **45**, 140-145.
5. *Лукьянова Л.Д.* (2000) *Вестник РАМН*, №9, 3-12
6. *Davies K.J.A., Goldberg A.L.* (1987) *J. Biol. Chem.*, **262**, 8220-8226.
7. *Wilhelm J., Herget J.* (1999) *Internat. J. Biochem. Cell Biol.*, **31**, 671-681.
8. *Lee E., Hung Y., Min K.P.* (2001) *J. Neurol. Sci.*, **190**, 3-10.
9. *Платонов А.Г., Гончаренко Е.Н., Крушинская Я.В.* (1999) *Бюл. exper. биол. мед.*, **128**, 518-520.
10. *Белан Е.И.* (2000) *Бюл. exper. биол. мед.*, **129**, 521-525.
11. *Кудряшов А.М., Титова Н.М.* (2001) *ВИНИТИ*, №1946-B2001.
12. *Асиньяров Г.З.* (1981) *Патент СССР*, № 2896817.
13. *Nerenberg S.T., Zedler P.* (1975) *J. Lab. Clin. Med.*, **85**, 523-526.
14. *Авраамова Т.Н., Титова Н.М.* (1978) *Руководство по большому биохимическому практикуму: Углеводный обмен*, Красноярск, том 1, с. 90-92.
15. *Меньшиков В.В.* (1987) *Справочник по клиническим лабораторным методам исследования*. М., Медицина.
16. *Соколовский В.В., Лебедева Л.В., Лизлун Т.Б.* (1967) *Лаб. дело*, №12, 160-161.
17. *Поэтова В.Т., Гутельзон И.И., Терсков И.А.* (1967) *Вопросы биофизики, биохимии и патологии эритроцитов*, Красноярск.
18. *Card R.F., Paulson E.J., Valberg L.S.* (1969) *Amer. J. Physiol.*, **216**, 974-978.
19. *Shimada A.* (1972) *Acta Med. Okayama*, **29**, 283-289.
20. *Guaquil V.H., Farber C.M., Golde D.W.* (1975) *J. Biol. Chem.*, **272**, 9915-9921.
21. *Jong K.D., Kim J.H., Yu K.S.* (2001) *Blood*, **98**, 1577-1584.
22. *Parsons R., Yue V., Xiaomi T.* (1996) *J. Chromatography B: Biomed. Sci. Appl.*, **686**, 177-187.
23. *Huisman M., Busch D., Burkholder D.* (2001) *Prenat. Diagn.*, **21**, 523-528.
24. *Piomelli C.* (1990) In: (Magnan and De Flora Eds.) *Blood Cell Aging*, Plenum Press, New York.

Поступила 08.03.2003

## THE CONTENTS OF ASCORBIC ACID AND ITS OXIDIZED FORMS AT THE AGING OF RED BLOOD CELLS PRODUCED IN CONDITIONS OF THE NORMAL AND INTENSE OF ERYTHROPOESIS

*A.M. Kudryashov<sup>1</sup>, N.M. Titova<sup>1</sup>, A.A. Savchenko<sup>2</sup>, E.V. Kudryashova<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Kraevoi Narkologicheskii Dispanser Krasnoyarsk, Kombainostroitelei st., 5,  
fax: (3912) 211440, e-mail: anti\_krasu@mail.ru

<sup>2</sup>Krasnoyarsk State University, Department of biochemistry and physiology of man and animals, 660041,  
Krasnoyarsk, Svobodnii av. 79, fax (3912) 44-87-81

Levels of ascorbic acid, its oxidized forms, dehydroascorbic acid (DHA) and diketogulonic acid (DKGA), and the sum of all forms of ascorbic acid (SAA) were investigated in aging red blood cells produced under physiological and stress conditions (massive hemorrhage). Aging of red blood cells of intact animals is accompanied by accumulation of DKGA and decrease of AA, DHA and SAA concentrations. Comparison of these parameters between young and old red blood cells produced before and after hemorrhage revealed decrease of AA concentration (52%) and accumulation of DKGA (27%) on the 7th day. On the 7th, 20th, 30th days after hemorrhage red blood cells are characterized by increased concentrations of DHA, DKGA, SAA with simultaneously decreased contents of the AA as compared with red blood cells of intact animals. Similar changes were the most pronounced on the 7th day; on the 20th day they decreased and on the 30th day they returned to control levels.

**Key words:** Ascorbic acid, dehydroascorbic acid, diketogulonic acid, red blood cell, aging, erythropoiesis.