

Л.А. Ромодин, А.А. Московский

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ АСКОРБИНОВОЙ, ЯБЛОЧНОЙ И ЯНТАРНОЙ КИСЛОТ НА РАДИАЦИОННО-ИНДУЦИРОВАННЫЙ ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС В КЛЕТКАХ ЛИНИИ А549

Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна ФМБА России, Москва

Контактное лицо: Леонид Александрович Ромодин, e-mail: rla2904@mail.ru

РЕФЕРАТ

Актуальность: Для современной радиобиологии остается актуальной проблема поиска средств фармакологической защиты от радиационного поражения. Интерес к данной теме не ослабевает в связи с высокой химической токсичностью всех общепризнанных радиопротекторов. Одними из наиболее изучаемых в данной связи препаратов являются вещества, имеющие антиоксидантную активность, что обусловлено способностью антиоксидантов к ингибиции процессов окислительного стресса.

Цель: Изучение влияния яблочной, янтарной и аскорбиновой кислот на радиационно-индуцированный окислительный стресс в культуре клеток adenокарциномы легкого человека линии А549.

Материал и методы: Изучено влияние растворов яблочной, аскорбиновой и янтарной кислот в концентрациях 0,1, 0,5, 1 и 2 мМ на уровень радиационно-индуцированного окислительного стресса в адсорбционной культуре клеток линии А549. Окислительный стресс был индуцирован рентгеновским излучением в дозе 8 Гр. Уровень активных форм кислорода оценивался на основании отношения интенсивности флуоресценции красителя дихлорфлуоресцина (DCF) к таковой для красителя Hoechst-33342.

Результаты: Под влиянием изучаемых веществ наблюдалось статистически значимое снижение содержания активных форм кислорода в клетках. Наиболее выраженный эффект наблюдается в пробах, обработанных янтарной кислотой. В необлученных пробах в присутствии аскорбиновой и яблочной кислот при концентрации изучаемых веществ 100 мКМ наблюдается статистически значимое повышение интенсивности флуоресценции, что может быть объяснено восстановлением под действием данных веществ внутриклеточного трёхвалентного железа до Fe^{2+} , что способствовало протеканию реакции Фентона.

Выводы: На основании полученных в ходе данного исследования результатов, можно предположить наличие некоторых радиозащитных свойств у яблочной кислоты, аскорбиновой кислоты и, в особенности, янтарной кислоты. Тем не менее, для подтверждения наличия данных свойств необходимо проведение дополнительных исследований на других модельных системах, включая различные клеточные линии. Результаты представленной работы позволяют в будущем начать разработку терапевтических схем для облегчения последствий облучения с использованием изученных веществ.

Ключевые слова: клетки А549, рентгеновское облучение, окислительный стресс, яблочная кислота, аскорбиновая кислота, янтарная кислота

Для цитирования: Ромодин Л.А., Московский А.А. Оценка влияния аскорбиновой, яблочной и янтарной кислот на радиационно-индуцированный окислительный стресс в клетках линии А549 // Медицинская радиология и радиационная безопасность. 2024. Т. 69. № 5. С. 21–27. DOI:10.33266/1024-6177-2024-69-5-21-27

DOI:10.33266/1024-6177-2024-69-5-21-27

L.A. Romodin, A.A. Moskovskij

Assessment of the Effect of Ascorbic, Malic and Succinic Acids on Radiation-Induced Oxidative Stress in A549 Cells

A.I. Burnazyan Federal Medical Biophysical Center, Moscow, Russia

Contact person: L.A. Romodin, e-mail: rla2904@mail.ru

ABSTRACT

Relevance: For modern radiobiology, the problem of finding pharmacological protection against radiation damage remains urgent. Interest in this topic does not weaken due to the high chemical toxicity of all generally recognized radioprotectors. One of the most studied drugs in this regard are substances with antioxidant activity, which is due to the ability of antioxidants to inhibit the processes of oxidative stress.

Purpose: The effect of malic, succinic and ascorbic acids on radiation-induced oxidative stress in the culture of human lung adenocarcinoma cells of the A549 line.

Material and methods: In the course of the work, the effect of solutions of malic, ascorbic and succinic acids in concentrations of 0.1, 0.5, 1 and 2 mM on the intensity of radiation-induced oxidant stress in the adsorption culture of cells of the A549 line was studied. Oxidative stress was induced by X-ray radiation at a dose of 8 Gy. The level of reactive oxygen species was estimated based on the ratio of the fluorescence intensity of the dye dichlorofluorescein to that of the dye Hoechst-33342.

Results: Under the influence of the studied substances, a statistically significant decrease in the content of reactive oxygen species in the cells was observed. The most pronounced effect is observed in samples treated with succinic acid. In non-irradiated samples in the presence of ascorbic and malic acids at a concentration of the studied substances of 100 mM, a statistically significant increase in the intensity of fluorescence is observed, which can be explained by the reduction of intracellular trivalent iron to Fe^{2+} under the action of these substances, which contributed to the Fenton reaction.

Conclusions: Based on the results obtained during this study, it can be assumed that malic acid, ascorbic acid and, in particular, succinic acid have some radioprotective properties. However, additional studies on other model systems, including various cell lines, are needed to confirm the presence of these properties. The results of the presented work make it possible in the future to begin the development of therapeutic schemes to alleviate the effects of radiation using the studied substances.

Keywords: A549 cells, X-rays, oxidative stress, malic acid, ascorbic acid, succinic acid

For citation: Romodin LA, Moskovskij AA. Assessment of the Effect of Ascorbic, Malic and Succinic Acids on Radiation-Induced Oxidative Stress in A549 Cells. Medical Radiology and Radiation Safety. 2024;69(5):21–27. (In Russian). DOI:10.33266/1024-6177-2024-69-5-21-27

Введение

Проблема поиска средств фармакологической защиты от радиационного поражения остается актуальной и в настоящее время [1]. Интерес к данной теме связан с потенциальным воздействием ионизирующего излучения на организм человека и животных из-за возможного применения ядерного оружия, аварий на атомных электростанциях, а также с необходимостью нивелирования негативных последствий лучевой терапии, в чем нуждается современная медицина при лечении онкологических заболеваний. Помимо этого, наличие высокоеффективных, и при этом нетоксичных радиозащитных препаратов является необходимым условием для реализации долгосрочных космических перелетов, так как подобные проекты требуют постоянного и длительного нивелирования воздействия космической радиации на космонавтов.

Химическая токсичность всех признанных радиопротекторов является весьма серьезной проблемой [1–3]. Таким образом, современные радиопротекторы нивелируют последствия радиационного воздействия, но их применение влечет за собой химическое отравление организма.

В контексте изучения радиозащитных свойств различных веществ, необходимо рассмотреть вопросы терминологии и классификации данных веществ. Понятие радиопротекторов, если опираться на классификацию, предложенную в обзоре М.В. Васина [3], включает в себя лишь средства, оказывающие противолучевое воздействие непосредственно в момент облучения. То есть, радиопротекторы – это препараты, которые необходимо применять незадолго до облучения. Для остальных средств радиозащиты М.В. Васин выделяет следующие категории: радиомитигаторы (ускоряют восстановление облученных тканей путем активации провоспалительных сигналов), радиомодуляторы (повышают общую радиационную устойчивость организма), противорвотные, антидиарейные средства, сорбенты и комплексы радионуклидов [3].

Одним из основных биологических эффектов воздействия ионизирующего излучения является возникновение в клетках организма процессов окислительного стресса, ведущих к повреждению всех структур клеток, в том числе генетического аппарата [4]. Окислительный стресс возникает в клетках в результате радиолиза молекул и следующих за ним каскадов свободно-радикальных реакций, главным образом – перекисного окисления липидов мембран [4, 5].

В связи с этим не ослабевает интерес к веществам, имеющим антиоксидантные свойства [6, 7]. Антиоксиданты способны останавливать реакции перекисного окисления липидов, приводящие к возникновению в клетках организма окислительного стресса [6–11]. Токсичность многих антиоксидантов на порядки ниже по сравнению с таковыми у веществ из группы собственно радиопротекторов [6].

В качестве примера антиоксиданта можно привести исследуемую в настоящей работе янтарную кислоту. Анализируя данные о токсичности янтарной кислоты в сравнении с амифостином, являющимся табельным радиопротектором в США [2], приведём данные об экспериментах на мышах и крысах. Так, согласно данным

из архива [12], значения дозы LD_{50} (означает смерть 50 % подопытных) янтарной кислоты равно 2260 мг/кг при оральном введении у крыс и 2702 мг/кг при внутрибрюшинном введении у мышей [12, 13], в то время как значения дозы LD_{50} амифостина равны 826 мг/кг при оральном введении у крыс и 321 мг/кг при внутрибрюшинном введении у мышей [12].

Цель настоящей работы – изучение способности аскорбиновой, яблочной и янтарной кислот к нивелированию процессов окислительного стресса, вызванного воздействием ионизирующего излучения на культуры клеток на модели клеточной линии A549 – аденокарциномы легкого человека. Структурные формулы изучаемых веществ приведены на рис. 1.

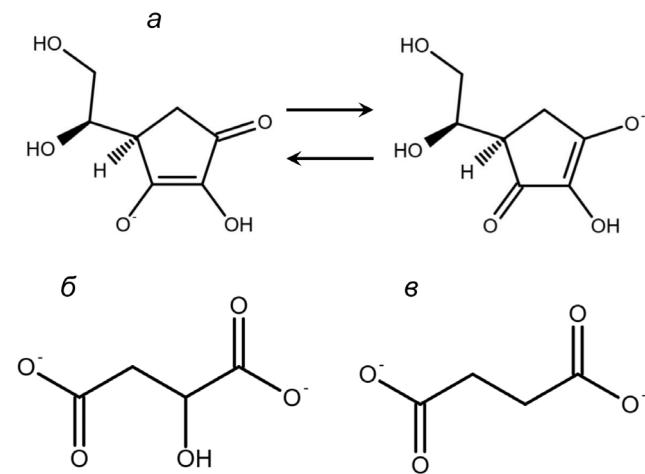


Рис. 1. Структурные формулы изучаемых веществ: а) аскорбиновая кислота, б) яблочная кислота, в) янтарная кислота

Fig. 1. Structural formulas of the studied substances: a) ascorbic acid, b) malic acid, c) succinic acid

В ходе достижения указанной цели нами были решены следующие задачи:

1. Провести флуориметрическое исследование влияния яблочной, янтарной и аскорбиновой кислот на выраженность процессов радиационно-индуцированного окислительного стресса на модели культуры клеток A549, подвергнутой воздействию рентгеновского излучения.
2. Сравнить эффект воздействия изучаемых веществ на облученные и необлученные клетки.

Выбор изучаемых в настоящей работе веществ обусловлен тем, что для них всех описана способность нивелировать свободно-радикальные реакции в клетке. Например, аскорбиновая кислота является классическим примером антиоксиданта [7]. Авторы [14] сообщают, что аскорбиновая кислота в концентрациях от 0,75 до 3 мМ способна полностью подавлять окислительный стресс в костной ткани человека. Также существует ряд работ, свидетельствующих о том, что аскорбиновая кислота снижает оксидативный стресс в разных тканях организма [15, 16]. Для янтарной кислоты описано повышение антиоксидантного потенциала клеток при её применении [17], схожие сведения приводятся и для молата [10, 11]. При этом имеются сообщения о наличии у

аскорбиновой [7] и янтарной [17] кислот непосредственно радиозащитных свойств.

Материал и методы

Эксперимент проводился в черном плоскодонном 96-луночном планшете с использованием клеточной линии аденокарциномы легкого человека A549 (American Type Culture Collection, США), и заключался в оценке влияния яблочной, янтарной и аскорбиновой кислот на выраженность процессов радиационно-индукционного окислительного стресса, определённой как отношение интенсивности флуоресценции DCF (возбуждение светом длиной волны 480 нм, регистрация эмиссии на длине волны 520 нм) к интенсивности флуоресценции Hoechst-33342 (возбуждение светом длиной волны 355 нм, регистрация эмиссии на длине волны 460 нм) с использованием планшетного флуориметра FLUOstar Omega (BMG LABTECH, Германия). В качестве референсных проб выступали пробы с неокрашенными клетками, находящимися на протяжении всех этапов эксперимента, предшествующих работе на планшетном флуориметре, в питательной среде.

В ячейки планшета мы вносили по 25 тыс. клеток в 100 мкл полной среды RPMI 1640 без сыворотки. Среда была приготовлена путем добавления к 500 мл среды RPMI Medium 1640 1x (GIBCO (Invitrogen), США) 146 мг L-глутамина (ПанЭко, РФ), смеси 25000 ед. пенициллина и 25 мг стрептомицина (ПанЭко, Россия). Далее планшеты инкубировались в течение 12 ч в CO₂-инкубаторе при 37 °C.

После инкубации в ячейки планшета было внесено по 100 мкл растворов яблочной, аскорбиновой или янтарной кислот в концентрациях 0,2, 1, 2 и 4 мМ. В контрольные пробы вносились по 100 мкл среды.

Далее планшеты инкубировались в течение 2 ч при 37 °C, после чего были подвергнуты воздействию рентгеновского излучения в дозе 8 Гр. Планшеты с контрольными пробами, не подвергнутыми воздействию излучения, инкубировались в течение 30 мин при комнатной температуре. После этого из каждой пробы было отобрано 180 мкл среды и внесено 30 мкл 6.7 мкМ H₂DCFDA. Указанный раствор был приготовлен путем добавления к 300 мкл 200 мкМ H₂DCFDA (Life Technologies Inc. (Invitrogen), США) 8700 мкл PBS. После внесения красителя планшеты инкубировались 30 мин при 37°C. Затем в пробы было внесено по 50 мкл Hoechst-33342 (ThermoFisherScientificInc., США) концентрацией 2 мкг/мл. После внесения Hoechst-33342 планшеты инкубировались 10 мин.

После инкубации из проб было отобрано по 90 мкл среды, а затем внесено по 90 мкл бессывороточной RPMI 1640 и по 100 мкл растворов изучаемых веществ, аналогичных внесенным после 12-ти часовой инкубации, после чего планшеты инкубировались 1 час при 37 °C. Далее из всех проб, включая референсные, было отобрано по 190 мкл среды и внесено по 50 мкл PBS. После этого была зарегистрирована интенсивность флуоресценции при возбуждении длиной волны 355 нм и регистрации эмиссии на длине волны 460 нм (коэффициент усиления 1300) и при возбуждении проб длиной волны 485 нм и регистрации эмиссии на длине волны 520 нм (коэффициент усиления 2300). Каждая пробы выполнялась в 8 повторностях.

Статистическая обработка результатов эксперимента производилась средствами MS Excel. Статистически значимыми считаются различия при $p = 0,95$. Данные представлены в виде: среднее арифметическое результатов \pm погрешность среднего.

Результаты

Окислительный стресс оценивался по отношению интенсивности флуоресценции DCF к интенсивности флуоресценции Hoechst-33342. Таким образом мы производили оценку среднего содержания активных форм кислорода (АФК) в одной клетке. На рис. 2 представлены графики зависимости отношения интенсивности флуоресценции DCF к Hoechst-33342 (ex485em520)/(ex-355em460) от концентрации изучаемых веществ в среде с клетками.

Как видно из данных, представленных на рис. 2, в пробах с добавлением янтарной кислоты наблюдается статистически значимое снижение относительной интенсивности флуоресценции DCF.

В пробах с добавлением аскорбиновой кислоты не наблюдается статистически значимого отличия интенсивности флуоресценции от проб облучённого контроля. Однако при добавлении аскорбиновой кислоты в концентрациях 0,5 и 2 мМ также не наблюдается статистически значимого отличия интенсивности флуоресценции облучённых проб от интактных клеток, что свидетельствует о присутствии эффекта снижения концентрации АФК в клетках.

Аналогичный эффект можно наблюдать и в пробах клеток, инкубированных с яблочной кислотой. Более того, интенсивность флуоресценции проб с яблочной кислотой не имеет статистически значимого отличия от интактных клеток ни при одной из концентраций соединения, на основании чего также можно сделать вывод о способности яблочной кислоты к снижению концентрации АФК в культуре клеток, подвергнутой воздействию ионизирующего облучения.

Окислительный стресс является одним из ключевых биологических аспектов влияния радиации на живые организмы [4, 5]. Так как повышение концентрации АФК является свидетельством интенсификации процессов окислительного стресса в культуре клеток, снижение интенсивности флуоресценции DCF в контексте данной работы свидетельствует о возможности наличия у яблочной, янтарной и аскорбиновой кислот радиозащитных свойств.

При добавлении яблочной и аскорбиновой кислот в концентрации 100 мкМ наблюдается статистически значимое увеличение выраженности окислительного стресса в необлучённых пробах по сравнению с интактными клетками. При более высоких концентрациях данного эффекта не наблюдается, а интенсивность флуоресценции не имеет статистически значимого отличия от проб интактных клеток.

Обсуждение

Результаты, полученные в ходе проведенных исследований, могут свидетельствовать о наличии радиозащитных свойств у янтарной кислоты. Наблюдается практически двукратное снижение интенсивности отношения флуоресценции DCF к интенсивности флуоресценции Hoechst-33342, что свидетельствует о снижении интенсивности протекания процессов радиационно-индукционного окислительного стресса в культуре клеток аденокарциномы легкого человека (A549). Несмотря на то, что итоговые значения имеют статистически значимое отличие от интактных клеток в сторону более выраженного окислительного стресса, положительное воздействие янтарной кислоты стоит считать ощутимым. Данный эффект может быть объяснен наличием у янтарной кислоты антиоксидантной активности, описанной в работе [18].

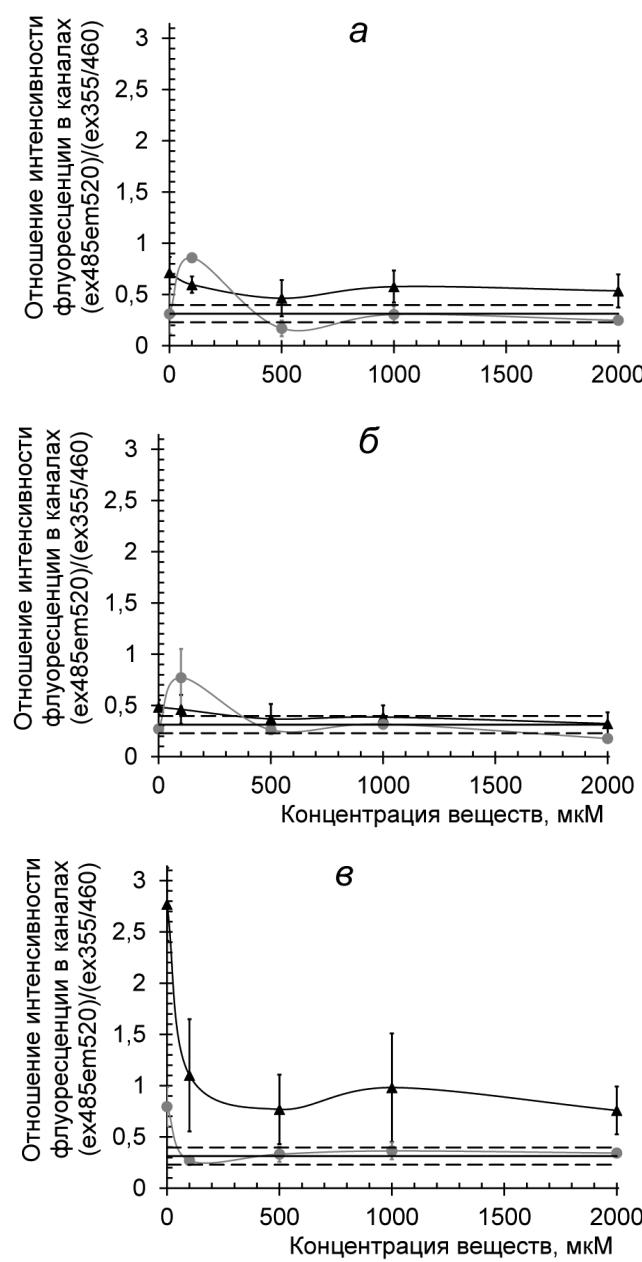


Рис. 2. Влияние изучаемых веществ на выраженность процессов окислительного стресса (по критерию отношения флуоресценции DCF к флуоресценции Hoechst-33342) в культуре клеток аденокарциномы легкого человека A549 при воздействии рентгеновского излучения в дозе 8 Гр (черные линии, треугольные маркеры) или без такого воздействия (серые линии, круглые маркеры). (а) Яблочная кислота. (б) Аскорбиновая кислота. (в) Янтарная кислота. Данные представлены в виде среднее±погрешность среднего при доверительной вероятности 95 %. Горизонтальная сплошная и пунктирные линии – среднее значение для проб клетками, не подвергнутых воздействию излучения и изучаемых веществ

Fig. 2. The effect of the studied substances on the severity of oxidative stress processes (according to the criterion of the ratio of DCF fluorescence to Hoechst-33342 fluorescence) in human lung adenocarcinoma cell culture A549 when exposed to X-ray radiation at a dose of 8 Gy (black lines, triangular markers) or without such exposure (gray lines, round markers). (a) Malic acid. (b) Ascorbic acid. (b) Succinic acid. The data is presented as an average±marginal error with a confidence probability of 95 %. Horizontal solid and dotted lines are the average value for samples with cells not exposed to radiation and the substances under study

Снижение выраженности окислительного стресса под действием янтарной кислоты может быть объяснено не только наличием у неё непосредственных антиокси-

дантных свойств, но и её ролью в клеточном дыхании. Сукцинат участвует в цикле трикарбоновых кислот (цикле Кребса) [19]. При этом фермент сукцинат-дегидрогеназа, являясь вторым ферментным комплексом цепи переноса электронов, восстанавливает убихинон [19]. Таким образом, увеличение концентрации сукцината в митохондриях способно привести к ускорению синтеза АТФ, что в свою очередь способствует повышению эффективности как систем репарации, так и скорости синтеза антиоксидантных ферментов. И это снижает выраженность в том числе окислительного стресса.

В то же время результаты, полученные в ходе изучения влияния яблочной и аскорбиновой кислот на радиационно-индуцированный окислительный стресс, являются не столь однозначными. Значения относительной флуоресценции DCF в пробах, подвергнутых действию рентгеновского излучения без обработки изучаемыми веществами, слабо отличаются от таковых значений для интактных клеток. Тем не менее, интенсивность флуоресценции в пробах облучённого контроля имеет статистически значимое отличие от таковой для интактных клеток, чего не наблюдается в пробах с добавлением аскорбиновой кислоты в концентрациях 0,5 и 2 мМ и яблочной кислоты во всех рассмотренных в ходе данной работы концентрациях. На основании данного эффекта можно сделать вывод, что данные соединения всё же имеют способность к снижению интенсивности процессов радиационно-индуцированного окислительного стресса.

Интерес представляет повышение интенсивности флуоресценции в необлучённых пробах в присутствии яблочной и аскорбиновой кислот в концентрации 100 мкМ. При этом выраженность процессов окислительного стресса в остальных необлучённых пробах с данными веществами находится на уровне интактных клеток.

Для объяснения данного эффекта следует обратиться к реакциям, в которые вступают антиоксиданты в клетках. В качестве примера возьмём классический антиоксидант, изученный в настоящем исследовании, – аскорбиновую кислоту.

Аскорбиновая кислота является эффективным водорастворимым антиоксидантом в организме человека [14]. Она участвует в связывании свободных радикалов и разрушении перекисей, а также взаимодействует с глутатионом и липофильными антиоксидантами [20, 21]. Однако в работе [22] сообщается, что аскорбиновая кислота способна ингибировать рост раковых клеток посредством образования внеклеточной перекиси водорода. Происходит это посредством усиления реакции Фентона, продуктом которой является гидроксильный радикал [23]. Аскорбиновая кислота способна вернуть железо в сферу данной реакции путём восстановления Fe^{3+} до Fe^{2+} . Таким образом, в некоторых обстоятельствах аскорбиновая кислота за счёт своих антиоксидантных свойств может проявлять прооксидантный эффект.

Авторы [24] наблюдали повышение скорости генерации супероксид-аниона O_2^- в листьях огурца при добавлении аскорбиновой кислоты. Кроме того, в статьях [25, 26] указывается на механизм образования перекиси водорода при спонтанном окислении аскорбиновой кислоты в апопласте растений. Тем не менее, несмотря на отличие модельных систем в приведённых работах от использованной нами, можно предположить, что тенденции повышения интенсивности актуальны и для других экспериментальных моделей.

Таким образом, есть определённые биохимические механизмы, благодаря которым аскорбиновая кислота

может повышать интенсивность протекания процессов окислительного стресса.

Аскорбиновая кислота способна взаимодействовать как с активными формами кислорода, так и с другими веществами, включая металлы переменной валентности. Мы предполагаем, что усиление выраженности окислительного стресса при относительно низких концентрациях аскорбиновой кислоты связано именно с запуском реакции Фентона: антиоксидант взаимодействует с трёхвалентным железом, но его недостаточно для восстановления образующихся АФК.

Но при более высоких концентрациях аскорбиновой кислоты ионов трёхвалентного железа в клетке уже не хватает, чтобы полностью израсходовать запас аскорбата. По этой причине образовавшиеся свободные радикалы и другие АФК быстро восстанавливаются молекулами аскорбиновой кислоты. Это не позволяет развиться состоянию окислительного стресса.

Также подтверждением нашей гипотезы служит то, что в пробах облучённых клеток, подвергнутых воздействию аскорбиновой кислоты, отсутствует статистически значимое отличие интенсивности флуоресценции DCF от интактных проб клеток. То есть, если в пробе изначально повышена концентрация АФК, аскорбиновая кислота с большей вероятностью прореагирует с АФК, чем с ионами железа, понижая интенсивность процессов окислительного стресса.

Аналогична оценка результатов измерения относительной флуоресценции DCF в пробах необлучённых клеток, в которые была добавлена яблочная кислота. В литературе имеется ряд сообщений о способности яблочной кислоты к подавлению окислительного стресса [10, 27, 28]. Однако нами не было найдено достоверной информации об участии яблочной кислоты в процессах, способных интенсифицировать окислительный стресс.

Таким образом, несмотря на неоднозначность полученных результатов в отношении способности аскорбиновой и яблочной кислот к ингибированию процессов окислительного стресса, можно сделать вывод о наличии у данных соединений антиоксидантного эффекта,

что позволяет сделать предположение о возможности их применения в комбинации с другими препаратами в целях снижения радиационно-индуцированного оксидантного стресса. Тем не менее, наблюдаемые в ходе данной работы эффекты говорят также о том, что при некоторых условиях данные вещества способны приводить к повышению концентрации активных форм кислорода в живых системах.

Заключение

В ходе данного исследования была изучена способность яблочной, янтарной и аскорбиновой кислот к ингибированию процессов радиационно-индуцированного окислительного стресса в адсорбционной культуре клеток аденоакрициномы лёгкого человека.

Янтарная кислота продемонстрировала наиболее выраженный эффект снижения интенсивности флуоресценции DCF, позволяющий с высокой долей вероятности говорить о наличии у неё радиозащитных свойств. Однако выраженность процессов окислительного стресса в облучённых клетках при действии янтарной кислоты не снизилась полностью до значений, наблюдавшихся в пробах с интактными клетками. Тем не менее, можно предположить перспективность использования янтарной кислоты и сукцинатов для купирования побочных эффектов лучевой терапии.

Аскорбиновая и яблочная кислоты также продемонстрировали снижение интенсивности флуоресценции DCF, что говорит о снижении выраженности процессов окислительного стресса в обработанных ими клетках. Однако в силу слабой выраженности данного эффекта, а также неоднозначности литературных данных требуется дополнительное исследование радиопротекторного потенциала данных веществ.

Благодарности

Авторы работы выражают благодарность и признательность Игнатову Максиму Александровичу, младшему научному сотруднику лаборатории Радиационной биофизики ФГБУ ГНЦ ФМБЦ имени А.И. Бурназяна, за предоставленную возможность работы с клетками линии А549.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Рождественский Л.М. Проблемы разработки отечественных противолучевых средств в кризисный период: поиск актуальных направлений развития // Радиационная биология. Радиоэкология. 2020. Т.60. №3. С.279–290. doi: 10.31857/S086980312003011X.
2. Singh V.K., Seed T.M. The Efficacy and Safety of Amifostine for the Acute Radiation Syndrome // Expert Opinion on Drug Safety. 2019. Vol.18. No.11. P.1077–1090. doi: 10.1080/14740338.2019.1666104.
3. Васин М.В. Классификация противолучевых средств как отражение современного состояния и перспективы развития радиационной фармакологии // Радиационная биология. Радиоэкология. 2013. Т.53. №5. С.459–467. doi: 10.7868/S0869803113050160.
4. Бурлакова Е.Б., Аткарская М.В., Фаткулина Л.Д., Андреев С.Г. Радиационно-индуцированные изменения структурного состояния мембран клеток крови человека // Радиационная биология. Радиоэкология. 2014. Т.54. №2. С.162–168. doi: 10.7868/S0869803114020040.
5. Кузин А.М. Структурно-метаболическая теория в радиобиологии. М.: Наука, 1986. 282 с.
6. Raj S., Manchanda R., Bhandari M., Alam M.S. Review on Natural Bioactive Products as Radioprotective Therapeutics: Present and Past Perspective // Current Pharmaceutical Biotechnology. 2022. Vol.23. No.14. P.1721–1738. doi: 10.2174/138920102366220110104645.
7. Gonzalez E., Cruces M.P., Pimentel E., Sanchez P. Evidence that the Radioprotector Effect of Ascorbic Acid Depends on the Radiation Dose Rate // Environmental Toxicology and Pharmacology. 2018. Vol.62. P.210–214. doi: 10.1016/j.etap.2018.07.015.
8. Журавлёв А.И., Зубкова С.М. Антиоксиданты. Свободно-радикальная патология, старение. Второе издание, исправленное и дополненное. М.: Бельевые альвы, 2014. 304 с.
9. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Переокисное окисление липидов в биологических мембранах. М.: Наука, 1972. 252 с.
10. Mousavi A., Pourakbar L., Siavash Moghaddam S. Effects of Malic Acid and EDTA on Oxidative Stress and Antioxidant Enzymes of Okra (Abelmoschus Esculentus L.) Exposed to Cadmium Stress // Ecotoxicology and Environmental Safety. 2022. Vol.248. P.114320. doi: 10.1016/j.ecoenv.2022.114320
11. Zeng X., Wu J., Wu Q., Zhang J. L-Malate Enhances the Gene Expression of Carried Proteins and Antioxidant Enzymes in Liver of Aged Rats // Physiological Research. 2015. Vol.64. No.1. P. 71–78. doi: 10.33549/physiolres.932739
12. Wegrzyn A.B., Stolle S., Rienksma R.A., Martins Dos Santos V.A.P., Bakker B.M., Suarez-Diez M. Cofactors Revisited – Predicting the Impact of Flavoprotein-Related Diseases on

- a Genome Scale // *Biochimica et Biophysica Acta. Molecular Basis of Disease*. 2019. Vol.1865. No.2. P.360–370. doi: 10.1016/j.bbadi.2018.10.021
13. Domingo J.L., Gomez M., Llobet J. M., Corbella J. Chelating Agents in the Treatment of Acute Vanadyl Sulphate Intoxication in Mice // *Toxicology*. 1990. Vol. 62. No.2. P.203–211. doi: 10.1016/0300-483x(90)90110-3
14. Силантьева Т.А. Многофакторное влияние аскорбиновой кислоты на процесс reparативного остеогенеза // Современные проблемы науки и образования. 2023. №4. С.157. doi: 10.17513/spno.32901
15. Kim J., Stolarski A., Zhang Q., Wee K., Remick D. Hydrocortisone, Ascorbic Acid, and Thiamine Therapy Decrease Renal Oxidative Stress and Acute Kidney Injury in Murine Sepsis // *Shock*. 2022. Vol.58. No.5. P.426–433. doi: 10.1097/SHK.0000000000000195
16. Spoelstra-de Man A.M.E., Elbers, P.W.G., Oudemans-Van Straaten H.M. Vitamin C: Should we Supplement? // *Current Opinion in Critical Care*. 2018. Vol.24. No.4. P.248–255. doi: 10.1097/MCC.0000000000000510
17. Закирова Г.Ш., Ишмухаметов К. Т., Сайтов В. Р., Кадиков И. Р. Эффективность применения солей фумаровой и янтарной кислот при комбинированном поражении кроликов // Вестник Марийского Государственного Университета. 2022. Т.8. №3. С.256–263. doi: 10.30914/2411-9687-2022-8-3-256-263
18. Zarubina I.V., Lukk M.V., Shabanov P.D. Antihypoxic and Antioxidant Effects of Exogenous Succinic Acid and Aminothiol Succinate-Containing Antihypoxants // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2012. Vol.153. No.3. P.336–339. doi: 10.1007/s10517-012-1709-5
19. Мороз Н.Е. Биохимия: формулы, таблицы, схемы. Калининград: Балтийский федеральный университет имени Имануила Канта, 2023. 155 с.
20. Маркова Е.О., Новиков В.Е., Парфенов Э.А., Пожилова Е.В. Комплексное соединение аскорбиновой кислоты с антигипоксантными и антиоксидантными свойствами // Вестник Смоленской государственной медицинской академии. 2013. Т.12. №1. С.27–32.
21. Frei B., England, L., Ames, B.N. Ascorbate is an Outstanding Antioxidant in Human Blood Plasma // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1989. Vol.86. No.16. P.6377–6381. doi: 10.1073/pnas.86.16.6377
22. Tian J., Peehl Donna M., Knox Susan J. Metalloporphyrin Synergizes with Ascorbic Acid to Inhibit Cancer Cell Growth Through Fenton Chemistry // *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*. 2010. Vol.25. No.4. P.439–448. doi: 10.1089/cbr.2009.0756
23. Иванова И.П., Трофимова С.В., Пискарёв И.М. Хемилюминесценция, индуцированная реакцией Фентона, – математическое моделирование процесса; особенности, параметры и условия применения для биомедицинских исследований // Современные технологии в медицине. 2014. Т.6. №4. С.14–25.
24. Лугакин А.С., Ешкина, С. В., Осмоловская, Н. Г. Влияние экзогенных антиоксидантов на генерацию супероксидного аниона-радикала в листьях огурца при стрессовом действии охлаждения и ионов меди // Вестник Санкт-Петербургского Университета. Серия 3. Биология. 2013. №4. С.65–73.
25. Шарова Е.И., Медведев, С. С., Демидчик, В. В. Аскорбат в апопласте: метаболизм и функции // *Физиология растений*. 2020. Т.67. №2. С.115–129. doi: 10.31857/S0015330320020153
26. Green M., Fry S. Apoplastic Degradation of Ascorbate: Novel Enzymes and Metabolites Permeating the Plant Cell Wall // *Plant Biosystems – An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*. 2005. Vol.139. No.1. P.2–7. doi: 10.1080/11263500500056849
27. Zhang S., Chen H., He D., He X., Yan Y., Wu K., Wei H. Effects of Exogenous Organic Acids on Cd Tolerance Mechanism of *Salix Variegata* Franch. Under Cd Stress // *Frontiers in Plant Science*. 2020. Vol.11. P.594352. doi: 10.3389/fpls.2020.594352
28. Chen M., Zhao Y., Li S., Chang Z., Liu H., Zhang D., Wang S., Zhang X., Wang J. Maternal Malic Acid May Ameliorate Oxidative Stress and Inflammation in Sows through Modulating Gut Microbiota and Host Metabolic Profiles during Late Pregnancy // *Antioxidants & Redox Signaling*. 2024. Vol.13. No.2. P.253. doi: 10.3390/antiox13020253

REFERENCES

1. Rozhdestvenskiy L.M. Difficulties in Radiation Counter Measure Preparations Development in Russia in Crisis Period: Actual Approaches Searching. *Radiatsionnaya Biologiya. Radioekologiya* = Radiation Biology. Radioecology. 2020;60;3:279–290 (In Russ.). doi: 10.31857/S086980312003011X
2. Singh V.K., Seed T.M. The Efficacy and Safety of Amifostine for the Acute Radiation Syndrome. Expert Opinion On Drug Safety. 2019;18;11:1077–1090. doi: 10.1080/14740338.2019.1666104
3. Vasin M.V. The Classification of Radiation Protective Agents as the Reflection of the Present State and Development Perspective of Current Radiation Pharmacology. *Radiatsionnaya Biologiya. Radioekologiya* = Radiation Biology. Radioecology. 2013;53;5:459–467 (In Russ.). doi: 10.7868/S0869803113050160.
4. Burlakova E.B., Atkarskaya M.V., Fatkullina L.D., Andreev S.G. Radiation-Induced Changes in Structural State of Membranes of Human Blood Cells. *Radiatsionnaya Biologiya. Radioekologiya* = Radiation Biology. Radioecology. 2014;54;2:162–168 (In Russ.). doi: 10.7868/S0869803114020040.
5. Kuzin A.M. *Strukturno-Metabolicheskaya Teoriya v Radiobiologii* = Structural and Metabolic Theory in Radiobiology. Moscow, Nauka Publ., 1986. 282 p. (In Russ.).
6. Raj S., Manchanda R., Bhandari M., Alam M.S. Review on Natural Bioactive Products as Radioprotective Therapeutics: Present and Past Perspective. Current Pharmaceutical Biotechnology. 2022;23;14:1721–1738. doi: 10.2174/1389201023666220110104645
7. Gonzalez E., Cruces M.P., Pimentel E., Sanchez P. Evidence that the Radioprotector Effect of Ascorbic Acid Depends on the Radiation Dose Rate. Environmental Toxicology And Pharmacology. 2018;62:210–214. doi: 10.1016/j.etap.2018.07.015
8. Zhuravlov A.I., Zubkova S.M. *Antioxidanty. Svobodnoradikal'naya Patologiya, Starenie* = Free Radical Pathology, Aging. Moscow, Belye Al'yu Publ., 2014. 304 p. (In Russ.).
9. Vladimirov Yu.A., Archakov A.I. *Perekisnoe Okislenie Lipidov v Biologicheskikh Membranah* = Lipid Peroxidation in Biological Membranes. Moscow, Nauka Publ., 1972. 252 p. (In Russ.).
10. Mousavi A., Pourakbar, L., Siavash Moghaddam, S. Effects of Malic Acid and EDTA on Oxidative Stress and Antioxidant Enzymes of Okra (*Abelmoschus Esculentus* L.) Exposed to Cadmium Stress. Ecotoxicology and Environmental Safety. 2022;248:114320. doi: 10.1016/j.ecoenv.2022.114320
11. Zeng X., Wu J., Wu Q., Zhang J. L-Malate Enhances the Gene Expression of Carried Proteins and Antioxidant Enzymes in Liver of Aged Rats. Physiological Research. 2015;64;1:71–78. doi: 10.33549/physiolres.932739
12. Wegrzyn A.B., Stolle S., Rienksma R.A., Martins Dos Santos V.A.P., Bakker B.M., Suarez-Diez M. Cofactors Revisited – Predicting the Impact of Flavoprotein-Related Diseases on a Genome Scale. *Biochimica et Biophysica Acta. Molecular Basis of Disease*. 2019;1865;2:360–370. doi: 10.1016/j.bbadi.2018.10.021
13. Domingo J.L., Gomez M., Llobet J.M., Corbella J. Chelating Agents in the Treatment of Acute Vanadyl Sulphate Intoxication in Mice. *Toxicology*. 1990;62;2:203–211. doi: 10.1016/0300-483x(90)90110-3
14. Silant'yeva T.A. Multifactorial Effect of Ascorbic Acid on the Process of Reparative Osteogene. *Sovremennye Problemy Nauki i Obrazovaniya* = Modern Problems of Science and Education. 2023;4:157 (In Russ.). doi: 10.17513/spno.32901
15. Kim J., Stolarski A., Zhang Q., Wee K., Remick D. Hydrocortisone, Ascorbic Acid, and Thiamine Therapy Dec-

- reace Renal Oxidative Stress and Acute Kidney Injury in Murine Sepsis. *Shock*. 2022;58;5:426–433. doi: 10.1097/SHK.0000000000001995
16. Spoelstra-de Man A.M.E., Elbers P.W.G., Oudemans-Van Straaten H.M. Vitamin C: Should we Supplement? Current Opinion in Critical Care. 2018;24;4:248–255. doi: 10.1097/MCC.0000000000000510
17. Zakirova G.Sh., Ishmukhametov K.T., Saitov V.R., Kadikov I.R. The Effectiveness of the Use of Fumaric and Succinic Acids Salts in Combined Lesions of Rabbits. *Vestnik Mariyskogo Gosudarstvennogo Universiteta* = Vestnik of the Mari State University. 2022;8;3:256–263. (In Russ.). doi: 10.30914/2411-9687-2022-8-3-256-263
18. Zarubina I.V., Lukk M.V., Shabanov P.D. Antihypoxic and Antioxidant Effects of Exogenous Succinic Acid and Aminothiol Succinate-Containing Antihypoxants. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2012;153;3:336–339. doi: 10.1007/s10517-012-1709-5
19. Moroz N.E. *Biokhimiya: Formuly, Tablitsy, Skhemy* = Biochemistry: Formulas, Tables, Diagrams. Kaliningrad, Baltiyskiy Federal'nyy Universitet imeni Imanuila Kanta Publ., 2023. 155 p. (In Russ.).
20. Markova E.O., Novikov V.E., Parfenov E.A., Pozhilova E.V. Complex Compound of Ascorbic Acid with Antioxidant and Antihypoxanth. *Vestnik Smolenskoy Gosudarstvennoy Meditsinskoy Akademii* = Bulletin of the Smolensk State Medical Academy. 2013;12;1:27–32 (In Russ.).
21. Frei B., England, L., Ames, B. N. Ascorbate is an Outstanding Antioxidant in Human Blood Plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1989;86;16:6377–6381. doi: 10.1073/pnas.86.16.6377
22. Tian J., Peehl Donna M., Knox Susan J. Metalloporphyrin Synergizes with Ascorbic Acid to Inhibit Cancer Cell Growth Through Fenton Chemistry. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*. 2010;25;4:439–448. doi: 10.1089/cbr.2009.0756
23. Ivanova I.P., Trofimova S.V., Piskarev I.M. Fenton's Reaction Induced Chemiluminescence is Mathematical Modeling of the Process; Characteristics, Parameters and Application Conditions for Biomedical Studies. *Sovremennyye Tekhnologii v Meditsine* = Modern Technologies In Medicine. 2014;6;4:14–25 (In Russ.).
24. Lukatkin A.S., Yeshkina S.V., Osmolovskaya N.G. Influence of Exogenous Antioxidants on the Generation of Superoxide Anion-Radicals in the Cucumber Leaves Under Low Temperature and Cu²⁺ Stress. *Vestnik Sankt-Peterburgskogo Universiteta. Seriya 3. Biologiya* = Bulletin of St. Petersburg University. Series 3. Biology. 2013;4:65–73 (In Russ.).
25. Sharova E.I., Medvedev S.S., Demidchik V.V. Ascorbate in the Apoplast: Metabolism and Functions. *Fiziologiya Rasteniy* = Russian Journal of Plant Physiology. 2020;67;2:115–129 (In Russ.). doi: 10.1134/S1021443720020156
26. Green M., Fry S. Apoplastic Degradation of Ascorbate: Novel Enzymes and Metabolites Permeating the Plant Cell Wall. *Plant Biosystems* – an International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology. 2005;139;1:2–7. doi: 10.1080/11263500500056849
27. Zhang S., Chen H., He D., He X., Yan Y., Wu K., Wei H. Effects of Exogenous Organic Acids on Cd Tolerance Mechanism of *Salix variegata* Franch. Under Cd Stress. *Frontiers in Plant Science*. 2020;11:594352. doi: 10.3389/fpls.2020.594352
28. Chen M., Zhao Y., Li S., Chang Z., Liu H., Zhang D., Wang S., Zhang X., Wang J. Maternal Malic Acid May Ameliorate Oxidative Stress and Inflammation in Sows through Modulating Gut Microbiota and Host Metabolic Profiles during Late Pregnancy. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2024;13;2:253. doi: 10.3390/antiox13020253

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Финансирование. Работа выполнена в рамках НИР «Технология-3» (номер регистрации НИР в системе ЕГИСУ НИОКР: 1230113001053).

Участие авторов. Статья подготовлена с равным участием авторов.

Поступила: 20.05.2024. Принята к публикации: 25.06.2024.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Financing. The work was carried out within the framework of research and development «Technology-3» (the registration number of research and development in the EGISU R&D system: 1230113001053).

Contribution. Article was prepared with equal participation of the authors.

Article received: 20.05.2024. Accepted for publication: 25.06.2024.