

## КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ

УДК 616.155.1-008  
©Коллектив авторов

### ВЛИЯНИЕ АЛИМЕНТАРНОГО МИКРОЭЛЕМЕНТОЗА НА АКТИВНОСТЬ ГЛУТАТИОН-ПЕРОКСИДАЗЫ И СУПЕРОКСИДИСМУТАЗЫ

*А.В. Васильев\*, В.И. Ивахненко, С.А. Хотимченко, В.В. Корж*

ГУ НИИ питания РАМН, 109240, Москва, Устьинский пр-д, 2/14;  
тел.: 8-499-613-15-92; факс: 8-499-613-07-09; эл. почта: mednutrition@mail.ru

Проведены исследования  $K_m$  глутатионпероксидазы (ГПО), активности супероксиддисмутазы (СОД) и ГПО в печени и эритроцитах у крыс, получавших полноценный полусинтетический и высокожировой корм при дополнительном увеличении содержания Cu, Zn, Mn, Se в рационе крыс. Были отмечены изменения кинетических параметров ГПО: увеличение степени сродства к ТБП в печени и эритроцитах крыс, получавших дополнительно микроэлементы. Так же отмечено снижение активности СОД в печени крыс, получавших высокожировой корм и дополнительно Cu, Zn, Mn, Se на 14 день.

**Ключевые слова:** супероксиддисмутаза, глутатионпероксидаза, Cu, Zn, Mn, Se.

**ВВЕДЕНИЕ.** Известно, что избыток жиров в рационе является фактором, приводящим к развитию окислительного стресса (ОС). Так, диета с 50% содержанием жира по массе, по сравнению с диетой содержащей только крахмал и белок, значительно увеличивает содержание ТБК продуктов в печени и почках [1]. Показано [2, 3], что развитие ОС в значительной степени зависит и от источника (состава) жира. Развитие ОС на высокожировом рационе проявляется значительным увеличением содержания продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК), и диеновых конъюгатов (ДК), снижением концентрации глутатиона и значительным снижением активности ферментов антиоксидантной защиты (АОЗ): супероксиддисмутаза (СОД), каталазы, глутатион-S-трансферазы и глутатионпероксидазы (ГПО) [3] в разных органах (печени, сердце, почках, кишечнике и аорте [4, 5]). В работе [6] показано влияние высокожировой диеты на уровень транскрипции генов. Выявлено снижение количества копий мРНК генов ферментов АОЗ (СОД1 СОД2 и ГПО) в икроножных мышцах крыс, находящихся на рационе с высоким содержанием жира. Очевидно, влияние высокожировой диеты на пул двух металл-зависимых ферментов АОЗ - СОД и ГПО (СОД - Cu, Zn и Mn зависимые формы и ГПО - Se-зависимые формы [7]) может осуществляться на уровне синтеза мРНК, трансляции и посттрансляционного процессинга ферментов. Есть основания предполагать, что уровень потребления микроэлементов Cu, Zn, Mn и Se в составе рациона может влиять на кинетические параметры СОД и ГПО. В связи с этим представляется целесообразным исследование кинетических свойств ГПО и активности СОД для оценки возможных путей коррекции функционального состояния системы АОЗ в условиях окислительного стресса (ОС) при высокожировом рационе и дополнительном обогащении рациона Cu, Zn, Mn и Se.

\* - адресат для переписки

**МЕТОДИКА.** Исследования проводили на белых крысах самцах Вистар с исходной массой тела  $42 \pm 1$  г. Животные получали полусинтетический рацион, рекомендованный приказом министра здравоохранения СССР №1179 от 10.10.83. Животные первой контрольной и второй (К+Ме) группы получали рацион, включающий 12% белка (в виде казеина), 32% жиров (1/3 лярд и 2/3 рафинированное подсолнечное масло) и 56% углеводов (кукурузный крахмал). В корм также вводили водо- и жирорастворимые витамины и холинхлорид, согласно утверждённым рекомендациям. Животные третьей (ВЖ) и четвёртой группы (ВЖ+Ме) получали рацион, содержащий 12% белка, 42% жиров и 46% углеводов. Микроэлементы вводили в рацион крыс всех групп в виде неорганических солей в составе солевой смеси согласно утверждённым рекомендациям. Дополнительно в рацион групп К+Ме и ВЖ+Ме на 1000 грамм сухого корма вводили премикс, содержащий Mn - 50 мг, Zn - 6 мг, Cu - 4,7 мг, Se - 0,1 мг (цинк и медь в виде комплексов ферментативных гидролизатов сывороточных белков коровьего молока, марганец в виде аспарагината и селен в виде селеносодержащей спироурины [8-10]). Животных содержали в условиях вивария ГУ НИИ питания РАМН по 3-4 особи в клетке в течение 2, 14 и 28 дней при постоянном контроле массы тела и поедаемости корма.

По истечении периода эксперимента животных умерщвляли путем декапитации, кровь собирали в пробирку с 0,1 мл гепарина, центрифугировали 10 мин. при 3000 g, плазму отделяли от эритроцитов. Гемолизат эритроцитов готовили разбавлением эритроцитов дистиллированной водой 1:1, с последующим замораживанием при  $-12^{\circ}$  -  $-15^{\circ}\text{C}$ . Одновременно со сбором крови проводили ретроградную перфузию печени через скошенный катетер охлажденным физраствором (0,9% NaCl); из отмытой печени готовили гомогенат в разведении 1:1 в гомогенизаторе Поттера – Эльвейма.

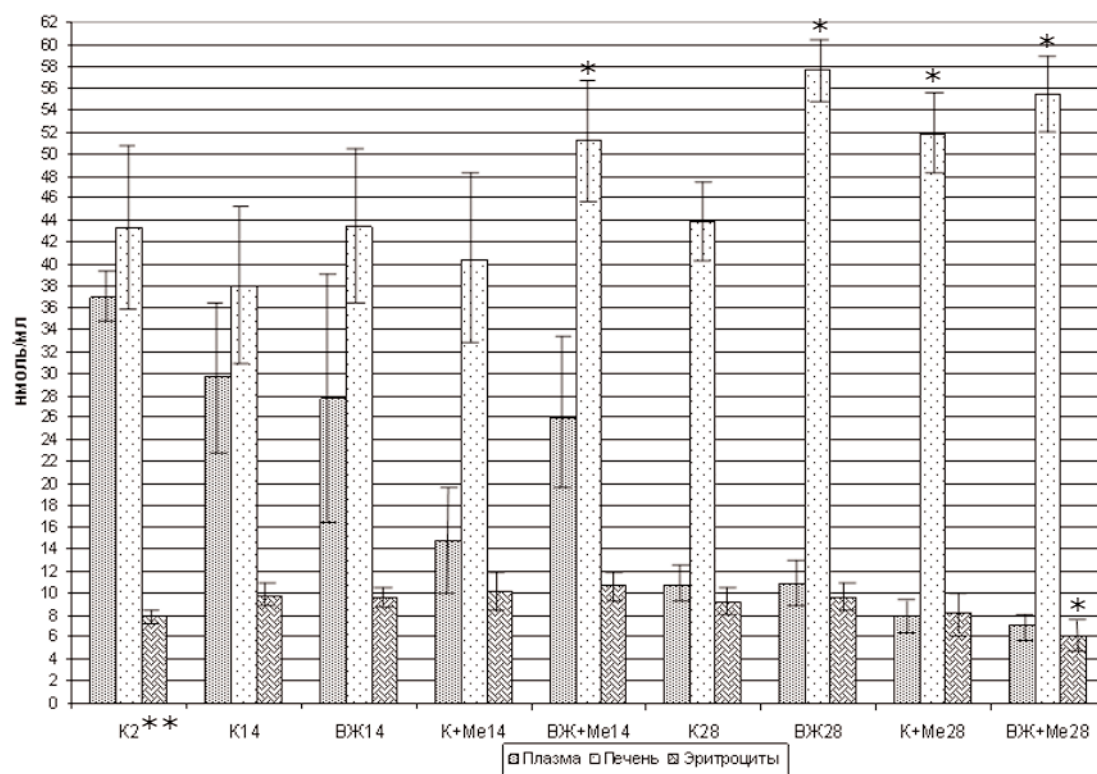
Биохимические показатели (альбумин, общий белок, глобулины, мочевины, триглицериды) определяли в плазме на биохимическом анализаторе КонелАб 30i. Продукты ПОЛ определяли по следующим методикам: малоновый диальдегид (МДА) по образованию продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой [11], диеновые конъюгаты (ДК) по методу [12]. Концентрацию селена определяли микрофлуориметрическим методом [13].

Активность СОД и ГПО измеряли в гомогенатах печени и гемолизатах эритроцитов на анализаторе FP 901(Labsystem). Кажущиеся величины константы Михаэлиса для ГПО и максимальной скорости реакции определяли при помощи метода, адаптированного для FP – 901 [14, 15]. Активность общей ГПО реакции определяли, используя в качестве субстрата *трет*-бутиловую гидроперекись (ТБП). Для определения активности СОД использовали метод Nishikimi M. et al., адаптированный для FP – 901 [16] с использованием в качестве  $\text{O}_2$ -генерирующей системы NADH, феназинметасульфат (ФМС), нитросиний тетразолий. Выбор рабочего диапазона  $\text{O}_2$ -генерирующей системы проводили с использованием в качестве стандарта коммерческого препарата эритроцитарной супероксиддисмутазы (Biozyme Laboratories 3333,3 U/мг). Коэффициент пересчета условных единиц в единицы активности составлял 54,113.

Результаты опытов обрабатывали статистически с использованием t-критерия Стьюдента (рассчитывали средние арифметические  $\pm$  ошибки средних), различия между группами считали достоверными при  $p < 0,05$ .

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** На 28 день вес крыс контрольной группы составлял  $146 \pm 16$  г, достоверных различий по данному показателю между группами не было. В группе ВЖ+Ме на 14 день отмечено достоверное увеличение содержания в плазме общего белка, альбуминов и глобулинов на 12, 11 и 14% соответственно. На этом же сроке в группе К+Ме наблюдается достоверное снижение в плазме триглицеридов на 61%.

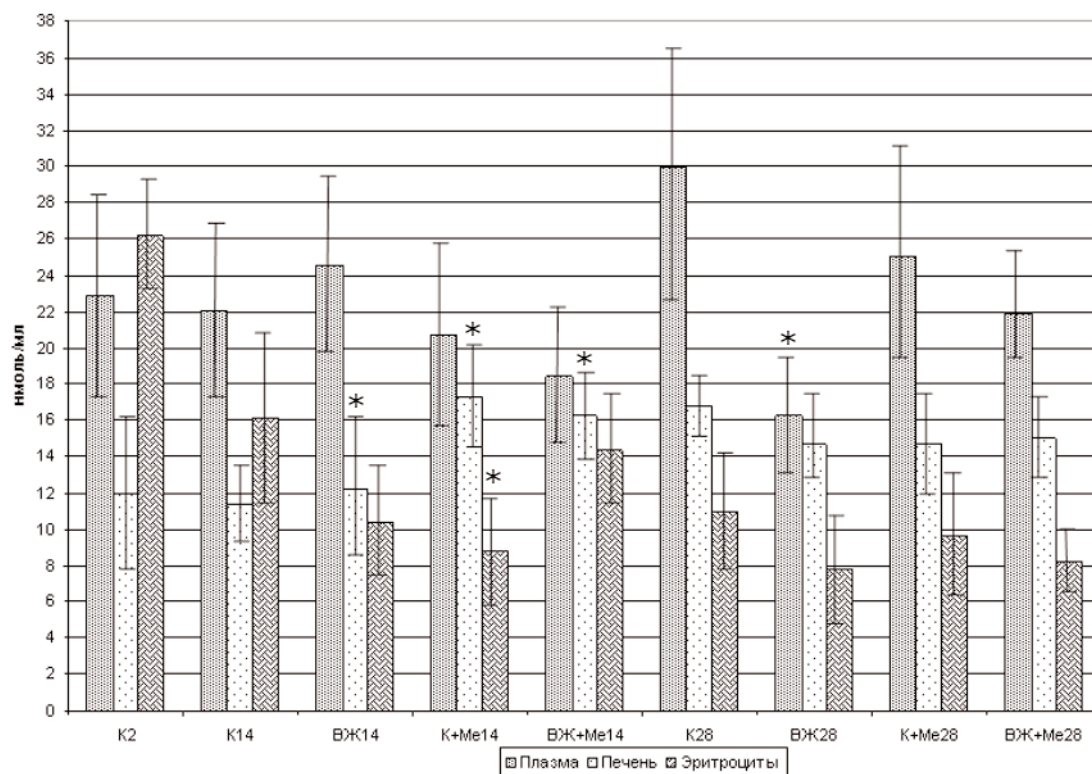
Измерение концентрации продуктов ПОЛ в эритроцитах показало достоверное снижение концентрации МДА в группе ВЖ+Ме на 34% на 28 день (рис. 1) и ДК в группе К+Ме на 45% на 14 день по сравнению с контрольной группой (рис. 2).



**Рисунок 1.**

Концентрация МДА в плазме, печени и эритроцитах крыс. Здесь и далее:

\* - достоверное различие с контролем,  $p < 0,05$ . \*\* - Здесь и далее цифровой индекс у группы указывает на число дней эксперимента.



**Рисунок 2.**

Концентрация ДК в плазме, печени и эритроцитах крыс.

## АЛИМЕНТАРНЫЙ МИКРОЭЛЕМЕНТОЗ И АКТИВНОСТЬ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ

В печени было отмечено увеличение концентрации МДА на 28 день во всех опытных группах на 20–30%, при этом в группе ВЖ+Ме увеличение МДА наблюдалось уже на 14 день (на 35%). Концентрация ДК в печени была увеличена на 14 день во всех опытных группах (на 50%). На 28 день содержание ДК в плазме крыс группы ВЖ было ниже, чем в плазме крыс контрольной группы на 46% (рис. 1, 2).

Отмечено достоверное снижение концентрации селена в печени и плазме крыс контрольной группы на 14 (на 68%) и 28 (на 80%) день по сравнению с началом эксперимента. При этом концентрация селена на 28 день в печени и плазме была достоверно ниже на 31–34% по сравнению с данными в этой же группе на 14 день. В печени крыс, получавших высокожировой рацион (группа ВЖ), наблюдалось снижение концентрации селена на 28 день на 22% по сравнению с печенью крыс, получавших контрольный рацион (табл. 1).

Таблица 1. Концентрация селена в плазме и печени.

Группа	Селен плазмы, мкг/л	Селен печени, мкг/г
<b>К<sup>2</sup> (n=14)</b>	<b>256±13,6</b>	<b>265±16,6</b>
<b>К<sup>14</sup> (n=8)</b>	<b>82,7±7,44</b>	<b>84,6±9,37</b>
<b>ВЖ<sup>14</sup> (n=14)</b>	<b>75,3±7,13</b>	<b>97,7±10,2</b>
<b>К+Ме<sup>14</sup> (n=14)</b>	<b>205±12,0*</b>	<b>296±12,1*</b>
<b>ВЖ+Ме<sup>14</sup> (n=14)</b>	<b>229±11,3*</b>	<b>248±13,5*</b>
<b>К<sup>28</sup> (n=8)</b>	<b>55,0±2,99</b>	<b>58,6±2,11</b>
<b>ВЖ<sup>28</sup> (n=15)</b>	<b>56,3±2,83</b>	<b>45,9±1,68*</b>
<b>К+Ме<sup>28</sup> (n=14)</b>	<b>260±9,29*</b>	<b>305±8,61*</b>
<b>ВЖ+Ме<sup>28</sup> (n=18)</b>	<b>300±19,1*</b>	<b>318±19,6*</b>

Примечание: \* - здесь и далее достоверное различие с контролем,  $p < 0,05$ .

На фоне потребления рациона, обогащённого микроэлементами, наблюдалось увеличенная концентрация селена как в плазме крыс на 14 день на 148 и 176% (в группах К+Ме и ВЖ+Ме соответственно), так и в печени на 250 и 193%, на 28 день - на 374 и 446% в плазме и на 421 и 443% в печени (в группах К+Ме и ВЖ+Ме соответственно). При этом достоверная разница между группами К+Ме и ВЖ+Ме была отмечена только в печени крыс на 14 день на 16% ниже в группе ВЖ+Ме.

В печени крыс группы ВЖ+Ме на 28 день концентрация цинка была выше чем в контрольной группе и группе К+Ме (табл. 2).

Таблица 2. Концентрация цинка, меди и марганца в печени крыс.

Группа	Цинк, мг/кг	Медь, мг/кг	Марганец, мг/кг
<b>К<sup>28</sup> (n=8)</b>	<b>8,83±0,444</b>	<b>1,71±0,190</b>	<b>0,527±0,0378</b>
<b>ВЖ<sup>28</sup> (n=15)</b>	<b>9,31±0,378</b>	<b>1,96±0,103</b>	<b>0,560±0,0208</b>
<b>К+Ме<sup>28</sup> (n=14)</b>	<b>8,56±0,340</b>	<b>1,65±0,0951</b>	<b>0,610±0,0319</b>
<b>ВЖ+Ме<sup>28</sup> (n=18)</b>	<b>10,5±0,494*</b>	<b>1,92±0,164</b>	<b>0,567±0,0578</b>

Выявлено увеличение  $K_m$  ГПО в печени и эритроцитах контрольной группы на 148 и 267% на 14 день и на 53 и 746% соответственно. При этом в эритроцитах наблюдается увеличение  $K_m$  ГПО на 28 день по сравнению с данными на 14 день, а в печени – снижение на 38% (табл. 3). На фоне потребления высокожирового рациона отмечено увеличение  $K_m$  ГПО на 28 день по сравнению с контролем в печени крыс на 74% и в эритроцитах на 117%.

Таблица 3. Кинетические параметры глутатионпероксидазы эритроцитов и печени крыс групп К, ВЖ, К+Ме и ВЖ+Ме.

Группа	Печень		Эритроциты	
	$K_m$ , мМ	$V_{max}$ , мкмоль/мин/мг белка	$K_m$ , мМ	$V_{max}$ , мкмоль/мин/мл
<b>К<sup>2</sup> (n=14)</b>	<b>0,147±0,0186</b>	<b>0,1726±0,043</b>	<b>0,0154±0,00203</b>	<b>12,6±0,418</b>
<b>К<sup>14</sup> (n=8)</b>	<b>0,364±0,0360</b>	<b>0,110±0,0242</b>	<b>0,0567±0,00727</b>	<b>7,26±0,729</b>
<b>ВЖ<sup>14</sup> (n=14)</b>	<b>0,360±0,0416</b>	<b>0,165±0,0297</b>	<b>0,0864±0,0160</b>	<b>7,27±0,594</b>
<b>К+Ме<sup>14</sup> (n=14)</b>	<b>0,0146±0,00218*</b>	<b>0,287±0,0313*</b>	<b>0,0454±0,00492</b>	<b>11,1±0,516*</b>
<b>ВЖ+Ме<sup>14</sup> (n=14)</b>	<b>0,00944±0,00099*</b>	<b>0,283±0,0337*</b>	<b>0,0472±0,00570</b>	<b>11,0±0,536*</b>
<b>К<sup>28</sup> (n=8)</b>	<b>0,224±0,0220</b>	<b>0,172±0,0330</b>	<b>0,131±0,0184</b>	<b>6,99±0,464</b>
<b>ВЖ<sup>28</sup> (n=15)</b>	<b>0,3897±0,0365*</b>	<b>0,154±0,0210</b>	<b>0,283±0,0494*</b>	<b>7,75±0,422</b>
<b>К+Ме<sup>28</sup> (n=14)</b>	<b>0,0202±0,00315*</b>	<b>0,234±0,0215</b>	<b>0,0160±0,00181*</b>	<b>14,2±0,768*</b>
<b>ВЖ+Ме<sup>28</sup> (n=18)</b>	<b>0,0258±0,00302*</b>	<b>0,242±0,0184</b>	<b>0,0179±0,00152*</b>	<b>14,7±0,868*</b>

В печени крыс групп, получавших премикс,  $K_m$  ГПО была достоверно ниже уже на 14 день на 97-96%, а на 28 день  $K_m$  ГПО была достоверно ниже как в печени, так и в эритроцитах крыс на 91 и 88% в группе К+Ме и на 88 и 86% в группе ВЖ+Ме.



# АЛИМЕНТАРНЫЙ МИКРОЭЛЕМЕНТОЗ И АКТИВНОСТЬ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ

$V_{\max}$  ГПО в контрольной группе достоверно снизилась только в эритроцитах на 42% на 14 день и на 44% на 28 день. По данному показателю не выявлено различий между контрольной группой и животными, содержащимися на высокожировой диете.

Увеличение  $V_{\max}$  ГПО наблюдали в группах, получавших премикс, на 14 день в печени на 161 и 151%, в эритроцитах на 14 и 28 день на 53 и 103% в группе К+Ме и на 52 и 111% в группе ВЖ+Ме.

Изменение активности СОД в контрольной группе в течение эксперимента в контрольной группе отмечено только в печени на сроке 14 дней (снижение на 61%). На 28 день активность СОД увеличилась на 46% по сравнению с данными на 14 день. В печени крыс группы ВЖ отмечено увеличение активности СОД на 28 день на 380% (табл. 4).

Таблица 4. Активность СОД в печени и эритроцитах крыс групп К, ВЖ, К+Ме и ВЖ+Ме.

Группа	Печень	Эритроциты
	Активность, мкмоль/мин/мг белка	Активность мкмоль/мин/г белка
<b>К<sup>2</sup> (n=14)</b>	<b>0,103±0,0196</b>	<b>0,321±0,00938</b>
<b>К<sup>14</sup> (n=8)</b>	<b>0,0403±0,00132</b>	<b>0,307±0,0103</b>
<b>ВЖ<sup>14</sup> (n=14)</b>	<b>0,0410±0,00102</b>	<b>0,284±0,00420</b>
<b>К+Ме<sup>14</sup> (n=14)</b>	<b>0,0465±0,00320*</b>	<b>0,274±0,00728*</b>
<b>ВЖ+Ме<sup>14</sup> (n=14)</b>	<b>0,0285±0,00324</b>	<b>0,487±0,0779</b>
<b>К<sup>28</sup> (n=8)</b>	<b>0,0587±0,00792</b>	<b>0,300±0,0117</b>
<b>ВЖ<sup>28</sup> (n=15)</b>	<b>0,282±0,0617*</b>	<b>0,263±0,00681*</b>
<b>К+Ме<sup>28</sup> (n=14)</b>	<b>0,115±0,0148*</b>	<b>0,284±0,0174</b>
<b>ВЖ+Ме<sup>28</sup> (n=18)</b>	<b>0,0517±0,00278</b>	<b>0,287±0,00731</b>

В группе К+Ме отмечено снижение активности СОД печени на 14 день на 53% и увеличение на 28 день на 96% по сравнению с контролем. Так же отмечено снижение активности СОД в группе ВЖ+Ме на 14 день по отношению к группам К+Ме на 60% и ВЖ на 54% на 28 день на 55 и 82% соответственно. В эритроцитах наблюдалось снижение активности СОД на 10% в группе К+Ме на 14 день и в группе ВЖ на 28 день на 13% по отношению к контролю. Увеличение активности СОД было отмечено на сроке 14 дней в группе ВЖ+Ме. Так же достоверно выше была активность СОД в эритроцитах группы ВЖ+Ме на 78% по сравнению с группой К+Ме на 14 день и на 9% в группе ВЖ+Ме по сравнению с группой ВЖ на 28 день.

Как следствие потребления высокожирового рациона на 28 день в печени групп ВЖ и ВЖ+Ме отмечается увеличение продуктов ПОЛ. В группе К+Ме так же имеется достоверное увеличение ПОЛ, что объясняется введением в рацион

металлов с переходной валентностью. Снижение концентрации ДК на 28 день в группе ВЖ, по видимому, объясняется внесением с дополнительно вводимым подсолнечным маслом витамина Е. Снижение концентрации продуктов ПОЛ в эритроцитах крыс групп, потреблявших рационы, обогащенные Cu, Zn, Mn и Se, возможно является следствием как увеличения сродства ГПО к субстрату, так и проявлением антиоксидантных свойств селена и цинка.

Дополнительное введение селена в рацион приводило к увеличению сродства ГПО к субстрату и увеличению  $V_{\max}$  ГПО в эритроцитах и печени при нормальном и повышенном потреблении жира, при этом более выраженное увеличение сродства отмечено на более длительном сроке эксперимента - к 28 дню.

Дополнительные включения в рацион металлов с переходной валентностью инициируют, в первую очередь, образование именно супероксид-аниона - главного субстрата СОД и происходит увеличение образования  $O_2^-$ . На высокожировом рационе активность СОД печени не имеет достоверной разницы с контролем на 14 день. Активность СОД достоверно снижается в печени на рационе ВЖ+Ме на 14 день. На 28 день активность СОД в печени крыс групп К+Ме и ВЖ достоверно выше по сравнению с контролем.

Таким образом, показано, что исследование кинетических свойств ГПО и активности СОД вполне применимо для детальной оценки функционального состояния отдельных ферментов и их нутриопротективных изменений. Полученные результаты дают основание считать, что дополнительное введение Se в рацион в значительной степени влияет на стабилизацию кинетических параметров ГПО, что позволяет использовать введение Se для коррекции ОС.

Известно, что металлы с переходной валентностью Cu и Mn могут инициировать ПОЛ [7], и дополнительное введение данных микроэлементов в сбалансированный рацион в двукратной дозировке по сравнению с контролем привело к повышению концентрации продуктов ПОЛ в печени на 28 день в группе К+Ме, что свидетельствует о том, что данные дозы этих металлов являются избыточными.

В свою очередь, введение в рацион дополнительно только Zn приводит к снижению активности Cu, Zn – СОД и увеличению концентрации продуктов ПОЛ [17, 18], что может быть обусловлено конкурентными взаимодействиями Cu, Zn – органических комплексов при всасывании в тонком кишечнике и на уровне синтеза фермента. В совокупности, полученные результаты позволяют на ферментном уровне оценить особенности влияния Se, Cu, Zn, Mn, поступающих с пищей, на состояние ферментной системы антиоксидантной защиты, что необходимо учитывать при оценке нутриметаболического статуса для индивидуализации диетотерапии.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Folmer V., Soares J.C.M., Gabriel D., Rocha J.K. (2003) J. Nutr. **133**, 2165-2170.
2. Ibrahim W., Lee U.-S., Yeh C.-C., et al. (1997) J. Nutr. **127**, 1401-1406.
3. Slim R.M., Toborek M., Watkins B.A., Boissonneault G.A., Hennig J.B. (1996) Am. College Nutr., **15**, 289-294.
4. Ima Nirwana Soelaiman, Zainuddin Merican, Jamaludin Mohamed, Khalid Bin Abdul Kadir (1996) Asia Pacific J. Clin. Nutr., **5**(4): 244-248.
5. Vijayakumar R.S., Surya D., Nalini N. (2004) Redox Report, **9**(2), 105-110.
6. Sreekumar R., Unnikrishnan J., Fu A., Nygren J. (2002) Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab., **282**(5), 1055-1061.
7. Меньшикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К. и др. (2006) Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты. М.-Фирма "Слово" – 556с.
8. Мазо В.К., Зорин С.Н., Гмошинский И.В. и др. (2003) Вопр. дет. диетол., **1**(6), 6-10.

9. Мазо В.К., Зорин С.Н., Гмошинский И.В., и др. (2004) Вопр. дет. диетол, **2**(3), 9-11.
10. Кукес В.Г., Асланян Н.В., Голубкина Н.А., и др. (2002) Микроэлементы в медицине. **3**(4), 13-14.
11. Ernster Z., Nordenbrandt K. (1967) Methods Enzymol., **10**, 575-576.
12. Гаврилов В.Б., Мишкорудная М.И. (1983) Лаб. дело, №3, 33-35.
13. Голубкина Н.А. (1995) Ж. аналит. химии, **50**, 492-497.
14. Мальцев Г.Ю., Тышко Н.В. (2002) Гигиена и санитария, **2**, 69-71.
15. Mille G. (1959) J. Biol. Chem., **244**, 502-506.
16. Мальцев Г.Ю., Васильев А.В. (1994) Вопр. мед. химии, **40**(2), 56-58.
17. Xiang Y., Yang X., Bian J., Wang L. (2004) Wei Sheng Yan Jin, **33**(6), 727-731.
18. Fosmire G.J. (1990) Am. J. Clin. Nutr., **51**, 225-227.

Поступила: 05. 09. 2007.

#### INFLUENCE OF ALIMENTARY MICROELEMENTOSIS ON ACTIVITY OF SUPEROXIDE DISMUTASE AND GLUTATHIONE PEROXIDASE

*A.V. Vasiljev, V.I. Ivakhnenko, S.A. Chotimchenko, V.V. Korj*

Institute of Nutrition RAMS, 109240, Moscow, Ustinsky proezd, 2/14; tel.: (095)113-15-92;  
fax: (095) 113-07-09; e-mail: mednutrition@mail.ru

Studies of  $K_m$  for glutathione peroxidase (GPx) and activities of superoxide dismutase and GPx were carried out in liver and erythrocytes of rats kept on either the normal semisynthetic diet or a high-fat diet with increased content of Cu, Zn, Mn, and Se. The diet containing microelement additions caused the increase in TBH affinity of liver and erythrocyte GPx, as well as the decrease of liver SOD observed on the 14th day of the treatment of rats with the high-fat diet with additional increase of Cu, Zn, Mn, and Se.

**Key words:** superoxide dismutase, glutathione peroxidase, Cu, Zn, Mn, Se.