

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 546.23+616.056+567.8.097.32

© Коллектив авторов

### ГОМЕОСТАЗ СЕЛЕНА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ АНАФИЛАКСИИ У КРЫС НА ФОНЕ ПРИЕМА ВОССТАНОВЛЕННОГО ГЛУТАТИОНА И СЕЛЕНОБОГАЩЕННОЙ СПИРУЛИНЫ

Н.А. ГОЛУБКИНА, В.К. МАЗО, И.В. ГМОШИНСКИЙ, С.Н. ЗОРИН,  
А.Х. ТАМБИЕВ\*, Н.Н. КИРИКОВА\*

Институт питания РАМН, Москва 109240, Устьинский пр.2/14  
тел. 298-18-64. Факс (095)298-18-72; \*МГУ им.М.В.Ломоносова

Анафилактический шок у sensibilizированных крыс увеличивает экскрецию селена с мочой с 1,71 до 6,36 нмоль Se/18 часов. При этом соотношение Se плазмы/Se эритроцитов изменяется с 0,939 до 0,791, а содержание селена в стенках тонкой кишки не меняется. Введение животным восстановленного глутатиона (ГЛ-Н) не изменяло кишечную проницаемость, но приводило к уменьшению содержания селена в плазме крови и увеличению концентрации микроэлемента в стенках тонкой кишки ( $r=-0,720$ ). Хроматографический анализ белков плазмы показал, что в процессе перераспределения селена участвует селен-переносящий белок Р. Использование комплексной добавки: ГЛ-Н + селен - обогащенная спирулина - в значительной степени нормализовало как макромолекулярную проницаемость кишечного барьера, так и распределение селена в элементах крови и стенках кишки, а также содержание в плазме селен-переносящего белка Р.

**Ключевые слова:** селен, анафилаксия, восстановленный глутатион, спирулина

**ВВЕДЕНИЕ.** Изменения в состоянии системы антиоксидантной защиты организма млекопитающих при развитии реакции анафилаксии представляют существенный интерес как в теоретическом, так и в практическом плане. В частности, с позиций возможного использования алиментарного селена (одного из ключевых антиоксидантов, обладающих иммуномодулирующим действием) для профилактики и коррекции аллергических состояний представляется

целесообразным исследовать изменения его содержания в органах и тканях в условиях сенсibilизации и развития анафилактического шока.

Соединения селена в комплексе с витаминами антиоксидантного действия уже были использованы в качестве профилактического средства при аллергии [1]. Ранее нами было экспериментально установлено антианафилактическое действие биодоступного селена в составе микроводоросли спирулины в комплексе с восстановленным глутатионом (ГЛ-Н) [2].

Целью настоящего исследования явилось изучение некоторых параметров, характеризующих гомеостаз селена при экспериментальной системой анафилаксии у крыс, и влияние на эти показатели биологически активной добавки к пище (БАД), содержащей селен-обогащенную спирулину.

**МЕТОДИКА.** Исследования проводились на четырех группах крыс линии Вистар обоих полов с исходной массой тела 180-200 г (по 10 крыс в каждой группе при равном количестве животных каждого пола), получающих стандартный рацион вивария НИИ питания РАМН, сбалансированный по основным макро- и микронутриентам. Первая группа (контроль) не подвергалась сенсibilизации, животных остальных групп сенсibilизировали на 1,3,5 и 21 дни опыта куриным овальбумином (ОА) парентерально по схеме, описанной в работе [3]. Крысы 3-ей группы получали, начиная с 25 дня опыта, внутривентриально через зонд ежедневно 300 мг восстановленного глутатиона (ГЛ-Н)/кг массы тела в 2 мл изотонического раствора NaCl. Животные 4-ой группы, помимо ГЛ-Н, получали с кормом селен-обогащенную спирулину (*Spirulina platensis* Nordst. Geitl.) из расчета 2 мг Se/кг рациона. На 29 день с утра после введения указанных добавок крыс лишали пищи и внутривенно вводили разрешающую дозу 1,25 мг ОА в 0,5 мл изотонического раствора NaCl. После этого крысам 2-ой – 4-ой групп вводили внутривентриально в том же растворе по 500 мкл индикатора кишечной проницаемости - полиэтиленгликоля 4000 (ПЭГ-4000) - и помещали в обменные клетки для сбора мочи. Через 18 часов крыс подвергали декапитации. Кровь в присутствии гепарина центрифугировали при 2500 об/мин в течение 15 минут, плазму отделяли, эритроциты разбавляли дистиллированной водой 1:1. Тонкую кишку удаляли, промывали 0,15 М раствором NaCl и хранили так же как образцы плазмы, эритроцитов и мочи при -4° С до начала анализа.

Содержание селена в препарате спирулины, сыворотке крови, эритроцитах, моче и стенках кишечника определяли микро-флуориметрическим методом [4]. Контроль за качеством анализа осуществляли путем использования в каждой серии определений соответствующих референс-стандартов: препарата селен-обогащенных дрожжей "Селена" (А/О Алко, Финляндия), лиофилизированных сывороток крови N 23- КТ (Nippan, Осло), бычьей крови (С) (Национальный институт здравоохранения, Хельсинки), мочи Seronorm 108 (Nuscomed, Осло) и мышц (сельскохозяйственный центр Финляндии) с содержанием селена соответственно 450 мкг/кг, 72 мкг/л, 97 мкг/л, 50 мкг/л и 394 мкг/кг. Результаты определений хорошо соответствовали регламентированным значениям. Разделение белков сыворотки крови крыс осуществляли на колонке с сефадексом CM-50 (1,5x30 см), используя в качестве элюента 0,1 М Трис-буфер с pH 6,7.

В работе использовалась селен-обогащенная спирулина [5] с общим содержанием селена 727 мг/кг.

Статистический анализ полученных результатов проводился на ЭВМ типа РС-АТ-486 с использованием пакета программ Winstat согласно двустороннему t-критерию Стьюдента.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** Результаты исследования, представленные в таблице, свидетельствуют о значительных изменениях в гомеостазе селена у крыс в результате анафилактического шока. В первую очередь обращает на себя внимание резкое увеличение величины экскреции селена с мочой за 18 часов после разрешения, превышающей значение, характерное для контрольных животных, более чем в 3 раза ( $P < 0,0001$ ). Гораздо слабее выражено влияние анафилактического шока на концентрацию микроэлемента в плазме и эритроцитах. Снижение уровня селена в плазме животных 2-ой группы на 11 % по сравнению с соответствующей величиной в контроле (группа 1,  $P < 0,001$ ) сопровождалось возрастанием концентрации микроэлемента в эритроцитах на 5,7 % ( $P < 0,01$ ). Наиболее четко эти изменения проявляются в уменьшении соотношения Se плазмы/Se эритроцитов. Как видно из данных таблицы, содержание селена в стенках кишечника не различалось для контрольных и сенсibilизированных крыс.

*Таблица.* Показатели селенового статуса сенсibilизированных и несенсibilизированных крыс на фоне приема биологически активных добавок.

N группы	Se плазмы, мкг/л	Se эритроцитов мкг/л	Se плазмы/Se эритроц.	Se стенки кишки мкг/кг	Se мочи	
					нМ/18 час	нМ Se/мМ креатинина
I	430,9±21,3	458,7 ± 19,2	0,939	256,8 ± 22,5	1,72±0,38	0,043±0,006
II	383,5±26,5	484,9± 23,3	0,791	260,9 ± 39,3	6,36±1,18	0,115±0,029
III	226,4±10,9	445,5± 40,4	0,491	338,6 ± 41,0	-	-
IV	301,9±14,9	541,4± 94,2	0,558	289,2 ± 42,9	-	-
P(I-II)	<0,001	<0,01	-	-	<0,0001	<0,0001
(II-III)	<0,001	<0,1	-	<0,01	-	-
(II-IV)	<0,001	<0,1	-	-	-	-
(III-IV)	<0,001	<0,05	-	<0,05	-	-

- I- контрольная группа животных
- II- сенсibilизированные животные
- III- сенсibilизированные животные, получавшие ГЛ-Н.
- IV- сенсibilизированные животные, получавшие ГЛ-Н и селен-обогащенную спинулину

Среди использованных биологически активных добавок ГЛ-Н не влиял на кишечную проницаемость сенсibilизированных животных в отношении макромолекул ПЭГ-4000 [2] и приводил к снижению уровня селена в плазме крови и уменьшению величины соотношения Se плазмы/Se эритроцитов в 1,6 раза. Уменьшение концентрации селена в плазме крови в 1,7 раза по сравнению с животными, не получавшими БАД, (животные 3 и 2 групп,  $P < 0,001$ ), сопровождалось возрастанием содержания микроэлемента в стенках кишки в 1,3 раза ( $P < 0,01$ ). Коэффициент корреляции между этими показателями составил -0,720 ( $P < 0,001$ ). Комплексная БАД: ГЛ-Н + селен-обогащенная спинулина-

частично нормализовала кишечную проницаемость сенсibilизированных крыс и достоверно снижала уровень специфических антител к ОВА [2]. При этом концентрация селена в эритроцитах увеличивалась на 21,5 % ( $P < 0,05$ ) по сравнению с сенсibilизированными животными, получавшими только ГЛ-Н, а содержание микроэлемента в плазме крови возрастало на 33,3 % ( $P < 0,001$ ).

Среди полученных данных наиболее значительным представляется факт многократного возрастания экскреции селена с мочой в результате анафилактического шока. Сенсibilизированные животные по сравнению с контрольными характеризовались также повышенным уровнем в моче креатинина, однако, даже в пересчете на последний, экскреция селена у них была существенно выше ( $P < 0,0001$ ). Можно предположить, что в условиях окислительного стресса, вызванного развитием анафилактической реакции, антиоксидантная система организма работает с большим напряжением, что выражается в значительном ускорении процессов катаболизма селенсодержащих белков и обуславливает, следовательно, необходимость повышенного потребления этого микроэлемента с пищей. Сравнение величины экскреции селена с мочой с общим селеновым пулом крови свидетельствует о том, что столь значительные потери селена должны уменьшать содержание селена в крови в среднем на 30 %. На самом деле изменения концентрации этого микроэлемента в плазме и эритроцитах при сенсibilизации гораздо ниже (см. выше), что свидетельствует о существовании иного источника селена. Поскольку биосинтез метаболитов селена, обнаруженных в моче, осуществляется в печени [5], представляется вероятным участие этого органа в процессе повышения экскреции этого микроэлемента. Другим возможным источником являются почки, причем в этом случае кровоток не участвует в переносе микроэлемента. Несомненно, однако, что окончательный вывод требует дополнительных исследований.

Результаты проведенных экспериментов [2] не подтвердили ранее высказанное предположение о возможности нормализации кишечной проницаемости при анафилактическом шоке за счет приема ГЛ-Н [6]. Тем не менее, влияние ГЛ-Н на селеновый статус сенсibilизированных крыс оказалось неожиданным и представляло самостоятельный интерес. Данные, представленные в таблице, а также высокий отрицательный коэффициент корреляции между содержанием селена в сыворотке крови и стенках кишки для животных 2 и 3 групп (см. выше) свидетельствуют о том, что ГЛ-Н может выступать в роли модулятора межорганного распределения селена. В связи с этим логично предположить возможность использования ГЛ-Н в случаях необходимости создания локального увеличения концентрации микроэлемента (например, кожные, онкологические заболевания). Можно предположить, что рассматриваемое действие ГЛ-Н опосредуется участием селен переносящего белка Р плазмы крови в перераспределении селена внутри организма. Для проверки этого предположения нами было проведено хроматографическое разделение селенсодержащих белков плазмы крови животных 2-ой-4-ой групп. Задача облегчалась известным для организма крыс фактом легкости хроматографического разделения белков плазмы, элюирующихся с хроматографической колонки в виде трех пиков: селен переносящего белка Р и селен зависимой глутатион-пероксидазы, проявляющейся на хроматограмме в виде двух сигналов одинаковой интенсивности [7]. Как следует из данных, представленных на рис., введение сенсibilизированному животному ГЛ-Н

снижало содержание селен переносящего белка в плазме, а селен обогащенная спирулина в этом отношении имела противоположный эффект, восстанавливая содержание селен переносящего белка Р (см.рис.). При этом в сравнении с группой 2 наблюдалось изменение в изоэнзимном составе последней, причины чего заслуживают отдельного исследования.

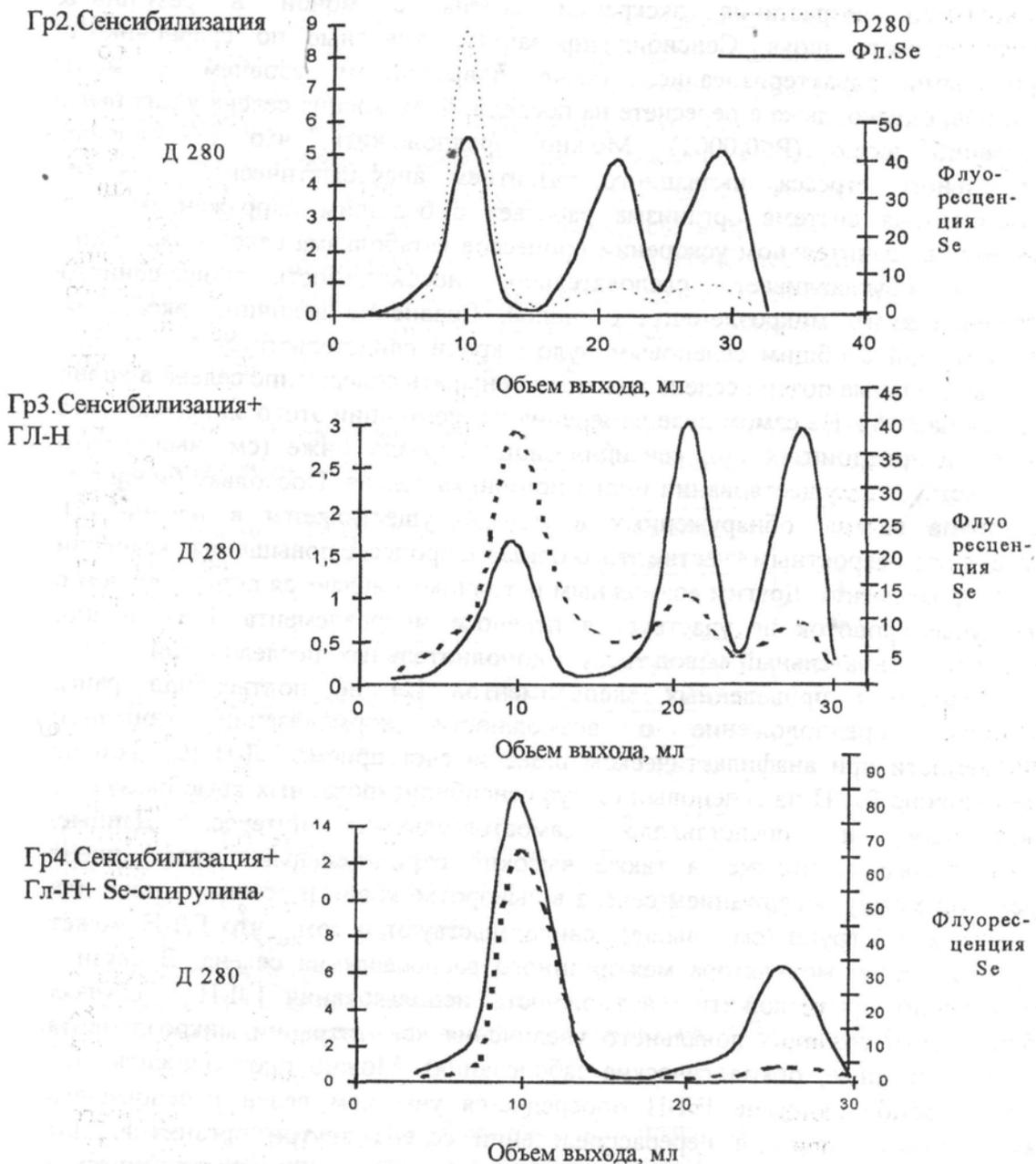


Рисунок  
Хроматографическое разделение белков сыворотки крови

Как видно из таблицы, комплексная БАД обеспечивала также нормализацию содержания селена в стенках тонкой кишки и плазме крови. Последнее хорошо видно из сравнения соотношения Se плазмы/Se стенки кишки для животных 2, 3 и 4 групп: 1,47:1 (сенсibilизированные животные), 0,67:1

(крысы, получавшие ГЛ-Н), 1,04:1 (животные, получавшие, помимо ГЛ-Н, также селенобогатенную спирулину).

Таким образом, проведенное исследование позволило установить многократное увеличение экскреции селена с мочой в результате анафилактического шока, выявило роль местного акцептора селена для ГЛ-Н и показало возможность эффективного регулирования гомеостаза селена в организме сенсibilизированных животных при использовании БАД.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Behne D.* (1994) *Ann.Nestle.* **52**, 107-117.
2. *Мазо В.К., Гмошинский И.В., Тамбиев А.Х., Кирикова Н.Н., Голубкина Н.А.* (1997) *Биотехнология*, **9-10**, 45-48.
3. *Ермекина Р.А., Гмошинский И.В., Мазо В.К.* (1994) *Вопр.питания.* **4**, 17-20.
4. *Alfthan G.* (1984) *Anal.Chim.Acta.*, **165**, 187-194.
5. *Burk R.F., Brown D.G., Seely R.J., Scaief C.C.* (1972) *J. Nutr.* **102**, 1049-1055.
6. *Seaduto R.C.* (1990) *Glutathione : metabolism and physiological functions.*- Boca Raton et al: CRC Press. 228-235.
7. *Motsenbocker M.A., Tappel A.J.* (1982) *Biochim. Biophys. Acta.*, **719**, 147.

Поступила 20.02.98.

### THE SELENIUM HAEMOSTASIS IN RATS DURING ANAPHYLAXIS EVENT: EFFECT OF REDUCED GLUTATHIONE AND SELENIUM ENRICHED SPIRULINA

GOLYBKINA N.A., MAZO V.K., GMOSHINSKI I.V., ZORIN S.N., TAMBIEV A.H.\*,  
KIRIKOVA N.N.\*

Institute of Nutrition, RAMS, Moscow,  
\*Moscow State University

The main events caused by anaphylaxis in selenium haemostasis in rats include significant increase of selenium excretion with urine ( $6,36 \pm 1,18$  nM Se/18 h.,  $n=10$ ), compared with  $1,72 \pm 0,38$  nM Se/18 h.,  $n=10$ ) and decrease of selenium plasma/selenium erythrocytes ratio from 0,939 to 0,791. Reduced glutathione (G-SH) administration led to 1,5-fold decrease of plasma selenium level and 1,3-fold increase of selenium concentration in intestinal walls of sensitised rats ( $r=-0,720$ ,  $P<0,001$ ). Chromatographic separation of plasma proteins showed that intragastric intubation of G-SH to sensibilised rats significantly decreased the protein P content and did not influence the concentration of Se-GSHPx, thus indicating the local selenium acceptor role of G-SH. G-SH administration did not influence the intestinal permeability in sensitised rats while use of complex additive: G-SH and selenium enriched spirulina – normalised the latter parameter and the ratio of protein P/Se-GSHPx in plasma.

Key words: seleniym, anaphylactic shock, reduced glutathione, spirulina.