

УДК 66.094.38: 66.094.3: 547.466  
© Коллектив авторов

## ИССЛЕДОВАНИЕ СИСТЕМЫ АНТИОКИСЛИТЕЛЬНОЙ ЗАЩИТЫ В УСЛОВИЯХ АЛИМЕНТАРНО ИНДУЦИРОВАННОГО ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА

*Ю.В.Кравченко, Г.Ю.Мальцев, А.В.Васильев*

ГУ НИИ Питания РАМН  
109240 Москва, Устьинский проезд, 2/14  
тел.: 113-15-92; факс: 113-07-09; e-mail: andrvalv@mtu-net.ru

С целью создания алиментарно индуцированного окислительного стресса крысам-самцам породы Вистар 8-недельного возраста (период полового созревания) проводили нагрузку метионином в условиях дефицита пиридоксина и фолиевой кислоты (первая опытная группа), крысам второй опытной группы при тех же условиях вводили БАД "Селенес" (комплексный антиоксидант, содержащий витамины Е, С и органический селен), контролем служили животные, получавшие стандартный полусинтетический рацион. В плазме, эритроцитах, гомогенатах соскобов слизистой тонкого кишечника, печени, миокарда, аорты определяли содержание продуктов перекисного окисления и активность ферментов антиокислительной защиты. По сравнению с контролем в первой опытной группе достоверно увеличивалось содержание диеновых конъюгатов в кишечнике (на 8%) и печени (на 39%), малонового диальдегида в печени (на 16%) и кишечнике (на 34%), а в эритроцитах достоверно понижалась активность супероксиддисмутазы (на 25%) и каталазы (на 48%). В кишечнике активность глутатионредуктазы достоверно увеличивалась на 74%. Активность глутатионпероксидазы по сравнению с контролем достоверно снижалась в кишечнике на 46%, печени на 18%, миокарде на 18%, эндотелии аорты на 29%. Введение животным второй опытной группы БАД "Селенес" уменьшало проявления окислительного стресса, что выражалось в снижении количества малонового диальдегида по сравнению с контролем и первой опытной группой, но повышало содержание диеновых конъюгатов во всех исследуемых тканях. Активность ферментов при введении в рацион "Селенес" изменялась неоднозначно: активность супероксиддисмутазы и каталазы повышалась, а глутатионредуктазы и глутатионпероксидазы снижалась.

**Ключевые слова:** антиоксиданты, алиментарно индуцированный окислительный стресс, гомоцистеин

**ВВЕДЕНИЕ.** В развитии окислительного стресса большую роль играет не только активизация процессов свободнорадикального окисления, но и состояние многоуровневой системы антиокислительной защиты - наличие внутри- и внеклеточных низкомолекулярных антиоксидантов, активности ферментов - супероксиддисмутазы, каталазы, глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы, а также обеспеченность экзогенными антиоксидантами. Разнообразные соединения, поступающие извне или образующиеся в процессе метаболизма, обладают высокой активностью и способностью не только провоцировать свободнорадикальные процессы, но также воздействовать на систему антиокислительной защиты, приводя к инаktivации ее компонентов. Одним из

#### АНТИОКСИДАНТЫ ПРИ АЛИМЕНТАРНОМ ОКИСЛИТЕЛЬНОМ СТРЕССЕ

приоритетных среди подобных метаболитов является гомоцистеин - промежуточный продукт биосинтеза цистеина. Гомоцистеин обладает прооксидантной активностью за счет наличия высокореактивной сульфгидрильной группы. Установлено [1,2], что в присутствии кислорода и металлов переходной валентности гомоцистеин быстро окисляется с образованием супероксид-анион-радикала и пероксида водорода, которые активируют процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ). Превышение физиологических концентраций гомоцистеина приводит к образованию его дисульфидов с активными тиоловыми группами ферментов и низкомолекулярными тиолами [3]. Участие свободных радикалов в развитии патологического действия высокого уровня гомоцистеина подтверждено также эффективностью антиоксидантов - аскорбиновой кислоты и витамина Е [4,5].

Активность основных ферментов утилизации гомоцистеина зависит от наличия пиридоксаль-5-фосфата, N-5-метилтетрагидрофолата, кобаламина и бетаина. Кроме того, лимитирующим фактором образования повышенного количества гомоцистеина является обеспеченность организма метионином. Очевидно, что выяснение механизмов развития окислительного стресса при алиментарной нагрузке метионином в условиях дефицита кофакторов и поиск способов коррекции этого состояния являются актуальными в плане профилактики сердечно-сосудистых заболеваний у детей и взрослых как с алиментарными, так и с наследственными формами гипергомоцистеинемии.

В настоящее время для коррекции окислительного стресса применяются различные антиоксидантные комплексы, в том числе биологически активные добавки (БАД), в состав которых входят органические соединения селена. Одно из таких соединений - селенопиран - жирорастворимый 9-фенилсимметричный октагидроселеноксантен, в котором атом селена включен в гетероцикл. Благодаря своему строению, селенопиран не только является донором селена, но также проявляет антиоксидантные свойства *in vitro* и *in vivo* [6].

Цель работы - исследовать состояние системы антиокислительной защиты у животных в период полового созревания при окислительном стрессе, индуцированном алиментарной нагрузкой метионином как лимитирующим фактором образования гомоцистеина, и оценить эффективность антиоксидантного комплекса "Селенес".

**МЕТОДИКА.** Эксперимент выполнен на белых крысах-самцах породы Вистар в возрасте полового созревания ( $60 \pm 4$  дней). Масса животных в начале эксперимента составляла 189-215 г. Использовали модель на основе полусинтетического рациона [7], с введением повышенного количества метионина и дефицитом витамина В<sub>6</sub> и фолиевой кислоты. Животные были разделены на 3 однородные группы - контроль (I) (получали стандартный полусинтетический рацион); первая опытная группа (II) - алиментарная нагрузка метионином; вторая опытная группа (III) - алиментарная нагрузка метионином с введением комплекса "Селенес" в дозе 5,5 мкг органического селена, 1,35 мг витамина Е, 37 мг витамина С на 100 г веса животных в сутки. Селен в добавке находится в форме селенопирана. Длительность эксперимента составила 14 дней, после чего животных декапитировали.

В плазме, эритроцитах, гомогенатах печени, слизистой тонкого кишечника, миокарда и аорты определяли интенсивность процессов перекисного окисления липидов и активность ферментов антиоксидантной защиты.

Содержание диеновых конъюгатов (ДК) в плазме крови оценивали методом Placer (1968) в модификации Гаврилова и соавт. [8]. ДК в эритроцитах крови, гомогенатах тканей определяли методом Placer (1968) в модификации Владимиров и соавт. [9] и Гаврилова и соавт. [8], малонового диальдегида (МДА) в плазме и гомогенатах тканей - методом Michara и соавт. [10], МДА в эритроцитах - методом Ernster и соавт. [11]. В гемолизатах эритроцитов и гомогенатах тканей определяли активность глутатионредуктазы (ГР) и глутатионпероксидазы (ГПО)

соответственно методами Tilbotson (1971) и Mille (1959) в модификации Мальцева и соавт. [12], супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы - соответственно методами Niashikimi (1972) и Oshino (1973) в модификации Мальцева и Васильева [13], адаптированными для анализатора открытого типа ФП-901 фирмы "Labsystems".

Статистическую достоверность полученных отличий значений определяли с помощью двустороннего t-теста Стьюдента; отличия считали достоверными при  $p < 0,05$ .

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** Анализ полученных результатов позволяет считать, что наиболее высокий уровень процессов ПОЛ выявлен у животных группы II в клетках печени и слизистой кишечника (табл. 1) - концентрация ДК и МДА в печени достоверно превышала контрольные показатели на 41% и 16%, а в кишечнике - на 8% и 34% соответственно. В других тканях достоверных изменений в концентрации продуктов ПОЛ не обнаружено. Концентрация продуктов ПОЛ у животных группы III изменялась неоднозначно: увеличивалось содержание ДК в печени на 51%, в кишечнике на 19% и в плазме на 42% по сравнению с контролем. Однако, во всех тканях отмечалось снижение содержания МДА - в кишечнике до контрольного уровня, а в эритроцитах, плазме, печени, миокарде и аорте - достоверно ниже контрольных параметров. Можно предположить, что компоненты "Селенес" прерывали процесс ПОЛ на уровне образования липоперекисей или малонового диальдегида, что объясняется наличием в композиции жирорастворимых антиоксидантов -  $\alpha$ -токоферола и селенопирана.

Таблица 1. Содержание диеновых конъюгатов и малонового диальдегида в тканях

	группа I (n=10)	группа II (n=12)	группа III (n=11)
содержание диеновых конъюгатов, нмоль/гр			
плазма	2,29±0,200	2,55±0,150	3,26±0,150 <sup>II-III*</sup>
эритроциты	2,08±0,210	1,75±0,230	1,61±0,170
печень	70,8±3,86	98,4±3,46 <sup>I-II</sup>	107±2,58 <sup>I-III</sup>
кишечник	124±2,59	134 ±3,40 <sup>I-II</sup>	147±3,27 <sup>II-III, I-III</sup>
миокард	307±3,13	315±2,40	284±2,92 <sup>II-III</sup>
аорта	13,9±0,250	14,5±0,261	15,1±0,170
содержание малонового диальдегида, нмоль/гр			
плазма	4,08±0,240	3,60±0,230	2,15 ±0,150 <sup>II-III, I-III</sup>
эритроциты	5,05±0,220	4,33±0,210 <sup>I-II</sup>	3,92 ±0,140 <sup>I-III</sup>
печень	174±10,6	201±9,97	124 ±7,92 <sup>II-III, I-III</sup>
кишечник	122±3,92	164 ±3,89 <sup>I-II</sup>	122 ±4,10 <sup>II-III</sup>
миокард	253±6,68	240±5,30	226 ±5,09 <sup>II-III</sup>
аорта	5,59±0,310	4,23 ±0,380 <sup>I-II</sup>	3,48 ±0,300 <sup>I-III, II-III</sup>

Примечание: \* различия между указанными группами достоверны при  $p < 0,05$ .

Исследование ферментного звена антиокислительной защиты свидетельствует о разнонаправленном, и, по-видимому, тканеспецифическом изменении активности ферментов данной группы.

Активность супероксиддисмутазы (СОД) у животных группы II в наибольшей степени снижалась в эритроцитах (на 25% по сравнению с контролем), а в других органах имелась только лишь тенденция к понижению (рис.1). При изучении патологического действия гомоцистеина на изолированной аорте кроликов Lang et al. [14] обнаружили резкое повышение активности СОД в эндотелиальных клетках через 72 часа после начала инкубации, и это коррелировало с повышенным образованием супероксид-анион-радикала кислорода. При хроническом воздействии, напротив, было отмечено снижение активности Cu-Zn-супероксиддисмутазы в гомогенатах печени [15]. В наших исследованиях снижение активности СОД, возможно, связано с инактивацией фермента либо самим гомоцистеином при образовании смешанных дисульфидов [3], либо высокореактивным метаболитом гомоцистеина тиолактоном [16],

## АНТИОКСИДАНТЫ ПРИ АЛИМЕНТАРНОМ ОКИСЛИТЕЛЬНОМ СТРЕССЕ

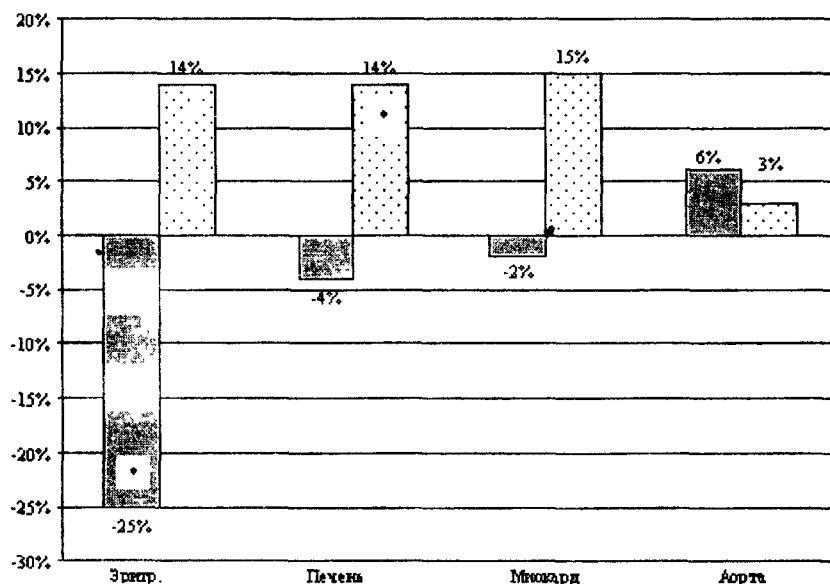


Рисунок 1.

Изменение активности супероксиддисмутазы (в % отклонения от контроля; \* различия между контрольной и опытной группами достоверны при  $p < 0.05$ )

который образуется в клетках из гомоцистеинил-аденилата и представляет собой высокоэнергетическое циклическое соединение, химически очень активное и способное к ацилированию свободных боковых аминогрупп аминокислот [16,17] с последующей денатурацией и активным внутрилизосомальным протеолизом. Введение "Селенес" (группа III) повышало активность супероксиддисмутазы в эритроцитах, печени и миокарде на 14-15% от уровня контрольной группы, что, возможно, связано с предотвращением процессов инактивации фермента. Кроме того, ранее было показано [18], что селенопиран, входящий в состав "Селенес", метаболизируется, подобно всем жирорастворимым ксенобиотикам, через систему микросомального окисления, что должно приводить к повышенному образованию супероксид-анион-радикала кислорода, и, соответственно, к повышению активности СОД в клетках.

Активность каталазы в эритроцитах достоверно снижалась в группе II более чем на 40% от контроля, а применение "Селенес" удерживало активность каталазы эритроцитов на контрольном уровне. Возможно, что и в этом случае действовали ранее описанные механизмы, сходные с СОД.

Активность ГР у животных группы II возрастала в клетках слизистой тонкого кишечника на 74% по сравнению с контролем, что является отражением интенсивности свободнорадикальных процессов с участием кислорода и согласуется с данными Welch et al. [19] о повышении уровня окисленного глутатиона при подобном воздействии (рис.2). У животных группы III активность ГР по сравнению с группой II достоверно снижалась в кишечнике, в печени и аорте (рис. 2). Не исключено, что это происходило за счет наличия в составе "Селенес" аскорбиновой кислоты, которая способна восстанавливать окисленный глутатион [20] и опосредованно регулировать интенсивность синтеза фермента *de novo*.

У животных группы II во всех исследуемых тканях, кроме эритроцитов, достоверно снижалась активность ключевого фермента антиоксидантной защиты - глутатионпероксидазы (ГПО) (рис.3). Ранее было выявлено [3,19,21], что повышение уровня гомоцистеина провоцирует угнетение экспрессии ГПО-1 (клеточного типа) *in vitro* в культуре эндотелиальных клеток. Это было также показано *in vivo* в клетках печени крыс при алиментарной гипергомоцистеинемии

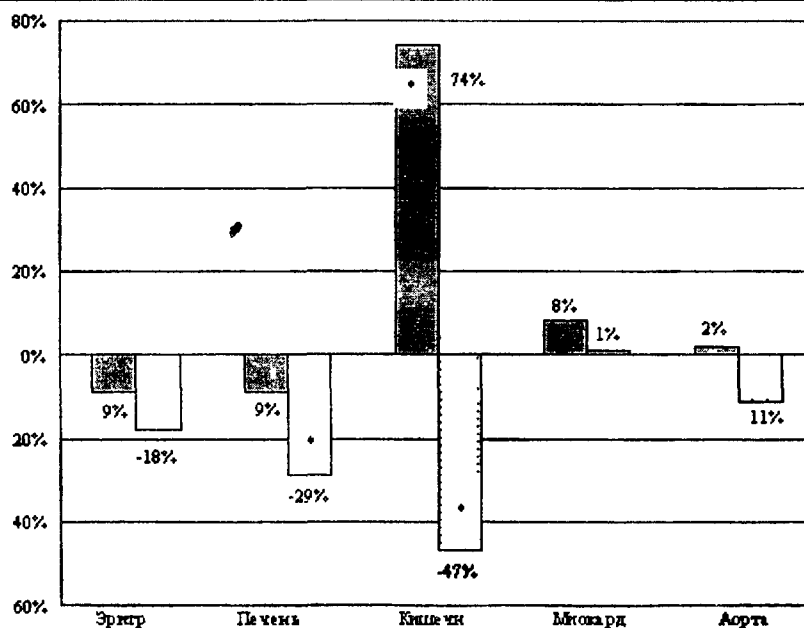


Рисунок 2

Изменение активности глутатионредуктазы (в % отклонения от контроля, \* различия между контрольной и опытной группами достоверны при  $p < 0,05$ )

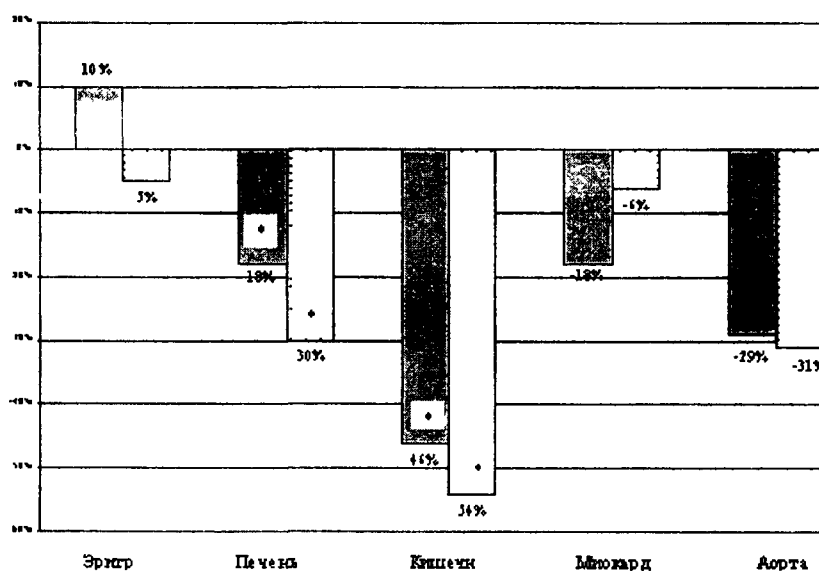


Рисунок 3

Изменение активности глутатионпероксидазы (в % отклонения от контроля, \* различия между контрольной и опытной группами достоверны при  $p < 0,05$ )

[22] и в клетках печени мышей при наследственном дефиците цистатионин-β-синтетазы [23]. Вероятно, следствием снижения активности ГПО является обнаруженное в клетках кишечника и печени высокое содержание продуктов ПОЛ. Введение "Селенес" достоверно снижало активность ГПО в клетках печени на 12% и кишечника (на 7%), а также в эритроцитах на 15% по сравнению с группой II. Ранее было показано [24], что у ягнят при введении селенопирана активность

#### АНТИОКСИДАНТЫ ПРИ АЛИМЕНТАРНОМ ОКИСЛИТЕЛЬНОМ СТРЕССЕ

ГПО в эритроцитах повышалась только на 36 день после введения, из чего заключили, что рециклизация молекулы селенопирана, высвобождение селена из гетероцикла и включение его в реакции метаболизма происходит в достаточно длительные сроки. Этим можно объяснить отсутствие эффекта от введения "Селенес", но не дополнительное снижение активности ГПО.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Таким образом, результаты, полученные при использовании предложенной экспериментальной модели, позволяют полагать, что окислительный стресс модулируется, в первую очередь, снижением активности ферментов антиокислительной защиты, и в наибольшей степени проявляется в органах, функционально адекватных алиментарным воздействиям. Алиментарная коррекция экспериментального окислительного стресса введением комплекса "Селенес" в итоге приводит к снижению концентрации конечных продуктов ПОЛ и повышению антиоксидантного потенциала клеток как за счет прямого антиоксидантного действия компонентов, так и за счет повышения активности СОД и каталазы.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Misra H. (1974) J.Biol.Chem., **249**, 2151-2155
2. Jacobsen D., Troxell L., Brown K. (1984) Biochemistry, **23**, 2017-2025
3. Sengupta S., Chen H., Togawa T., DiBello P., Majors A., Budy B., Ketterer M., Jacobsen D. (2001) J.Biol.Chem., **276**, 30111-30117
4. Chambers J., McGregor A., Jean-Marie J., Obeid O., Kooner J. (1999) Circulation., **99**, 1156-1160
5. Nappo F., De Rosa N., Marfella R., De Lucia D., Ingrosso D., Perna A., Farzati B., Giugliano D. (1999) JAMA, **281**, 2113-2118
6. Боряев Г.И. (2000) Биохимический и иммунологический статус молодняка с/х животных и птицы и его коррекция препаратами селена. Автореф. дисс.д.б.н, Москва
7. Mori N., Hirayama K. (2000) J. Nutr., **130**, 2349-2355
8. Гаврилов В.Б., Мишкорудная М.И. (1983) Лаб. дело, № 3, 33-35.
9. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. (1972) Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М.: Наука.
10. Michara M., Uchiyama M. (1980) Biochem. Med., **23**, 302-311
11. Ernster L., Nordenbrandt K. (1967) Methods Enzymol., **10**, 575
12. Мальцев Г.Ю., Орлова Л.А. (1994) Вопр. мед. химии, № 2, 59-61
13. Мальцев Г.Ю., Васильев А.В. (1994) Вопр. мед. химии, № 2, 56-58
14. Lang D., Kredan M., Moat S., Hussain S., Powell C., Bellamy M., Powers H., Lewis M. (2000) Arterioscl. Thromb. Vasc.Biol., **20**, 422-431
15. Huang R., Hsu Y., Lin H., Yang F. (2001) J. Nutrition., **131**, 33-38
16. Jacubowski H., Zhang L., Bardegues A., Aviv A. (2000) Circ.Res., **87**, 45-56
17. Davies M., Fu S., Wang H., Dean R. (1999) Free.Radic.Biol.Med., **27**, 1151-1163.
18. Боряев Г.И., Галочкин В.А., Блинохватов А.Ф. (1990) Бюлл.ВНИИФБиП с.-х. животных, **3**, 70-73.
19. Welch G., Upchurch, G., Keaney J., Loscalzo J. (1996) J. Am. Coll. Cardiol., **27**, 164-171
20. Frei B., Stocker R., England L., Ames B. (1990) Adv. Exp. Med. Biol., **264**, 155-163

21. Outinen P., Sood S., Pfeifer S., Pamidi S., Podor T., Li J., Weitz J., Austin R. (1999) *Blood*, **94**, 959-967
22. Weiss N., Zhang Y., Heydrick S., Bierl C., Loscalzo J. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 12503-12508
23. Huang R., Hsu Y., Lin H., Yang F. (2001) *J.Nutr.*, **131**, 33-38
24. Boryaev G., Blinokhvatov A. (1998) *Pathophysiology*, **5**, 148.

Поступила 01.10.2003.

#### RESEARCH OF ANTIOXIDANT DEFENCE SYSTEM UNDER ALIMENTARY INDUCED OXIDATIVE STRESS

*J.V.Kravchenko, G.J.Maltzev, A.V.Vasiliev*

Institute of Nutrition Russian Academy of Medical Sciences  
2/14 Ustinskiy proezd, Moscow, 109240 Russia  
tel.: 113-15-92; fax: 113-07-09; e-mail: andrvalv@mtu-net.ru

Alimentary induced oxidative stress and its corrections in children and adults with homocysteine metabolism disorder are urgent problems for arteriosclerosis and cardiovascular disease prophylactics. For determination antioxidant status GSH-Px, SOD, GSH-reductase, catalase activities were detected. Effectiveness of Se-contained antioxidant complex "Selenec" was determined in experimental model with pubertal male Wistar rats. Including high value of methionine to semipurified diet with pyridoxine and folate deficiency induced oxidative stress. Lipid peroxidation substances were increased in blood, liver, intestine mucous tunic, aortal endothelium and myocardium. GSH-Px, SOD, GSH-reductase, catalase activities decreased significant compared to control. "Selenec" supplementation caused a decrease of thiobarbituric-reactive substances level, increasing SOD and catalase activity and decreasing GSH-Px and GSH-reductase activity in blood, liver, intestine mucous tunic, aorta and myocardium.

**Key words:** antioxidants, alimentary-induced oxidative stress, homocysteine