

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 577.16:591.133.1

©Коллектив авторов

ЭФФЕКТЫ ОРГАНИЧЕСКОЙ СУБСТАНЦИИ СЕЛЕНА – СЕЛЕНОМЕТИОНИНА ПРИ ОСТРОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

Н.Э. Петушок^{1}, Ю.А. Тарасов², Т.А. Пеховская², И.Н. Евкович²,
А.А. Шевалье², С.С. Чумаченко²*

¹Гродненский государственный медицинский университет, ул. Горького, 80,
Гродно, 230015 Беларусь; тел.: +375 0152 435559; эл. почта: pena-n@tut.by

²Институт фармакологии и биохимии НАН Беларуси, Гродно, Беларусь

Представлены результаты исследования влияния предварительного насыщения организма крыс селенометионином (50 мкг/кг, внутривентрикулярно, ежедневно, 10 суток) перед острой алкогольной интоксикацией (5 г/кг, 25% раствор этанола, интрагастрально, однократно на 11 день с экспозицией – 2 часа). Изучена активность глутатионпероксидазы (слизистая отделов желудочно-кишечного тракта, плазма крови, эритроциты, печень); уровень окисленного и восстановленного глутатиона; интенсивность ПОЛ; уровень кортикостерона в крови.

Ключевые слова: селенометионин, этанол, глутатионпероксидазы, глутатион, желудочно-кишечный тракт, кортикостерон.

ВВЕДЕНИЕ. Изучение этиологии и механизмов возникновения некоторых заболеваний желудочно-кишечного тракта дало ряд бесспорных доказательств участия свободно-радикальных процессов в их развитии. Установлено, что активные формы кислорода вызывают повреждения мембран слизистой оболочки желудка при хронических воспалительных процессах, гастрите, вызванном *Helicobacter pylori*, воздействии паразитарных факторов и нестероидных противовоспалительных лекарственных препаратов [1]. В настоящее время считается общепризнанным, что глутатионпероксидаза играет ключевую роль в защите желудочно-кишечного тракта от негативного воздействия продуктов перекисного окисления. В свою очередь, биосинтез глутатионпероксидазы находится в зависимости от обеспеченности организма селеном. Так, установлено, что при экспериментальном ограничении доступности микроэлемента происходит снижение активности фермента [2].

Для коррекции селенодефицитных состояний и увеличения потенциала антиоксидантной системы организма до настоящего времени используются препараты неорганического селена (селенит, селенат). Названные субстанции обладают чрезвычайно высокой токсичностью, что ограничивает возможности их широкого профилактического применения. Исследования свидетельствуют о формировании в организме млекопитающих своеобразного депо селена – селеноаминокислот, представляющих собой в основном селенометионин и селеноцистеин. Первое из этих веществ обладает высокой биодоступностью, достаточно эффективно трансформируется в селенол и далее в селеноцистеин, делая возможным индукцию синтеза нескольких селеноцистеинсодержащих белков, таких как глутатионпероксидаза, селенопротеин Р и других. Это обстоятельство привело к появлению фармацевтических и биоактивных (БАД) субстанций селена и в их числе селенометионина [3].

* - адресат для переписки

ЭФФЕКТ СЕЛЕНОМЕТИОНИНА ПРИ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

Исследование биологической и протекторной активности органических субстанций селена имеет перед собой практическую цель, одна из задач которой состоит в выявлении модуляторных возможностей селенометионина во влиянии на активность глутатионпероксидаз, систему глутатиона и глюкокортикоидный статус животных, при его использовании для предупреждения окислительного стресса, в том числе проявляющегося при острой алкогольной интоксикации.

МЕТОДИКА. В опытах на половозрелых белых крысах-самках линии Вистар CRL:(WI)WUBR проведено тестирование эффективности применения селенометионина для коррекции нарушений возникающих в организме крыс при окислительном стрессе, вызванном острой алкогольной интоксикацией. В течение эксперимента, который проводился на 4 группах животных, крысы получали обычный рацион вивария *ad libitum*. Животным третьей и четвертой групп в течение 10 суток интрагастрально, с помощью металлического зонда, вводили раствор селенометионина из расчета 50 мкг селена на 1 кг массы тела в день. Одновременно крысы первой (контроль на зондирование) и второй групп вместо препарата в течение этого времени внутрижелудочно получали дистиллированную воду. В конце эксперимента на 11-е сутки крысам второй и четвертой групп на 2 часа интрагастрально ввели 25% раствор этанола в дозе 5 г на 1 кг массы тела, особям же первой и второй групп изообъемное количество воды. Опыты проводили с учетом требований, установленных “Правилами проведения научных исследований с использованием экспериментальных животных”, утвержденных Президиумом АН СССР от 2 апреля 1980 г.

Активность глутатионпероксидаз в плазме крови, эритроцитах, печени, слизистой оболочке желудка, двенадцатиперстной, тонкой, толстой и прямой кишки измеряли с использованием субстратов пероксида водорода [4] и *терт*-бутилгидропероксида (*t*-BOOH) [5]. Содержание восстановленной и окисленной форм глутатиона определяли по методу Akerboom и Sies [6]. Интенсивность перекисного окисления липидов оценивалась по накоплению продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБ-РП) [7].

Концентрацию кортикостерона в плазме крови определяли, используя метод высокоэффективной жидкостной хроматографии, на микроколоночном хроматографе “Милихром” (Россия), колонка с “Silasorb-600LC” (“Lachema”, Чехия). В качестве подвижной фазы использовали смесь гексан:хлороформ:метанол (7:1:1) [8]. Концентрацию кортикостерона рассчитывали по калибровочному графику, для построения которого в качестве стандарта использовали кортикостерон фирмы “Sigma” (США).

Содержание белка определяли по методу Лоури.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с учетом *t*-критерия Стьюдента.

В эксперименте использовался селенометионин, субстанция которого предоставлена УП “Лигур” (г. Минск).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Развитие окислительного стресса у животных, в результате острой алкогольной интоксикации, подтвердилось достоверным повышением в плазме крови уровней тиобарбитурат-реагирующих продуктов (табл. 1) и кортикостерона (рисунок). Следует отметить, что в норме у интактных крыс концентрация кортикостерона в плазме крови находится в пределах 400–600 нМ [9], а высокий уровень кортикостерона в крови животных группы “контроль на зондирование”, со всей очевидностью, объясняется стрессорным воздействием самой процедуры введения металлического зонда [10]. Последующее внутрижелудочное введение этанола животным, на фоне 10-дневного зондирования с водой, привело к достоверному дополнительному подъёму уровня кортикостерона в крови. В свою очередь, предварительная селенизация крыс перед алкогольной интоксикацией ограничила рост концентрации кортикостерона в крови (–21,6%) животных, по сравнению с группой крыс не получавших предварительно селен (рисунок).

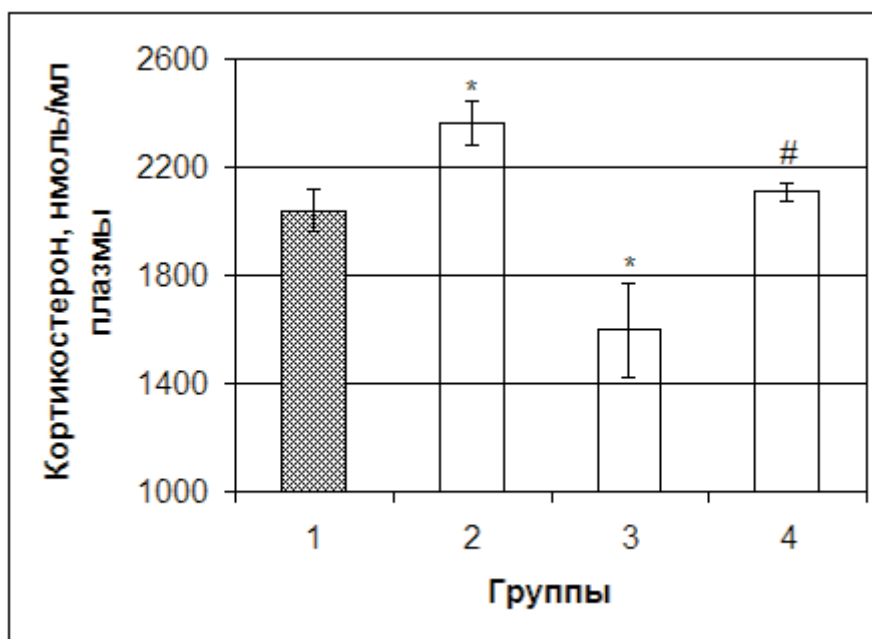


Рисунок.

Концентрация кортикостерона в плазме крови белых крыс, получавших в качестве протектора окислительного стресса селенометионин (SeMet). 1 - контроль на зондирование, 2 - зондирование с введением воды + этанол, 3 - зондирование с введением SeMet, 4 - зондирование с введением SeMet + этанол. *- достоверные изменения по сравнению с 1 группой, #- достоверные изменения по сравнению с 2 группой.

Таблица 1. Показатели (средняя \pm ошибка средней) восстановленного глутатиона (GSH) и активности глутатионпероксидаз (ГПО) в плазме крови и эритроцитах белых крыс, получавших в качестве протектора от окислительного стресса селенометионин (SeMet).

Показатель	Группы			
	Контроль на зондирование	Зондирование + этанол	Зондирование с SeMet	Зондирование с SeMet + этанол
GSH, мкмоль/мг белка плазмы	4,22 \pm 0,23	3,56 \pm 0,03*	3,42 \pm 0,16*	3,47 \pm 0,17
ГПО (H ₂ O ₂), нмоль GSH/мин/мл плазмы	1,62 \pm 0,11	1,57 \pm 0,18	2,19 \pm 0,16*	2,10 \pm 0,33 [#]
ГПО (t-BOOH), мкмоль GSH/ мин/ мл плазмы	2,3 \pm 0,2	1,8 \pm 0,2	6,1 \pm 0,6*	7,1 \pm 0,2 [#]
ТБ-РП, нмоль/мл плазмы	3,37 \pm 0,08	3,72 \pm 0,13*	3,40 \pm 0,13	3,56 \pm 0,2
GSH, мкМ/г Hb эритроцитов	3,27 \pm 0,16	2,64 \pm 0,13*	3,54 \pm 0,03	3,16 \pm 0,03 [#]
ГПО (H ₂ O ₂), нмоль GSH/ мин/г Hb	142,4 \pm 14,4	114,7 \pm 12,9	189,2 \pm 14,0*	209,0 \pm 24,6 [#]
ГПО (t-BOOH), мкмоль GSH/ мин/г Hb	299,0 \pm 32,6	293,2 \pm 30,3	679,6 \pm 55,3*	678,8 \pm 54,0 [#]

Примечание: здесь и в таблицах 2, 3, 4 - *- $p < 0,05$ по отношению к показателю группы "контроль на зондирование"; # - $p < 0,05$ по отношению к показателю группы "зондирование + этанол".

ЭФФЕКТ СЕЛЕНОМЕТИОНИНА ПРИ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

Таблица 2. Активность глутатионпероксидаз в слизистой оболочке желудка (I) и печени (II) белых крыс, получавших в качестве протектора от окислительного стресса селенометионин.

Показатель	Группы			
	Контроль на зондирование	Зондирование + этанол	Зондирование с SeMet	Зондирование с SeMet + этанол
I				
ГПО (H_2O_2), нмоль GSH/мин/г белка	493,3±27,3	230,0±12,3*	523,7±60,2	418,2±46,5 ^б
ГПО (t-BOOH), нмоль GSH/мин/г белка	217,3±14,2	233,1±8,7	450,8±14,7*	456,1±15,7 ^б
II				
ГПО (H_2O_2), нмоль GSH/мин/г белка печени	407,0±1713	363,7±7,8*	479,1±24,1*	527,0±13,4 ^б
ГПО (t-BOOH), нмоль GSH/мин/г белка печени	766,3±31,3	665,2±14,5*	1181,0±28,8*	1210,3±29,2 ^б

Таблица 3. Изменение показателей системы глутатиона и активности глутатионпероксидаз в слизистой оболочке двенадцатипёрстной (I) и тонкой (II) кишки белых крыс, получавших в качестве протектора от окислительного стресса селенометионин.

Показатель	Группы			
	Контроль на зондирование	Зондирование + этанол	Зондирование с SeMet	Зондирование с SeMet + этанол
I				
GSH, нмоль/мг белка	7,79±0,25	5,89±0,30*	8,25±0,04	8,68±0,45 ^б
GSSG, нмоль/мг белка	0,14±0,01	0,16±0,01*	0,16±0,01*	0,18±0,01
ГПО (H_2O_2), нмоль GSH/мин/г белка	246,9±12,4	159,5±7,2*	193,4±14,7	234,6±27,0 ^б
ГПО (t-BOOH), нмоль GSH/мин/г белка	305,4±25,6	467,2±35,6*	482,7±19,9*	540,6±48,5
II				
GSH, нмоль/мг белка	19,2±1,0	16,5±0,3*	24,6±1,0*	17,0±0,4
GSSG, нмоль/мг белка	0,32±0,01	0,37±0,01*	0,31±0,01	0,35±0,02
ГПО (H_2O_2), нмоль GSH/мин/г белка	1201,3±75,1	1266±23,0	1114,3±129,2	1193,0±42,0
ГПО (t-BOOH), нмоль GSH/мин/г белка	356,5±27,2	208,9±9,6*	423,0±41,5	413,9±27,6 ^б

Таблица 4. Показатели системы глутатиона и активности глутатионпероксидаз в слизистой оболочке толстой (I) и прямой (II) кишки белых крыс, получавших в качестве протектора от окислительного стресса селенометионин.

Показатель	Группы			
	Контроль на зондирование	Зондирование + этанол	Зондирование с SeMet	Зондирование с SeMet + этанол
I				
GSH, нмоль/мг белка	20,7±1,4	18,7±0,8	18,8±0,8	20,5±0,8
GSSG, нмоль/мг белка	0,75±0,04	0,81±0,08	0,53±0,01*	0,84±0,06
ГПО (H ₂ O ₂), нмоль GSH/мин/г белка	238,7±14,7	236,3±31,3	175,2±25,7	206,5±21,0
ГПО (t-BOOH), нмоль GSH/мин/г белка	239,9±21,7	184,2±24,4	348,7±8,7*	376,2±16,0 [#]
II				
GSH, нмоль/мг белка	6,83±0,32	6,67±0,4	9,12±0,32*	6,89±0,2
GSSG, нмоль/мг белка	0,117±0,017	0,110±0,002	0,097±0,002	0,106±0,002
ГПО (H ₂ O ₂), нмоль GSH/мин/г белка	247,1±14,6	205,0±7,1*	337,9±26,5*	292,5±11,9 [#]
ГПО (t-BOOH), нмоль GSH/мин/г белка	171,9±1,7	178,5±7,2	225,7±10,2*	204,4±4,4 [#]

Параллельно при развитии окислительного стресса происходило снижение содержания восстановленного глутатиона в слизистой оболочке двенадцатипёрстной (–24,4%) и тонкой (–14,1%, табл. 2) кишки, плазме крови (–15,6%) и эритроцитах (–19,3%, табл. 1). Кроме того, алкогольная интоксикация приводила к ингибированию активности глутатионпероксидазы, с H₂O₂ в качестве субстрата, особенно значительному в слизистой оболочке желудка (–53,4%, табл. 2), в энтероцитах двенадцатипёрстной (–35,4%, табл. 3), прямой кишки (–17,0%, табл. 4), а также в гепатоцитах (табл. 2). Активность фермента, с t-BOOH как субстратом, достоверно снизилась в слизистой оболочке тонкой кишки (–41,4%) и печени (табл. 2), но при этом достоверно возросла в энтероцитах двенадцатипёрстной кишки (табл. 3).

Курсовое применение животным селенометионина, не оказав существенного влияния на активность глутатионпероксидазы с H₂O₂ в качестве субстрата, в верхних отделах желудочно-кишечного тракта, всё же привело к повышению активности фермента в энтероцитах прямой кишки. В свою очередь, активность фермента с t-BOOH в качестве субстрата повышалась практически во всех исследованных отделах и только в тонком кишечнике повышение его активности не достигало уровня статистической достоверности. Одновременно в плазме крови, эритроцитах и печени произошел рост активности обоих изоферментов глутатионпероксидазы.

ЭФФЕКТ СЕЛЕНОМЕТИОНИНА ПРИ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

Предварительное насыщение организма животных селенометионином с дальнейшим окислительным стрессом, вызванным внутрижелудочной нагрузкой этанолом, позволило удерживать на уровне нормы концентрацию ТБ-РП и восстановленного глутатиона в плазме крови. Одновременно произошло значительное повышение активности изоферментов глутатионпероксидазы в плазме крови и эритроцитах (119,7–394%) в сравнении с показателями алкоголизованных животных без предварительной селенизации. Аналогичное повышение активности глутатионпероксидазы произошло в слизистой оболочке желудка (с H_2O_2 как субстратом – 181,5% и t-BOOH – 195,7%) и печени (с H_2O_2 – 144,8% и t-BOOH – 181,9%). Активность фермента с разными субстратами была выше также в энтероцитах двенадцатипёрстной кишки (с H_2O_2 – 147%), в тонком кишечнике (с t-BOOH – 198%) и прямой кишке (с H_2O_2 – 142% и t-BOOH – 114,5%), в сравнении с показателями животных не прошедших селенизацию перед алкогольной интоксикацией.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Таким образом, в данном экспериментальном исследовании установлено положительное модулирующее влияние предварительного насыщения организма селенометионином в отношении системы глутатиона, глутатионпероксидазной активности и глюкокортикоидного статуса животных при развитии острой алкогольной интоксикации. Рост и стабильность показателей, полученных в результате предварительной селенизации организма и последующем окислительном стрессе, свидетельствуют об устойчивом механизме поддержания в организме достаточно высокого антиоксидантного потенциала. Следует отметить, что регуляция активности ферментов семейства селеноцистеиносодержащих глутатиопероксидаз осуществляется на уровне экспрессии, которую в высокой степени стимулирует избыток селена [1]. Кроме того, ранее проведенные исследования позволили установить, что в случае длительного применения селенометионина в организме животных происходит аккумулялирование микроэлемента [11].

Работа выполнена при поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант Б05М – 195).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Chu F.F., Esworthy R.S., Doroshov J.H.* (2004) *Free Radic. Biol. Med.*, **36**(12), 1481–1495.
2. *Esworthy R.S., Binder S.W., Doroshov J.H., Chu F.F.* (2003) *J. Biol. Chem.*, **384**, 597–607.
3. *Schrauzer G.N.* (2000) *J. Nutr.*, **130**, 1653–1656.
4. *Кругликова Г.О., Штутман И.М.* (1976) *Укр. биохим. журн.*, **48**, 227–233.
5. *Моин В.М.* (1986) *Лаб. дело*, №12, 724–727.
6. *Akerboom T., Sies H.* (1981) *Methods Enzymol.*, **77**, 373–382.
7. *Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г.* (1977) *Современные методы в биохимии*, Москва, с. 66–68.
8. *Yamada Y., Aizawa A.* (1984) *J. Pharmac. Methods*, **11**, 291–297.
9. *Тарасов Ю.А., Шейбак В.М., Чумаченко С.С., Лелевич В.В.* (2005) *Росс. физиол. журн. им. И.М. Сеченова*, **91**, 910–914.
10. *Тарасов Ю.А., Гриневич В.П., Островский Ю.М.* (1986) *Изв. АН БССР*, №5, 88–91.
11. *Moiseenok A.G., Alfthan G.V., Slyshenkov V.S., Pekhovskaya T.A., Shevalye A.A.* (2005) *Proceedings Twenty Years of Selenium Fertilization. Agrifood Research Reports* 69, Helsinki, 101.

Поступила: 01. 09. 2008.

**EFFECTS OF ORGANIC SELENIUM SUBSTANCE, SELENOMETHIONINE,
IN ACUTE ALCOHOL INTOXICATION**

N.E. Petushok¹, Yu.A. Tarasov², T.A. Pekhovskaya², I.N. Evkovich², A.A. Shevalye², S.S. Chumachenko²

¹State Medical University, 80 Gorky Str., Grodno, 230015 Belarus;

tel.: +375 0152 435559; e-mail: pena-n@tut.by

²Institute of Pharmacology and Biochemistry, National Academy of Sciences of Belarus, Grodno, Belarus

The effect of the preliminary saturation of rats with selenomethionine (50 g/kg, intragastrically, daily, 10 days) prior to acute alcohol intoxication (5 g/kg, 20% ethanol solution, intragastrically, singly on the 11th day with the exposure for 2 hours) was investigated. The activities of glutathione peroxidases (gastrointestinal mucosa, blood plasma, erythrocytes, liver), the levels of oxidized and reduced glutathione, LPO intensity and blood corticosterone level were studied.

Key words: selenomethionine, ethanol, glutathione peroxidases, glutathione, gastrointestinal tract, corticosterone.