

*Irena Musik, Helena Donica¹⁾, Małgorzata Kieleczykowska,
Anna Hordyjewska, Kazimierz Pasternak*

WPŁYW PODAWANIA ZWIĄZKÓW SELENU O RÓŻNEJ STRUKTURZE NA PARAMETRY OKSYDACYJNE KRWI SZCZURÓW

Katedra i Zakład Chemii Medycznej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie
Kierownik: prof. dr hab. *K. Pasternak*

¹⁾ Zakład Diagnostyki Biochemicznej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie
Kierownik: dr hab. n. med. prof. nadz. UM *H. Donica*

Badano wpływ suplementacji związków selenu o różnej strukturze na parametry oksydacyjne krwi szczurów. Stwierdzono, że związki organiczne selenu spowodowały podwyższenie TAS, natomiast związki nieorganiczne tego pierwiastka obniżenie stężenia MDA. Wyniki wskazują, że suplementacja selenu może wywierać korzystny wpływ na organizm poprzez podwyższenie całkowitego statusu antyoksydacyjnego i hamowanie peroksydacji lipidów.

Hasła kluczowe: selen, antyoksydanty, peroksydacja lipidów, krew, szczury.
Keywords: selenium, antioxidants, lipid peroxidation, blood, rats.

Selen należy do pierwiastków niezbędnych dla organizmu. W ciągu ostatnich kilkudziesięciu lat prowadzono coraz więcej badań dotyczących jego metabolizmu, a uzyskane wyniki potwierdziły m. in. istnienie zależności pomiędzy poziomem selenu w organizmie, a procesami antyoksydacyjnymi (1, 2, 3, 4). Badania wykazały, że podawanie samego selenu lub w połączeniu z witaminą E może hamować proces peroksydacji lipidów (5, 6). Stwierdzono również zależność pomiędzy poziomem selenu w organizmie, a działaniem układu immunologicznego (6). Obniżony poziom selenu w organizmie może być przyczyną zaburzenia rozwoju i prawidłowego funkcjonowania (7) jednak jego nadmiar może również spowodować poważne uszkodzenia organizmu (8).

Badania nad właściwą formą i dawką suplementacji selenu stanowią trudny i skomplikowany problem. Ponieważ stwierdzono, że selenoorganiczne związki są mniej toksyczne, zaczęto poszukiwania nowych, skutecznych organicznych suplementów selenu (9). Nasze wcześniejsze badania również wykazały, że selen w postaci organicznej jest lepiej przyswajany niż nieorganiczny selenian(IV) sodu (10).

Celem pracy było badanie wpływu organicznych związków selenu o różnej budowie na oksydacyjne parametry krwi u szczurów i porównanie ich działania z nieorganicznym selenianem(IV) sodu.

MATERIAŁ I METODY

Stosowano dwa organiczne związki selenu zsyntetyzowane w naszej Katedrze:

- związek A – (forma łańcuchowa) 4-(o-tolilo)-selenosemikarbazyd kwasu 2-chlorobenzooesowego (10),
- związek B – (forma pierścieniowa) 3-(2-chlorobenzoiloamino-)-2-(o-toliloimino)-4-metylo-4-selenazolina (11).

Doświadczenie przeprowadzono na młodych szczurach samcach rasy *Wistar* o początkowej masie ciała 110–150 g. Zwierzęta podzielono na cztery grupy po 10 sztuk każda. Grupa I – kontrolna, otrzymywała sól fizjologiczną, grupie II – podawano wodny roztwór selenianu(IV) sodu, grupa III – była suplementowana związkiem A, grupa IV – związkiem B. Związki organiczne były podawane w emulsji sporządzonej z oleju, gumy arabskiej i wody w stosunku 2:1:1,5. Zwierzęta we wszystkich grupach miały podawane związki selenu w dawce $5 \cdot 10^{-4}$ mg Se/g m. c. sondą dożołądkowo przez 10 dni. Ilość podawanego związku była obliczana w oparciu o masę ciała zwierzęcia tak, aby podana ilość selenu była równa ustalonej dawce. Zwierzęta karmiono paszą standardową LSM i pojo no wodą destylowaną ad libitum. Po zakończeniu doświadczenia zwierzęta usypiano pentotalem a z serca pobierano do dalszych badań krew do próbek z antykoagulantem (heparyna).

W pełnej krwi oznaczano aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) i peroksydazy glutationowej (GPx) stosując zestawy diagnostyczne RANSOD i RANSEL firmy RANDOX i wyrażano w U/cm³ pełnej krwi.

W osoczu oznaczano wartość całkowitego statusu antyoksydacyjnego (TAS) oraz stężenia kwasu askorbinowego (AA), dialdehydu malonowego (MDA) i zredukowanego glutationu (GSH). Wartość TAS oznaczano stosując zestaw diagnostyczny firmy RANDOX i wyrażano w mmol/dm³ osocza. Stężenie AA oznaczano stosując zmodyfikowaną metodę *Kyaw* (12) i wyrażano w $\mu\text{mol/dm}^3$ osocza. Stężenie MDA oznaczano stosując metodę opisaną przez *Ledwożywa* i współpr. (13) i wyrażano w $\mu\text{mol/dm}^3$ osocza. Stężenie GSH oznaczano stosując zestaw BIOXYTECH® GSH-400™ firmy OxisResearch™ i wyrażano w $\mu\text{mol/dm}^3$ osocza. Pomiarów dokonano za pomocą spektrofotometru SPECORD M40 firmy Carl Zeiss Jena.

Analizę statystyczną przeprowadzoną za pomocą pakietu statystycznego SPSS v.12 pl. testem ANOVA. Jako istotne uznawano wartości statystyk dla $p < 0,05$.

Na przeprowadzenie badań wyraziła zgodę Lokalna Komisja Etyczna w Lublinie przy Akademii Medycznej im prof. Feliksa Skubiszewskiego, zezwolenie nr 65/AM/2004.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Suplementacja selenu podwyższyła wartość TAS w osoczu w porównaniu z grupą kontrolną w sposób zależny od struktury podawanego związku. Organiczne związki selenu wywarły bardziej znaczący efekt, a pierścieniowa selenazolina (B) wykazała znacznie bardziej korzystny wpływ niż łańcuchowy selenosemikarbazyd (A). Aktywności enzymów antyoksydacyjnych SOD i GPx w pełnej krwi zostały również podwyższone w grupach otrzymujących selen, ale zmiany nie były istotne statystycznie w porównaniu do kontroli.

Stężenie AA w osoczu było znacząco obniżone w grupie II otrzymującej nieorganiczny selenian(IV) i w grupie III otrzymującej łańcuchowy selenosemiskarbazyd (A). Pierścieniowa selenazolina (B) nie zmieniła stężenia AA w porównaniu do grupy kontrolnej.

Stężenie GSH w osoczu w porównaniu do kontroli uległo podwyższeniu we wszystkich grupach, ale w sposób znaczący jedynie w grupie III (selenosemiskarbazyd A).

Stężenie MDA w osoczu było istotnie statystycznie obniżone w porównaniu z grupą kontrolną w grupie II (Na_2SeO_3), nieznacznie obniżone w grupie III i niezmienione w porównaniu z kontrolą w grupie IV.

Otrzymane dane przedstawiono w tab. I.

Tab e l a I. Parametry oksydacyjne krwi szczurów suplementowanych różnymi formami selenu

Tab l e I. Blood oxidative parameters in rats supplemented with different forms of selenium

Parametr	Grupa I kontrolna $\bar{x} \pm \text{SD}$	Grupa II (Na_2SeO_3) $\bar{x} \pm \text{SD}$	Grupa III (selenosemiskarbazyd A) $\bar{x} \pm \text{SD}$	Grupa IV (selenazolina B) $\bar{x} \pm \text{SD}$
TAS (mmol/dm ³ osocza)	0,82±0,32	1,29±0,19	1,39±0,26*	1,96±0,36** [^]
SOD (U/cm ³ pełnej krwi)	232,8±30,4	466,3±171,5	378,0±101,9	242,6±82,5
GPx (U/cm ³ pełnej krwi)	48,59±21,45	54,77±9,34	69,55±12,87	68,24±31,54
AA (μmol/dm ³ osocza)	32,53±7,37	13,83±5,56**	19,63±7,35*	34,12±9,60 ^c . ^x
GSH (μmol/dm ³ osocza)	0,88±0,32	1,59±0,57	1,73±0,39*	1,01±0,38
MDA(μmol/dm ³ osocza)	45,43±7,55	29,38±8,08**	32,75±8,43	47,68±8,22 ^B . ^x

Istotność statystyczna w porównaniu z grupą kontrolną * p < 0,05; **p < 0,01; *** p < 0,001.

Istotność statystyczna w porównaniu z grupą II [^] p < 0,05; ^B p < 0,01; ^c p < 0,001.

Istotność statystyczna w porównaniu z grupą III ^x p < 0,05.

W naszych badaniach suplementacja selenu podwyższała wartość TAS w osoczu szczurów. *Berger* i współpr. nie stwierdzili zmian wartości TAS u pacjentów z rozległymi oparzeniami poddawanych suplementacji selenu, miedzi i cynku przez okres 20 dni (14). *Haug* i współpr. nie zanotowali zmian wartości TAS w osoczu kurcząt karmionych paszą wzbogaconą w selen (8).

W naszym doświadczeniu stwierdziliśmy nieznaczący wzrost aktywności SOD i GPx w grupach otrzymujących selen. *Korać* i *Buzadźić* z kolei podali, że selenian(IV) sodu podawany w wodzie pitnej znacząco podwyższył erytrocytarną aktywność GPx u szczurów przetrzymywanych zarówno w temperaturze pokojowej, jak i adaptowanych do zimna. Jednakże należy podkreślić, że w tym przypadku zwierzęta były poddawane suplementacji przez znacznie dłuższy okres – 45 dni, a sposób podawania selenu był inny (2). *Haug* i współpr. zaobserwowali podwyższenie aktywności GPx w pełnej krwi kurcząt otrzymujących selen w pożywieniu (8). Z kolei *Noaman* i współpr. nie stwierdzili żadnych zmian aktywności SOD i GPx we krwi szczurów otrzymujących selenian(IV) sodu, chociaż w tym przypadku zarówno dawka selenu, jak i sposób podawania były inne (0,1 mg/kg m.c. podawane dootrzewnowo). Ci sami autorzy stwierdzili, że u zwierząt poddawanych działaniu

promieniowania γ podawanie selenu wyraźnie podniosło poziom GPx we krwi (5). Organiczna forma selenu (cynkowa pochodna selenometioniny) podawana koniom podwyższyła erytrocytarną aktywność GPx po 28-dniowej suplementacji, ale po 56 dniach trwania doświadczenia nie obserwowano żadnych różnic w porównaniu do kontroli (3). Organiczne związki zastosowane w naszym eksperymencie nieznacząco podwyższyły aktywność GPx w porównaniu do grupy otrzymującej nieorganiczny selenian(IV) sodu. Podobne wyniki otrzymali *Slavik* i współpr. podając organiczne i nieorganiczne suplementy selenu krowom z deficytem tego pierwiastka (4). Jednakże, podobny eksperyment przeprowadzony na brojlerach nie wykazał żadnego wpływu ani organicznej ani nieorganicznej formy selenu na aktywność GPx3 w osoczu (7). Z kolei badając aktywność GPx w erytrocytach i osoczu u szczurów z deficytem selenu również nie stwierdzono znaczących różnic w działaniu organicznych i nieorganicznych suplementów selenu (1).

Pierścieniowa selenazolina nie wpłynęła na stężenia drobnocząsteczkowych antyoksydantów kwasu askorbinowego i zredukowanego glutationu. Inne zastosowane przez nas suplementy selenu obniżyły AA i podwyższyły GSH. U koni karmionych paszą z dodatkiem selenu stężenie kwasu askorbinowego w osoczu zostało podwyższone, natomiast GSH we krwi obniżone nieznacząco (15).

W naszym doświadczeniu stężenie MDA – markera peroksydacji lipidów było znacząco obniżone u zwierząt otrzymujących nieorganiczny selenian(IV) i nieistotnie w grupie suplementowanej łańcuchowym selenosemikarbazydem. Podobne zahamowanie peroksydacji lipidów w osoczu szczurów otrzymujących 200 $\mu\text{g Se/kg m.c.}$ w postaci Na_2SeO_3 , zarówno zdrowych jak i dodatkowo eksponowanych na glin zaobserwowała *El-Demerdash* (6). *Selamoglu* zaobserwował obniżenie stężenia MDA w erytrocytach szczurów poddanych działaniu substancji karcinogennej i suplementowanych selenem w postaci organicznej (9).

WNIOSKI

1. Suplementacja selenu może wywierać korzystny wpływ na organizm poprzez podwyższenie całkowitego statusu antyoksydacyjnego i hamowanie peroksydacji lipidów.

2. Wpływ podawanego selenu zależy od rodzaju zastosowanego suplementu, co zachęca do badania innych związków selenoorganicznych.

I. Musik, H. Donica, M. Kiełczykowska, A. Horcyjewska,
K. Pasternak

THE INFLUENCE OF ADMINISTRATION OF SELENOCOMPOUNDS WITH DIFFERENT STRUCTURES ON OXIDATIVE BLOOD PARAMETERS IN RATS

Summary

Selenium belongs to essential elements which are necessary to ensure correct functions of organism.

The aim of the work was to investigate the influence of different forms of selenium supplementation on oxidative balance parameters: total antioxidant status value (TAS), activity of superoxide dismutase

(SOD) and glutathione peroxidase (GPx) as well as concentrations of ascorbic acid (AA), reduced glutathione (GSH) and malonyldialdehyde (MDA) in blood of rats. The studied compounds were: organic 4-(o-tolyl)-selenosemicarbazide of 2-chlorobenzoic acid (A) and 3-(2-chlorobenzoyloamino)-2-(o-tolylimino)-4-methyl-4-selenazoline (B) as well as inorganic sodium selenite Na_2SeO_3 . The administration was performed intragastrically by stomach tube at a dose of $5 \cdot 10^{-4}$ mg Se/g b.w. for 10 days. Organic supplements increased TAS value, whereas Na_2SeO_3 depleted MDA concentration.

The results suggest that selenium supplementation may exert beneficial effect by TAS enhancement and inhibition of lipid peroxidation.

PIŚMIENNICTWO

1. *Cases J., Vacchina V., Napolitano A., Caporiccio B., Besançon P., Lobinski R., Rouanet J.M.*: Selenium from selenium-rich Spirulina is less bioavailable than selenium from sodium selenite and selenomethionine in selenium-deficient rats. *J. Nutr.*, 2001; 131: 2343-2350.
2. *Korać B., Buzadžić B.*: Selenium supplementation and GSH-Px activity in the IBAT and erythrocytes of cold-adapted rats. *Food Res. Int.*, 2002; 35: 221-224.
3. *Richardson S.M., Siciliano P.D., Engle T.E., Larson C.K., Ward T.L.*: Effect of selenium supplementation and source on the selenium status of horses. *J. Anim. Sci.*, 2006; 84: 1742-1748.
4. *Slavik P., Illek J., Brix M., Hlavicova J., Rajmon R., Jilek F.*: Influence of organic versus inorganic dietary selenium supplementation on the concentration of selenium in colostrum, milk and blood of beef cows. *Acta Vet. Skand.*, 2008; 50: 43-48.
5. *Noaman E., Zahran A.M., Kama A.M., Omran M.F.*: Vitamin E and selenium administration as a modulator of antioxidant defense system. *Biol. Trace Elem. Res.*, 2002; 86: 55-6411.
6. *El-Demerdash F.M.*: Antioxidant effect of vitamin E and selenium on lipid peroxidation, enzyme activities and biochemical parameters in rats exposed to aluminium. *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 2004; 18: 113-121.
7. *Payne R.L., Southern L.L.*: Comparison of inorganic and organic selenium sources for broilers. *Poult. Sci.*, 2005; 84: 898-902.
8. *Haug A., Eich-Greatorex S., Bernhoft A., Hetland H., Sogn T.*: Selenium bioavailability in chicken fed selenium-fertilized wheat. *Acta Agric. Scand. Sec. A*, 2008; 58: 65-70.
9. *Selamoglu Talas Z., Yılmaz I., Ozdemir I., Ates B., Gok Y., Cetinkaya B.*: Role of synthesized organoselenium compounds on protection of rat erythrocytes from DMBA-induced oxidative stress. *Biol. Trace Elem. Res.*, 2009; 128: 167-175.
10. *Musik I., Koziol-Montewka M., Toś-Luty S., Donica H., Pasternak K., Wawrzycki S.*: Comparison of selenium distribution in mice organs after the supplementation with inorganic and organic selenium compound selenosemicarbazide. *Ann. Univ. M. Curie Skłodowska (Med)*, 2002; 57: 15-21.
11. *Musik I., Kielczykowska M., Hordyjewska A., Pasternak K.*: Influence of different forms of selenium supplementation on superoxide dismutase activity and total antioxidant status in rats. *Ann. Univ. M. Curie Skłodowska (Pharm)*, 2009; 22: 95-101.
12. *Rutkowski M., Grzegorzczak K.*: Kolorymetryczne oznaczenie stężenia witaminy C w osoczu krwi przy użyciu odczynnika fosforowolframowego – modyfikacja metody *Kyaw*. *Diagn. Lab.*, 1998; 34: 511-520.
13. *Ledwożyw A., Michalak J., Stępień A., Kądziołka A.*: The relationship between plasma triglycerides, cholesterol, total lipids and lipid peroxidation products during human atherosclerosis. *Clin. Chim. Acta*, 1986; 155: 275-284.
14. *Berger M.M., Baines M., Raffoul W., Benathan M., Chioloro R.L., Reeves C., Revelly J.P., Cayeux M.C., Sénéchaud I., Shenkin A.*: Trace element supplementation after major burns modulates antioxidant status and clinical course by way of increased tissue trace element concentrations. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2007; 85: 1293-1300.
15. *de Mofarts B., Kirschvink N., Art T., Pincemail J., Lekeux P.*: Effect of oral antioxidant supplementation on blood antioxidant status in trained thoroughbred horses. *Vet. J.* 2005; 169: 65-74.

Adres: 20-093 Lublin, ul. Chodźki 4A.