

Защитное действие БАД «Рекицен - РД» при алиментарном Т-2-микотоксикозе у крыс.

Л.В. КРАВЧЕНКО, Л.И. АВРЕНЬЕВА ГУ НИИ питания РАМН, Москва

Включение БАД «Рекицен - РД» в рацион крыс Вистар в количестве 5% приводило к ослаблению токсического действия трихотеценового микотоксина Т-2-токсина. В меньшей степени были выражены изменения суточных привесов массы тела животных, относительной массы внутренних органов, активности ферментов сыворотки крови, неседиментируемой активности лизосомальных ферментов и активности ферментов метаболизма ксенобиотиков в печени. Защитное действие БАД связывают с высокой адсорбционной способностью входящих в состав добавки пшеничных отрубей и возможным их влиянием на активность ферментов, участвующих в детоксикации Т-2-токсина (UDP-глюкуронозилтрансфераза).

Inclusion of a biologically active food supplement (BAS) «Rekicen RD» in rat Wistar ration in percentage 5% result in reduction of toxic action of a trichothecene mycotoxin T-2 toxin. The changes of daily increase in body weight of animals, of relative internal weight, of serum enzyme activity, of not sedimentated activity of lysosomal enzymes and of activity of enzymes of a xenobiotic metabolism in a liver were expressed in a lesser degree. It is possible that a protective action of BAS is related with high adsorption capacity of wheat bran in BAS composition and with their possible influence on activity of enzymes participating in detoxification T-2 toxin (UDP-glucuronosyltransferase).

Поиск путей снижения неблагоприятного воздействия на организм загрязнителей окружающей среды особенно актуален для таких природных контаминантов продовольственного сырья, как микотоксины. Образование микотоксинов - явление плохо предсказуемое, и полностью предотвратить их накопление в пищевых продуктах, а значит, и поступление в организм человека практически невозможно. В связи с этим наряду с мероприятиями, направленными на предотвращение попадания микотоксинов в организм, важное значение приобретает изыскание путей снижения токсичности поступивших в организм токсинов. К числу наиболее перспективных направлений относится использование пищи и ее компонентов как мощного фактора регуляции процессов токсикокинетики чужеродных соединений, включая этапы всасывания, печеночно-кишечной рециркуляции, биотрансформации и детоксикации [6, 14]. Особое внимание привлекают биологически активные добавки к пище (БАД), содержащие в концентрированной форме такие жизненно важные компоненты, как витамины, микроэлементы, биофлавоноиды, индолы, которые находят широкое применение не только для коррекции структуры питания населения, но и в профилактических целях, для повышения резистентности организма к воздействию неблагоприятных факторов окружающей среды [5].

Задачей настоящей работы явилось изучение возможного защитного действия БАД, содержащей пищевые волокна, на модели алиментарного микотоксикоза, вызванного трихотеценовым микотоксином Т-2-токсином. БАД «Рекицен - РД» (ЗАО «Ягодное», Россия) представляет собой пшеничные отруби, ферментированные винными дрожжами (с использованием специально селекционированного штамма винных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae vini*). Содержание пищевых волокон в БАД составляет 49,3%, в том числе 45,8% приходится на долю нерастворимых и 3,5% - на долю растворимых волокон. Клиническую эффективность

БАД связывают с ее выраженными адсорбционными способностями в отношении токсических агентов микробного и немикробного происхождения [8].

Материалы и методы.

Исследования проводили на 4 группах крыс-самцов Вистар, по 12 животных в каждой группе. Крысы 1-й (контрольной) и 2-й групп получали в течение 3 нед полноценный полусинтетический (базовый) рацион, крысы 3-й и 4-й групп - тот же рацион с включением БАД в количестве 5%. Крысам 2-й и 4-й групп в течение последних 10 дней эксперимента вводили Т-2-токсин внутрь в дозе 0,8 мг на 1 кг массы тела, а животным 1-й и 3-й групп - равное количество растворителя (0,1% водный этанол).

Контроль за состоянием животных, поедаемостью корма и массой тела проводили ежедневно. Для оценки повреждающего действия токсина на печень, клеточные мембраны в гомогенатах печени и фракции цитозоля определяли соответственно общую и неседиментируемую активность ферментов лизосом - арил-сульфатаз А и В, β -галактозидазы и β -глюкуронидазы [1]. В сыворотке крови определяли активность лизосомальных гликозидаз - β -галактозидазы, α -маннозидазы и N-ацетилглюкозаминидазы в качестве одного из биохимических параметров, чувствительных к действию

фузариотоксинов. В микросомах, выделенных из печени, изучали активность ключевых ферментов метаболизма ксенобиотиков, в том числе и участвующих в процессах биотрансформации и детоксикации Т-2-токсина, - общее содержание цитохрома Р-450 [18], активность карбоксилэстеразы [19], эпоксидгидролазы [3], UDP-глюкуронозилтрансферазы с р-нитрофенилом (р-нф) [10] и 4-гидроксифенилом (ГБФ) [9] в качестве акцепторов. В цитозоле определяли активность глутатионтрансферазы с 1-хлор-2,4-динитробензолом в качестве кофактора [15]. Хроматографически чистый (>98%) Т-2-токсин был выделен из культуры *Fusarium sporotrichiella* 53315. Статистическая обработка результатов проведена методом дисперсионного анализа (ANOVA) и с использованием t-критерия Стьюдента.

Таблица 1. Некоторые показатели токсического действия Т-2-токсина у крыс, получавших рацион с БАД «Рекицен - РД» ($M \pm m$)

	Группа животных			
	1-я	2-я	3-я	4-я
Масса тела, г:				
исходная	181±9	182±5	173±11	176±6
конечная	214±7 ^{ac}	191±7 ^b	219±9 ^a	194±5 ^{b,c}
Масса печени				
относительная, %	3,90±0,10 ^a	4,90±0,14 ^b	3,58±0,09 ^a	4,43±0,11 ^d
Масса тимуса				
относительная, %	0,24±0,02 ^a	0,14±0,01 ^b	0,23±0,01 ^a	0,18±0,01 ^d

Активность ферментов сыворотки крови

β-Галактозидаза, нмоль/мин в 1 мл.	9,62±0,38 ^a	6,65±0,32 ^b	9,38±0,40 ^a	7,36±0,58 ^b
α-Маннозидаза, мкмоль/мин в 1 мл.	2,65±0,25 ^a	0,87±0,07 ^b	2,57±0,09 ^a	1,30±0,06 ^d
N-ацетилглюкозаминидаза, мкмоль/мин в 1 мл	8,92±0,79 ^a	5,00±0,37 ^b	8,53±0,25 ^a	6,40±0,27 ^d

Примечание. Здесь и в последующих таблицах представлены средние данные ($X \pm S_x$) из 6 опытов; различия между значениями, обозначенными разными буквами, статистически достоверны ($p < 0,05$).

Результаты и обсуждение.

Содержание крыс в течение 3 нед на рационе с включением БАД (3-я группа) не оказывало какого-либо влияния на рост животных, относительную массу внутренних органов (табл. 1), на активность изученных ферментов сыворотки крови (см. табл. 1), общую (данные не представлены) и неседиментируемую активность лизосомальных ферментов печени (табл. 2). В микросомах печени крыс 3-й группы обнаружено небольшое (на 15%) снижение активности карбоксил-эстеразы и существенное (на 40%) возрастание активности ГБФ-UDP-глюкуронозилтрансферазы (табл. 3). При этом содержание микросомального белка и активность остальных ферментов не отличались значительно от уровня в контрольной группе.

Токсическое действие Т-2-токсина у крыс 2-й группы, получавших базовый рацион, в целом характеризовалось клиническими, биохимическими и морфологическими проявлениями, которые были описаны ранее [2]. Как видно из данных, представленных в табл. 1, у животных этой группы были значительно снижены суточные привесы, относительная масса печени возросла на 26%, а относительная масса тимуса уменьшалась более чем на 40%. На вскрытии макроскопические изменения печени наблюдались у всех животных. В сыворотке крови активность лизосомальных гликозидаз была резко понижена: β-галактозидазы - на 30%, α-маннозидазы - на 67%, N-ацетилглюкозаминидазы - на 44% (см. табл. 1). Неседиментируемая активность ферментов лизосом печени - β-галактозидазы и β-глюкуронозидазы - была понижена более чем в 2 раза, а арилсульфатаз - на 40% (см. табл. 2). Токсическое действие Т-2-токсина сопровождалось значительным (на 40%) подавлением активности ключевого фермента его детоксикации в организме крыс - микросомальной карбоксилэстеразы; снижением более чем вдвое содержания цитохрома Р-450 и достоверным уменьшением в этой группе концентрации микросомального белка в печени крыс (см. табл. 3).

Включение БАД в рацион животных приводило к значительному ослаблению всех проявлений токсического действия микотоксина. У крыс 4-й группы были достоверно выше, чем во 2-й, величины суточных привесов, достоверно менее выражены изменения относительной массы печени и тимуса (см. табл. 1). На вскрытии макроскопические изменения печени обнаруживались только у 50% крыс (во 2-й группе - у 100%). Вызванные токсином изменения активности ферментов сыворотки крови также были

у животных 4-й группы менее выраженными; различия статистически достоверны (см. табл. 1). Характерное для токсического действия Т-2-токсина у крыс снижение неседиментируемой активности ферментов лизосом было в значительно меньшей степени выражено при включении БАД в рацион. Неседиментируемая активность арилсульфатаз и β -глюкуронидазы у животных 4-й группы фактически не отличалась от таковой в 3-й группе (не получавшей токсин), а снижение неседиментируемой активности (β -галактозидазы было достоверно менее выраженным, чем у крыс 2-й группы (см. табл. 2). Как видно из данных, представленных в табл. 3, активность карбоксилэстеразы, эпоксидгидролазы и р-нф-UDP-глюкуронозилтрансферазы, а также уровень микросомального белка не отличались от показателей в 3-й группе, а снижение содержания цитохрома Р-450 было значительно менее выраженным, чем у крыс 2-й группы.

Таким образом, проведенные исследования показали, что обогащение рациона крыс пищевыми волокнами за счет включения БАД приводит к ослаблению токсического действия Т-2-токсина.

Таблица 2. Неседиментируемая активность (в % от общей) ферментов лизосом печени крыс, получавших Т-2-токсин на фоне рациона с БАД «Рекицен - РД» ($M \pm m$)

Показатель	Группа животных			
	1-я	2-я	3-я	4-я
Арилсульфатазы А и В	4,09 \pm 0,29 ^a	2,59 \pm 0,05 ^b	4,20 \pm 0,15 ^a	3,70 \pm 0,10 ^a
β -Галактозидаза	6,50 \pm 0,26 ^a	3,45 \pm 0,10 ^b	6,14 \pm 0,38 ^a	4,31 \pm 0,29 ^d
β -Глюкуронидаза	7,34 \pm 0,46 ^a	3,51 \pm 0,36 ^b	7,24 \pm 0,29 ^{a,d}	6,06 \pm 0,52 ^d

Таблица 3. Активность ферментов метаболизма ксенобиотиков в печени крыс, получавших Т-2-токсин на фоне рациона с БАД «Рекицен - РД» ($M \pm m$)

Показатель	Группа животных			
	1-я	2-я	3-я	4-я
Цитохром Р-450, нмоль на 1 мг белка	0,88 \pm 0,07 ^a	0,40 \pm 0,04 ^b	0,74 \pm 0,06 ^a	0,53 \pm 0,04 ^b
Карбоксилэстераза, мкмоль/мин на 1 мг белка	1,93 \pm 0,09 ^a	1,36 \pm 0,05 ^b	1,63 \pm 0,05 ^c	1,47 \pm 0,06 ^{bc}
Эпоксидгидролаза, нмоль/мин на 1 мг белка	5,40 \pm 0,30 ^a	7,17 \pm 0,37 ^b	5,70 \pm 0,18 ^{ac}	6,38 \pm 0,20 ^{bc}
р-нф-UDP-глюкуронозилтрансфераза, нмоль/мин на 1 мг белка	26,7 \pm 1,0 ^a	24,1 \pm 2,7 ^a	28,3 \pm 1,7 ^{ad}	33,2 \pm 1,5 ^d
4-ГБФ-UDP-глюкуронозилтрансфераза, нмоль/мин на 1 мг белка	22,4 \pm 1,4 ^a	-	31,6 \pm 1,7 ^c	-
ХДНБ-глутатионтрансфераза, мкмоль/мин на 1 г белка	0,67 \pm 0,05	0,77 \pm 0,04	0,78 \pm 0,02	0,74 \pm 0,03
Белок микросомальный, мг на 1 г ткани	13,4 \pm 0,4 ^a	11,6 \pm 0,3 ^b	13,2 \pm 0,5 ^a	13,5 \pm 0,5 ^a

Интерес к пищевым волокнам как компонентам БАД определяется многочисленными доказательствами (полученными как в экспериментальных, так и в эпидемиологических и клинических исследованиях) их значения для снижения риска ряда хронических заболеваний, в том числе онкологических, сердечно-сосудистых, диабета, ожирения [11,13]. Кроме того, пищевые волокна могут влиять на процессы всасывания ксенобиотиков в кишечнике, повышать скорость их экскреции, снижать действующую концентрацию за счет усиления адсорбирования и выведения, влиять на биотрансформацию соединений, в метаболизме которых участвуют ферменты кишечника, и кишечной микрофлоры [6,13]. Так, в наших предыдущих исследованиях [7] было показано, что обогащение рациона крыс пищевыми волокнами типа лигнина приводит к значительному усилению выведения Т-2-токсина и его глюкуронидов с калом при одновременном снижении их экскреции с мочой, что указывает на усиление связывания токсина и его метаболитов в просвете желудочно-кишечного тракта и подавление их печеночно-кишечной рециркуляции. Одновременно возрастало образование и выведение метаболитов - продуктов деацетилирования Т-2-токсина, что сопровождалось повышением в тонкой кишке крыс активности микросомальной карбоксилэстеразы - фермента, осуществляющего последовательное деацетилирование токсина.

Пшеничные отруби, использованные в данной работе, относятся к числу лучших источников пищевых волокон в питании человека. Установлено, что по своим адсорбционным свойствам они намного превосходят овсяные, ячменные и кукурузные отруби [16]. В эксперименте на животных выявлено также, что пшеничные отруби оказывают более выраженное подавляющее действие на

опухолеобразование, чем овсяные и кукурузные отруби. При включении в рацион пшеничных (но не овсяных и кукурузных) отрубей значительно снижался уровень некоторых промоторов канцерогенеза в толстой кишке человека [21]. В последние годы установлено, что пшеничные отруби наряду с пищевыми волокнами содержат ряд биологически активных соединений, обладающих хемопротекторными свойствами, - флавоноиды, фенольные кислоты, фитоэстрогены [12, 21].

Именно с наличием этих соединений связывают способность пшеничных отрубей модулировать пути активации и детоксикации чужеродных соединений за счет изменения активности и экспрессии ферментов метаболизма ксенобиотиков [17, 20].

Показано [20], что включение в корм крыс 10% пшеничных отрубей не влияет существенно на активность ферментов метаболизма ксенобиотиков, а увеличение содержания отрубей до 20% приводит к активации отдельных изоформ цитохрома Р-450 и умеренному подавлению активности глутатионтрансферазы и метилумбеллиферил-UDP-глюкуронозилтрансферазы в печени. В наших исследованиях включение рацион 5% пшеничных отрубей (в виде БАД) не сопровождалось достоверными изменениями общего содержания цитохрома Р-450 и активности глутатионтрансферазы и р-нф-UDP-глюкуронозилтрансферазы, которая, как и метилумбеллиферил-UDP-глюкуронозилтрансфераза, относится к семейству 1А (см. табл. 3). В то же время активность ГБФ-UDP-глюкуронозилтрансферазы, относящейся к семейству 2В, значительно превышала уровень в контроле. Необходимо отметить, что ГБФ-UDP-глюкуронозилтрансфераза является одной из изоформ, активно участвующих в образовании глюкуроноидов Т-2-микотоксина и других трихотеценовых микотоксинов, на долю которых приходится более половины всех экскретируемых метаболитов [4, 22].

Результаты проведенных исследований и анализ данных литературы позволяют заключить, что защитный эффект изученной БАД при алиментарном Т-2-микотоксикозе связан прежде всего с адсорбционными свойствами пшеничных отрубей и влиянием их на токсикокинетику (всасывание и выведение) токсина. Обнаруженное нами значительное повышение в печени крыс, получавших рацион с БАД, активности ГБФ-UDP-глюкуронозилтрансферазы указывает на возможное влияние пшеничных отрубей и на процессы биотрансформации (детоксикации) Т-2-токсина.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дингл Г. Лизосомы. Методы исследования. - М., 1980. - 350 с.
2. Кравченко Л.В., Авреньева Л.И., Тутельян В.А. // Вопр. питания. - 2000. - № 5. - С. 20-23.
3. Кравченко Л.В., Соболев В.С. // Бюл. экспер. биол. - 1989. - №8.-С. 179-181.
4. Обольский О. Л., Кравченко Л.В., Авреньева Л.И., Тутельян В. А. // Вопр. питания. -1998. - № 4. - С. 18-23.
5. Тутельян В.А. // Там же. - 1996. - № 6. - С. 3-11.
6. Тутельян В. А, Бондарев Г.И., Мартинчик А. Питание и процессы биотрансформации чужеродных веществ. — М.: ВИНТИ, 1987.-212 с.
7. Тутельян В.А., Кравченко Л. В., Соболев В.С. и др. // Токсикол. вести. - 1994. - № 1. - С. 16-20.
8. Экспериментальное обоснование и клиническая эффективность применения Рекицена - РД при сальмонеллезе у детей: Метод. рекомендации. - Киров: Минздрав РФ, 2000. - 18 с.
9. Bock K. W., Clausbruch U.C. V., Kaufmann R. et al // Biochem. Pharmacol. - 1980. - Vol. 29. - P. 495-500.
10. Burchell B., Weatherill P. // Methods Enzymol. - 1981. - Vol. 77. - P. 169-176.
11. Dietary Reference Intakes: Proposed Definition of Dietary Fiber. - Washington: National Academic Press, 2001.
12. Ferguson L.R, Harris P.J.//Eur.J.Cancer Prev.- 1999. -Vol.8. - P. 17-25.
13. GallaherD.D., Schneeman B.O. Present Knowledge in Nutrition. - Washington: ILSI Press, 1996. - P. 87-97.
14. Galvano F., Piva A., Ritieni A., Galvano G. //]. Food Prot. - 2001.-Vol. 64. - P. 120-131.
15. Habig W.H., Pabst M.J., Jacoby W.B. // J. Biol. Chem. - 1974. - Vol. 294.-P. 7130-7139.
16. Harris P.J., Sasidharan V.K., Robertson A.M. et al. // Mutat. Res. - 1998.-Vol.412.-P. 323-331.
17. Kestell P.,Zhao L., Zhu Set al. //Carcinogenesis.- 1999. - Vol. 20. - P. 2253-2260.
18. Lake B.G. Biochemical Toxicology: A Practical Approach. - Oxford, 1987.- P. 183-202.
19. Mendoza C.E., Shields J.B., Phillips W.E. // Comp. Biochem. Physiol.- 1971.- Vol. 40(B). - P. 841-854.
20. Nelsby N.A., Zhu S., Pearson A.E. et al. // Mutat. Res. - 2000. - Vol. 454. - P. 77-88.
21. Reddy B.S. //Am. J. Med. - 1999. - Vol. 106. - P. 16S-19S.
22. Swanson S.P., Corley R.A. Trichothecene Mycotoxicosis: Pathophysiological effects. - Florida: CRC Press, 1989. - P. 37-61.