

На правах рукописи

ФЛОРИДА РАДИК кызы ЯХЪЯЕВА

**ИНДУЦИРОВАННЫЕ ОКИСЛИТЕЛЬНО-
ДЕСТРУКТИВНЫЕ ПРОЦЕССЫ В ЭРИТРОЦИТАХ С
РАЗЛИЧНЫМ СТАТУСОМ СЕЛЕНА**

2406.01 – Биофизика

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

диссертации на соискание ученой степени
доктора философии по биологии

БАКУ-2014

**Работа выполнена в лаборатории Экологической биофизики
Института Физики НАН Азербайджана**

**Научный руководитель:
доктор биологических наук**

Т.М. ГУСЕЙНОВ

Официальные оппоненты:

**доктор химических наук,
профессор**

Л.Н. ШИШКИНА

**доктор биологических наук,
профессор**

И.Н. АЛИЕВА

Ведущая организация: Кафедра биохимии Азербайджанского
Медицинского Университета

Защита состоится «_04_» _04_____ 2014 г. в «_____» часов на
заседании разового Диссертационного Совета D01.061 при Институте
Ботаники НАН Азербайджана по адресу: г. Баку, AZ1073,
Бадамдарское Шоссе 40

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института Ботаники
НАН Азербайджанской Республики

Автореферат разослан «_____» _____ 2014 г.

**Ученый секретарь
Диссертационного Совета D01.061
доктор биологических наук,
профессор**

С.Д. ИБАДУЛЛАЕВА

Əlyazma hüququnda

FLORİDA RADİK QIZI YAHYAYEVA

**MÜXTƏLİF SELEN STATUSUNA MALİK OLAN
ERİTROSİTLƏRDƏ İNDUKSİYALAŞAN
OKSİDLƏŞDİRİCİ-DESTRUKTİV PROSESLƏR**

2406.01 – Biofizika

biologiya üzrə fəlsəfə doktoru elmi dərəcəsi
almaq üçün təqdim olunmuş dissertasiyanın

A V T O R E F E R A T I

BAKI – 2014

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. В настоящее время человечество все острее испытывает последствия техногенного развития. В частности, гигантский рост промышленности, энергетики, средств связи, транспорта, химизации сельскохозяйственного производства, проблемы больших городов и т.д., коренным образом влияют на экологическую обстановку. В результате техногенного развития сочетание этих факторов привело к возникновению серьезных экологических проблем: кислотные дожди, озоновые дыры, загрязнение природной среды (в том числе воздуха и водоемов) тяжелыми металлами и токсичными химическими соединениями, что является одной из главных причин появления новых ранее неизвестных заболеваний, приобретающих признаки пандемий. К ним относятся СПИД, вирусные гепатиты, вирусы птичьего и свиного гриппа (Taylor E.W., 1997; Campa A. et al., 2000). В то же время имеет место значительный количественный рост хорошо известных заболеваний, таких как сердечно-сосудистые, онкологические, нервные, эндокринные и др. (Gladyshev V.N. et al., 1999; Korpinen L. et al., 2005; Ebi K. et al., 2009). Следствием этого стала необходимость создания всеобъемлющей системы отслеживания за состоянием окружающей среды, создания строгого контроля всех неблагоприятных изменений в экологической обстановке, которые могут происходить при воздействии различных антропогенных факторов.

Конкретные механизмы, связывающие глобальные изменения в ноосфере с теми или иными патологиями, пока еще не раскрыты, что затрудняет принятие адекватных мер. Вместе с тем, за последние 10-15 лет наметился некоторый прогресс в этой области. Многочисленные исследования показывают, что нехватка в питании некоторых элементов, в том числе селена, возможно, играет критическую роль в развитии самых грозных заболеваний нашего времени (Taylor E.W., 1997; Низамова А.Ф. и др., 2008).

В данной работе представлены результаты экспериментальных исследований биохимических сдвигов в клетке (на примере эритроцитов) под влиянием таких физических факторов окружающей среды, как электрические поля высокой напряженности (ЭПВН), УФ-облучение, озон. Обнаружено участие селена, как составной части антиокислительной системы клеток, регулирующей уровень свободнорадикальных окислительно-деструктивных процессов, индуцированных этими факторами.

Это приводит к выводу о возможной минимизации их последствий посредством использования селена, как природного антиоксиданта.

Цель работы: Выявление механизмов окислительно-деструктивных процессов в эритроцитах, индуцированных некоторыми распространенными физическими факторами окружающей среды (ЭПВН промышленной частоты, УФ-облучение, озон) и участие в них селена в качестве природного антиоксиданта, регулирующего интенсивность окислительных реакций в биологических системах.

Для ее достижения были поставлены следующие задачи:

1. Изучение закономерности развития индуцированных окислительных процессов в эритроцитах (суспензии и лизаты) морской свинки и крысы – животных, существенно отличающихся по метаболизму селена.

2. Рассмотрение возможности использования крови беременных женщин, как природной модели селендефицитного состояния организма и его клеток (эритроцитов), для изучения антиокислительных свойств эритроцитарных селенопротеинов:

а) установление современного статуса селена жителей Азербайджана;

б) выявление связи между изменением содержания селена в крови (и в эритроцитах) и активности селеноэнзима глутатионпероксидазы в течение беременности.

3. Установление возможной связи между насыщенностью селеном гемоглобина и его пероксидазной активностью.

4. Исследование закономерности развития окислительно-деструктивных процессов в селендефицитных эритроцитах при воздействии рассматриваемых повреждающих факторов внешней среды.

Научная новизна и практическое значение работы: Показано, что начальным звеном окислительного повреждения эритроцитов, индуцированных факторами внешней среды (ЭПВН, УФ-облучение, озон), является окислительная модификация гемоглобина. В его противоокислительной протекции принимает участие селен, антиокислительный эффект которого не ограничивается лишь известным глутатионпероксидазным механизмом утилизации гидропероксидов. Включение селена в гемоглобиновую фракцию придает ей бóльшую окислительную резистентность. При этом установлена видовая специфичность средства селена к гемоглобину. Также установлено, что пероксидазная активность гемоглобиновой фракции косвенно связана с содержанием селена в ней, и она также имеет видовую специфичность.

Установлены новые нормативы статуса селена жителей Азербайджана, которые свидетельствуют о его значительном уменьшении по сравнению с нормативами 70 гг. прошлого века.

Продemonстрировано, что содержание селена в крови (и в эритроцитах) в ходе беременности может уменьшаться в 2 и более раз, достигая критических дефицитных значений (<50 мкг/л) при том, что падение активности глутатионпероксидазы (ГП) менее заметно (менее 50 %). Это означает, что оценку селенового статуса беременных женщин необходимо производить непосредственно по определению селена в крови, а не по измерению глутатионпероксидазной активности. Столь значительное уменьшение селенового статуса при беременности представляет реальную угрозу для здоровья плода, женщин и новорожденных, и требует принятия адекватных мер для его коррекции, как в ходе беременности, так и в послеродовой период.

Учитывая широкое распространение изучаемых факторов в окружающей среде, и их отрицательное влияние на здоровье людей, в том числе беременных женщин, результаты этой работы являются полезными для выработки рекомендаций в целях обогащения ряда продуктов питания селеном и другими важными минералами для увеличения резистентности организма к развитию различных патологий.

Апробация диссертационной работы: Результаты диссертационной работы были представлены на 2-х научных конференциях аспирантов НАН Азербайджана (2005, 2006); 4-х международных научных конференциях «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем», Минск, Беларусь (2004, 2006, 2010, 2012); 3-х международных научных конференциях в Турции (2006, 2008, 2009); VI съезд биофизиков России, Симпозиум III «Физика – медицине и экологии», Нижний Новгород, 2012 и др.

Публикации: По теме диссертации опубликовано 24 работы, в том числе 6 журнальных статей, 11 статей и 7 тезисов в материалах конференций.

Структура диссертации: Диссертационная работа изложена на 168 страницах, содержит 55 рисунков и 4 таблицы. Состоит из введения, обзора литературы (Глава I), описания материалов и методов (Глава II), описания результатов экспериментов и их обсуждения (Главы III, IV, V), заключения (Глава VI), выводов, списка использованной литературы (273 источника).

I. Действие некоторых физических факторов окружающей среды на биообъекты (Обзор литературы)

В обзоре литературы проведен критический анализ сведений касающихся экологических проблем окружающей среды,

окислительного стресса и прочих вопросов, связанных с темой диссертационной работы.

II. Материалы и методы исследования

Материалы исследования. Объектом исследования служила кровь животных, существенно отличающихся по метаболизму селена. Эксперименты проводились на самцах белых беспородных крыс (*Albino rat* – lat.) (n=36) и морских свинок (*Cavia porcellus* – lat.) (n=24), массами 150-180 г и 300-400 г, соответственно, которые содержались в обычных условиях вивария. Также использовали донорскую кровь волонтеров (n=48) и женщин детородного возраста (n=86) с различным сроком беременности в возрасте от 18-ти до 45-ти лет. Волонтеры и беременные женщины не получали витаминно-минеральные препараты, могущие влиять на статус селена в крови. Компоненты венозной крови получали обычным методом центрифугирования (Dodge J. et al., 1963). В качестве факторов окислительной деструкции использовали УФ-облучение (доза облучения 0-200 кДж/м²), электрические поля высокой напряженности промышленной частоты (50 Гц, напряженность поля до 100 кВ/м) и озон (концентрация до 20 мкг/л).

Методы исследования:

– разделение селенсодержащих протеинов лизатов эритроцитов производили колоночным гель-хроматографическим способом (Sephadex G-75 и G-150) (Wendel A., 1980);

– состояние окисленных форм гемоглобина определяли по формулам: $[HbO_2] = 29,8A_{577} - 98,0A_{630} - 22,2A_{560}$,

$$[MetHb] = 7,0A_{577} + 76,8A_{630} - 13,8A_{560},$$

$$[гемихром] = 33,2A_{577} - 36,0A_{630} + 58,2A_{560},$$

где A_{577} , A_{630} и A_{560} – экстинкции проб на длинах волн, равных соответственно 577 нм, 630 нм и 560 нм (Szebeni J. et al., 1984);

– накопление MetHb определяли спектрофотометрическим методом (СФ-46) по значению оптической плотности при $\lambda=630$ нм;

– уровень перекисного окисления мембранных липидов эритроцитов оценивали по накоплению продуктов реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (малоновый диальдегид) (Mengel C.F., 1966);

– активность фермента глутатионпероксидазы определяли спектрофотометрически по методу Моина (Моин В.М., 1986);

– статус селена оценивали по его содержанию в крови флуориметрическим методом на флуориметре ФАС-2 (первичный фильтр $\lambda=365$ нм, вторичный фильтр $\lambda=540$ нм) с использованием реагента – 2,3'-диаминонафталина (Назаренко И.И. и др., 1975).

Статистическая обработка полученных результатов: Все полученные экспериментальные данные обрабатывали с использованием t-критерия Стьюдента (Худсон, 1990).

III. Результаты исследования и их обсуждение

3. Селен как противоокислительный фактор в эритроцитах животных, отличающихся по метаболизму селена

3.1. Распределение селена в эритроцитах морской свинки и крысы

Опытным путем установлены видовые различия в содержании селена в крови, плазме и эритроцитах, и активность эритроцитарного селеноэнзима глутатионпероксидазы животных, существенно отличающихся метаболизмом селена. Так, содержание селена в цельной крови для крысы составляет $0,22 \pm 0,04$ мкг/мл ($n=5$), для морской свинки – $0,14 \pm 0,03$ мкг/мл ($n=5$), а активность ГП в цельной крови – $601,8 \pm 20,3$ мкМоль GSH/мин на 1г Hb и $184,5 \pm 8,5$ мкМоль GSH/мин на 1г Hb – для крысы и морской свинки соответственно. В эритроцитах крысы и морской свинки содержание селена равно $0,34 \pm 0,05$ мкг/мл и $0,20 \pm 0,04$ мкг/мл, а ГП активность составляет $771,2 \pm 25,3$ и $266,8 \pm 8,3$ мкМоль GSH/мин на 1г Hb.

В наших опытах мы установили, что гемоглобин морской свинки и человека (объекты близкие по содержанию селена и его метаболизму) включает в себя 70-90% внутриэритроцитарного селена, и, наоборот, в эритроцитах крысы селен преимущественно включается в энзим глутатионпероксидазу, таким образом $\frac{3}{4}$ всего селенового пула охватывается ГП, т.е. содержание селена в гемоглобине зависит не только от диетарных условий, но еще имеет видовую специфичность. В частности, гемоглобин морской свинки и человека включает \approx в 2,5-3 раза больше селена, чем гемоглобин крысы, при том, что эритроциты крысы богаче селеном (>50%), чем эритроциты морской свинки и человека.

Включение селена в гемоглобиновую фракцию эритроцитов ставит вопрос о его возможном влиянии на антиокислительные свойства гемоглобина. С этой целью в опытах *in vivo* эритроциты морской свинки и крысы были обогащены селеном (парентеральное введение селенита натрия (Na_2SeO_3) 0,5 мг/кг массы животного) с 2-х и 48-ми часовыми экспозициями. Учитывая, что селен включается в гемоглобин уже в первые 2 ч после введения его животным, а синтез *de nova* молекул белка глутатионпероксидазы происходит в печени, и в эритроцитах активность глутатионпероксидазы максимальна на 2-3-е сутки (McConnell J.G., 1972; Wendel A., 1980; Гусейнов Т.М., 1993, 2002),

забор крови был проведен спустя 2 и 48 часов после введения препарата. Эти сроки были выбраны исходя из известных фактов активного включения экзогенного селена в гемоглобиновую фракцию уже в первые 1,5-2 часа после введения с последующим спадом к 24–48 часам. Использование разницы в скорости накопления селена и активности энзима глутатионпероксидазы открывает возможность изучения действия селена на образование метгемоглобина и антиоксидантную активность в условиях отсутствия дополнительного вклада энзима глутатионпероксидазы.

Соответствующие эксперименты по изучению окислительной резистентности гемоглобина, обогащенного селеном, вне действия ГП механизма, при индуцированном окислительном процессе (УФ воздействие, электрические поля высокой напряженности), приведены в разделах 3.2. и 3.4. Они показывают, что в условиях отсутствия заметного роста активности глутатионпероксидазы, вводимый селен оказывает АО эффект: замедление накопления метгемоглобина в лизатах эритроцитов, окислительного гемолиза, и накопления ТБК активных продуктов в суспензии эритроцитов морской свинки и крысы. Сравнение кинетики развития окислительного гемолиза и накопления метгемоглобина показывают, что накопление метгемоглобина происходит раньше наступления окислительного гемолиза, что свидетельствует о том, что окисление гемоглобина является первичным звеном окислительной деградации эритроцитов.

3.2. Фотоокислительные процессы в эритроцитах (на примере морской свинки)

Изучалась кинетика образования окисленных форм гемоглобина в лизатах эритроцитов морской свинки. Пасту эритроцитов разводили Na-фосфатным буфером (10 mM Na-фосфат pH 7,4 на 0,07 M NaCl) в соотношении 1:10, в котором инкубировали эритроциты в течение 8-и часов ($t=6^{\circ}\text{C}$) до полного гемолиза; далее образцы центрифугировали при 1000g в течение 10 мин. Полученные супернатанты помещались в бюксы с пластмассовыми, прозрачными для УФ-света крышками; они ставились на магнитную мешалку, далее образцы повергались воздействию интегрального УФ-излучения лампы СВД-120А (спектральный диапазон $\approx 240\text{--}650$ нм) с интенсивностью излучения $\approx 12,5\text{--}50$ Вт/м², и через каждые 15 минут в течение 105 минут проводили отбор проб на содержание окисленных форм гемоглобина и активности ГП в лизате.

Первая серия опытов была посвящена изучению фотоокисления гемоглобина в лизатах эритроцитов, выделенных из морских свинок, через 2 и 48 часов, после введения селенита натрия. Опыты показали (рис. 1), что интенсивное УФ-облучение лизатов эритроцитов (120–180 кДж/м²) приводит к заметному образованию метгемоглобина, которое более выражено в лизатах эритроцитов, полученных из морских свинок через 2 часа, чем в лизатах эритроцитов животных, выделенных через 48 часов после введения им селенита натрия.

Таблица 1. Содержание селена (мкг/г Hb) в гемоглибиновой фракции лизатов эритроцитов морской свинки с 2-х и 48-ми часовыми сроками после введения селенита натрия*

Контроль	Опыт	
	2 часа	48 часов
0,84±0,11	1,78±0,17 (p≤0,01)	1,41±0,12 (p≤0,02)

*Условия гель-хроматографического выделения гемоглибиновых фракций лизатов эритроцитов морской свинки аналогичны для лизатов эритроцитов беременных женщин. Содержимое колонки делилось на две части: «неокрашенную» и «окрашенную» фракции. В последней определяли содержание селена.

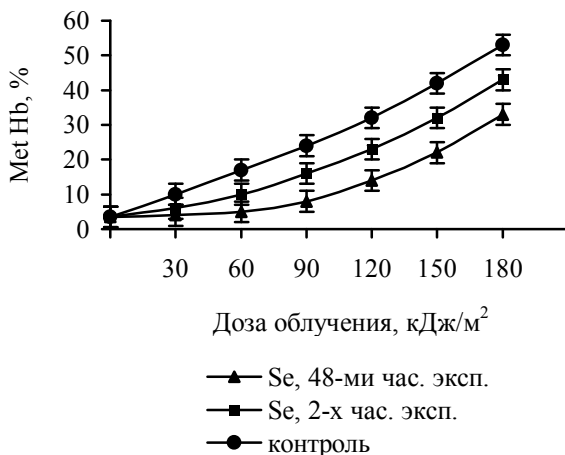


Рис. 1. Кинетика накопления MetHb при УФ-облучении в лизатах эритроцитов морской свинки, обогащенные селеном с 2-х (n=3) и 48-ми (n=3) часовыми экспозициями

ГП активность в лизатах эритроцитов, полученных из морских свинок через 2 часа после введения селенита натрия, не изменяется, в то время как она возрастает \approx в 2 раза через 48 часов после введения препарата. При этом содержание селена в опытных лизатах эритроцитов \approx в 1,7 и 1,4 раза, соответственно, превышает контрольный уровень. Содержание селена в гемоглибиновых фракциях лизатов эритроцитов морской свинки с 2-х и 48-ми часовыми сроками после подкожного введения селенита натрия приведены в таблице 1. Как видно из сравнений данных, приведенных в таблице 1, введение в организм морской свинки селенита натрия приводит к преимущественному накоплению селена в гемоглибиновой фракции лизатов эритроцитов. Этот эффект максимален для случая 2-х часовой экспозиции селенита натрия в организме морской свинки. Отсюда можно заключить, что включаемый в гемоглибиновую фракцию селен может увеличивать окислительную устойчивость гемоглобина к индуцированному УФ-облучению и без дополнительного участия глутатионпероксидазы.

Касательно механизма торможения накопления метгемоглобина селеном, можно сделать определенные предположения, основанные на известных фактах и допущениях: глобин защищает гем от окислительного воздействия (Грей Г.Б., 1978); селен замещает серу в цистеине 93 вблизи от иона железа; электроотрицательность селена меньше, чем серы, что уменьшает электронную плотность у иона железа, а это уменьшает вероятность переноса электрона от металла на кислород, т.е. окисление гема.

Аналогичные результаты получены и на эритроцитах крысы.

3.3. Озониндуцированные окислительные процессы в эритроцитах морской свинки и крысы

Изучено влияние озона, полученного из электрического коронарного разряда, на развитие окислительных реакций в эритроцитах и в самом гемоглибине морской свинки и крысы.

Была рассмотрена кинетика окисления озоном как гемоглобина в лизате эритроцитов полученного путем полного гемолиза дистиллированной водой и с последующим доведением 0,1 М буферным раствором фосфата натрия (рН 7,4) до гематокрита \approx 1, так и гемоглобина в эритроцитарной суспензии (гематокрит \approx 1). Наибольшую устойчивость к окислению в обоих случаях показывает морская свинка, наименьшую – крыса; человек и кролик (взятые для сравнения) – занимают промежуточное положение (рис. 2 а, б).

В этих же пробах рассмотрен гемолиз, индуцированный озоном. Процент гемолиза оценивали по соотношению оптической плотности A_{540} аликвоты к оптической плотности A_{540}^* , полностью гемолизированной водой, аликвоте. Оказалось, что различия в кинетике окислительного гемолиза эритроцитов морской свинки и крысы менее значительны, чем для кинетики накопления метгемоглобина в них.

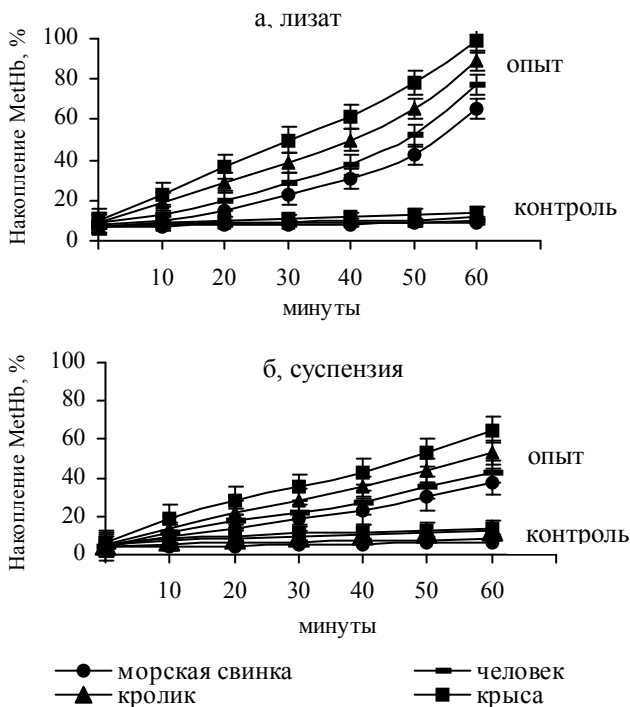


Рис. 2. (а, б) Кинетика накопления MetHb в лизате и суспензии эритроцитов (гематокрит 1) разных видов животных и человека при воздействии озона (10 мкг/л)

3.4. Действие электрических полей на эритроциты морской свинки и крысы

Предварительные опыты показали, что электрические поля напряженностью 10-30 кВ/м при 5-ти часовой экспозиции достоверно не влияют на развитие окислительной деструкции эритроцитов обоих видов животных.

Эти данные свидетельствуют о том, что окислительный стресс может иметь место при высоких дозах воздействия электрических полей. Поэтому нами выбрано воздействие электрических полей дозой до 100

кВ/м при 5 часовой экспозиции. При этом удалось обнаружить, что пороги чувствительности к электрическим полям высокой напряженности для эритроцитов морской свинки и крысы близки между собой: ≈ 75 кВ/м и ≈ 70 кВ/м. В целях выявления защитного АО эффекта селена, вне участия ГП-механизма, нами было произведено предварительное обогащение эритроцитов обоих видов животных селеном с различным сроком экспозиции: 2 и 48 часов (см. раздел 3.1.).

Эти опыты показали, что обогащенные селеном клеточные образцы (т.е. не подвергнутые действию поля) показывают близкие к контролю уровни развития окислительных процессов (накопление метгемоглобина и окислительный гемолиз), в то время как электрические поля высокой напряженности ускоряют, а экзогенный селен ингибирует их (рис. 3 (а, б) и 4 (а, б)).

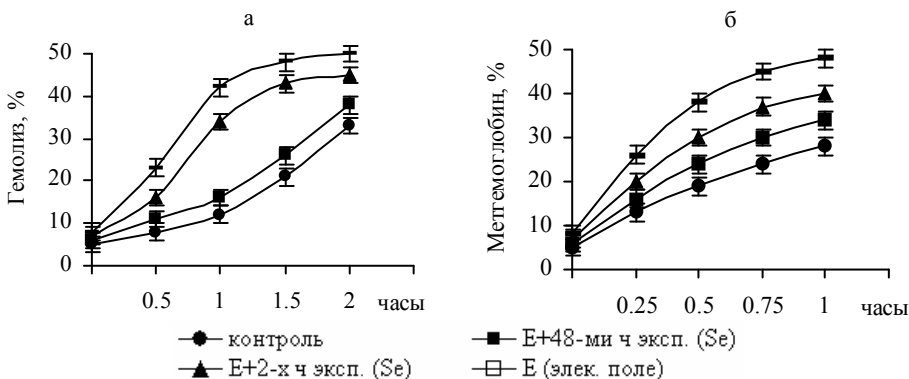


Рис. 3. (а, б) Кинетика развития гемолиза и накопления метгемоглобина в эритроцитах (гематокрит 2) крысы при аэробном инкубировании при $+37^{\circ}\text{C}$ после воздействия электрического поля 100 кВ/м при 5-ти час. экспозиции

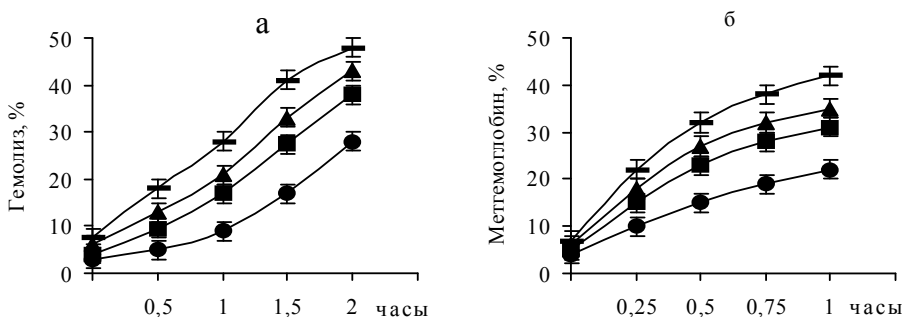


Рис. 4. (а, б) Кинетика развития гемолиза и накопления метгемоглобина в эритроцитах (гематокрит 2) морской свинки при аэробном инкубировании при $+37^{\circ}\text{C}$ после воздействия электрического поля 100 кВ/м при 5-ти час. экспозиции

Полученные результаты свидетельствуют о значительном уменьшении его статуса: содержание селена в крови ≈ 90 мкг/л против ≈ 120 мкг/л, установленного в начале 70 гг. XX века. Также установлено наличие тесной корреляции между содержанием селена и активностью ГП ($r \approx 0,71$), что подтверждает низкий уровень обеспеченности селеном населения страны (при высоком статусе селена нет коррелятивной связи между содержанием селена и активностью глутатионпероксидазы) (Butler J.A., 1991).

4.2. Распределение селена и активности ГП в протеиновых фракциях лизатов эритроцитов беременных женщин

Рассмотрение профиля гель-хроматографической картины лизатов эритроцитов показывает наличие двух явно выраженных больших пиков, отражающих содержание селена и двух больших пиков, относящихся к активности ГП. Очевидно, что за первый селенсодержащий пик (1-5 фракции) отвечает «неокрашенный» глутатионпероксидазный энзим массой ≈ 84 кДа, а за второй – «окрашенный» (6-12 фракции) – гемоглобин массой ≈ 64 кДа. Характерно, что в обоих селенсодержащих пиках идентифицированы высокие ГП активности. Первый селеновый пик полностью совпадает с пиком ГП активности, во втором селенсодержащем пике максимум ГП активности несколько смещен влево, т.е. нет полного совпадения максимумов в пиках содержания селена и ГП активности, что свидетельствует об определенной косвенности ГП активности для гемоглобина. Кроме того, из картины гель-хроматографического разделения можно заключить, что:

1. «ГП» активность Hb сопоставима с активностью ГП энзима;
2. Суммарное содержание селена в гемоглобиновых фракциях выше, чем для ГП содержащих фракций.

Проведение оценки распределения селена в этих двух протеиновых фракциях показало, что ГП энзим охватывает $\approx 30\%$ общего эритроцитарного Se, а $\approx 70\%$ приходится на гемоглобиновую фракцию. Между тем в регионах с высокой обеспеченностью селеном только около 10% внутриэритроцитарного Se связывается энзимом ГП (Butler J.A. et al., 1982). Относительно высокий процент связывания внутриэритроцитарного селена глутатионпероксидазой говорит о низком статусе селена в Азербайджане.

Другим важным подтверждением тому служат опыты, показывающие изменение содержания селена в лизате эритроцитов беременных женщин, а также непосредственно в гемоглобиновых

фракциях, выделенных из лизатов эритроцитов женщин на начальных (n=6) и поздних (n=6) сроках беременности. Оказалось, что содержание селена в ходе беременности в гемоглибиновой фракции падает в $\approx 2,3$ раза, а в самих лизатах в $\approx 1,7$ раза, в то время как активность ГП лизата уменьшается на $\approx 15\%$, а «ГП» активность самих гемоглибиновых фракций уменьшается на $\approx 30\%$. Отсюда следует, что в ходе беременности происходящее уменьшение селенового статуса организма затрагивает гемоглибиновую фракцию, ослабляя ее загруженность селеном.

Полученные результаты интересны в том смысле, что они фактически свидетельствуют о наличии определенной связи между загруженностью селеном гемоглибина и его «ГП» активностью. В частности, бесспорно уменьшение количества селена в крови, плазме, эритроцитах и других форменных элементах крови в ходе беременности. Уменьшение содержания селена в эритроцитах сопровождается, в первую очередь, уменьшением его содержания в гемоглибине. Здесь важно то, что изменение содержания селена в гемоглибиновых фракциях происходит на фоне падения «ГП» активности в самой гемоглибиновой фракции, т.е. имеет место определенная параллельность этих событий.

5. Окислительные процессы в эритроцитах беременных женщин, индуцированные неблагоприятными физическими факторами окружающей среды

Здесь рассмотрено влияние «обеднения» эритроцитов селеном на развитие индуцированного факторами внешней среды окисления гемоглибина и на ГП активность. Сравнительное изучение действия ЭПВН, УФ-облучения, озона на эритроциты женщин на начальных и поздних сроках беременности показало, что эритроциты женщин на начальных сроках беременности оказываются более устойчивыми к их окислительному действию.

В частности, на примере фотоокисления (>100 кДж/м²) лизатов эритроцитов было продемонстрировано наличие отрицательной корреляции между накоплением метгемоглибина и содержанием селена в гемоглибиновой фракции, изменяющегося в ходе беременности.

Существенное уменьшение активности глутатионпероксидазы в лизатах эритроцитов при их облучении высокими дозами УФ (>100 кДж/м²) на фоне глубокого фотоокисления гемоглибина, наводит на мысль о том, что наряду с падением активности самого энзима

глутатионпероксидазы, возможна и потеря пероксидазной активности гемоглобина, вносящей вклад в суммарную ГП активность лизатов.

Рассматривая ГП активность гемоглобина, как возможный АО фактор, представлялось интересным проследивание ее изменения при УФ окислительной деструкции гемоглобина, в зависимости от его насыщения селеном. С этой целью мы провели гель-хроматографическое разделение лизатов эритроцитов у женщин на начальных и поздних сроках беременности, подвергнутых действию УФ-облучения, аналогично тому, как это описано выше. УФ-облучение лизатов проводилось высокими дозами (≥ 200 кДж/м²) с целью создания заметной окислительной деструкции гемоглобина.

Эти опыты показали, что фотоокисление лизатов эритроцитов приводит к уширению «окрашенной» полосы в хроматографической колонке, и это уширение больше для лизатов эритроцитов у женщин на поздних сроках беременности, чем для лизатов эритроцитов у женщин на начальных сроках беременности ($\approx 20\%$ и $\approx 12\%$ соответственно). Также обнаружено, что фотоокисление приводит к миграции селена из нижних «окрашенных» фракций в верхние, а самое главное, на наш взгляд, это то, что происходит уменьшение, наряду с истинной ГП активностью («неокрашенной» фракции) и «ГП» активности гемоглобина, т.е. происходит фотоокислительная деструкция гемоглобина, которая сопровождается также и вымыванием селена. Отражением этой дефрагментации является падение «ГП» активности гемоглобина.

Совокупность полученных экспериментальных данных позволяет утверждать, что включаемый в гемоглобиновую фракцию селен принимает участие в лимитировании уровня окислительных реакций, индуцированных, различными по своей природе, физическими факторами окружающей среды (УФ-облучение, озон, электрические поля высокой напряженности), а его дефицит приводит к уменьшению окислительной (противоокислительной) резистентности организма к внешним воздействиям.

ОСНОВНЫЕ ВЫВОДЫ

1. Различные по своей природе и механизму воздействия физические факторы окружающей среды (ЭПВН, УФ-облучение, озон) индуцируют развитие окислительно-деструктивных процессов в изолированных эритроцитах морской свинки, крысы, человека. Их интенсивность зависит от доз воздействия. Установлены пороги развития

окислительных реакций для ЭПВН $> 30 \text{ кВ/м} * 5 \text{ часов}$; для УФ-облучения $\geq 50 \text{ кДж/м}^2$ и для озона $> 10 \text{ мкг/л} * 30 \text{ минут}$.

2. Установлено, что начальным звеном индуцированного окисления эритроцитов является окислительная модификация гемоглобина (накопление метгемоглобина и др.), которая предшествует окислительному гемолизу. Лаг-периоды накопления метгемоглобина \approx в 2 раза короче лаг-периода гемолиза.

3. Показано, что обеспеченность селеном эритроцитов играет существенное значение для регуляции окислительных реакций. Экзогенное обогащение селеном эритроцитов (парентеральное введение селенита натрия – $0,5 \text{ мг/кг}$) усиливает окислительную резистентность эритроцитов животных путем повышения активности ГП и за счет обогащения селеном гемоглобина, а дефицит селена (модель – кровь беременных женщин) приводит к интенсификации перекисного окисления липидов эритроцитов и ускорению накопления MetHb.

4. Распределение внутриэритроцитарного селена имеет видовую специфичность. У крыс около 75 % селена включено в ГП фракцию, $< 25 \%$ – в гемоглобиновую фракцию. Для морской свинки и человека наоборот – 15-30 % включено в ГП фракцию и 70-85 % – в гемоглобиновую фракцию. Общее содержание селена в эритроцитах крысы $> 1,5$ раз превышает его концентрацию в эритроцитах человека и морской свинки.

5. Произведена оценка современного статуса селена в Азербайджане (на примере г. Баку), которая указывает на то, что в Азербайджане имеет место значительное уменьшение обеспеченности селеном его жителей по сравнению с 70 гг. XX столетия – $\approx 90 \text{ мкг/л}$ против $\approx 120 \text{ мкг/л}$ в крови. Установлено наличие тесной корреляции ($r \approx 0,71$) между содержанием селена и активностью селеноэнзима глутатионпероксидазы в крови, что является косвенным свидетельством низкой обеспеченности селеном жителей региона.

6. Показано, что в течение беременности содержание селена в крови женщин в Азербайджане уменьшается до критической величины ($\approx 40 \text{ мкг/л}$), т.е. \approx в 2 раза, а активность ГП в эритроцитах снижается не более чем на 30-50 %, что указывает на необходимость контроля статуса селена непосредственным измерением его содержания в цельной крови и целесообразность диетарной селеновой коррекции.

7. В процессе беременности в гемоглобиновой фракции лизатов эритроцитов отмечено уменьшение содержания селена (до ≈ 2 раз), которому сопутствует падение квазиглутатионпероксидазной

активности (до 30%) гемоглобиновой фракции, что свидетельствует о наличии определенной связи между этими показателями.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Гусейнов Т.М., Мамедов Н.А., Гулиева Р.Т., Яхьяева Ф.Р. Озон как окислитель в эритроцитах животных, отличающихся метаболизмом селена / Межд. науч. конф. «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем». VI съезд Белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков. Минск, Беларусь, 6-8 октября, 2004, Сб. ст., т. I, с. 162-164
2. Яхьяева Ф.Р. Селен как антиокислительный «лиганд» в белках (на примере гемоглобина) / Материалы научной конференции аспирантов НАНА. Баку: Елм, 2005, с. 24-25
3. Гусейнов Т.М., Яхьяева Ф.Р., Гулиева Р.Т. Протекторное действие селена от неблагоприятного фактора окружающей среды // *Reproduktiv sağlamlıq və perinatologiya*, 2005, № 3, с. 48-52
4. Yahyaeva F.R., Guliyeva R.T., Mamedova T.V., Bagirova E.C., T.M. Huseynov High tension electric fields as the factor of oxidative-destructive influence on erythrocytes at low antioxidative status / The 3rd International Conference on Technical and Physical Problems in Power engineering TPE-06. Ancara, Turkey, 29-31 May, 2006, p. 668-671
5. Яхьяева Ф.Р. Окислительное действие электрических полей высокой напряженности на эритроциты беременных женщин / Материалы научной конференции аспирантов НАНА. Баку: Елм, 2006, Сб. ст., ч. I, с. 76-80
6. Яхьяева Ф.Р., Гулиева Р.Т., Гусейнов Т.М., Сафаров Н.С. Окислительная резистентность гемоглобина при различных уровнях насыщения организма селеном / Межд. науч. конф. «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем». VII съезд Белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков. Минск, Беларусь, 21-23 июня, 2006, Сб. ст., ч. I, с. 180-182
7. Гулиева Р.Т., Яхьяева Ф.Р., Гусейнов Т.М., Дадашов М.З. Действие электрического поля высокой напряженности на окислительную

устойчивость эритроцитов с пониженным антиокислительным статусом / (там же) Минск, Беларусь, 2006, Сб. ст., ч. II, с. 170-172

8. Яхъяева Ф.Р., Гусейнов Т.М. Действие электрических полей высокой напряженности на эритроциты с пониженным статусом селена // Экоэнергетика, 2007, № 2, с. 38-40

9. Huseynov T.M., Safarov N.S., Qanbarova Sh.Q., Yahyayeva F.R., Zeynalli E.M. The environmental challenge of selenium deficiency. / 9th Baku International Congress "Energy, Ecology, Economy". Baku, 7-9 June, 2007, p. 310-313

10. Яхъяева Ф.Р., Гулиева Р.Т., Дадашов М.З., Ганбарова Ш.Г., Гусейнов Т.М. Протекторное значение селена для гемоглобина от окислительного стресса, индуцированного физическими факторами окружающей среды / Межд. конф. посвящ. 120-ти летию акад. Г. Алиева «Ekologiya və həyat fəaliyyətinin təhlükəsizliyi». Сумгаит, 6-7 Декабрь, 2007, с. 5-6

11. Гулиева Р.Т., Яхъяева Ф.Р., Гусейнов Т.М. Озон как инициатор окислительных процессов в клетках красной крови // Биомедицина, 2008, № 2, с. 30-33

12. Huseynov T.M., Dadashov M.Z., Quliyeva R.T., Yahyayeva F.R., Bagirova E.M. Mother and newborn selenium dependences / The 3rd Euro-Asian conf. on Hazardous waste and Human health. Istanbul, Turkey, 27-30 March, 2008, p. 37

13. Гусейнов Т.М., Гулиева Р.Т., Яхъяева Ф.Р. Селен как антиокислительная «примесь» в гемоглобине / Материалы III Межд. конф. «Химия, структура и функция биомолекул». Минск, Беларусь, 1-3 октября, 2008, с. 89

14. Гулиева Р.Т., Яхъяева Ф.Р. Особенности индуцированного озоном окисления эритроцитов животных с различным метаболизмом селена // Известия НАН Азербайджан, Серия биологических наук. 2008, № 5-6, с. 179-183

15. Dadashov M.Z., Guliyeva R.T., Yahyayeva F.R., Bagirova E.S., Mamedova T.V. Localization of selenium in protein fractions erythrocytes of man at long incubation at room temperature / The 2nd international biophysics congress and biotechnology at GAP and 21st National biophysics congress. Diyarbakir, Turkey, 5-9 october, 2009, P-40

16. Зейналлы Э.М., Гулиева Р.Т., Яхъяева Ф.Р. О проблеме надвигающегося дефицита селена в Азербайджане / Материалы науч.-практич. конф. посвящ. 80-и летию проф. Э.И. Ибрагимова. Центр Онкологии МЗ Азербайджана. Баку, 4-5 Апрель, 2010, с. 65-66

17. Гусейнов Т.М., Яхъяева Ф.Р. Фотохимические окислительные процессы в эритроцитах животных с отличным метаболизмом селена /

Материалы межд. науч. конф. «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем». IX-й съезд Белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков. Минск, Беларусь, 2010, Сб. ст., ч. 2, с. 332-334

18. Гусейнов Т.М., Яхьяева Ф.Р., Багирова Э.М. Беременность как природная модель состояния дефицита селена для изучения антиокислительной протекции селеном эритроцитов / Материалы межд. науч. конф. «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем». IX-й съезд Белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков. Минск, Беларусь, 2010, Сб. ст., ч. 2, с. 335-336

19. Гусейнов Т.М., Дадашов М.З., Гулиева Р.Т., Яхьяева Ф.Р. Обеспеченность селеном гемоглобина как антиокислительный фактор при стрессорных воздействиях / VIII Межд. конф. «Биоантиоксидант». Москва, Россия, 04-06 Октябрь, 2010, Тез. док. с. 132-133

20. Dadashov M.Z., Guliyeva R.T., Yahyayeva F.R., Huseynov T.M. Selenium saturation of haemoglobin as antioxidative factor at high tension electric fields action // International J. "Technical and Physical Problems of Engineering", Iran, 2011, v. 3, № 2, p. 22-25

21. Гусейнов Т.М., Яхьяева Ф.Р., Гулиева Р.Т. Влияние селена на устойчивость гемоглобина к фотоокислительным процессам // Украинский биохимический журнал, 2012, т. 84, № 2, с. 53-60

22. Гусейнов Т.М., Яхьяева Ф.Р., Гулиева Р.Т. Активность ГП – как «ранний» маркер окислительного воздействия на эритроциты / Материалы межд. науч. конф. «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем». 10-й съезд Белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков. Минск, Беларусь, 2012, Сб. ст., ч. 2, с. 173-175

23. Гусейнов Т.М., Яхьяева Ф.Р., Зейналлы Э.М., Багирова Э.Д. Распределение селена и активности глутатионпероксидазы в селеносодержащих протеиновых фракциях лизатов эритроцитов беременных женщин / VI съезд биофизиков России, Симпозиум III «Физика – медицине и экологии». Материалы докладов, Нижний Новгород, 20-26 августа, 2012, с. 63

24. Huseynov T.M., Quliyeva R.T., Dadashov M.Z., Bagirova E.J., Mamedova T.A., Yakhyayeva F.R. Oxidative stability of red blood cells with different saturation with selenium to the effects of power frequency electric field / The Eight International Conference on Technical and Physical Problems in Power engineering. Fredrikstad, Norway, 5-7 September, 2012, p. 431-434

MÜXTƏLİF SELEN STATUSUNA MALİK OLAN ERİTROSİTLƏRDƏ
İNDUKSIYALAŞAN OKSİDLƏŞDİRİCİ-DESTRUKTİV PROSESLƏR

X Ü L A S Ə

Dissertasiya işi ətraf mühitin təbiəti müxtəlif və təsir mexanizminə görə bir-birindən fərqlənən yüksək gərginlikli elektrik sahəsi, UB-şüalanma, ozon kimi fiziki amillərin təsiri nəticəsində izolə olunmuş eritrositlərdə induksiya olunmuş oksidləşdirici proseslərin öyrənilməsinə həsr olunub. Elektrik sahəsi üçün > 30 kV/m 5 saat ekspozisiyasında, UB-şüalanma ≥ 50 kJ/m² və ozon > 10 mkq/l 30 dəqiqə ekspozisiyasında həddləri təyin olunub. Müəyyən olunub ki, eritrositlərin oksidləşdirici zədələnməsində ilkin həlqəsi hemoqlobinin (Hb) oksidləşdirici modifikasiyasıdır və onun antioksidləşdirici proteksiyasında selen (Se) iştirak edir. Selenin hemoqlobinə meylliliyinə görə növ spesifikliyi aşkar olunub. Siçovullarda 75% Se qlutationperoksidaza (QP) fraksiyasına, < 25 % hemoqlobin fraksiyasına daxil olur; dəniz donuzcuğu və insan üçün əksinə, 15-30 % QP fraksiyasına və 70-85 % hemoqlobin fraksiyasına daxil olur.

Azərbaycan əhalisi üçün selen statusunun yeni normativlər təyin olunub hansılar ki, 70-ci illərin normativlərlə müqayisə edildikdə onun miqdarının əhəmiyyətli dərəcədə aşağı düşməsinə sübut edir. Təsvir etmək mümkündür ki, Azərbaycanda hamiləlik dövründə qadınların qanında və onun komponentlərində (o cümlədən, hemoqlobin fraksiyasında) selenin miqdarı 2 dəfəyə qədər azalır (qanda ≤ 50 mkq/l-rə çatır), bununla bərabər QP aktivliyinin azalması daha az görünür (30-50%). Hemoqlobin fraksiyasında selen miqdarının azalması ilə bərabər kvaziqlutationperoksidaza aktivliyi də azalır (30% qədər), bu da iki parametr arasında müəyyən əlaqə olduğunu sübut edir. Hamiləlik dövründə selen statusun əhəmiyyətli dərəcədə azalması

qadın sağlamlığına, döl və təzə doğulmuş uşaqlar üçün real təhlükə yarada bilər.

Alınmış nəticələrin məcmusu selenin hemoqlobinin təbii müdafiə mexanizminə rolunun anlayışına maraq doğurur və insan sağlamlıqla əlaqədar tədbirlərin görülməsi üçün faydalıdır.

YAKHYAYEVA FLORIDA RADİK QIZI

INDUCED OXIDATIVE-DESTRUCTIVE PROCESSES IN ERYTHROCYTES WITH DIFFERENT STATUS OF SELENIUM

S U M M A R Y

The dissertation work is devoted to the study of the influence of different nature and the mechanism of effects such as physical factors of the environment as electrical field of high tension, UV-irradiation, ozone induced oxidative processes in isolated erythrocytes of animal and human. Able to show that the threshold for electrical field >30 kV/m during 5 hour exposition, for UV-irradiation ≥ 50 kJ/m² and ozone >10 µg/l during 30 minute. The first link of oxidative damage of erythrocytes is oxidative modification of haemoglobin (Hb) and selenium (Se) take part in its antioxidative protection was established. Revealed species specification of affinity of selenium to haemoglobin. In rats, about 75% of selenium is included into glutathioneperoxidase (GPx) fraction, $<25\%$ into haemoglobin fraction; for guinea pig and human by contrast, 15-30% is included into glutathioneperoxidase fraction and 70-85% into haemoglobin fraction.

Established new standards for selenium status of Azerbaijan's population, which testify about significant decrease as compared with standards of 70 year of XX century: ≈ 90 µg/l vs. 120 µg/l in the blood. It is possible that in condition of Azerbaijan during pregnancy of women in blood and its components (including haemoglobin fraction) content of selenium is reduced to almost 2 times (reaching up to ≤ 50 µg/l in blood), though that reducing the activity of GPx is less noticeable (30-50%). Decrease content of Se in haemoglobin fraction is accompanied also falling of quasi glutathioneperoxidase activity (to 30%) of haemoglobin that testify about

presence definite connection these parameters. Such a significant decrease status of selenium during pregnancy present real threat to health of women, fetus and newborns.

Combination of receive information is of interest for understanding of mechanism of natural protection of haemoglobin with the help of selenium and is useful for production of measures connected with the health of human.