

© Т. М. Гусейнов, Р. Т. Гулиева, Ф. Р. Яхъяева, Э. Д. Багирова

УДК 618.2 + 576.32 + 576.36

ПЕРОКСИДАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ ГЕМОГЛОБИНА (В ПРИСУТСТВИИ GSH) В ЛИЗАТАХ ЭРИТРОЦИТОВ БЕРЕМЕННЫХ ЖЕНЩИН С Г-6-ФД ДЕФИЦИТОМ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ЭЛЕКТРИЧЕСКОГО ПОЛЯ ВЫСОКОЙ НАПРЯЖЕННОСТИ*

Т. М. Гусейнов, Р. Т. Гулиева, Ф. Р. Яхъяева, Э. Д. Багирова (Баку, Азербайджан)

Результаты наших экспериментов показали, что эритроциты здоровых беременных женщин оказались более устойчивыми к воздействию электрического поля высокой напряженности, чем эритроциты женщин с патологией глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы. В связи с интенсивным расходом селена в течение беременности, эритроциты женщин на поздних сроках беременности более устойчивы к индуцированному окислению, чем эритроциты беременных женщин, носителей гена недостаточности фермента глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы.

Ключевые слова: электрические поля высокой напряженности, селен, глутатионпероксидаза, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, гемолиз, метгемоглобин, перекисное окисление липидов.

Ранее было показано, что физиологическое уменьшение насыщенности селеном эритроцитов и гемоглобиновых фракций лизатов эритроцитов в ходе беременности женщин приводит к ослаблению резистентности

гемоглобина к индуцированному фотоокислению. Также был установлен факт снижения не только активности глутатионпероксидазы (ГП), но и пероксидазной активности самого гемоглобина в лизатах эритроцитов [1].

* Статья подготовлена по результатам работы Международной научно-практической конференции «Свободные радикалы и антиоксиданты в химии, биологии и медицине» (1-4 октября 2013 г.) в рамках реализации Программы стратегического развития ФГБОУ ВПО «Новосибирский государственный педагогический университет» на 2012–2016 гг.

Гусейнов Токай Магеррам – доктор биологических наук, заведующий лабораторией экологической биофизики, институт физики, Национальная Академия наук Азербайджана.

E-mail: thuseynov@physics.ab.az

Гулиева Ругия Таирага – научный сотрудник, институт физики, Национальная Академия наук Азербайджана.

E-mail: ruhiyya.guliyeva@yahoo.com

Яхъяева Флорида Радик – научный сотрудник, Институт Физики, Национальная Академия наук Азербайджана.

E-mail: flora_yahya@mail.ru

Багирова Эльмира Джавадхан – старший научный сотрудник, Институт Акушерства и Гинекологии.

E-mail: s.axundova@mail.ru

В другой работе было установлено, что малые дозы воздействия электрического поля высокой напряженности (до 30 кВ/м, 5 час. эксп.) приводят к повышению активности ГП, а большие дозы (более 50 кВ/м, 5 час. эксп.) к подавлению ГП активности, окислительной модификации гемоглобина (накопление метгемоглобина), ускорению процесса гемолиза, накоплению продуктов реагирующих с тиобарбитуровой кислотой [2]. Однако вопрос о влиянии высоких доз воздействия электрических полей на пероксидазную активность гемоглобина (в присутствии GSH) не рассматривался.

Кроме того, нам представляется интересным рассмотрение влияния электрического поля высокой напряженности (ЭПВН) на изменение активности глутатионпероксидазы и показателей окислительной модификации гемоглобина и эритроцитов беременных женщин, носителей гена недостаточности фермента глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФД). Это важно по двум причинам. Во-первых, эта патология широко распространена в Азербайджане. Во-вторых, при этой патологии имеет место не только активация перекисного окисления липидов (ПОЛ) мембран эритроцитов и склонность к гемолизу, но и нарушение сопряженного с углеводным обменом метаболизма селенфермента ГП, важного эритроцитарного антиоксидантного (АО) фактора защиты гемоглобина и эритроцитов от окислительной деструкции.

Целью настоящей работы является установление возможной связи между содержанием селена в гемоглобине и пероксидазной активностью гемоглобина при воздействии электрического поля высокой напряженности на лизаты эритроцитов беременных женщин на начальных и поздних сроках бе-

ременности, как в норме, так и у носителей дефицита гена Г-6-ФД.

Материалы и методы.

Исследовали донорскую кровь женщин-волонтеров детородного возраста (n=30), кровь носителей дефицита фермента Г-6-ФД (n=32), беременных женщин (n=28) (начальные (n=18) и поздние (n=10) сроки беременности) и женщин носителей гена дефицита Г-6-ФД (n=16) (начальные (n=8) и поздние (n=8) сроки беременности). Волонтеры и беременные женщины не получали витаминно-минеральные комплексы, способные повлиять на уровень селена в крови.

Компоненты крови выделяли стандартным методом центрифугирования [3]. Получение гемоглобиновых фракций осуществляли гель-хроматографическим способом, как описано в ранних публикациях [1].

Накопление метгемоглобина (MetHb) оценивали по полуэмпирическим формулам предложенным Szebeni J. et al. [4]. Активность глутатионпероксидазы в лизатах эритроцитов определяли по методу Моина [5]. Содержание селена в исследуемых образцах (лизаты эритроцитов и др.) определяли флуориметрически с применением специфического селенчувствительного реагента – 2,3'-диаминонафталина [6]. Интенсивность окислительных процессов оценивали по накоплению продуктов реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) [7]. Содержание гемоглобина в лизатах и элюатах определяли стандартным цианметгемоглобиновым методом [8]. Отмытые суспензии эритроцитов разделялись на две части: контрольные и опытные, подвергаемые влиянию электрического поля промышленной частоты высокой напряженности (50 кВ/м, 8 час. экспозиция), в которых определяли содержание селена и активность фермента ГП. Опыты проведены в

трехкратной повторности. Статистическая обработка осуществлялась с применением t-критерия Стьюдента [9].

Результаты и их обсуждение.

Ранее нами было установлено, что содержание селена в лизатах эритроцитов у беременных женщин на начальных сроках беременности близко к контрольному уровню, но на поздних сроках беременности уменьшается в $\approx 1,7-2$ раза. Активность ГП в лизатах эритроцитов у беременных женщин на начальных сроках беременности составляет $\approx 285 \pm 20$ мкМоль GSH/мин на г Hb, а на поздних сроках беременности глутатионпероксидазная активность лизатов эритроцитов уменьшается на $\approx 20\%$ [1].

В настоящей работе было выявлено, что содержание селена в лизатах эритроцитов у беременных женщин на начальных сроках беременности составляет $0,090 \pm 0,026$ мкг/мл, а к концу срока беременности уменьшается в $\approx 1,7$ раза, что касается активности ГП, то она на начальных сроках беременности равно $\approx 380 \pm 25$ мкМоль GSH/мин на г Hb, но к концу срока беременности изменяется незначительно ($\approx 15\%$). У беременных женщин носителей гена дефицита Г-6-ФД содержание селена в лизатах эритроцитов уменьшается на $\approx 20\%$, в сравнении со здоровыми женщинами, а активность ГП в лизатах эритроцитов в течение беременности уменьшается на 30-50% по сравнению с контролем (волонтеры и нормально беременные женщины) (табл. 1).

Таблица 1

Содержание селена и активность ГП энзима в лизатах эритроцитов женщин в норме и в различные сроки беременности

	Лизаты эритроцитов	
	Se, мкг/мл	ГП, мкМоль GSH/мин на 1г Hb
Доноры	$0,093 \pm 0,027$	
Беременные женщины (нач. срок берем.)	$0,090 \pm 0,026$	380 ± 25
Беременные женщины (позд. срок берем.)	$0,053 \pm 0,021$	323 ± 21
Беременные женщины носители гена дефицита Г-6-ФД (нач. срок берем.)	$0,075 \pm 0,020$	286 ± 23
Беременные женщины носители гена дефицита Г-6-ФД (позд. срок берем.)	$0,045 \pm 0,022$	232 ± 20

При воздействии электрического поля высокой напряженности (50 кВ/м, 8 час. экспозиция) оказалось, что эритроциты у беременных женщин на поздних сроках беременности менее устойчивы к индуцированному

полем окислению, чем контрольные образцы, и у беременных женщин в случае дефицита Г-6-ФД это свойство еще более выражено. Так, накопление активных продуктов реагирующих с ТБК в рассмотренных образцах, и

особенно для случая дефицита энзима Г-6-ФД, а также у беременных женщин на позд-

них сроках беременности увеличивается в 1,5-2 раза (рис. 1 а, б).

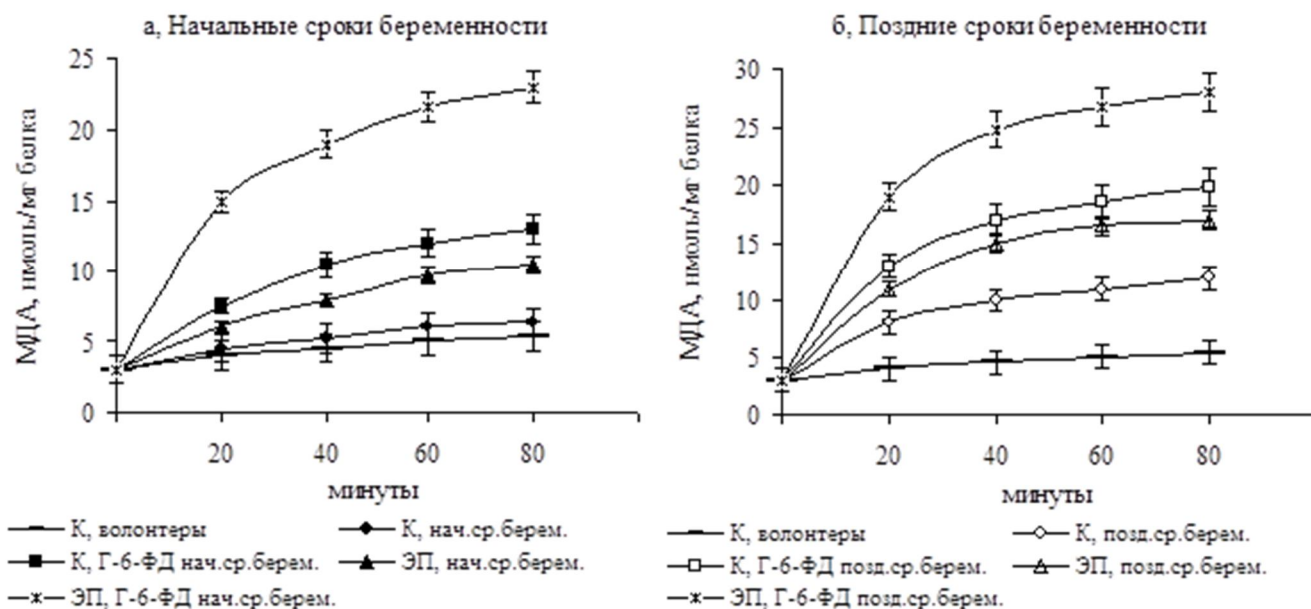


Рис. 1 (а, б) Кинетика накопления ТБК активных продуктов в суспензии эритроцитов нормально беременных женщин и женщин носителей гена дефицита Г-6-ФД при воздействии электрического поля (модель аскорбатзависимого ПОЛ: 10^{-4} М FeSO₄ + 10^{-4} М аскорбиновая кислота + 2 мл суспензии эритроцитов, 25° С) (К – контроль; ЭП – электрическое поле)

Сравнивая кривые накопления метгемоглобина и гемолиза при воздействии электрического поля пришли к выводу, что кривая накопления MetHb имеет более крутую характеристику, что косвенно свидетельствует о том, что окислительная деградация эритроцитов начинается с окисления самого гемоглобина. Наибольшую склонность к окислению проявляют эритроциты (как сам гемоглобин, так и мембранные структуры) с дефицитом энзима Г-6-ФД, беременных жен-

щин на поздних сроках беременности, как нормальных, так и носителей патологических генов Г-6-ФД (рис. 2 а, б).

Для установления возможной связи между содержанием селена в гемоглобиновой фракции и ее пероксидазной активностью произведено гель-хроматографическое разделение селенопротеиновых фракций в лизатах у женщин на начальных и поздних сроках беременности без и с патологией Г-6-ФД.

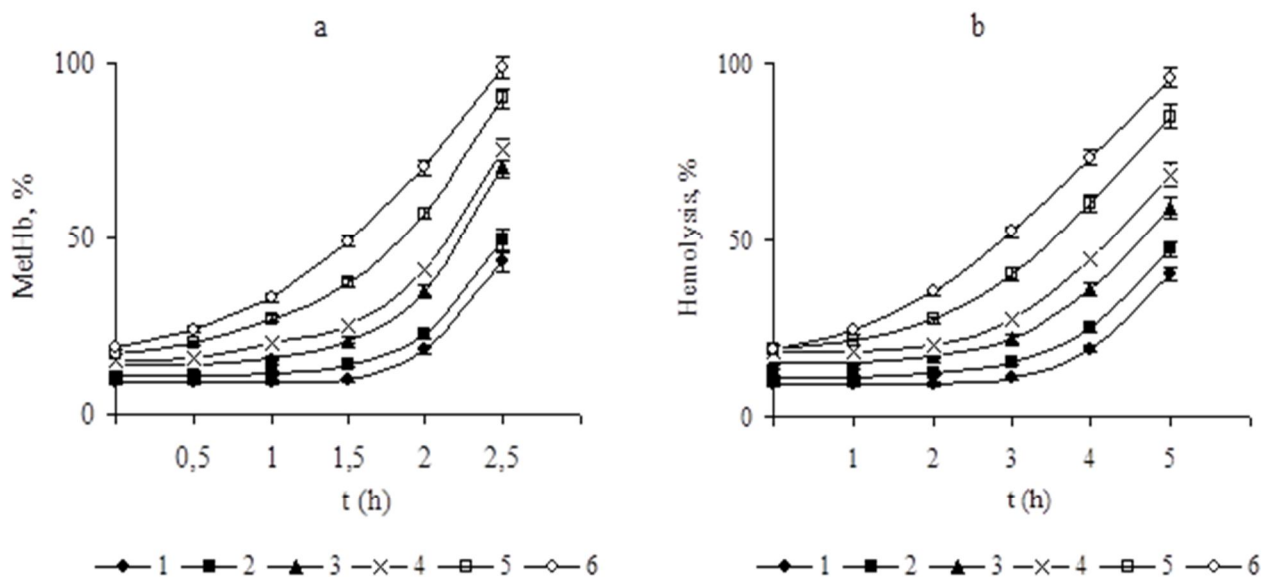


Рис. 2 (а, б) Накопление MetHb и гемоллиз в суспензии эритроцитов при воздействии электрического поля (50 кВ/м, 5 час. эксп.)
 1 – контроль; 2 – начальный срок беременности; 3 – контроль-Г-6-ФД; 4 – поздний срок беременности; 5 – Г-6-ФД нач. ср. берем.; 6 – Г-6-ФД позд. ср. берем.

Сравнительное рассмотрение распределения содержания селена, активности ГП (в том числе и квази-ГП) лизатов эритроцитов у женщин на начальных и поздних сроках беременности показывает (табл. 2), что в ходе беременности происходит некоторое снижение содержания селена и активности ГП, как в неокрашенных (содержащих ГП) фракциях, так и окрашенных (содержащих гемоглобин) фракциях. Однако уменьшение содержания селена и активности ГП в неокрашенных фракциях незначительно ($\approx 10\%$), в окрашенных фракциях содержание селена падает в ≈ 2 раза, а пероксидазная активность гемоглобина в присутствии глутатиона падает на $\approx 45\%$. Для случая беременных женщин с патологией Г-6-ФД было установлено, что содержание селена и активности ГП в неокрашенных фракциях падает $\approx 8\%$ и 40% соответственно, в окрашенных фракциях содержание селена падает в $\approx 2,2$ раза, а перок-

сидазная активность гемоглобина в присутствии глутатиона падает на $\approx 60\%$. Это очевидно связано с тем, что в лизатах гемоглобин составляет более 95% общего протеина, в то время как содержание белка в неокрашенных фракциях очень низко ($\approx 0,01 - 0,05$ мг/мл), а в окрашенных фракциях содержание гемоглобина максимально.

Данные представленные в таблице 2 показывают, что при воздействии ЭПВН наблюдается снижение содержания селена и активности ГП, как в неокрашенных, так и окрашенных фракциях в обоих случаях (т.е. беременные женщины без и с патологией Г-6-ФД). В обоих случаях это уменьшение более заметно для лизатов эритроцитов у женщин на поздних сроках беременности по сравнению с начальными сроками беременности. Сопоставление содержания селена в гель-хроматографических профилях, не подвергнутых и подвергнутых влиянию ЭПВН, эрит-

роцитарных лизатов показывает, что деструктивное окисление лизатов эритроцитов обуславливает определенную миграцию селена из нижних окрашенных фракций в верхние, т.е. окислительная деградация гемоглобина сопровождается его олигомерной фрагментацией.

Сравнивая изменения в спектре гель-хроматографических показателей лизатов эритроцитов у женщин на начальных и поздних сроках беременности, нетрудно заметить, что влияние ЭПВН на лизаты эритроцитов у женщин на поздних сроках беременности

приводит к большим сдвигам в показателях, чем для лизатов эритроцитов у женщин на начальных сроках беременности, т.е. имеет место большее снижение ГП активности, как самого ГП энзима, так и гемоглобина (квази-ГП), и по олигомерной фрагментации гемоглобина, прослеживается миграция селена из нижних зон в верхние. Для случая беременных женщин с патологией Г-6-ФД, учитывая, что изначально содержание селена и активность ГП были низкими по сравнению с нормально беременными женщинами, наблюдается еще больший сдвиг в показателях.

Таблица 2

Удельное содержание селена (мкг/ на г Hb) и активность ГП (мкмоль GSH/мин на г Hb) в гель-хроматографических фракциях лизатов эритроцитов у женщин на н.с.б. и п.с.б.

Лизаты эритроцитов беременных женщин (n=4)	Фракции							
	1-5 неокрашенные		6-7 окрашенные		8-10 окрашенные		11-12 окрашенные	
	ГП	Se	ГП	Se	ГП	Se	ГП	Se
Нач.ср.берем	574±20	1,76±0,09	83±8	0,185±0,014	138±10	0,136±0,013	следы	следы
Позд.ср.берем	517±15	1,62±0,08	75±5	0,147±0,012	124±12	0,083±0,015	следы	следы
Г-6-ФД Нач.ср.берем.	478±22	1,50±0,07	76±8	0,158±0,013	126±10	0,116±0,014	следы	следы
Г-6-ФД Позд.ср.берем.	356±21	1,43±0,06	53±6	0,122±0,007	96±12	0,074±0,006	следы	следы
После воздействия ЭПВН (50 кВ/м, 8 час. эксп.)								
Нач.ср.берем	345±20	1,27±0,05	33±7	0,134±0,012	56±10	0,063±0,008	следы	следы
Позд.ср.берем	310±14	1,10±0,04	30±4	0,093±0,010	50±12	0,047±0,007	следы	следы
Г-6-ФД Нач.ср.берем.	317±24	1,08±0,08	16±7	0,112±0,008	23±10	0,051±0,007	следы	следы
Г-6-ФД Позд.ср.берем.	285±22	0,96±0,05	12±4	0,071±0,007	46±12	0,036±0,005	следы	следы

Таким образом, мы можем заключить, что повреждающий окислительный эффект ЭПВН для гемоглобина более выражен для

лизатов эритроцитов у женщин на поздних сроках беременности, которые обладают более сниженным АО статусом и содержанием

селена, чем лизаты эритроцитов у женщин на начальных сроках беременности. Кроме того, в лизате эритроцитов, при длительной экспозиции в ЭПВН, происходит угнетение пероксидазной активности, как самого ГП энзима, так и гемоглобина. Потеря пероксидазной активности гемоглобина является следствием окислительной деструкции гемоглобина. Эти процессы более заметны для случая лизатов эритроцитов у беременных женщин с патологией Г-6-ФД, обладающих меньшим про-воокислительным потенциалом по сравнению с нормально обеспеченными.

Таким образом, в рамках данной работы показано, что несмотря на значительное уменьшение содержания селена в лизатах эритроцитов у беременных женщин в обоих случаях, как на начальных, так и поздних сроках беременности, активность истинного ГП энзима падает незначительно, в то время как пероксидазная активность гемоглобина угнетается существенно, что свидетельствует об определенной связи между содержанием селена в гемоглобиновых фракциях и пероксидазной активностью гемоглобина.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. 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.
2. 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, 2012. – 5–7 September. – Pp. 431–434.
3. Dodge J. T., Mitchell C., Hanahas D. J. The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes // Arch. Biochem. Biophys. Acta. – 1963. – Vol. 100. – Pp. 119–130.
4. Szebeni J., Winterbourn C. C., Carrell R. W. Oxidative interactions between haemoglobin and membrane lipid. A liposome model // Biochem. J., 1984. – Vol. 220. – № 3. – Pp. 685–692.
5. Моин В. М. Простой специфический метод определения активности глутатионпероксидазы в эритроцитах // Лаб. дело, 1986. – № 12. – С. 724–727.
6. Назаренко И. И., Кислова И. В., Гусейнов Т. М. и др. Флуориметрическое определение селена 2,3-диаминонафталином в биологических материалах // Аналит. химия, 1975. – № 4. – С. 733–738.
7. Mengel C. F., Kann H. E. Effect of in vivo hyperoxid of erythrocytes, III in vivo peroxidation of erythrocytes lipid / J. Nutr. Chemical Invest., 1966. – Vol. 45. – Pp. 1150–1159.
8. Eilers R. J. // Am. J. Clin. Pathol., 1967. – Vol. 47. – Pp. 212–214.
9. Худсон Д. Ж. Статистика для физиков. – М.: Изд. «Мир», 1990. – 242 с.

© T. M. Huseynov, R. T. Guliyeva, F. R. Yahyaeva, E. D. Bagirova

UDC 618.2 + 576.32 + 576.36

PEROXIDASE ACTIVITY OF HEMOGLOBIN (IN THE PRESENCE OF GSH) IN LYSATES OF ERYTHROCYTES PREGNANT WOMEN WITH G-6-PD DEFICIENCY ON EXPOSURE HIGH ELECTRIC FIELD

T. M. Huseynov, R. T. Guliyeva, F. R. Yahyaeva, E. D. Bagirova (Baku, Azerbaijan)

The results of our experiments showed that the red blood cells healthy pregnant women were more resistant to the effects of high electric field than the red blood cells of women with disorders of glucose-6-phosphate dehydrogenase. Due to the intensive consumption of selenium during pregnancy, erythrocytes women in late pregnancy are more resistant to induced oxidation than red blood cells of pregnant women carrying the gene deficiency of the enzyme glucose-6-phosphate dehydrogenase.

Keywords: high voltage electric field, selenium, glutathione peroxidase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, hemolysis, methemoglobin, lipid peroxidation.

REFERENCES

1. Huseynov T. M., Yakhyayeva F. R., Guliyeva R. T. The effect of selenium on the stability of hemoglobin to photooxidative processes // Ukrainian Biochemical Journal, 2012, vol. 84, № 2, p. 53-60.
2. 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.
3. Dodge J. T., Mitchell C., Hanahas D. J. The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes // Arch. Biochem. Biophys. Acta, 1963, v. 100, p. 119-130.
4. Szebeni J., Winterbourn C. C., Carrell R. W. Oxidative interactions between haemoglobin and membrane lipid. A liposome model // Biochem. J., 1984, v. 220, № 3. p. 685-692.
5. Moin V. M. Simple and specific method for determining the activity of glutathione peroxidase in erythrocytes // Lab. Delo, 1986, № 12, p. 724-727.
6. Nazarenko I. I., Kislova I. V., Huseynov T. M. et al. Fluorimetric determination of selenium with using 2,3-diaminonaphthalene in biological materials // Analytical Chemistry, 1975, № 4, p. 733-738
7. Mengel C. F., Kann H. E. Effect of *in vivo* hyperoxid of erythrocytes, III *in vivo* peroxidation of erythrocytes lipid, J. Nutr. Chemical Invest., 1966, v. 45, p. 1150-1159.
8. Eilers R. J. // Am. J. Clin. Pathol., 1967, v. 47, p. 212-214.
9. Hudson D. J. Statistics for Physicists. – Moscow.: Publishing "Mir", 1990, 242 p.

Huseynov Tokai Maharram – Doctor of Biological Sciences, Head of Laboratory of Ecological Biophysics, Institute of Physics, Azerbaijan National Academy of Sciences.

E-mail: thuseynov@physics.ab.az



Guliyeva Rugiya Tairaga – Research associate, Institute of Physics, Azerbaijan National Academy of Sciences.

E-mail: ruhiyya.guliyeva@yahoo.com

Yakhyayeva Florida Radik – Institute of Physics, Azerbaijan National Academy of Sciences.

E-mail: flora_yahya@mail.ru

Bagirova Elmira Dghavadghan – Institute of Gynecology and Obstetrics.

E-mail: s.axundova@mail.ru