

Министерство образования и науки Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г.ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра биохимии и биофизики

**Антиоксидантный эффект селенорганических соединений на мембраны
эритроцитов крови человека**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

студентки 4 курса 421 группы

направления подготовки бакалавриата 06.03.01 «Биология»

биологического факультета

Курьянович Янины Геннадиевны

Научный руководитель
доцент, к.б.н.

В.А. Великов

Научный консультант
зав. кафедрой биохимии СГМУ
им. В.И. Разумовского,
д.м.н., профессор

В. Б. Бородулин

Заведующий кафедрой
д.б.н., профессор

С.А. Коннова

Саратов 2016 год

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Уровень селена снижается в процессе старения организма, и его дефицит связан с заметным увеличением смертности среди людей старше шестидесяти лет. Концентрация селена в крови является важным показателем продолжительности жизни у пациентов пожилого возраста, хотя молекулярные механизмы работы селенопротеинов еще предстоит выяснить. Одним из основных факторов старения по-прежнему считается окислительный стресс. Существуют данные о том, что селен, являясь близким по химическим свойствам сере химическим элементом за счет сходства строения электронных оболочек, проявляет, в отличие от серы, свойства хорошего восстановителя. Данное свойство селена позволяет ему замещать серу в различных органических соединениях, в том числе антиоксидантных ферментах и дезактивировать различные активные формы кислорода. Селен изначально входит в состав более чем тридцати селенопротеинов в организме человека, многие из которых – ферменты, в том числе антиоксидантные ферменты, такие как глутатионпероксидаза. Однако в научной литературе есть данные и о возможности непосредственной дезактивации селеном активных форм кислорода, без включения его в состав ферментов. Между тем как сам селен, так и его неорганические соединения чрезвычайно токсичны, в результате чего все большую актуальность приобретает создание и изучение антиоксидантного потенциала органических соединений селена.

Цель и задачи исследования. Целью исследования является выявление антиоксидантной активности 1,5-дифенил-3-селенапентандиона-1,5 (ДАФС-25) в отношении мембран эритроцитов крови человека. Для достижения указанной цели необходимо выполнить следующие задачи:

- 1) Подобрать оптимальную концентрацию пероксида водорода H_2O_2 для генерации *in vitro* окислительного стресса в мембранах эритроцитов;

2) Определить концентрацию малонового диальдегида как продукта перекисного окисления липидов мембран эритроцитов, иницированного перекисью водорода в присутствии селеноорганического препарата ДАФС-25.

Краткая характеристика материалов. Исследуемое селеноорганическое соединение (ДАФС-25) впервые было синтезировано в химической лаборатории на базе Саратовского военного института биологической и химической безопасности (СВИ БХБ) под руководством д.х.н., профессора Б.И. Древки. Формула исследуемого соединения представлена на рисунке 1. Препарат, использованный в данной работе был произведён в городе Саратове закрытым акционерным обществом «Сульфат».

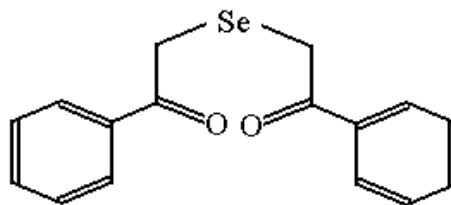


Рисунок 1 – 1,5-дифенил-3-селенапентандион-1,5 (ДАФС-25)

Структура работы. Работа изложена на 44 страницах печатного текста и включает в себя введение, три раздела, первый из которых состоит из четырех подразделов, а второй – двух подразделов и четырех пунктов. Кроме того, в основную часть работы включены 1 таблица и 4 рисунка. Также работа включает в себя заключение, вывод и список использованных источников из 49 наименований.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Перекисное окисление липидов мембран (ПОЛ) - одна из первых неспецифических реакций клетки на стресс. ПОЛ представляет собой один из важнейших универсальных процессов повреждения мембранных систем, изменяющий химический состав, физические параметры, ультраструктурную организацию и функциональные характеристики биомембран, что определяет формирование многих патологических состояний организма, возникающих при неблагоприятных условиях и повреждающих воздействиях. Регулирование уровня активных кислородных метаболитов и свободнорадикальных продуктов ПОЛ осуществляется антиоксидантными системами, снижающими активность радикальных окислительных процессов.

ПОЛ протекает в клеточных мембранах, нарушая их свойства и целостность. Способность селена в составе ДАФС-25 как восстановителя напрямую дезактивировать АФК представляет большой интерес для науки. Поскольку среди ферментов, интегрированных напрямую в клеточные мембраны, селеносодержащих ферментов до настоящего времени не обнаружено, использование в опыте суспензии отмытых мембран позволяет определить способность селена в составе ДАФС-25 как восстановителя напрямую дезактивировать АФК, возникающие в процессе ПОЛ, а не посредством включения его в состав ферментов антиоксидантной системы.

Для изучения этого процесса были выбраны мембраны эритроцитов, так как эритроциты представляют собой наиболее удобный объект, и не в последнюю очередь благодаря тому, что в них отсутствует большинство органоидов, наличие которых могло бы повлиять на результаты опыта.

Одним из широко применяемых методических подходов при решении данного рода задач является использование индукторов ПОЛ окислительного стресса. В нашей работе в качестве подобного индуктора использовали экзогенную перекись водорода.

Нами был проведен подбор концентраций перекиси водорода. Поскольку отсутствуют стандартные методики индукции окислительного стресса, для целей каждого конкретного исследования АФК и её концентрация подбирается индивидуально. В данном случае перекись водорода была выбрана как окислитель средней силы, относящийся к АФК вторичного типа, то есть в живой клетке образующаяся из первичной АФК – супероксид-аниона. Этим она отличается и от третичных АФК.

Для решения этой задачи нами был опытным путем проведен подбор оптимальной концентрации перекиси водорода. Оптимальной в данном случае явилась наибольшая из концентраций, – то есть 3,4 мг/мл, что соответствует 0,1 моль/л, имеющая наименьшее среднее квадратическое отклонение, поскольку в живой клетке АФК не могут образовываться в больших объемах.

Для получения оптимальной концентрации гидроперит мочевины в количестве 94 мг растворяли в объеме 1 мл дистиллированной воды. В работе использовались только свежеприготовленные растворы.

Оценку активности ПОЛ проводили путем определения концентрации одного из конечных продуктов ПОЛ – малонового диальдегида (МДА). Для достижения этой цели к суспензии отмытых мембран эритроцитов в объеме 150 мкл в 750 мкл буферного раствора с рН 7,4 добавили 100 мкл свежеприготовленного раствора перекиси водорода с концентрацией 3,4 мг/мл и инкубировали в течение 10 мин. Для осаждения белка добавляли 400 мкл 0,8%-ной трихлоруксусной кислоты, а затем пробу центрифугировали 10 мин при 4000 об/мин. После этого, в соответствии с методикой, отбирали из пробы 800 мкл супернатанта и добавляли к 400 мкл ТБК. Окрашенный триметиновый комплекс МДА и ТБК образуется при нагревании пробы на водяной бане при 100°C в течение 10 мин. Затем измерили оптическую плотность полученного раствора на фотоэлектроколориметре при длине волны 532 нм (зелёный свет) против

контроля, где вместо супернатанта содержался буферный раствор с рН 7,4 в том же объеме.

Для получения оптимальной концентрации гидроперит мочевины в количестве 94 мг растворяли в объеме 1 мл дистиллированной воды. В работе использовались только свежеприготовленные растворы.

Оценку активности ПОЛ проводили путем определения концентрации одного из конечных продуктов ПОЛ – малонового диальдегида (МДА). Для достижения этой цели к суспензии отмытых мембран эритроцитов в объеме 150 мкл в 750 мкл буферного раствора с рН 7,4 добавили 100 мкл свежеприготовленного раствора перекиси водорода с концентрацией 3,4 мг/мл и инкубировали в течение 10 мин. Для осаждения белка добавляли 400 мкл 0,8%-ной трихлоруксусной кислоты, а затем пробу центрифугировали 10 мин при 4000 об/мин. После этого, в соответствии с методикой, отбирали из пробы 800 мкл супернатанта и добавляли к 400 мкл ТБК. Окрашенный триметиновый комплекс МДА и ТБК образуется при нагревании пробы на водяной бане при 100°C в течение 10 мин. Затем измерили оптическую плотность полученного раствора на фотоэлектроколориметре при длине волны 532 нм (зелёный свет) против контроля, где вместо супернатанта содержался буферный раствор с рН 7,4 в том же объеме.

При использовании перекиси водорода в концентрации 0,1 моль/л концентрация МДА в пробе составила 13,14 моль/мл. Уменьшая концентрацию перекиси водорода последовательно на 1, 2 и 4 порядка мы получили концентрацию МДА в размере 13,97 моль/мл, 14,55 моль/мл и 15,45 моль/мл соответственно. Опыт проводился в трех повторностях. При использовании концентрации перекиси водорода в размере 0,1 моль/л среднее квадратическое отклонение составило 0,02, а в остальных случаях превысило эту величину и составило 0,03.

В конечном итоге в дальнейшей работе при измерении концентрации МДА в присутствии ДАФС-25 использовали концентрацию пероксида водорода 34×10^{-1} мг/мл. Выбор этой концентрации обоснован тем, что при её использовании среднее квадратическое отклонение имеет наименьшую величину, а значит результаты являются более стабильными.

Полученные результаты приведены в виде средних величин и их средних квадратических отклонений в таблице 1 и на рисунке 3.

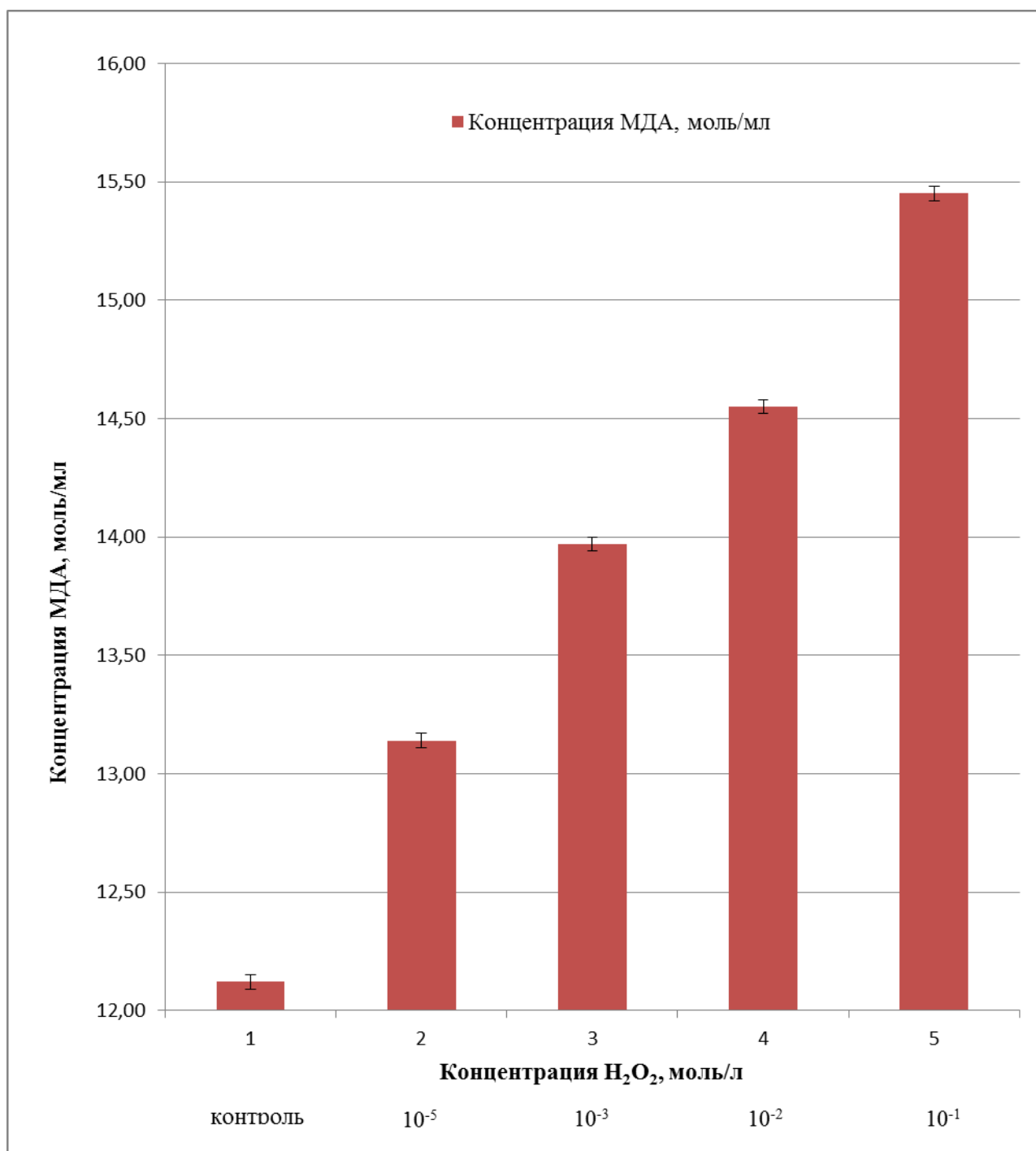
Таблица 1 – Расчет оптимальной концентрации H_2O_2

Концентрация H_2O_2 , моль/л	0	10^{-5}	10^{-3}	10^{-2}	10^{-1}
Концентрация МДА, моль/мл	12,12	13,14	13,97	14,55	15,45
Среднее квадратическое отклонение	$\pm 0,03$	$\pm 0,03$	$\pm 0,03$	$\pm 0,03$	$\pm 0,02$

На следующем этапе работы мы проводили оценку антиоксидантной активности препарата ДАФС-25. ДАФС-25 эффективно применяется в животноводстве для предотвращения у животных функциональных расстройств, связанных с недостаточностью селена. Он обладает ярко выраженными антитоксическими свойствами, сохранность птицы увеличивается на 12-16%. Препарат значительно повышает иммунный статус птицы, а также он эффективен при использовании в качестве усилителя роста некоторых сельскохозяйственных культур [1]. Синтез препарата произведен в Саратовском военном институте биологической и химической безопасности. После биологических испытаний 1,5-дифенил-3-селенапентандион-1,5 был внедрен в ветеринарную практику и в настоящее время производится в промышленных масштабах. Содержание селена в

препарате составляет 25%. Торговое название препарата - диацетофенонилселенид (ДАФС-25). Препарат относится к 3 классу токсичности (умеренно токсичные вещества) [2].

Рисунок 2 – Зависимость концентрации МДА в образце от концентрации H_2O_2



В настоящее время антиоксидантная активность селена в составе ДАФС-25 не подтверждена окончательно, не установлен точный механизм его действия, большинство исследований дают противоречивые данные на этот счет.

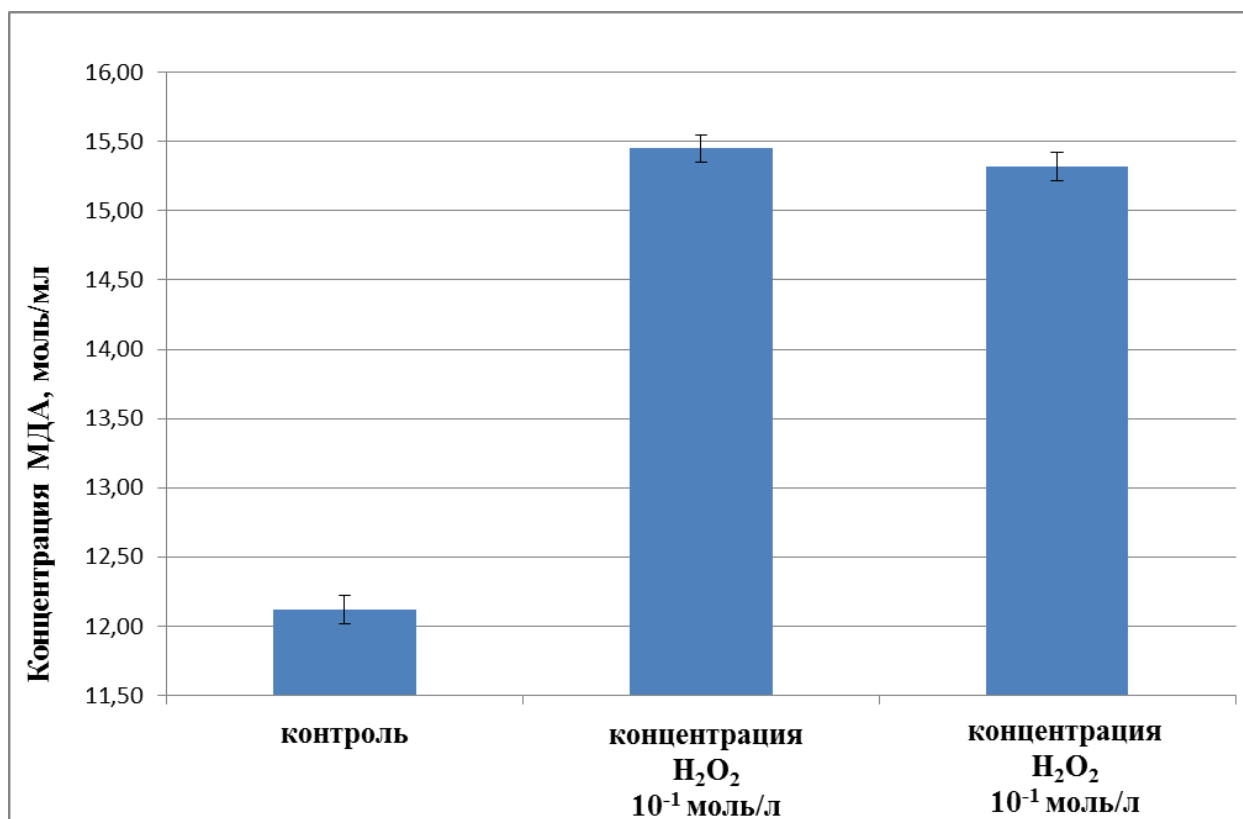
В нашем исследовании антиоксидантная активность препарата ДАФС-25 также оценивается по изменению содержания в образцах малонового диальдегида в соответствии с методикой В.Г. Артюхова [3].

Для этого перед каждым опытом готовился раствор препарата ДАФС-25 в концентрации 5 мкг/мкл. В качестве растворителя использовали диметилсульфоксид. Количество препарата в образце составило 200 мкг на 1 г суспензии, что соответствует суточной потребности организма человека в селене – именно это стало решающим фактором в выборе концентрации. Указанный раствор добавлялся к пробе, содержащей 3,4 мг/мл (0,1 моль/л) пероксида водорода и инкубировался 10 мин в темноте, после чего определялась концентрация МДА.

Полученные результаты представлены на рисунке 4.

Таким образом, нами было показано, что концентрация МДА при внесении перекиси водорода в концентрации 0,1 моль/л составляла 15,45 моль/мл. Дополнительное внесение в раствор селеноорганического соединения ДАФС-25 не привело к достоверному снижению количества МДА: оно снизилось до 15,32 моль/л, то есть лишь на 1% по сравнению с опытом с индукцией ПОЛ перекисью водорода в концентрации 0,1 моль/л в отсутствие ДАФС-25 и составило величину на 79% выше по сравнению с контролем в отсутствие индукции ПОЛ.

Рисунок 3 – Зависимость концентрации МДА в образце от наличия или отсутствия при индукции АФК ДАФС-25



ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Значение микроэлемента селена в настоящее время признаётся всё большим для организма человека.

Наибольшее значение имеет его способность препятствовать оксидативному стрессу или как минимум компенсировать его проявления.

Однако до сих пор среди ученых нет единого мнения на этот счет. Однозначно антиоксидантный эффект синтезированных искусственным путем соединений селена не установлен. Данные различных исследований противоречивы и не дают оснований категорически заявлять о целесообразности их применения в качестве биологически активных добавок. Кроме того, по-прежнему актуальна проблема токсичности в той или иной

мере всех соединений селена и поиска наиболее подходящей его формы для приема внутрь.

Оптимальной концентрацией пероксида водорода H_2O_2 для генерации *in vitro* окислительного стресса в мембранах эритроцитов для целей настоящей работы явилась концентрация 0,1 моль/л.

В концентрации 5 мкг/мкл селеносодержащий препарат 1,5-дифенил-3-селенапентандион-1,5 (ДАФС-25) – 200 мкг на 1 г опытного образца – не оказывает выраженного антиоксидантного эффекта на мембраны эритроцитов крови человека.

Так, в настоящей работе также не был подтвержден антиоксидантный эффект одного из самых популярных и активно исследуемых препаратов селена – ДАФС-25.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Давидчук, Н.В. О возможностях использования селеносодержащего препарата ДАФС-25 для коррекции эндогенного селена в листьях *Nicotiana tabacum* / Н.В. Давидчук, Н.В. Еремеева // Биозлементы: материалы II Междунар. науч.-практ. конф. Оренбург: Оренб. гос. ун-т, 2006. С. 19-24.
2. Кирова, Ю.И. Антиоксидантное и антитоксическое действие новых селенорганических соединений: дис. ... канд. биол. наук / Ю.И. Кирова. Ростов н/Д, 2004. 186 с.
3. Артюхов, В.Г. Биологические мембраны: структурная организация, функции, модификация физико-химическими агентами: уч. пособие. / В.Г. Артюхов, М.А. Наквасина. Воронеж: Изд-во Воронеж. гос. ун-та, 2000. 296 с.