

СЕЛЕН КАК ПРОТЕКТОР ОТ ПЕРОКСИДВОДОРОДНОЙ ОКИСЛИТЕЛЬНОЙ ДЕГРАДАЦИИ ГЕМА ГЕМОГЛОБИНА БЕЗ УЧАСТИЯ ГЛУТАТИОНПЕРОКСИДАЗНОГО МЕХАНИЗМА

© 2025 г. Т.М. Гусейнов*,#, С.М. Рахманова*, Ф.Р. Мехралиева*

*Институт биофизики при Министерстве науки и образования Азербайджана,
ул. З. Халилова, 117, Баку, AZ-1141, Азербайджан

#E-mail: tokhus@mail.ru

Поступила в редакцию 21.11.2023 г.

После доработки 14.12.2023 г.

Принята к публикации 17.04.2024 г.

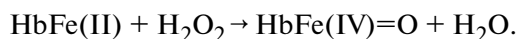
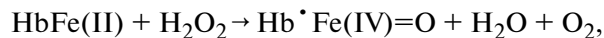
Изучалось защитное действие селенита натрия (Na_2SeO_3) на окислительную деградацию гема гемоглобина, индуцированную пероксидом водорода (H_2O_2) путем регистрации возникающих двух флуоресцирующих продуктов распада гема ($\lambda_{\text{возб}} = 321$ нм, $\lambda_{\text{эм}} = 460$ нм) и ($\lambda_{\text{возб}} = 465$ нм, $\lambda_{\text{эм}} = 525$ нм). Установлено, что селенит натрия тормозит развитие окислительной модификации гемоглобина (истощение оксигемоглобина, накопление метгемоглобина и феррилгемоглобина), что отражается на заметном 20–30% снижении пиков флуоресценции, отражающей окислительную деструкцию гема в условиях отсутствия вклада антипероксидных энзимов (каталазы, глутатионпероксидазы, пероксиредоксина-2) в утилизации H_2O_2 . Это ставит вопрос о самостоятельном антиокислительном значении селена в гемоглобине, в его защите от пероксидного воздействия без участия глутатионпероксидазного механизма утилизации H_2O_2 .

Ключевые слова: пероксид водорода, селен, селенит натрия, флуоресценция, глутатионпероксидаза, эритроциты.

DOI: 10.31857/S0006302925010124, EDN: LVZNZU

Эритроциты в силу своей специфичности, как клетки, осуществляющие основной газообмен (O_2 , CO_2 , NO) организма, испытывают непрерывное окислительное воздействие с участием активных форм кислорода и азота. Среди них наибольшее значение имеет пероксид водорода (H_2O_2), образующийся в ходе дисмутации супероксида $\text{O}_2^{\cdot-}$, возникшего в результате окисления оксигемоглобина (HbO_2) [1]. В самих эритроцитах в ходе эволюции возникла эффективная система природных антиокислительных факторов, включающая в себя такие антиокислительные ферменты, как супероксиддисмутаза, каталаза (CAT), глутатионпероксидаза (GPX), пероксиредоксин-2 (PRDX-2) и др., утилизирующие чрезмерное накопление H_2O_2 [1–4]. При этом избыточное количество H_2O_2 восстанавливается до

воды в основном посредством CAT и GPX, в то время как PRDX-2 «работает» предпочтительно в физиологических пределах накопления H_2O_2 [3–7]. Избыток H_2O_2 приводит к окислительной деструкции гемоглобина (Hb) до радикала феррилгемоглобина $\text{Hb}^{\cdot}\text{Fe(IV)=O}$ или феррилгемоглобина (HbFe(IV)=O) [8–10].



В свою очередь, гем феррилгемоглобина при взаимодействии последнего с H_2O_2 деструктурируется, переходя из тетрагональной в ромбическую структуру (с возможным выходом иона железа из гема) с образованием характерных двух флуоресцирующих пигментных соединений: «Соединение 1» с $\lambda_{\text{эм}} = 460$ нм при $\lambda_{\text{возб}} = 321$ нм и «Соединение 2» с $\lambda_{\text{эм}} = 525$ нм при $\lambda_{\text{возб}} = 465$ нм [11–13].

Одним из регуляторов окислительно-восстановительных процессов в эритроцитах является селен и его соединения. Селенит натрия в эритро-

Сокращения: CAT – каталаза, GPX – глутатионпероксидаза, PRDX-2 – пероксиредоксин-2, Hb – гемоглобин, HbO_2 – оксигемоглобин, GSH – восстановленный глутатион, MetHb – метгемоглобин, КФБ – калий фосфатный буфер.

цитах обладает сложным и быстротечным редокс-метаболизмом. В его основе лежит мгновенное поглощение селена из Na_2SeO_3 в гемоглобин, где он связывается с SH-группами цистеина (Cys), причем более 98% включаемого селена локализуется в Cys93 β -цепи (Hb-Cys93). В этой позиции селен, тесно взаимодействуя с восстановленным глутатионом (GSH), модифицирует Cys93-остаток в селентрисульфид. Последний, активно взаимодействуя с двумя различными SH-участками интегрального белка анион-обменника AE1, выходит через мембрану, включаясь в плазматические альбумины — переносчики селена (так называемый релейный механизм и/или селеновый насос), попадает в кровоток и т.д. В случае изолированных эритроцитов из-за отсутствия плазматических белков-переносчиков селен, будучи восстановленным из Se^{+4} до Se^{-2} -состояния и частично «оседая» в гемоглобин, переносится в примембранное пространство (см. ссылки в работе [14]), активно взаимодействуя с GSH. В случае избытка Na_2SeO_3 селен фактически «съедает» ресурс GSH и тем самым оказывает токсическое действие, выступая как прооксидант, стимулирующий карбонильный стресс и перекисное окисление липидов, инактивирует антиокислительные ферменты и т.д. (см. ссылки в работе [15]). В малых дозах селен усиливает антиокислительные свойства гемоглобина и его основного деривата метгемоглобина (MetHb), обладающих пероксидазной активностью, подобной каталазе. Сама повышенная реакционная способность SeCys основана на том, что pK_a селената существенно меньше, чем pK_a тиолата (5.2 против 8.5), и кроме того, SeCys или Sec имеет больше электронов, больший атомарный радиус, поляризуемость, т. е. нуклеофильность [16]. Кроме того, избыток связывания Se в Hb конкурирует со связыванием CO_2 и аминокислотной группой Hb, что приводит к увеличению генерации свободного CO_2 и способствует образованию пероксинитрита, сильного прооксиданта (см. ссылки в работе [15]). Приведенные соображения дают возможность селену в определенных концентрационных пределах играть роль антиокислительного протектора.

Принято считать, что при концентрациях H_2O_2 , близких к «субтоксичным», основной удельный вес антиокислительной защиты в эритроцитах приходится на селенфермент GPX [14, 17]. Однако оказалось, что неспецифически включаемый в гемоглобин селен также может придавать антиокислительную устойчивость гемоглобину вне GPX-механизма [18–21]. Сам гемоглобин, а также MetHb, будучи гемсодержащими белками, обладают пероксидазной активностью, в том числе и квази-GPX-активностью в присутствии глу-

татива, т. е. разрушают пероксид водорода [19, 22, 23].

Учитывая то, что для человека только около 10–20% внутриэритроцитарного селена охвачено GPX, а остальные 80–90% приходится на гемоглобин [18, 19, 23, 24], представляется интересным рассмотреть антиокислительную роль селена в гемоглобине без участия GPX, при использовании генерации флуоресцентных соединений как маркера окислительной деградации гема [10–13], что и составило предмет исследования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реактивы: селенит натрия, азид натрия, йодацетамид — производства Sigma-Aldrich (США); ЭДТА, калий фосфорнокислый однозамещенный, хлористый натрий, 30%-й пероксид водорода — «РеаХим» (Россия), все — квалификации «х.ч.».

Эритроцитарную массу выделяли из донорской крови, которую трижды промывали 5 объемами изотонического раствора (0.14 М NaCl), путем трехкратного центрифугирования (800 g, 10 мин). Из нее готовили суспензию эритроцитов (гематокрит (Ht) \approx 10%) путем разбавления буфером (0.05 М калий-фосфатный буфер (КФБ) + 0.14 М NaCl, 0.1 мМ ЭДТА, pH 7.4) для последующих приготовлений соответствующих аликвот, содержащих \approx 50 мкМ Hb. Изучение протекторного действия селенита натрия (Na_2SeO_3) на окислительную модификацию гемоглобина или его гема проводили при его конечной концентрации в инкубационной среде, равной 10 мкМ (это верхняя граница антиокислительного действия Na_2SeO_3 , которая ранее была экспериментально определена сотрудником лаборатории экологической биофизики Института биофизики С.Я. Гусейновой [15]).

Экспериментальный материал был разделен на 3 группы.

— Группа 1 (контрольная): суспензию эритроцитов разводили 0.05 М КФБ + 0.14 М NaCl до концентрации 50 мкМ и инкубировали в течение 60 мин при температуре 37°C при действии «субтоксичной» дозы пероксида водорода (доза пероксидного воздействия, при которой начинается заметный рост интенсивности флуоресценции) \leq 2 мМ H_2O_2 (конечный объем аликвот составлял 3 мл).

— Группа 2: для оценки окислительного эффекта H_2O_2 , оказываемого на гемоглобин, свободного от участия антипероксидных ферментов (CAT, GPX, PRDX-2), были использованы их ингибиторы: для CAT — 1.0 мМ азид натрия и для GPX и PRDX-2 — 5.0 мМ йодацетамида, который блокирует SH группы как GPX, так и PRDX [17].

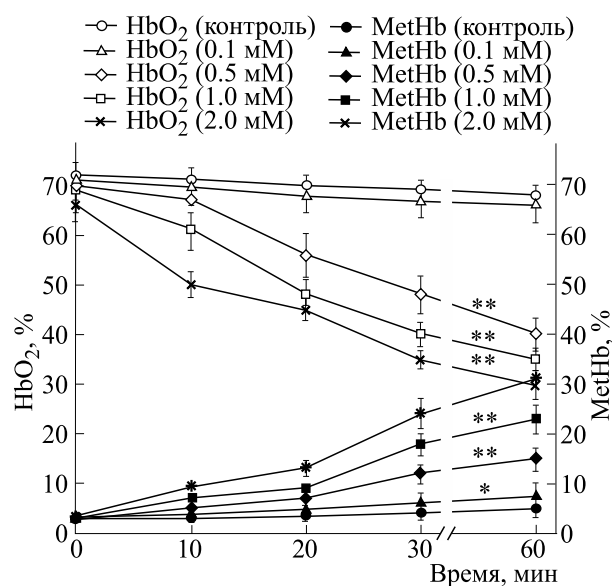


Рис. 1. Зависимость кинетики индуцированного H_2O_2 окисления гемоглобина от концентрации H_2O_2 в инкубационной среде (0.05 М КФБ + 0.14 М NaCl + 0.1 М ЭДТА, pH 7.4, $t = 37^\circ\text{C}$), за 100% HbO_2 принимали 45 мкМ; * – $p \leq 0.05$, ** – $p \leq 0.01$.

Ингибиторы добавляли в исследуемые образцы за 5 мин до начала инкубирования с H_2O_2 .

– Группа 3: одновременно с ингибированием CAT, GPX и PRDX-2 в инкубационную среду добавляли Na_2SeO_3 в конечной концентрации 10 мкМ (условия те же, что и для групп 1 и 2).

Оценки глубины окислительной модификации гемоглобина (истощение HbO_2 , накопление MetHb) проводили спектрофотометрически (спектрофотометр СФ-46, Россия) по полуэмпирическим формулам, предложенным в работе [8]:

$$[\text{oxyHb}] = 119A_{577} - 39A_{630} - 89A_{560},$$

$$[\text{MetHb}] = 28A_{577} + 307A_{630} - 55A_{560}.$$

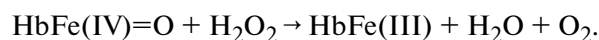
Интенсивность флуоресценции измеряли на лабораторной флуориметрической установке, собранной на базе флуориметра ФАС-1, где фотодетектором служил ФЭУ-64, а в качестве источника света использовали ртутную лампу СВД-120А. Для возбуждения люминесценции в полосе с максимумом 321 нм и 465 нм использовали ртутные спектральные линии 313 нм и 347 нм, которые выделяли соответствующими светофильтрами. Эмиссионное излучение пропускали через интерференционные фильтры (460 нм и 520 нм).

Результаты обрабатывали статистически ($n \geq 3$) при уровне значимости $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Прежде чем приступить к опытам по определению влияния селенита натрия (Na_2SeO_3) на развитие окислительной деградации гема гемоглобина, вызванной H_2O_2 , необходимо было выявить пороговую зависимость флуоресценции от концентрации H_2O_2 в инкубационной среде, содержащей эритроциты.

Здесь мы исходили из того, что в ходе индуцированного H_2O_2 окисления гема совершается каскад окислительных реакций, начальным звеном которого служит образование высокореактивного феррилгемоглобина. Последний (HbFe(IV)=O), взаимодействуя со второй молекулой H_2O_2 , генерирует в гемовом кармане супероксид $\text{O}_2^{\bullet-}$, который атакует порфирин гема, изменяя его структуру [9], что сопровождается возникновением двух видов флуоресцирующих соединений [11–13]. В итоге нестабильный феррилгемоглобин восстанавливается до относительно стабильного метгемоглобина по следующей конечной реакции [10]:



Накопление этого продукта косвенно можно оценивать по истощению HbO_2 и, соответственно, по накоплению метгемоглобина. По этому показателю условно можно оценить концентрационную субтоксичность H_2O_2 по критерию ≈ 30 –50% истощения HbO_2 .

Из рис. 2 видно, что при конечной концентрации в 0.5 мМ и выше наблюдается также и накопление метгемоглобина, которое отражается на интенсивности пиков флуоресценции обоих пигментов окислительной деградации гема. При этом рост интенсивности накопления метгемоглобина аналогичен росту интенсивности пиков флуоресценции обоих пигментных соединений. Это свидетельствует о том, что причиной возникновения флуоресцирующих пигментов служит структурная перестройка гема, возникшая при образовании феррилгемоглобина в ходе окисления гема H_2O_2 , который в итоге восстанавливается до MetHb (рис. 2).

В целях достижения лучшей наглядности влияния H_2O_2 на флуоресценцию образцов контрольных опытов (т. е. без участия селенита натрия, группа 2) была выбрана конечная концентрация в 2.0 мМ при времени инкубирования 60 мин как показатель «субтоксичной» дозы. Однако невысокий уровень интенсивности (превышение над фоном или контрольного уровня) флуоресценции связан с наличием эффективной антипероксидной системы энзимов (CAT, GPX, PRDX-2). В случае использования ингибиторов этих энзимов картина окислительного

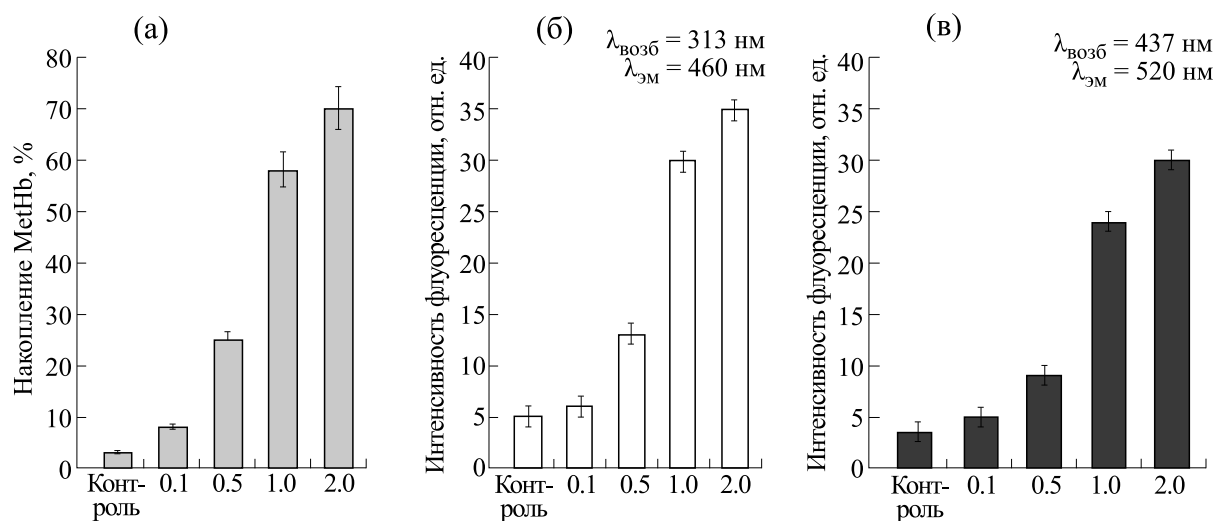


Рис. 2. Влияние конечной концентрации H_2O_2 в инкубационной среде (0.05M КФБ, 0.14 M NaCl, 0.1 mM ЭДТА, pH 7.4, $t = 37^\circ\text{C}$, время инкубирования 60 мин), содержащей эритроциты (≈ 50 мкМ Hb), на интенсивность флуоресценции продуктов окислительной деградации гема: (а) – накопление MetHb в %, за 100% приняты 17 мкМ MetHb; (б) – интенсивность флуоресценции, $\lambda_{\text{возб}} = 313$ нм, $\lambda_{\text{эм}} = 460$ нм; (в) – интенсивность флуоресценции, $\lambda_{\text{возб}} = 437$ нм, $\lambda_{\text{эм}} = 520$ нм.

воздействия H_2O_2 становится значительно более наглядной (рис. 3).

Так, из рис. 3 видно, что уже на 10-й минуте инкубирования с H_2O_2 имеет место существенный рост интенсивности флуоресцентных пиков, свидетельствующий о начале структурных перестроек гема.

Результаты с использованием Na_2SeO_3 в качестве возможного антиоксиданта, снижающего окислительное повреждение гема, индуцированное относительно высокой дозой H_2O_2 (2.0 mM, 60 мин), представлены на рис. 4. Видно, что, в случае использования обоих ингибиторов активности антипероксидных энзимов имеет место

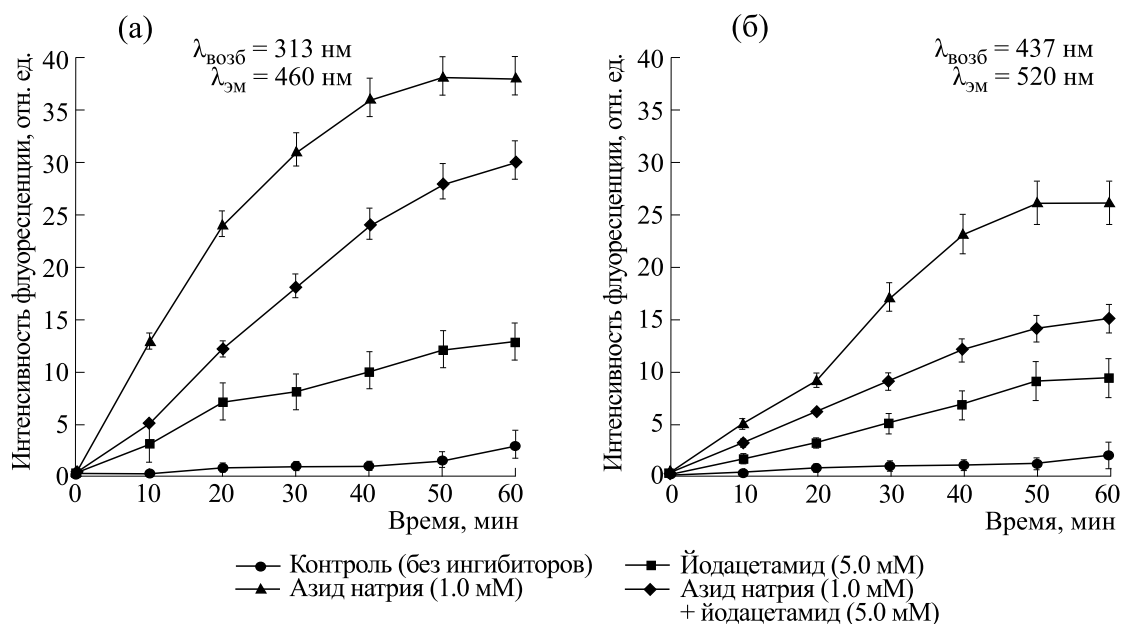


Рис. 3. Влияние H_2O_2 (2.0 mM) на развитие флуоресценции в суспензии эритроцитов (≈ 50 мкМ Hb) в инкубационной среде (0.05M КФБ, 0.14 M NaCl, 0.1 mM ЭДТА, pH 7.4, $t = 37^\circ\text{C}$, время инкубирования 60 мин) в присутствии ингибиторов антипероксидных энзимов – CAT (азид натрия, 10 mM), GPX и PRDX-2 (йодацетамид, 50 mM).

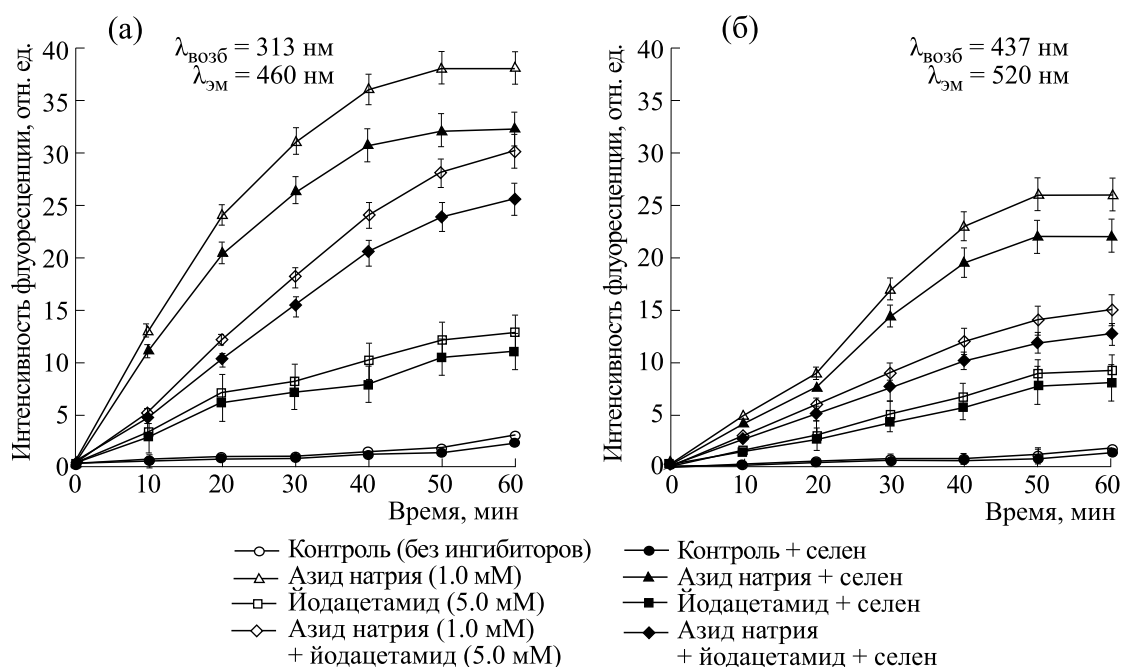


Рис. 4. Влияние Na_2SeO_3 (10 мкМ) на развитие гемовой флуоресценции, индуцированной H_2O_2 (2.0 мМ) в эритроцитах в инкубационной среде (условия те же, что на рис. 3).

существенное снижение интенсивности флуоресценции обоих образующихся пигментов. Снижение интенсивности пигментообразования происходит и в случае использования азид натрия (NaN_3), ингибитора GPX-активности (при высокой генерации H_2O_2 вклад PRDX-2 незначителен). Все это дает основание утверждать, что включаемый в гемоглобин селен из Na_2SeO_3 оказывает определенное протекторное действие против индуцированного H_2O_2 окислительного повреждения гема без дополнительного участия глутатионпероксидазного механизма утилизации пероксида водорода.

ОБСУЖДЕНИЕ

Селен является уникальным элементом, активно участвующим во многих ключевых регуляторных процессах во всех доменах жизни. Будучи наиболее близким по своим физико-химическим свойствам среди халькогенов к сере, он замещает ее во многих биохимических реакциях [25, 26]. При этом, являясь химически более активным элементом, чем сера (повышенная нуклеофильность), селен может более активно влиять на клеточный метаболизм, в частности в эритроцитах [15].

Уместно заметить, что SH-группы глобиновых субъединиц обеспечивают возможность антиокислительной защиты гема гемоглобина [27–29], являющегося наиболее легко окисляемой ча-

стью гемоглобина, в которой ион железа при окислении меняет свойства гемоглобина. В конечном счете эти SH-группы оказывают влияние на окислительный метаболизм эритроцитов в целом [1, 3, 5, 6].

Из полученных результатов можно заключить, что Na_2SeO_3 в оптимальной конечной концентрации 10 мкМ, вносимый в среду инкубирования, содержащую суспензию эритроцитов с конечной концентрацией 50 мкМ HbO_2 , оказывает определенный антиокислительный эффект (снижение истощения HbO_2 , накопление MetHb) на окислительную модификацию гемоглобина, индуцированную H_2O_2 при «субтоксичных» концентрациях (0.5 мМ, 1.0 мМ) и выше (2.0 мМ), т. е. в тех дозовых значениях, при которых явно заметно увеличение интенсивности флуоресценции образующихся пигментов, свидетельствующее о начале ромбической перестройки гема. Сам факт антиокислительного действия селенита натрия по отношению к гемоглобину (снижение метгемоглобинообразования) был установлен еще в 1970–1980 гг. как в опытах *in vivo*, так и *in vitro* [30, 31]. В другой работе группой исследователей на основе собственных данных и имеющихся в литературе сведений сделан вывод о том, что индуцированные гемоглобином окислительные повреждения клеток могут быть снижены селеном (селенит натрия) без антиокислительного участия GPX-механизма [32]. Было предположено, что селен, замещая серу в SH-группах

аминокислот Hb, образует новые клеточные антиокислительные центры. В более поздней работе другие исследователи на примере синтетических переносчиков кислорода на основе Hb показали, что Na_2SeO_3 может снижать окислительное поражение в гемоглобине напрямую, вступая в реакцию непосредственно с Hb без участия GPX [33]. Авторы предположили, что это происходит из-за доступности сайта гема для селена из селенита натрия.

Сотрудниками лаборатории экологической биофизики Института биофизики было показано, что антиокислительное действие селена по протекции гемоглобина при фотоокислительных процессах и др. также возможно и без участия GPX-механизма утилизации пероксидов, и оно может иметь самостоятельное значение [15, 18, 19, 35]. Представляется логичным объяснение этого явления тем, что селен (в определенных концентрационных пределах), включаясь в SH-группы Hb, придает им большую реакционную способность. Кроме того, также показано что, включение селена в гемоглобин несколько увеличивает его пероксидазную активность в присутствии GSH [15]. При этом селенит, применяемый в наших опытах, в низкой концентрации при фотоокислении и других процессах способствует увеличению содержания GSH, что положительно влияет на антиокислительный потенциал эритроцитов [15].

Касаясь механизма антиокислительного действия Se в Hb, можно заметить, что он укладывается в рамки «гипотезы связывания», выдвинутой в 2000 г. группой исследователей [34]. Суть этой гипотезы состоит в том, что селен может находиться в такой позиции, в которой он будет препятствовать движению электронов от окисляемого вещества к кислороду. Подобную мысль мы высказывали в 2008 г., рассматривая «примесь» Se в гемоглобине, как электронную «ловушку» [35]. Действительно, возможно допустить, что включаемый в β -цепь Hb селен, обладая большим атомарным радиусом, повышенной электроотрицательностью, поляризуемостью, будет препятствовать движению электронов от Fe^{+2} гема в сторону H_2O_2 , тем самым тормозя образование Fe^{+4} (феррилгемоглобина), который, взаимодействуя с новой молекулой H_2O_2 , генерирует новый супероксид в гемовом кармане, что в конечном счете деградирует сам гем.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что заметное развитие процесса окисления гемоглобина, индуцированного пероксидом водорода, начинается при конечной концентрации в инкубационной среде более 0.5 мМ.

2. Показано, что совместное применение азидата натрия (ингибитора активности каталазы) и йодацетамида (ингибитора активности глутатионпероксидазы и пероксиредоксина-2) приводит к увеличению интенсивности флуоресценции, которое происходит уже на 10-й минуте инкубирования эритроцитов при 37°C.

3. При использовании селенита натрия (10 мкМ) все показатели индуцированной флуоресценции снижаются в среднем на 20–30% в условиях ингибирования активности антипероксидных энзимов, что свидетельствует о том, что антиоксидантное действие селена на гемоглобин при воздействии H_2O_2 может осуществляться без участия механизмов GPX, т.е. селен в гемоглобине может иметь самостоятельное антиокислительное значение.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, связанных с изложенными в статье данными.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания собственных исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Moller M. N., Orrico F., Villar S. F., Lopez A. C., Silva N., Donze M., Thomson L., and Denicola A. Oxidants and Antioxidants in the Redox Biochemistry of Human Red Blood Cells. *ACS Omega*, **8** (1), 147–168 (2023). DOI: 10.1021/acsomega.2c06768
2. Lapinski R., Siergiejuk M., Worowska A., and Gasko M. Oxidants and antioxidants of erythrocytes. *Prog. Health. Sci.*, **4** (1), 211–219 (2014).
3. Sies H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biol.*, **4**, 180–183 (2015). DOI: 10.1016/j.redox.2015.01.002
4. Flohe L. Looking back at the early stages of redox biology. *Antioxidants*, **9** (12), 1254 (2020). DOI: 10.3390/antiox9121254
5. Low F. M., Hampton M. B., and Winterbourn C. C. Peroxiredoxin 2 and peroxide metabolism in the erythrocyte. *Antioxid. Redox Signal.*, **10** (9), 1621–1630 (2008). DOI: 10.1089/ars.2008.2081
6. Sies H. Role of metabolic H_2O_2 generation: Redox signaling and oxidative stress. *J. Biol. Chem.*, **289** (13), 8735–8741 (2014). DOI: 10.1074/jbc.R113.544635
7. Rocha S., Gomes D., Lima M., Bronze-da-Rocha E., and Santos S. A. Peroxiredoxin 2, glutathione peroxidase, and catalase in the cytosol and membrane of erythrocytes under H_2O_2 -induced oxidative stress. *Free Radic. Res.*, **49** (8), 990 (2015). DOI: 10.3109/10715762.2015.1028402
8. Winterbourn C. C. Protection by ascorbate against acetylphenylhydrazine-induced Heinz body formation in glu-

- cose-6-phosphate dehydrogenase deficient erythrocytes. *Br. J. Haematol.*, **41** (2), 245–252 (1979). DOI: 10.1111/j.1365-2141.1979.tb05853.x
9. Nagababu E. and Rifkind J. M. Reaction of hydrogen peroxide with ferrylhemoglobin: superoxide production and heme degradation. *Biochemistry*, **39** (40), 12503–12511 (2000). DOI: 10.1021/bi992170y
 10. Nagababu E. and Rifkind J. M. Heme degradation by reactive oxygen species. *Antioxid. Redox Signal.*, **6** (6), 967–978 (2004). DOI: 10.1089/ars.2004.6.967
 11. Nagababu E. and Rifkind J. M. Formation of fluorescent heme degradation products during the oxidation of hemoglobin by hydrogen peroxide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **247** (3), 592–596 (1998). DOI: 10.1006/bbrc.1998.8846
 12. Nagababu E. and Rifkind J. M. Heme degradation during autoxidation of oxyhemoglobin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **273** (3), 839–845 (2000). DOI: 10.1006/bbrc.2000.3025
 13. Nagababu E., Chrest F. J., and Rifkind J. M. The origin of red cell fluorescence caused by hydrogen peroxide treatment. *Free Radic. Biol. Med.*, **29** (7), 659–663 (2000). DOI: 10.1016/s0891-5849(00)00348-8
 14. Hongoh M., Haratake M., Fachigame N., and Nakayama N. A thiol-mediated active membrane transport of selenium by erythroid anion exchanger 1 protein. *Dalton Trans.*, **41** (24), 7340–7349 (2012). DOI: 10.1039/c2dt30707c
 15. Huseynova S. Ya. Oxidative metabolism of sodium selenite in isolated human erythrocytes in vitro. *Biomedicine (Azerbaijan)*, **17** (3), 18–23 (2019).
 16. Arner E. S. J. Selenoproteins – What unique properties can arise with selenocysteine in place of cysteine? *Exp. Cell Res.*, **316** (8), 1296–1303 (2010). DOI: 10.1016/j.yexcr.2010.02.032
 17. Nagababu E., Chrest F. J., and Rifkind J. M. Hydrogen-peroxide-induced heme degradation in red blood cells: the protective roles of catalase and glutathione peroxidase. *Biochim Biophys Acta*, **1620** (1–3), 211–217 (2003). DOI: 10.1016/s0304-4165(02)00537-8
 18. Гусейнов Т. М., Яхъяева Ф. Р. и Гулиева Р. Т. Влияние селена на устойчивость гемоглобина к фотоокислительным процессам. *Укр. биохим. журн.*, **84** (2), 53–60 (2012).
 19. Гусейнов Т. М. и Яхъяева Ф. Р. *Селен как антиокислительный протектор в эритроцитах* (Lambert Acad. Publ., 2014).
 20. Padmaja K. and Prasad A. R. Selenium altered regulation of heme biosynthesis in chick embryos. *Drug Chem. Toxicol.*, **16** (4), 395–408 (1993). DOI: 10.3109/01480549308998229
 21. Padmaja K., Ramamurthi R., and Prasad A. R. Inhibitory effect of selenium on enzymes involved in heme biosynthetic pathway in chick embryos. *J. Enzyme Inhib.*, **11** (1), 1–11 (1996). DOI: 10.3109/14756369609038217
 22. Widmer C. C., Pereira C. P., Gehrig P., Vallelan F., Scoedon G., Buehler P. W., and Schaer D. J. Hemoglobin can attenuate hydrogen peroxide-induced oxidative stress by acting as an antioxidative peroxidase. *Antioxid. Redox Signal.*, **12** (2), 185 (2010). DOI: 10.1089/ars.2009.2826
 23. Beilstein M. A. and Whanger P. D. Distribution of selenium and glutathione peroxidase in blood fractions from humans, rhesus and squirrel monkeys, rats and sheep. *J. Nutr.*, **113** (11), 2138–2146 (1983). DOI: 10.1093/jn/113.11.2138
 24. Whanger P. D. Selenocompounds in plants and animals and their biological significance. *J. Am. Coll. Nutr.*, **21** (3), 223–232 (2002) DOI: 10.1080/07315724.2002.10719214
 25. Варламова Е. Г. *Микроэлемент селен: уникальные свойства, встречаемость в природе, ключевые функции селен-содержащих соединений, роль в здоровье* (ИЗ-во «КноРус», М., 2024).
 26. Shukurlu Y. H. and Huseynov T. M., Increased morbidity and its possible link to impaired selenium status. In: *Selenium and Human Health*, Ed. by V. Gelen, A. Kara. and A. Kükürt (London, UK, 2023), Chapt. 7. DOI: 10.5772/intechopen.110848, 103
 27. Vitturi D. A., Sun C. W., Harper V. M., Thrash-Williams B., Cantu-Medellin N., Chacko B. K., Peng N., Dai Y., Wyss J. M., Townes T., and Patel R. P. Antioxidant functions for the hemoglobin β 93 cysteine residue in erythrocytes and in the vascular compartment *in vivo*. *Free Radic. Biol. Med.*, **55**, 119–129 (2013). DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.11.003
 28. Kassa T., Strader M. B., Nakagawa A., Zapol W. M., and Alayash A. I. Targeting β Cys93 in hemoglobin S with an antisickling agent possessing dual allosteric and antioxidant effects. *Metallomics*, **9** (9), 1260–1270 (2017). DOI: 10.1039/c7mt00104e
 29. Alayash A. I. β Cysteine 93 in human hemoglobin: a gateway to oxidative stability in health and disease. *Lab. Invest.*, **101** (1), 4–11 (2021). DOI: 10.1038/s41374-020-00492-3
 30. Iwata H., Matsukami J., and Nakaya S. Effect of selenite on drug-induced methemoglobinemia in rats. *Biochem. Pharmacol.*, **28** (14), 2209–2211 (1979). DOI: 10.1016/0006-2952(79)90206-5
 31. Wilsdrow G., Doring K., and Solomon R. In: *Proc. 6th Int. Trace Element Symp.*, Ed. by M. Anke (Leipzig, 1989), p. 851.
 32. Simoni J., Simoni G., Garcia E. L., Prien S. D., Tran R. M., Feola M., and Shires G. T. Protective effect of selenium on hemoglobin mediated lipid peroxidation *in vivo*. *Artif. Cells Blood Substit. Biotechnol.*, **23** (4), 469–486 (1995). DOI: 10.3109/10731199509117963
 33. Baldwin A. N., Wiley E. B., and Alayash A. Differential effects of sodium selenite in reducing tissue damage caused by three hemoglobin-based oxygen carriers. *J. Appl. Physiol.*, **96** (3), 893–903 (2004). DOI: 10.1152/japplphysiol.00615.2003
 34. Nyberg-Swenson B. E. The selenium link: the missing link in our understanding of biochemical trigger reactions? *Med. Hypotheses*, **52** (2), 125–131 (1999). DOI: 10.1054/mehy.1997.0633

35. Гусейнов Т. М., Гулиева Р. Т. и Яхъяева Ф. Р. Селен как антиокислительная «примесь» в гемоглобине.

В сб. *Матер. III Междунар. конф. «Химия, структура и функция биомолекул»* (Минск, Беларусь, 2008), с. 89.

Selenium as a Protector Against Hydrogen Peroxide Oxidative Degradation of Heme of Hemoglobin without the Glutathione Peroxidase Mechanism

T.M. Huseynov*, S.M. Rahmanova*, and F.R. Mehraliyeva*

**Institute of Biophysics, Ministry of Science and Education of Azerbaijan Republic,
ul. Zahida Khalilova 117, Baku, AZ-1141, Azerbaijan*

The protective effect of sodium selenite (Na_2SeO_3) on the oxidative degradation of hemoglobin induced by hydrogen peroxide (H_2O_2) was studied by recording the resulting two fluorescent products of heme breakdown ($\lambda_{\text{ex}} = 321 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ nm}$) and ($\lambda_{\text{ex}} = 465 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 525 \text{ nm}$). It has been established that sodium selenite (Na_2SeO_3) inhibits the development of oxidative modification of hemoglobin (depletion of oxyhemoglobin, accumulation of methemoglobin and ferrylhemoglobin), which is reflected in a noticeable 20–30% decrease in fluorescence peaks, reflecting the oxidative destruction of heme in the absence of the contribution of antiperoxide enzymes (catalase, glutathione peroxidase, peroxiredoxin-2) in H_2O_2 utilization. This raises the question of the independent AO significance of selenium in hemoglobin, in its protection from peroxide effects without the GPX mechanism of H_2O_2 utilization.

Keywords: hydrogen peroxide, selenium, sodium selenite, fluorescence, glutathione peroxidase, erythrocyte