
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ — КЛИНИКЕ

КИНЕТИЧЕСКАЯ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ КАК МЕТОД ОЦЕНКИ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА ПРИ ОБСЛЕДОВАНИИ ПАЦИЕНТОВ С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2-ГО ТИПА

Е.В.Проскурнина, А.М.Полимова, М.М.Созарукова,
М.А.Прудникова*, А.С.Аметов*, Ю.А.Владимиров

*Факультет фундаментальной медицины МГУ им. М.В.Ломоносова, Москва, РФ; *ГБОУ
ДПО Российская медицинская академия последипломного образования, Москва, РФ*

Для оценки окислительного стресса предложен новый подход с использованием кинетической хемилюминесценции: определение антиоксидантной и прооксидантной активности плазмы. В исследовании приняли участие 50 пациентов с сахарным диабетом 2-го типа на пероральной сахароснижающей терапии. Кроме указанных показателей, определяли уровень ТБК-активных продуктов, маркеры воспаления, показатели гемокоагуляции и биохимические показатели. Предложенный метод предоставляет независимую от клинических и лабораторных данных информацию об окислительном стрессе у пациентов с сахарным диабетом 2-го типа. Применение его в комплексе с клиническими, лабораторными и инструментальными исследованиями даст возможность полнее оценить состояние пациента в целях диагностики и выбора терапии.

Ключевые слова: окислительный стресс, плазма крови, кинетическая хемилюминесценция, сахарный диабет 2-го типа

За последние десятилетия накоплены данные, свидетельствующие о том, что окислительный стресс участвует в развитии сахарного диабета, в частности, в патогенезе инсулинорезистентности и дисфункции клеток — основных механизмов развития сахарного диабета 2-го типа и его сосудистых осложнений [2,4,7,8]. Высокий уровень глюкозы активирует различные ферментативные каскады в митохондриях, активизирует НАДФН-оксидазу, разобщает NO-синтазы и стимулирует ксантинооксидазы [5]. Липидная пероксидация и гликирование белков фактически объединяют карбонильный и окислительный стресс во взаимосвязанный метаболический круг [6].

Поскольку окислительный стресс является нарушением баланса между оксидантной и антиоксидантной системами организма, то при его оценке требуется количественное описание двух

этих составляющих. Хемилюминесцентный (ХЛ) метод благодаря своим преимуществам (простоте, дешевизне, чувствительности и информативности) может успешно использоваться для этих целей. Разработано множество отдельных ХЛ-методик для определения АФК и антиоксидантных свойств веществ [9]. Мы предлагаем новый подход, который позволит в одном эксперименте получить показатели о состоянии оксидантно-антиоксидантной системы плазмы крови.

Цель данного исследования — оценить возможность применения этого подхода в клинической практике у пациентов с сахарным диабетом 2-го типа.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследовании участвовали 50 пациентов (22 женщины и 28 мужчин) с сахарным диабетом 2-го типа, получавших пероральную сахароснижающую терапию. Средний возраст пациентов

Адрес для корреспонденции: proskurnina@gmail.com. Проскурнина Е.В.

составил 60.8 ± 7.0 лет, средний стаж диабета — 5.4 ± 3.6 года. Пациенты прошли комплексное клинико-лабораторное обследование с исследованием показателей липидного обмена, гликемического контроля, гемокоагуляции, показателей хронического воспаления и окислительного стресса (ТБК-реактивные продукты). Ранее с помощью разработанной методики мы обследовали 20 практически здоровых мужчин в возрасте 55.5 ± 4.0 года, которые проходили профилактическое обследование на базе Центральной клинической больницы гражданской авиации г. Москвы (группа контроля).

Критерии включения в исследование: возраст старше 18 лет, сахарный диабет 2-го типа, гликемия натощак 6–10 ммоль/л, гликированный гемоглобин $<10\%$; АлАТ, АсАТ, щелочная фосфатаза не превышают верхний порог нормы более чем в 2 раза.

Критерии исключения: печеночная и/или почечная недостаточность, тяжелая сердечная недостаточность, прием эстрогенов или пероральных контрацептивов, алкогольная или наркотическая зависимость, злокачественные новообразования, выявленные менее чем 5 лет назад, хрипы в легких, беременность и период лактации. Все пациенты подписали информированное согласие на добровольное участие в исследовании, предварительно ознакомившись с его условиями и целями.

ХЛ-анализ плазмы проводили с помощью однокюветного хемилюминометра “SmartLum 5773” (“ДИСофт”) с оригинальным программным обеспечением “PowerGraph 3.0”. Реагенты: люминол, 2,2'-азо-бис(2-амидинопропан) дигидрохлорид (АБАП), аскорбат натрия (“Fluka”), K_2HPO_4 (“Sigma”), H_2O_2 (“Sigma-Aldrich”), пероксидаза из корней хрена (ПХ, 124 МЕ/мг, “Sigma”).

В микропробирку объемом 1.5 мл помещали 50 мкл 50 мМ раствора АБАП и 20 мкл 0.1 мМ люминола. Смесь перемешивали в течение 2 мин на вортексе “Yellow Line TTS2” при частоте 1400 об/мин и инкубировали 20 мин в темноте при комнатной температуре. В кювету помещали необходимое количество нагретого (37°C) в термостате буферного раствора и 70 мкл смеси АБАП и люминола и регистрировали свечение до достижения стационарного уровня при 37°C , затем добавляли 10 мкл плазмы крови, предварительно разбавленной в 10 раз. Регистрацию прекращали после повторного выхода сигнала на плато. Общий объем пробы в кювете составлял 1 мл.

Для калибровки сигнала при определении антиоксидантной активности использовали аскорбиновую кислоту, при определении прооксидантной активности — стационарный сигнал плато

в системе: $\text{ПХ} + \text{H}_2\text{O}_2$ (0.01 мМ) + люминол (80 мкМ) + фосфатный буферный раствор pH 7.4 (100 мМ). Значение $\Delta I_{\text{ХЛ}}$ пересчитывали в единицы активности пероксидазы.

В исследуемой группе изучали аналитические показатели — антиоксидантную и прооксидантную активность плазмы, и полученные данные сравнивали с показателями контрольной группы. Для статистического анализа использовали пакет программ “Statistica” (“StatSoft”).

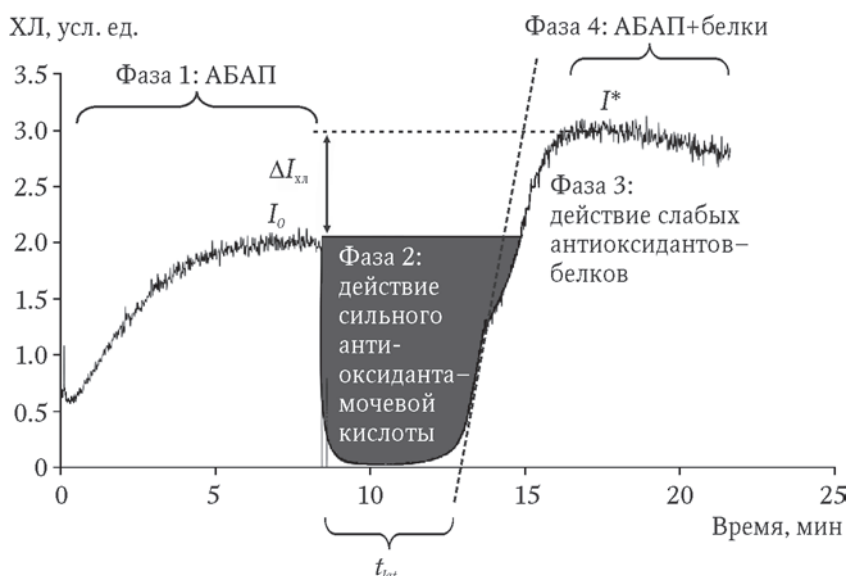
РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

ХЛ-метод определения антиоксидантной активности плазмы крови основан на регистрации кинетики ХЛ в системе АБАП+люминол [1]. В данном исследовании для клинических целей использовали модифицированный метод — с новым способом расчета аналитического сигнала.

Принцип метода кинетической ХЛ заключается в регистрации и обработке полной кривой развития ХЛ во времени. В качестве генератора свободных радикалов использовали органическое азосоединение АБАП, которое при нагревании (37°C) распадается на два радикала. В присутствии люминола регистрировали свечение, достигающее постоянного уровня I_0 (рисунок, фаза 1). После добавления плазмы крови свечение прекращалось благодаря нейтрализации радикалов антиоксидантами плазмы крови, прежде всего мочевой кислотой (фаза 2). После расходования антиоксидантов свечение вновь нарастало (фаза 3) и достигало нового стационарного уровня I^* (фаза 4), который при превышении уровня ХЛ до добавления плазмы может служить показателем прооксидантного действия белков крови.

Общепринятым является определение антиоксидантной активности по латентному периоду — временному отрезку между началом фазы 2 и временем, отсекаемым на оси абсцисс касательной (пунктирной линией) к нарастающей части кривой ХЛ (рисунок). Этот подход имеет ряд недостатков, которые, в частности, проявляются в том, что латентный период зависит от начального стационарного свечения I_0 , а возможное влияние на ХЛ слабых антиоксидантов вообще игнорируется. Способ расчета антиоксидантной активности по площади над “провалом” ХЛ-кривой (темная область на рисунке) является более точным, поскольку учитывает вклад всех антиоксидантов в активность, а результат не зависит от начального уровня свечения [3].

Теоретически калибровка аналитического сигнала может быть проведена по любому перехватчику радикалов, поскольку площадь “провала”



Кривая развития ХЛ в системе АБАП+люминол+плазма. Площадь темной области пропорциональна антиоксидантной активности плазмы крови. Пунктирная прямая — область латентного периода t_{lat} .

является универсальной мерой антиоксидантной активности вне зависимости от силы антиоксиданта. Практически удобно калибровать систему по сильному антиоксиданту плазмы крови — аскорбиновой кислоте. Уравнение градуировочного графика аппроксимируется прямой:

$$y=21.3x+0.32, r^2=0.993$$

Совокупность данных по антиоксидантной активности (АОА) у пациентов (группа В) и здоровых испытуемых (группа А) отличается от нормального (критерий Шапиро—Уилка): $n(B)=50, p(B)=0.015, n(A)=20, p(A)=0.031$. Описание массива данных: медиана (АОА-В) 1.76 мМ (в пересчете на аскорбат натрия), интерквартильный размах (АОА-В) 1.28-2.51 мМ, медиана (АОА-А) 1.64 мМ, интерквартильный размах (АОА-А) 1.32-2.12 мМ.

По критерию Манна—Уитни для двух независимых групп получены следующие данные: $U=430, z=-0.78, p=0.43$, что подтверждает гипотезу об отсутствии статистически значимого различия между выборками. Таким образом, уровень антиоксидантной защиты у компенсированных пациентов с сахарным диабетом 2-го типа соответствует нормальным значениям.

Ранее нами показано, что увеличение уровня стационарного свечения $\Delta I_{хл}$ (рисунок) определяется изменениями белков крови, в основном альбумина, и может быть использовано в качестве показателя оценки окислительного стресса.

Распределение признака отличается от нормального как в группе А ($p=0.001$), так и в группе В ($p=0.025$). В условных единицах активности ПХ: медиана (А) 1.34, интерквартильный размах 1.02-2.02; медиана (В) 2.49, интерквартильный размах 2.10-3.63. По критерию Манна—Уитни

подтверждается гипотеза о статистически значимом различии $U=236, z=5.7, p<0.001$.

Таким образом, прооксидантная активность белков плазмы у пациентов с сахарным диабетом 2-го типа статистически значимо превышает этот показатель в группе здоровых испытуемых, что свидетельствует о хроническом окислительном стрессе у больных диабетом данного типа.

С использованием нового, более точного способа расчета антиоксидантной активности плазмы показано, что антиоксидантная активность у пациентов с удовлетворительными показателями гликемического контроля статистически значимо не отличается от контроля. Предложен новый показатель, который может служить мерой прооксидантной активности белков плазмы. Разработанный подход предоставляет независимую информацию об окислительном стрессе у пациентов с сахарным диабетом 2-го типа, применение его в комплексе с клиническими, лабораторными и инструментальными исследованиями даст возможность более точной оценки объективного состояния и пациента, и прогноза.

Работа выполнена при поддержке РФФ (проект № 14-15-00375).

ЛИТЕРАТУРА

1. Алексеев А.В., Проскурнина Е.В., Владимиров Ю.А. Определение антиоксидантов методом активированной хемилюминесценции с использованием 2,2'-азо-бис(2-амидинопропана) // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2: Химия. 2012. Т. 53, № 3. С. 187-193.
2. Аметов А.С. Сахарный диабет 2 типа. Проблемы и решения. М., 2012.
3. Евразийский патент ЕА016868. Способ определения количества и/или активности антиоксидантов /

- Д.Ю.Измайлов, Ю.А.Владимиров // Опубликовано 30.08.2012.
4. *Folli F., Corradi D., Fanti P., Davalli A., Paez A., Giaccari A., Perego C., Muscogiuri G.* The role of oxidative stress in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus micro- and macrovascular complications: avenues for a mechanistic-based therapeutic approach // *Curr. Diabetes Rev.* 2011. Vol. 7, N 5. P. 313-324.
 5. *Mullarkey C.J., Edelstein D., Drownlee M.* Free radical generation by early glycation products: a mechanism for accelerated atherogenesis in diabetes // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1990. Vol. 173, N 3. P. 932-939.
 6. *Oxidative stress. Molecular mechanisms and biological effects* / Eds. V.I.Lushchak, H.M.Semchyshyn. Rijeka, 2012.
 7. *Pitocco D., Tesauro M., Alessandro R., Ghirlanda G., Cardillo C.* Oxidative stress in diabetes: implications for vascular and other complications // *Int. J. Mol. Sci.* 2013. Vol. 14, N 11. P. 21 525-21 550.
 8. *Ruskovska T., Bernlohr D.A.* Oxidative stress and protein carbonylation in adipose tissue – implications for insulin resistance and diabetes mellitus // *J. Proteomics.* 2013. Vol. 92. P. 323-334.
 9. *Vladimirov Y.A., Proskurnina E.V., Izmailov D.Y.* Chemiluminescence as a method for detection and study of free radicals in biological systems // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2007. Vol. 144, N 3. P. 390-396.

Получено 13.02.15
