

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ
И СИСТЕМЫ ЖИЗНЕОБЕСПЕЧЕНИЯ

УДК 616.379-008

ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТА ВТОРОЙ
ФАЗЫ БИОТРАНСФОРМАЦИИ КСЕНОБИОТИКОВ ГЛУТАТИОН
S-ТРАНСФЕРАЗЫ У ПАЦИЕНТОВ С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 1 И 2 ТИПА
С ДИСТАЛЬНОЙ НЕЙРОПАТИЕЙ И СИНДРОМОМ
ДИАБЕТИЧЕСКОЙ СТОПЫ

© 2023 г. В. И. Попов^{1,*}, А. С. Денисюкова²

¹Военный инновационный технополис «ЭРА», Анапа, Россия

²Кубанский государственный университет” Минздрава России, Краснодар, Россия

*E-mail: era_lab6@mil.ru

Поступила в редакцию 06.07.2023 г.

После доработки 06.07.2023 г.

Принята к публикации 05.10.2023 г.

Окислительный стресс свободных радикалов, сопровождающийся хронической гипергликемией при сахарном диабете, ослабляет эндогенную систему антиоксидантной защиты и является ключевым фактором, способствующим развитию осложнений диабета, в том числе дистальной нейропатии и синдрома диабетической стопы. Группа генов детоксикации второй фазы представлена суперсемейством глутатион S-трансфераз (GST), которые определяют индивидуальную чувствительность организма к воздействию факторов внешней среды. Изучена активность фермента второй фазы биотрансформации ксенобиотиков GST у больных сахарным диабетом 1 и 2 типа, имеющих дистальную нейропатию и синдром диабетической стопы.

DOI: 10.56304/S2782375X23020122

ВВЕДЕНИЕ

Сахарный диабет (СД) сопровождается хронической гипергликемией, вызванной дефектами секреции и/или действия инсулина. Гипергликемия генерирует свободные радикалы, вызывающие окислительный стресс, ослабляющий эндогенную систему антиоксидантной защиты. Окислительный стресс является ключевым фактором, способствующим развитию осложнений диабета, в том числе дистальной нейропатии (ДН) и синдрома диабетической стопы (СДС) [1].

В рамках системы антиоксидантной защиты рассмотрим систему биотрансформации ксенобиотиков, а именно реакции второй фазы биотрансформации ксенобиотиков. Группа генов детоксикации второй фазы представлена суперсемейством глутатион S-трансфераз (GST). Полиморфизм GST определяет индивидуальную чувствительность организма к воздействию факторов внешней среды [2].

Глутатион относится к водорастворимым антиоксидантам, присутствует в высоких концентрациях в каждой клетке, а также в сыворотке крови. Известно, что глутатиопосредованная детоксикация играет ключевую роль в обеспечении устойчивости клеток к перекисному окисле-

нию липидов (ПОЛ), к свободным радикалам, алкилированию белков [1].

GST представляют собой многоуровневое надсемейство ферментов, которые катализируют конъюгацию глутатиона с электрофильными соединениями, в том числе вырабатываемыми во время окислительного стресса. GST класса P (GSTP), один из изоферментов GST, имеет особенно высокое сродство к малым ненасыщенным альдегидам. Экспрессия и активность GST во время диабета были широко изучены, но мало что известно о механизмах регуляции GSTP [2].

GST катализирует детоксикацию окисленных метаболитов катехоламинов и может служить антиоксидантной системой, препятствующей дегенеративным клеточным процессам. GST является неферментативным антиоксидантом против активных форм кислорода в системе клеточной защиты. Перепроизводство свободных радикалов в мозге крыс с СД приводит к окислительному повреждению мембранных липидов, белка и в конечном итоге вызывает снижение содержания GST [4].

В связи с этим целью настоящей работы — изучение активности фермента второй фазы биотрансформации ксенобиотиков GST у больных СД 1 и 2 типа, имеющих ДН и СДС.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Обследовано 149 пациентов с СД 1 и 2 типа, имеющих ДН и СДС, которые были разделены на четыре группы. Возраст пациентов в каждой группе – от 18 до 70 лет. Первую группу составили 23 пациента с СД 1 типа мужчин и женщин, имеющих ДН. Во вторую группу вошли 58 больных СД 2 типа мужчин и женщин в возрасте, имеющих ДН. В третью группу вошли 12 пациентов с СД 1 типа мужчин и женщин, имеющих ДН и СДС. В четвертую группу вошли 56 пациентов с СД 2 типа мужчин и женщин, имеющих ДН и СДС. Контрольную группу составили 19 практически здоровых людей соответствующего возраста и пола. Диагноз СД у всех пациентов подтвержден клинико-лабораторными исследованиями. В работе использованы рекомендации федеральной целевой программы “Сахарный диабет”.

У всех обследованных пациентов было взято информированное добровольное согласие, после чего был проведен забор периферической венозной крови, из которой осуществляли получение гемолизата эритроцитов по следующей методике: кровь собирали в стеклянные пробирки с гепарином (200 ед./мл) и центрифугировали при 3000 об./мин в течение 10 мин, затем отбирали плазму, а эритроциты трижды отмывали холодным физиологическим раствором, каждый раз центрифугируя при тех же оборотах в течение 5 мин. Отмытые эритроциты гемолизировали, для чего к 0.1 мл упакованных эритроцитов с помощью пипетки сильной струей приливали 0.9 мл охлажденной бидистиллированной воды. Гемолизат периодически встряхивали в течение 5 мин, а затем центрифугировали при 14000 об./мин в течение 20 мин для осаждения стромы и неразрушенных клеток [5]. Прозрачный гемолизат сливали в стоящую на льду пробирку и использовали для определения активности GST.

Для расчета GST осуществляли приготовление раствора гемоглобина. Для этого собранную кровь (3–4 мл) центрифугировали при 3000 об./мин в течение 10 мин. Плазму и верхний слой эритроцитов удаляли. Эритроциты трижды отмывали 0.9%-ным раствором хлорида натрия с последующим центрифугированием. К полученной эритроцитарной массе в равном объеме добавляли дистиллированную воду и 0.4 объема четыреххлористого углерода (хлороформ). Пробирку закрывали пробкой и энергично встряхивали в течение 10 мин. После этого пробирку оставляли на 1 ч в холодильнике. Затем образец центрифугировали при 10000 об./мин в течение 30 мин либо при 4000–5000 об./мин в течение 1 ч, после чего осторожно отбирали гемолизат [6].

Методика исследования активности GST основывается на определении скорости конъюгации восстановленного глутатиона и 1-хлор-2,4-

динитробензола. Исследование активности GST в печени при действии физических и химических факторов осуществляли следующим образом:

– готовили контрольную пробу, для чего в пробирку внести 0.8 мл буфера (0.1 моль Na-фосфатного буфера, pH 6.5), 0.1 мл GST (100 ммоль) и 0.1 мл субстрата (100 ммоль 1-хлор-2,4-динитробензола);

– готовили опытную пробу, для этого в центрифужную пробирку внесли 2.4 мл буфера (0.1 моль Na-фосфатного буфера, pH 6.5), 0.1 мл гомогената, 0.1 мл GST (100 ммоль) и 0.1 мл субстрата (100 ммоль 1-хлор-2,4-динитробензола). Опытную пробу инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин, затем добавили 20 мкл 10%-ного раствора трихлоруксусной кислоты для останова реакции и денатурации белка.

Далее провели центрифугирование при 3000 об./мин в течение 5 мин для осаждения выпавшей в осадок белковой фракции. Измерили оптическую плотность опытной пробы против контрольной при 340 нм и рассчитали ферментативную активность по формуле, учитывая коэффициент молярной экстинкции, равный $9600 \text{ м}^{-1} \text{ см}^{-1}$ [7]:

$$A = \frac{\Delta E * V_1 * n * k}{m * V_2 * \text{Hb}}$$

где A – активность фермента, ммоль/мин/мг; $\Delta E = E_{\text{оп}} - E_{\text{кон}}$ – оптическая плотность опытной пробы против контрольной; t – время измерения, мин; V_1 – общий объем реакционной смеси, мл; $n = 21$ – коэффициент разведения эритроцитов в пробе; $k = 1000$ – коэффициент перерасчета ммоль в мкмоль; $m = 9600$ – коэффициент молярной экстинкции GST; V_2 – объем вносимой пробы плазмы, мл; Hb – гемоглобин.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Выявлены отличия в показателях GST по сравнению с контрольной группой (39.47 ± 1.69 мМоль/мин/мг):

– у больных с СД 1 типа, имеющих ДН, уровень GST составил 36.63 ± 1.39 мМоль/мин/мг;

– у пациентов с СД 2 типа, имеющих ДН, уровень GST составил 38.14 ± 1.19 мМоль/мин/мг;

– у больных с СД 1 типа, имеющих ДН и СДС, уровень GST составил 42.12 ± 2.62 мМоль/мин/мг;

– у пациентов с СД 2 типа, имеющих ДН и СДС, уровень GST составил 50.26 ± 1.15 мМоль/мин/мг.

Полученные данные статистически обработали с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA), множественные попарные сравнения выполнили с помощью критерия Тью-

ки. Статистически значимыми признаны показатели при уровне значимости менее 0.05 ($p < 0.05$).

В результате выявили статистически значимое отличие группы больных СД 1 типа от группы больных СД 2 типа при $p < 0.01$ и статистически значимое отличие показателя группы больных СД 2 типа относительно группы контроля при $p < 0.001$.

Определили корреляцию индекса инсулинорезистентности с активностью GST у пациентов с СД 2 типа и нейропатией в качестве предиктора окислительного стресса, который возникает при нарушении окислительно-антиоксидантного равновесия. Активные формы кислорода вызывают повреждение сосудов и ряд воспалений. Результаты настоящего исследования показывают, что нет существенной разницы между пациентами с СД и ДН и здоровыми людьми в резистентности к инсулину ($p > 0.05$). Активность GST значительно различается между пациентами и здоровыми группами ($p \leq 0.05$).

Сообщалось об улучшении резистентности к инсулину и высокой активности GST в группе пациента в качестве предупреждающего признака чрезмерного окислительного стресса. Не было никаких доказательств, раскрывающих связь между резистентностью к инсулину и GST. Настоящее исследование показало, что НОМА-IR имеет положительную связь с уровнем сахара в крови натощак и инсулином в группе нейропатии и диабетической группе и отрицательную связь с липопротеинами высокой плотности [3].

Полученные результаты показателей GST позволяют сделать вывод о том, что у больных СД 1 типа с ДН и СДС отмечается более низкий уровень антиоксидантной защиты по сравнению с пациентами, имеющими СД 2 типа, осложненный ДН и СДС, что вызывает более активные дегенеративные клеточные процессы у больных СД 1 типа с ДН и СДС.

Выявленные изменения в состоянии антиоксидантной системы у больных СД 1 и 2 типа с ДН и СДС направлены против отрицательного воз-

действия ПОЛ и уменьшают последствия окислительного стресса.

Таким образом, при сравнении свободнорадикальных процессов между группами больных СД 1 и 2 типа с ДН и СДС и соответствующими контрольными группами установлена разница в процессах ПОЛ по накоплению продуктов перекисидации.

ВЫВОДЫ

У пациентов СД 1 и 2 типа установлена активация процессов ПОЛ. Выявлен повышенный показатель GST у пациентов с СД 2 типа, имеющих ДН и СДС, относительно контрольной группы, что свидетельствует о напряжении антиоксидантных защитных механизмов.

Выявленные изменения активности фермента второй фазы биотрансформации ксенобиотиков GST влияют на развитие и течение ДН и СДС у пациентов с СД 1 и 2 типа.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Ding X., Kaminsky L.S.* // Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 2003. V. 43. P. 149.
2. *Oliveri L.M., Milena S.M., Buzaleh A.M., Gerez E.N.* // New Innovations in Chemistry and Biochemistry. 2022. V. 7. P. 137.
3. *Jaid K.H., Khaleel M.F., Salman N.I., Abd A.B.* // Ibn AL-Haitham J. For Pure Appl. Sci. 2022. V. 35 (4). P. 194.
<https://doi.org/10.30526/35.4.2916>
4. *Handayani P.N. et al.* // Biomed. Pharmacother. 2022. V. 148. P. 112730.
5. *Lippi G., Cervellin G., Favaloro E.J., Plebani M.* // Лабораторная служба. 2017. Т. 6. № 2. С. 46.
<https://doi.org/10.17116/labs20176238-46>
6. *Лопатина Н.И., Геронимус А.Л., Тренестова Е.П.* // Лаб. дело. 1976. № 6. С. 328.
7. *Арутюнян А.В., Дубинина Е.Е., Зыбина Н.Н.* Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма: методические рекомендации. СПб.: ИКФ "Фолиант", 2000. 104 с.