

Az oxidatív stressz felmérésének módozatai cukorbetegknél

Jákó Zsuzsánna^{oh.}, Nemes-Nagy Enikő¹, Balogh-Sămărghitan Victor¹, Crăciun Elena-Cristina²,
Kósa Beáta^{oh.}, Zöld Gizella^{oh.}, Czédula András^{oh.}, Szilveszter Mónika³, Baki László-Béla^{oh.},
Szócs Katalin⁴, Sánta Dóra⁵, Dobreanu Minodora⁶

Marosvásárhelyi Orvosi és Gyógyszerészeti Egyetem, ¹Orvosi Biokémia Tanszék, ²„Iuliu Hațieganu” Orvosi Egyetem, Kolozsvár, Gyógyszerészeti Biokémia Tanszék,
³Sepsiszentgyörgyi Megyei Kórház, ⁴2. sz. Belgyógyászati Klinika, Marosvásárhely, ⁵Santa Járóbetegrendelő, Marosvásárhely, ⁶MOGYE, Klinikai Biokémia és
Laboratórium Tanszék

Modalități de evaluare a stresului oxidativ la pacienții diabetici

Stresul oxidativ joacă un rol important în dezvoltarea și agravarea diabetului zaharat. Scopul lucrării este compararea a șase metode de evaluare a acestuia. Pentru dozarea malondialdehidei am folosit setul Bioxytech LPO 586, respectiv două metode bazate pe reacția malondialdehidă - acid tiobarbituric. Absorbantele au fost citite cu fotometrul Beckman DU-68. Am determinat activitatea superoxid dismutazei și a glutation peroxidazei cu Cobas Mira Plus. Statusul antioxidant din piele s-a determinat cu scannerul biofotonic. Rezultate: Concentrația malondialdehidei, determinată prin cele trei metode, a arătat o corelație bună, prezentând concentrații mai mari la pacienții diabetici, comparativ cu cei nediabetici. Enzimele antioxidante au avut valori fiziologice la majoritatea pacienților diabetici. Indicele carotenozilor din piele a fost semnificativ mai scăzut la diabetici, față de subiecții nediabetici de aceeași vârstă ($p < 0,05$). Concluzii: Evaluarea lipidperoxidării este un indicator mai sigur al intensității stresului oxidativ, comparativ cu activitatea enzimatică. Indicele carotenozilor din piele este o metodă modernă, neinvazivă în evaluarea antioxidantilor protectori.

Cuvinte cheie: stres oxidativ, malondialdehidă, diabet zaharat

Modalities of oxidative stress evaluation in diabetic patients

Oxidative stress is important in the development and progression of diabetes mellitus. The aim of this study is to compare six methods used to evaluate its intensity. Malondialdehyde concentration was determined by the Bioxytech LPO 586 kit, and two methods based on malondialdehyde - thiobarbituric acid reaction. Absorbances were determined using the Beckman DU-68 photometer. We also determined the activities of superoxid dismutase and glutathione peroxidase using a Cobas Mira Plus. We used a biophotonic scanner to determine the skin carotenoid score. Results: Good correlation was observed between malondialdehyde concentrations determined by the three methods, showing higher concentrations in diabetics compared to non-diabetic patients. Antioxidant enzymes showed physiological values in almost all diabetics. The skin carotenoid score was significantly lower in diabetics compared to non-diabetic subjects of the same age-group ($p < 0,05$). Conclusions: Evaluation of lipoperoxidation end products is a better indicator of the intensity of oxidative stress compared to enzyme activity. Skin carotenoid determination is a modern, non-invasive method to evaluate antioxidant protection.

Key words: oxidative stress, malondialdehyde, diabetes mellitus

Orvostudományi Értesítő, 2009, 82 (4): 261-264

www.orvtudert.ro

Oxidatív stresszről beszélünk ha a keletkező szabadgyökök és az antioxidáns rendszer között felbomlik az egyensúly és az előbbieket túlsúlyba kerülnek. A szabadgyök reakciók számos kórkép kialakulásában szerepet játszanak (pl. cukorbetegség, gyomorfekély, érelmeszesedés, rákbetegség, autoimmun kórképek, HIV fertőzés stb.) [2, 9]. A magas vércukorszint hatására a glükóz autooxidációja révén, illetve más mechanizmusok következtében emelkedik a szabadgyökök termelődése, felszabadulása. Ezt még súlyosítja az antioxidáns enzimek szintjének csökkenése [3, 1]. A szabadgyökök képesek különböző szinteken gátolni az inzulin szekréciót. A hasnyálmirigy B sejtjei nagyon érzékenyek a szuperoxid károsító hatására, amelyre magyarázatul szolgál az a tény, hogy a hasnyálmirigy az egyik, antioxidánsokban legszegényebb szervünk. A szabadgyökök károsító hatásának következtében a szervezetünk kialakított ellenük egy összetett védekező rendszert, amely fiziológiai körülmények között kiegyenlíti (semlegesíti) a szabadgyökök károsító hatását, de patológiai esetekben ez a védekezés elégtelenné válik [12].

Mivel a szabadgyökök élettideje nagyon rövid ezért a hatásukra megnövekedő lipid peroxidáció végtermékeinek a szintjét mérjük, amely gyakran használt állapotjelző az oxidatív stressz mértékének kimutatására. A malondialdehid (MDA)

egy szerves vegyület ($C_3H_4O_2$), laboratóriumban előállítható 1,1,3,3 tetramethoxypropan hidrolízisével.

Antioxidáns alatt az élő szervezetben, illetve a táplálékban található, természetes vagy mesterséges szabadgyököket hatástalanító vegyületeket értjük. Ezek az anyagok rendszerint szerves vegyületek, de találhatunk közöttük vegyérték váltásra hajlamos fémeket, valamint fémorganikus komplexeket is. Az idős, beteg szervezetben az antioxidánsok hatása, és mennyisége is csökken.

A szuperoxid dismutáz (SOD), glutation peroxidáz (GPX), illetve a kataláz szervezetünk három legfontosabb antioxidáns enzime. Az SOD katalizálja a szuperoxid átlakulását oxigénné és hidrogén peroxiddá. A GPX a szervezetünk legnagyobb mennyiségű antioxidáns enzime.

A karotének szervezetünk legnagyobb antioxidáns hatással bíró növényi eredetű, zsírolédkony, 40 szénatomos vegyületei, a magas energiájú szabadgyököket átalakítják egy kevésbé reaktív gyökké, amely a felesleges energiát fokozatosan adja le, hő formájában.

Dolgozatunk célja hat módszer hatékonyságának az összehasonlítása, amelyek az oxidatív stressz felmérésére szolgálnak. Páciensek: cukorbeteg gyermekek (2. sz. Gyermekklinika, Marosvásárhely) és felnőttek (2. sz. Belgyógyászati Klinika, Marosvásárhely), valamint nem diabeteses egyénekből álló kontrollcsoport.

Jákó Zsuzsánna

540103 Marosvásárhely - Târgu Mureș

Cornișa sétány 16/9

E-mail: jakozs@gmail.com

Anyag és módszer

A lipid peroxidáció végtermékének számító malondialdehid meghatározására három módszert használtunk: Bioxytech LPO-586 reagenskészletet, amely a malondialdehid és N-methyl-2-phenylindol (NMPI) közötti színreakción alapul és két másik módszert, amelyek a malondialdehid és tiobarbitursav reakcióján alapulnak, név szerint: Fogelman- és Kei Satoh-módszer. Az eredmények értékelése mindhárom esetben a Beckman DU-68 fotométerrel történt. A malondialdehid koncentráció felmérése 21 fős kontrollcsoporton és 12 fős cukorbeteg gyermekcsoporton történt. Az átlagéletkor a kontrollcsoport esetében 11,5 év $\pm$ 3,21 SD, míg a cukorbeteg gyermekeknél 10,8 év $\pm$ 3,77 SD volt. A tanulmányban szereplő cukorbeteg gyermekek 58 %-a lány volt, míg a kontrollcsoport esetében a nemek szerinti eloszlási arány 62% volt a lányok javára.

A statisztikai feldolgozásnál a GraphPad InStat programot vettük igénybe.

Bioxytech LPO-586 reagenskészlet

A szükséges anyagok: 0,2 ml szérum, 0,65 ml N-metil-2-phenylindol, 0,15 ml HCl 12N. Az eredmény leolvasása centrifugálás után 586 nm történik a vakpróbával szemben.

Kontrollcsoport: 0,55 $\pm$ 0,36 (SD) nmol/ml

Cukorbeteg: 1,20 $\pm$ 0,27 (SD) nmol/ml

p = 0,0011

<i>A Bioxytech LPO-586 reagenskészlet előnyei</i>	<i>A Bioxytech LPO-586 reagenskészlet hátrányai</i>
- az inkubáció 45 °C-on történik	- a reagenscsomag nagyon drága
- az ösztérfogot 1 ml, tehát használhatunk Eppendorf-csővet	- minden próbának van vak próbája, tehát a szükséges szérum: 2 $\times$ 200 μ l/teszt
- az N-methyl phenylindol használva nem csak az MDA értékét hanem a hidroxialkenálok szintjét is megmérhetjük.	- a 12 N HCl hozzáadása elég nehézkes
	- modern felszerelésre van szükség (ultracentrifuga)

Fogelman-módszer

Szükséges anyagok: 1 ml szérum, 0,375 ml triklórecetsav (ATA), 1M HCl, 0,2 ml tiobarbitursav 0,1M, 30 perces főzés és szonikálás

<i>A Fogelman-módszer előnyei</i>	<i>A Fogelman-módszer hátrányai</i>
- olcsóbb, mint az LPO-586 módszer	- a próbákat főzni kell 45 percet
- a szükséges szérum mennyisége kicsi: 100 μ l/teszt (ha végzünk egy 1:10 hígítást, amely előnyös a gyermekeknél)	- nehéz elválasztani a felülúszót a csapadéktól
	- szükség van ultracentrifugára

Kei Satoh-módszer

Szükséges anyagok: 0,5 ml szérum vagy plazma, 205 ml ATA 20%, 205 ml H₂SO₄ 0,05M, 3 ml 200 mg% TBA, 1M Na₂SO₄, 4 ml n-butyl alkohol [10].

<i>A Kei Satoh-módszer előnyei</i>	<i>A Kei Satoh-módszer hátrányai</i>
- kevesbé költséges, mint az LPO-586 módszer	- szükség van 500 ml szérum/teszt, ez gond lehet főleg a gyerekeknél, de használhatunk fele mennyiséget is
- elvégzéséhez nem szükséges modern laboratórium	- a próbákat 30 percig kell főzni
- a végtérfogot 9,5 tehát nem okoz gondot a felülúszóból történő pipettázás	- a Na ₂ SO ₄ 2M telített vegyület, hamar kicsapódik (ezért használtunk 1M-t)

Az antioxidáns enzimek közül a szuperoxid diszmutáz és glutation peroxidáz meghatározását végeztük el Cobas Mira Plus készüléken 24 diabeteses gyermekben, 8-17 éves korosztályon. A vizsgált csoport átlagéletkora 12,79 $\pm$ 3,13 év volt, a nemek szerinti eloszlás 58,33% volt a fiúk javára.

A glutation peroxidáz aktivitásának meghatározásához heparinra levett vérpróbákat használtunk, amelyeket -70 °C-ra fagyasztottunk, majd a feldolgozás napján olvasztottunk ki. A meghatározás a RANSEL kereskedelmi reagenskészlettel történt, amely Paglia és Valentine módszerén alapszik [7]. A szuperoxid diszmutáz aktivitásának meghatározásához EDTA-ra levett vérpróbákból származó mosott vörösvártesteket használtunk, és a hemoglobin koncentrációt Drabkin-módszerrel határoztuk meg, Sysmex KX-21 N készülék segítségével, és a mosott eritrociták tárolása szintén mélyfagyasztással történt a feldolgozás napjáig. Az eljárás a xantin-oxidáz segítségével termelődő szuperoxid gyökök indofenil-nitrofenol-fenil-tetrazolium kloriddal történő reakcióján alapszik [6].

A bőr szintjén az antioxidáns státus felmérésére *Raman biofotonikus scanner* által felmért karotén indexet alkalmaztunk. A biofotonikus scanner segítségével 20 tagú kontrollcsoportot vizsgáltunk meg, illetve 12 cukorbeteg. A kontrollcsoport átlagéletkora 47,72 év $\pm$ 15,04 SD volt, míg a cukorbetegké 50,73 év $\pm$ 16,3 SD. A nemek szerinti eloszlás 63% volt a nők javára a nem diabeteses csoportban, illetve 58% ugyancsak a nők javára a cukorbetegből álló csoportban.

Eredmények

A Bioxytech LPO-586 reagenskészlettel történő malondialdehid koncentráció mérés során az alábbi eredményeket kaptuk:

Kontrollcsoport: 0,55 $\pm$ 0,36 (SD) nmol/ml

Cukorbeteg: 1,20 $\pm$ 0,27 (SD) nmol/ml

p = 0,0011

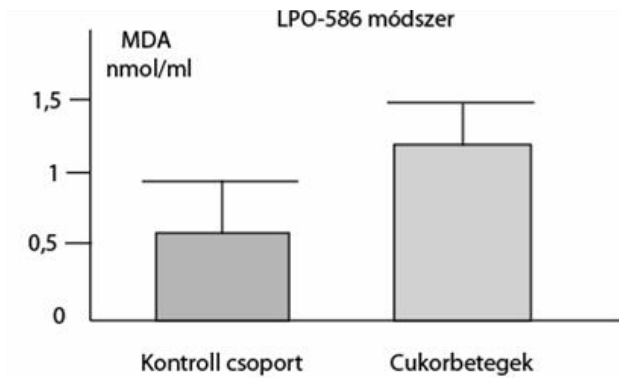
A Fogelman-módszerrel történő MDA szint meghatározás az alábbi eredményekhez vezetett:

Kontrollcsoport: 3,82 $\pm$ 1,48 (SD) nmol/ml

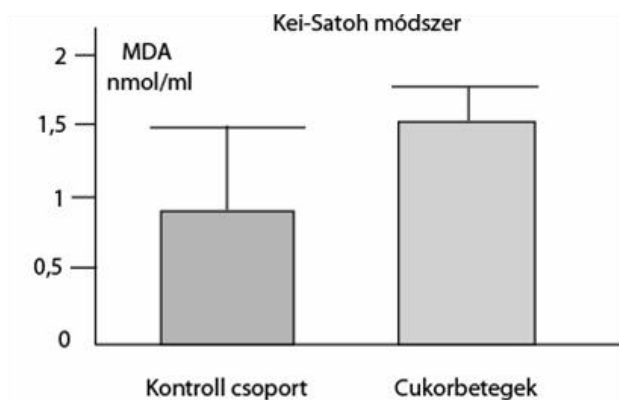
Cukorbeteg: 6,33 $\pm$ 1,184 (SD) nmol/ml

p = 0,0006

A Kei Satoh-módszerrel az alábbi eredményekhez jutottunk:



1. ábra. Az MDA koncentráció értéke a kontroll illetve cukorbeteg csoport esetében LPO-586 módszerrel



2. ábra. Az MDA koncentráció értéke a kontroll illetve cukorbeteg csoport esetében TBARS Kei-Satoh-módszerrel

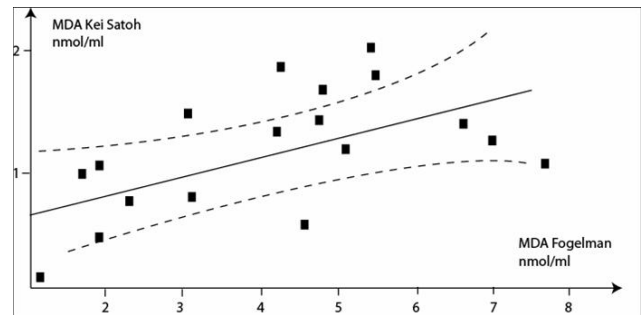
Kontrollcsoport: 0,91 +/- 0,6 (SD) nmol/ml
 Cukorbeteg: 1,53 +/- 0,21 (SD) nmol/ml
 $p = 0,0022$

A három eljárással meghatározott malondialdehid koncentráció jó korrelációt mutatott, cukorbetegségben magasabb értékeket jelezve a nem diabetesesekhez képest [5].

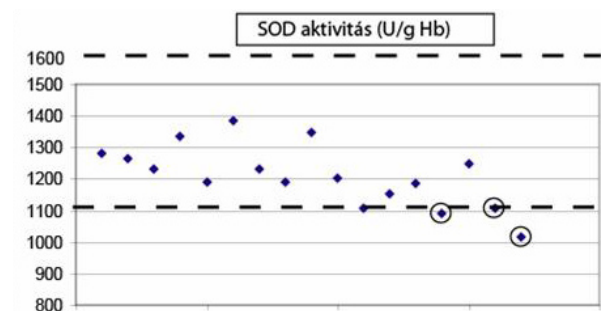
LPO-586 vs Fogelman: $r=0,81$ ($n = 8$), $p=0,015$
 Fogelman vs Satoh: $r=0,66$ ($n = 18$), $p=0,003$
 LPO-586 vs Satoh: $r = 0,91$ ($n = 9$), $p=0,0007$

Az antioxidáns enzimek fiziológiai értékeket mutatnak a felmért cukorbeteg nagy részénél. A cukorbeteg szuperoxid dizmutáz szintjét mérve 17% volt a fiziológiai (1102-1601 U/gHb) érték alatt, a glutation peroxidáz esetében pedig csupán 7% került a fiziológiai (27,5-73,6 U/gHb) tartomány alá [2, 6].

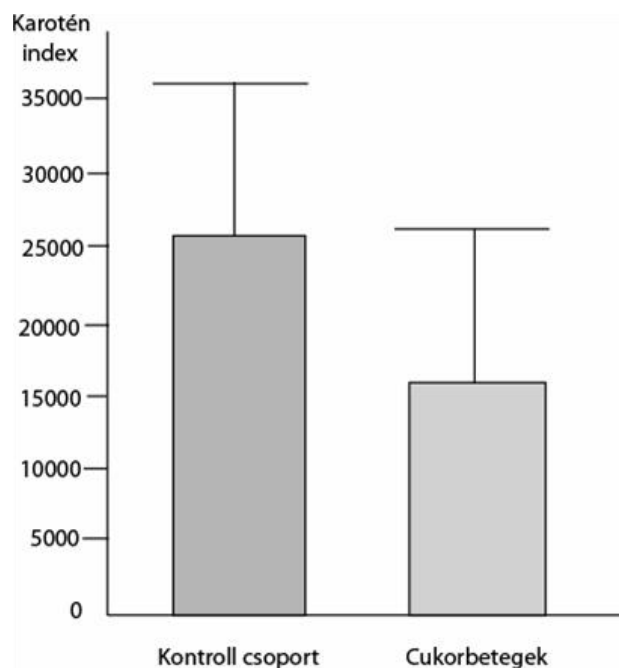
A karotén index az alábbi értékeket mutatta:
 Kontrollcsoport: 25736,84 +/- 11464 (SD)
 Cukorbeteg: 16727,27 +/- 11385 (SD)
 $p = 0,0469$



3. ábra. A malondialdehid koncentráció értékeinek korrelációja két TBARS módszerrel



4. ábra. A SOD aktivitása cukorbetegségben (a bekarikázott értékek a szaggatott vonallal jelölt fiziológiai tartomány alatt találhatók)



5. ábra. A karotén indexek értéke a kontrollcsoport és a cukorbeteg esetében

Megbeszélés

A három malondialdehid koncentráció meghatározására használatos módszer a lipidperoxidáció végtermékét vizsgálja, amelynek szintje egyenesen arányos az oxidatív stressz mértékével. Ezzel ellentétben az antioxidáns enzimek aktivitása csökkenhet szabadgyök reakciók túlsúlya esetén, amennyiben ezek elhasználódása jön létre, illetve irodalmi adatok alapján esetenként növekedést is tapasztalhatunk [2], kompenzatorikus mechanizmus során, különösen a hosszan tartó oxidatív stressz elleni védekező reakció keretén belül.

A táplálékban található karotenoidok a bőrbe szállítódhatnak, ahol védelmet nyújtanak az ultraibolya sugárzás ellen. A karotén koncentráció a bőrben lassabban változik a táplálkozás függvényében, mint a vérben található mennyiség. Egy közel 100 fős tanulmányon kimutatták, hogy a bőr karotén tartalma (a comb bőréből vett biopsziás mintából meghatározva) és a plazma β -karotén koncentrációja között 0,75-ös korrelációs együttható van [8].

A klasszikus HPLC meghatározás a bőrbiopsziás anyagból igen invazív jellegű, ezért nem alkalmazható rutinvizsgálatként a klinikai gyakorlatban. 1998-ban meghatározták reflektációs spektroszkópiával a test különböző részein a bőr karotén szintjét és összehasonlították a szérum karotén koncentrációval HPLC módszer segítségével. A legmagasabb korrelációs együttható a szérum koncentráció és a tenyér bőrében található mennyiség között volt ($r = 0,94$). A módszer hiányossága, hogy más pigmentanyagok interferenciát okoznak (pl. a melanin). 2000-ben kidolgoztak egy igen specifikus módszert a bőrben található karotenoidok meghatározására, amely a Raman-féle spektroszkópián alapszik [4]. Ez az eljárás különválasztja a karotén molekulákat ket-
tős kötések tartalmazó hosszú szénláncuk alapján, igen jó reprodukibilitással rendelkezik, és egy 104 fős tanulmány alapján $r = 0,78$ korrelációs együtthatót mutatott ($p < 0,001$) a szérum karotén koncentrációval. További tanulmányok bebizonyították, hogy a bőr karotén indexe hasonló összefüggést mutat a táplálkozással és a demográfiai jellemzőkkel akár a klasszikus szérum vagy plazma karotén meghatározások [11].

Következtetés

A lipidperoxidáció végtermékeinek meghatározása megbízhatóbb módszer az oxidatív stressz felmérésére, mint az antioxidáns enzimek vizsgálata.

A bőr karotén indexének meghatározása egy modern, nem invazív módszer a védő antioxidánsok szintjének felmérésére, amelyből következtetni lehet az oxidatív stressz mértékére. A bőr karotén indexe szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyult cukorbetegyeknél az egészséges egyénekhez képest ($p < 0,05$), különösen a súlyos esetekben találunk igen kis értékeket.

Irodalom

1. Baynes J.W. – *Role of oxidative stress in development of complications in diabetes*, Diabetes, 1991, 40:405-412.
2. Dejić D. – *Stresul oxidativ în bolile interne*, Ed. Casa Cărții de Știință, Cluj-Napoca, 2000.
3. Duma L., Duma V., Erdősy S. et al. – *Aspecte ale lipoperoxidării la pacienții diabetici cu și fără microangiopatie diabetică*, Infomedica, București, 1998, 3:21-23.
4. Hata T.R., Scholz T.A., Ermakov I.V. et al. – *Non-invasive raman spectroscopic detection of carotenoids in human skin*, Journal of Investigative Dermatology, 2000, 115:441-448.
5. Nemes-Nagy E., Dobreanu M., Balogh-Sámárgișan V. et al. – *Trei metode de determinare a produșilor de lipoperoxidare la copii diabetici*, Infomedica, București, 2004, 2(120):28-31.
6. Nemes-Nagy E., Szőcs-Molnár T., Dunca I. et al. – *Effect of a dietary supplement containing blueberry and sea buckthorn concentrate on antioxidant capacity in type 1 diabetic children*, Acta Physiologica Hungarica, 2008, 95(4):383-393.
7. Paglia D.E., Valentine W.N. – *Studies on the quantitative and qualitative characterisation of erythrocyte glutathione peroxidase*, J Lab Clin Med 1967, 70:158-169.
8. Peng, Y.M., Peng Y.S., Lin Y. et al. – *Concentrations and plasma-tissue-diet relationships of carotenoids, retinoids and tocopherols in humans*, Nutrition and Cancer, 1995, 23:233-246.
9. Răducanu-Lichiardopol C., Moța M., Bistriceanu M. et al. – *Stresul oxidativ în diabetul zaharat*, Infomedica, 2000, 73(3):4-8.
10. Satoh K. – *Serum lipid peroxide in cerebrovascular disorders determined by a new colorimetric method*, Clinica Chimica Acta, 1978, 90:37-43.
11. Smidt C.R., Shieh D. – *Non-invasive biophotonic assessment of skin carotenoids as a biomarker of human antioxidant status*, FASEB Journal, 2003, 17:11-15.
12. West I.C. – *Radicals and oxidative stress in diabetes*, J Assoc Physicians India, 1999, 47(4):380-383.