

ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДИКИ МЕДЬ-ЗАВИСИМОГО АУТООКИСЛЕНИЯ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ. АНАЛИЗ В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ С ПРИМЕНЕНИЕМ ИНТЕГРАЛЬНЫХ ВЫЧИСЛЕНИЙ

А.В. Иванов, Д.Д. Шамшина, Р.А. Литвинов, В.В. Батраков

ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» МЗ РФ

В данном исследовании описана оптимизация методики медь-индуцированного аутоокисления аскорбиновой кислоты как способа оценки хелатирующей активности веществ на примере пиоглитазона. В процесс регистрации данных была внедрена техника real-time. Анализ данных проведен с применением интегральных исчислений и последующей кластеризацией данных. Это позволило вести более быстрое определение активности и использовать в сравнительном анализе одну концентрацию в противовес стандартному концентрационному исследованию.

Ключевые слова: аскорбиновая кислота, многофункциональная антиоксидантность, хелация, сульфат меди (II), исследование в реальном времени.

DOI 10.19163/1994-9480-2018-2(66)-47-49

OPTIMISATION OF COPPER-INDUCED ASCORBATE AUTOXIDATION METHOD USING REAL-TIME DETECTION. INTEGRATIVE DECISION EXAMPLE

A.A. Ivanov, D.D. Shamshina, R.A. Litvinov, V.V. Batrakov

FSBEI HE «Volgograd State Medical University» of Public Health Ministry of the Russian Federation

This paper describes the new approach of process of optimization and comprehended analysis of results for copper-induced ascorbate autoxidation method. This is a method of chelating activity detection. Real-time technique in data registration was used and integrative analysis in comparison of the results was applied. It gives a possibility to evaluate the chelation properties of pioglitazone without calculation of IC_{50} . This variant is most actual for spread screening of chelating activity.

Key words: ascorbate, multifunctional autoxidation, chelation, copper sulfate (II), real-time analysis.

Биогенные металлы (Cu^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} и другие, относимые к металлам с переменной валентностью) вовлечены в патогенез сосудистых и неврологических осложнений диабета (микро- и макроангиопатия, нефропатия, ретинопатия, энцефалопатия, полинейропатия), а также участвуют в развитии некоторых нейродегенеративных и сердечно-сосудистых патологий [2, 3, 5–7]. Образование поперечно-сшитых белков, как конечного звена патогенеза, активно протекает в условиях длительной гипергликемии (гликирование аминокислотных остатков => основания Шиффа => продукты Амадори => реакция Суйяма или Намики или Ходжа => образование аминокадипата => сшивание), однако может проходить в условиях нормального уровня глюкозы, на фоне усиления процессов оксидативной деградации аминокислот (реакции перекисного окисления => путь Штадтмана => образование аминокадипата => сшивание) [9]. Данные реакции активнее протекают в условиях нарушенного гомеостаза металлов переменной валентности и при увеличении образования металлами АФК. Это позволяет рассматривать биогенные металлы переходного ряда как актуальную мишень в разработке средств фармакотерапии осложнений диабета. Роль металлов в представленном метаболизме заключена в нуклеофильном катализе и ускоренном образовании АФК, а потому не только хелация, но и изменение энергии d-орбитали и инактивация АФК являются способами устранения их нежелательной активности. В литературе [4] представ-

лено обозначение подобной активности термином «многофункциональная антиоксидантность, сочетающаяся с хелацией».

Аскорбиновая кислота в присутствии Cu^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} и др. вступает в реакцию аутоокисления, этапами которой также являются нуклеофильный катализ окисления и окисление от воздействия образующихся АФК [8]. Вещества, тормозящие реакцию металл-индуцированного аутоокисления, могут рассматриваться как потенциальные многофункциональные антиоксиданты с хелатирующей активностью.

Скорость окисления аскорбиновой кислоты определена кинетикой окисления, которое напрямую зависит от уровня проявляемой веществом активности. Данная зависимость позволяет оценить активность вещества без прибегания к стандартному определению показателя полуактивной концентрации в пользу исследования в одной концентрации.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Оптимизация методики медь-индуцированного аутоокисления аскорбиновой кислоты путем внедрения процедуры real-time в процесс регистрации данных.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект определения: Пиоглитазона гидрохлорид.

Реактивы: Аскорбиновая кислота (х.ч.), сульфат меди (II) пятиводный (х.ч.) деионизированная вода (деионизатор Prodeion 10 VS).

Стандартная операционная процедура: оригинальная методика медь-индуцированного аутоокисления аскорбиновой кислоты предварительно настроена, валидизирована [1] и неоднократно использована коллективом авторов в исследовательской деятельности [10, 11].

Для стандартного теста готовили раствор индикатора – 100 мкМ аскорбиновой кислоты в деионизированной воде. Перед проведением реакции в кварцевую кювету ($V = 3$ мл, $l = 10$ мм), установленную в спектрофотометре APOL PD 303 UV (Япония), вносили 2,5 мл 100 мкМ раствора аскорбиновой кислоты. Целевая оптическая плотность данного раствора, готового к инициации реакции аутоокисления, при рабочей длине волны λ 265 нм составляла 1250 ± 50 (измерение против деионизированной воды, для удобства все значения оптической плотности умножены на 1000). Пиогли-тазон растворяли в 1 мл ДМСО 99%. Индуктор аутоокисления – сульфат меди (II) пятиводный – растворяли в деионизированной воде. 75 мкМ маточного раствора пиогли-тазона инкубировали при 37 °С вместе с 150 мкМ раствора индуктора аутоокисления (эквивалентно 95 мкМ безводной соли). После проведения инкубации, смесь вносили в кювету с аскорбиновой кислотой, фиксировали падение оптической плотности при длине волны λ 265 нм с временным интервалом 5 секунд после начала реакции, и до полной ее остановки.

Анализ активности проводили методом оценки интегральных величин (определенный интеграл) с последующей кластеризацией полученных данных. Построенные графики зависимости оптической плотности от времени проанализировали через расчет интеграла линейной функции нескольких переменных. Функция оправдана наличием линейной зависимости между графическими отображениями оптической плотности и ходом времени в интегральном построении.

Условия проведения интегрального анализа: шаг точности (E) = 1, диапазон значений (коэффициент $X \cdot E$) от -2 до 260. К определению интеграла использовали метод Риманна.

Статистическая обработка была проведена методом кластеризации k -средних в программе

STATISTICA 12 (версия 12.5.192.7) с целью оценки уровня значимости для полученных классов: 1) экспериментальные и 2) контрольные данные, с последующим выявлением значимости различий.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведения экспериментов получили графики падения оптической плотности аскорбиновой кислоты во времени (рис. 1).

Представленные графические зависимости доступны для сравнительного анализа различными методами в реальном времени, например, для определения так называемой точки полуреакции $T_{1/2}$. Аутоокисление аскорбиновой кислоты является реакцией Жаботинского – колебательным процессом. Поэтому из-за наличия колебаний, нативные графики неудобны для анализа real-time с опорой на свойства кривых.

При подборе способа анализа активности веществ по кривым наиболее пригодным является нахождение интегральной функции и значений определенного интеграла. Интеграл представляет собой сумму простых функций и используется для нахождения площади фигуры под кривой обобщенной функции.

При анализе каждый отдельный график кривых падения оптической плотности ($n = 5$ для опытной и контрольной групп) описывали с помощью значения интеграла нескольких линейных функций: $Y = A + BX_1 + CX_2 + DX_3 + EX_4 + FX_5$; где X_{1-5} – значения падения оптической плотности, $A-F$ – коэффициенты регрессии, равные 256,27; 1,48; 0,34; -1,99; 0,07; -0,17 соответственно. Применение функций оправданно наличием зависимости между графическим отображением оптической плотности и ходом времени. Условия для проведения интегрального анализа следующие: шаг точности (E) = 1, диапазон значений (коэффициент $X \cdot E$) от -2 до 260. Полученные методом Риманна данные контрольных (593,02) и экспериментальных (270,65) значений являются признаком наличия прямой зависимости в паттерне падения оптической плотности, что служит признаком чувствительности методики к иско-

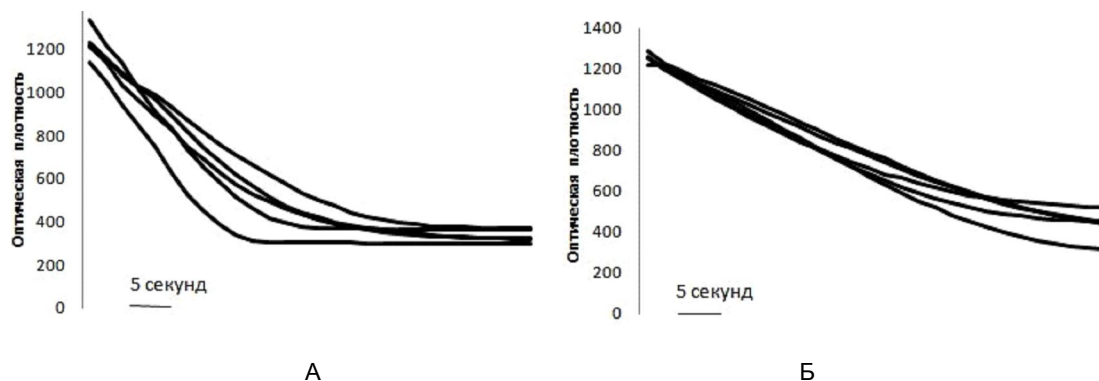


Рис. 1. Зависимость падения оптической плотности аскорбиновой кислоты при добавлении смеси 150 мкМ сульфата меди (II) пятиводного и ДМСО (А) и смеси 150 мкМ сульфата меди (II) пятиводного с 75 мкМ пиогли-тазона, растворенного в ДМСО (Б)

мой активности. Кластерные группы разделены значительным евклидовым расстоянием, позволяющим идентифицировать различия между ними. Экспериментальные значения: 0,261, контрольные значения: 0,068. Уровень значимости различий $p < 0,001$.

Таким образом, значения определенного интеграла кривых оптической плотности являются чувствительным фактором присутствия искомой активности. Классификация результатов, в свою очередь, является способом определения значимости различий.

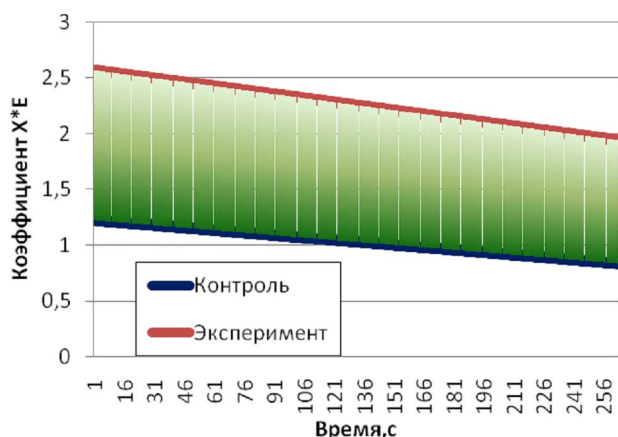


Рис. 2. Коридор между значениями определенного интеграла контроля и опыта

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Методика медь-индуцированного аутоокисления аскорбиновой кислоты оптимизирована на примере исследования пиоглиптона. При регистрации информации использована техника real-time с пошаговой фиксацией динамики оптической плотности во времени. Сравнительная оценка дана посредством кластеризации значений определенного интеграла, полученного по методу Римана. Отмечена высокая чувствительность оптимизированной методики к наличию активности.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Шамшина Д.Д., Литвинов Р.А. [SHamshina D.D., Litvinov R.A.] Валидация методики медь-зависимого аутоокисления аскорбиновой кислоты как способа оценки

активности соединений, связывающих d-элементы [Validaciya metodiki med'-zavisimogo autookisleniya askorbinovoj kisloty kak sposoba ocenki aktivnosti soedinenij, svyazyvayushchih d-ehlementy] [Validation of the procedure of copper-dependent autooxidation of ascorbic acid as a way of assessing the activity of compounds linking d-elements]. Вестник ВолГМУ [Vestnik VolgGMU] [Bulletin of VolgGMU], 2018, no. 1 (65), pp. 115–117. (In Russ.; abstr. in Engl.).

2. Aneni E.C., Escolar E., Lamas G.A. Chronic Toxic Metal Exposure and Cardiovascular Disease: Mechanisms of Risk and Emerging Role of Chelation Therapy. Curr. Atheroscler. Rep., 2016, Vol. 18 (12), pp. 81.

3. Dusek P., Schneider S.A., Aaseth J. Iron chelation in the treatment of neurodegenerative diseases. J. Trace Elem. Med. Bio., 2016, Vol. 38, pp. 81–92.

4. Kawada H., Kador P.F. Orally Bioavailable Metal Chelators and Radical Scavengers: Multifunctional Antioxidants for the Coadjuvant Treatment of Neurodegenerative Diseases. J. Med. Chem., 2015, Vol. 58 (22), pp. 8796–8805.

5. Khan A.R., Awan F.R. Metals in the pathogenesis of type 2 diabetes. J. Diabetes Metab. Disord., 2014, Vol. 13, pp. 16.

6. Lamas G.A., Navas-Acien A., Mark D.B., Lee K.L. Heavy Metals, Cardiovascular Disease, and the Unexpected Benefits of Chelation Therapy. JACC, 2016, Vol. 67 (20), pp. 2411–2418.

7. Nagai R., Murray D.B., Metz T.O., Baynes J.W. Chelation: a fundamental mechanism of action of AGE inhibitors, AGE breakers, and other inhibitors of diabetes complications. Diabetes, 2012, Vol. 61 (3), pp. 549–559.

8. Price D.L., Rhett P.M., Thorpe S.R., Baynes J.W. Chelating activity of advanced glycation end-product inhibitors. J. Biol. Chem., 2001, Vol. 276 (52), pp. 48967–48972.

9. Sell D.R., Strauch C.M., Shen W., Monnier V. 2-amino adipic acid is a marker of protein carbonyl oxidation in the aging human skin: effects of diabetes, renal failure and sepsis. Biochem. J., 2007, Vol. 404, pp. 269–277.

10. Spasov A.A., Babkov D.A., Sysoeva V.A., et al. 6-nitroazolo[1,5-a]pyrimidin-7(4h)-ones as antidiabetic agents. Archiv der Pharmazie, 2017, Vol. 350 (12).

11. Spasov A.A., Zhukovskaya O.N., Brigadirova A.A. et al. Synthesis and pharmacological activity of 2(biphenyl4yl)imidazo[1,2a]benzimidazoles. Russian Chemical Bulletin, 2017, Vol. 66, pp. 1905–1912.

Контактная информация

Литвинов Роман Александрович — к. м. н., ассистент кафедры фармакологии, Волгоградский государственный медицинский университет, e-mail: litvinov.volggmu@mail.ru