

Состояние антиоксидантной системы крови у пациентов с акромегалией

М.В. ФААССЕН¹, к.м.н. М.С. ПАНКРАТОВА¹, д.м.н. Н.Н. МОЛИТВОСЛОВОВА¹,
к.б.н. А.А. БАЙЖУМАНОВ², С.С. КОВАЛЕНКО², к.б.н. А.И. ЮСИПОВИЧ^{2*}, д.б.н. Г.В. МАКСИМОВ²,
член-корр. РАН В.А. ПЕТЕРКОВА¹

¹ФГБУ «Эндокринологический научный центр» Минздрава России, Москва; ²ФГБОУ ВПО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», Москва

Оценивали общую антиоксидантную активность плазмы (ОААП), уровень небелковых тиолов (НТ), уровень продуктов, связанных с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК-АП), активность супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы (Кат), а также уровень церулоплазмينا (ЦП). Показано, что у пациентов, страдающих акромегалией, по сравнению с контролем значительно уменьшается ОААП (в среднем на 20%) и активность СОД (в среднем на 30%). Полученные результаты позволяют предполагать развитие окислительного стресса у данных пациентов.

Ключевые слова: акромегалия, антиоксидантный статус.

The state of the blood antioxidant system in the patients presenting with acromegaly

M.V. FAASSEN, M.S. PANKRATOVA, N.N. MOLITVOSLOVOVA, A.A. BAIZHUMANOV, S.S. KOVALENKO,
A.I. YUSIPOVICH, G.V. MAKSIMOV, V.A. PETERKOVA

Endocrinology Research Centre, Russian Ministry of Health, Moscow; M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow

The state of the blood antioxidant system in the patients presenting with acromegaly. The objective of the present study was to evaluate the total antioxidant activity (TAA) of blood plasma, the levels of non-protein thiols and 2-thiobarbituric acid-active products (TBA-AP), superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activities as well as ceruloplasmin (CP) level in the patients presenting with acromegaly. It was shown that plasma TAA and SOD activity in this patients was on the average 20 and 30% lower respectively than in the control subjects. At the same time, the TBA-AP and CP levels increased by 50 and 40% respectively. These data suggest the development of oxidative stress in the acromegalic patients.

Keywords: acromegaly, antioxidant status.

Окислительный стресс — ключевой фактор в развитии многих патологий, таких как сахарный диабет, атеросклероз, гипертония и др. Для акромегалии, тяжелого заболевания, обусловленного хронической гиперпродукцией соматотропина, характерны такие осложнения, как сахарный диабет и сердечно-сосудистая патология. У пациентов с акромегалией увеличивается количество активных форм кислорода в плазме крови [1, 2]. В связи с этим оценка антиоксидантного статуса крови пациентов с акромегалией в активной стадии заболевания представляет несомненный интерес.

В настоящее время нет идеального биомаркера окислительного стресса, поскольку активные формы кислорода (АФК) чрезвычайно высокореактивны. Поэтому для адекватной оценки степени окислительного повреждения, вызванного АФК, мы предлагаем комплексное измерение показателей, наиболее полно характеризующих активность системы антиоксидантной защиты. Нам представляется наиболее перспективным использовать следу-

ющие показатели: общую антиоксидантную активность плазмы (ОААП) [3], активность ферментов супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы (Кат) [4, 5], уровень небелковых тиолов (НТ), уровень церулоплазмينا (ЦП), количество конечных продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ), оцениваемое по количеству продуктов, связанных с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК-АП) [4]. ОААП не зависит от активности ферментных антиоксидантных систем, активности жирорастворимых антиоксидантов, а определяется главным образом продуктами распада мочевой кислоты (уратами). СОД и ЦП ответственны не только за утилизацию супероксиданион-радикала, но и регулируют уровень металлов переменной валентности (меди и железа); Кат и НТ принимают участие в утилизации перекиси водорода, а увеличение уровня продуктов ПОЛ (ТБК-АП) является показателем окислительного стресса.

Снижение активности СОД наблюдается при различных хронических заболеваниях (например,

при сахарном диабете, хронических стрессорных воздействиях, сердечно-сосудистых заболеваниях и др.) [6]. Уменьшение активности СОД приводит к увеличению количества и времени жизни в клетках супероксиданион-радикалов и, как следствие, к возрастанию вероятности их токсического действия.

Уменьшение ОААП наблюдается при окислительном стрессе [3], как и увеличение уровня ТБК, которое также наблюдается при заболеваниях, связанных с окислительным стрессом (повышение сахара в крови и др.) [6].

Материал и методы

В исследование были включены 11 пациентов (8 женщин, 3 мужчины) в возрасте от 32 до 69 лет с акромегалией в активной стадии. Хронологический возраст (ХВ) составил $48,6 \pm 9,2$ года. Всем пациентам проводилось стандартное клинико-лабораторно-инструментальное обследование, включающее определение гемоглобина и общего холестерина (для оценки кислород-транспортных свойств крови и ее антиоксидантного статуса) на базе ФГБУ «Эндокринологический научный центр» Минздрава России. Для подтверждения активности заболевания у всех пациентов определяли уровни СТГ в ходе перорального глюкозотолерантного теста (ПГТТ) и ИФР-1. Исследования проведены в соответствии с этическими принципами, принятыми локальным Этическим комитетом. Группу контроля составили 9 добровольцев (5 мужчин и 4 женщины), средний возраст — $34,2 \pm 7,2$ года, не имеющих эндокринных заболеваний.

Оценка антиоксидантного статуса проводилась в образцах цельной крови в лаборатории биофизики биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

Определение активности супероксиддисмутазы (СОД) в крови и плазме. Метод основан на измерении количества продукта окисления адреналина — адренохрома, который образуется в отсутствие дополнительных источников генерации супероксида [7]. Активность СОД оценивалась по ингибированию аутоокисления адреналина в карбонатном буфере (рН=10,0) при добавлении образцов гемолизата крови (1:50). Активность выражали в относительных единицах на 1 мг белка или гемоглобина, где за 1 относительную единицу принято 50% ингибирование аутоокисления.

Определение активности ЦП в плазме. Метод [4] основан на ферментативной реакции ЦП с о-фенилендиаминном (ОФД) с образованием окрашенного продукта при 492 нм. Реакцию останавливали добавлением концентрированной серной кислоты. Уровень фермента определялся по калибровочной кривой.

Определение активности каталазы в гемолизате крови. Определение активности каталазы проводилось по методу Н. Aebl [8], основанного на том, что каталаза разрушает H_2O_2 . Измеряют уменьшение оптической плотности образца при 240 нм. Одна единица каталазной активности — количество фермента, необходимое для переработки 1 мМ H_2O_2 в минуту. Количество израсходованной H_2O_2 в минуту вычислялось с учетом коэффициента экстинкции ($46,3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Активность фермента выражалась в единицах каталазной активности на 1 г гемоглобина в минуту.

Определение содержания небелковых тиолов в крови. По методике [9] 0,05 мл крови смешивали с 0,5 мл 0,02 М ЭДТА- Na_2 и 0,5 мл 10% трихлоруксусной кислоты. После экстракции в течение 10 мин пробы центрифугировали в течение 15 мин при 8000 об/мин. Супернатант смешивали с 2 мл 0,4 М трис-НСl буфера (рН=8,9) и 50 мкл 0,01 М ДТНБ. Через 5 мин определяли оптическую плотность при 412 нм. Содержание небелковых тиолов выражали в нмоль/мг гемоглобина крови.

Определение ТБК активных продуктов в плазме. Метод [4] основывается на экстракции бутанолом продуктов перекисного окисления липидов, которые образуют с ТБК окрашенные комплексы.

Оптическая плотность (D) супернатанта измерялась против холостой пробы при 535 и 580 нм в кювете толщиной 1 см. Расчет содержания ТБК-активных продуктов проводился по формуле:

$$C = \Delta D_{535-580} \times 106 + 0,81,$$

где C — концентрация ТБК-активных продуктов (мкмоль/л плазмы).

Определение концентрации гемоглобина в гемолизате. Метод [4] основан на превращении всех форм гемоглобина в 0,06 % водном растворе додецилсульфата натрия в одну форму — гемихром. Измеряли оптическую плотность при 540 нм.

Концентрацию рассчитывали по закону Бугера—Ламберта—Бера:

$$C = (\Delta D \times 50 \times M_r) / \epsilon \text{ (г/л) (1)},$$

где 50 — разведение, M_r — молекулярный вес мономера гемоглобина (16114), ϵ — коэффициент молярной экстинкции гемоглобина (10140).

Определение антиоксидантной способности плазмы крови методом измерения ее способности восста-

Таблица 1. Клинико-лабораторные параметры (среднее $\pm$ стандартное отклонение) больных акромегалией

Параметр	Среднее $\pm$ стандартное отклонение	Референсные значения
Рост, см	$168,9 \pm 9,0$	—
Масса тела, кг	$88,6 \pm 17,0$	—
ИФР-1, нг/мл	718 ± 350	88—250
Гемоглобин, г/л	121 ± 26	Жен — 120—140 Муж — 135—160
Холестерин, ммоль/л	$5,7 \pm 1,3$	3,3—5,2

Таблица 2. Средние значения измеренных параметров антиоксидантного статуса крови (среднее±стандартное отклонение) больных акромегалией

Параметр	Контроль	Акромегалия	Статистическая значимость*, <i>p</i>
Общая антиоксидантная активность плазмы, усл. ед.	0,43±0,06	0,35±0,02	0,00226
Небелковые тиолы, нМоль на 1 мг гемоглобина	7,2±1,5	8,3±0,8	0,18054
ТБК-АП, нмоль/мл	3,4±0,7	5,1±0,5	0,00445
Супероксиддисмутазная активность в крови, у.е. на 1 мг гемоглобина	22,0±6,7	16,2±1,9	0,01971
Каталазная активность крови, у.е. на 1 мг гемоглобина	183±45	172±13	0,51938
Церулоплазмин, мкг/мл	394±76	579±42	0,00123

Примечание. * — для оценки достоверности различий между контрольной группой и пациентами, страдающими акромегалией, использовался двухвыборочный *t*-критерий в модификации Уэлча.

навливать железо. Метод основан на измерении образования восстановленного комплекса железа с 2,4,6-трипиридилтриазином, поглощающего при 593 нм, образование которого идет за счет взаимодействия с антиоксидантами крови [3].

Статистическая обработка проводилась с помощью программы Microcal Origin Pro 9.1. Данные представлены в виде среднее значение ± стандартное отклонение. При сравнении параметров контрольной и экспериментальной групп использовался парный *t*-критерий Стьюдента в модификации Уэлча. Статистически значимыми считались изменения при *p* < 0,05.

Результаты и обсуждение

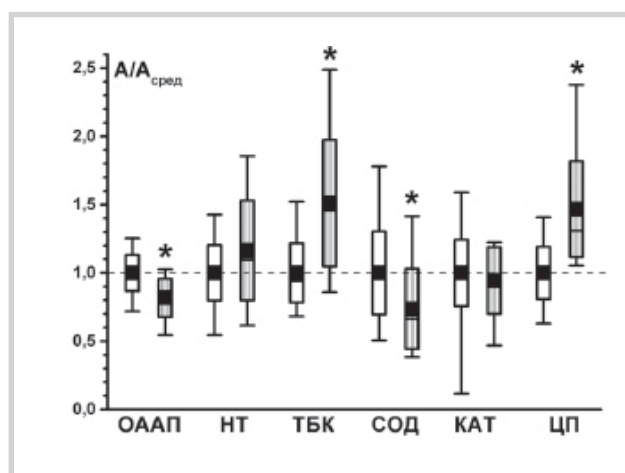
У всех пациентов с акромегалией отмечался повышенный уровень ИФР-1 (значения ИФР-1 превышали референсные значения) и отсутствовало подавление СТГ в ходе ПГТТ ниже 1 нг/мл, что подтверждало активную стадию заболевания. Отмечены также повышенный уровень холестерина (у 8 испытуемых значения холестерина превышали референсные значения) и пониженный уровень гемоглобина (табл. 1).

У пациентов с акромегалией имели место значимые изменения следующих параметров: уменьшение ОААП (в среднем на 20%), достоверное увеличение уровня ЦП (в среднем на 40%), уменьшение активности СОД (в среднем на 30%), а также повышенный уровень ТБК (в среднем на 50%) (табл. 2).

При этом, несмотря на достоверное отличие от контрольной группы, уровень ЦП у пациентов с акромегалией находился на верхней границе нормы. Кроме того, выявлена тенденция к снижению активности Кат и увеличению уровня НТ (см. рисунок).

Не обнаружено корреляции между клинко-гормональными (включая уровень ИФР-1) и антиоксидантными параметрами у пациентов, страдающих акромегалией.

Полученные данные в целом соответствуют зарубежным исследованиям, в которых оценивался



Распределение экспериментально измеренных параметров антиоксидантного статуса у здоровых добровольцев (незакрашенные прямоугольники) и пациентов, страдающих акромегалией (заштрихованные прямоугольники). Данные представлены как экспериментальные параметры, нормированные на соответствующие средние значения контрольной группы. Экспериментальные данные представлены в виде модифицированного «ящика с усами», где черная точка в центре — нормированные средние значения, горизонтальная линия внутри прямоугольника — медианные значения, вертикальные границы прямоугольника соответствуют величине стандартного отклонения выборки, а величина «усов» — нормированным максимальным и минимальным значениям параметров. * — значимые различия контрольной и экспериментальной групп (*T*-критерий в модификации Уэлча; *p* < 0,05).

антиоксидантный статус пациентов, страдающих акромегалией. Так, показано [1, 2] значимое увеличение основного маркера окислительного стресса — уровня ТБК у таких пациентов. Однако у пациентов с акромегалией не было обнаружено снижения активности КАТ (хотя наблюдалась тенденция к ее уменьшению) и уровня НТ. Это, вероятно, связано с тем, что вышеуказанные параметры антиоксидантной системы при акромегалии в значительной степени зависят от спектра и тяжести сопутствующих осложнений и, таким образом, являются сугубо индивидуальными и не всегда воспроизводимыми характеристиками пациентов.

Полученные данные подтверждают дисбаланс в работе антиоксидантной системы крови при акромегалии, что приводит к развитию окислительного стресса у данных пациентов.

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

Участие авторов:

Концепция и дизайн исследования — М.С. Панкратова, А.И. Юсипович, Г.В. Максимов, В.А. Петеркова

Сбор и обработка материала — М.С. Панкратова, А.И. Юсипович, М.В. Фаассен, С.С. Коваленко, А.А. Байжуманов, Н.Н. Молитвословова

Статистическая обработка данных — М.С. Панкратова, А.И. Юсипович, С.С. Коваленко, А.А. Байжуманов

Написание текста — М.С. Панкратова, А.И. Юсипович, М.В. Фаассен, С.С. Коваленко

Редактирование — Н.Н. Молитвословова, Г.В. Максимов, В.А. Петеркова

ЛИТЕРАТУРА

1. Nishizawa H, Handayaningsih A-E, Iguchi G, et al. Enhanced oxidative stress in GH-transgenic rat and acromegaly in humans. *Growth Hormone & IGF Research*. 2012;22(2):64-68. doi: 10.1016/j.ghir.2012.02.001.
2. Anagnostis P, Efstathiadou Z, Gougoura S, et al. Oxidative Stress and Reduced Antioxidative Status, along with Endothelial Dysfunction in Acromegaly. *Hormone and Metabolic Research*. 2012;45(04):314-318. doi: 10.1055/s-0032-1323765.
3. Benzie IFF, Strain JJ. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of «Antioxidant Power»: The FRAP Assay. *Anal Biochem*. 1996;239(1):70-76. doi: 10.1006/abio.1996.0292.
4. Brazhe NA, Baizhumanov AA, Parshina EY, et al. Studies of the blood antioxidant system and oxygen-transporting properties of human erythrocytes during 105-day isolation. *Human Physiology*. 2014;40(7):804-809. doi: 10.1134/s0362119714070020.
5. Панкратова М.С., Юсипович А.И., Воронцова М.В. и др. Особенности кислородного и антиоксидантного статуса крови на фоне заместительной терапии гормоном роста у детей с соматотропной недостаточностью. *Проблемы эндокринологии*. 2012;58:5:10-15. [Pankratova MS, Iusipovich AI, Vorontsova MV, Kovalenko SS, Baizhumanov AA, Parshina EI, et al. Peculiarities of the blood oxygen and antioxidant status in the children presenting with somatotrophic insufficiency and managed by the substitution treatment with growth hormone. *Problemy Endokrinologii*. 2012;58(5):10-15.] doi:10.14341/probl201258510-15.
6. Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British Journal of Pharmacology*. 2004;142(2):231-255. doi: 10.1038/sj.bjp.0705776.
7. Sun M, Zigman S. An improved spectrophotometric assay for superoxide dismutase based on epinephrine autoxidation. *Anal Biochem*. 1978;90(1):81-89. doi: 10.1016/0003-2697(78)90010-6.
8. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol*. 1984;105:121-126. doi: 10.1016/s0076-6879(84)05016-3.
9. Akhalaia MI, Baizhumanov AA, Brazhe NA, et al. Modifying effect of nitric oxide on rat blood plasma proteins and hemoglobin. *Doklady Biochemistry and Biophysics*. 2007;415(1):222-224. doi: 10.1134/s1607672907040151.