

УДК 612.017.1:616.441
DOI: 10.24061/1727-0847.16.4.2017.91

*М.І. Шеремет, В.О. Шідловський *, Л.П. Сидорчук, А.Д. Беденюк, Я.В. Гирла*
ВДНЗ України “Буковинський державний медичний університет”, Чернівці;
*Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського

АНАЛІЗ ПРОЦЕСІВ ПЕРОКСИДНОГО ОКИСНЕННЯ, КАСПАЗИ-3 ТА КАСПАЗИ-8 У ХВОРИХ НА ВУЗЛОВІ ФОРМИ ЗОБА НА ФОНІ АВТОІМУННОГО ТИРЕОЇДИТУ ТА З АДЕНОМОЮ ЩИТОПОДІБНОЇ ЗАЛОЗИ

Резюме. У статті наведено результати порівняльного аналізу активності процесів пероксидного окиснення, каспази-3 та каспази-8 в тканині у хворих на аденому щитоподібної залози (ЩЗ) та вузловий зоб на фоні аутоімунного тиреоїдиту (ВЗАІТ). При дослідженні процесів пероксидного окиснення у тканині ЩЗ виявлено, що в патологічно зміненій тканині має місце суттєве зростання параметрів окислювальної модифікації білків (ОМБ), в той же час, активність ферментів антиоксидантного захисту (АОЗ) суттєво зменшувалась, причому більш вірогідно у хворих на ВЗАІТ. Показано, що у хворих на ВЗАІТ має місце вірогідне зростання активності каспази 3 та 8 як порівняно з макроскопічно незмінною тканиною, так і з аденомою ЩЗ. Обговорюються можливі механізми виявлених порушень.

Ключові слова: вузловий зоб на фоні аутоімунного тиреоїдиту, аденома щитоподібної залози, апоптоз, перекисне окиснення, каспази 3,8.

На сьогодні питання етіології, патогенезу, діагностики та хірургічного лікування такої поєднаної патології як вузловий зоб і аутоімунний тиреоїдит (АІТ) зберігають свою актуальність [1, 2]. Аутоімунний тиреоїдит, як фонове захворювання вузлового зоба, при якому практично завжди розвивається гіпотиреоз, на сьогодні ще вивчений недостатньо [3].

Своєчасна та точна діагностика вузлових утворень щитоподібної залози на фоні АІТ має важливе значення у виборі методу лікування вузлової тиреоїдної патології, показань, обсягу і характеру оперативного лікування [4-6].

Все це обумовлює актуальність досліджень, спрямованих на вивчення особливостей патогенезу та перебігу вузлового зобу на фоні аутоімунного тиреоїдиту, що дозволить розробити нові інформативні методи діагностики та прогнозування перебігу, патогенетично обґрунтовані ефективні методи лікування та профілактики ускладнень.

Вже не викликає сумнівів, що різні токсичні впливи чи метаболічні порушення призводять до розвитку оксидативного стресу, за умов останнього доля клітини визначається балансом сукупності різних адаптаційних метаболічних процесів, які індуковані дією патологічного чинника, а також генетичними і конституційними особливос-

тями її біохімічних систем [7, 8]. Однією з відповідей клітини за умов не тільки дії токсичних впливів, а і при порушенні балансу необхідних чинників росту, гормонів, цитокінів, при ушкодженні ДНК, інших структурних елементів клітини або порушенні регуляції проходження клітинного циклу є активація генетичної програми загибелі клітини – апоптозу [9, 10].

За даними літератури, найбільш раннім етапом апоптозу є окиснення ліпідів та білків клітинних мембран, що відбувається під впливом надлишкової продукції активних форм кисню (АФК) [11, 12]. Процеси, які дають змогу клітині адаптуватися до негативних впливів і визначають можливість її подальшого існування, або загибелі, як вважають, залежать від особливостей механізмів індукції, регуляції та реалізації апоптозу [13].

Механізми апоптотичної загибелі тиреоцитів при аутоімунних захворюваннях ЩЗ є предметом активного вивчення в останні десятиліття [14].

Інтенсивність досліджень проблеми апоптозу в останні роки пов'язана з низкою обставин. Перш за все, з'явилися методичні можливості реєстрації різних проявів апоптозу та аналізу його молекулярних механізмів, які тісно пов'язані з механізмами інших актуальних явищ (активацією проце-

сів пероксидного окиснення) [11-16]. Крім того, вивчення апоптозу виявилось дуже продуктивним для розуміння ряду найважливіших процесів, включаючи імунний гомеостаз і онкогенез [17]. Нарешті, у зв'язку з апоптозом виникла необхідність перегляду низки концептуальних основ патофізіології [17].

На сьогоднішній день виявлено ряд механізмів індукції апоптозу тиреоцитів. Зазвичай, апоптоз відбувається через 2 основні шляхи: внутрішній шлях, опосередкований мітохондріями, в результаті активації каспази 9, в той час як зовнішній шлях, опосередкований активацією Fas-рецепторів (CD95) і включає в себе активацію каспази 8 [10, 14]. Обидва шляхи сходяться до активності ефекторних каспаз, виконавців апоптозу (каспази 3, 6, 7), що приводить до деградації ДНК і загибелі клітини [14].

Мішенями каспаз-ефекторів є білки, деградація яких викликає незворотні зміни в клітині [3, 11]. Дія каспаз специфічна: під їх впливом деградують тільки певні білки і до фрагментів певної довжини [15]. Тому каспази складають центральний компонент програми апоптозу, їх активація призводить до фінальної стадії загибелі клітин, а саме - до фрагментації ДНК і деградації структурних білків цитоскелету і клітинних мембран, а також до інактивації інших білків, що забезпечують нормальне функціонування клітини [9, 10]. Поява таких фрагментів білків служить біохімічним маркером апоптозу [16]. Однак, даних літератури про взаємозв'язок процесів пероксидного окиснення з активацією каспазного каскаду у хворих на АІТ майже немає.

Мета дослідження: вивчити про- та антиоксидантну активність, каспазо-залежні механізми індукції апоптозу в тканині ЩЗ хворих на вузловий зоб на фоні аутоімунного тиреоїдиту та з аденною щитоподібної залози.

Матеріал і методи. За 2013-2016 рр. обстежили 75 жінок зі скаргами на дискомфорт в ділянці шиї. Вік пацієнтів коливався від 23 до 72 років. Діагноз був виставлений клінічно, лабораторно (антитіла до тиреопероксидази (АТПО) – 60-250 ОД/мл; антитіла до тиреоглобуліну (АТТГ) – 60-500 ОД/мл; тиреотропний гормон (ТТГ) – 4-10 мОД/л) за допомогою УЗД, та підтверджений гістологічно після хірургічного лікування.

Нами виділена група з 25 жінок у яких за даними УЗД, тонкогальною аспіраційної пункційної біопсії (ТАПБ) та гістологічного заключення після операції було діагностовано аденому ЩЗ. Ми виділили групу в зв'язку з тим, що дана патологія є однією з найбільш розповсюджених серед вузлових

форм зоба. У пацієнтів проводили дослідження паренхіми неураженої вузлом, морфологічно незміненої, контрлатеральної частки ЩЗ. Ці показники слугували контролем. Остаточне підтвердження морфологічно незміненої тканини отримували після гістологічного заключення.

У 50 жінок було встановлено діагноз ВЗАІТ (II група). Показами до операції у даній групі хворих були: збільшення щитоподібної залози з симптомами стиснення і звуження трахеї та стравоходу; наявність вузлів з компресією на органи ший; прогресуюче зростання зоба, незважаючи на проведену протягом 1-1,5 років консервативну терапію; підозра на злоякісне переродження, яке базувалося на даних ТАПБ.

У дослідження не включали пацієнток з гіпертиреозом, маніфестним гіпотиреозом, артеріальною гіпертензією та серцево-судинними захворюваннями, тяжкою соматичною патологією і після настання менопаузи.

Пацієнти I-ої та II-ої груп були рандомізовані за віком (відповідно $34,2 \pm 10,33$ і $38,0 \pm 10,62$ року, $p=0,12$), антропометричними даними (індекс маси тіла - ІМТ відповідно $23,5 \pm 2,71$ і $24,3 \pm 4,88$ кг / м², $p=0,43$) та рівню вільного Т3 ($4,4 \pm 0,91$ і $4,4 \pm 0,93$ нг / л, $p=0,93$), але відрізнялися за рівнем вільного Т4 ($16,6 \pm 2,02$ і $12,9 \pm 3,42$ мкмоль / л, $p<0,0001$), ТТГ ($1,9 \pm 0,76$ і $4,9 \pm 3,51$ мОд/л, $p<0,0001$) і АТ-ТПО ($11,9 \pm 13,92$ і $255,7 \pm 340,58$ мОд/л, $p=0,0009$). У цілому відмінності між групами були закономірні і підтверджували аутоімунне ураження і тенденцію до зниження функції на фоні АІТ у пацієнток II-ої групи.

Всім хворим виконано оперативне втручання. Об'єм операції – від гемітиреоїдектомії до тиреоїдектомії. Після проведеного втручання тканина забиралася в операційній не пізніше ніж 30 хв. після операції. У пацієнтів I-ої групи окремо виділяли макроскопічно незмінену (паранодулярну) тканину, яка слугувала контролем для обох груп порівняння та аденоматозну тканину. У хворих на АІТ забирали тканину з лівої, правої часток і перешийку. Шматочки тканини масою 100-300 мг доставлялися на льоду в лабораторію і відразу ж розрізали на 4-6 частин масою в середньому по 50-70 мг кожен. Після поділу закривалися в спеціальний пластиковий контейнер і зберігалися при температурі -70°C до виконання основних досліджень.

Окремо досліджували про- та антиоксидантну активність у 5% гомогенатах тиреоїдної тканини, шляхом визначення активності глутатіонпероксидази (ГП, мкмоль/хв·г тканини), глу-

татіон-S-трансферази (GST, мкмоль/хв·г тканини) та ступеня ОМБ (о.о.г./г білка) за прийнятими методиками.

Для дослідження активності каспази 3 та 8 тканину цитоподібної залози подрібнювали в гомогенізаторі "WiseTis" серії HG-15 ("Daihan Scientific", Південна Корея) з ротором 8 мм при швидкості 4500 об/хв. Для цього використовували середовище виділення (20 мМ HEPES, рН 7,5, 10 мМ KCl, 1,5 мМ MgCl₂, 1 мМ ДТТ), до якого додавали коктейль інгібіторів протеаз (104 мМ AEBSF, 0,08 мМ протинін, 1,5 мМ пепстатину А, 2 мМ лейпептину, 4 мМ бестатину, 1,4 мМ E-64) у співвідношенні 100:1 (всі реактиви були вироблені фірмою "Sigma", США). Гомогенати центрифугували у мікроцентрифугі "Heraeusfresco 17" ("Thermo Electron LED GmbH", Німеччина) при 1500 обертах упродовж 30 хв за температури +4°C. Отриманий супернатант використовували для оцінки активності ка-

спази-3 і каспази-8. Специфічну активність і ефекторної каспази-3 та ініціаторної каспази-8 у тканині вивчали колориметричним методом на імуноферментному аналізаторі (ІФА) "Sanrise™-Tecan" (Австрія), при довжині хвилі 405 нм, за швидкістю розщеплення синтетичного субстрату N-ацетил-Асп-Глу-Вал-Асп-нітрозанілін (Ac-DEVD-NHA) і N-ацетил-Ілі-Глу-Тре-Асп-нітроанілін (Ac-IETD-PHA), відповідно. Всі реактиви, використані в даному дослідженні, були виготовлені фірмою "Sigma" (США). Активність каспаз оцінювали в мкмоль паранітроаніліну [год/мг білка].

Результати дослідження та їх обговорення. При дослідженні процесів пероксидного окиснення у тканині ЩЗ встановили, що в змінній тканині має місце суттєве зростання параметрів ОМБ, в той же час, активність ферментів антиоксидантного захисту (АОЗ) суттєво зменшувалась, при чому більш вірогідно у хворих на ВЗАІТ (табл. 1).

Таблиця 1

Показники оксидантного та антиоксидантного стану у тканині щитоподібної залози М±м

Показники	Незмінена тканина ЩЗ (n=25) контроль	Аденома ЩЗ (n=25) І група	Тканина хворих на ВЗАІТ (n=50) ІІ група
	1	2	3
ОМБ	46,19±2,75	60,68±2,92 P 1-2*	68,41±3,07 P 1-3*
ГП	191,55±14,55	166,65±15,85	139,57±13,72
GST	24,65±1,82	12,72±1,43 P 1-2*	10,64±1,36 P 1-3*

*(P< 0,001) різниця у порівнянні з активністю у позавузловій незмінній тканині

Так, активність ГП у хворих І-ої групи знижувалась майже на 15% порівняно з позавузловою тканиною, а у хворих ІІ-ої групи – на 18%. Рівень GST у хворих І-ої групи знижувався на 49,5%, а у хворих ІІ-ої групи – на 56,8%. Ступінь ОМБ був на 24% вищим у хворих І-ої групи, а у хворих ІІ-ої групи – на 33,4%.

У процесі проведеного дослідження встановлено, що активність каспази-3 у тканині пацієнтів ІІ групи була удвічі вищою, ніж у незмінній тканині ЩЗ (табл. 2), що свідчить про активацію за цих умов каспазозалежного шляху апоптозу. При цьому вірогідно зростає також активність каспази-8 як порівняно з такою у незмінній тканині ЩЗ, так і з пацієнтами І-ої групи.

Такий дисбаланс між активністю процесів пероксидного окиснення та системою антиоксидантного захисту створює умови для реалізації пошкоджуючої дії процесів пероксидного окиснення на структури ЩЗ, а також для впливу АФК на про – та антиапоптичні мішені та механізми

шляхом прямого або опосередковано через внутрішньоклітинні редокс-залежні сигнал-передавальні системи. На наш погляд, цими структурами можуть бути елементи тиреоцитів – клітинна мембрана, внутрішньоклітинні структури, що спричи-

Таблиця 2

Активність каспази-3 та каспази-8 у тканині щитоподібної залози, М±м

Тканина	Каспаза-3	Каспаза-8
Незмінена тканина (n=25) - контроль	0,098±0,026	0,89±0,14
Аденома ЩЗ (n=25) – І група	0,123±0,036	0,93±0,15
Тканина хворих на ВЗАІТ (n=50) – ІІ група	0,186±0,028*	1,39±0,11*#

* – (P<0,05) різниця порівняно з активністю у позавузловій незмінній тканині; # – (P<0,05) різниця у порівнянні з активністю каспази у тканині ЩЗ із аденомою

няють запуск апоптичного сигналу, доказом чого є вірогідна активація як ініціаторних, так і ефекторних каспаз.

При цьому в клітині можуть активуватись кілька молекулярних шляхів, які взаємодіють між собою. Доказом цього є дані літератури, що підтверджують роль антиапоптозного білка Bcl-2 за умов розвитку АПТ, який займає одне з центральних місць у регуляції апоптозної функції мітохондрій [10, 11].

Оксидантний стрес призводить до утворення в мембранах клітини окиснених ліпідів, які також є апоптогенними факторами. Окисні модифікації каспаз (зокрема каспази-3), які є чутливими до редокс-статусу клітини, залежно від типу та локалізації таких змін, можуть спричиняти їхню активацію.

Зважаючи на це, а також на дані, що одержані при виконанні роботи можна припустити, що у пацієнтів із ВЗАІТ основні механізми апоптозу запускаються внаслідок надмірної активації процесів пероксидного окиснення, які спрямовані на залучення зовнішнього рецепторного механізму ініціації і підвищення активності каспази-3, а також може відбуватися внаслідок дії каспази-8, доказом чого є високо вірогідне зростання активності цього показника як порівняно з таким у незмінній тканині ЩЗ, так і в пацієнтів із аденомою ЩЗ.

Дослідження сигнальних шляхів каспаз за апоптозу клітин ЩЗ розпочалось не так давно і потребує подальшого вивчення. Відкриття фізіологічних регуляторів активності каспаз при апоптозі показує невичерпні можливості клітини для підтримки гомеостазу і природного завершення життєвого циклу. Відстеження шляхів, які викликають загибель клітин може сприяти розробці нових підходів для профілактики та лікування аутоімунних захворювань ЩЗ.

Висновки. 1. У тканині щитоподібної залози хворих на вузлові форми зоба на тлі аутоімунного тиреоїдиту та аденоми щитоподібної залози вірогідно активуються процеси пероксидного окиснення білків та зниження спроможності систем антиоксидантного захисту. 2. Індукція апоптозу тиреоцитів у хворих на ВЗАІТ за зовнішнім механізмом асоціює зі зростанням активності каспази-8, котра вірогідно переважає таку у хворих на аденому ЩЗ та у практично здорових на 56,18% і 49,46%, із відповідною реалізацією через ефекторну каспазу-3, активність якої зростає майже у 2 рази.

Перспективи подальших досліджень. Виявлення патогенетичних факторів і механізмів порушення регуляції апоптозу за ВЗАІТ дозволить визначити додаткові причини їх виникнення і сформулювати патогенетично-обґрунтовані методи корекції імунopatологічних змін.

Список використаної літератури

1. Tsyganenko O.S. Immunomorphological reaction in the thyroid tissue in patients with autoimmune thyroiditis in combination with nodular goiter / O.S. Tsyganenko, R.S. Voroschuk // *Arta Medica. Nicholas Anestiadi, Tenth Congress of the Association of Surgeons of Moldova: Chisinau.* – 2007. – October; 4 (25). – P. 51-52.
2. Research of prognostic markers of proliferation and apoptosis in patients with nodular goiters combined with autoimmune thyroiditis / M.I. Sheremet, L.P. Sydorhuk, V.O. Shidlovskiy, A.D. Bedenyuk // *Archives of the Balkan Medical Union.* – 2016. – № 51 (4). – P. 488-491.
3. Олійник В.А. Хронічний лімфоцитарний тиреоїдит (тиреоїдит Хашимото): сучасний стан проблеми / В.А. Олійник // *Ендокринологія.* – 2006. – № 1. – С. 71-79.
4. Власенко М.В. Аутоиммунный тиреоидит у подростков / М.В. Власенко // *В кн.: 100 избранных лекций по эндокринологии / Под ред. Ю.И. Караченцева, А.В. Казакова, Н.А. Кравчуна, И.М. Ильиной.* – Харьков, 2009. – С. 372-378.
5. Ai J. Autoimmune thyroid diseases: Etiology, pathogenesis, and dermatologic manifestations / J. Ai, J.M. Leonhardt, W.R. Heymann // *J. Am. Acad. Dermatol.* – 2003. – V. 48. – P. 641-659.
6. New prognostic markers of nodular forms of goiter combined with autoimmune thyroiditis / M.I. Sheremet, L.P. Sydorhuk, V.O. Shidlovskiy [et al.] // *Journal of Education, Health and Sport.* – 2017. – № 7 (3). – P. 475-482.
7. Андреев А.Ю. Метаболизм активных форм кислорода в митохондриях / А.Ю. Андреев, Ю.Е. Кушнарёва, А.А. Старков // *Биохимия.* – 2005. – Т. 70, № 2. – С. 246-264.
8. Болдырев А.А. Дискриминация между апоптозом и некрозом под влиянием окислительного стресса / А.А. Болдырев // *Биохимия.* – 2000. – Т. 5, № 7. – С. 981-991.
9. Мишуніна Т.М. Механізми апоптозу клітин щитоподібної залози за умов її патології / Т.М. Мишуніна, О.В. Калініченко, М.Д. Тронько // *Фізіолог. ж.* – 2009. – Т. 55, № 6. – С. 90-102.
10. Мітохондріальні та постмітохондріальні механізми апоптозу у тканині щитоподібної залози з ознаками лімфоїдної інфільтрації чи хронічного тиреоїдиту / Т.М. Мишуніна, О.В. Калініченко, М.Д. Тронько [та ін.] // *Ендокринологія.* – 2009. – Т. 14, № 1. – С. 48-56.
11. Роль апоптозу в розвитку аутоиммунних захворювань щитовидної залози / Ю.В. Недосекова, О.И. Уразова, Е.Б. Кравец, А.В. Чайковский // *Бюллетень сибирской медицины.* – 2009. – № 4 (2). – С. 64-71.
12. Особенности перекисного окисления липидов и белков при аутоиммунном тиреоидите без и

с минимальной тиреодной дисфункцией / Т.А. Некрасова, Т.Г. Щербатюк, Д.В. Давыденко [и др.] // *Клиническая и экспериментальная тиреодология*. – 2011. – Т. 7, № 4. – С. 38-43. 13. *The effect of hypothyroidism, hyperthyroidism, and the ir treatment on parameters of oxidative stress and antioxidant status* / Н. Erdamar, Н. Demirci, Н. Yaman [et al.] // *Clin. Chem. Lab. Med.* – 2008. – V. 46, № 7. – P. 1004-1010. 14. *Superoxide radical-initiated apoptotic signaling pathway in selenite-treated Hep G (2) cell: mitochondria remains intact*. / Н.М. Shen, С.Ф. Yang, W.X. Ding [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* – 2001. – № 30. – P. 9-21. 15. Модуляция апоптоза мононуклеаров в условиях окислительного стресса / В.В. Новицкий, Н.В. Рязанцева, Н.Ю. Часовских [и др.] // *Бюл. эксперимент. биол. и мед.* – 2008. – № 3. – С. 251-254. 16. *Hancock J.T. Role of reactive oxygen species in cell signaling pathways* / J.T. Hancock, R. Desikan, S.J. Neill // *Biochem. Soc. Trans.* – 2001. – Vol. 29. – P. 345-350. 17. *Bretz J.D. Apoptosis and autoimmune thyroid disease: following a TRAIL to thyroid destruction?* / J.D. Bretz, J.R. Baker // *Clin. Endocrinol.* – 2001. – V. 55, № 1. – P. 1-11.

АНАЛИЗ ПРОЦЕССОВ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ, КАСПАЗЫ-3 И КАСПАЗЫ-8 У БОЛЬНЫХ С УЗЛОВЫМ ЗОБОМ НА ФОНЕ АУТОИММУННОГО ТИРЕОИДИТА И С АДЕНОМОЙ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Резюме. В статье приведены результаты сравнительного анализа активности процессов перекисного окисления, каспазы-3 и каспазы-8 в ткани у больных аденомой щитовидной железы и с узловым зобом на фоне аутоиммунного тиреозита. При исследовании процессов перекисного окисления в ткани щитовидной железы выявлено, что в измененной патологической ткани имеет место существенный рост параметров окислительной модификации белков, в то же время, активность ферментов антиоксидантной защиты существенно уменьшалась, причем более вероятно у больных с узловым зобом на фоне аутоиммунного тиреозита. Показано, что у больных с узловым зобом на фоне аутоиммунного тиреозита имеет место достоверное повышение активности каспазы 3 и 8 как по сравнению с макроскопически не измененной тканью, так и с аденомой щитовидной железы. Обсуждаются возможные механизмы выявленных нарушений.

Ключевые слова: узловой зоб на фоне аутоиммунного тиреозита, аденома щитовидной железы, апоптоз, перекисное окисление, каспазы-3, 8.

ANALYSIS OF PROCESSES PEROXIDATION, CASPASE-3 AND CASPASE-8 IN PATIENTS OF NODULAR GOITER WITH AUTOIMMUNE THYROIDITIS AND THYROID ADENOMA

Abstract. In the article presented the results of analysis processes peroxidation activity, caspase-3 and caspase-8 in the tissue of patients with thyroid adenoma and nodular goiter with autoimmune thyroiditis. In the study of processes peroxidation in tissue thyroid found that the diseased modified tissue is a significant growth parameters of oxidative modification of proteins at the same time, the activity of enzyme antioxidant protection is significantly reduced, and more likely in patients with nodular goiter with autoimmune thyroiditis. It is shown that in patients with nodular goiter with autoimmune thyroiditis is a significant increase of the activity of caspase 3 and 8 as compared to not macroscopically altered tissue and thyroid adenoma. Discussed of possible mechanisms of these disorders.

Key words: nodular goiter with autoimmune thyroiditis, thyroid adenoma, apoptosis, processes of peroxidation, caspase-3, 8.

Higher educational institution of Ukraine “Bukovina State Medical University” (Chernivtsi);
National Horbachevsky Memorial Medical University (Ternopil)

Надійшла 10.05.2017 р.
Рецензент – проф. Білокий В.В. (Чернівці)