

СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫЕ ПРОЦЕССЫ КАК СПЕЦИФИЧЕСКИЙ ФАКТОР РАЗВИТИЯ РАКА ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Канд. мед. наук В. Н. ГОРБЕНКО

FREE-RADICAL PROCESSES AS A SPECIFIC FACTOR OF THYROID CANCER DEVELOPMENT

V. N. GORBENKO

Институт общей и неотложной хирургии АМН Украины, Харьков, Украина

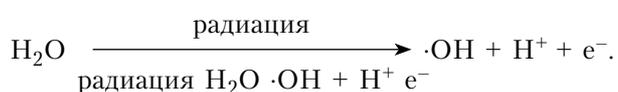
Показаны разнонаправленные изменения уровней продуктов перекисного окисления липидов и антиоксидантной активности в самом органе и в плазме крови больных при раке щитовидной железы. Проведенные исследования позволяют рекомендовать методы измерения баланса про-/антиоксидантных составляющих в плазме крови для оценки степени тяжести заболевания.

Ключевые слова: рак щитовидной железы, свободнорадикальные процессы, продукты перекисного окисления липидов.

Various changes in the level of lipid peroxidation products and antioxidant activity in the organ and blood plasma in patients with thyroid cancer are shown. The performed investigation allows to recommend the methods of measuring the balance of pro-/anti-oxidant components in the blood plasma in evaluation of the disease severity.

Key words: thyroid cancer, free-radical processes, lipid peroxidation products.

Гипотеза о ключевой роли свободных радикалов в процессах злокачественного перерождения клеток и развитии опухолей была сформулирована академиком Н. М. Эммануэлем еще в 50-е годы прошлого столетия. В последующие годы были получены экспериментальные подтверждения тому, что свободные радикалы могут сами инициировать или способствовать трансформации интактных клеток в опухолевые [1, 2]. Цитотоксическое и канцерогенное действие ионизирующих излучений на живые организмы прямо связывается с генерацией в процессе радиолиза воды (на которую приходится основная масса содержимого большинства клеток и межклеточного пространства организмов) такой активной формы кислорода, как гидроксильный радикал $\cdot\text{OH}$ [3]:



Модификация азотистых оснований ДНК в результате действия $\cdot\text{OH}$ приводит, с одной стороны, к малигнизации пораженных клеток [4], а с другой — к образованию аутоантител к трансформированной ДНК и индукции аутоиммунных процессов [5].

Наряду с тем, что свободнорадикальные процессы выступают в качестве неспецифического фактора в канцерогенезе вообще, на наш взгляд, их вклад в возникновение и развитие опухолей

именно щитовидной железы (ЩЖ) следует отнести к специфическим факторам по следующим причинам.

Участие ЩЖ в формировании баланса прооксидантов и антиоксидантов в организме в целом и в самом органе в частности определяется, во-первых, механизмом синтеза тиреоидных гормонов, во-вторых, про- либо антиоксидантными свойствами тироксина и трийодтиронина, в-третьих, влиянием тиреоидных гормонов, как минимум, на метаболизм липидов и ферментов, участвующих в продуцировании либо инактивации продуктов свободнорадикальных процессов.

Все метаболические процессы в ЩЖ, связанные с выработкой тиреоидных гормонов, протекают с участием мембранных структур тиреоцитов, а этапы этих процессов сопровождаются образованием свободнорадикальных форм промежуточных метаболитов синтеза гормонов.

Собственные процессы синтеза тиреоидных гормонов можно разделить на четыре последовательных этапа [6]. Первый этап включает активный транспорт иодида из плазмы в клетку ЩЖ и просвет фолликула. На втором этапе биосинтеза гормонов происходит окисление иодида в более реакционную радикальную форму, способную йодировать тирозильные остатки в молекуле тиреоглобулина. Окисление иодида осуществляется тиреоид-пероксидазой в присутствии H_2O_2 . Пероксид водорода в свою очередь образуется при действии НАДФН-оксидазы, сложного ферментного комплекса, включающего в свой состав как цитоплазматические, так и мембраносвязанные

белковые субъединицы. Возможно, эти две функции (окисление иодида и наработка H_2O_2) выполняются одним сложным ферментом, фрагмент которого был выделен в 1999 г. из ткани ЩЖ [7]. По современной номенклатуре изоформы этого фермента обозначаются как Duox1 и Duox2, или двойные оксидазы, или оксидазы ЩЖ (по месту преимущественной локализации). Фермент представляет собой трансмембранный сложный белок (флавопротеин), при этом фрагмент обращен во внеклеточное пространство доменом, обладающим пероксидазной активностью [8]. В фолликулах ЩЖ белки Duox обнаруживаются на апикальной поверхности тиреоцитов, где, как минимум, служат источником перекиси водорода для тиреоид-пероксидазы, осуществляющей иодирование входящих в состав тиреоглобулина остатков тирозина (с образованием неактивных предшественников тиреоидных гормонов — моноиодтирозинов (МИТ) и диiodтирозинов (ДИТ) и их конденсацию (опять же с участием пероксидазы) [9, 10].

В результате процессов, происходящих внутри молекулы тиреоглобулина на предыдущих этапах, образуются различные иодтиронины, в том числе Т3 и Т4. Конечный этап включает высвобождение активных гормонов в кровь. Вначале происходит пиноцитоз фолликулярного тиреоглобулина на апикальном краю клетки с образованием коллоидных капель. Они, в свою очередь, сливаются с тиреоидными лизосомами, образуя фаголизосомы, в которых тиреоглобулин гидролизуетея протеазами и пептидазами. Далее Т3 и Т4 выделяются в кровь.

Все этапы синтеза тиреоидных гормонов строго связаны с функционированием мембранных структур тиреоцитов, т. е. целостность их имеет первостепенное значение для нормального течения процесса. На центральных этапах синтеза при работе Duox2 происходит массовое образование активных кислотных метаболитов. Нарушение процесса вследствие недостатка субстратов для синтеза гормонов, изменения физико-химических свойств мембран тиреоцитов или неэффективной работы собственных антиоксидантных систем органа, безусловно, должно приводить к активации перекисного окисления липидов (ПОЛ) и увеличению концентрации его продуктов в ЩЖ и организме. При этом возможна прямая зависимость уровня продуктов ПОЛ от стадии развития опухоли и от тяжести заболевания. Причем, вероятно, увеличение степени дифференцировки опухоли будет способствовать усилению липопероокисления за счет активного гормонообразования. Таким образом, повышение уровня продуктов ПОЛ в крови больных с различными патологиями ЩЖ имеет диагностическое значение.

Целью работы явилось изучение зависимости между активацией свободнорадикальных процессов в ЩЖ и тяжестью заболевания, а также разработка диагностических критериев для оценки

изучаемых процессов у больных раком щитовидной железы (РЩЖ).

Были обследованы 95 больных РЩЖ, составляющих основную группу, и 20 больных с эутиреоидным зобом (контрольная группа), находившихся на стационарном лечении в Харьковском областном клиническом онкологическом диспансере в 2002–2003 гг. Диагноз у всех больных был верифицирован гистологически. Возраст больных находился в пределах от 34 до 65 лет, средний возраст — $51,4 \pm 3,2$ года. Всем больным на первом этапе лечения было выполнено хирургическое вмешательство. Состояние свободнорадикальных процессов оценивали по уровню продуктов ПОЛ в ЩЖ и крови больных.

Содержание продуктов ПОЛ определяли спектрофотометрически: диеновые конъюгаты — по специфическому поглощению в УФ области спектра при длине волны 233 нм [11]; ТБК-активные продукты ПОЛ — по методу Т. Asakawa et al. [12]; малоновый диальдегид — в реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой, при этом спектр поглощения окрашенного продукта записывали на спектрофотометре при длине волны 532 нм ($\epsilon = 1,56 \cdot 10^5 M^{-1} cm^{-1}$) [13]. Общую антиоксидантную активность (АОА) гомогенатов ЩЖ и плазмы крови определяли по их способности тормозить накопление ТБК-активных продуктов ПОЛ в суспензии желточных липопротеидов, как описано в [14], и выражали в процентах ингибирования окисления желточных липопротеидов. Количество общих липидов (ОЛ) определяли по методу Марча и Вейнштейна [15]. Статистическая обработка полученных материалов проводилась с использованием компьютерных программ и определением средних величин, их средних квадратичных отклонений и достоверности отличий.

Как показали наши исследования, действительно, в ЩЖ больных раком на разных стадиях заболевания повышается уровень первичных и вторичных продуктов ПОЛ, диеновых конъюгатов (ДК) и малонового диальдегида (МДА) соответственно. Данные, представленные в табл. 1, позволяют судить о степени выраженности этих изменений.

Мы изучали интегральные показатели про/антиоксидантного потенциала ЩЖ: кроме концентрации первичных (ДК) и вторичных (МДА) продуктов ПОЛ, были определены показатели АОА, т. е. общей способности всех антиоксидантных систем ЩЖ подавлять процессы липопероокисления. Наряду с этим для оценки наличия субстратов ПОЛ измерялся уровень ОЛ в ЩЖ.

По сравнению с показателями ткани ЩЖ, не пораженной злокачественной опухолью, по усредненным данным в общей выборке онкобольных наблюдается значительный рост продукции ДК и МДА, повышение уровня ОЛ и снижение АОА ЩЖ. Представляет особый интерес анализ данных табл. 1 по группам больных на разных стадиях заболевания.

**Про/антиоксидантный потенциал опухоли у больных РЩЖ
в зависимости от стадии заболевания**

X±Sx

Стадия заболевания	Исследуемые показатели			
	ДК, нмоль на 1 мг липидов	МДА, нмоль на 1 мг липидов	ОЛ, нмоль на 1 мг ткани	АОА, %
Контроль, n = 20	147,3±13,8	0,53±0,05	86,5±8,7	72,9±7,3
I, n = 25	195,4±17,4 **k	0,98±0,07 **k	89,7±8,1	58,1±5,5 *k
II, n = 21	223,7±20,3 **k	1,12±0,11 **k	103,5±11,2	53,2±5,3 *k
III, n = 31	291,4±23,4 **k, **I, *II	1,48±0,12 **k, **I, *II	131,7±11,9 **k, **I	44,9±4,2 **k, *I
IV, n = 18	312,2±32,7 **k, **I, **II	1,62±0,18 **k, **I, **II	149,4±15,8 **k, **I	40,8±4,4 **k, **I, *II
Всего, n = 95	258,3±11,5 **k	1,31±0,08 **k, **I	119,8±7,2 **k, **I	50,8±2,7 **k

Примечание. * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$ — различия между группами статистически значимы по сравнению с контролем (k) и стадиями (I–IV). То же в табл. 2.

По отличию рассматриваемых параметров от контроля, больных можно разделить на две большие группы: в одну отнести I и II стадии заболевания, в другую — III и IV стадии. Действительно, на I и II стадиях заболевания у больных повышается концентрация ДК и МДА, причем скорость роста концентрации вторичных продуктов (МДА) превалирует над таковой для первичных (ДК), АОА снижается. Уровень ОЛ значимо не отличается от показателей контроля, хотя на II стадии отмечается тенденция к его росту. Это свидетельствует о необратимости процесса липоперекисления при развитии заболевания даже на ранних его стадиях, а также — о необходимости фармакологической коррекции нарушений про/антиоксидантного баланса ЩЖ. При этом характер изменения продуктов ПОЛ позволяет предположить, что необходимо не только применение прямых антиоксидантов типа токоферолов, но и увеличение активности системы выведения конечных продуктов ПОЛ, прежде всего — ферментов глутатион-зависимой антиоксидантной системы.

Две следующие стадии заболевания (III и IV) отличаются как более значительным, чем на I и II стадиях увеличением концентрации ДК и МДА, так и более значительным снижением АОА ЩЖ. Кроме того, обращает на себя внимание и повышение уровня ОЛ в ткани ЩЖ, т. е. можно сказать, что с прогрессированием опухоли баланс сдвигается в сторону прооксидантной составляющей процесса липоперекисления. Следовательно, при увеличивающемся количестве субстратов ПОЛ в ЩЖ явно недостаточна активность антиоксидантных систем.

Разумеется, для диагностики стадии заболевания у больного РЩЖ в предоперационном периоде требуется использование методов изу-

чения не ткани железы, а состава биологических жидкостей организма больного. Нами были исследованы показавшие свою информативность показатели в плазме крови обследованных больных. Как видно из данных табл. 2, изменения этих показателей соответствовали изменениям их в ЩЖ. Исключение составляет лишь уровень ОЛ — их количество, по крайней мере, не повышается, а в некоторых группах на более поздних стадиях заболевания даже имеет тенденцию к снижению, что связано с участием тиреоидных гормонов в процессах синтеза липидов в организме, прежде всего в печени [16, 17].

Таким образом, показано, что при РЩЖ процессы свободнорадикального перекисного окисления активируются в ЩЖ, и эта активация сопровождается разнонаправленными изменениями продуктов ПОЛ и АОА не только в самом органе, но и в плазме крови больных. Причем тяжесть заболевания и степень дифференцировки опухоли прямо влияют на величину изменения показателей ПОЛ. Это свидетельствует как о специфичности процессов радикалообразования в ЩЖ, связанной, вероятно, с собственным метаболизмом органа, так и с ролью свободных радикалов в процессах онкогенеза вообще.

Проведенные исследования позволяют рекомендовать методы измерения баланса про/антиоксидантных составляющих в плазме крови для оценки степени тяжести заболевания у больных РЩЖ. В целях стабилизации антиоксидантного баланса и липидного обмена у больных РЩЖ как в организме в целом, так и в ЩЖ в частности, мы рекомендуем применять антиоксидантные препараты, а также — гепатопротекторы, поскольку липидный обмен зависит от нормального функционирования печени.

Про/антиоксидантный потенциал плазмы крови больных в зависимости от степени дифференцировки опухоли

X±Sx

Стадия заболевания	Исследуемые показатели			
	ДК, нмоль на 1 мг липидов	МДА, нмоль на 1 мг липидов	ОЛ, г/л	АОА, %
Контроль, n = 20	1,24±0,13	3,48±0,37	6,82±0,71	41,1±4,3
I, n = 25	1,65±0,14 **k	4,01±0,35	7,33±0,68	37,4±3,7
II, n = 21	1,93±0,19 **k	4,32±0,39 *k	7,03±0,70	30,3±3,1 **k
III, n = 31	2,47±0,22 **k, **I, *II	5,21±0,46 **k, **I, *II	5,71±0,52	24,5±2,2 **k, **I
IV, n = 18	2,91±0,31 **k, **I, **II	5,70±0,61 **k, **I, **II	5,30±0,57	22,7±2,5 **k, **I, **II
Всего, n = 95	2,25±0,11 **k	4,87±0,23 *k	6,52±0,39	29,7±1,3 **k

Литература

1. Биоантиоксиданты в лучевом поражении и злокачественном росте / Е. Б. Бурлакова, Е. Б. Алексеенко, Е. М. Молочкина и др.— М.: Наука, 1975.— 211 с.
2. Франциянц Е. М., Сидоренко Ю. С., Розенко Л. Я. Перекисное окисление липидов в патогенезе опухолевой болезни.— Ростов-на-Дону: Изд-во Ростовского университета, 1995.— 176 с.
3. Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты / Е. Б. Меньщикова, В. З. Ланкин, Н. К. Зенков и др.— М.: Фирма «Слово», 2006.— 556 с.
4. Modification of DNA bases in chromatin of intact target human cells by activated human polymorphonuclear leukocytes / M. Dizdagorlu, R. Olinski, J. H. Doroshow, S. A. Akman // *Cancer. Res.*— 1993.— Vol. 53.— P. 1269–1272.
5. Alam K., Ali A., Ali R. The effect of hydroxyl radical on the antigenicity of native DNA // *FEBS lett.*— 1993.— Vol. 319.— P. 66–70.
6. Зайчик А. Ш., Чурилов Л. П. Основы патохимии.— СПб.: ЭЛБИ-СПб., 2001.— С. 501–523.
7. Purification of a novel flavoprotein involved in the thyroid NADPH oxidase cloning of the porcine and human cDNAs / C. Dupuy, R. Ohayon, A. Valent et al. // *J. Biol. Chem.*— 1999.— Vol. 274.— P. 37265–37269.
8. Lambeth J. D. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen // *Nat. Rev. Immunol.*— 2004.— Vol. 4.— P. 181–189.
9. Tyrosine cross-linking of extracellular matrix is catalyzed by Duox, a multidomain oxidase/peroxidase with homology to the phagocyte oxidase subunit gp91^{phox} / W. A. Edens, L. Sharling, G. Cheng et al. // *J. Cell. Biol.*— 2001.— Vol. 154.— P. 879–891.
10. Geiszt M., Leto T. L. The Nox family of NAD(P)H oxidases: Host defense and beyond // *J. Biol. Chem.*— 2004.— Vol. 279.— P. 51715–51718.
11. Kim R. S., LaBella F. Comparison of analytical methods for monitoring autoxidation profiles of authentic lipids // *J. Lipid Res.*, 1987.— Vol. 28.— P.1110–1117.
12. Asakawa T., Matsushita S. Coloring condition of thiobarbituric acid test for detecting lipid peroxides // *Lipids.*— 1980.— Vol. 15, № 3.— P. 137–140.
13. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах.— М.: Наука, 1972.— 252 с.
14. Оценка антиокислительной активности плазмы крови с применением желточных липопротеидов / Г. И. Клебанов, И. В. Бабенкова, Ю. О. Теселкин и др. // *Лабораторное дело.*— 1988 — № 5.— С. 59–62.
15. Кейтс М. Техника липидологии.— М., 1975.— 256 с.
16. Марзоев А. И. Мембранотропное действие тиреоидных гормонов: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук: 03.00.02 / Ин-т биохимии АН Узбекской ССР.— Ташкент, 1984.— 46 с.
17. Бабенко Н. А. Влияние тиреоидных гормонов на метаболизм жирнокислотных компонентов липидов плазматических мембран клеток печени крыс разного возраста // *Укр. биохим. журн.*— 1991.— Т. 63, № 1.— С. 50–55.

Поступила 23.11.2006