

Т. М. Мишуніна, О. В. Калініченко, член-кореспондент НАН України  
М. Д. Тронько, Л. Ю. Зурнаджи

## Набряк мітохондрій з тканини доброякісних та злоякісних фолікулярних пухлин щитоподібної залози. Вплив іонів Са та антиоксидантів

*Показано, що параметри базального рівня набряку мітохондрій з патологічно зміненої тканини щитоподібної залози (мікрофолікулярна аденома чи фолікулярна карцинома) не відрізняються від таких для мітохондрій з незміненої тканини нормофолікулярної будови. Мітохондрії з мікрофолікулярної аденоми повністю резистентні до дії іонів Са, мелатоніну чи  $\alpha$ -токоферолу, а реакція мітохондрій з фолікулярної карциноми обмежена, при цьому виявлені зміни параметрів набряку мітохондрій при дії іонів Са та антиоксидантів протилежні за напрямком у порівнянні із спостережуваними в мітохондріях із незміненої тканини щитоподібної залози.*

Серед новоутворень щитоподібної залози (ЩЗ), які за цитологічною картиною об'єднують у групу фолікулярних неоплазій, переважна частина належить до доброякісних пухлин і лише близько 1% випадків є високодиференційованим фолікулярним раком [1]. Результати вивчення ролі генетичних порушень у патогенезі фолікулярних неоплазій свідчать про те, що експресія деяких онкогенів, пухлинних супресорів чи компонентів, які беруть участь у регуляції клітинного циклу, росту, диференціювання та загибелі епітеліальних клітин, однакова як у фолікулярних карциномах, так і фолікулярних аденомах, для інших, проте, виявлена істотна різниця в їх експресії, або в частоті зустрічальності певних генетичних дефектів [2–6]. Молекулярні основи патогенезу доброякісних та злоякісних фолікулярних пухлин ЩЗ до кінця не з'ясовані [6], тому актуальними є дослідження, спрямовані на вивчення характерних молекулярно-біологічних, біохімічних, гістологічних чи імунологічних відмінностей цих пухлин, а також удосконалення їх диференціальної діагностики.

Серед основних етапів ініціації та регуляції програмованої загибелі клітин мітохондріальний є одним із центральних [7]. Активація мітохондрій за участю проапоптозних білків сім'ї Bcl-2, зниження трансмембранного потенціалу мітохондрій, вихід проапоптозних факторів з них до цитоплазми та регуляція цих процесів антиапоптозними білками білків сім'ї Bcl-2 так чи інакше пов'язані зі зміною пермеабельності мітохондріальної мембрани. Найбільш адекватним параметром її оцінки вважають визначення набряку мітохондрій, який розвивається внаслідок підвищення іонної проникності внутрішньої мембрани при відкритті електрозалежних аніонних каналів, які діють у місцях контакту зовнішньої та внутрішньої мембран і дозволяють неспецифічний прохід невеликих молекул, зокрема і  $H_2O$ .

З'ясовано, що зміни стану мітохондрій та їх відповідь на апоптозіндукторні чи апоптозмодуляторні чинники залежать від виду та інтенсивності стимулів, ступеня ураженості та типу клітин. Деякі антиканцерогенні препарати спроможні індукувати апоптоз клітин карцином ЩЗ шляхом активації вивільнення проапоптозних мітохондріальних білків (цитохрому С, AIF, ендонуклеази G,  $S_{mas}$ /DIABLO та ін.), проте мало що відомо про можливі порушення цього процесу та його регуляції в клітинах ЩЗ за формування фолікулярних пухлин [4].

У даному повідомленні наведені результати дослідження інтенсивності, динаміки в часі та швидкості набряку мітохондрій, які виділені з тканини фолікулярної карциноми чи фолікулярної аденоми ШЦЗ хворих.

Досліджено 11 зразків тканин ШЦЗ, отриманих від хворих із вузловою еутиреоїдною патологією (4 — мікрофолікулярна аденома, 3 — фолікулярна карцинома, 4 — позавузлова незмінена тканина ШЦЗ нормофолікулярної будови). На проведення досліджень був одержаний дозвіл від комісії Інституту з біоетики.

Інтенсивність набряку мітохондрій визначали за величиною зниження світлорозсіювання суспензії мітохондрій ( $\Delta A$ , % від початкової величини), яку реєстрували впродовж 20 хв при кімнатній температурі на спектрофотометрі при довжині хвилі 540 нм. Швидкість набряку мітохондрій розраховували як відсоток зниження світлорозсіювання за 1 хв у межах кожного 5-хвилинного періоду спостережень. Відкриття мітохондріальних пор індукували  $\text{CaCl}_2$  ( $10^{-7}$  М —  $10^{-3}$  М), розчин якого вносили безпосередньо в кювету при реєстрації набряку мітохондрій. При визначенні впливу  $\alpha$ -токоферолу чи мелатоніну мітохондрії перед додаванням  $\text{CaCl}_2$  ( $10^{-5}$  М) попередньо інкубували з препаратами впродовж 5 хв (кінцева розрахункова концентрація антиоксидантів у середовищі інкубації становила  $10^{-3}$  та  $10^{-7}$  М). Методи виділення мітохондрій та визначення концентрації білка, а також деталі постановки досліджень описані раніше [8]. Одержані дані опрацьовані статистично із використанням критерію  $t$  Стюдента та непараметричного критерію Вілкоксона–Манна–Уїтні. Критичний рівень значущості приймали за 0,05.

Інтенсивність набряку за 20 хв інкубації мітохондрій з тканини мікрофолікулярної аденоми чи фолікулярної карциноми не відрізнялася від інтенсивності набряку мітохондрій з позавузлової незміненої тканини ШЦЗ нормофолікулярної будови (табл. 1). Характер кривих динаміки набряку мітохондрій, виділених із зазначених тканин, також був подібним, проте початкова швидкість набряку мітохондрій з тканини мікрофолікулярної аденоми була підвищеною (рис. 1). Іони Са не впливали істотно на інтенсивність і динаміку в часі набряку мітохондрій з тканини аденоми (див. табл. 1, рис. 2, б), відмічено лише зниження прикінцевої швидкості їх набряку при дії іонів Са у концентрації  $10^{-7}$  М (рис. 3, б). Внесення іонів Са у концентрації  $10^{-7}$  та  $10^{-3}$  М у середовище інкубації мітохондрій з тканини фолікулярної карциноми не змінювало, а в концентрації  $10^{-5}$  М гальмувало їх набряк (див. табл. 1) за рахунок рівномірного зменшення швидкості цього процесу впродовж

Таблиця 1. Інтенсивність набряку мітохондрій з позавузлової незміненої тканини, тканини мікрофолікулярної аденоми та тканини фолікулярної карциноми ШЦЗ хворих і вплив на неї іонів кальцію і антиоксидантів,  $\Delta A$ , % за 20 хв інкубації ( $M \pm m$ )

Варіант досліджу	Тканина		
	незмінена ( $n = 4$ )	аденоми ( $n = 4$ )	карциноми ( $n = 3$ )
Базальний рівень	$-5,19 \pm 0,22$	$-3,81 \pm 0,81$	$-5,30 \pm 1,30$
Іони Са, $10^{-7}$ М	$-8,17 \pm 1,19^*$	$-4,10 \pm 1,88$	$-5,06 \pm 1,34$
Іони Са, $10^{-5}$ М	$-8,44 \pm 0,22^*$	$-3,86 \pm 1,43$	$-2,04 \pm 0,64^*$
Іони Са, $10^{-3}$ М	$-8,11 \pm 1,12^*$	$-5,43 \pm 1,89$	$-3,46 \pm 0,43$
Мелатонін, $10^{-7}$ М	$-5,07 \pm 1,16^{**}$	$-5,26 \pm 1,69$	$-0,62 \pm 0,12^{**}$
Мелатонін, $10^{-3}$ М	$-4,34 \pm 0,30^{**}$	$-4,30 \pm 1,31$	$-3,32 \pm 0,97$
$\alpha$ -Токоферол, $10^{-7}$ М	$-3,85 \pm 0,59^{**}$	$-3,88 \pm 1,98$	$-1,79 \pm 1,11$
$\alpha$ -Токоферол, $10^{-3}$ М	$-2,90 \pm 0,46^{**}$	$-3,71 \pm 1,08$	$-1,37 \pm 0,15$

\* Різниця вірогідна в порівнянні з базальним рівнем набряку ( $P < 0,05$ ). \*\* Різниця вірогідна в порівнянні з рівнем набряку за умов впливу іонів Са у концентрації  $10^{-5}$  М ( $P < 0,05$ ).

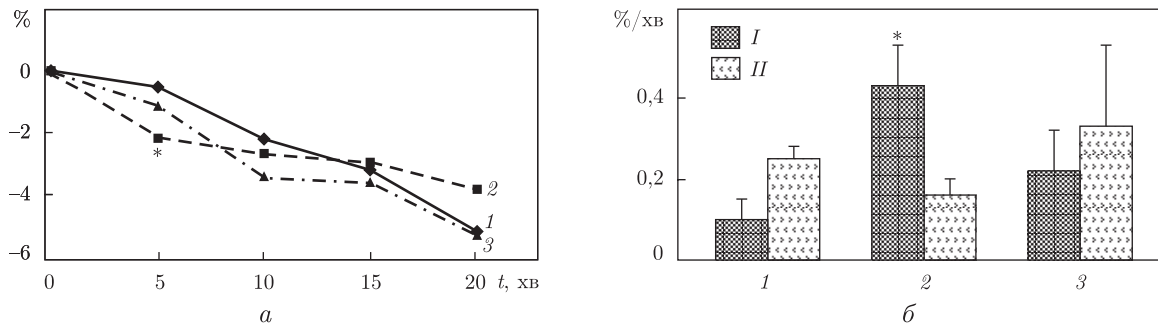


Рис. 1. Динаміка (а) та швидкість (б) набряку мітохондрій з позавузлової незміненої тканини ШЦЗ (1), тканини мікрофолікулярної аденоми (2) та тканини фолікулярної карциноми (3). I — початкова швидкість, II — прикінцева швидкість. \* — різниця вірогідна в порівнянні з параметрами набряку мітохондрій з незміненої тканини нормофолікулярної будови ШЦЗ ( $P < 0,05$ )

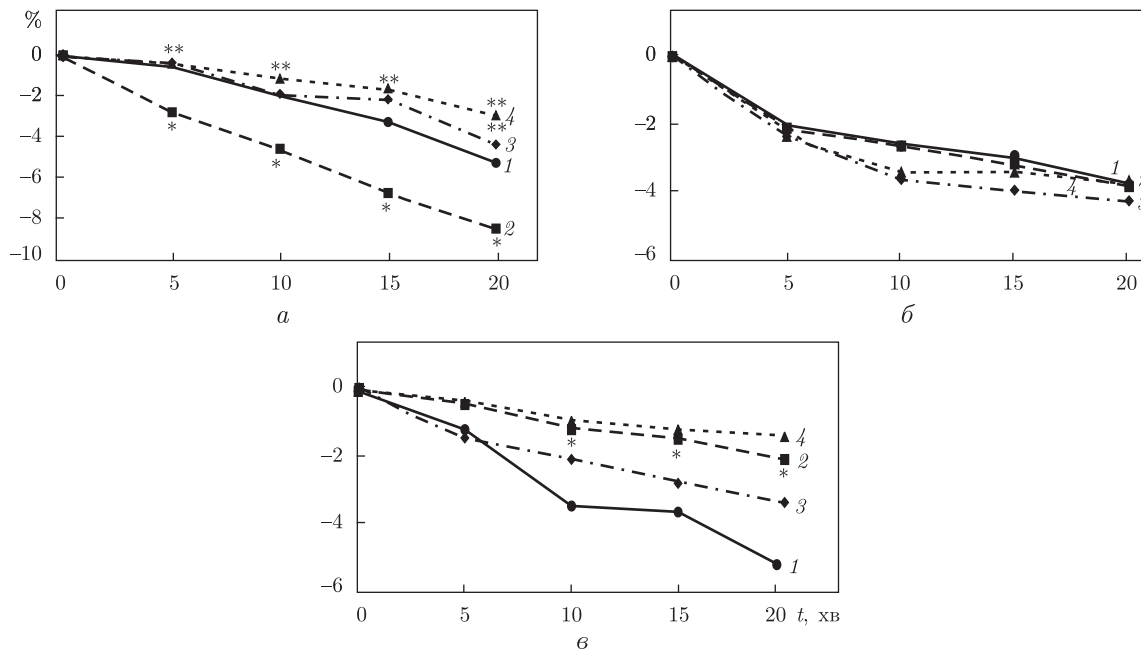


Рис. 2. Вплив іонів Ca, мелатоніну та  $\alpha$ -токоферолу на динаміку набряку мітохондрій з позавузлової незміненої тканини ШЦЗ (а), тканини мікрофолікулярної аденоми (б) та тканини фолікулярної карциноми (в). 1 — базальний рівень; 2 —  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $10^{-5}$  М; 3 — мелатонін;  $10^{-3}$  М +  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $10^{-5}$  М; 4 —  $\alpha$ -токоферол,  $10^{-3}$  М +  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $10^{-5}$  М. \* — різниця вірогідна в порівнянні з базальним рівнем ( $P < 0,05$ ), \*\* — різниця вірогідна в порівнянні з впливом іонів Ca ( $P < 0,05$ )

усього часу інкубації (див. рис. 2, в). Цей вплив іонів Ca був відмінний від такого для мітохондрій з незміненої тканини ШЦЗ, де іони Ca незалежно від концентрації індукували подальший набряк мітохондрій (див. табл. 1) внаслідок значного збільшення початкової, а при концентрації  $10^{-3}$  М також і прикінцевої швидкості набряку (див. рис. 2, а та 3, а). Звертає на себе увагу протилежний ефект іонів Ca у концентрації  $10^{-7}$  М на прикінцеву швидкість набряку мітохондрій з тканини аденоми та карциноми: у першому випадку вона зменшувалася (як і для мітохондрій з незміненої тканини), у другому — зростала (див. рис. 3).

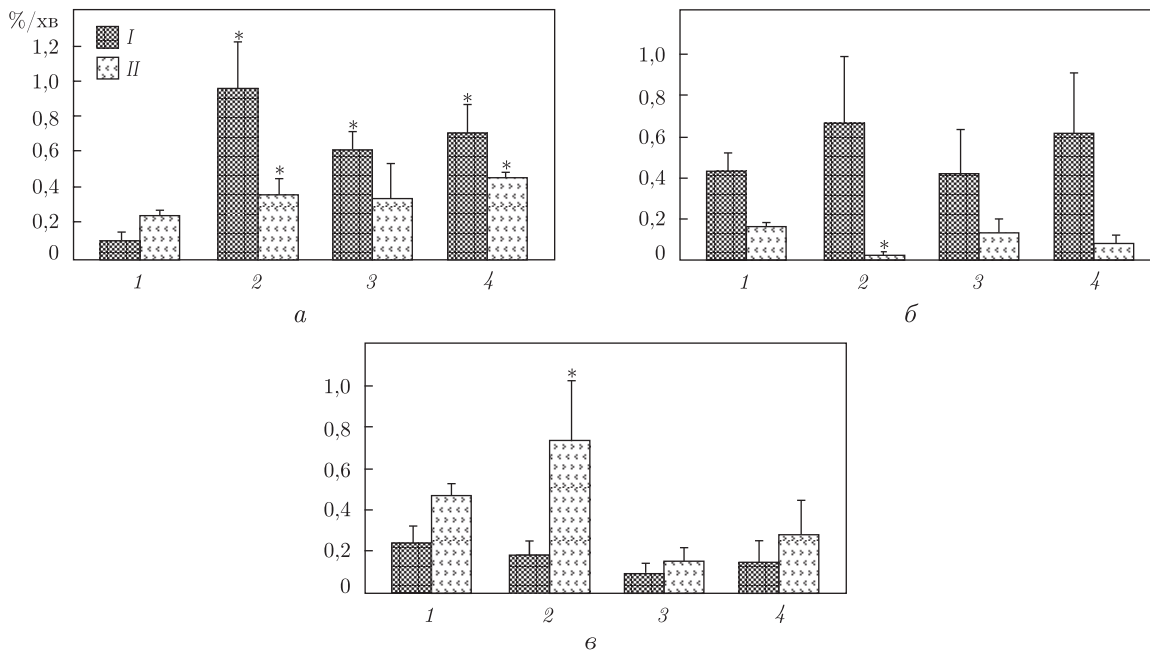


Рис. 3. Вплив іонів Са на початкову (I) та прикінцеву (II) швидкість набряку мітохондрій з позавузлової незміненої тканини ЩЗ (а), тканини мікрофолікулярної аденоми (б) та тканини фолікулярної карциноми (в). 1 — базальний рівень (безкальцієве середовище); 2 —  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $10^{-7}$  М; 3 —  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $10^{-5}$  М; 4 —  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $10^{-3}$  М. \* — різниця вірогідна в порівнянні з відповідною швидкістю в безкальцієвому середовищі ( $P < 0,05$ )

Параметри, що характеризують набряк мітохондрій з тканини мікрофолікулярної аденоми та фолікулярної карциноми, не змінювалися при попередній до внесення іонів Са інкубації їх із  $\alpha$ -токоферолом, тоді як останній запобігав  $\text{Ca}^{2+}$ -індукованому набряку мітохондрій з незміненої тканини ЩЗ, зменшуючи його початкову швидкість (див. табл. 1, рис. 2, 4). Гальмування  $\text{Ca}^{2+}$ -індукованого набряку мітохондрій з незміненої тканини відбувалося і при дії мелатоніну (див. табл. 1, рис. 2, 4), тоді як його вплив на набряк мітохондрій з тканини мікрофолікулярної аденоми був відсутнім. Для мітохондрій з тканини фолікулярної карциноми спостерігали певну залежність ефекту від концентрації гормону: при концентрації мелатоніну  $10^{-7}$  М інтенсивність та початкова швидкість набряку зменшувалися, при концентрації  $10^{-3}$  М початкова швидкість набряку зростала вдвічі. Перше подібно, а друге протилежно впливу мелатоніну на набряк мітохондрій з незміненої тканини ЩЗ (див. табл. 1, рис. 4).

Отже, незважаючи на те, що параметри базального рівня набряку мітохондрій з тканини мікрофолікулярної аденоми чи фолікулярної карциноми істотно не відрізнялися від таких для мітохондрій з незміненої тканини ЩЗ нормофолікулярної будови, механізми регуляції пермеабельності мембрани таких мітохондрій при дії індуктора (іони Са) чи антиоксидантів, які модулюють проникність мембран, порушені. При цьому мітохондрії з мікрофолікулярної аденоми повністю резистентні до дії іонів Са, мелатоніну та  $\alpha$ -токоферолу, а реакція мітохондрій з фолікулярної карциноми була дуже обмеженою. Зміни параметрів набряку мітохондрій з фолікулярної карциноми мали у порівнянні з мітохондріями з незміненої тканини ЩЗ протилежний за напрямком характер при дії іонів Са в середній із досліджених концентрацій і мелатоніну в концентрації  $10^{-3}$  М та однотипний (гальмування) при дії мелатоніну в концентрації  $10^{-7}$  М. Зазначимо, що мелатонін у концентрації  $10^{-7}$  М зменшував

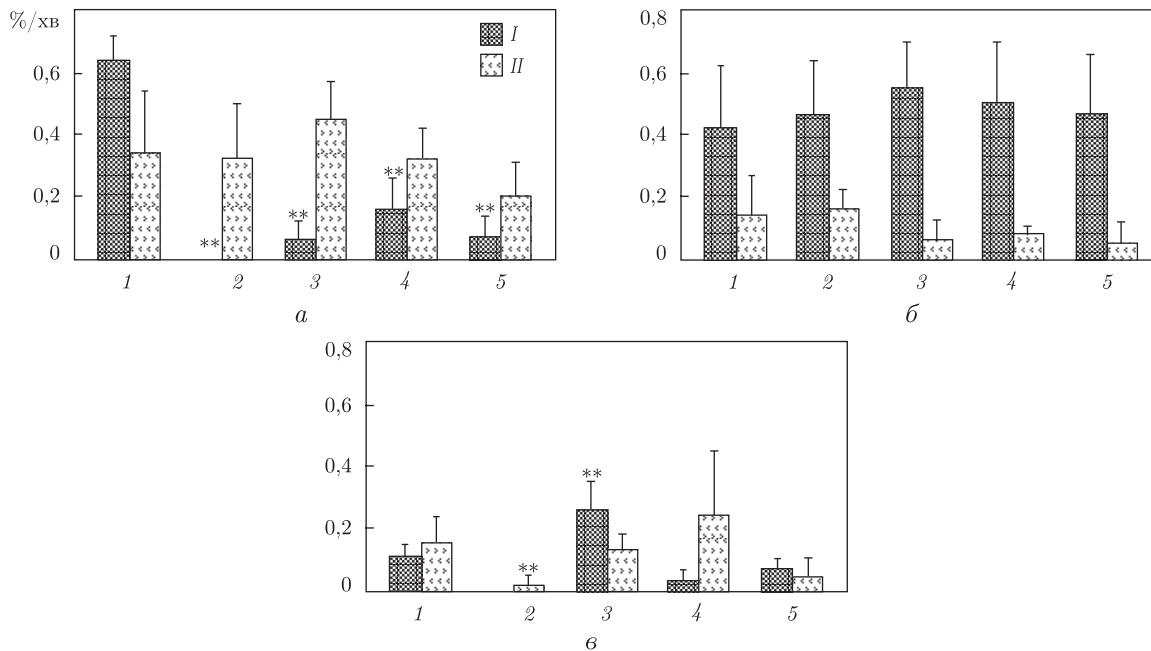


Рис. 4. Вплив мелатоніну та  $\alpha$ -токоферолу на початкову (I) та прикінцеву (II) швидкість набряку мітохондрій з позавузлової незміненої тканини ЩЗ (а), тканини мікрофолікулярної аденоми (б) та тканини фолікулярної карциноми (в). 1 –  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $10^{-5}$  М; 2 – мелатонін,  $10^{-7}$  М +  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $10^{-5}$  М; 3 – мелатонін,  $10^{-3}$  М +  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $10^{-5}$  М; 4 –  $\alpha$ -токоферол,  $10^{-7}$  М +  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $10^{-5}$  М; 5 –  $\alpha$ -токоферол,  $10^{-3}$  М +  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $10^{-5}$  М. \*\* – різниця вірогідна в порівнянні з впливом іонів Ca ( $P < 0,05$ )

і інтенсивність міжнуклеосомної фрагментації ДНК, яка була виділена з тканини фолікулярної карциноми [9]. Нетиповість або відсутність змін проникності мембран мітохондрій трансформованих клітин мікрофолікулярної аденоми та фолікулярної карциноми при дії модулюючих пермеабельність мембран чинників може свідчити про гальмування мітохондріальних механізмів регуляції апоптозу, що, безумовно, має істотне значення в патогенезі фолікулярних неоплазій.

1. Трошина Е. А., Абесадзе И. А. Фолликулярная неоплазия // Consilium Medicum Ukraina. – 2007. – 1, № 3. – С. 31–34.
2. Grebe S., McIver B., Yay I. et al. Frequent loss of heterozygosity on chromosomes 3p and 17p without VHL or p53 mutations suggests involvement of unidentified tumor suppressor genes in follicular thyroid carcinoma // J. Clin. Endocrinol. and Metabol. – 1997. – 82, No 11. – P. 3684–3691.
3. Frisk T., Kytola S., Wallin G. et al. Low frequency of numerical chromosomal aberration in follicular thyroid tumors detected by comparative genomic hybridization // Genes, Chromosomes and Cancer. – 1999. – 25, No 4. – P. 349–353.
4. Мишуніна Т. М., Тронько М. Д. Основні молекулярні механізми апоптозу та їх порушення при канцерогенезі щитоподібної залози // Журн. АМН України. – 2006. – 12, № 4. – С. 611–633.
5. Haghpanah V., Shooshtarizaden P., Heshmat R. et al. Immunohistochemical analysis of surviving expression in thyroid follicular adenoma and carcinoma // Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol. – 2006. – 14, No 4. – P. 422–425.
6. Фюрер Д. Генетика доброкачественных и злокачественных опухолей щитовидной железы // Междунар. эндокринол. журн. – 2007. – № 3. – С. 114–119.
7. Nieminen A. Apoptosis and necrosis in health and disease: role of mitochondria // Int. Rev. Cytol. – 2003. – No 224. – P. 29–55.
8. Мишуніна Т. М., Калініченко О. В. Особливості фолікулярної будови тканини щитоподібної залози та проникливість мембран мітохондрій, виділених з неї // Ендокринологія. – 2008. – 13, № 1. – С. 35–44.

9. Мишуніна Т. М., Калініченко О. В., Пількевич Л. І., Тронько М. Д. Вплив антиоксидантів на міжнуклеосомну фрагментацію ДНК у тканині щитоподібної залози хворих на різну тиреоїдну патологію // Укр. біохім. журн. – 2007. – 79, № 5. – С. 178–187.

Державна установа “Інститут ендокринології  
та обміну речовин ім. В. П. Комісаренка  
АМН України”, Київ

Надійшло до редакції 28.05.2008

**T. M. Myshunina, O. V. Kalinichenko**, Corresponding Member of the NAS  
of Ukraine **M. D. Tronko, L. Yu. Zurnadzhi**

### **The swelling of mitochondria from tissue of benign and malignant follicular thyroid tumors. Effect of Ca ions and antioxidants**

*It has been demonstrated that the parameters of the basal level of mitochondria swelling of the pathologically changed thyroid tissue (microfollicular adenoma or follicular carcinoma) had no changes comparing to those for mitochondria of the unchanged tissue of normofollicular structure. Mitochondria of microfollicular adenoma were completely resistant to the effect of Ca ions, melatonin, or alpha-tocopherol, but the mitochondria reaction of follicular carcinoma was very limited. In this case, the parameter changes in mitochondria swelling under the effect of Ca ions and antioxidants had contrary directions in comparison with mitochondria of unchanged thyroid tissue.*