

Рівень оксиду азоту та активність його синтаз у тканині щитоподібної залози пацієнтів із хворобою Грейвса

О.В. Калініченко,
Т.М. Мишуніна,
М.Д. Тронько,
Л.Ю. Зурнаджи

ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка НАМН України»

Резюме. Досліджено рівень метаболітів оксиду азоту та активність його синтаз (конститутивної та індукційної, NOS та iNOS) у тканині щитоподібної залози осіб із хворобою Грейвса. Встановлено вищий рівень метаболітів оксиду азоту в тканині дифузного токсичного зоба порівняно з таким у незмінній тканині щитоподібної залози хворих із вузловою евтиреоїдною патологією, який не залежав від особливостей фолікулярної будови тканини, вираженості гіперпластичного процесу або тиреоїдиту, наявності фіброзно-склеротичних змін строми, а також величини перевищення об'єму залози понад вікову норму. У тканині залози за тяжкої форми хвороби відсутні значні зміни рівня метаболітів оксиду азоту, тоді як за середньої тяжкості перебігу він збільшений більше ніж удвічі. Активність NOS у тканині дифузного токсичного зоба підвищено лише за наявності осередкового тиреоїдиту та в тканині макрофолікулярної будови, тоді як статистично значуще збільшення активності iNOS підтверджено в патологічно змінній тканині за наявності супутнього тиреоїдиту, осередкової гіперплазії тиреоїдного епітелію, в тканині залози хворих із збільшенням її об'єму в межах до 300% понад норму та в залозі хворих із середньою тяжкістю перебігу хвороби; воно не залежить від особливостей фолікулярної будови тканини та наявності фіброзно-склеротичних змін строми. Індукція iNOS відсутня в разі реєстрації вираженого гіперпластичного процесу, за значного перевищення об'єму залози (300-800% понад норму) та в залозі хворих із тяжкою формою хвороби Грейвса. Зміни функціонального стану системи оксиду азоту, який поєднує властивості активного радикалу з функціями сигнальної молекули та медіатора, в тканині дифузного токсичного зоба можуть асоціюватися як зі збільшеною активністю залози, наявністю запальних або аутоімунних процесів, так і з порушенням функції ендотелію тиреоїдних судин, а також механізмів регуляції проліферації та загибелі клітин щитоподібної залози.

Ключові слова: оксид азоту, конститутивна та індукційна синтази оксиду азоту, щитоподібна залоза, хвороба Грейвса.

Оксидативний стрес є визнаним чинником патогенезу багатьох патологічних станів і захворювань. Сьогодні широко досліджується теорія, яка стверджує, що активні радикали азоту — це більш по-

тужні окисники, ніж активні радикали кисню, тому нітро-оксидативний стрес є основним у механізмі пошкодження клітин і тканин [1-3]. Натомість деякі дослідники дотримують думки, що активні радикали азоту є лише підмножиною активних радикалів кисню [4], і важко відокремити дію перших від дії других, бо вони відіграють важливу роль у реалізації нормальних фізіологічних процесів [5].

* адреса для листування (Correspondence): ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка НАМН України», вул. Вишгородська, 69, м. Київ, 04114, Україна. E-mail: zdovado@ukr.net

Серед активних радикалів азоту основним є оксид азоту (NO) — поліфункціональний біологічний посередник у клітинах усіх органів і тканин людини та тварин [6]. Він ініціює функції розвитку та велику кількість захисних і гомеостатичних механізмів шляхом безпосередньої дії або активації внутрішньоклітинної сигналізації [5, 7]. Існуючі в літературі дані дозволили навіть висунути ідею, що оксид азоту є гормоном, який після свого синтезу в тканинах стабілізується й транспортується до клітин-мішеней у вигляді нітриту та/або нітрозотіолів [6, 8].

Оксид азоту синтезується в усіх тканинах, а система його генерації є надзвичайно чутливою та швидко реагує на зміни, що відбуваються в організмі. Конститутивні форми синтаз оксиду азоту (сNOS, ендотеліальна та нейрональна) забезпечують його синтез у фізіологічних умовах, тоді як індукбельна форма ферменту (іNOS) є неактивною та активується у відповідь на дію патогенних стимулів [9, 10]. З огляду на важливу роль оксиду азоту в регуляції діяльності власне усіх клітин, органів, систем і в цілому життєдіяльності організму можна вважати, що як надлишок, так і нестача генерації цієї молекули можуть бути значущими в патогенезі багатьох захворювань. Зокрема, одним із механізмів розвитку останніх є участь оксиду азоту та продуктів його взаємодії з активними радикалами кисню в механізмах активації або гальмування апоптозної загибелі клітин [10-12].

Значний інтерес має визначення участі оксиду азоту в патогенезі захворювань щитоподібної залози, адже утворення надвисоких концентрацій активних форм кисню є нормальним фізіологічним явищем у синтезі тиреоїдних гормонів [13], а наявність спільних мішеней у дії радикальних форм кисню й оксиду азоту припускає існування регуляції дихання мітохондрій за участю останнього [10].

У мітохондріях, зокрема, оксид азоту діє як фізіологічний месенжер, що модулює швидкість транспорту електронів через компоненти електротранспортного ланцюга мітохондрій, а в реакції оксиду азоту та активного радикалу кисню утворюється пероксинітрит, який є потужним оксидантом [10, 14]. Саме оксидативний стрес та порушення функції антиоксидантних систем розглядають як один із центральних механізмів розвитку не лише вузлових, запальних і онкологічних, але й аутоімунних захворювань щитоподібної залози, що супроводжуються, зокрема, порушенням синтезу тиреоїдних гормонів [15-18].

Встановлено тісний взаємозв'язок між функціональним станом щитоподібної залози та метаболізмом оксиду азоту в організмі, що дозволило вважати

останній однією з ключових ланок серцево-судинних ускладнень за гіпертиреозу; причому активність синтаз, які є мішенями для тиреоїдних гормонів [19], підвищено у більшості тканин, пов'язаних із контролем кров'яного тиску [20]. Дефіцит оксиду азоту, який виникає на тлі введення блокаторів сNOS, не впливав на рівень тиреоїдних гормонів у крові інтактних щурів [8], але попереджував активацію системи гіпофіз — щитоподібна залоза, що спостерігалася за умов введення ендотоксину [21]. Сеанс електромагнітного опромінення, який змінює діяльність NO-системи, цілком нормалізував порушену іммобілізаційним стресом функцію щитоподібної залози експериментальних тварин [22].

Водночас стан NO-системи власне у щитоподібній залозі за патології, що супроводжується зміною тиреоїдного стану, досліджено вкрай недостатньо, хоча встановлено, що оксид азоту регулює в залозі не лише локальний кровообіг [23]: експресію мРНК конститутивної сNOS, крім ендотеліальних клітин, реєструють також і в тиреоцитах [24, 25]. Показано, що експресія мРНК сNOS є значно вищою в тканині залози пацієнтів із гіпертиреозом порівняно з такою в пацієнтів із незміненою функцією залози та, надто, в пацієнтів із гіпотиреозом [24]. Припускають, що роль оксиду азоту, який безпосередньо синтезується у фолікулярних клітинах, пов'язано зі змінами функції залози або інтенсивністю проліферативних процесів у ній. Так, за результатами дослідження механізмів участі оксиду азоту в регуляції функції щитоподібної залози встановлено, що він гальмує активність тиреоїдної пероксидази та експресію мРНК тиреоглобуліну, є негативним сигналом для ТТГ-стимульованого поглинання йоду й експресії тиреоїдспецифічних генів [26-28].

Мета роботи — дослідження рівня метаболітів оксиду азоту та активності його синтаз (сNOS та іNOS) у тканині щитоподібної залози хворих із хворобою Грейвса.

Матеріали та методи

Досліджено 26 зразків тканини щитоподібної залози, отриманих від пацієнтів із хворобою Грейвса; групу порівняння становили 17 зразків незміненої позавузлової тканини нормофолікулярної будови від хворих з евтиреоїдною вузловою патологією щитоподібної залози.

Тканину щитоподібної залози промивали охолодженим фізіологічним розчином, зважували, подрібнювали та гомогенізували в 10-кратному об'ємі середовища такого складу: цукроза — 250 ммоль/л, трис-НCl-буфер — 20 ммоль/л, натрієва сіль етилендіамін-тетраоцтової кислоти — 1 ммоль/л (рН 7,4).

Оригінальні дослідження

Вміст метаболітів оксиду азоту (суму нітрит- і нітрат-аніонів) визначали в гомогенатах тканини щитоподібної залози спектрофотометричним методом за розвитком забарвлення в реакції діазування нітритом сульфаніламідом, який входить до складу реактиву Гріса [29]. Для відновлення нітрат-аніону до нітрит-аніону в ході кольорової реакції в проби додавали хлорид кадмію до кінцевої концентрації 2,5%. Інтенсивність забарвлення визначали на спектрофотометрі (JanWay, Великобританія) з довжиною хвилі 540 нм. Для побудови калібрувальної кривої використовували водний розчин нітриту натрію (1 моль/л). Рівень метаболітів оксиду азоту виражали в нмоль нітриту/ мг білка.

Активність cNOS визначали за кількістю утворених під час інкубації метаболітів оксиду азоту, вміст яких встановлювали, як описано вище. Інкубаційна суміш об'ємом 1 мл містила (в ммоль/л): фосфатний буфер (рН 7,4) — 50, хлорид натрію — 1, хлорид кальцію — 2, нікотин-аміндифосфат відновлений — 1, L-аргінін — 2,2, а також 1-2 мг білка гомогенату [30]. Час інкубації становив 60 хв. Для визначення активності iNOS до складу інкубаційної суміші замість хлориду кальцію для зв'язування ендogenous Ca²⁺ додавали етиленгліколь-тетраацетат у кінцевій концентрації 4 ммоль/л. Активність ферментів виражали в нмоль нітриту/(год • мг білка).

Вміст білка у гомогенатах тканини щитоподібної залози визначали за однією з модифікацій загальноприйнятого методу Лоурі, після осадження білків у пробах рівним об'ємом трихлороцтової кислоти [31].

Під час оцінки отриманих даних враховували висновки патолога щодо патоморфологічних особливостей тканини дифузного токсичного зоба, клінічні дані та результати досліджень рівня тиреоїдних гормонів у крові пацієнтів.

Отримані дані наведено в таблиці у вигляді $M \pm m$, опрацьовано статистично з використанням критерію t-Ст'юдента (P_t) і непараметричного критерію U Вілкоксона-Манна-Уїтні (P_U). Критичний рівень значущості приймали за 0,05. На проведення досліджень отримано дозвіл від Комітету з біоетики ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка НАМН України».

Результати та їх обговорення

Рівень метаболітів оксиду азоту в тканині дифузного токсичного зоба від хворих із хворобою Грейвса виявився майже вдвічі більшим за такий у незмінній тканині щитоподібної залози хворих

із вузловою евтиреоїдною патологією (табл. 1), що збігається з нечисленними даними літератури [32]. Це підвищення не залежало від особливостей фолікулярної будови тканини, вираженості гіперпластичного процесу або тиреоїдиту, наявності фіброзно-склеротичних змін строми, а також величини збільшення залози понад вікову норму. Відсутність значних змін (підвищення на 31%, $p > 0,1$) рівня метаболітів оксиду азоту відзначено в тканині залози пацієнтів із хворобою Грейвса тяжкої форми, тоді як за середньої тяжкості перебігу він був суттєво збільшеним (у 2,3 раза).

Отже, отримані результати збігаються з відомими в літературі про активацію утворення

Таблиця 1. Вміст метаболітів оксиду азоту та активність NO-синтаз у незмінній тканині щитоподібної залози та тканині дифузного токсичного зоба ($M \pm m$)

Тканина	Вміст метаболітів NO, нмоль NO ₂ /мг білка	Активність cNOS, нмоль NO ₂ /(год • мг білка)	Активність iNOS, нмоль NO ₂ /(год • мг білка)
Незмінена (17)	2,65±0,36	10,3±1,5	6,7±0,7
Дифузний токсичний зоб (26), у т.ч.:	4,85±0,62 *	14,5±2,4	11,9±1,6 *
мікрофолікулярної будови (13)	4,03±0,79	12,5±2,5	11,4±1,9 *
макрофолікулярної будови (6)	5,15±1,35	22,4±6,7 **	12,6±4,1
гетерофолікулярної будови (7)	5,96±1,45 *	11,3±2,4	11,4±3,5
з осередковою гіперплазією (20)	4,36±0,76 *	14,6±2,4	13,6±1,9 *
з вираженою гіперплазією (6)	5,08±1,09 *	13,9±5,3	6,4±1,4 †
з осередковим тиреоїдитом (12)	4,77±0,90 *	18,6±4,0 **	11,1±1,9 *
з вираженим тиреоїдитом (14)	5,12±0,85 *	10,8±1,8	12,6±2,5 *
без фіброзних змін строми (15)	4,80±0,88 *	15,5±3,5	10,9±2,2
із фіброзними змінами строми (11)	5,18±0,82 *	12,0±2,0	13,3±2,3 *
з перевищенням об'єму залози:			
до 300% (20)	5,70±1,15 *	14,0±2,7	12,4±2,0 *
понад 300% (6)	4,91±0,63 *	10,6±2,8	7,7±2,6 †
середня тяжкість хвороби (16)	6,19±0,98 *	14,1±3,4	14,9±2,2 *
тяжка форма хвороби (10)	3,49±0,45 †	11,7±2,2	7,1±1,2 †

Примітка: *, ** — вірогідна різниця з показником незмінної тканини (P_t і P_U відповідно); † — вірогідна різниця з показником тканини з осередковою гіперплазією (P_t); ‡ — вірогідна різниця з показником тканини з перевищенням об'єму залози до 300% (P_U); § — вірогідна різниця з показником тканини за тяжкої форми хвороби (P_t); у дужках — кількість спостережень.

оксида азоту в тканині щитоподібної залози хворих із гіпертиреозом [24, 32]. Слід зазначити, що пацієнти із хворобою Грейвса, тканину щитоподібної залози яких було досліджено в роботі, тривалий час приймали тиреостатики з метою корекції тиреоїдного статусу, але така терапія не привела до регресії захворювання, що і вимагало хірургічного втручання. Дослідження рівня тиреоїдних гормонів у крові пацієнтів показало, що, хоча після такої терапії концентрація тироксину в крові пацієнтів ($15,2 \pm 2,3$ пкмоль/л) не виходила за межі референтних значень ($11,5-23$ пкмоль/л), середній рівень активного трийодтироніну в крові ($6,7 \pm 2,1$ пкмоль/л) залишався дещо вищим за верхню межу референтних величин ($2,5-5,8$ пкмоль/л). Отже, дійсно, вищий рівень метаболітів оксиду азоту в тканині щитоподібної залози може бути частково пов'язаний зі збільшеною її функціональною активністю, а також з наявністю тиреоїдиту (див. табл. 1). Як дані літератури [33], так і результати власних спостережень [34] свідчать про зростання рівня метаболітів оксиду азоту в тканині щитоподібної залози за хронічного тиреоїдиту.

Зазначений висновок про активацію утворення оксиду азоту в тканині щитоподібної залози хворих із гіпертиреозом ґрунтується на даних про підвищення експресії мРНК cNOS [24]. У даному дослідженні активність cNOS у тканині дифузного токсичного зоба суттєво не відрізнялася від такої в тканині залози за її евтиреоїдного стану (див. табл. 1). Не встановлено також залежності між величиною активності cNOS і клінічними та патоморфологічними характеристиками захворювання, за винятком вищої активності ферменту в тканині дифузного токсичного зоба макрофолікулярної будови та за осередкового тиреоїдиту. Цікаво, що саме за цих характеристик зареєстровано суттєвіше підвищення активності cNOS у позавузловій тканині щитоподібної залози хворих із вузловою евтиреоїдною патологією за наявності тиреоїдиту [34]. З огляду на те, що утворення оксиду азоту під дією cNOS насамперед відбувається у судинному ендотелії [9, 20], ми припустили, що виявлене підвищення активності cNOS у тканині з макрофолікулярною будовою на тлі тиреоїдиту може свідчити про значніші порушення функції ендотелію тиреоїдних судин саме за такої її будови [34]. Відомо, що за хвороби Грейвса також має місце дисфункція ендотелію судин щитоподібної залози [35], тому подібне припущення можна висловити і для цієї органоспецифічної аутоімунної патології за наявності супутнього тиреоїдиту.

Водночас відсутність суттєвих змін активності cNOS у тканині щитоподібної залози пацієнтів із хворобою Грейвса можна пояснити певним позитивним впливом на стан ендотелію тиреоїдних судин попередньої терапії, наслідком якої є нормалізація вмісту тиреоїдних гормонів.

Невідповідність між змінами рівня оксиду азоту (за рівнем метаболітів) та активності конститутивного ферменту, що його генерує, може бути пов'язаною з участю цієї молекули в різноманітних внутрішньоклітинних реакціях, створенні різних за об'ємом депо, зокрема за умов включення оксиду азоту в динітрозильні комплекси із залізом або в S-нітрозотіоли [10], а також залученням інших шляхів її утворення, в т.ч. у нітрит-редуктазній реакції, яка активується за дефіциту кисню [36, 37]. Питання щодо реалізації цих механізмів у щитоподібній залозі за її патології залишається невивченим. Крім того, відомо, що конститутивна кальційзалежна cNOS, яка синтезує оксид азоту у фізіологічних концентраціях у дискретному режимі невеликими порціями у ті проміжки часу, коли в синтезуючій клітині підвищується концентрація Ca^{2+} , є менш потужним ферментом, ніж кальцій-незалежна iNOS, яка, як правило, індукується цитокінами [9, 10].

Активність iNOS у тканині дифузного токсичного зоба пацієнтів із хворобою Грейвса було збільшено вдвічі (див. табл. 1), і це загалом більше відповідає встановленим змінам рівня метаболітів оксиду азоту. Добре відомо, що за хвороби Грейвса тканину щитоподібної залози інфільтровано лімфоцитами, які експресують прозапальні цитокіни. Крім того, і самі тиреоцити за цієї органоспецифічної патології (на відміну від здорової залози) також продукують низку цитокінів. Останні, зокрема інтерферони, чинник некрозу пухлин, інтерлейкін-1 і надто їх комбінації індукують iNOS [38]. Участь оксиду азоту в розвитку запалення є відомою [39]. Дані літератури [40] і результати власних спостережень [34] свідчать про підвищення активності iNOS у тканині щитоподібної залози за її лімфоїдної інфільтрації, як і за хронічного тиреоїдиту.

Підвищення активності iNOS у тканині дифузного токсичного зоба не залежить (як і рівень метаболітів оксиду азоту) від характеру її фолікулярної будови, ступеня тиреоїдиту, наявності або відсутності склеротично-фіброзних змін стромы. Статистично значуще збільшення активності ферменту підтверджено у патологічно змінній тканині за наявності осередкової гіперплазії тиреоїдного епітелію, в тканині залози хворих за її збільшення в межах до 300% понад норму та в залозі хворих

Оригінальні дослідження

із середньою тяжкістю перебігу хвороби. Водночас індукція iNOS відсутня в тканині дифузного токсичного зоба за наявності вираженого гіперпластичного процесу, за значного перевищенні об'єму залози (300-800%) та в залозі пацієнтів із тяжкою формою хвороби Грейвса (див. табл. 1).

Останні дані є дещо несподіваними. Аналізуючи їх, ми можемо лише будувати певні припущення. Так, встановлено, що хронічна або тяжка гіпоксія гальмує синтез оксиду азоту, адже для ферментативного окислення аргініну потрібен кисень. За його дефіциту активується потужніший нітритредуктазний компонент ланцюга метаболічних перетворень оксиду азоту, пов'язаний із гемовмісними білками [36, 37]. Отже, можна припустити, що в пацієнтів із тяжкою формою хвороби Грейвса, за якої можливо виникнення локальної тканинної гіпоксії внаслідок значної гіперплазії та гіпертрофії щитоподібної залози, синтез оксиду азоту під дією iNOS гальмується, а його вміст підтримується за рахунок прямого відновлення нітриту до оксиду азоту в присутності гемопротейнів.

Відомо, що одним із потенційних механізмів, які можуть призводити до зниження рівня оксиду азоту, є його підвищений розпад унаслідок надмірної продукції супероксиду. Супероксидний аніон елімінує оксид азоту, внаслідок чого утворюється пероксинітрит, сильний окисник, який може викликати значні порушення у функціонуванні клітин, зокрема мітохондріальну дисфункцію [11, 14]. Остання є одним із ключових механізмів, що призводить до загибелі клітини шляхом апоптозу або некрозу. Щодо можливості існування такого сценарію стосовно щитоподібної залози встановлено, що тривалий тиреотоксикоз, який супроводжується значним оксидативним стресом, призводить до зниження в крові вмісту оксиду азоту у зв'язку з підвищенням інтенсивності його перетворення на пероксинітрит [41].

З огляду на це певний інтерес мають дані щодо встановленої негативної за характером залежності активності iNOS і величини перевищення об'єму щитоподібної залози пацієнтів із хворобою Грейвса понад вікову та статеву норму ($\delta = -0,45$, $p < 0,01$; **рисунок**) і позитивного зв'язку між ступенем збільшення об'єму залози та величиною активності каспази-3, що було встановлено нами раніше і розглядалося як доказ можливої активації (за збільшення об'єму залози) каспазозалежного шляху загибелі тиреоцитів [42]. Незважаючи на сталий висновок, що на відміну від аутоімунного тиреоїдиту тиреоцити за дифузного токсичного зоба є захищеними від загибелі [43, 44], в літера-

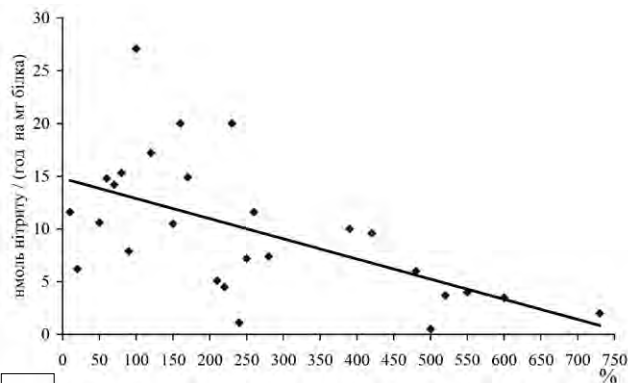


Рис. Взаємозв'язок між активністю iNOS у гомогенатах тканини та перевищенням об'єму щитоподібної залози пацієнтів із хворобою Грейвса. За віссю абсцис — відсоток перевищення об'єму залози понад вікову норму, за віссю ординат — активність iNOS.

турі є дані про вищу кількість апоптозних клітин у тканині залози пацієнтів із хворобою Грейвса, ніж у тканині здорової залози [45]. Отже, підвищення рівня пероксинітриту, що, на думку багатьох, є пусковим моментом ініціації мітохондріального шляху апоптозу та активації каспазного каскаду [11], за умов значного збільшення об'єму залози може призводити до активації активності каспази-3. З іншого боку, за зниження рівня оксиду азоту (що показано за рівнем його метаболітів, див. табл. 1) у тканині дифузного токсичного зоба пацієнтів із тяжкою формою хвороби порівняно з рівнем метаболітів у тканині залози пацієнтів із хворобою Грейвса середньої тяжкості може мати місце зменшення прямого блокуючого впливу оксиду азоту на каспази через зменшення їх нітрозилування [11, 12] та, отже, активація останніх. Який із цих імовірних механізмів має місце насправді в тканині щитоподібної залози за тяжкої форми хвороби Грейвса, невідомо.

Слід зробити ще одне зауваження. Останнім часом з'явилися дані про існування статевих відмінностей величини окисно-відновного балансу в тиреоцитах, а саме: для щитоподібної залози самиць щурів характерний більший рівень утворення перекису водню та послаблений ферментативний антиоксидантний захист порівняно із залозою самців, що пов'язують із прямою дією естрогенів [15]. Крім того, естрогени можуть прямо впливати на експресію cNOS [25]. Ми не мали змоги провести аналіз досліджених параметрів у повному обсязі через невелику кількість хворих чоловічої статі, тканину щитоподібної залози яких було досліджено. Проте встановлено, що рівень метаболітів оксиду азоту та активність його синтаз у позавузловій незмінній тканині щитоподібної залози хворих різної статі суттєво не різнився (**табл. 2**). Водночас у тканині залози жінок із хворобою Грейвса рівень

Таблиця 2. Вміст метаболітів оксиду азоту та активність NO-синтази у незмінній тканині щитоподібної залози та тканині дифузного токсичного зоба пацієнтів різної статі (M±m)

Тканина	Вміст метаболітів NO, нмоль NO ₂ /мг білка	Активність cNOS, нмоль NO ₂ /(год·мг білка)	Активність iNOS, нмоль NO ₂ /(год·мг білка)
Жінки			
Незмінена (13)	2,39±0,41	11,0±1,9	6,3±1,5
Дифузний токсичний зоб (22)	4,84±0,74 *	15,2±2,4	12,8±1,9 *
Чоловіки			
Незмінена (4)	3,40±0,67	7,9±1,4	6,7±0,9
Дифузний токсичний зоб (4)	4,65±1,05	10,4±4,4	7,1±1,2

Примітка: * — вірогідна різниця з показником незміненої тканини.

метаболітів оксиду азоту та активність iNOS були суттєво вищими за такі в тканині порівняння, чого не спостерігали в тканині щитоподібної залози хворих чоловіків. Безумовно, ці попередні дані вимагають підтвердження та детального аналізу.

Отже, зміни функціонального стану системи оксиду азоту в тканині дифузного токсичного зоба пацієнтів із хворобою Грейвса можуть асоціюватися як зі збільшеною активністю залози, наявністю запальних або аутоімунних процесів, так і з порушенням функції ендотелію тиреоїдних судин, а також механізмів регуляції проліферації та загибелі клітин щитоподібної залози. Така багатоспрямованість залучення оксиду азоту до низки фундаментальних процесів, що складають підґрунтя патогенезу хвороби Грейвса, відповідає вже загально визнаній думці про поліфункціональність цієї молекули з властивостями активного радикалу, сигнальної молекули та медіатора.

Список використаної літератури

- Korkmaz A., Manchester L. Reactive nitrogen species; devastating intracellular players and melatonin as a defender // J. Exp. Integr. Med. — 2011. — Vol. 1, № 2. — P. 63-65.
- Valez V., Cassina A., Batinic-Haberle I., Kalyanaraman B., Ferrer-Sueta G., Radi R. Peroxynitrite formation in nitric oxide-exposed submitochondrial particles: detection, oxidative damage and catalytic removal by Mn-porphyrins // Arch. Biochem. Biophys. — 2013. — Vol. 529, № 1. — P. 45-54.
- Liaudet L., Rosenblatt-Velin N., Pacher P. Role of peroxynitrite in the cardiovascular dysfunction of septic shock // Curr. Vasc. Pharmacol. — 2013. — Vol. 11, № 2. — P. 196-207.
- Doshi S., Khullar K., Sharma R., Agarwal A. Role of reactive nitrogen species in male infertility // Reprod. Biol. Endocrinol. — 2012. — Vol. 10. — P. 109.
- Lee J., Giordano S., Zhang J. Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signaling // Biochem. J. — 2012. — Vol. 441, № 2. — P. 523-540.
- Ghasemi A., Zahedias S. Is nitric oxide a hormone? // Iranian Biomed. J. — 2011. — Vol. 15, № 3. — P. 59-65.
- Pacher P., Beckman J., Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease // Physiol. Rev. — 2007. — Vol. 87, № 1. — P. 315-424.

- Vargas F., Moreno J., Wangenstein R., Rodriguez-Gomez I., Garcia-Estac J. The endocrine system in chronic nitric oxide deficiency // Eur. J. Endocrinol. — 2007. — Vol. 156, № 1. — P. 1-12.
- Forstermann U., Sessa W. Nitric oxide synthases: regulation and function // Eur. Heart J. — 2012. — Vol. 33, № 7. — P. 829-837 (837a-837d).
- Бурлака А.П., Сидорик Є.П. Радикальні форми кисню та оксиду азоту при пухлинному процесі. — К.: Наукова Думка, 2006. — 227 с. (Burlaka A.P., Sydoryk E.P. The radical oxygen species and nitric oxide in tumor process. — K.: Naukova Dumka, 2006. — 227 p.)
- Poderoso J. The formation of peroxynitrite in the applied physiology of mitochondrial nitric oxide // Arch. Biochem. Biophys. — 2009. — Vol. 484, № 2. — P. 214-220.
- Carreras M., Poderoso J. Mitochondrial nitric oxide in the signaling of cell integrated responses // Am. J. Physiol. Cell Physiol. — 2007. — Vol. 292, № 5. — P. 1569-1580.
- Кавок Н.С. Структура і регуляція ферментів тиреоїдного гормонорозробки // Укр. біохім. журн. — 2006. — Vol. 78, № 1. — P. 5-19. (Kavok N.S. Structure and regulation of the enzymes of thyroid hormonogenesis // Ukr. biohim. Zh. — 2006. — Vol. 78, № 1. — P. 5-19.)
- Стародубцева М.Н. Пероксинитрит в физиологии и патологии клеток крови — М., Книжный дом «Либроком», 2011. — 200 с. (Starodubtseva M.N. Peroxynitrite in the physiology and pathology of blood cells — M., Book House «LIBROKOM», 2011. — 200 p.)
- Fortunato R., Ferreira A., Hecht F., Dupuy C., Carvalho D. Sexual dimorphism and thyroid dysfunction: a matter of oxidative stress? // J. Endocrinol. — 2014. — Vol. 221, № 2. — P. R31- R40.
- Cejelep G., Marotta F. Oxidants and antioxidants in health and disease // Oxid. Antioxid. Med. Sci. — 2014. — Vol. 3, № 1. — P. 5-8.
- Inoue M., Sato E., Nishikawa M., Hiramoto K., Kashiwagi A., Utsumi K. Free radical theory of apoptosis and metamorphosis // Redox. Rep. — 2004. — Vol. 9, № 5. — P. 237-247.
- Demelash A., Karlsson J., Nilsson M., Bjorkman U. Selenium has a protective role in caspase-3-dependent apoptosis induced by H₂O₂ in primary cultured pig thyrocytes // Eur. J. Endoc. — 2004. — Vol. 150, № 6. — P. 841-849.
- Carrillo-Sepulveda M., Ceravolo G., Fortes Z., Carvalho M., Tostes R., Laurindo F., Webb R. Barreto-Chaves M. Thyroid hormone stimulates NO production via activation of the PI3K/Akt pathway in vascular myocytes // Cardiovasc. Res. — 2010. — Vol. 85, № 3. — P. 560-570.
- Богдар Т.Н. Тиреоїдний статус організму і оксид азота // Annals of Mechnikov Institute. — 2008. — № 3. — С. 8-12. (Bogdar T.N. Thyroid status of the body and nitric oxide // Annals of Mechnikov Institute. — 2008. — № 3. — P. 8-12.)
- Висмонт Ф.И., Степанова Н.А., Глебов М.А. О роли монооксида азота в регуляции уровня йодсодержащих гормонов щитовидной железы в крови и температуры тела при эндотоксической лихорадке // Военная медицина. — 2009. — № 4. — P. 22-25. (Vismont F.I., Stepanova N.A., Glebov M.A. On the role of nitric oxide in the regulation of the level of iodine-containing thyroid hormones in the blood and body temperature during endotoxin fever // Voyennaya Meditsina. — 2009. — № 4. — P. 22-25.)
- Киричук В.А., Цымбал А.А. Использование электромагнитного излучения терагерцового диапазона на частотах оксида азота для коррекции функционального состояния щитовидной железы при стрессе // Вестник Рос. Акад. мед. наук. — 2010. — № 4. — С. 37-40. (Kirichuk V.A., Tsybmal A. The use of terahertz electromagnetic radiation at frequencies of nitric oxide for the correction of the functional state of the thyroid gland during stress // Vestnik Ros. Acad. Med. Nauk. — 2010. — № 4. — P. 37-40.)
- Knudsen N., Lauberg P., Perrid H. Risk factor for goiter and thyroid nodules // Thyroid. — 2002. — Vol. 12, № 10. — P. 879-888.
- Colin I., Nava E., Toussaint D., Maiter D., vanDenhove M., Luscher T., Ketelslegers J., Deneff J., Jameson J. Expression of nitric oxide synthase isoforms in the thyroid gland: evidence for a role of nitric oxide in vascular control during goiter formation // Endocrinology. — 1995. — Vol. 136, № 12. — P. 5283-5290.
- de Araujo L., Grozovsky R., dos Santos Pereira M., de Carvalho J., Vaisman M., Carvalho D. Expressions of vascular endothelial growth factor and nitric oxide synthase III in the thyroid gland of

Оригінальні дослідження

- ovariectomized rats are upregulated by estrogen and selective estrogen receptor modulators // *Thyroid*. — 2010. — Vol. 20, № 1. — P. 85-92.
26. Coiro V., Volpi R., Chiodera P. Mediation by nitric oxide of TRH-, but not metoclopramide-stimulated TSH secretion in humans // *Neuroreport*. — 1995. — Vol. 6, № 8. — P. 1174-1176.
 27. Bocanera L., Krawiec L., Silberschmidt D., Pignataro O., Juvenal G., Pregliasco L., Pisarev M. Role of cyclic 3'5' guanosine monophosphate and nitric oxide in the regulation of iodide uptake in calf thyroid cells // *J. Endocrinol.* — 1997. — Vol. 155, № 3. — P. 451-457.
 28. Fozzatti L., Viñez M., Lucero A., Nicol J., Mascanfroni I., Maccio D., Pellizas C., Roth G., Masini-Repiso A. Endogenous thyrocyte-produced nitric oxide inhibits iodide uptake and thyroid-specific gene expression in FRTL-5 thyroid cells // *J. Endocrinol.* — 2007. — Vol. 192, № 3. — P. 627-637.
 29. Green L., Wagner D., Glogowski J., Skipper P., Wishnok J., Tannenbaum S. Analysis of nitrate, nitrite, and ¹⁵N nitrate in biological fluids // *Anal. Biochem.* — 1982. — Vol. 126, № 1. — P. 131-138.
 30. Гула Н.М., Косякова Г.В., Бердищев А.Г. Вплив N-стероїлетаноламіну на NO-синтазний шлях генерації оксиду азоту в аорті та серці щурів із стрептозотиніндукованим діабетом // *Укр. біохім. журн.* — 2007. — Vol. 79, № 5. — С. 153-158. (Gula N.M., Kosyakova G.V., Berdyshev A.G. Effect of N-steroyiletanolaminu on NO-synthase pathways generation of nitric oxide in the aorta and heart of rats with streptozotocin-induced diabetes // *Ukr. Biochem. Zh.* — 2007. — Vol. 79, № 5. — P. 153-158).
 31. Hartree T. Determination of protein: A modification of Lowry method that gives a linear photometric response // *Anal. Biochem.* — 1972. — Vol. 48, № 2. — P. 422-427.
 32. Seven R., Gelisgen R., Seven A., Erbil Y., Bozboru A., Burcak G. Influence of propylthiouracil treatment on oxidative stress and nitric oxide in Basedow disease patients // *J. Toxicol. Environ. Health*. — 2001. — Vol. 62, № 7. — P. 495-503.
 33. Vural P., Degirmencioglu S., Erden S., Gelincik A. The relationship between transforming growth factor-beta 1, vascular endothelial growth factor, nitric oxide and Hashimoto's thyroiditis // *Int. Immunopharmacol.* — 2009. — Vol. 9, № 2. — P. 212-215.
 34. Мишуніна Т.М., Калініченко О.В., Тронько М.Д., Зурнаджи Л.Ю. Система генерації оксиду азоту в тканині щитоподібної залози при лімфоїдній інфільтрації чи хронічному тиреоїдиті // *Журн. НАМН України*. — 2015. — Vol. 21, № 1, 00-00. (Myshunina T.M., Kalinichenko O.V., Tronko M.D., Zurnadzhy L.Y. The system of generation of nitric oxide in the tissue of the thyroid gland in lymphoid infiltration or chronic thyroiditis // *J. NAMN Ukrainy*. — 2015. — Vol. 21, № 1. — P. 00-00).
 35. Popiawska-Kita A., Szelachowska M., Modzelewska A., Siewko K., Dzikcio J., Klimiuk P., Gyrsla M. Endothelial dysfunction in Graves' disease // *Adv. Med. Sci.* — 2013. — Vol. 58, № 1. — P. 31-37.
 36. Реутов В.П. Медико-биологические аспекты циклов оксида азота и супероксидного анион-радикала // *Вестник РАМН*. — 2000. — № 4. — P. 35-41. (Reutov V.P. Medical and biological aspects of the cycles of nitric oxide and superoxide anion radical // *Bulletin of Medical Sciences*. — 2000. — № 4. — P. 35-41).
 37. Lundberg J., Weitzberg E. The biological role of nitrate and nitrite: the times they are a-changin // *Nitric Oxide*. — 2010. — Vol. 22, № 2. — P. 61-63.
 38. Сапріна Т.В., Прохоренко Т.С., Рязанцева Н.В., Ворожцова І.Н. Цитокинопосередовані механізми формування аутоімунних тиреопатій // *Клін. експерим. тиреоїдологія*. — 2010. — Vol. 6, № 4. — P. 6-27. (Saprin T.V., Prokhorenko T.S., Ryzantseva N.V., Vorozhtsova I.N. Cytokine-mediated mechanisms of autoimmune thyropathies // *Klin. Exper. Thyroidology*. — 2010. — Vol. 6, № 4. — P. 6-27).
 39. LoFaro M., Fox B., Whatmore J., Winyard P., Whiteman M. Hydrogen sulfide and nitric oxide interactions in inflammation // *Nitric Oxide*. — 2014. — Vol. 41. — P. 38-47.
 40. Figueroa-Vega N., Majano P., Larranaga E., Miguel Bravo J., Rodriguez-Ramos R., Gonzalez-Amaro R., Marazuela M. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in autoimmune thyroid disorders (AITD) // *Endocrinol. Nutr.* — 2008. — Vol. 55, № 8. — P. 340-345.
 41. Antelava N., Antelava A., Gogolauri M., Kezeli T., Pachkoriia K. Oxidative stress during thyrotoxicosis and its correction // *Georgian Med. News*. — 2006. — Vol. 132. — P. 123-127.
 42. Myshunina T.M., Kalinichenko O.V., Tron'ko M.D. Mechanism of apoptosis in thyroid cells under thyroid pathology // *Inter. J. Physiol. Pathophysiol.* — 2010. — Vol. 1, № 2. — P. 81-96.
 43. Кандрор В.И., Крайнова С.И., Крюкова И.В., Мкртумова Н.А. К механизмам пролиферации и гибели тиреоцитов при аутоиммунных заболеваниях щитовидной железы // *Вестник РАМН*. — 2006. — № 9-10. — С. 56-60. (Kandror V.I., Kraynova S.I., Kryukova I.V., Mkrumova N.A. About the mechanisms of proliferation and death of thyrocytes in autoimmune thyroid diseases // *Bulletin of Medical Sciences*. — 2006. — № 9-10. — P. 56-60).
 44. Salmaso C., Bagnasco M., Pesce G., Montagna P., Brizzolaro R., Altrinetti V., Richiusa P., Galluzzo A., Giordano C. Regulation of apoptosis in endocrine autoimmunity: insights from Hashimoto's thyroiditis and Graves' disease // *Ann. NY Acad. Sci.* — 2002. — Vol. 966. — P. 496-501.
 45. Sera N., Kawakami A., Nakashima T., Nakamura H., Imaizumi M., Koji T., Abe Y., Usa T., Tominaga T., Ejima E., Ashizawa K., Yokoyama N., Ishikawa N., Ito K., Eguchi K. Fas/FasL mediated apoptosis of thyrocytes in Graves' disease // *Clin. Exp. Immunol.* — 2001. — Vol. 124, № 2. — P. 197-207.

(Надійшла до редакції 17.07.2015 р.)

Уровень оксида азота и активность его синтаз в ткани щитовидной железы пациентов с болезнью Грейвса

Е.В. Калиниченко, Т.М. Мишуніна, Н.Д. Тронько, Л.Ю. Зурнаджи

ГУ «Институт эндокринологии и обмена веществ им. В.П. Комиссаренко НАМН Украины»

Резюме. Исследованы уровень метаболитов оксида азота и активности его синтаз (конститутивной и индуцибельной, cNOS и iNOS) в ткани щитовидной железы пациентов с болезнью Грейвса. Установлен высший уровень метаболитов оксида азота в ткани диффузного токсичного зоба по сравнению с таким в неизменной ткани щитовидной железы больных с эутиреоидной узловатой патологией, который не зависел от особенностей фолликулярного строения ткани, выраженности гиперпластического процесса или тиреоидита, наличия фиброзно-склеротических изменений стромы, а также величины превышения объема железы над возрастной нормой. В ткани железы при тяжелой форме болезни отсутствуют значительные изменения уровня метаболитов оксида азота, тогда как при средней тяжести он увеличен более чем в 2 раза. Активность cNOS в ткани диффузного токсического зоба повышена только в случае присутствия очагового тиреоидита и в ткани макрофолликулярного строения, тогда как статистически значимое увеличение активности iNOS подтверждено в патологически измененной ткани при сопутствующем тиреоидите, очаговой гиперплазии тиреоидного эпителия, в ткани железы больных при увеличении ее объема в пределах до 300% выше нормы и в железе больных при средней тяжести болезни; оно не зависит от особенностей фолликулярного строения ткани и наличия фиброзно-склеротических изменений стромы. Индукция iNOS отсутствует в случае регистрации выраженного гиперпластического процесса, при значительном превышении объема железы (300-800% сверх нормы) и в железе больных с тяжелой

формой болезни Грейвса. Изменения функционального состояния системы оксида азота, который объединяет свойства активного радикала с функциями сигнальной молекулы и медиатора, в ткани диффузного токсического зоба может ассоциироваться как с увеличенной активностью железы, наличием воспалительных или аутоиммунных процессов, так и с нарушением функции эндотелия тиреоидных сосудов, а также механизмов регуляции пролиферации и гибели клеток щитовидной железы.

Ключевые слова: оксид азота, конститутивная и индуцибельная синтазы оксида азота, щитовидная железа, болезнь Грейвса.

Level of nitric oxide and its synthases activity in the thyroid tissue of Graves' disease patients

O.V. Kalinichenko, T.M. Myshunina, M.D. Tronko, L. Yu. Zurnadzi

State Institution «V. P. Komisarenko Institute of Endocrinology and Metabolism, NAMS of Ukraine»

Summary. The authors have studied the level of nitric oxide metabolites and its synthase activity (constitutive and inducible ones, cNOS and iNOS) in thyroid tissue of patients with Graves' disease. It has been established the highest level of nitric oxide metabolites in the tissue of toxic goiter compared with that in the unmodified thyroid tissue of patients with euthyroid nodular pathology,

which did not depend on the structure of follicular tissue, hyperplastic process or severity of thyroiditis, presence of fibro-sclerotic changes in stroma, as well as excess in gland volume above the age norm. In thyroid tissue with severe disease there are no significant changes in nitric oxide levels, whereas in case of moderate disease it is increased more than two-fold. cNOS activity in the tissue of toxic goiter is increased only in case of focal thyroiditis and in tissue of macrofollicular structure, whereas a statistically significant increase in iNOS activity is confirmed in pathologically modified tissue in case of concomitant thyroiditis, focal hyperplasia of thyroid epithelium, in tissue of patients with an increase in gland's volume up to 300% above the normal volume and in patients with mild disease; it does not depend on the peculiarities of tissue follicular structure and presence of fibro-sclerotic stroma. iNOS induction is absent in case of a marked hyperplastic process, in the presence of a significant excess of gland volume (300-800% above normal) and in patients with severe Graves' disease. Changes in functional state of nitric oxide system, which combines the properties of the active radical with functions of signaling molecule and mediator, in toxic goiter tissue may be associated both with an increased activity of the gland, presence of inflammatory or autoimmune processes, and with endothelial dysfunction of thyroid vessels, and mechanisms of regulation of thyroid cell proliferation and thyroid cell death.

Keywords: nitric oxide, constitutive and inducible nitric oxide synthases, thyroid, Graves' disease.