

Активність синтаз оксиду азоту та його концентрація в тканині карцином щитоподібної залози людини

О.В. Калініченко, Т.М. Мишуніна, М.Д. Тронько

ДУ “Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка НАМН України”, Київ;
e-mail: mishunina@list.ru

При дослідженні активності конститутивної форми синтази оксиду азоту (сNOS) встановлено, що в папілярних карциномах щитоподібної залози вона відповідає такій у незмінній позапухлинній тканині, тоді як в фолікулярних карциномах вона менша вдвічі. Водночас активність індукційної синтази оксиду азоту (іNOS) вища як в папілярних, так і в фолікулярних карциномах. Такі зміни супроводжуються більшим вмістом оксиду азоту в папілярних карциномах і незначними змінами в фолікулярних. У медулярних карциномах вивчені показники відповідали таким у незмінній тканині, а в метастазах папілярної карциноми на фоні відсутності змін активності ферментів утворення оксиду азоту вміст його був суттєво вищим. Збільшений вміст оксиду азоту та активності іNOS в папілярних карциномах щитоподібної залози суттєво не залежать від характеристик їх агресивності, проте зміни вмісту відсутні в пухлинах категорії T4 на фоні зниженої при цьому активності сNOS і менш виражений у пухлинах, які оточені тканиною за наявності в ній хронічного тиреоїдиту. Крім того, в папілярних карциномах папілярної чи фолікулярної будови вміст оксиду азоту не відрізнявся від норми, був трохи вищим у пухлинах солідної чи гетерогенної будови з наявністю солідних ділянок, тоді як в карциномах папілярно-фолікулярної будови він був більшим в 2, а в тканині солідно-інсулярної будови – в 3 рази. Підвищену активність іNOS спостерігали в карциномах різної будови, за виключенням пухлин солідної будови, в яких вона виявилася на рівні норми, та в пухлинах солідно-інсулярної будови, де вона суттєво (як і активність сNOS) вища порівняно з пухлинами іншої будови. Система генерації оксиду азоту бере участь у трансформації клітин щитоподібної залози та прогресії пухлинного росту, зокрема через регуляцію апоптозу, що видно з аналізу даних, отриманих як в рамках виконання цього дослідження, так і раніше. При цьому характер такої участі в папілярних карциномах щитоподібної залози, які мають неоднакову гістологічну будову, різниться. Ключові слова: оксид азоту; конститутивна та індукційна синтази оксиду азоту; карциноми щитоподібної залози; апоптоз.

ВСТУП

Оксид азоту (NO) – один з центральних регуляторів фізіологічних і біохімічних процесів – безперервно продукується в організмі ферментативним шляхом і за певних умов є потенційно токсичною молекулою. В нормі він бере участь у регуляції найважливіших внутрішньо- та міжклітинних реакцій, які відбуваються в усіх системах організму, тому цій молекулі надають особливого значення в розвитку патології. Функціональна відповідь клітини на дію оксиду азоту різнопланова; вона та баланс між фізіологічними, регуля-

© О.В. Калініченко, Т.М. Мишуніна, М.Д. Тронько

торними та/чи цитотоксичними властивостями молекули значною мірою залежить не тільки від фенотипу клітини-мішені, але і від локальної концентрації оксиду азоту, а також редокс-стану власне цієї молекули, а також інших молекул, що її оточують у тканинах, в яких вона синтезується і реалізує свої ефекти [1].

Радикал оксиду азоту у біологічних системах реагує з киснем, іонами металів і супероксидним аніон-радикалом. При взаємодії з останнім утворюється токсичний пероксинітрит, якому властиві всі функції оксиду азоту і який є потужним оксидантом

[2]. Він може продукувати високореакційно-спроможні гідроксильні радикали, що сприяє посиленню окисного стресу [1]. Відомо, що активні форми кисню, які утворюються при цьому, можуть окиснювати білки та ліпіди, пошкоджувати ДНК і, таким чином, викликати мутації, що призводять до трансформації клітин. З іншого боку, в мітохондріях оксид азоту діє як фізіологічний месенджер, що модулює швидкість транспорту електронів через компоненти електронно-транспортного ланцюга мітохондрій. Залежно від вмісту утвореного пероксинітриду, останній та активні радикали кисню можуть викликати розвиток мітохондріальних дисфункцій, результатом чого є апоптозна чи некротична загибель клітини [1]. Водночас нітрозилування регуляторних білків, зокрема ефекторних каспаз, призводить, навпаки, до блокування апоптозу [2]. Порушення регуляції та реалізації останнього є також основою для розвитку низки патологічних процесів. Більшість авторів схиляються до висновків, що розбіжності у спрямованості ефектів ендogenous оксиду азоту залежать не тільки від його вмісту та типу клітин, а також від активності онкогенів і стадії клітинного циклу, тому цю молекулу вважають фізіологічним модулятором проходження клітинного циклу, проліферації та апоптозу [3].

Не викликає вже сумнівів, що саме окисний стрес при недостатності функції антиоксидантних систем є одним з центральних механізмів розвитку вузлових, запальних, автоімунних чи онкологічних захворювань щитоподібної залози [4, 5]. Проте питання щодо участі оксиду азоту в реалізації цих механізмів в щитоподібній залозі за її патології залишається до кінця не визначеним, а дані досліджень багато в чому суперечливі. Як приклад, застосування апоптозмодулювального препарату, який створений на основі вітаміну B_{12} та оксиду азоту (нітрозилкобаламін) і який підвищує вміст останнього, призвело до різкого зниження об'єму неоперабельної карциноми щитоподібної залози

[6], тоді як інгібітор NOS, який викликає зменшення вмісту оксиду азоту, підвищує в клітинній культурі фолікулярного раку щитоподібної залози кількість клітин, які гинуть за апоптозом [7].

Раніше ми показали, що в тканині хронічного тиреоїдиту, дифузного токсичного зобу, зобозміненої тканині хворих на еутиреоїдний вузловий зоб і в тканині фолікулярних аденом зміни активності ферментів, які відповідають за генерацію оксиду азоту (конститутивна та індукційна синтази оксиду азоту – cNOS та iNOS), а також його вмісту залежать від деяких клінічних характеристик перебігу хвороби та морфологічних особливостей досліджуваної тканини [8-10].

Метою цієї роботи було визначити вміст оксиду азоту (його метаболітів) та активність cNOS та iNOS у тканині карцином щитоподібної залози.

МЕТОДИКА

Досліджено 44 зразки папілярної, 5 фолікулярної, 3 медулярної карцином, 6 метастазів папілярної карциноми, 6 позапухлинної тканини з інвазією пухлинних клітин, а також 14 зразків позапухлинної незміненої тканини щитоподібної залози нормофолікулярної будови; останні склали групу порівняння. Всі пацієнти, тканина щитоподібної залози яких була досліджена, знаходилися в еутиреоїдному стані.

Зразки тканин промивали охолодженим фізіологічним розчином, зважували, подрібнювали та гомогенізували у 3-5-кратному об'ємі середовища такого складу: цукроза – 250 ммоль/л, тріс- HCl -буфер – 20 ммоль/л, натрієва сіль етилендіамін-тетраоцтової кислоти – 1 ммоль/л (pH 7,4).

Вміст метаболітів NO (суму нітрит- і нітрат-аніонів) визначали в гомогенатах спектрофотометричним методом за розвитком забарвлення в реакції діазотування нітритом сульфаніламідом, який входить до складу реактиву Гріса [11]. Для відновлення нітрат- до

нітрит-аніона при проведенні кольорової реакції у проби добавляли хлорид кадмію до кінцевої концентрації 2,5 %. Інтенсивність забарвлення реєстрували на спектрофотометрі («JanWay», Великобританія) при довжині хвилі 540 нм. Для побудови калібрувальної кривої використовували водний розчин нітрит-аніону натрію (1 моль/л), вміст якого в тканині виражали у наномолях на 1 мг білка.

Активність cNOS визначали за кількістю утворених під час інкубації метаболітів NO, вміст яких (у вигляді нітрит-аніона) 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, нікотинаміддинуклеотид відновлений – 1, L-аргінін – 2,2, а також 1-2 мг білка гомогенату [12]. Час інкубації становив 60 хв. Для визначення активності iNOS до складу інкубаційної суміші замість хлориду кальцію для зв'язування ендогенного Ca²⁺ додавали тетраацетат етиленгліколю у кінцевій концентрації 4 ммоль/л. Активність ферментів виражали у наномолях NO₂⁻, утвореного за 1 год на 1 мг білка. Вміст останнього визначали за однією з модифікацій загальноприйнятого методу Лоурі, після його осадження трихлороцтовою кислотою.

Одержані результати опрацьовані статистично з використанням критерію t Стьюдента та представлені в таблицях у вигляді M±m. Критичний рівень значимості приймали за 0,05. При вивченні можливого зв'язку між показниками, що вивчали, розраховували непараметричний коефіцієнт кореляції Спірмена. При аналізі отриманих результатів враховували висновки патоморфологічних досліджень післяопераційного матеріалу. На проведення досліджень був отриманий дозвіл від Комітету з біоетики Інституту.

Перед викладенням та аналізом результатів зазначимо, що при розподілі зразків папілярних карцином по групах враховували лише один з показників (будова тканини, категорія пухлини TNM, наявність капсули, інвазії, склеротичних чи некротичних змін

тощо), розуміючи при цьому, що разом із досліджуваною характеристикою пухлини мають і інші. Проте у реальних умовах неможливо скласти вибірки, в яких зразки пухлинної тканини щитоподібної залози у кожній з груп мали б лише одну з таких характеристик, тому подібним аналізом, незважаючи на його гетерогенність, на нашу думку, можна все таки отримати певну інформацію.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Активність cNOS у папілярних карциномах відповідає такій у незмінній позапухлинній тканині щитоподібної залози нормофолікулярної будови, тоді як у фолікулярних карциномах вона менша майже наполовину (табл. 1). Водночас активність iNOS вища як у папілярних, так і у фолікулярних карциномах. Такий характер змін активності ферментів синтезу оксиду азоту супроводжується збільшенням його вмісту в папілярних карциномах і незначними змінами у фолікулярних. У 3 зразках медулярних карцином вивчені показники відповідали таким у незмінній тканині, а в метастазах папілярної карциноми на фоні відсутності змін активності ферментів утворення оксиду азоту вміст останнього був суттєво вищим (на 450 %), як і в позапухлинній тканині з ознаками інвазії пухлинних клітин, хоча в останньому випадку активність обох синтаз були значно вищими за норму (див. табл. 1).

Проведений аналіз характеру змін у системі генерації оксиду азоту в папілярних карциномах залежно від певних клінічних і біологічних характеристик останніх показав, що вміст оксиду азоту високий лише в карциномах категорії T1, а активність iNOS (але не cNOS) збільшена в пухлинах категорій T1-T3 (табл. 2). В папілярних карциномах категорії T4 активність cNOS суттєво нижча порівняно з такою в незмінній тканині щитоподібної залози, а вміст оксиду азоту та активність iNOS відповідають нормі і менші, ніж у тканині пухлин категорії T1-T3.

Таблиця 1. Вміст метаболітів оксиду азоту та активність NO-синтази (NOS) у незмінній тканині щитоподібної залози, в карциномах, метастазах папілярної карциноми та позапухлинній тканині з інвазією пухлинних клітин останньої (M±m)

Тканина	Вміст NO ₂ ⁻ , нмоль/мг білка	Активність, нмоль NO ₂ ⁻ •год ⁻¹ •мг ⁻¹ білка	
		cNOS	iNOS
Незмінена (n=14)	2,63±0,56	7,11±1,19	5,07±0,64
Медулярної карциноми (n=3)	4,42±1,17	6,44±1,95	5,78±1,64
Фолікулярної карциноми (n=5)	3,20±0,44	4,02±0,55 **	9,70±1,84 *
Папілярної карциноми (n=44)	4,01±0,39 *	6,57±0,65	11,25±1,20 *
Метастазів папілярної карциноми (n=6)	14,55±3,92 *	6,09±1,45	3,51±0,66
Позапухлинна з інвазією пухлинних клітин папілярної карциноми (n=6)	7,89±2,13 *	34,21±9,34 *	19,27±5,62 *

* P < 0,05 щодо незміненої тканини; ** P < 0,05 щодо папілярної карциноми.

Вищий вміст оксиду азоту в папілярних карциномах суттєво не залежить від їх біологічних характеристик, а саме від наявності капсули, розповсюдження пухлинних клітин

Таблиця 2. Вміст метаболітів оксиду азоту та активність NO-синтази (NOS) в незмінній тканині щитоподібної залози та в папілярних карциномах з різними біологічними характеристиками (M±m)

Тканина	Вміст NO ₂ ⁻ , нмоль/мг білка	Активність, нмоль NO ₂ ⁻ •год ⁻¹ •мг ⁻¹ білка	
		cNOS	iNOS
Незмінена (n=14)	2,63±0,56	7,11±1,19	5,07±0,64
Папілярної карциноми категорії			
T1 (n=7)	5,49±1,19 ***	7,19±1,48	11,28±2,67 ***
T2 (n=11)	4,03±1,36	5,06±1,12	9,93±1,99 ***
T3 (n=22)	3,87±0,61 **	6,95±1,00	13,19±1,88 ***
T4 (n=4)	1,94±0,43	4,02±0,59 *	3,85±0,87
N0 (n=26)	4,20±0,69	6,66±0,91	12,94±1,50 *
N1 (n=18)	3,66±0,64	6,01±0,86	8,87±1,70 *
інкапсульованої (n=15)	4,15±1,08	4,80±0,87	9,57±1,55 *
неінкапсульованої (n=29)	3,85±0,48	7,52±0,85 ***	11,82±1,70 *
без кровоносної інвазії (n=24)	4,15±0,78	5,61±0,76	11,62±1,51 *
з кровоносною інвазією (n=20)	3,77±0,53	7,68±1,07	10,84±1,96 *
без лімфатичної інвазії (n=32)	4,20±0,59	6,49±0,69	12,40±1,42 *
з лімфатичною інвазією (n=12)	3,31±0,77	6,90±1,66	7,92±2,00
без тиреоїдної інвазії (n=27)	3,59±0,55	7,44±0,86	10,68±1,37 *
з тиреоїдною інвазією (n=17)	4,56±0,88	5,25±0,99	12,13±2,27 *
без інвазії у м'які тканини (n=26)	4,00±0,68	5,75±0,71	10,43±1,24 *
з інвазією у м'які тканини (n=18)	3,94±0,65	7,82±1,22	12,51±2,43 *
без фіброзно-склеротичних змін (n=17)	4,41±0,94	6,10±0,76	9,21±1,39 *
з фіброзно-склеротичними змінами (n=27)	3,72±0,53	6,85±0,95	12,47±1,71 *
без некротичних змін (n=18)	3,75±0,53	5,77±0,69	9,75±1,54 *
з некротичними змінами (n=26)	4,32±0,92	7,79±1,25	13,55±1,84*
без тиреоїдиту у позапухлинній тканині (n=30)	4,56±0,66 *	7,11±0,84	12,63±1,45*
з тиреоїдитом у позапухлинній тканині (n=14)	2,75±0,43 ****	5,45±0,99	8,41±1,95 ****

* P < 0,05 щодо незміненої тканини; ** P < 0,05 щодо карциноми категорії T4; *** P < 0,05 щодо інкапсульованої карциноми; **** P < 0,05 щодо карциноми без тиреоїдиту в позапухлинній тканині.

по залозі, метастазів пухлини до лімфовузлів, інвазії до кровоносних чи лімфатичних судин, а також до м'яких тканин, наявності виражених фіброзно-склеротичних чи некротичних змін. Щодо cNOS, то активність, яка відповідає нормі, спостерігається в карциномах з різними біологічними характеристиками, за виключенням інкапсульованих, де вона нижча, ніж у тканині неінкапсульованих. Підвищена активність iNOS, яка зареєстрована у загальній групі пухлин, простежується і в підгрупах; дещо суттєвіше це видно в тканині неінкапсульованих папілярних карцином і карцином категорії N0, в пухлинах, які не інвазують до лімфатичних судин, а також за наявності фіброзно-склеротичних чи некротичних змін, хоча вірогідних змін між групою, де ознака відсутня, і групою, де вона є, не зафіксовано (див. табл. 2). Лише у разі, коли карцинома інвазує до лімфатичних судин, активність ферменту знаходиться на рівні, який встановлений в незмінній тканині.

Зважаючи на участь системи оксиду азоту в механізмах розвитку запальних та автоімунних реакцій, зокрема і в щитоподібній залозі [13], ми проаналізували зміни активності ферментів генерації оксиду азоту та його вмісту в папілярних карциномах залежно від наявності хронічного тиреоїдиту в позапухлинній тканині. Як видно з результатів такого аналізу, вміст оксиду азоту та активність iNOS в тканині карцином за наявності тиреоїдиту в позапухлинній тканині є нижчими порівняно з такими в пухлинах, коли в навколишній тканині він відсутній (див. табл. 2).

В одному з досліджень відмічено, що найбільше зростання експресії iNOS спостерігається у карциномах великих розмірів і в пухлинах хворих старшого (понад 45 років) віку [14]. За нашими результатами активність cNOS та iNOS ніяк не пов'язана з розміром пухлин ($\rho = + 0,02$ і $\rho = - 0,02$ відповідно), а для вмісту оксиду азоту, навпаки, визначений негативний корелятивний зв'язок з ним ($\rho = - 0,33$, $P < 0,02$). Щодо віку хворих, то наші результати підтверджують висновок, що у хворих віком понад 40 років активність iNOS у папілярних карциномах вища, ніж у пухлинах молодших пацієнтів (табл. 3, $\rho = + 0,36$, $P < 0,01$).

Отже, збільшення вмісту оксиду азоту та активності iNOS в папілярних карциномах щитоподібної залози майже не залежить від характеристик їх агресивності, метастатичного та інвазивного потенціалу, розміру пухлини, проте воно відсутнє в пухлинах категорії T4 на фоні зниженої при цьому активності cNOS і менш виражено в пухлинах, які оточені тканиною з хронічним тиреоїдитом. Водночас, розглядаючи залежність стану системи оксиду азоту в папілярних карциномах різної гістологічної будови було підмічено, що в пухлинах папілярної чи фолікулярної будови вміст оксиду азоту не відрізнявся від норми, був трохи вищим у пухлинах солідної чи гетерогенної будови з наявністю солідних ділянок, тоді як в карциномах папілярно-фолікулярної будови він був збільшеним в 2, а в пухлинах солідно-інсулярної будови – в 3 рази (табл. 4). Підвищена активність

Таблиця 3. Вміст метаболітів оксиду азоту та активність NO-синтази (NOS) в папілярних карциномах хворих різного віку (M±m)

Тканина карцином хворих віком	Вміст NO ₂ ⁻ , нмоль/мг білка	Активність, нмоль NO ₂ ⁻ •год ⁻¹ •мг ⁻¹ білка	
		cNOS	iNOS
до 17 років (n=5)	6,67±2,34	6,68±1,46	9,41±2,10
21-30 років (n=16)	3,31±0,55	5,52±0,98 *	7,99±1,53 *
31-40 років (n=16)	3,40±0,66	5,99±1,05 *	12,38±1,93
понад 40 років (n=7)	5,02±1,53	10,36±1,73	18,60±3,42

Примітка: *P < 0,05 щодо значень у групі хворих віком понад 40 років

Таблиця 4. Вміст метаболітів оксиду азоту та активність NO-синтази (NOS) в незмінній тканині щитоподібної залози та у папілярних карциномах різної будови (M±m)

Тканина	Вміст NO ₂ ⁻ , нмоль/мг білка	Активність, нмоль NO ₂ ⁻ •год ⁻¹ •мг ⁻¹ білка	
		cNOS	iNOS
Незмінена (n=14)	2,63±0,56	7,11±1,19	5,07±0,64
Папілярної карциноми будови типової папілярної (n=4)	2,21±0,26	6,75±2,62	10,54±2,38 *
фолікулярної (n=4)	2,00±0,38	4,07±1,49	10,99±2,37 *
папілярно-фолікулярної (n=10)	5,32±1,02 ***,***	7,27±1,46	14,67±2,93 *
солідної (n=7)	3,98±1,29	6,00±1,07	6,77±1,54 ****
гетерогенної з солідними ділянками (n=16)	3,54±0,81	6,50±1,24	11,02±1,99 *
солідно-інсулярної (n=3)	8,13±1,95 ****,****,****	10,32±0,74 ****,****,****,****	19,74±3,66 ****

Різниця вірогідно значуща (P<0,05) відносно: * незміненої тканини; ** карциноми папілярної будови; *** карциноми фолікулярної будови; **** карциноми солідної будови; **** карциноми гетерогенної будови з солідними ділянками; **** карциноми папілярно-фолікулярної будови.

iNOS спостерігалася в карциномах різної фолікулярної будови, за виключенням пухлин солідної будови, в яких активність ферменту виявилася на рівні норми, та в карциномах солідно-інсулярної будови, де вона суттєво (як і активність cNOS) вища порівняно з пухлинами іншої будови.

ОБГОВОРЕННЯ

На цей час вже доведено, що оксид азоту є одним з основних медіаторів протипухлинної дії активованих макрофагів [15]. Водночас підвищений вміст оксиду азоту в щитоподібній залозі при наявності пухлини фіксують не стільки в макрофагах, скільки власне в пухлинних клітинах [14, 16-20]. Це підвищення забезпечується збільшенням експресії ферментів синтезу оксиду азоту, більшою мірою iNOS, експресія якого значно посилюється за дії різних патогенних стимулів, зокрема, у відповідь на зростання в пухлинних клітинах вмісту різноманітних цитокинів. Кальцій-залежна cNOS, яка синтезує оксид азоту у фізіологічних концентраціях в дискретному режимі невеликими порціями у ті проміжки часу, коли в синтезуючій клітині підвищу-

ється концентрація Ca²⁺, є менш потужним ферментом, ніж кальційнезалежна iNOS [21].

Дані досліджень дещо різняться і якщо одні свідчать про те, що найвища активність ферментів, які генерують оксид азоту, спостерігається в тканині за тиреоїдиту і менша в пухлинній тканині [18, 19], то інші вказують на неспецифічність щодо тиреоїдної патології активації експресії iNOS [20]. Найчастіше серед новоутворень щитоподібної залози підвищення експресії iNOS відмічають в оксифільноклітинних (100 %), папілярних (до 80 %), анапластичних (до 60 %) карциномах, тоді як в фолікулярних карциномах і аденомах воно зустрічається рідше (до 40 % і 20 % відповідно) [14], що підтверджено іншими дослідниками, які стверджують, що у фолікулярних новоутвореннях експресія iNOS нижча, ніж в папілярних чи анапластичних карциномах [16]. Водночас за деякими даними експресія як cNOS, так і iNOS збільшена саме в фолікулярних аденомах порівняно з папілярними карциномами [18]. Згідно з нашими результатами активність iNOS дійсно дещо вища в папілярних карциномах порівняно з фолікулярними, до того ж активність cNOS в останніх знижена як відносно такої

в нормальній тканині залози, так і порівняно з активністю ферменту в папілярних карциномах (див. табл. 1). Щодо аденом, то, як показано нами раніше, активність iNOS підвищена лише в оксифільноклітинних аденомах щитоподібної залози [9].

Збільшення утворення оксиду азоту може відігравати важливу роль не тільки у злоякісній трансформації тиреоцитів, але і в прогресії пухлин щитоподібної залози, зокрема їх неоваскуляризації, метастазуванні та інвазії [17, 19, 22]. Вважають, що за дії cNOS синтез оксиду азоту насамперед відбувається у судинному ендотелії при дії ендотеліальної NOS (eNOS) [21]. Зважаючи на це, результати наших досліджень щодо відсутності суттєвих змін в активності cNOS в папілярних карциномах не вкладається у висновок, що неоваскуляризація пухлин пов'язана з активацією експресії eNOS [17]. Більше того, в пухлинах категорії T4 активність cNOS навіть нижча за норму. Слід зазначити, що і інші дослідники не встановили суттєвої експресії eNOS в судинах папілярних карцином, натомість в ендотелії перитуморальної зони вона була значно збільшеною [23].

Допускають, що високий вміст оксиду азоту в пухлинній чи в позапухлинній тканинах, особливо за наявності запалення, може підвищувати метастатичний потенціал і сприяти розвитку інвазивних карцином щитоподібної залози [22]. Проте результати наших досліджень свідчать, що ні вміст оксиду азоту, ні активність його синтаз не були пов'язані з такими характеристиками папілярних карцином, як властивість до метастазування та інвазії (див. табл. 2). За наявності хронічного тиреоїдиту в позапухлинній тканині, де система оксиду азоту суттєво активована [8], активність iNOS та вміст оксиду азоту в папілярних карциномах були навіть меншими порівняно з такими при відсутності тиреоїдиту, хоча дійсно відсоток метастатичних та інвазивних карцином за наявності хронічного тиреоїдиту у позапухлинній тканині був вищим, ніж у групі карцином

за відсутності останнього.

Ми не підтвердили думку щодо активації системи генерації оксиду азоту в великих пухлинах, але згідні з висновками, що утворення оксиду азоту відбувається інтенсивніше в папілярних карциномах хворих, старших за 40 років [14]. Відомо, що у пацієнтів з папілярними карциномами щитоподібної залози вік є одним з значимих чинників прогнозу. Цей критерій прийнятий до уваги у Класифікації раку щитоподібної залози за системою TNM (менше і більше ніж 45 років), а також у прогностичних системах AMES (менше і більше ніж 40 років у чоловіків і 45 років у жінок), AGES и MACIS (менше і більше ніж 40 років).

Зважаючи на роль оксиду азоту в процесах апоптозу цікаво було зіставити результати цього дослідження з тими, які були отримані раніше при вивченні деяких біохімічних механізмів реалізації програмованої загибелі клітин. Перше, що привертає увагу – це прогресуюче зниження вмісту оксиду азоту в папілярних карциномах зі збільшенням категорії пухлин (від T1 до T4) та зниження активності iNOS в тканині пухлин категорії T4 порівняно з пухлинами категорії T1-T3. У літературі свідчення про зміни інтенсивності спонтанного апоптозу залежно від стадії розвитку пухлин неоднозначні. Одні вважають, що на початкових етапах канцерогенезу пухлини характеризуються низькою інтенсивністю загибелі трансформованих клітин; вона підвищується разом з посиленням проліферативної активності на стадії прогресії. Інші дослідники відмічають, що зі зростанням розмірів пухлини інтенсивність спонтанного апоптозу знижується. Дані, що були отримані нами при дослідженні активності каспази-3 та трансмембранного потенціалу мітохондрій у папілярних карциномах щитоподібної залози підтверджують останнє [24, 25]. Вони узгоджуються також з тим, що у клітинах пухлин на початкових стадіях канцерогенезу спостерігається високий вміст вільних радикалів (які індукують

мітохондріальні механізми апоптозу [26], що у свою чергу призводить до активації каспази-3), тоді як у термінальну стадію росту пухлин їх концентрація суттєво знижується [27]. Частково це пояснюють наявністю зсуву метаболізму клітини у напрямку гліколізу, що характерно для злоякісних пухлин і посилюється впродовж їх прогресії [28]. Отже, цей фактор активації апоптозу (висока концентрація активних радикалів) у пухлинах на пізніх стадіях їх розвитку вже не відіграє такої важливої ролі. Висока активність iNOS в пухлинах T1-T3, зниження утворення оксиду азоту та його вмісту в папілярних карциномах категорії T4 відносно перших, а також негативний зв'язок між вмістом оксиду азоту та розміром пухлин вкладаються у ці висновки. До того ж встановлено, що оксид азоту бере участь у нітрозилуванні гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази, ферменту, що є медіатором TRAL-індукованого апоптозу у пухлинних клітинах. Нижчий вміст оксиду азоту в папілярних карциномах категорії T4 і, отже, зниження транслокації нітрозильованої форми гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази до ядра також може бути причиною гальмування апоптозу клітин в цих пухлинах [29].

Слід відмітити, що активність каспази-3 вища лише в неметастазуючих папілярних карциномах [25]; iNOS також активніша в таких пухлинах. Таким чином, простежується певний зв'язок між змінами в папілярних карциномах інтенсивності генерації оксиду азоту та його вмістом, з одного боку, та змінами активності каспази-3, з іншого. Крім того, в позапухлинній тканині з ознаками інвазії пухлинних клітин активність обох синтаз оксиду азоту та його вміст різко збільшені (див. табл. 1), а трансмембранний потенціал мітохондрій, виділених з таких пухлин, дуже низький [24]. Зазначені факти відповідають усталеній схемі ініціації мітохондріального шляху апоптозу під дією оксидного стресу (компонентом якого є оксид азоту), що призводить до зниження трансмембранного потенціалу мітохондрій, відкриття мітохон-

дріальних пор, вивільнення проапоптозних факторів і активації каспази-3.

Раніше ми відмічали, що низка показників, які характеризують біохімічні механізми апоптозу в щитоподібній залозі, дещо відрізняються залежно від особливостей її гістологічної будови, зокрема і будови пухлинної тканини. Так, в папілярних карциномах типової папілярної будови активність каспази-3 не відрізнялася від такої у незміненій тканині щитоподібної залози нормофолікулярної будови, тоді як вона була вищою в пухлинах фолікулярно-папілярної будови і нижчою в пухлинах гетерогенної будови з наявністю солідних ділянок [25]. Характер змін вмісту оксиду азоту в папілярних карциномах за таких характеристик їх будови, у цілому, узгоджується з характером змін активності каспази-3: підвищення вмісту оксиду азоту в пухлинах фолікулярно-папілярної будови порівняно з таким у карциномах типової папілярної будови, нижчий вміст оксиду азоту в пухлинах гетерогенної будови з наявністю ділянок солідної будови і низька активність iNOS в карциномах солідної будови. Отже, відсутність активації утворення оксиду азоту та відсутність підвищення його вмісту спостерігається в клітинах менш диференційованих пухлин (солідних чи фолікулярно-папілярних з солідними ділянками), які мають більш агресивний характер, а саме, високу частоту розповсюдження пухлинних клітин по залозі, екстратиреоїдний ріст, лімфатичну та кровеносну інвазію. Таким пухлинам притаманний низький потенціал щодо синтезу тиреоїдних гормонів за рахунок зниження диференціювання клітин та значне послаблення процесів блокування клітинного циклу на стадії переходу до S-фази. Інтенсивність апоптозу в цих пухлинах, з огляду на зазначене вище, може бути зниженою, тоді як підвищення активності каспази-3 та вмісту оксиду азоту в папілярних карциномах фолікулярно-папілярної будови може свідчити про активацію мітохондріальних механізмів апоптозу в карциномах такої будови.

Водночас у папілярних карциномах солідно-інсулярної будови оксид азоту синтезується, навпаки, найінтенсивніше. Папілярні карциноми з наявністю інсулярного компоненту є агресивними, для них характерне частіше екстракапсулярне розповсюдження, наявність метастазів до лімфовузлів і віддалених метастазів, підвищення кількості мітозів. Протилежний характер змін синтезу оксиду азоту в папілярних карциномах різної будови зі зниженою диференціацією пухлинних клітин (солідних чи папілярно-фолікулярно-солідних, а також солідно-інсулярних) свідчить про складність та неоднозначність біохімічних процесів, які відбуваються в клітинах цих пухлин, у т.ч. і за участю оксиду азоту.

Слід відмітити певну невідповідність у деяких випадках між змінами вмісту оксиду азоту та активності iNOS, що може бути пов'язано з участю цієї молекули в різноманітних внутрішньоклітинних реакціях, створенні різних за об'ємом депо, зокрема при включенні оксиду азоту в динітрозилні комплекси із залізом чи в S-нітрозотіоли [1], а також залученням інших шляхів її утворення [30]. Останнє, а саме активація більш потужного нітритредуктазного компонента ланцюга метаболічних перетворень оксиду азоту, може бути причиною суттєвого підвищення його вмісту в метастазах папілярної карциноми на фоні відсутності змін активності синтаз. Цей шлях активується при гіпоксії, за якої утворення оксиду азоту в реакції ферментативного окислення аргініну, що потребує кисень, гальмується [30]. Можливо, що за локальної гіпоксії підвищення вмісту оксиду азоту в метастазах відбувається саме за рахунок прямого відновлення нітриту за наявності гемопротейнів.

Таким чином, система генерації оксиду азоту бере участь у трансформації клітин щитоподібної залози та прогресії пухлинного росту. При цьому характер такої участі різниться в папілярних карциномах щитоподібної залози, які мають різну гістологічну будову, і

пов'язаний з запальними та/чи автоімунними процесами, що відбуваються в залозі.

**Е.В. Калініченко, Т.М. Мишуніна,
Н.Д. Тронько**

АКТИВНОСТЬ СИНТАЗ ОКСИДА АЗОТА И ЕГО КОНЦЕНТРАЦИЯ В ТКАНИ КАРЦИНОМ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЧЕЛОВЕКА

При исследовании активности конститутивной формы синтазы оксида азота (сNOS) установлено, что в папиллярных карциномах щитовидной железы она отвечает такой в неизменной внеопухолевой ткани, тогда как в фолликулярных карциномах она вдвое меньше. В то же время активность индуцибельной синтазы оксида азота (iNOS) выше как в папиллярных, так и в фолликулярных карциномах. Такие изменения активности ферментов синтеза оксида азота сопровождались повышенным его содержанием в папиллярных карциномах и незначительными изменениями в ткани фолликулярных. В образцах медулярных карцином изученные показатели отвечали таким в неизменной ткани, а в метастазах папиллярной карциномы на фоне отсутствия измененной активности ферментов образования оксида азота содержание его было значительно выше. Повышенное содержание оксида азота и активности iNOS в папиллярных карциномах щитовидной железы существенно не зависят от характеристик их агрессивности, однако такие изменения отсутствуют в опухолях категории T4 на фоне сниженной при этом активности сNOS, и менее выражены в опухолях, которые окружены тканью при наличии в ней хронического тиреоидита. Кроме того, в папиллярных карциномах папиллярного или фолликулярного строения содержание оксида азота не отличалось от нормы, оно было несколько выше в опухолях солидного или гетерогенного строения с наличием солидных участков, тогда как в карциномах папиллярно-фолликулярного строения оно в 2, а в опухолях солидно-инсулярного строения – в 3 раза выше. Повышенную активность iNOS наблюдали в карциномах разного строения, за исключением опухолей солидного строения, в которых активность фермента оказалась на уровне нормы, и в опухолях солидно-инсулярного строения, где она существенно (как и активность сNOS) выше по сравнению с опухолями иного строения. Система генерации оксида азота принимает участие в трансформации клеток щитовидной железы и прогрессии опухолевого роста, в т.ч. через регуляцию апоптоза, что видно из результатов анализа данных, полученных как в рамках выполнения настоящего исследования, так и ранее. При этом характер такого участия в папиллярных карциномах щитовидной железы, имеющих разное гистологическое строение, отличается.

Ключевые слова: оксид азота; конститутивная и индуцибельная синтазы оксида азота; карциномы щитовидной

железы; апоптоз.

**O. V. Kalinichenko, T. M. Myshunina,
M. D. Tron'ko**

NITRIC OXIDE SYNTHASE ACTIVITY AND ITS CONCENTRATION IN THE TISSUES OF HUMAN THYROID CARCINOMAS

The study of the activity of the constitutive form of nitric oxide synthase (cNOS) revealed that in the papillary thyroid carcinomas it corresponded to that detected in unchanged extratumoral tissue, while the enzyme activity in follicular carcinoma was half lesser. At the same time, the activity of inducible nitric oxide synthase (iNOS) was higher in the papillary and follicular carcinomas. Such changes in the enzyme activity were associated with an increase in its level in papillary carcinomas, and with minor changes in follicular carcinomas. In medullary carcinomas the parameters under study corresponded to those in unchanged tissue, and in the papillary carcinoma metastases without changes in enzyme activity of nitric oxide formation, the level of the latter was much higher. Elevated levels of nitric oxide and iNOS activity in papillary thyroid carcinomas did not depend significantly on the aggression characteristics of the latter, being however absent in tumors of T4 category on a background of reduced cNOS activity and less expressed in tumors surrounded by the tissue in the presence of a chronic thyroiditis. Furthermore, in the papillary carcinomas of papillary or follicular structure nitric oxide level did not differ from the normal range, being slightly higher in tumors of solid or heterogeneous structure with presence of solid areas, whereas in carcinomas of papillary-follicular structure it was twice, and in tissue of solid-insular structure three times higher. iNOS hyperactivity was observed in the carcinomas of different structure, except for tumors of solid structure, in the tumor of which enzyme activity was within the normal range, and in tumor of solid-insular structure where it was significantly higher (as well as cNOS activity) compared with tumors of other structure. Nitric oxide generating system is involved in the transformation of thyroid cells and progression of tumor growth, including through apoptosis regulation, as shown by the results of an analysis of data obtained both in the present study and previously. The nature of such involvement in papillary thyroid carcinomas with different histological structure is different.

Key words: nitric oxide; constitutive and inducible nitric oxide synthase; thyroid carcinoma; apoptosis.

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

REFERENCES

1. Burlaka AP, Sydoryk EP. Radical oxygen species and nitric oxide in tumor process. Kyiv: Naycova Dymka, 2006. [Ukrainian].
2. Poderoso J. The formation of peroxynitrite in the applied physiology of mitochondrial nitric oxide. Arch Biochem Biophys. 2009; 484(2): 214-20.
3. Napoli C, Paolisso G, Casamassimi A, Al-Omran M, Barbieri M, Sommese L, Infante T, Ignarro L. Effects of nitric oxide on cell proliferation. J Amer College of Cardiol. 2013; 62(2): 89-95.
4. Kandor VI. Autoimmune thyroid disease and apoptosis. Probl Endocrinol. 2002; 48(1): 45-8. [Russian].
5. Fortunato R, Ferreira A, Hecht F, Dupuy C, Carvalho D. Sexual dimorphism and thyroid dysfunction: a matter of oxidative stress? J Endocrinol. 2014; 221(2): R31- R40.
6. Bauer J, Frye G, Bahr A, Gieg J, Brofman P. Anti-tumor effects of nitrosylcobalamin against spontaneous tumors in dogs. Invest New Drugs. 2010; 28(5): 694-702.
7. Melisi D, Rosso F, Curcio A, Tortora C, Nieddu M, Marino G, Lettieri M, Grimaldi A, Luongo E, Romano S, Romano M, Boatto G, Abignente E, Barbarisi A, Rimoli M. Galactosyl derivative of N(omega)-nitro-L-arginine: study of antiproliferative activity on human thyroid follicular carcinoma cells. J Cell Physiol. 2009; 221(2): 440-7.
8. Mishunina TM, Kalinichenko OV, Tron'ko MD, Zurnadzhi LYu. Systems for the generation of nitric oxide in the tissues of the thyroid gland with lymphoid infiltration or chronic thyroiditis. J Acad Med Sci Ukraine. 2015; 21(1): 115-21. [Ukrainian].
9. Mishunina TM, Kalinichenko OV, Tron'ko MD, Zurnadzhi LYu. Nitric oxide and enzymes its synthesis in the tissue of the thyroid benign formations. J Acad Med Sci Ukraine. 2015; 21(3): 42-7. [Ukrainian].
10. Kalinichenko OV, Mishunina TM, Tron'ko MD, Zurnadzhi LYu. Level of nitric oxide and its synthases activity in the thyroid tissues of patients with Graves' disease. Endocrin. 2015; 20(3): 582-9. [Ukrainian].
11. Green L, Wagner D, Glogowski J. Analysis of nitrate, nitrite, and ¹⁵N nitrate in biological fluids. Anal Biochem. 1982; 126(1): 131-8.
12. Gula NM, Kosyakova GB, Berdyshev AG. Effect of N-sterolethanolamine on the path of NO-synthase generate of nitric oxide in the aorta and heart of rats with diabetes. Ukr Biochem J. 2007; 79(5): 153-8. [Ukrainian].
13. LoFaro M, Fox B, Whatmore J, Winyard P, Whiteman M. Hydrogen sulfide and nitric oxide interactions in inflammation. Nitric Oxide. 2014; 41: 38-47.
14. Kim K, Kim S, Kim S, Back J, Park M, Kim J. Cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression in thyroid neoplasms and their clinicopathological correlation. J Korean Med Sci. 2006; 21(6): 1064-9.
15. Mardente S, Zicari A, Consorti F, Mari E, Di Vito M, Leopizzi M, Della Rocca C, Antonaci A. Cross-talk between NO and HMGB1 in lymphocytic thyroiditis and papillary thyroid cancer. Oncol Rep. 2010; 24(6): 1455-61.
16. Choe W, Kim S, Hwang T, Lee S. Expression of inducible nitric oxide synthase in thyroid neoplasms: immunohistochemical and molecular analysis. Pathol Int. 2003; 53(7): 434-9.
17. Donckier J, Michel L, Delos M, Havaux X, Van Beneden R. Interrelated overexpression of endothelial and induc-

- ible nitric oxide synthases, endothelin-1 and angiogenic factors in human papillary thyroid carcinoma. Clin Endocrinol (Oxf). 2006; 64(6): 703-10.
18. Nose F, Ichikawa T, Fujiwara M, Okayasu I. Up-regulation of cyclooxygenase-2 expression in lymphocytic thyroiditis and thyroid tumors: significant correlation with inducible nitric oxide synthase. Am J Clin Pathol. 2002; 117(4): 546-51.
 19. Patel A, Fenton C, Terrell R, Powers PA, Dinauer C, Tuttle RM, Francis GL. Nitrotyrosine, inducible nitric oxide synthase (iNOS), and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) are increased in thyroid tumors from children and adolescents. J Endocrinol Invest. 2002; 25(8): 675-83.
 20. Kayser L, Francis D, Broholm H. Immunohistochemical localization of inducible and endothelial constitutive nitric oxide synthase in neoplastic and autoimmune thyroid disorders. APMIS. 2000; 108(11): 785-91.
 21. Förstermann U., Sessa W. Nitric oxide synthases: regulation and function. Eur Heart J. 2012; 33(7): 829-37.
 22. Yasuoka H, Kodama R, Hirokawa M, Takamura Y, Miyauchi A, Sanke T, Nakamura Y. CXCR4 expression in papillary thyroid carcinoma: induction by nitric oxide and correlation with lymph node metastasis. BMC Cancer. 2008; 8: 274.
 23. Scarpino S, D'Alena F, Di Napoli A, Ballarini F, Prat M, Ruco L. Papillary carcinoma of the thyroid: evidence for a role for hepatocyte growth factor (HGF) in promoting tumour angiogenesis. J Pathol. 2003; 199(2):243-50.
 24. Myshunina TM, Kalinichenko OV, Tron'ko MD, Zurnadzhi LYu. Characteristic of changes mitochondrial membrane permeability of papillary thyroid cancer tissue and thyroid tissue in presence of cancer cells invasion. J Acad Med Sci Ukraine. 2010; 16(5): 5-22. [Ukrainian].
 25. Mishunina TM, Kalinichenko OV, Tronko MD., Statsenko OA. Caspase-3 activity in papillary thyroid carcinomas. \ Exp Oncol. 2010. 32(4): 1-4.
 26. Ramsey M, Sharpless N. ROS as a tumor suppressor? Nat Cell Biol 2006; 8: 1213-4.
 27. Baraboy VA. Biooxidants. Kyiv: Knyha plus, 2006. [Russian].
 28. Mishunina TM. Mechanisms, advantages, and consequences of glycolysis activation in tumoral cells. J Acad Med Sci Ukraine. 2009; 15(3): 1-32. [Ukrainian].
 29. Du Z, Wang H, Zhang H, Gao D. Involvement of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated death of thyroid cancer cells. Endocrinol. 2007; 148(9): 4352-61.
 30. Lundberg J, Weitzberg E. The biological role of nitrate and nitrite: the times they are a-changin'. Nitric Oxide. 2010; 22(2): 61-3.

*Матеріал надійшов
до редакції 17.12.2015*