

В. Г. Истратов, С. И. Сулейманов // Урология и нефрология. — 2006. — № 5. — С. 98-101.

7. *Комплексне лікування і реабілітація хворих сечокам'яною хворобою методом екстракорпоральної ударнохвильової літотрипсії*: метод. рекомендації. — Львів, 1994.

8. Куріліна Т. В. Стан глутатионової антиоксидантної системи у доношених немовлят, народжених від матерів зі звичним невиношуванням вагітності ендокринного генезу / Т. В. Куріліна // Перинатология и педиатрия. — 2006. — № 1. — С. 27-30.

9. Мельник В. А. Особенности обмена щавелевой кислоты при рас-

стройствах тонкокишечного переваривания и всасывания у детей с синдромом мальабсорбции и кожными проявлениями аллергии / В. А. Мельник, А. И. Мельник // Аллергические заболевания у детей: современные проблемы диагностики, терапии и реабилитации: науч.-практ. конф.: материалы. Новосибирск, декабрь, 1998. — Новосибирск, 1998. — С. 160-169.

10. *Метаболизм щавелевой кислоты в норме и при мочекаменной болезни* / Ю. Е. Вельтищев, А. Э. Юрьева, И. В. Казанская, Е. К. Каблукова // Урология и нефрология. — 1985. — № 3. — С. 64-70.

11. Сайдакова Н. А. Основні показники урологічної допомоги в Україні за 2006–2007 роки / Н. А. Сайдакова, Л. М. Старцева, Н. Г. Кравчук. — К.: МОЗ України, 2008. — С. 113-115.

12. *Effect of cyclosporine on liver antioxidants and the protective role of vitamin E in hyperoxaluria in rats* // J. of Pharmacy and Pharmacology. — 1998, May. — Vol. 50, N 5. — P. 501-505.

13. Siener R. The Effect of Different Diets on Urine Composition and the Risk of Calcium Oxalate Crystallisation in Healthy Subjects / R. Siener, A. Hesse // European Urology. — 2002. — Vol. 42. — P. 289-296.

УДК 612.017:547.367:577.115.4

В. О. Ратушенко

## ВПЛИВ L-ТИРОКСИНУ НА СУЛЬФІДРИЛЬНІ І ДИСУЛЬФІДНІ ГРУПИ СИРОВАТКИ КРОВІ *IN VITRO* У ХВОРИХ НА АДЕНОМИ І РАК ЩИТОПОДІБНОЇ ЗАЛОЗИ

Одеський державний медичний університет

Наукові роботи, присвячені пошуку різноманітних факторів ризику новоутворень щитоподібної залози (ЩЗ), залишаються актуальними в експериментальній та клінічній медицині [1]. Підставою для вивчення впливу L-тироксину на сульфідрильні (-SH) і дисульфідні (-S-S-) групи сироватки крові *in vitro* у хворих на аденоми і рак ЩЗ були дані літератури про їх важливу роль у механізмах гормональної регуляції, у тому числі і метаболічних процесів [2–4].

Тіолові сполуки низької молекулярної маси, які містять -SH групи, обґрунтовано зараховують до універсальних антимутагенів, але є повідомлення, які свідчать і про мутагенну дію цих сполук [5], що пояснюється особливостями їх біологічних властивостей [6; 7]. Дотепер залишається відкритим питання щодо імунобіологічних властивостей білків сироваток крові хво-

рих на аденоми і рак ЩЗ. В експериментальних дослідженнях *in vitro* встановлено, що функціонування білкових і небілкових -SH і -S-S- груп в імунних реакціях антиген-антитіло суттєво відрізняється від аналогічного при неспецифічних реакціях [8; 9]. Незважаючи на те, що при порушенні тиреоїдного статусу L-тироксин є одним із найважливіших лікувальних препаратів [10], поки ще не знайдена відповідь відносно його впливу на функціонування білкових і небілкових -SH і -S-S- груп. Природно, виникає питання чи можна визначити імунобіологічні властивості білків сироваток крові за показниками зміни вмісту білкових і небілкових -SH і -S-S- груп сироваток крові до і після їх навантаження L-тироксинам *in vitro*.

**Мета** роботи — вивчити особливості функціонування білкових і небілкових -SH і -S-S- груп сироваток крові до і

після їх навантаження L-тироксинам *in vitro* і з'ясувати клінічне значення цих показників у хворих на аденоми і рак ЩЗ.

### Матеріали та методи дослідження

До відкритого контрольованого обстеження включено 100 хворих із новоутвореннями ЩЗ, що перебували на стаціонарному лікуванні у відділенні пухлин голови та шиї Одеського обласного онкологічного диспансеру. За клінічними проявами, даними рентгенографії, комп'ютерної томографії, УЗ-діагностики, а також гістологічними та цитологічними ознаками новоутворень ЩЗ усі пацієнти були розподілені на дві клінічні групи. У першу включено 81 хворого на рак ЩЗ (РАК ЩЗ), із них у 68 пацієнтів було верифіковано вискодиференційований рак ЩЗ (ВДР ЩЗ) і у 13 пацієнтів — низкодиференційований рак ЩЗ (НДР ЩЗ). У другу гру-



пу включено 19 хворих на доброякісні новоутворення ЩЗ (ДН ЩЗ), які верифіковано як аденоми ЩЗ (АД ЩЗ). Для з'ясування референтних значень показників, що вивчаються, обстежена контрольна група — 100 практично здорових добровольців і донорів крові, у яких за даними клінічних, інструментальних і лабораторних досліджень не було ознак новоутворень (КГД).

У дослідженнях використовувалася венозна кров без антикоагулянту, взяття якої здійснювали загальноприйнятим методом із ліктьової вени, натщесерце. Потім центрифугували при 1000 об/хв протягом 20 хв, відокремлювали згусток і отримували сироватку крові (СК). Підготовку реакційних сумішей СК + L-тироксин проводили, як описано в роботі [8]. Для цього в лунки імунологічних планшетів вносили 450 мкл СК КГ донорів (СК<sub>КГД</sub>), хворих на АД ЩЗ (СК<sub>АД ЩЗ</sub>) і хворих на РАК ЩЗ (СК<sub>РАК ЩЗ</sub>) і в кожен з них додавали по 50 мкл розчину L-тироксину, інкубували при температурі 37 °С протягом 60 хв і одержували такі реакційні суміші: СК<sub>КГД</sub> + L-тироксин; СК<sub>АД ЩЗ</sub> + L-тироксин; СК<sub>РАК ЩЗ</sub> + L-тироксин. Використовували L-тироксин виробництва BERLIN-CHEMIE AG (Реєстраційне посвідчення в Україні № П.05.03 / 06810). Кінцеву молярну концентрацію L-тироксину в реакційних сумішах підібрано дослідним шляхом, вона становила 8,6 мкмоль.

Вміст білкових і небілкових -SH груп в СК і РС визначали методом зворотного амперметричного титрування [2] в модифікації [8]. Аналогічним методом досліджено вміст -S-S- груп, але після попереднього розщеплення дисульфідних зв'язків насиченим розчином сульфату натрію, як описано в роботі [2]. Небілкову фракцію СК отримували шляхом її депротейнізації розчином метафосфорної кислоти (10 %). За співвідношенням між вмістом відновних

(-SH) і окиснених (-S-S-) груп розраховували білковий і небілковий тиол-дисульфідні коефіцієнти (SH/SS-коефіцієнт, абс.), значення яких відображають окисно-відновну рівновагу R-SH ↔ R-S-S-R у тиолдисульфідній системі (ТДС) [2; 4; 11; 14].

Унаслідок відповідності вибірок нормальному розподілу Гауса порівняння вибірових середніх величин (M±m) проводили з використанням t-критерію Стюдента з урахуванням рівня вірогідності відмінностей між показниками різних груп. За рівень статистичної значущості приймали P<0,05.

### Результати дослідження та їх обговорення

Згідно з даними табл. 1, у реакційній суміші СК<sub>КГД</sub> + L-тироксин вміст вільних білкових -SH груп був вірогідно вищим, кількість білкових -S-S- груп — нижчою і білковий SH/SS-коефіцієнт — вищим порівняно з аналогічними показниками в СК<sub>КГД</sub> до інкубації з L-тироксином. У реакційних сумішах СК<sub>АД ЩЗ</sub> + L-тироксин і СК<sub>РАК ЩЗ</sub> + L-тироксин, навпаки, зареєстроване вірогідне зменшення

вмісту вільних білкових -SH груп, збільшення кількості білкових -S-S- груп і зниження білкового SH/SS-коефіцієнта порівняно з аналогічними показниками в СК<sub>АД ЩЗ</sub> і СК<sub>РАК ЩЗ</sub> до інкубації з L-тироксином.

Згідно з даними табл. 2, встановлено, що в реакційній суміші СК<sub>КГД</sub> + L-тироксин вміст вільних небілкових -SH груп вірогідно вищий, кількість небілкових -S-S- груп — нижча і небілковий SH/SS-коефіцієнт нижчий порівняно з аналогічними показниками в СК<sub>КГД</sub> до інкубації з L-тироксином. У реакційній суміші СК<sub>АД ЩЗ</sub> + L-тироксин, навпаки, виявлено вірогідне збільшення вмісту небілкових -SH груп і підвищення небілкового SH/SS-коефіцієнта порівняно з аналогічними показниками СК<sub>АД ЩЗ</sub> до інкубації з L-тироксином, а кількість небілкових -S-S- груп хоча і була дещо нижчою, але не досягала рівня статистичної значущості відмінностей. У реакційній суміші СК<sub>РАК ЩЗ</sub> + L-тироксин виявлено вірогідне збільшення кількості небілкових -SH груп, зменшення -S-S- груп і підвищення небілкового SH/SS-коефіцієнта порівняно з аналогічними по-

Таблиця 1

Вміст білкових -SH і -S-S- груп (мкмоль/л), білковий SH/SS-коефіцієнт (абс.) у сироватках крові до і після інкубації з L-тироксином *in vitro*, M±m

Досліджуваний біоматеріал	-SH	-S-S-	SH/SS
СК <sub>КГД</sub> , n=100	581,0±3,8	129,0±3,0	4,58±0,11
СК <sub>КГД</sub> + L-тироксин, n=100	603,0±4,0 P<0,05	101,0±3,1 P<0,05	6,13±0,20 P<0,05
СК <sub>АД ЩЗ</sub> , n=19	507,0±28,6 P <sub>1</sub> <0,05	153,0±10,5 P <sub>1</sub> <0,05	3,36±0,23 P <sub>1</sub> <0,05
СК <sub>АД ЩЗ</sub> + L-тироксин, n=19	383,0±29,7 P<0,05	247,0±15,8 P<0,05	1,57±0,15 P<0,05
СК <sub>РАК ЩЗ</sub> , n=81	398,0±17,0 P <sub>1</sub> <0,05 P <sub>2</sub> <0,05	234,0±14,4 P <sub>1</sub> <0,05 P <sub>2</sub> <0,05	1,95±0,24 P <sub>1</sub> <0,05 P <sub>2</sub> <0,05
СК <sub>РАК ЩЗ</sub> + L-тироксин, n=81	323,0±17,3 P<0,05	293,0±16,4 P<0,05	1,25±0,14 P<0,05

Примітка. У табл. 1 і 2: P — вірогідність відмінностей порівняно з аналогічними показниками до інкубації сироваток крові з L-тироксином; P<sub>1</sub> — порівняно з аналогічними показниками у КГД; P<sub>2</sub> — порівняно з аналогічними показниками у хворих на АД ЩЗ.



Таблиця 2

**Вміст небілкових -SH і -S-S- груп (мкмоль/л),  
небілковий SH/SS-коефіцієнт (абс.) у сироватках крові  
до та після інкубації з L-тироксинам *in vitro*, M±m**

Досліджуваний біоматеріал	-SH	-S-S-	SH/SS
СК <sub>КГД</sub> , n=100	0,38±0,01	45,3±1,2	0,0090±0,0003
СК <sub>КГД</sub> + L-тироксин, n=100	0,18±0,01 P<0,05	50,6±1,4 P<0,05	0,0040±0,0002 P<0,05
СК <sub>АД щЗ</sub> , n=19	8,20±0,97 P <sub>1</sub> <0,05	36,3±2,3 P <sub>1</sub> <0,05	0,23±0,03 P <sub>1</sub> <0,05
СК <sub>АД щЗ</sub> + L-тироксин, n=19	23,33±2,16 P<0,05	25,3±1,5 P<0,05	0,93±0,09 P<0,05
СК <sub>РАК щЗ</sub> , n=81	25,04±1,78 P <sub>1</sub> <0,05 P <sub>2</sub> <0,05	32,9±1,4 P <sub>1</sub> <0,05 P <sub>2</sub> >0,05	0,84±0,10 P <sub>1</sub> <0,05 P <sub>2</sub> <0,05
СК <sub>РАК щЗ</sub> + L-тироксин, n=81	44,12±2,18 P<0,05	23,27±1,21 P<0,05	2,11±0,23 P<0,05

казниками в СК<sub>РАК щЗ</sub> до інкубації з L-тироксинам (див. табл. 2).

Перш за все, необхідно зупинитися на даних, отриманих при обстеженні КГ донорів до інкубації з L-тироксинам. Так, закономірності функціонування білкових і небілкових -SH і -S-S- груп у сироватці крові КГ донорів до інкубації з L-тироксинам можна пояснити структурними властивостями атома сірки в білках і низькомолекулярних тіолах (глутатіону, цистеїну, гомоцистеїну та ін.), незначною «міграцією» їх із клітин у периферичну кров, де вони утворюють змішані дисульфідні з білками (R-S-S-P) і дисульфідні низької молекулярної маси (R-S-S-R) [6; 7; 11–14].

На підставі даних літератури можна зробити висновок, що в сироватці крові КГ донорів до інкубації з L-тироксинам відзначається збалансоване функціонування системи R-SH ↔ R-S-S-R. Це побічно свідчить про стабільний структурно-функціональний стан білків і низькомолекулярних сполук, які містять ці функціональні групи, а також про незначний рівень їх міграції з клітин у периферичну кров. Отримані результати збігаються з даними інших авторів [2; 8], і тому їхнє значення було прийнято за фізіологічні показники.

Порушення вмісту білкових і небілкових -SH і -S-S- груп у сироватці крові КГ донорів і хворих із новоутвореннями ЩЗ після інкубації з L-тироксинам свідчать про зміни структурно-функціонального стану білків і можуть опосередковуватися їхніми конформаційними перебудовами, зміною іонного оточення і гідрофобними взаємодіями, що не суперечить даним літератури [2; 13; 14]. Ці автори встановили, що конформаційні перебудови білків супроводжуються процесами «маскування» або «демаскування» -SH груп, порушенням внутрішньо- і міжмолекулярних -S-S- зв'язків, а також змішаних дисульфідних зв'язків між низькомолекулярними тіолами з білками (R-S-S-P) та власне дисульфідів низької молекулярної маси (R-S-S-R). Більш детальний аналіз цих процесів буде проведено в наступних роботах, тому що для поглибленого вивчення механізму зазначених порушень необхідно застосування різноманітних реагентів і методів для визначення -SH і -S-S- груп, наприклад таких, які наведені в роботах [2; 14].

Проте отримані результати наочно демонструють, що вплив L-тироксинам на білкові і низькомолекулярні тіоли супроводжується порушенням співвід-

ношення між відновними (-SH) і окисненими (-S-S-) групами у цих сполуках. Важливо зазначити, що особливості їх функціонування в реакційній суміші СК<sub>КГД</sub> + L-тироксин по суті були аналогічні тим, які ми спостерігали в модельних дослідах *in vitro* при неспецифічному пошкодженні білків антигенами, а в реакційних сумішах СК<sub>РАК щЗ</sub> + L-тироксин і СК<sub>АД щЗ</sub> + L-тироксин — аналогічні тим, які ми спостерігали в модельних дослідах *in vitro* при імунному ушкодженні білків у реакції антиген-антитіло, що наведено в попередніх наших роботах [8; 9]. У зв'язку з чим значення показників вмісту білкових і небілкових -SH і -S-S- груп, білкового і небілкового SH/SS-коефіцієнтів у реакційній суміші СК<sub>КГД</sub> + L-тироксин можна розглядати як лабораторні критерії неспецифічного ушкодження білків, а в реакційних сумішах СК<sub>АД щЗ</sub> + L-тироксин і СК<sub>РАК щЗ</sub> + L-тироксин — імунного їх ушкодження. На нашу думку, ці показники доцільно використовувати в онкології як додаткові тести для визначення імунобіологічних властивостей білків та імунного їх ушкодження L-тироксинам у хворих із новоутвореннями ЩЗ.

## Висновки

1. Інкубація сироваток крові контрольної групи донорів із L-тироксинам *in vitro* супроводжується підвищенням вмісту білкових -SH і небілкових -S-S- груп, зниженням кількості небілкових -SH і білкових -S-S- груп, підвищенням білкового і зниженням небілкового SH/SS-коефіцієнтів порівняно з аналогічними показниками до інкубації.

2. Інкубація сироваток крові хворих на аденоми і рак ЩЗ з L-тироксинам *in vitro*, навпаки, супроводжується зниженням вмісту білкових -SH і небілкових -S-S- груп, підвищенням кількості небілкових -SH і білкових -S-S- груп, зниженням білкового і підвищенням не-



білкового SH/SS-коефіцієнтів порівняно з аналогічними показниками до інкубації.

3. Обґрунтовано, що значення цих показників у сироватках крові після інкубації сироваток крові з L-тироксином *in vitro* свідчить про неспецифічне ушкодження білків у контрольній групі донорів і про імунне їх ушкодження у хворих на аденоми і рак ЩЗ, тому їх доцільно визначати як додаткові лабораторні тести для оцінки імунобіологічних властивостей білків та імунного їх ушкодження L-тироксином.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Пушкарьов В. М. Молекулярно-генетичні механізми утворення злоякісних пухлин щитоподібної залози (огляд літератури) / В. М. Пушкарьов, О. І. Ковзун, М. Д. Тронько // Журнал НАМН України. — 2009. — Т. 15, № 1. — С. 116-127.
2. Соколовский В. В. Тиолдисульфидное соотношение крови как показатель состояния неспецифической резистентности организма / В. В. Соколовский. — СПб. : МАПО, 1996. — 33 с.
3. Шпаков А. О. Роль сульфгидрильных групп в функционировании аденилатциклазной сигнальной системы / А. О. Шпаков // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. — 2002. — Т. 38, № 1. — С. 97-107.
4. Ziegler D. M. Role of reversible oxidation-reduction of enzyme thiols-disulfides in metabolic regulation / D. M. Ziegler // Annual. Rev. Biochem. — 1985. — Vol. 54. — P. 305-329.
5. Ранчялис В. П. «Парадоксальное» действие тиоловых соединений / В. П. Ранчялис, Л. С. Бальчюнене // Вестник Российской академии мед. наук. — 1995. — № 1. — С. 44-48.
6. Кулинский В. И. Система глутатиона. I. Синтез, транспорт, глутатионтрансферазы, глутатионпероксидазы / В. И. Кулинский Л. С. Колесниченко // Биомедицинская химия. — 2009. — Т. 55, вып. 3. — С. 255-277.
7. Кулинский В. И. Система глутатиона. II. Другие ферменты, тиол-дисульфидный обмен, воспаление и иммунитет, функции / В. И. Кулинский, Л. С. Колесниченко // Биомедицинская химия. — 2009. — Т. 55, вып. 4. — С. 365-379.
8. Костюшов В. В. Комплекс для иммуноанализа биологических реакций по тиолсодержащим анализам в реакционных средах / В. В. Костюшов, Л. А. Костюшова, Ю. П. Сахно [и др.] // Вісник морської медицини. — 2001. — № 3. — С. 72-76.
9. Юрлова Л. В. Стан тиолдисульфідної системи при білок-білкових взаємодіях в імунних і неімунних реакціях *in vitro* / Л. В. Юрлова, Н. В. Костюшова, І. І. Бокал [та ін.] // Досягнення біології та медицини. — 2006. — № 1. — С. 66-70.
10. Фадеев В. В. Диагностика и лечение токсического зоба / В. В. Фадеев // Рус. мед. журнал. — 2002. — Т. 10, № 11. — С. 513-516.
11. Cysteine/cystine couple is a newly recognized node in the circuitry for biologic redox signaling and control / J. P. Jones, Y. M. Go, C. L. Anderson [et al.] // FASEB Journal. — 2004. — Vol. 18, N 11. — P. 1246-1248.
12. Шевченко О. П. Гомоцистеин / О. П. Шевченко, Г. А. Олефиренко, Н. В. Червякова. — М. : Реафарм, 2002. — 48 с.
13. Reduced, oxidized and protein-bound forms of homocysteine and other aminothiols in plasma comprise the redox thiol status — a possible element of the extracellular antioxidant defense system / P. M. Ueland, M. A. Mansoor, A. B. Guttormsen [et al.] // J. Nutr. — 1996. — Vol. 126, N 4 (Suppl.). — P. 1281-1284.
14. Торчинский Ю. М. Сера в белках / Ю. М. Торчинский. — М. : Наука, 1977. — 303 с.

