 Для заказа доставки данной работы воспользуйтесь поиском на сайте по ссылке: <http://www.mydisser.com/search.html>

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ’Я УКРАЇНИ

**ЛУГАНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**

**КОМАРЕВЦЕВА КАТЕРИНА ВІТАЛІЇВНА**

УДК 616.441-006-089

**Клініко-біохімічний аналіз рівнЯ апоптозу та його регуляторів у діагностиці вузлових захворювань щитоподібної залози**

14.01.32 – медична біохімія

**А В Т О Р Е Ф Е Р А Т**

**дисертації на здобуття наукового ступеня**

**кандидата медичних наук**

**Луганськ - 2009**

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Луганському державному медичному університеті Міністерства охорони здоров’я України.

**Науковий керівник**  доктор медичних наук

**Ларін Олександр Сергійович,**

директор Українського наукового центру ендокринної хірургії, трансплантації органів і тканин МОЗ України.

**Офіційні опоненти:** доктор медичних наук, професор

**Кульчицький Олег Костянтинович**,

Інститут геронтології АМН України,

завідувач лабораторії регуляції метаболізму;

доктор медичних наук, професор

**Савченкова Лариса Василівна**,

Луганський державний медичний університет,

завідувач кафедри клінічної фармакології та фармакотерапії.

Захист відбудеться « 16 » жовтня 2009 р. о 1400 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 29.600.03 при Луганському державному медичному університеті за адресою: 91045, м. Луганськ, кв. 50-річчя Оборони Луганська, 1г).

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Луганського державного медичного університету МОЗ України (91045, м. Луганськ, кв. 50-річчя Оборони Луганська, 1г).

Автореферат розіслано « 12 » вересня 2009 р.

**Вчений секретар**

**спеціалізованої вченої ради,**

**кандидат біологічних наук І. А. Вишницька**

**ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ**

**Актуальність теми.** Серед сучасних медико-соціальних проблем однією з найважливіших є захворювання щитоподібної залози. За даними ВООЗ, на Земній кулі зареєстровано близько 300 мільйонів хворих на зоб [De Martino E. et al., 2008; Dal Maso L., 2009]. Сумарна частота різних форм тиреопатій складає не менше 20%, а в ендемічних на зоб областях ця цифра перевищує 50% [Kasagi K., 2007; Zimmermann M.B., 2008].

Вузлові утворення щитоподібної залози (ЩЗ) у клінічній практиці прийнято поєднувати в групове поняття „вузловий зоб” [Черенько С.М., 2006; Kameyama K. et al., 2007; Klein M. and Brunaud L., 2008]. Уточнення природи вузлів, дозволяє виділити в цій групі різні форми вузлового колоїдного чи паренхіматозного зоба (гіпер-, гіпо- чи еутиреоїдного), а також тиреоїдити, рідше – пухлини й деякі інші захворювання щитоподібної залози, що можуть супроводжуватися формуванням вузлів у її тканині [Ларін О.С., 2006; Uchino S. and Noguchi S., 2007; Leenhardt L., 2009].

Збільшення кількості хворих значною мірою відбувається за рахунок вузлових форм зоба й диференційованого раку [Stockli R., 2007; Reiners C. et al., 2008]. Багато дослідників повідомляють про 4 – 5-кратне збільшення за останні роки кількості хворих з вузловими захворюваннями щитоподібної залози [Klein M. and Brunaud L., 2008; Moalem J. et al., 2008]. Частота вузлового зоба, за даними епідеміологічних клінічних досліджень, у регіонах з достатнім споживанням йоду в осіб, старших 15 років, складає 3 – 9% (у дітей – одиничні випадки). При дефіциті йоду вона досягає в дорослих 16%, причому в осіб віком 56 – 75 років – 23,4% [Kasagi K., 2007; Kopp P. et al., 2008].

У Луганській області є мозаїчно розташовані йоддефіцитні регіони (частота зоба, за даними ультразвукового дослідження, – 12-15%) [Тимченко А.М., Місюра К.В., 2007].

Вузловий зоб – один з найбільш частих різновидів патології щитоподібної залози, що диктує необхідність ясного розуміння етіології, пато- і морфогенезу вузлових утворень щитоподібної залози [Montone K.T. et al., 2008; Westhoff C.C. et al., 2008; Fiore E. et al., 2009].

У здоровому дорослому організмі клітинний гомеостаз підтримується за рахунок балансу між клітинною загибеллю і проліферацією [Nagata S., 2000; Cvejic D. et al., 2009]. Установлено, що порушення процесу клітинної загибелі є важливою ланкою патогенезу багатьох захворювань людини. Супресія, чи гіперекспресія мутації генів, що контролюють апоптоз, призведуть до активації чи інгібіції цього процесу [Белушкіна Н.Н. та ін., 1998. 2001; Subramanian M. et al., 2009].

Особливе значення при вивченні апоптозу на сьогодні надається можливостям використання таргетної терапії з метою модулювання цього виду клітинної загибелі [Циган В.Н. та ін., 1996; Stojanović J. et al., 2009]. Для захворювань, пов'язаних із пригніченням апоптозу (пухлини), розробляються методи, здатні активізувати цей процес, а у випадках прискореного апоптозу (проліферативні процеси) – пригнічувати його. Ідеальним рішенням проблеми може бути можливість модулювання рівня апоптозу.

Феномен апоптозу є результатом дії різних чинників, що призводять до загибелі клітини. Оскільки апоптоз – фізіологічне явище, то в організмі повинні бути фактори, що призводять як до апоптозу клітини, так і до його активації чи пригнічення [Sartorius U. et al., 2001; Park S.Y. et al., 2002].

Необхідною умовою проліферації є збільшення об’єму клітини, але в той же час це створює передумови для активації апоптозу [Gulbins E. et al., 2000; Bortner C. D. and Cidlowski J. A., 2002]. Як бачимо, такий ефект спрямований на створення умов для швидкої елімінації шляхом апоптозу неповноцінних клітин, що можуть утворитися в процесі мітозу.

Об’єм-регулюючі механізми клітини запускаються великою кількістю внутрішньоклітинних сигнальних чинників, включаючи зміни потенціалу мембрани клітини й внутрішньоклітинного складу іонів, різні каскади вторинних посередників і зміну експресії генів.

Інакше кажучи, рівень апоптозу в тканинах, зокрема щитоподібної залози, цілком може служити діагностичним маркером вузлових утворень і прогностичним чинником їхньої можливої малігнізації чи рецидиву, що визначає хірургічну стратегію у виборі об’єму оперативного втручання.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Роботу виконано в рамках державної бюджетної теми МОЗ України: «Механізми апоптозу в культурах клітин та репараційні процеси у тканинах» (№ державної реєстрації 0107U001159).

**Мета і завдання дослідження.** Вивчити біохімічні ознакиапоптозу, його маркерів і модуляторів у тканинах щитоподібної залози у хворих на вузлові захворювання щитоподібної залози для розробки діагностичного алгоритму вузлової тиреоїдної патології.

Зазначена мета передбачає розв’язання таких **завдань**:

1. Проаналізувати структуру вузлової тиреоїдної патології: вузлового зобу, багатовузлового зобу, вузлової форми хронічного аутоімунного тиреоїдита Хашимото, рака щитоподібної залози в зіставленні з рівнем апоптозу за біохімічною детекцією ДНК-фрагментації, ДНК-електрофорезу, Хехст-типуванню.
2. Дослідити генетичні маркери апоптозу (p53, bcl-2) і антиген ядер проліферуючих клітин (PCNA) у хворих на вузлові захворювання щитоподібної залози.
3. Вивчити метаболізм оксиду азоту, експресію судинного ендотеліального чинника росту і сфінгозину в резектованій ненодулярній і нодулярній тканині щитоподібної залози у хворих на вузлову тиреоїдну патологію.
4. Установити роль альтерації клітинного об’єму в розвитку апоптозу при вузлових захворюваннях щитоподібної залози (за даними МР-томографії і ЯМР-релаксометрії).
5. Розробити діагностичний алгоритм нозологічних форм вузлових захворювань щитоподібної залози за активністю апоптозу, його маркерів, модуляторів, а також за показниками ЯМР-релаксометрії.

**Об'єкт дослідження:** вогнищеві захворювання щитоподібної залози у людини (вузловий зоб, багатовузловий зоб, вузлова форма аутоімунного тиреоїдиту Хашимото, рак щитоподібної залози).

**Предмет дослідження:** біохімічні показники апоптозу, його індукторів і модуляторів; чинники проліферації й ангіогенезу вузлової тканини.

**Методи дослідження:** спектрофотометричний, електрофорез, імуноферментний, диференціальне центрифугування, тонкошарова хроматографія, ЯМР-релаксометрія, МР-томографія, флуоресцентна мікроскопія та статистичні.

**Наукова новизна отриманих результатів.** Уперше вірогідно доведено, що вузлова патологія щитоподібної залози і непухлинного, і пухлинного ґенезу з біохімічної точки зору характеризується гнобленням апоптозу у вузлах на тлі підвищеного рівня апоптозу в навколишній тканині щитоподібної залози, що створює патогенетичні передумови для рецидиву й малігнізації тканини, яка залишилася після оперативного лікування.

На великому клінічному матеріалі отримано біохімічні ознаки зміненого співвідношення рівня апоптозу в межах тканини навколо вузла, що корелює з рівнем фрагментованої ДНК (кількісні показники, дані ДНК-форезу й Хехст-типування**)**.

Уперше вивчена експресія промотору апоптозу р53 і його супресора bcl-2 у нодулярній й ненодулярній тканині щитоподібної залози. Установлено, що блокування процесу апоптозу, що відбувається на різних стадіях зобоґенезу, призводить до зниження здатності трансформованих клітин активувати програму клітинної загибелі, це визначає прогресію зобоформування, перспективу рецидиву зоба й імовірність злоякісного переродження.

Дані про експресію антигену ядер проліферуючих клітин (PCNA) і судинного ендотеліального чинника у хворих на вузлові захворювання щитоподібної залози довели, що в ґенезі формування вузлового зоба щитоподібної залози активна проліферація тиреоїдних фолікулярних клітин супроводжується васкуляризацією вузла.

Уперше встановлено, що порушення балансу апоптозу і проліферації, що лежить у ґенезі формування вузла при вузловій патології щитоподібної залози, NO-опосередковане й реалізується через сфінголіпідний сигнальний шлях.

На основі даних ЯМР-релаксометрії отримані достовірні результати про те, що в умовах вузлової трансформації тканин щитоподібної залози клітини не здатні до регуляції об’єму й піддаються постійному набряканню чи стиску. Така дисрегуляція клітинного об’єму є ініціацією апоптотичної смерті клітини. При цьому зміна клітинного об’єму у вузлах і тканині, що оточує вузол, обумовлений регуляторними механізмами, такими як метаболізм оксиду азоту, експресія антигену ядер проліферуючих клітин (PCNA), судинний ендотеліальний чинник і тісно взаємопов’язана зі сфінголіпідним сигнальним внутрішньоклітинним шляхом.

**Практична значимість роботи.**

Методика детекції апоптозу за ДНК-фрагментацією в тканині щитоподібної залози – доступна й відтворювана, що уможливлює застосування цього методу при тонкоголковій аспіраційній біопсії (ТАПБ) у хворих на вузлові захворювання щитоподібної залози в діагностико-прогностичних цілях і виборі хірургічної стратегії. При цьому виявлені в роботі показники рівня ДНК-фрагментації в тканинах щитоподібної залози можуть служити прогностичними маркерами в клінічній оцінці післяопераційного періоду й профілактиці рецидиву й малігнізації вузлового процесу.

Індекс співвідношення ДНК-фрагментації в клітинах вузла й навколишньої тканини є класифікаційним критерієм нозологічної приналежності вузлового процесу, що може розглядатися не тільки як діагностичний критерій, але й як надійний показник прогнозування рецидиву.

Установлений спектр метаболітів оксиду азоту в нодулярній і ненодулярній тканині щитоподібної залози є обґрунтуванням для застосування в терапії вузлової патології щитоподібної залози блокаторів чи попередників їхнього синтезу залежно від нозології.

Високий рівень експресії антигену ядер проліферуючих клітин (PCNA) і судинного ендотеліального чинника у хворих на вузлові захворювання щитоподібної залози відносить хворих з вузловими захворюваннями до груп ризику на онкозахворювання, що є підставою для заглибленого обстеження хворого на предмет виявлення онкопроцесу. Більше того, наявні сучасні методи таргетної терапії спрямовані саме на ці чинники росту, у зв'язку з чим отримані нами результати дозволяють розробити нові терапевтичні підходи до вузлових захворювань щитоподібної залози.

Виявлений при тиреотоксикозі високий рівень апоптозу у тканині, що оточує вузол, при всіх нозологіях дає можливість розробити нові підходи до корегуючої тиреоїдний статус терапії.

Розроблений методичний підхід, виміри часів протонної релаксації уявляється перспективним для вивчення структурного стану тканинної води в передопераційній діагностиці *in vitro* при різних вузлових патологіях щитоподібної залози.

**Особистий внесок здобувача.** Дисертаційна робота є самостійним науковим дослідженням. Автором здійснено патентно-інформаційний пошук і підготовку літературного огляду з обґрунтуванням актуальності й необхідності цього науково-практичного дослідження, розроблено програму дослідження, обґрунтовано й відібрано методи дослідження, складено протокол для фіксації результатів і структуру бази даних. Самостійно проведено лабораторні дослідження рівня апоптозу, його індукторів, супресорів, показників ЯМР-релаксації. Автором особисто відібрані й клінічно обстежені всі тематичні хворі, сплановані і проведені клініко-біохімічні дослідження. Здобувач безпосередньо брала участь у проведенні операцій хворих на вузлові захворювання, збирала операційний матеріал. Автор самостійно проаналізувала отримані результати, провела статистичний аналіз та інтерпретацію отриманих результатів. Написані автором усі розділи роботи і сформульовані висновки носять самостійний характер.

Дослідження апоптотичних клітин за допомогою флуоресцентного барвника Хехст-33342 здійснювалося в науково-дослідній лабораторії Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця за участю завідувача лабораторії ст. н. співроб. Н.В. Макагон.

**Апробація результатів дисертації.** Основні положення й результати дисертації були представлені й обговорені на Міжнародній конференції «Патофизиология и современная медицина» (м. Москва, 2004 р.), 15-й Європейській конференції студентів-медиків і молодих вчених (Німеччина, м. Берлін, 2004 р.), 5-му Міжнародному конгресі студентів-медиків (Польща, м. Катовіци, 2000 р.), Всеукраїнській конференції студентів-медиків (м. Одеса, 1999 р.), 4-му Міжнародному конгресі студентів-медиків (Польща, м. Катовіци, 1998 р.), засіданні Східного відділення Українського Біохімічного Товариства (м. Луганськ, 2000 р., 2004 р., 2009 р.), міжкафедральних засіданнях працівників кафедри медичної хімії, хірургії і урології, науково-дослідницького центру Луганського державного медичного університету (м. Луганськ, 2005 р., 2008 р., 2009 р.).

**Публікації.** За результатами дисертаційної роботи опубліковано 13 наукових праць. Серед них: 7 статей у фахових виданнях (5 – без співавторів), 6 тез доповідей у матеріалах 6 наукових конгресів і конференцій (5 – у зарубіжних).

**Структура й об’єм дисертації.** Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів дослідження, 3 розділів результатів власних досліджень, глави аналізу й узагальнення результатів досліджень, висновків, практичних рекомендацій і списку використаних літературних джерел. Робота ілюстрована 23 таблицями, 18 рисунками, 8 фотознімками. Повний об’єм дисертації – 195 сторінок. Список літератури 432 джерел ( 42 кирилицею, 390 латиницею, що займає 44 сторінки).

**ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ**

**Матеріали й методи дослідження.** Хворі всіх клінічних груп перебували на обстеженні в хірургічному відділенні Луганської обласної клінічної лікарні. Усього в процесі роботи ми обстежували 116 хворих на вузлові захворювання щитоподібної залози, із них 21 хворий на вузловий зоб, 22 хворих на багатовузловий еутиреоїдний зоб, 16 хворих на змішаний зоб, 13 хворих на дифузно-токсичний зоб, 10 хворих на хронічний аутоімунний тиреоїдит Хашимото з вузлоутворенням, 18 хворих на рак щитоподібної залози; 9 хворих на рецидив вузлового й багатовузлового еутиреоїдного зобу; 7 хворих на рецидив змішаного кістозно-вузлового еутиреоїдного зобу.

*Детекция апоптозу* здійснювалася біохімічно за ДНК-фрагментацією в гомогенатах вузла резектованої щитоподібної залози з дифеніламіновим реагентом [Messmer U.K., Verena A.B., 1996] у модифікації І.О. Комаревцевої [Комаревцева І.О., та ін., 2001]. При вивченні проліферуючих процесів використовували визначення антигену ядер проліферуючих клітин (PCNA), при оцінці клітинної загибелі – експресію промотору апоптозу гена p53 і антиапоптозного гена Bcl-2. Використовували антитіла до PCNA (Dako, Данія, клон PC-10, попереднє розведення), р53 (Dako, Данія, клон DO-7, робоче розведення 1:100), Bcl-2 (Dako, Данія, клон 124, робоче розведення 1:20). Аналіз зображення проводили за допомогою флуоресцентного мікроскопа МС 300 (Micros Austria) при 400-кратному і 1000-кратному збільшенні, зйомку проводили цифровою відеокамерою САМ400 (Micros Austria) за допомогою програми аналізу зображення BioVision version 2.0.

З метою виявлення апоптотичних ядер клітин застосовували фарбування флуоресцентним ядерним барвником Хехст-33342 [Cohen L.C., 1993]. Експеримент було проведено в науково-дослідній лабораторії Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України (зав. лаб. ст.н.співр. Н.В. Макагон).

Рівень апоптозу вивчали також біохімічним методом визначення ДНК-фрагментації – ДНК-електрофорезом на 1% агарозному гелі, що містить 5 µг/мл етидіум броміду [Vitale M. et al., 2000].

Зміст оксиду азоту визначали за його стабільними метаболітами нітрит- і нітрат-аніонами з використанням реактиву Грисса [Green L.C., et al., 1982]. Для проведення цього аналізу ми розробили методику, що дозволяє визначати нітрит- і нітрат-аніони в одній пробі. Оскільки реакція діазотування є специфічною тільки для нітритів, то для визначення нітратів необхідно їхнє попереднє відновлення. Відновником виступав цинковий пил. У результаті діазотування в пробах розвивалося фарбування. Спектрофотометричне вимірювання проводили при  = 540 нм.

Для визначення кількісного змісту судинного ендотеліального чинника (VEGF) в гомогенатах тканин щитоподібної залози було використано імуноферментний метод ELISA, набір реактивів фірми R&D (США).

Зміст сфінгомієліну визначали в елюатах проб після поділу загальної фракції фосфоліпідів методом тонкошарової хроматографії на стандартних пластинках «Silufol» у системі розчинників хлороформ : метанол : вода (65:30:5). Кількість сфінгомієліну визначали за методом Чена [Chan Ch., Goldcorn T., 2000]. Кількісно пул вільного сфінгозину визначали методом Lauter – Trams [Lauter C., Trams C.G., 1962], основаним на утворенні забарвленого комплексу сфінгозину й метилоранжу. Проби спектрофотометрували при =415 нм. Кількість вільного сфінгозину визначали за калібрувальною кривою стандартного розчину сфінгозину (Amersham).

Дослідження зміни клітинного об’єму в тканинах щитоподібної залози проводили методом ЯМР-релаксометрії на ядрах Н+, in vitro. Для виміру часу подовжньої й поперечної релаксації протонів тканинної води використовували прилад для ЯМР-релаксометрії «Minispec PC 120» фірми «Bruker» (Німеччина), укомплектований модульними програмами ЕДМ 110 А; 510 А; 511 А; 610 А; 611 А; 612 А; 613 А, що дозволяють змінювати послідовність імпульсів. У проведених експериментах Т1-показник визначався за методом «інверсія-відновлення» (inversion-recovery), використовуючи 1800-Т-900 пульсову послідовність за 40 точками, а Т2-показник вимірювався за методом Карра-Парселла-Мельбума-Гілла.

Математична обробка отриманих значень Т1- і Т2- показників проводилася автоматично на персональному комп'ютері «Minispec PC 120»з використанням програмного пакета «Experiment Supervisor» фірми «Bruker» (Німеччина).

Усім хворим було проведено ультразвукову діагностику щитоподібної залози лінійним датчиком 7,5-10 МГц фірми «Brul @ Kaer» (Данія). Магнітно-резонансну томографію щитоподібної залози було зроблено 31 хворому (41,89 %) за допомогою «Tomicon BNT 1100» (Bruker, Німеччина) з напруженістю магнітного поля 0,23 Т з використанням послідовностей FSE Т1 і Т2 в аксіальній, корональній, сагітальній проекціях, 3D SPGR для розрахунку об’єму щитоподібної залози.

**Статистична обробка результатів досліджень.** Статистичну обробкуотриманих результатів було проведено з використанням програм «Microsoft Excel 97» і «Start Graf». Коефіцієнт достовірності змін було визначено за Стьюдентом (Р). Кореляційний аналіз проводився програмою «Start Graf» (США).

**Результати дослідження та їх обговорення**

***Клініко-біохімічний аналіз апоптозу і його маркерів при вузлових захворюваннях щитоподібної залози.***

Вузлова тканина характеризувалася апоптозом, який ми вивчали Хехст-типуванням із підрахунком відсотка апоптозних ядер (до 400 клітин у пробі). Апоптозні клітини були у вигляді фрагментованих чи конденсованих ядер. Апоптозні ядра спостерігалися в області вузлів і в ненодулярній тканині у хворих на багатовузлові й вузлові захворювання щитоподібної залози. У тканинах хворих на рак щитоподібної залози апоптозних тілець було значно менше (30 – 70 клітин на пробу).

Природно, процес дисрегуляції співвідношення проліферації й апоптозу розвивається поступово і, очевидно, задовго до появи неопластичних клітин.

У зв'язку з цим метою нашого дослідження стало вивчення рівня апоптозу за ДНК-фрагментацією у вузлових і навколишніх тканинах вузлового зоба пухлинного й непухлинного ґенезу.

У всіх клінічних групах рівень апоптозу в гомогенатах вузлів був нижчим, ніж у навколишній тканині. Мінімальний рівень ДНК-фрагментації спостерігався в гомогенатах вузлів, отриманих у хворих на рак щитоподібної залози: рак щитоподібної залози < хронічний аутоімунний тироеїдит < багатовузловий еутиреоїдний зоб < вузловий еутиреоїдний зоб.

У навколишніх тканинах показники ДНК-фрагментації мали іншу спрямованість, при цьому показники ДНК-фрагментації в гомогенатах навколишньої тканини у хворих на хронічний аутоімунний тиреоїдит і рак щитоподібної залози перевершували їх в інших клінічних групах у 1,5 рази: рак щитоподібної залози > хронічний аутоімунний тиреоїдит > багатовузловий еутиреоїдний зоб > вузловий еутиреоїдний зоб.

Таким чином, зменшення апоптозної активності в тироцитах призводить до дисбалансу в процесах проліферації й апоптозу убік зменшення рівня апоптозу, що ми й спостерігали в гомогенатах вузлів у хворих на вузловий і багатовузловий еутиреоїдний зоб.

Відомо, що як вузловий зоб, так і аутоімунний тиреоїдит можуть сполучатися з раком щитоподібної залози. Проведені нами дослідження дозволяють поглянути на проблему можливої малігнізації вузла при еутиреоїдному зобі й аутоімунному тиреоїдиті з позицій пригнобленого апоптозу, що є морфо-функціональною готовністю до розвитку неопластичних клітин у вузлі.

Далі предметом нашого дослідження стало вивчення експресії промотору апоптозу р53 у вузлових тканинах зобу пухлинного й непухлинного ґенезу. Як показали наші дослідження, рівень експресії р53 корелював із встановленим у цих клінічних групах рівнем апоптозу. Мінімальний рівень експресії р53 спостерігався в гомогенатах вузлів, отриманих у хворих на рак щитоподібної залози: рак щитоподібної залози < рецидив багатовузлового зобу < вузловий еутиреоїдний зоб < багатовузловий еутиреоїдний зоб < хронічний аутоімунний тиреоїдит.

У фізіологічних умовах посилена експресія bcl-2 захищає клітини від загибелі, викликаної р53, тоді як в онкогенезі цей генетичний механізм життєздатності клітини сприяє ліквідації контролю над апоптозом у пухлинних клітин. За нашими даними, максимальний рівень експресії bcl-2 спостерігався в гомогенатах вузлів, отриманих у хворих на рак щитоподібної залози: рак щитоподібної залози > багатовузловий еутиреоїдний зоб > хронічний аутоімунний тиреоїдит > вузловий еутиреоїдний зоб > рецидив багатовузлового зоба.

Експресія bcl-2 у тиреоцитах повинна забезпечувати виживання активно проліферуючим клітинам. Антиген ядер проліферуючих клітин (PCNA) корелює з проліферацією тироцитов. Ми вивчили експресію антигену ядер проліферуючих клітин (PCNA) у клітинах резектованої нодулярної тканини щитоподібної залози. У хворих на рак щитоподібної залози експресія PCNA була максимальною в цій групі дослідження і склала 78,2±12,5 %. Активність проліферації у хворих на багатовузловий еутиреоїдний зоб та його рецидив була високою, судячи з рівня експресії PCNA, 56,2±9,3 % і 56,4±9,8 % відповідно. У хворих на хронічний аутоімунний тиреоїдит з вузлоутворенням експресія PCNA була 32,4±5,3 %, а у хворих на вузловий еутиреоїдний зоб – 24,6±4,4 %.

***Біохімічні індуктори й супресори апоптозу: оксид азоту, судинний ендотеліальний фактор росту і сфінгомієліновий каскад у ґенезі вузлової тиреоїдної патології.***

Максимальний рівень вмісту всіх метаболітів оксиду азоту спостерігався в гомогенатах вузлів, отриманих у хворих на рак щитоподібної залози, багатовузловий еутиреоїдний зоб і хворих з рецидивом вузлового зоба: рак щитоподібної залози > рецидив вузлового зоба > багатовузловий еутиреоїдний зоб > вузловий еутиреоїдний зоб > хронічний аутоімунний тиреоїдит.

У навколишніх тканинах рівень вмісту всіх метаболітів оксиду азоту мав іншу спрямованість, при цьому показники вмісту метаболітів оксиду азоту в гомогенатах навколишньої тканини у хворих на хронічний аутоімунний тиреоїдит з вузлоутворенням і рак щитоподібної залози перевершували такі в інших клінічних групах у 3,5 рази: рак щитоподібної залози > хронічний аутоімунний тиреоїдит > рецидив вузлового зоба > багатовузловий еутиреоїдний зоб > вузловий еутиреоїдний зоб.

Табл. 1.

Вміст NOх (μг/г) у гомогенатах вузлів і навколишньої тканини

у хворих на вузлову патологію щитоподібної залози

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Клінічні**  **групи** | **Вузлова**  **тканина**  **щитоподібної**  **залози** | **Навколишня вузол тканина щитоподібної**  **залози** | **Співвідно-шення вузол/навк.**  **тканина** |
| Вузловий еутиреоїдний зоб | 21,9±3,8\* | 10,2±2,9 | 2,14 |
| Багатовузловий еутиреоїдний зоб | 33,11±6,1\*# | 10,18±1,1 | 3,25# |
| Хронічний аутоімунний тиреоїдит | 10,38±1,6\*# | 40,28±6,4# | 0,26# |
| Рак щитоподібної залози | 53, 9±6,8# | 44,1±7,2# | 1,22# |
| Рецидив вузлового зоба | 41,9±7,1\*# | 14,8±2,6 | 2,8 |

\* -p - < 0,05 – порівняно з навколишньою тканиною

# -p - < 0,05 – порівняно з групою вузлового еутиреоїдного зоба

Максимальний рівень метаболітів оксиду азоту спостерігався при раку щитоподібної залози, що, очевидно, пов'язано з неоваскуляризацією пухлинного вузла.

У цьому аспекті є інформативними дані щодо співвідношення показника NO3- між тканиною вузла й навколишньою тканиною. Мінімальний показник має місце в групі хворих на хронічний аутоімунний тиреоїдит з вузлоутворенням, а максимальний – у групі хворих на багатовузловий еутиреоїдний зоб. Показник групи хворих на рак щитоподібної залози займає проміжне місце й тяжіє до одиниці – 1,23.

З огляду на роль оксиду азоту в регуляції локального кровообігу й активність ангіогенезу в канцерогенезі, очевидно, цей показник можна використовувати як діагностичний і прогностичний критерій у плані малігнізації вузла щитоподібної залози: хронічний аутоімунний тиреоїдит < рак щитоподібної залози – 1,23 > доброякісний зоб.

Судинний ендотеліальний фактор росту (VEGF), який виробляють тиреоцити, стимулює проліферацію клітин ендотелію й ріст судин. З продукцією цього агента зв'язують нагромадження кістозної рідини як в аденомах, так і в колоїдних вузлах.

Як показали наші результати, рівень вмісту VEGF у вузлах був найбільш високим у хворих на рак щитоподібної залози. Далі, за спадною, йде група з рецидивом вузлового еутиреоїдного зоба, багатовузлового еутиреоїдного зоба, вузлового еутиреоїдного зоба. Найменший вміст VEGF виявився у вузлах хворих на хронічний аутоімунний тиреоїдит з вузлоутворенням.

У тканині навколо вузла щитоподібної залози рівень вмісту VEGF був також максимальним у хворих на рак щитоподібної залози, що забезпечує активний неоангіогенез. Майже такого значення досягає його вміст і в тканині навколо вузла у хворих на хронічний аутоімунний тиреоїдит з вузлоутворенням, що цілком логічно, з огляду на лімфоцитарну експансію при такій патології. VEGF може впливати на ангіогенез шляхом рекрутування лейкоцитів (які продукують ангіогенні чинники) за допомогою експресії лейкоцитами рецепторів адгезії. При доброякісній вузловій патології – рецидивом вузлового еутиреоїдного зоба, багатовузловому еутиреоїдному зобі, вузловому еутиреоїдному зобі – вміст VEGF був практично на одному рівні.

Ряд фактів указує на те, що VEGF не тільки має проангіогенну активність, але й може безпосередньо брати участь у регуляції проліферації клітин пухлини. Очевидно, цим зумовлена максимальна експресія VEGF у хворих на рак щитоподібної залози.

Нам вдалося встановити роль оксиду азоту в індукції й супресії апоптозу при вузлових захворюваннях щитоподібної залози. Залежно від нозології оксид азоту виступає проапоптозним чи антіапоптозним чинником. Ми ставили за мету встановити можливу ланку в сигнальних механізмах апоптозу, що направляє про- чи антіапоптозні ефекти оксиду азоту.

Такою можливою ланкою ми визначили сфінгомієліновий цикл, продукти якого є вторинними месенджерами й беруть участь у проведенні сигналу апоптозу.

Закономірним результатом активації сфінгомієлінового каскаду зі збільшенням деградації сфінгомієліну стало накопичення сфінгоїдних основ, а саме: сфінгозин-1-фосфату в клітинах тканини навколо вузла у хворих на рак щитоподібної залози (49,1±7,9 нг/мг білка), хронічний аутоімунний тиреоїдит (47,8±7,5 нг/мг білка), багатовузловий еутиреоїдний зоб (46,1±8,3 нг/мг білка), менше – у хворих на вузловий еутиреоїдний зоб (35,3±7,2 нг/мг білки) і у хворих з рецидивом вузлового зоба (34,3±6,6 нг/мг білка).

Вміст сфінгозин-1-фосфату в клітинах вузлової тканини щитоподібної залози у хворих на рак щитоподібної залози (12,4±2,7 нг/мг білка) і хронічний аутоімунний тиреоїдит Хашимото (17,6±3,2 нг/мг білка) був мінімальним порівняно з такими у хворихнабагатовузловий еутиреоїдний зоб (38,4±6,7 нг/мг білка), хворих на вузловий еутиреоїдний зоб (26,8±5,6 нг/мг білка) і хворих з рецидивом вузлового зоба (39,8±6,4 нг/мг білка).

***Роль альтерації клітинного об’єму в розвитку апоптозу при вузлових захворюваннях щитоподібної залози (за даними МР-томографії і ЯМР-релаксометрії).*** У зв'язку з тим, що при вузлових захворюваннях щитоподібної залози спостерігаються в тому чи іншому ступені виражені зміни рівня апоптозу в тканинах, стає можливим на основі ЯМР-релаксометрії тканини щитоподібної залози (вузлів і навколишньої тканини) розробити селективні тести діагностики вузлової патології щитоподібної залози й чуттєві методики для вибору тактики оперативного втручання.

Як показали наші дослідження, у хворих на вузлові захворювання щитоподібної залози апоптоз і проліферація виявилися об’єм-залежними. У тканинах вузла у хворих на рак щитоподібної залози і в тканині навколо вузла хворих на вузловий, багатовузловий, рецидив вузлового зоба щитоподібної залози, хронічний аутоімунний тиреоїдит виявлене прискорення ЯМР-показників, що свідчить про збільшення клітинного обсягу. Зменшення клітинного обсягу (укорочення подовжньої й поперечної ЯМР-релаксації) спостерігалося у вузлах усіх клінічних груп спостереження, крім раку щитоподібної залози. У хворих на рак щитоподібної залози виявлене зменшення клітинного об’єму в тканині навколо вузла.

Таким чином, ЯМР-показники протонів тканинної води щитоподібної залози при різних вузлових захворюваннях специфічні, корелюють і відображають динаміку патогенетичних апоптозно-проліферативних процесів у вузлі і тканині навколо вузла щитоподібної залози й можуть розглядатися як адекватні діагностичні критерії вузлової патології щитоподібної залози.

**ВИСНОВКИ**

У дисертаційній роботі представлено нове вирішення наукових задач, які полягають у вивченні біохімічних ознак апоптозу, його маркерів і модуляторів у тканинах щитоподібної залози у хворих на вузлові захворювання щитоподібної залози та розробки діагностичного алгоритму вузлової тиреоїдної патології.

1. На великому клінічному матеріалі, за даними біохімічної детекції апоптозу (фрагментованої ДНК, ДНК-форезу) і Хехст-типування, отримані ознаки зміненого співвідношення рівня апоптозу в межах тканини навколо вузла у хворих на вузлові захворювання щитоподібної залози. Мінімальний рівень ДНК-фрагментації спостерігався в гомогенатах вузлів, отриманих у хворих на рак щитоподібної залози: рак щитоподібної залози < хронічний аутоімунний тиреоїдит з вузлоутворенням < багатовузловий еутиреоїдний зоб < вузловий еутиреоїдний зоб. У навколишніх тканинах показники ДНК-фрагментації мали іншу спрямованість, при цьому показники ДНК-фрагментації в гомогенатах навколишньої тканини у хворих на хронічний аутоімунний тиреоїдит з вузлоутворенням і на рак щитоподібної залози перевершували такі в інших клінічних групах у 1,5 рази: рак щитоподібної залози > хронічний аутоімунний тиреоїдит з вузлоутворенням > багатовузловий еутиреоїдний зоб > вузловий еутиреоїдний зоб.
2. При тиреотоксикозі рівень апоптозу в навколишній тканині при всіх нозологіях був значно вищим, ніж у вузлі, що зв'язано з більш високою концентрацією йоду в навколишній тканині, що стимулює апоптоз через експресію р-53.
3. Пригнічення апоптозу у вузловій тканині хворих на рак щитоподібної залози пов'язане з високою експресією bcl-2, що блокувала експресію р-53 (співвідношення р-53/bcl-2 = 0,01). У хворих на вузлову форму хронічного аутоімунного тиреоїдиту Хашимото кількість р-53-позитивних клітин майже дорівнює кількості bcl-2-позитивних клітин (співвідношення = 1), що є патогенетичною відповіддю на р-53-експресію. Експресія р-53 у тироцитах хворих на вузловий і багатовузловий зоб також супроводжується експресією bcl-2. У хворих на багатовузловий зоб співвідношення р-53/bcl-2 = 0,9, тобто висока експресія р-53 адекватно контролюється bcl-2. А от у хворих на вузловий еутиреоїдний зоб співвідношення р-53/bcl-2 = 0,59, інакше кажучи, експресія антиапоптозного гена bcl-2 переважає над експресією проапоптозного гена р-53, що створює патогенетичні передумови для рецидиву і малігнізації у тканині залози вже після оперативного лікування.
4. Показано, що експресія bcl-2 у тиреоцитах забезпечує виживання активно проліферуючим клітинам. Експресія антигену ядер проліферуючих клітин (PCNA) у клітинах резектованої нодулярної тканини щитоподібної залози у хворих на рак щитоподібної залози була максимальною в нашій групі дослідження, а індекс проліферація/апоптоз – 10. Активність проліферації у хворих на багатовузловий еутиреоїдний зоб, судячи з рівня експресії PCNA, була також високою, але індекс проліферація/апоптоз при цьому був 2,87 (для порівняння: у хворих на вузловий зоб – 1,2). У хворих на хронічний аутоімунний тиреоїдит у вузлах проліферація майже в 3 рази переважала над апоптозом, тобто вузлова гіперплазія при вузловій патології щитоподібної залози обумовлена дисбалансом у процесах проліферації й апоптозу в бік зменшення рівня апоптозу.
5. Установлений біфункціональний характер оксиду азоту в ґенезі вузлової патології щитоподібної залози. Проапоптозний ефект NO виявився у вузлах хворих на багатовузловий зоб і рецидив вузлового зобу, а також у ненодулярній тканині – у хворих на хронічний аутоімунний тиреоїдит з вузлоутворенням і рак щитоподібної залози. Антиапоптотична дія NO виявлена у вузлах раку щитоподібної залози й вузлового зоба. У вузлі хворих на хронічний аутоімунний тиреоїдит і в тканині навколо вузла у хворих на вузловий, багатовузловий і рецидив вузлового зобу активація апоптозу носила NO-незалежний характер.
6. Експресія судинного ендотеліального чинника мала місце у хворих на рак щитоподібної залози й у тканинах вузла, і в тканині навколо вузла, що відбиває активний ангіогенез і проліферацію в цих тканинах. У хворих на вузловий, багатовузловий і рецидив вузлового зобу експресія судинного ендотеліального фактору спостерігалася тільки у вузлах, а у хворих на хронічний аутоімунний тиреоїдит – тільки в тканині навколо вузла.
7. Установлено активацію сфінгомієлінового метаболічного шляху з накопиченням вільних сфінгоїдних основ – сфінгозину – в умовах стимульованого апоптозу у вузлі хворих на багатовузловий і рецидив вузлового зобу, а в тканині навколо вузла – у хворих на вузловий, багатовузловий, рецидив вузлового зобу щитоподібної залози, особливо у хворих на хронічний аутоімунний тиреоїдит і рак щитоподібної залози.
8. Проапоптозний ефект NO у вузлах хворих на багатовузловий зоб і рецидив вузлового зоба, а також у ненодулярній тканині – у хворих на хронічний аутоімунний тиреоїдит і рак щитоподібної залози реалізується через сфінгомієліновий сигнальний шлях. Антиапоптозна дія NO у вузлах раку й вузлового зоба щитоподібної залози виявився сфінгозин-незалежним.
9. У хворих на вузлові захворювання щитоподібної залози апоптоз і проліферація виявилися об’єм-залежними. У тканинах вузла у хворих на рак щитоподібної залози і в тканині навколо вузла хворих на вузловий, багатовузловий, рецидив вузлового зоба щитоподібної залози, хронічний аутоімунний тиреоїдит виявлене прискорення ЯМР-показників, що свідчить про збільшення клітинного обсягу. Зменшення клітинного обсягу (укорочення подовжньої й поперечної ЯМР-релаксації) спостерігалося у вузлах усіх клінічних груп спостереження, крім раку щитоподібної залози. У хворих на рак щитоподібної залози виявлене зменшення клітинного об’єму в тканині навколо вузла.
10. У хворих на рак щитоподібної залози збільшення клітинного об’єму у вузловій тканині і зменшення клітинного об’єму у тканині навколо вузла виявилися NO-залежними. Протилежна картина була у хворих на непухлинні вузлові захворювання: NO-залежна гідратація в тканині навколо вузла й NO-залежна дегідратація у вузлі.

**ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ**

1. При виконанні тонкоголкової аспіраційної біопсії (ТАПБ) у хворих на вузлові захворювання щитоподібної залози пропонуємо застосовувати додатково до стандартного протоколу обстеження методику детекції апоптозу за ДНК-фрагментацією в тканині щитоподібної залози. При цьому виявлені в роботі показники рівня ДНК-фрагментації в тканинах щитоподібної залози можуть служити прогностичними маркерами в клінічній оцінці післяопераційного періоду і профілактиці рецидиву й малігнізації вузлового процесу.
2. Індекс співвідношення ДНК-фрагментації в клітинах вузла й навколишній тканини, а також індекс проліферація/апоптоз є класифікаційними критеріями нозологічної приналежності вузлового процесу, що може розглядатися не тільки як діагностичний критерій, але і як надійний показник прогнозування рецидиву.
3. Установлений спектр метаболітів оксиду азоту в нодулярній і ненодулярній тканині щитоподібної залози є обґрунтуванням для застосування в терапії вузлової патології щитоподібної залози блокаторов чи попередників їхнього синтезу залежно від нозології.
4. Високий рівень експресії антигену ядер проліферуючих клітин (PCNA) і судинного ендотеліального фактора у хворих на вузлові захворювання щитоподібної залози відносить хворих з вузловими захворюваннями до групи ризику на онкозахворювання, що є підставою для заглибленого обстеження хворого на предмет виявлення онкопроцесу.
5. Виявлений при тиреотоксикозі високий рівень апоптозу в тканині навколо вузла при всіх нозологіях, дає можливість розробити нові підходи до корегуючої тиреоїдний статус терапії.
6. Виміри ЯМР-показників протонної релаксації, які надають швидку інформацію про структурний стан тканинної води й тим самим дозволяють діагностувати онкопроцес у тканинах вузла, слід впровадити в передопераційній діагностиці *in vitro* при різних вузлових патологіях щитоподібної залози.

**СПИСОК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ**

1. Komarevtseva K.V. The predictive value of apoptosis in human thyroid nodules as a risk factor for malignancy / K.V. Komarevtseva, I.A. Komarevtseva // Українськийморфологічний альманах. – 2009. – Т. 7. – № 2 . – С. 60-63. (Комаревцева К.В. – проводила підбір хворих на вузлові захворювання щитоподібної залози, здійснювала збір операційного матеріалу, самостійно виконувала всі методики визначення апоптозу, проводила статистичну обробку даних).
2. Комаревцева Е.В. Роль альтерации клеточного объема (по данным ЯМР-релаксометрии) в развитии апоптоза при узловых заболеваниях щитовидной железы / Е.В. Комаревцева // Український журнал клінічної та лабораторної медицини. – 2009. – Т. 4 . – № 2. – С. 177-182.
3. Комаревцева Е.В. Роль оксида азота и сосудистого ендотелиального фактора роста в генезе узловой тиреоидной патологии / Комаревцева Е.В. // Українськиймедичний альманах. – 2008. – Т. 11. – № 6. – С. 90-94.
4. Комаревцева Е.В. Диагностическое и прогностическое значение уровня апоптоза в тканях щитовидной железы у больных с очаговой тиреоидной патологией / Е.В. Комаревцева // Український журнал клінічної та лабораторної медицини. – 2008. – Т. 3. – № 1. – С. 84-88.
5. Комаревцева К.В. Детекція апоптозу у вузлових зобах щитоподібної залози / К.В. Комаревцева // Українськиймедичний альманах. – 2004. – Т. 7. – № 3. – С. 168-170.
6. Комаревцева К.В. Застосування МР-томографії в діагностиці вузлових захворювань щитоподібної залози / К.В. Комарецева // Український медичний альманах. – 2004. – Т. 7. – № 5. – С. 24-26.
7. Комаревцева К.В. (співавт. Боровой П.М., Бойко М.С., Тецький Р.В., Орлова О.А.) Вплив тироксину і трийодтиронину на ЯМР-релаксацію протонів тканинної води нирок in vitro / К.В. Комаревцева та ін. // Укр.мед.альманах. – 1999. – T.2. – № 1. – C. 82-84. (Комаревцева К.В. самостійно проводила інкубацію гормонів тироксину і трийодтиронину з тканинами і вимірювала показники ЯМР-релаксометрії).
8. Комаревцева Е.В. Апоптоз и узловые формы заболеваний щитовидной железы / Е.В. Комаревцева // Патофизиология и современная медицина : Сборник научных работ. – М., 2004. – Вып.2. – С.207-209.
9. Komarevtseva K.V. Apoptosis in human thyroid epithelial cells from goiter nodules: a risk factor for malignancy and optimal surgical strategy / K.V. Komarevtseva // 15th European students` conference for future doctors and young scientists : Abstract book. – Berlin. – 2004. – P. 281.
10. Komarevtseva K. Investigation of the magnetic properties of opioids used as contrast agent for Magnetic Resonance Imaging / K. Komarevtseva // 5th International Medical Students Congress. –Poland, Katowice. – 2000. – P. 71.
11. Komarevtseva K. NMR-spectroscopy in diagnostic human thyroid nodules / K. Komarevtseva // 5th International Medical Students Congress. – Poland, Katowice. – 2000. – p. 85.
12. Комаревцева Е. Разработка нового класса контрастных агентов для ЯМР-томографии / Е. Комаревцева, П. Боровой, Е. Хомич // Матер. Всеукр. конфер. студентов-медиков. – Одесса, 1999. – с.71. (Комаревцева К.В. – проводила вимірювання показників ЯМР-релаксометрії).
13. Komarevtseva К. Interactions between sphingosine-1-phosphate and vascular endothelial growth factor in apoptosis in human thyroid nodules / К. Komarevtseva // 4th International Medical Students Congress. – Poland, Katowice. – 1998. – p. 65.

**АНОТАЦІЯ**

**Комаревцева К.В. Клініко-біохімічний аналіз рівня апоптозу та його регуляторів у діагностиці вузлових захворювань щитоподібної залози. – Рукопис.**

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.01.32 – медична біохімія. – Луганський державний медичний університет, Луганськ, 2009.

Дисертація присвячена дослідженню біохімічних ознак апоптозу, його маркерів і модуляторів у тканинах щитоподібної залози у хворих на вузлові захворювання щитоподібної залози та розробки діагностичного алгоритму вузлової тиреоїдної патології.

Уперше вірогідно доведено, що вузлова патологія щитоподібної залози і непухлинного, і пухлинного ґенезу з біохімічної точки зору характеризується гнобленням апоптозу у вузлах на тлі підвищеного рівня апоптозу в навколишній тканині щитоподібної залози, що створює патогенетичні передумови для рецидиву й малігнізації тканини, яка залишилася після оперативного лікування.

Уперше вивчено експресію промотору апоптозу р53 і його супресора bcl-2 у нодулярної і ненодулярної тканини щитоподібної залози. Установлено, що блокування процесу апоптозу, що відбувається на різних стадіях зобогенезу, призводить до зниження здатності трансформованих клітин активувати програму клітинної загибелі, що визначає прогресію зобоформування, перспективу рецидиву зоба й імовірність злоякісного переродження.

Дані про експресію антигену ядер проліферуючих клітин (PCNA) і судинного ендотеліального чинника у хворих на вузлові захворювання щитоподібної залози довели, що в генезі формування вузлового зоба щитоподібної залози активна проліферація тиреоїдних фолікулярних клітин супроводжується васкуляризацією вузла.

Уперше встановлено, що порушення балансу апоптозу й проліферації, що лежить у генезі формування вузла при вузловій патології щитоподібної залози – NO-опосередкованим і реалізується через сфінголіпідний сигнальний шлях.

На підставі даних ЯМР-релаксометрії отримані достовірні результати про те, що в умовах вузлової трансформації тканин щитоподібної залози, клітини не здатні до регуляції об’єму і піддаються постійному набряканню чи стиску. Така дисрегуляція клітинного об’єму є ініціацією апоптотичної смерті клітини. При цьому зміна клітинного об’єму у вузлах і навколишній вузол тканині обумовлений регуляторними механізмами, таким як метаболізм оксиду азоту, експресія антигену ядер проліферуючих клітин (PCNA), судинний ендотеліального чинник і тісно взаємозалежна зі сфінголіпідним сигнальним внутрішньоклітинним шляхом.

**Ключові слова:** апоптоз, промотори і супресори апоптозу, оксид азоту, судинний ендотеліальний фактор, об’єм клітин, ЯМР-релаксація, вузлова патологія щитоподібної залози.

# АННОТАЦИЯ

Комаревцева Е.В. Клинико-биохимический анализ уровня апоптозу в диагностике узловых заболеваний щитовидной железы. – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.01.32 – медицинская биохимия. – Луганский государственный медицинский университет, Луганск, 2009.

Диссертационная работа посвящена изучению биохимических признаков апоптоза, его маркеров и модуляторов в тканях щитовидной железы у больных узловыми заболеваниями щитовидной железы для разработки диагностического алгоритма очаговой тиреоидной патологии.

Впервые достоверно доказано, что очаговая патология щитовидной железы и неопухолевого, и опухолевого генеза с биохимической точки зрения характе­ризуется угнетением апоптоза в узлах на фоне повышенного уровня апоптоза в окружающей ткани щитовидной железы, что создает патогенетические предпосылки для рецидива и малигнизации в оставшейся после оперативного лечения ткани железы.

Впервые изучена экспрессия промотора апоптоза р53 и его супрессора bcl-2 в нодуллярной и ненодуллярной ткани щитовидной железы. Установлено, что блокирование процесса апоптоза, происходящее на разных стадиях зобогенеза, приводит к снижению способности трансформированных клеток активировать программу клеточной гибели, что определяет прогрессию зобообразования, перспективу рецидива зоба и вероятность злокачественного перерождения.

Данные об экспрессии антигена ядер пролиферирующих клеток (PCNA) и сосудистого эндотелиального фактора у больных узловыми заболеваниями щитовидной железы доказали, что в генезе формирования узлового зоба щитовидной железы активная пролиферация тиреоидных фолликулярных клеток сопровождается васкуляризацией узла.

Впервые установлено, что нарушение баланса апоптоза и пролиферации, которое лежит в генезе формирования узла при узловой патологии щитовидной железы – NO-опосредованное и реализуется через сфинголипидный сигнальный путь.

На основании данных ЯМР-релаксометрии получены достоверные результаты о том, что в условиях узловой трансформации тканей щитовидной железы клетки не способны к регуляции объема и подвергаются постоянному набуханию или сжатию. Такая дисрегуляция клеточного объема, является инициацией апоптотической смерти клетки. При этом, изменение клеточного объема в узлах и окружающей узел ткани обусловлено регуляторными механизмами, таким как метаболизмом оксида азота, экспрессией антигена ядер пролиферирующих клеток (PCNA), сосудистого эндотелиального фактора и тесно взаимосвязана со сфинголипидным сигнальным внутриклеточными путем.

**Ключевые слова:** апоптоз, промоторы и супрессоры апоптоза, оксид азота, сосудистый эндотелиальный фактор, объем клеток, ЯМР-релаксация, узловая патология щитовидной железы.

# SUMMARY

**Komarevtseva K.V. Clinical and biochemical analysis of level of apoptosis****in diagnostics of thyroid nodular goiters diseases. - A manuscript.**

The dissertation for the candidate of medical sciences degree in a speciality 14.01.32 - medical biochemistry. - Lugansk state medical university, Lugansk, 2009.

The dissertation is devoted to studying of biochemical signs of apoptosis, its markers and modulators in tissues of a thyroid gland of patients with thyroid nodular goiters diseases. It is working out of diagnostic algorithm of thyroid nodular goiters pathology.

For the first time it is authentically proved, that thyroid nodular goiters pathology both not tumoral, and tumoral genesis from the biochemical point of view ­is characterised by suppression of apoptosis in nodular goitersagainst the increased level of apoptosis in a no nodular tissue of a thyroid gland that creates pathogenetic preconditions for relapse and malignisation in the tissue which has remained after operative treatment of gland.

For the first time the promoter expression of apoptosis р53 and it suppressor bcl-2 in nodular and no nodular part of thyroid tissue is studied. Process of blocking of apoptosis, is an event which is established at different stages of goitrogenesis. That, leads to decrease in ability of the transformed cells to activate the program of cellular destruction that defines a progression of goitrogenesis, prospect of relapse of a goiter and probability of malignant regeneration.

Data about an expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and vascular endothelial growth factorat patient of thyroid nodular goiters diseaseshave proved, that in genesis formations of a thyroid nodular goiters active proliferation thyroid of follicular cells is accompanied of vascularisation of goiter.

For the first time it is established, that balance infringement of apoptosis and proliferating, which lays in genesis knot formations at a thyroid nodular goiters pathology of a thyroid gland - NO-mediated, and is released through sphingomyelin signaling pathway.

On the basis of the given nuclear magnetic resonance relaxation results that in the conditions of nodular transformation of tissues of a thyroid gland of a cage are not capable to regulation of volume are received and are exposed to constant swelling or shrinkage.

**Keywords:** apoptosis, promoters and suppressors of apoptosis, nitric oxide, vascular endothelial growth factor, cells volume, a nuclear magnetic resonance-relaxation, a thyroid nodular goiters diseases.

Підписано до друку 03.09.2009

Формат 60х90/16. Папір офсетний.

Гарнітура « Таймс». Друк цифровий.

Умовн. друк. арк. 0,8. Наклад 100 прим. Зам. № 1001.

Надруковано поліграфічним підприємством

СПД Нескреба Р.А.

Центр друку «Єлена»

Свідоцтво № 23820170000002312 від 19.02.03

190034, м. Луганськ, кв. Ватутіна, 18 А, салон «Єлена»

тел. 8 050 580 99 79

Для заказа доставки данной работы воспользуйтесь поиском на сайте по ссылке: <http://www.mydisser.com/search.html>