



Aktywność enzymów antyoksydacyjnych i stężenie aldehydu dimalonowego jako wykładniki stresu oksydacyjnego u kobiet z subkliniczną nieautoimmunologiczną nadczynnością tarczycy

Activity of antioxidative enzymes and concentration of malondialdehyde as oxidative status markers in women with non-autoimmunological subclinical hyperthyroidism

Barbara Rybus-Kalinowska^{1,4}, Krystyna Żwirska-Korczala¹, Mariusz Kalinowski², Michał Kukla¹, Ewa Birkner³, Jerzy Jochem⁴

¹Katedra i Zakład Fizjologii, Zabrze, Śląski Uniwersytet Medyczny, Katowice

²Śląskie Centrum Chorób Serca, Zabrze

³Katedra i Zakład Biochemii, Zabrze, Śląski Uniwersytet Medyczny, Katowice

⁴Zakład Podstawowych Nauk Medycznych, Bytom, Śląski Uniwersytet Medyczny, Katowice

Streszczenie

Wstęp: Badania z ostatnich lat wskazują na udział stresu oksydacyjnego w rozwoju schorzeń gruczołu tarczowego. Celem niniejszej pracy jest ocena zmian stanu oksydacyjnego u kobiet z subkliniczną nieautoimmunologiczną nadczynnością tarczycy.

Materiał i metody: Badania przeprowadzono u 20 kobiet z subkliniczną nadczynnością tarczycy oraz u 15 zdrowych kobiet. Wykonywano oznaczenia aktywności dysmutazy ponadtlenkowej — izoformy manganowej (Mn-SOD) i miedziowo-cynkowej (EC-SOD), a także stężenia aldehydu dimalonowego (MDA) w osoczu.

Wyniki: U kobiet z subkliniczną nadczynnością tarczycy stwierdzono w osoczu wyższą w porównaniu z grupą kontrolną aktywność EC-SOD ($13,3 \pm 2,1$ vs. $10,9 \pm 1,4$ NU/ml; $p < 0,05$), natomiast aktywności Mn-SOD nie różniły się pomiędzy grupami ($4,2 \pm 0,5$ vs. $4,0 \pm 1,0$ NU/ml). Badania wykazały również, że u kobiet z nadczynnością tarczycy w porównaniu z grupą kontrolną występuje wyższe stężenie MDA w osoczu niż w grupie kobiet zdrowych ($3,5 \pm 1,2$ vs. $2,0 \pm 0,6$ $\mu\text{mol/l}$; $p < 0,05$).

Wnioski: W grupie chorych z subkliniczną nadczynnością tarczycy występują zaburzenia równowagi oksydacyjnej, przejawiające się wzrostem aktywności EC-SOD w osoczu. Towarzyszy temu podwyższone stężenie MDA, świadczące o nasileniu peroksydacji lipidów w tej grupie chorych. (Endokrynol Pol 2009; 60 (3): 199–202)

Słowa kluczowe: subkliniczna nadczynność tarczycy, stres oksydacyjny, enzymy antyoksydacyjne, aldehyd dimalonowy

Abstract

Introduction: The recent investigations point out the significant role of oxidative stress in the development of thyroid gland disease. The present study was designed to investigate the variation of oxidative state in women with non-autoimmunological subclinical hyperthyroidism.

Material and methods: The study was conducted on 20 females with non-autoimmunological subclinical hyperthyroidism and 15 healthy women. Manganese-containing superoxide dismutase (Mn-SOD) and extracellular superoxide dismutase (EC-SOD) plasma activity, and malondialdehyde (MDA) plasma concentration were measured.

Results: EC-SOD plasma activity was significantly higher in women with subclinical hyperthyroidism when compared with the control group (13.3 ± 2.1 vs. 10.9 ± 1.4 NU/ml; $p < 0.05$), unlike Mn-SOD (4.2 ± 0.5 vs. 4.0 ± 1.0 NU/ml). MDA plasma concentration increased significantly in women with subclinical hyperthyroidism (3.5 ± 1.2 vs. 2.0 ± 0.6 $\mu\text{mol/l}$; $p < 0.05$).

Conclusions: The increased EC-SOD plasma activity may reflect disturbances of oxidative state in subclinical hyperthyroidism. Parallel increase of MDA plasma concentration may indicate enhancement of lipid peroxidation in patients with subclinical hyperthyroidism. (Pol J Endocrinol 2009; 60 (3): 199–202)

Key words: subclinical hyperthyroidism, oxidative stress, antioxidative enzymes, malondialdehyde



Wstęp

Problem subklinicznych schorzeń tarczycy jest jednym z ważniejszych zagadnień współczesnej endokrynologii, ponieważ u części pacjentów wiąże się on z ryzykiem występowania powikłań, podczas gdy u innych schorzenie to nie postępuje, a nawet ulega samoistnej regresji. Subliniczna nadczynność tarczycy jest zjawiskiem częstym, rozpoznaje się ją u 0,7–12,4% ogólnej populacji [1]. Tak duży rozrzut wyników badań epidemiologicznych wiąże się z różnymi kryteriami diagnostycznymi, czułością metod używanych do pomiaru stężenia hormonu tyreotropowego (TSH, *thyroid stimulating hormone*) i różną podażą jodu w diecie [1]. Za najczęstszą przyczynę subklinicznej nadczynności tarczycy uważa się stosowanie hormonów tarczycy w nadmiernych dawkach, co obserwuje się u około 25% chorych leczonych z powodu niedoczynności tego narządu [2]. Spośród innych ważnych czynników egzogennych należy wymienić stosowanie amiodaronu, interferonu- α (INF- α , *interferon α*) oraz związków jodu [3–5]. Amiodaron to lek antyarytmiczny zawierający w swoim składzie jod. Nadmiar tego leku może prowadzić do występowania nadczynności tarczycy, ponieważ jod jest wykorzystywany jako substrat do syntezy tyroksyny (T_4) i trijodotyroniny (T_3) w sposób niekontrolowany. Wynika to z faktu, że jod może gromadzić się w tkance tłuszczowej, a następnie być wykorzystany do syntezy hormonów. Nadczynność tarczycy indukowana amiodaronem może wystąpić w czasie stosowania leku, jak i po upływie kilku miesięcy od zaprzestania terapii [3]. Ze względu na antyadrenergiczne działanie amiodaronu należy liczyć się ze skąpoobjawowym obrazem klinicznym choroby. Z kolei podczas leczenia INF- α może dojść do zaburzeń czynności tarczycy, co ma związek przede wszystkim z działaniami niepożądanymi INF- α , do których należy pobudzenie mechanizmów autoagresji, zwłaszcza w gruczole tarczowym [4]. Przyczynami endogennej postaci subklinicznej nadczynności mogą być zapalenie tarczycy, choroba Gravesa-Basedowa oraz wole wieloguzkowe [6].

Warunkiem rozpoznania subklinicznej nadczynności tarczycy jest stwierdzenie stężenia TSH poniżej zakresu normy przy prawidłowym stężeniu wolnej i całkowitej tyroksyny oraz trijodotyroniny. U większości chorych przebieg subklinicznej nadczynności tarczycy jest bezobjawowy. Dolegliwości, najczęściej dyskretne, mogą pojawić się szczególnie wówczas, gdy stężenie T_4 mieści się w górnym przedziale normy [7]. Do najczęściej opisywanych objawów odczuwanych przez chorych należą kołatanie serca, nietolerancja ciepła, wzmożone pocenie się, upośledzona tolerancja wysiłku, nadmierna pobudliwość nerwowa, lęk, depresja, zaburzenia snu i trudności w koncentracji [8–9].

W warunkach prawidłowych istnieje równowaga pomiędzy powstającymi wolnymi rodnikami tlenowymi i aktywnością układów antyoksydacyjnych. Wolne rodniki tlenowe wytwarzane są we wszystkich komórkach, zależnie od nasilenia metabolizmu tlenowego. Do najaktywniejszych pod względem biologicznym wolnych rodników tlenowych należą rodnik hydroksylowy (OH^{\cdot}), anionrodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\cdot-}$) oraz nadtlenek wodoru (H_2O_2). Zaburzenie równowagi pomiędzy wytwarzaniem wolnych rodników tlenowych a ich unieczynnianiem prowadzi do rozwoju stresu oksydacyjnego. Wolne rodniki tlenowe łatwo reagują z cząsteczkami lipidów, białek i DNA, prowadząc do uszkodzenia błon komórkowych oraz aktywacji/inaktywacji enzymów. Ostatecznymi skutkami działania wolnych rodników tlenowych są mutacje, dysfunkcje metaboliczne i starzenie się komórek. Te z kolei stanowią przyczynę rozwoju procesów zapalnych, nowotworów oraz zaburzonego funkcjonowania narządów [10, 11].

Ilość wolnych rodników tlenowych zależy od równowagi między ich wytwarzaniem a usuwaniem przez enzymy i substancje nieenzymatyczne o właściwościach antyoksydacyjnych [12, 13]. Pierwszą linią obrony są związki organiczne zawierające jony metali (ferrytyna, transferyna, ceruloplazmina), które zapobiegają powstawaniu wolnych rodników tlenowych. Drugą linią stanowią antyoksydanty drobnocząsteczkowe (α -tokoferol, witamina C, glutation) i enzymy antyoksydacyjne (dysmutaza ponadtlenkowa [SOD, *superoxide dismutase*], peroksydaza glutationowa [GPx, *glutathione peroxidase*], katalaza) powodujące inaktywację wolnych rodników tlenowych. Trzecią linią obrony są systemy naprawcze cząsteczek uszkodzonych przez wolne rodniki tlenowe [13–16].

Celem niniejszej pracy jest ocena zmian stanu oksydacyjnego u kobiet z subkliniczną nieautoimmunologiczną nadczynnością tarczycy.

Materiał i metody

Charakterystykę badanych grup przedstawiono w tabeli I. Badania przeprowadzono u 20 kobiet z subkliniczną nadczynnością tarczycy będącą następstwem leczenia tyroksyną z powodu niedoczynności tarczycy. W badanej grupie stężenia wolnej trijodotyroniny (fT_3) i wolnej tyroksyny (fT_4) były prawidłowe, a stężenia TSH niższe w porównaniu z grupą kontrolną. Grupę kontrolną stanowiło 15 kobiet z prawidłową funkcją tarczycy, co wykazano na podstawie badań stężeń fT_3 , fT_4 i TSH (tab. I). Z badań wykluczono osoby z chorobą niedokrwienną serca, astmą oskrzelową, niewydolnością krążenia, niewydolnością nerek, chorobami wątroby oraz z innymi schorzeniami wymagającymi stosowania przewlekłej farmakoterapii, a także z dodatkim

Tabela I. Charakterystyka badanych grup

Table I. Characteristics of study groups

Parametr	Grupa kontrolna (n = 15)	Subkliniczna nadczynność tarczycy (n = 20)
Wiek (lata)	48,4 ± 11,2	50,4 ± 16,1
BMI [kg/m ²]	24,8 ± 4,1	25,4 ± 3,9
TSH [μIU/ml]	1,156 ± 0,52	0,127 ± 0,133*
fT ₃ [pg/ml]	2,4 ± 0,7	2,61 ± 0,62
fT ₄ [ng/dl]	1,2 ± 0,21	1,33 ± 0,31

* p < 0,001 w porównaniu z grupą kontrolną; BMI (*body mass index*) — wskaźnik masy ciała; fT₃ (*free triiodothyronine*) — wolna trijodotyronina; fT₄ (*free thyroxine*) — wolna tyroksyna; TSH (*thyroid stimulating hormone*) — hormon tyreotropowy

wywiadem w kierunku palenia tytoniu, nadużywania alkoholu i narkomanii. Protokół badania został zaaprobowany przez Lokalną Komisję Bioetyczną Śląskiej Akademii Medycznej w Katowicach (Zgoda nr NN-013-49/00 z dn. 23.02.2000 r.), a uczestniczki wyraziły pisemną, świadomą zgodę na wzięcie w nich udziału.

Krew do badań pobierano na czczo w godzinach porannych do próbek zawierających EDTA, natychmiast odwirowywano i tego samego dnia dokonywano oznaczeń. Aktywność izoform SOD oznaczano według metody Oyanagui [17], wyrażając ją w jednostkach nitrowych/ml (NU/ml). Stężenie aldehydu dimalonowego (MDA, *malondialdehyde*) w osoczu oznaczano metodą kolorymetryczną według Ohkawa [18], wykorzystując reakcję z kwasem tiobarbiturowym. Odczytu ekstynkcji dokonywano przy długości fali 515 nm (absorbancja) i 522 nm (emisja). Stężenie MDA odczytywano z krzywej standardowej.

Uzyskane wyniki przedstawiono jako średnie arytmetyczne ± odchylenia standardowe. Przeprowadzono analizę wariancji z klasyfikacją pojedynczą, sprawdzając wcześniej jednorodność wariancji za pomocą testu Fishera. Jako analizę *post-hoc* zastosowano test Newmana-Keula. Jako znamienne przyjęto p poniżej 0,05.

Wyniki

U kobiet z subkliniczną nadczynnością tarczycy stwierdzono w osoczu wyższą w porównaniu z grupą kontrolną aktywność EC-SOD (13,3 ± 2,1 vs. 10,9 ± 1,4 NU/ml; p < 0,05), natomiast aktywności manganowej dysmutazy ponadtlenkowej (Mn-SOD, *manganese-containing superoxide dismutase*) nie różniły się pomiędzy grupami (4,2 ± 0,5 vs. 4,0 ± 1,0 NU/ml). Badania wykazały również, że u kobiet z nadczynnością tarczycy w porównaniu z grupą kontrolną występuje wyższe stężenie MDA w osoczu niż w grupie kobiet zdrowych (3,5 ± 1,2 vs. 2,0 ± 0,6 μmol/l; p < 0,05) (tab. II).

Tabela II. Parametry stresu oksydacyjnego w osoczu w grupie z subkliniczną nadczynnością tarczycy i w grupie kontrolnej

Table II. Parameters of oxidative stress in patients with subclinical hyperthyroidism and in the control group

Parametr	Grupa kontrolna (n = 15)	Subkliniczna nadczynność tarczycy (n = 20)
EC-SOD [NU/ml]	10,9 ± 1,4	13,3 ± 2,1*
Mn-SOD [NU/ml]	4,0 ± 1,0	4,2 ± 0,5
MDA [μmol/l]	2,0 ± 0,6	3,5 ± 1,2*

* p < 0,05 w porównaniu z grupą kontrolną; EC-SOD (*extracellular superoxide dismutase*) — miedziowo-cynkowa dysmutaza ponadtlenkowa; Mn-SOD (*manganese-containing superoxide dismutase*) — manganowa dysmutaza ponadtlenkowa; MDA (*malondialdehyde*) — aldehyd dimalonowy

Dyskusja

Hormony tarczycy warunkują prawidłowy rozwój i funkcjonowanie organizmu we wszystkich okresach życia człowieka. Od odpowiedniego stężenia T₃ i T₄ zależą takie procesy życiowe, jak: przemiany energetyczne i wytwarzanie ciepła, metabolizm białek, tłuszczów i węglowodanów, bilans wodno-elektrolitowy, gospodarka wapniowo-fosforanowa, a także prawidłowy rozwój i czynność układu nerwowego, mięśniowego i kostnego [19].

Badania z ostatnich lat wskazują na udział stresu oksydacyjnego w rozwoju wielu schorzeń, w tym również chorób gruczołu tarczowego [20]. Dobrze udokumentowano fakt, że nadmiar hormonów tarczycy przyspiesza podstawową przemianę materii, a szczególnie metabolizm tlenowy, o czym świadczy wzrost aktywności enzymów (cyklu Krebsa, cyklu pentozowego i SOD) [21].

Istotną funkcję ochronną organizmu przed szkodliwym działaniem wolnych rodników tlenowych pełni SOD. U ludzi występują 3 izoformy tego enzymu: cytozolowa izoforma miedziowo-cynkowa (Cu/Zn-SOD), mitochondrialna izoforma manganowa (Mn-SOD) oraz pozakomórkowa izoforma miedziowo-cynkowa (EC-SOD). Dysmutaza ponadtlenkowa katalizuje reakcję dysmutacji O₂⁻ do H₂O₂ i molekularnego tlenu (O₂). Pozakomórkowa izoforma miedziowo-cynkowa, podobnie jak Cu/ZnSOD, wykazuje także aktywność peroksydazową, unieczynniając H₂O₂ [22].

W niniejszej pracy wykazano, że aktywność EC-SOD w osoczu pacjentów z subkliniczną nadczynnością tarczycy była wyższa w porównaniu z grupą kontrolną. Nie stwierdzono natomiast różnicy pod względem aktywności Mn-SOD w obu badanych grupach. Analizując dostępne piśmiennictwo, należy zauważyć, że badania aktywności enzymów antyoksydacyjnych w przebiegu subklinicznej nadczynności tarczycy są bardzo nieliczne. Jedynie praca Cetinkaya i wsp. wska-

zuje na zwiększenie aktywności SOD w surowicy chorych z subkliniczną nadczynnością tarczycy [23]. W odróżnieniu od niniejszej pracy autorzy ci nie dokonali podziału na poszczególne izoformy SOD.

Rozpoznanie subklinicznej nadczynności tarczycy wiąże się z takimi zagrożeniami, jak progresja do klinicznie jawnej postaci choroby, powikłania ze strony układu sercowo-naczyniowego oraz układu kostnego [2]. Istnieją również retrospektywne dane o nawet 3-krotnie częstszym występowaniu choroby Alzheimera w tej grupie pacjentów [1]. Ostatnio wykazano, że zarówno śmiertelność ogólna, jak i śmiertelność z powodu schorzeń naczyniowych w grupie powyżej 60. roku życia jest większa w przypadku występowania subklinicznej nadczynności tarczycy [9, 24].

Peroksydacja lipidów jest często ocenianym parametrem, świadczącym o natężeniu stresu oksydacyjnego [25]. Proces ten stanowi najbardziej znaną łańcuchową reakcję wolnorodnikową. Oznaczanie stężeń sprzężonych dienów, substancji reagujących z kwasem tiobarbiturowym bądź MDA to najczęściej stosowane metody służące do oceny nasilenia tego procesu. Proces peroksydacji lipidów jest przyczyną zmian we właściwościach fizykochemicznych błon komórkowych, co prowadzi do zaburzeń transportu błonowego, zmian aktywności enzymów łańcucha oddechowego, jak również zaburzenia przewodzenia sygnałów. W przebiegu stresu oksydacyjnego dochodzi również do zmian struktury i funkcji enzymów, czynników transkrypcyjnych, białek cytoszkieletu oraz utleniania zasad DNA [13, 15, 26]. W dostępnym piśmiennictwie można znaleźć liczne doniesienia o intensyfikacji metabolizmu oksydacyjnego w przebiegu jawnej nadczynności tarczycy [27]. Niewiele istnieje natomiast prac poświęconych kontroli peroksydacji lipidów u chorych z subkliniczną nadczynnością tarczycy [23]. W obecnej pracy wykazano, że zmianom aktywności enzymów antyoksydacyjnych towarzyszy nasilenie procesów peroksydacji lipidów, czego potwierdzenie stanowi stwierdzenie przez autorów niniejszego artykułu wzrost stężenia MDA w osoczu krwi kobiet z subkliniczną nadczynnością tarczycy. Jest to zgodne z wynikami badań Cetinkaya i wsp. [23], którzy na podstawie zmian stężenia MDA w surowicy wykazali nasilenie peroksydacji lipidów w tej grupie chorych.

Obecność nadtlenków lipidów stwierdza się także u osób zdrowych, co wskazuje na fakt, że rodniki te są wytwarzane również w toku fizjologicznych procesów metabolicznych [28]. W obecnym badaniu wykazano podwyższone stężenie MDA w osoczu u pacjentów z subkliniczną nadczynnością tarczycy, co przemawia za nadprodukcją wolnych rodników tlenowych. Dane te pozwalają przypuszczać, że w obrębie zajętych cho-

rowo tkanek może dochodzić do nasilenia peroksydacji lipidów przy udziale wytwarzanych w zwiększonych ilościach wolnych rodników tlenowych.

Wnioski

W grupie chorych z subkliniczną nadczynnością tarczycy występują zaburzenia równowagi oksydacyjnej przejawiające się wzrostem aktywności EC-SOD w osoczu. Procesowi temu towarzyszy podwyższone stężenie MDA, świadczące o nasileniu peroksydacji lipidów w tej grupie chorych.

Piśmiennictwo

- Biondi B, Palmieri EA, Klain M i wsp. Subclinical hyperthyroidism clinical and treatment options. *Eur J Endocrinol* 2005; 152: 1–9.
- Al-Abadi A.C. Subclinical thyrotoxicosis. *Postgrad Med J* 2001; 77: 29–32.
- Gietka-Czernel M, Jastrzębska H. Rozpoznanie i leczenie chorób tarczycy. Ośrodek Informacji Naukowej „Polfa”, Warszawa 2002.
- Prummel MF, Laurberg P. Interferon-alpha and autoimmune thyroid disease. *Thyroid* 2003; 13: 547–551.
- Markau K, Georgopoulos N, Kyriazopoulou V i wsp. Iodine-induced hypothyroidism. *Thyroid* 2001; 11: 501–510.
- Fatourechhi V. Subclinical thyroid disease. *Mayo Clin Proc* 2001; 76: 413–446.
- Toft AD. Clinical practice. Subclinical hyperthyroidism. *N Engl J Med* 2001; 345: 512–516.
- Burmeister LA, Flores A. Subclinical thyrotoxicosis and the heart. *Thyroid* 2002; 12: 495–499.
- Duntas LH. Subclinical thyroid disorders: the menace of the Trojan horse. *J Endocrinol Invest* 2003; 26: 472–480.
- Zablocka A, Janusz M. The two faces of reactive oxygen species. *Post Hig Med Dośw* 2008; 26, 62: 118–124.
- Nunomura A, Moreira PI, Takeda A i wsp. Oxidative RNA damage and neurodegeneration. *Curr Med Chem* 2007; 14: 2968–2975.
- Rahman I, Biswas SK, Kode A. Oxidant and antioxidant balance in the airway and airway diseases. *Eur J Pharmacol* 2006; 533: 222–239.
- Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002; 82: 47–95.
- Andreadis AA, Hazen SL, Comhair SA i wsp. Oxidative and nitrosative events in asthma. *Free Radic Biol Med* 2003; 35: 213–225.
- Skrzydłewska E, Farbiszewski R. Interakcje wolnych rodników z białkami. *Post Hig Med Dośw* 1995; 49: 747–766.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol JI i wsp. Free radicals and antioxidant in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39: 44–84.
- Oyanagui Y. Reevaluation of assay methods and establishment of kidney superoxide dismutase activity. *Anal Biochem* 1984; 142: 290–296.
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for peroxides in animal tissue by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95: 351–358.
- Harper ME, Seifert EL. Thyroid hormone effects on mitochondrial energetics. *Thyroid* 2008; 18: 145–156.
- Duntas LH. Oxidant, antioxidant in physical exercise and relation to thyroid function. *Horm Metab Res* 2005; 37: 572–576.
- Venditti P, Di Meo S. Thyroid hormone-induced oxidative stress. *Cell Mol Life Sci* 2006; 63: 414–434.
- Skrzycki M, Czczot H. Extracellular superoxide dismutase (EC-SOD) — structure, properties and functions. *Post Hig Med Dośw* 2004; 24: 301–311.
- Cetinkaya A, Kurutas EB, Buyukbese MA i wsp. Levels of malondialdehyde and superoxide dismutase in subclinical hyperthyroidism. *Mediators Inflamm* 2005; 24: 57–59.
- Boelaert K, Franklyn JA. Thyroid hormone in health and disease. *J Endocrinol* 2005; 187: 1–15.
- Bartosz G. Druga twarz tlenu. Wolne rodniki w przyrodzie. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2003.
- Thannickal VJ, Fanburg BL. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000; 279: L1005–L1028.
- Lampka M, Junik R, Nowicka A i wsp. Oxidative stress markers during a course of hyperthyroidism. *Endokrynol Pol* 2006; 57: 218–222.
- Zhang R, Brennan ML, Shen Z. i wsp. Myeloperoxidase functions as a major enzymatic catalyst for initiation of lipid peroxidation as sites of inflammation. *J Biol Chem* 2002; 277: 46116–46122.