

◆ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЭНДОКРИНОЛОГИЯ

© Л. И. НАДОЛЬНИК, 2005

УДК 616.441-008.94:577.175.444]-074-092.9

Л. И. Надольник

СОСТОЯНИЕ ТИРОЦИТОВ КРЫС ПРИ ОКИСЛИТЕЛЬНОМ СТРЕССЕ¹

Лаборатория биохимии эндокринных желез (зав. — проф. В. В. Виноградов), Института биохимии НАН Республики Беларусь, Гродно, Республика Беларусь

Йод является важнейшим регулятором функциональной активности клеток щитовидной железы (ЩЖ), однако нарушение метаболических процессов в тироцитах может быть обусловлено, по-видимому, не только йодной недостаточностью. Цель работы — исследование влияния Fe^{2+} /аскорбатзависимой активации окислительного стресса на функциональную активность тироцитов органичной культуры ЩЖ крыс. Показано, что увеличение в среде концентрации альдегидных продуктов перекисидации липидов в 2,88–6,76 раза ($p < 0,001$) сопровождается снижением наработки тироцитами тироксина (T_4), наиболее выражено через 6 ч (в 1,7–3,2 раза), увеличением экскреции трийодтиронина (T_3) на 120–250% и повышением в 1,5–3,0 раза соотношения T_3/T_4 в культуральной среде. Это, наиболее вероятно, следствие нарушения органификации йода в клетках ЩЖ в условиях активации окислительного стресса. Представленные данные позволяют авторам высказать предположение о выраженной чувствительности важнейших этапов биосинтеза тиреоидных гормонов в ЩЖ к повышению концентрации активных форм кислорода, перекисей, продуктов перекисидации липидов. Этот фактор может вносить определенный вклад в патогенез эндемической и зобной патологии ЩЖ.

Ключевые слова: функциональная активность тироцитов, Fe^{2+} /аскорбат, окислительный стресс.

Iodine is the most important regulator of the functional activity of thyroid cells; however, not only may iodine deficiency be responsible for impaired metabolic processes in the thyrocytes. The purpose of the study was to examine the impact of Fe^{2+} /ascorbate-dependent activation of oxidative stress on the functional activity of cultured rat thyrocytes. The 2.88–6.76-fold rise ($p < 0.001$) in the concentration of aldehyde lipid peroxidation products was shown to be followed by the decreased thyrocytic generation of thyroxine (T_4), the latter being most pronounced 6 hours late (by 1.7–3.2 times), by a 120–250% increase in triiodothyronine (T_3) excretion and a 1.5–3.0-fold rise in T_3/T_4 ratios in the culture medium. This is most likely to result from impaired thyrocytic iodine organification under activated oxidative stress. The findings suggest that the most important stages of biosynthesis of thyroid hormones in the thyroid are significantly sensitive to the elevated concentrations of active oxygen forms, peroxides, and lipid peroxidation peroxidation products. This factor may make a certain contribution to the pathogenesis of endemic and goiter pathology of the thyroid.

Key words: thyrocytic activity, Fe^{2+} /ascorbate, oxidative stress.

Йод играет центральную роль в физиологии щитовидной железы (ЩЖ). Этот микроэлемент является не только незаменимым субстратом для синтеза тиреоидных гормонов, но и регулятором гормоногенеза и пролиферации тироцитов. Длительное время йодная недостаточность считалась практически единственным фактором, провоцирующим развитие эндемической зобной патологии, а также узловой патологии ЩЖ. Однако увеличение числа заболеваний ЩЖ у лиц, проживающих в экологически неблагоприятных районах [1, 6], однозначно свидетельствует о том, что не только дефицит эндогенного йода провоцирует нарушение функции ЩЖ. Отмечен рост узловой патологии (аденомы, рака, коллоидных узлов), а также аутоиммунного тиреоидита у жителей Маршалловых островов [7, 12], Хиросимы и Нагасаки после взрыва атомной бомбы [19], а также Белоруссии, России и Украины после аварии на Чернобыльской АЭС [1, 15, 16]. Какие же факторы могут стимулировать нарушение функции ЩЖ? До настоящего времени механизмы развития аутоиммунной патологии ЩЖ, возникновения доброкачественных и злокачественных опухолевых узловых образований окончательно не установлены.

Хорошо известен ряд специфических структурно-функциональных особенностей клеток ЩЖ: тироциты относятся к немногочисленным клеткам, специализированный метаболизм которых предполагает постоянное образование высоких концентраций активных форм кислорода в ответ на физиологическое стимулирующее действие тиреотропного гормона; важнейшие этапы биосинтеза тиреоидных гормонов в тироцитах теснейшим образом сопряжены с клеточной мембраной: это импорт йода недавно открытым специфическим натрий-йодным симпортером [8], окисление йодида ассоциированной на апикальной мембране тиреопероксидазой; органические соединения йода являются внутриклеточными медиаторами, регулирующими рост и пролиферацию клеток ЩЖ.

Эти особенности предполагают, что значительное нарушение процессов поглощения и органификации йода в клетках ЩЖ можно наблюдать в условиях активации окислительного стресса. Активность различных звеньев антиоксидантного статуса ЩЖ детально не исследована, и это представляет особый интерес в связи со специфическим фолликулярным строением ткани ЩЖ, где по сути органификация йода происходит во внеклеточном фолликулярном пространстве.

Основная задача нашей работы — изучить влияние Fe^{2+} /аскорбатзависимой активации перекисного окисления липидов (ПОЛ) на функциональ-

¹Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант № Б01-343).

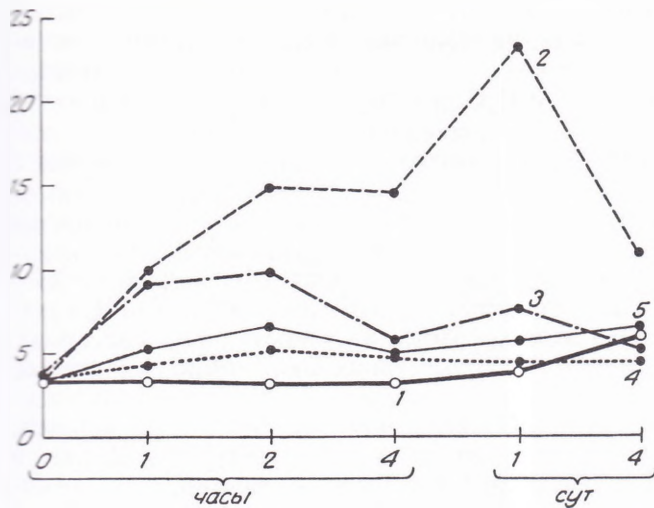


Рис. 1. Концентрация ТБКРС (в мМ/мл) в культуральной среде при Fe^{2+} /аскорбатзависимой активации ПОЛ.

Здесь и на рис. 2—4 каждая точка представлена как среднее 3—5 параллельных опытов. По осям абсцисс — время культивирования. 1 — контроль; 2 — концентрация Fe^{2+} /аскорбата $0,1 \cdot 10^{-3}$ М; 3 — $0,2 \cdot 10^{-4}$ М; 4 — $0,1 \cdot 10^{-4}$ М; 5 — $0,2 \cdot 10^{-5}$ М.

ную активность тироцитов органной культуры ЩЖ крыс в условиях культивирования *in vitro*.

Материалы и методы

Органную культуру ЩЖ крыс получали с использованием метода, отработанного нами ранее для ЩЖ новорожденных поросят и человека [2, 3]. ЩЖ у крыс брали в стерильных условиях и помещали в раствор Хенкса, измельчали до размеров $1-1,5 \text{ мм}^3$, тщательно отмывали раствором Хенкса и помещали в сосуд для культивирования. Культивирование проводили в среде 199 с солями Хенкса, 20 мМ HEPES и L-глутамином, содержащей 1% эмбриональной телячьей сыворотки, 10 ЕД/мл пенициллина, 10 мг/мл стрептомицина, в закрытых сосудах при 37°C . После 24 ч культивирования отбирали пробы среды для определения в ней содержания трийодтиронина (T_3) и тироксина (T_4) (нулевая точка). В культуральную среду вносили Fe^{2+} /аскорбат в концентрациях $0,1 \cdot 10^{-3}$, $0,2 \cdot 10^{-4}$, $0,1 \cdot 10^{-4}$, $0,4 \cdot 10^{-5}$, $0,2 \cdot 10^{-5}$ М. Пробы среды для определения концентрации гормонов брали через 1, 2, 4, 6 ч и 1, 2, 4 сут после добавления прооксидантов. После 1 сут культивирования в присутствии прооксидантов проводили полную замену среды и далее культивирование осуществляли в новой среде (2—4 сут). В культуральной среде определяли содержание T_3 и T_4 радиоиммунологическим методом с использованием наборов ХОП ИБОХ НАН Республики Беларусь, а также концентрацию стабильных альдегидных продуктов ПОЛ, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБКРС) [5].

Результаты и их обсуждение

Внесение в культуральную среду Fe^{2+} /аскорбата в концентрациях $0,1 \cdot 10^{-3}$, $0,2 \cdot 10^{-4}$ М сопровождается выраженным повышением содержания стабильных альдегидных продуктов ПОЛ уже через 2 ч (рис. 1).

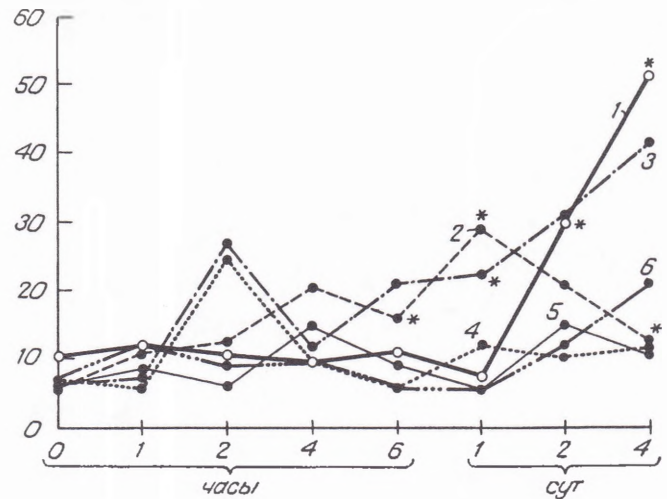


Рис. 2. Соотношение гормонов (T_3/T_4) в культуральной среде при Fe^{2+} /аскорбатзависимой активации ПОЛ. Здесь и на рис. 3, 4 * — $p < 0,05$ по отношению к нулевой точке. 6 — концентрация Fe^{2+} /аскорбата $0,4 \cdot 10^{-5}$ М.

При концентрации прооксидантов $0,1 \cdot 10^{-3}$ М уровень ТБКРС возрастает наиболее значительно — в 2,88—6,76 раза по сравнению с контрольными значениями. Активация свободнорадикального окисления в значительной мере влияет на функциональную активность культивируемых тироцитов. Об этом в первую очередь свидетельствует изменение соотношения синтезируемых гормонов T_3/T_4 в среде (рис. 2). Как видно из представленных данных, соотношение T_3/T_4 в контрольных пробах сохраняется практически постоянным в течение 24 ч эксперимента. В условиях Fe^{2+} /аскорбатзависимой активации ПОЛ наблюдали значительное увеличение (в 1,5—3,0 раза) соотношения T_3/T_4 через 2—24 ч при концентрациях прооксидантов $0,1 \cdot 10^{-3}$, $0,2 \cdot 10^{-4}$ М, что обусловлено как повышением уровня T_3 в среде, так и снижением содержания T_4 .

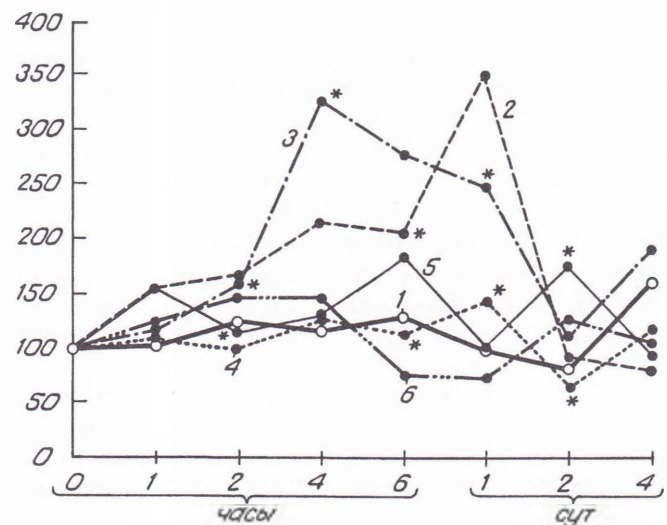


Рис. 3. Содержание T_3 в культуральной среде (в % по отношению к нулевой точке) при Fe^{2+} /аскорбатзависимой активации ПОЛ. Здесь и на рис. 4 по осям абсцисс за "0" принята точка добавления прооксидантов.

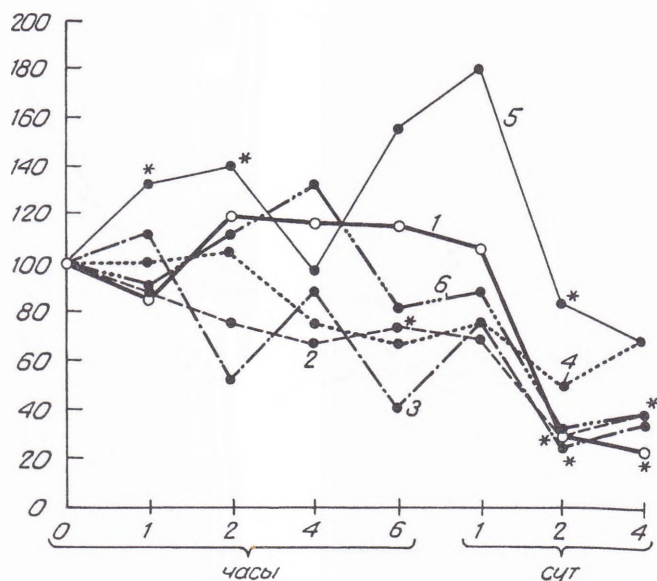


Рис. 4. Содержание T_4 в культуральной среде (в % по отношению к нулевой точке) при Fe^{2+} /аскорбатзависимой активации ПОЛ.

При концентрациях Fe^{2+} /аскорбата $0,1 \cdot 10^{-3}$, $0,2 \cdot 10^{-4}$ М на протяжении 2–24 ч наблюдали выраженное повышение (рис. 3), которое составляет 120–250% по сравнению с исходным уровнем (нулевая точка). И лишь к 48 ч опыта уровень T_3 снижался до контрольных значений. При более низких концентрациях прооксидантов повышение содержания T_3 в среде менее выражено или отсутствует. Другая закономерность выявлена нами в изменении наработки клетками основного гормона ЩЖ T_4 (рис. 4). При концентрациях прооксидантов $0,1 \cdot 10^{-3}$ – $0,1 \cdot 10^{-4}$ М наблюдается, по-видимому, ингибирование синтеза T_4 , поскольку его уровень в культуральной среде снижается на протяжении 2–24 ч, наиболее выражено к 6 ч опыта (в 1,7–3,2 раза). При концентрации в среде Fe^{2+} /аскорбата $0,4 \cdot 10^{-5}$ М содержание T_4 снижается лишь к 6 ч, и только при концентрации Fe^{2+} /аскорбата $0,2 \cdot 10^{-5}$ ингибирующий эффект прооксидантов отсутствовал, более того, наработка T_4 тироцитами была еще более значительной, чем в контроле. Уровень T_4 в среде повышался через 1 ч на 35,0%, далее наблюдали снижение через 4 ч и еще более значимое повышение (на 78,8%) через 24 ч. Необходимо отметить, что незначительная стимуляция синтеза T_4 отмечена через 1 ч и при более высоких концентрациях в среде прооксидантов, однако в дальнейшем она сменялась угнетением наработки этого гормона.

Полученные данные однозначно свидетельствуют о том, что активация процессов свободнорадикального окисления сопровождается выраженными сдвигами в реакциях синтеза тиреоидных гормонов в клетках ЩЖ. Поскольку активация окислительного стресса вызывает увеличение продукции менее йодированного гормона T_3 и снижение — более йодированного T_4 , можно полагать, что эти сдвиги обусловлены нарушением процессов орга-

нификации йода в тироцитах. Это, по-видимому, возможно, на этапе окисления йода тиреопероксидазой, поскольку установлено, что высокие концентрации H_2O_2 и супероксидного радикала ингибируют тиреопероксидазу [11]. Кроме того, показано, что H_2O_2 вызывает повреждение (увеличивает фрагментацию) тиреоглобулина [10]. По-видимому, состояние антиоксидантного статуса тироцитов значительно влияет на их функциональную активность, учитывая, что специализированный метаболизм этих клеток предполагает образование в высокой концентрации активных форм кислорода. Показано, что активация окислительного стресса приводит к индукции апоптоза и некроза тироцитов [9, 18]. Представляют интерес данные авторов, показавших, что важнейший регулятор функции ЩЖ тиреотропный гормон регулирует и транскрипцию тиолспецифического антиоксиданта в ЩЖ [13]. Полученные данные согласуются с более ранними нашими результатами, полученными в экспериментах *in vivo*, где было установлено, что воздействие внешнего радиационного излучения в дозах 0,25–5,0 Гр сопровождается активацией окислительного стресса в ЩЖ и снижением концентрации T_4 , а в более поздние сроки — и T_3 в крови крыс [4]. Активацией окислительного стресса в клетках ЩЖ авторы объясняют развитие гипотиреоидного состояния у голубей при голодании [17]. Не исключено, что следствием окислительных повреждений тироцитов является развитие узловой патологии ЩЖ, поскольку в узловой ткани аденомы и рака ЩЖ больных, оперированных по поводу эутиреоидного узлового зоба, обнаружены значительная активация антиоксидантных систем и повышение концентрации токсичных продуктов перекисидации липидов [14].

Таким образом, представленные данные свидетельствуют о том, что активация окислительного стресса, сопровождающаяся повышением концентрации активных форм кислорода, перекисей, продуктов перекисидации липидов, может рассматриваться как фактор, вызывающий нарушение метаболизма йода в тироцитах, что, по-видимому, может играть определенную роль в патогенезе эндемического и узлового зоба. Однако механизмы реализации ингибирующего эффекта окислительного стресса, безусловно, требуют более детального исследования.

Выводы

1. Fe^{2+} /аскорбатзависимая активация окислительного стресса *in vitro* вызывает увеличение соотношения гормонов T_3/T_4 в культуральной среде, что обусловлено снижением экскреции T_4 и увеличением продукции T_3 тироцитами органной культуры ЩЖ крыс.

2. Выраженное нарушение экскреции тиреоидных гормонов в условиях активации окислительного стресса свидетельствует о модулирующей роли активных форм кислорода, продуктов перекисидации липидов в отношении процессов биосинтеза тиреоидных гормонов в клетках ЩЖ.

ЛИТЕРАТУРА

- Дедов В. И., Дедов И. И., Степаненко В. Ф. Радиационная эндокринология. — М., 1993.
- Надольник Л. И., Гривачевский А. С., Басинский В. А. // Труды Регионального эндокринологического науч.-практ. центра. — 1997. — № 1—2. — С. 103—112.
- Надольник Л. И., Басинский В. А., Мартынич Д. И., Виноградов В. В. // Рос. физиол. журн. — 2001. — Т. 87, № 3. — С. 375—382.
- Надольник Л. И., Нецецкая З. В., Виноградов В. В. // Ради-ан. биол. Радиоэкол. — 2003. — Т. 45, № 1. — С. 65—70.
- Стальная И. Д., Гаришвили Т. Г. // Современные методы в биохимии / Под ред. В. Н. Ореховича. — М., 1977. — С. 66—68.
- Талантов В. В. // Пробл. эндокринол. — 1989. — Т. 47, № 4. — С. 43—45.
- Conard R., Rall, Sntow W. // N. Engl. J. Med. — 1966. — Vol. 274. — P. 1391—1399.
- Dai G., Levy O., Carrasco N. // Nature. — 1996. — Vol. 379. — P. 458—460.
- Donnini D., Zambito A. M., Perrella G. et al. // Biochem. Bio-phys. Res. Commun. — 1996. — Vol. 219, N 2. — P. 412—417.
- Duthoit C., Estienne V., Giraud A. et al. // Biochem. J. — 2001. — Vol. 360, Pt 3. — P. 557—562.
- Fukayama H., Murakami S., Nasu M., Sugawara M. // Thy-roid. — 1991. — Vol. 1, N 3. — P. 267—271.
- Hamilton N., Belle G., Lo Gerfo J. // J. A. M. A. — 1987. — Vol. 258. — P. 629—636.
- Kim H., Park S., Suh J. et al. // Cell. Physiol. Biochem. — 2001. — Vol. 11, N 5. — P. 247—252.
- Nadolnik L., Petushok N., Khomich T., Grivachevsky A. // XXXVIII Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego. — Wroclaw, 2002. — P. 185.
- Nikiforov Y., Gnepp D. R., Fagini J. A. // J. Clin. Endocrinol. Metab. — 1996. — Vol. 81. — P. 9—14.
- Pacini F., Vorontsova T., Molinaro E. et al. // Lancet. — 1998. — Vol. 352. — P. 763—766.
- Prem P., Parihar M. S., Malini L., Pradeep K. G. // Biochem. Mol. Biol. Int. — 1998. — Vol. 45, N 1. — P. 73—83.
- Riou C., Remy C., Rabilloud R. et al. // J. Endocrinol. — 1998. — Vol. 156, N 2. — P. 315—352.
- Socolow E., Hashizume A., Neviishi S. // N. Engl. J. Med. — 1963. — Vol. 268. — P. 406—410.

Поступила 06.05.04

♦ ОБЗОРЫ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2005

УДК 616.379-008.64-021.03

И. И. Дедов, К. И. Табеева, Т. В. Никонова, О. М. Смирнова

ИДИОПАТИЧЕСКИЙ ДИАБЕТ

ГУ Эндокринологический научный центр (дир. — акад. РАН И. И. Дедов) РАМН, Москва

Сахарный диабет — это группа метаболических (обменных) заболеваний, характеризующихся гипергликемией, которая является результатом дефектов секреции инсулина, действия инсулина или обоих этих факторов (ВОЗ, 1999 г.). В последней этиологической классификации (ВОЗ, 1999 г.) выделяют 4 клинических типа сахарного диабета: 1-й тип, 2-й тип, другие типы (инфекции, генетические нарушения и др.) и гестационный диабет. Сахарный диабет 1-го типа включает в себя заболевания, обусловленные деструкцией β -клеток поджелудочной железы, абсолютной недостаточностью инсулина и склонностью к кетоацидозу. Подавляющее большинство таких случаев имеет аутоиммунный характер поражения, но есть группы пациентов, у которых не выявляются маркеры аутоиммунного процесса. Учитывая это, по данной классификации диабет 1-го типа включает в себя 2 вида: аутоиммунный и идиопатический. Идиопатический сахарный диабет называют также диабетом 1-го В типа, атипичным диабетом 1-го типа, диабетом, склонным к кетозу, тропическим диабетом [8, 10].

Ранее считалось, что идиопатический диабет 1-го типа встречается только у пациентов африканского и азиатского происхождения [5, 10, 11]. Однако в последние годы появились данные о том, что сахарный диабет с клинической картиной, свойственной 1-му типу, но не имеющий маркеров аутоиммунного поражения β -клеток, встречается также и у лиц европеоидной расы, составляя незна-

чительный процент больных сахарным диабетом [12, 13]. Были описаны случаи идиопатического диабета среди испанцев, итальянцев, жителей Японии [7, 13]. Так, итальянские ученые из Университета "La Sapienza" (Рим) в своем исследовании показали, что больные идиопатическим диабетом встречаются и среди жителей Италии, но составляют небольшое количество больных сахарным диабетом [13].

Патогенез. Точный механизм возникновения сахарного диабета 1-го В типа неизвестен. Считается, что это гетерогенное заболевание [5, 9]. Есть предположения, что пусковым моментом поражения β -клеток являются вирусные инфекции, хромосомные аномалии, поражение экзокринного аппарата поджелудочной железы [7]. Ученые из Hospital Saint-Louis (Париж) в своей работе, посвященной идиопатическому диабету, высказывают мнение о том, что в развитие данного заболевания вносят вклад такие процессы, как глюкозотоксичность и липотоксичность, стресс, нарушение регуляции глюкагоном [10].

Диагностика. Идиопатический сахарный диабет характеризуется ярко выраженной клинической картиной [4]. У пациентов появляются такие жалобы, как сильнейшая жажда, сухость во рту, учащенное обильное мочеиспускание, потеря массы тела, слабость, быстрая утомляемость, сухость кожи, могут отмечаться зуд кожи, снижение остроты зрения. Также этим пациентам свойственно повышение