

3. Снижение уровня тестостерона у мужчин с сердечно-сосудистой патологией ассоциируется с повышенными уровнями атерогенных липопротеидов, а также с развитием депрессии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Андрология. Мужское здоровье и дисфункция репродуктивной системы / Под ред. Э. Нишлага, Г. М. Бере; Пер. с англ. — М., 2005.
2. Гончаров Н. П., Каця Г. В., Колесникова Г. С. и др. // Андрол. и генитальная хир. — 2005. — № 2. — С. 43—50.
3. Дедов И. И., Калинин С. Ю. Возрастной андрогенный дефицит у мужчин. — М., 2006.
4. Диагностика и коррекция нарушений липидного обмена с целью профилактики и лечения атеросклероза: ВНОК. — М., 2005.
5. Després J. P. // Crit. Pathw. Cardiol. — 2007. — Vol. 6, N 2. — P. 51—59.

6. Feldman H. A., Longcope C., Derby C. A. et al. // J. Clin. Endocrinol. Metab. — 2002. — Vol. 87. — P. 589—598.
7. Hak E., Witteman J. C., de Jong F. H. et al. // J. Clin. Endocrinol. Metab. — 2002. — Vol. 87, N 8. — P. 3632—3639.
8. Kondos G. T., Hoff J. A., Sevruck A. et al. // Circulation. — 2003. — Vol. 107, N 20. — P. 2571—2576.
9. Kragelund C., Omland T. // Lancet. — 2005. — Vol. 366. — P. 1589—1591.
10. Nieschlag E., Swerdloff R., Bhere H. M. et al. // J. Androl. — 2006. — Vol. 27, N 2. — P. 135—137.
11. Rosner W., Auchus R. J., Azziz R. et al. // J. Clin. Endocrinol. Metab. — 2007. — Vol. 92, N 2. — P. 405—413.
12. Seidman S. N., Walsh B. T. // Am. J. Geriatr. Psychiatry. — 1999. — Vol. 7. — P. 18—33.
13. Svartberg J., von Muhlen D., Sundsfjord J. et al. // Eur. J. Epidemiol. — 2004. — Vol. 19, N 7. — P. 657—663.
14. Taieb J., Mathian B., Millo F. et al. // Clin. Chem. — 2003. — Vol. 49. — P. 1381—1395.
15. Zigmond A. S., Snaith R. P. // Acta Psychiatr. Scand. — 1983. — Vol. 67. — P. 361—370.

Поступила 16.01.08

◆ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЭНДОКРИНОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2009

УДК 616.441-006.6-07:577.21

Т. М. Мишунина, Е. В. Калинин, Н. Д. Тронько

ИНТЕНСИВНОСТЬ ФРАГМЕНТАЦИИ ДНК В ТКАНИ И КАРЦИНОМАХ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЧЕЛОВЕКА И ЕЕ ИЗМЕНЕНИЕ ПОД ВЛИЯНИЕМ α -ТОКОФЕРОЛА И ИОНОВ ЙОДА IN VITRO

Институт эндокринологии и обмена веществ им. В. П. Комиссаренко АМН Украины, Киев

Исследовали интенсивность фрагментации ДНК в неизменной ткани щитовидной железы и ткани карцином щитовидной железы. Определение концентрации низкомолекулярной ДНК, а также электрофоретический анализ ДНК, выделенной из ткани щитовидной железы и опухолей, с последующим количественным расчетом содержания фракций олигонуклеосом показали резкое снижение интенсивности фрагментации ДНК в папиллярных карциномах и отсутствие существенных ее сдвигов в фолликулярных карциномах. В неизменной ткани щитовидной железы α -токоферол и йодид калия in vitro в концентрации 10^{-5} М тормозили интенсивность стимулированной фрагментации ДНК. В ткани папиллярных карцином влияние препаратов отсутствовало, а в фолликулярных их эффект был подобен таковому в неизменной ткани щитовидной железы, но менее выражен.

Ключевые слова: карциномы щитовидной железы, фрагментация ДНК, α -токоферол, ионы йода, апоптоз

T. M. Mishunina, Ye. V. Kalinichenko, N. D. Tronko

DNA FRAGMENTATION RATE IN HUMAN THYROID TISSUE AND CARCINOMAS AND ITS CHANGE UNDER THE INFLUENCE OF α -TOCOPHEROL AND IODINE IONS IN VITRO

V. P. Komissarenko Institute of Endocrinology and Metabolism, Academy of Medical Sciences of the Ukraine, Kiev

The rate of DNA fragmentation was studied in intact thyroid tissue and thyroid carcinoma tissue. The determination of low molecular-weight DNA concentrations and the electrophoretic analysis of DNA isolated from the thyroid tissues and tumors, followed by the calculation of the content of oligonucleosome fractions, indicated a drastic reduction in the DNA fragmentation rate in papillary carcinomas and no its significant changes in follicular carcinomas. In the intact thyroid tissue, α -tocopherol and potassium iodide at a concentration of 10^{-5} M inhibited the rate of stimulated DNA fragmentation in vitro. The agents showed no effect in the papillary carcinoma tissue and their effect was similar in the follicular carcinoma tissue, but it was less pronounced in intact thyroid tissue.

Key words: thyroid carcinoma, DNA fragmentation, α -tocopherol, iodine ions, apoptosis.

Межнуклеосомное расщепление (фрагментация) ДНК — одно из биохимических проявлений апоптоза

Информация для контактов:

Мишунина Тамара Марьяновна:

Институт эндокринологии и обмена веществ им. В. П. Комиссаренко АМН Украины

Адрес: 04114, Киев, ул. Вышгородская, 69

e-mail: simona@asvitonline.com

[6], который ответственен за элиминацию трансформированных клеток и играет важную роль в контроле величины клеточной популяции. В то же время широко распространенное мнение о снижении апоптозной активности в злокачественных опухолях справедливо только для определенных их типов [16].

Для щитовидной железы (ЩЖ) наибольшая интенсивность апоптоза установлена в медулярных, анапластических и оксифильноклеточных адено-

карциномах [15, 19], тогда как в папиллярных и фолликулярных аденокарциномах его уровень низок [16]. Морфологическими исследованиями выяснено, что апоптозный индекс в папиллярных карциномах существенно выше, чем в фолликулярных и медулярных карциномах, где он равен нулю [6]. В то же время при сравнении интенсивности апоптоза в папиллярных карциномах ЩЖ было установлено, что в 41% карцином апоптозная активность была на следовом уровне, характерном для нормальной ткани, в 44% — низкой, а в 15% — высокой [13], что может быть объяснено как разной скоростью роста опухолей (в быстрорастущих опухолях повышен индекс "оборота" клеточной популяции), так и стадией их развития.

Целью настоящей работы явилось исследование интенсивности межнуклеосомной фрагментации ДНК в ткани ЩЖ и карциномах ЩЖ человека. Особый интерес при этом представляло выяснение влияния на фрагментацию ДНК α -токоферола и ионов йода. Установлены роль активных радикалов кислорода в инициации митохондриальных механизмов апоптоза и нарушение последних в клетках папиллярных карцином [17]. Ионы йода в свою очередь дают в тиреоцитах дозозависимый эффект на сигнальные механизмы инициации апоптоза, связанные с участием рецепторов смерти, а также снижают чувствительность клеток папиллярной карциномы к апоптозным стимулам [20]. С другой стороны, известно мнение о том, что токсичность для тиреоцитов избытка молекулярного йода, который образуется при окислении ионизированного эндогенными пероксидазами, связана с образованием активных форм кислорода, продуктов перекисного окисления липидов и активацией апоптоза клеток ЩЖ [18].

В литературе приведены данные, в том числе и для опухолей ЩЖ [19], свидетельствующие о том, что регистрация межнуклеосомной фрагментации ДНК не может быть абсолютным доказательством смерти клетки в результате апоптоза. Строго говоря, наличие фрагментации ДНК указывает на апоптоз лишь в сочетании с анализом характерных для него морфологических изменений или с регистрацией активации каспаз. Учитывая тот факт, что электрофоретическое разделение ДНК на олигонуклеосомные фракции в большинстве своем является качественным подтверждением ее межнуклеосомной фрагментации, используют также и различные количественные методы определения содержания растворимых полидезоксинуклеотидов [4, 5, 10]. При этом считают достаточным подтверждение апоптоза одновременным электрофоретическим анализом ДНК ("апоптозная лесенка"). Указанное выше принимали во внимание при обсуждении полученных результатов и формулировании осторожных выводов об уровне апоптоза в опухолях ЩЖ и о возможных механизмах влияния α -токоферола и ионов йода на межнуклеосомную фрагментацию ДНК.

Материалы и методы

На проведение исследований было получено разрешение Комитета института по биоэтике.

Исследовано 20 образцов опухолей ЩЖ (16 папиллярных аденокарцином и 4 фолликулярные аденокарциномы). Средний возраст больных этой группы составил 36,3 года (от 19 до 70 лет), среди них 12 женщин и 8 мужчин. В группу сравнения включены 15 образцов неизмененной (заключение патолога — "ткань нормофолликулярного строения без особенностей") ткани ЩЖ, полученной при субтотальной резекции железы по поводу эутиреоидного узлового зоба или аденомы, а также при тотальной тиреоидэктомии по поводу рака ЩЖ. Возраст больных (8 женщин и 7 мужчин) колебался от 17 до 54 лет (37,4 года).

Концентрацию растворимых низкомолекулярных фрагментов ДНК определяли после лизиса клеток в надосадочной жидкости, а высокомолекулярных — в осадке в реакции с дифениламином [4]. ДНК выделяли из ткани ЩЖ ранее описанным методом [3] после предварительной инкубации срезов железы на протяжении 4 ч при 37°C в 1 мл Кребс—Рингер-фосфатного буфера [4]. В пробы вносили соответственно растворы α -токоферола или йодида калия (KI) до конечной расчетной концентрации 10^{-3} М или 10^{-7} М. α -Токоферол предварительно растворяли в небольшом количестве этилового спирта, после чего готовили его буферные растворы. В одну пробу препараты не вносили и рассматривали интенсивность фрагментации ДНК в ней как базальную.

Электрофорез ДНК проводили в агарозном геле [3]. Локализацию фрагментов ДНК на геле определяли в трансиллюминаторе, фореграммы с цифровых фотографий сканировали, используя программу "Photo Capt Mw", с помощью последней рассчитывали относительное содержание фракций олигонуклеосом. Эффект препаратов оценивали в процентах от базального уровня ($\pm \Delta\%$). Полученные данные обработаны статистически с использованием критерия *t* Стьюдента и непараметрических критериев Вилкоксона и Манна—Уитни. Критический уровень значимости принимали равным 0,05. В таблицах данные представлены как $M \pm m$.

Результаты и их обсуждение

Как следует из данных, представленных в табл. 1, содержание высокомолекулярной ДНК (в составе хроматина) в ткани папиллярных аденокарцином оказалось выше, чем в неизмененной ткани ЩЖ. Более значимые изменения наблюдались в опухолях, размер которых соответствовал стадии T₄ и опухолях фолликулярно-папиллярного строения. В то же время концентрация низкомолекулярных фрагментов ДНК (растворимые полидезоксинуклеотиды, которые выходят после фрагментации ДНК из ядра в цитоплазму) и их доля в ткани папиллярных карцином ниже, чем в неизмененной ткани ЩЖ, при этом не отмечено значительных различий уровня фрагментированной ДНК в зависимости от размера опухоли. Доля фрагментированной ДНК наиболее низка в папиллярных карциномах фолликулярно-папиллярного строения, менее значительно это снижение в опухолях типичного папиллярного строения. Полученные данные

Таблица 1

Концентрация ДНК и доля фрагментированной ДНК в неизменной ткани и ткани карцином ЩЖ

Ткань	n	Концентрация ДНК, мкг на 1 мг ткани		Доля фрагментированной ДНК, %
		высокомолекулярной	низкомолекулярной	
Неизменная, нормофолликулярного строения	15	1,11 ± 0,09	0,51 ± 0,06	30,5 ± 2,45
Папиллярной карциномы, в том числе:	16	2,00 ± 0,22*	0,35 ± 0,04*	15,9 ± 2,19*
категория опухоли T ₂ –T ₃	8	1,70 ± 0,26*	0,33 ± 0,04*	17,1 ± 2,57*
категория опухоли T ₄	8	2,31 ± 0,31*	0,37 ± 0,08	14,8 ± 3,51*
папиллярный вариант	7	1,94 ± 0,36*	0,33 ± 0,06*	15,6 ± 3,03*
фолликулярно-папиллярный вариант	5	2,63 ± 0,29*	0,31 ± 0,12	9,7 ± 3,06*
солидно-фолликулярный вариант	3	1,29 ± 0,04*	0,42 ± 0,03	24,4 ± 2,26*
Фолликулярной аденокарциномы	4	0,84 ± 0,14 ^б	0,78 ± 0,09 ^{а,б}	48,8 ± 6,20 ^{а,б}

Примечание. * — $p < 0,05$ в сравнении с уровнем в неизменной ткани; ^б — $p < 0,05$ в сравнении с уровнем в ткани папиллярной карциномы; ^а — $p < 0,05$ в сравнении с уровнем в ткани папиллярной карциномы фолликулярно-папиллярного строения.

подтверждают мысль о том, что решающее значение в формировании опухоли конкретного типа имеет баланс между противоположно направленными процессами — пролиферацией и элиминацией трансформированных клеток [6]. В то же время в трех опухолях солидно-фолликулярного строения, исследованных в работе, существенных изменений уровня ДНК и доли фрагментированной ДНК не отмечено (см. табл. 1). О разной апоптотической активности в различных образцах папиллярных карцином свидетельствуют и данные литературы [13].

Анализ выявленных изменений концентрации ДНК в папиллярных карциномах ЩЖ в зависимости от пола больных показал, что более высокая концентрация высокомолекулярной ДНК, а также более низкая концентрация и доля фрагментированной ДНК в ткани папиллярных карцином по сравнению с таковыми в нормальной ткани ЩЖ наблюдается только в опухолях, удаленных у женщин. В опухолях мужчин эти изменения были значительно менее выражены (табл. 2). Показано, что эстрадиол стимулирует пролиферацию фолликулярных клеток, увеличивая при этом соотношение содержания анти- и проапоптотических белков — Bcl-x_L/Bax — за счет надэкспрессии первого [12]. Тестостерон не дает такого эффекта. Эти данные обоснуют в плане известного факта повышенного в 2–3 раза риска возникновения карцином ЩЖ у женщин по сравнению с мужчинами.

В ткани фолликулярных аденокарцином отмечен повышенный уровень низкомолекулярной

ДНК и ее доли при неизменной концентрации высокомолекулярной ДНК (см. табл. 1). Величина этих показателей в ткани фолликулярной и папиллярной карцином существенно различалась. Немногочисленные данные литературы не позволяют составить четкого представления о различиях в интенсивности апоптоза в папиллярных и фолликулярных аденокарциномах. Так, в одних исследованиях показана одинаково низкая апоптотическая активность в ткани этих карцином ЩЖ [16], в других — апоптотический индекс в папиллярных карциномах был существенно выше, чем в фолликулярных [6].

В условиях предварительной инкубации срезов ткани, выделения ДНК и проведения электрофореза в образцах, полученных из внеузловой неизменной ткани ЩЖ больных, четко делятся фрагменты ДНК, отвечающие размерам 200, 400, 600 и 800 п. о., образуя характерную "апоптотическую лесенку" [3]. Наибольшее количество фрагментов при электрофорезе ДНК из неизменной ткани ЩЖ приходится на фракцию мононуклеосом (200 п. о.), а суммарное количество моно-, ди-, три- и тетра-нуклеосом составило около 1/3 от общего количества ДНК (табл. 3).

Суммарное содержание олигонуклеосом, которые регистрируются на электрофореграммах ДНК, выделенной из ткани папиллярной карциномы, значительно ниже, чем на электрофореграммах ДНК, выделенной из неизменной ткани ЩЖ (см. табл. 3), как и общая концентрация фрагментированной ДНК, содержание которой определяли спектрофотометрически (см. табл. 1). Статистиче-

Таблица 2

Концентрация ДНК и содержание фрагментированной ДНК в неизменной ткани и в ткани папиллярной карциномы ЩЖ мужчин и женщин

Ткань	n	Концентрация ДНК, мкг на 1 мг ткани		Доля фрагментированной ДНК, %
		высокомолекулярной	низкомолекулярной	
Неизменной железы женщин	8	1,13 ± 0,16	0,52 ± 0,07	32,7 ± 3,26
Папиллярной карциномы женщин	11	2,30 ± 0,26*	0,33 ± 0,06*	12,0 ± 2,54*
Неизменной железы мужчин	7	1,10 ± 0,05	0,49 ± 0,10	28,1 ± 3,74
Папиллярной карциномы мужчин	5	1,36 ± 0,11**	0,39 ± 0,03	22,5 ± 1,75**

Примечание. * — $p < 0,05$ в сравнении с уровнем в неизменной ткани; ** — $p < 0,05$ в сравнении с уровнем в ткани папиллярной карциномы женщин.

Таблица 3

Содержание олигонуклеосом (в %) в неизменной ткани и ткани карцином ЩЖ

Ткань	n	Содержание олигонуклеосом				
		800	600	400	200	200—800
Неизменная, нормофолликулярного строения	5	6,66 ± 0,47	6,82 ± 0,97	4,32 ± 0,86	15,21 ± 4,63	33,0 ± 2,82
Папиллярной карциномы	9	4,73 ± 0,53*	4,25 ± 0,70*	2,46 ± 0,73	3,38 ± 0,56*	14,8 ± 1,54*
В том числе:						
категория опухолей T ₂ —T ₃	3	3,40 ± 0,62*	3,25 ± 1,27*	1,14 ± 0,38*	3,38 ± 1,31*	11,2 ± 2,16*
категория опухолей T ₄	6	5,40 ± 0,58***	4,75 ± 0,84	3,12 ± 0,99	3,38 ± 0,65*	16,6 ± 1,66*
Фолликулярной карциномы	3	7,21 ± 0,20***	9,14 ± 1,34***	6,89 ± 1,46***	5,00 ± 0,86*	28,2 ± 3,44***

Примечание. * — $p < 0,05$ в сравнении с уровнем в неизменной ткани; ** — $p < 0,05$ в сравнении с уровнем в ткани папиллярной карциномы категории T₂—T₃; *** — $p < 0,05$ в сравнении с уровнем в ткани папиллярной карциномы.

ски значимые различия были установлены для тетра-, три- и особенно мононуклеосом, а более четко — в опухолях категории T₂—T₃; в этом случае снижен также уровень и динуклеосом. Концентрация фрагментированной ДНК также несколько ниже в опухолях категории T₂—T₃ (см. табл. 1). Обсуждая эти данные, прежде всего следует указать на более выраженную интенсивность фрагментации ДНК на ранних стадиях опухолевого роста [5] и на уменьшение активности Ca²⁺-, Mg²⁺-зависимой эндонуклеазы по мере прогрессирования процесса трансформации [9]. Известно также, что недоступность сайтов ДНК для эндонуклеаз может быть обусловлена такими структурными перестройками хроматина, в основе которых лежит экранирование чувствительных для эндонуклеаз участков вследствие образования ковалентных сшивок ДНК—белок. Последние являются результатом повреждения молекулы ДНК, что имеет место и при канцерогенезе.

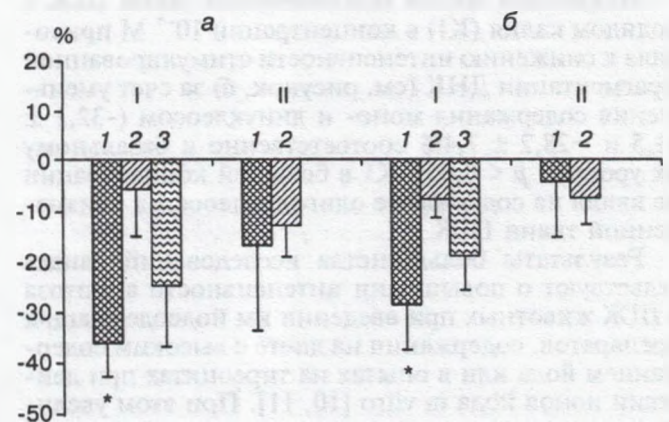
Учитывая тот факт, что в большинстве случаев межнуклеосомная фрагментация ДНК может служить показателем гибели клеток путем апоптоза, полученные данные о снижении интенсивности стимулированной межнуклеосомной фрагментации ДНК одновременно с уменьшенным суммарным уровнем фрагментированной ДНК позволяют предположить, что в папиллярных карциномах ЩЖ (особенно в карциномах ЩЖ женщин) наблюдается существенное торможение терминальной стадии этого механизма.

В отличие от папиллярной карциномы в ткани фолликулярной карциномы одновременно со сниженным уровнем мононуклеосом наблюдали несколько повышенное содержание тетра-, три- и динуклеосом (см. табл. 3). Вследствие этого суммарное содержание олигонуклеосом, которые регистрируются на электрофореграммах ДНК, существенно не отличалось от такового на электрофореграммах ДНК, выделенной из неизменной ткани ЩЖ. Учитывая тот факт, что общее содержание низкомолекулярной ДНК в ткани фолликулярной карциномы повышено (см. табл. 1), можно осторожно говорить об ускорении фрагментации ДНК в участках хроматина, расщепление которых приводит к высвобождению олигонуклеосом большого размера, и торможении фрагментации ДНК, приводящей к образованию мононуклеосом. Таким образом, в фолликулярных карциномах интенсив-

ность межнуклеосомной деградации ДНК меняется менее значительно и не так однозначно, следовательно нет оснований говорить о существенном изменении уровня апоптоза в этих карциномах. Ряд данных литературы также свидетельствует в пользу такого вывода [6, 13, 16].

При исследовании влияния α -токоферола на межнуклеосомную фрагментацию ДНК было установлено, что в нормальной ткани ЩЖ препарат в концентрации 10⁻⁷ М тормозил ее интенсивность (см. рисунок, а) за счет снижения образования моно-, три- и тетрануклеосом (-44,2 ± 7,99, -22,0 ± 5,10 и -19,8 ± 4,21% соответственно к базальному их уровню, $p < 0,05$). В большей концентрации (10⁻³ М) препарат существенно не влиял на интенсивность стимулированной межнуклеосомной фрагментации ДНК.

Представленные результаты о торможении стимулированной фрагментации ДНК в неизменной ткани ЩЖ больных под влиянием α -токоферола вполне соответствуют современным представлениям о возможных механизмах влияния антиоксидантов на апоптозные процессы, в первую очередь о предотвращении открытия неспецифической митохондриальной поры вследствие снижения уровня активных форм кислорода или продуктов перекисного окисления липидов. Так, в присутствии α -токоферола наблюдали торможение ин-



Изменения суммарного содержания олигонуклеосом (в %) в неизменной ткани ЩЖ (I), ткани папиллярной (II) и фолликулярной (III) карцином под влиянием α -токоферола (а) и ионов йода (б). I — 10⁻³ М, II — 10⁻⁷ М. * — $p < 0,05$ в сравнении с исходным уровнем.

дуцированной под действием H_2O_2 фрагментации ДНК в тимоцитах [2], а инкубация митохондрий сердца крыс с растворимым аналогом витамина приводила к угнетению открытия митохондриальной поры в условиях окислительного стресса [8].

Показано, что межнуклеосомной фрагментации ДНК предшествует снижение в клетке соотношения восстановленный/окисленный глутатион, который занимает едва ли не центральное место в антиоксидантной защите организма. Усиление антиоксидантных свойств токоферолов связывают с синергизмом их действия с другими антиоксидантами, в первую очередь с глутатионом [1]. Еще одним возможным звеном влияния α -токоферола на межнуклеосомную фрагментацию ДНК может быть устранение действия активных соединений кислорода на эндонуклеазы, которые принимают непосредственное участие в деградации ДНК. Активация этих ферментов под влиянием окислительного стресса происходит вследствие повышения уровня свободного Ca^{2+} , который высвобождается в этих условиях из депо одновременно с торможением удаления его избытка за пределы клетки из-за окисления тиоловых групп в структуре трансмембранных каналов [1].

Следует отметить, что в действии препарата четко прослеживается дозозависимость его влияния. Снижение эффекта α -токоферола с увеличением его концентрации может быть связано с тем фактом, что перехват перекисленных радикалов липидов, который является основным антиоксидантным механизмом действия токоферолов, происходит при их физиологических концентрациях, тогда как избыток витамина Е может действовать даже прооксидантно [1]. Эффекты токоферолов зависят от их химической структуры, природы агентов, повреждающих клетки, и, возможно, от вида клеток. Так, α -токоферол в концентрации 10^{-4} М не влиял на фрагментацию ДНК в тимоцитах при индукции апоптоза инкубацией клеток в течение 18 ч, уменьшал ее при стимуляции апоптоза Ca^{2+} -ионофором и существенно повышал в условиях развития Ca^{2+} -цитотоксичности [7].

Инкубация срезов неизменной ткани ЩЖ с йодидом калия (KI) в концентрации 10^{-7} М приводила к снижению интенсивности стимулированной фрагментации ДНК (см. рисунок, б) за счет уменьшения содержания моно- и динуклеосом ($-32,1 \pm 11,5$ и $-28,2 \pm 7,4\%$ соответственно к базальному их уровню, $p < 0,05$). KI в большей концентрации не влиял на содержание олигонуклеосом в неизменной ткани ЩЖ.

Результаты большинства исследований свидетельствуют о повышении интенсивности апоптоза в ЩЖ животных при введении им йодсодержащих препаратов, содержащих на диете с высоким содержанием йода или в опытах на тиреоцитах при действии ионов йода *in vitro* [10, 11]. При этом увеличение количества апоптозных клеток сопровождается снижением уровня экспрессии Bcl-2 и повышением экспрессии Bax. В то же время при апоптозе, индуцированном антителами к рецептору смерти Fas, высокая концентрация йодида повышала, а низкая снижала его интенсивность в пер-

вичной культуре тиреоцитов человека [20]. Результаты наших исследований свидетельствуют о торможении под действием низкой дозы KI межнуклеосомной фрагментации ДНК, стимулированной инкубацией срезов ткани ЩЖ.

Обращает на себя внимание подобие эффектов α -токоферола и KI на фрагментацию ДНК в неизменной ткани ЩЖ (см. рисунок). Считают, что в реализации механизмов апоптоза при действии молекулярного йода определенную роль может играть снижение уровня тиолов и реактивных соединений кислорода [14]. Исследования с использованием линии иммортализованных тиреоидных клеток, а также первичной культуры клеток ЩЖ человека показали, что апоптоз при действии йода был p53-независимым, не сопровождался синтезом белков и изменениями экспрессии анти- или проапоптозных белков (Bcl-2, Bcl- χ_L , Bax) [18]. Предполагают, что важнейшими при этом являются повышение уровня активных форм кислорода, продуктов перекисного окисления липидов и активация митохондриального пути инициации апоптоза.

Высказано предположение, что эффект йодида на апоптоз тиреоидного эпителия является прямым, а опосредуется йодированными производными, в частности полиненасыщенными жирными кислотами — йодолактонами [11]. Альтернативное мнение отводит решающее место в действии йода на фрагментацию ДНК его влиянию на синтез полиаминов, которые, отвечая за структуру хроматина и контролируя активность эндонуклеаз, контролируют и интенсивность межнуклеосомной фрагментации ДНК [10]. Следовательно, вопрос о возможных механизмах, реализация которых приводит к изменению межнуклеосомной фрагментации ДНК, как одного из проявлений апоптоза, в неизменной ткани ЩЖ под влиянием йодида остается невыясненным и дискуссионным.

Эффект обеих доз α -токоферола в ткани папиллярной карциномы отсутствовал, а в ткани фолликулярной карциномы препарат в концентрации 10^{-7} М оказывал влияние, подобное, но менее выраженное и менее закономерное ($0,1 > p > 0,05$), таковому в неизменной ткани ЩЖ (см. рисунок, а). Характер действия ионов йода в концентрации 10^{-7} М на межнуклеосомную фрагментацию ДНК в ткани фолликулярной карциномы ЩЖ также остался подобным таковому в неизменной ткани — суммарное содержание моно-, ди-, три- и тетра-нуклеосом был сниженным (см. рисунок, б), хотя эти изменения были менее выражены ($0,1 > p > 0,05$), чем в неизменной ткани. В то же время обе концентрации йодида не влияли на интенсивность межнуклеосомной фрагментации ДНК в ткани папиллярной карциномы ЩЖ.

Выяснение факта отсутствия влияния α -токоферола и ионов йода в папиллярных карциномах и подобного таковому в неизменной ткани ЩЖ "ответу" клеток фолликулярной аденокарциномы на действие препаратов требует дальнейших исследований, однако можно высказать предположение о сохранении определенного уровня внутриклеточных механизмов регуляции и реализации апоптоза в фолликулярных карциномах и о недееспособно-

сти таковых в папиллярных аденокарциномах. Это может быть связано с различиями характера процессов трансформации эпителиальных клеток ЩЖ в случае формирования фолликулярных и папиллярных карцином.

Показано, что скорость деления клеток находится в обратной зависимости от уровня свободных радикалов. В клетках злокачественных опухолей наблюдается значительное снижение активности механизмов антиоксидантной защиты, однако эта недостаточность компенсируется путем накопления в опухолях жирорастворимых антиоксидантов, в первую очередь α -токоферола. В этих условиях способность активных форм кислорода тормозить деление клеток в опухоли снижается. Важно отметить, что реализация указанных механизмов существенно зависит от природы опухоли и стадии ее развития [1].

Выводы

1. Концентрация фрагментированной (низкомолекулярной) ДНК и интенсивность стимулированной межнуклеосомной фрагментации ДНК в ткани папиллярной аденокарциномы значительно снижены. В ткани фолликулярной аденокарциномы уровень фрагментированной ДНК повышен, а интенсивность межнуклеосомной фрагментации ДНК существенно не отличается от таковой в нормальной ткани ЩЖ.

2. α -Токоферол и KI in vitro в концентрации 10^{-7} М снижают интенсивность стимулированной межнуклеосомной фрагментации ДНК в нормальной ткани ЩЖ и менее значительно в ткани фолликулярных карцином. Эффект препаратов в ткани папиллярных карцином отсутствует.

ЛИТЕРАТУРА

1. Барабой В. А. Биоантиоксиданты. — Киев, 2006.
2. Гринюк І. І., Корнійчук Г. М., Капралов О. О., Матусевська О. П. // Укр. біохім. журн. — 2004. — Т. 76, № 5. — С. 90–95.
3. Калініченко О. В., Мишунина Т. М., Пилькевич Л. І. та ін. // Ендокринологія. — 2007. — Т. 12, № 1. — С. 48–57.
4. Коваль Т. В., Ковальова В. А., Дворченко К. О. та ін. // Пробл. екол. та медичн. генетики і клітин. імунол. (Київ). — 2001. — № 7 (39). — С. 119–125.
5. Комаревцева Е. В. // Укр. мед. альманах. — 2004. — Т. 7, № 3. — С. 168–170.
6. Лушников Е. Ф., Абросимов А. Ю. Гибель клетки (апоптоз). — М., 2001.
7. Петрова Г. В., Донченко Г. В. // Укр. біохім. журн. — 2004. — Т. 76, № 1. — С. 103–107.
8. Сагац В. Ф., Вавилова Г. Л., Струтинська Н. А., Аконова О. В. // Фізіол. журн. — 2003. — Т. 49, № 1. — С. 3–12.
9. Сухих Г. Т., Серов В. Н., Деметьева М. М. и др. // Акуш. и гин. — 2000. — № 4. — С. 41–45.
10. Burikhanov R., Matsuzaki S. // Thyroid. — 2000. — Vol. 10, N 2. — P. 123–129.
11. Langer R., Burzler C., Bechner G., Gartner R. // Exp. Clin. Endocrinol. Diabet. — 2003. — Vol. 111, N 6. — P. 325–329.
12. Lee M., Chen G., Vantis A. et al. // Cancer J. — 2005. — Vol. 11, N 2. — P. 113–121.
13. Moore D., Ohene-Fianko D., Garcia B., Chakrabarti S. // Histopathology. — 1998. — Vol. 32, N 1. — P. 35–42.
14. Shrivastava A., Tiwari M., Sinha R. et al. // J. Biol. Chem. — 2006. — Vol. 281, N 28. — P. 19762–19771.
15. Sreelekha T., Pradeep V., Vijayalakshmi K. et al. // Thyroid. — 2000. — Vol. 10, N 2. — P. 117–122.
16. Szende B. // Magy. Onkol. — 2004. — Vol. 48, N 3. — P. 215–219.
17. Teel G., Pines A., Arturi F. et al. // Endocrinolog. — 2004. — Vol. 145, N 10. — P. 4660–4666.
18. Vitale M., Di Matola T., D'Ascoli F. et al. // Endocrinology. — 2000. — Vol. 141, N 2. — P. 598–605.
19. Volante M., Papotti M., Gugliotta P. et al. // J. Histochem. Cytochem. — 2001. — Vol. 49, N 8. — P. 1003–1011.
20. Wang S., Baker J. // Thyroid Cancer: A Comprehensive Guide to Clinical Management. — 2nd Ed. / Eds L. Wartofsky, D. Van Nostrand. — Totowa, 2006. — P. 55–61.

Поступила 24.01.08

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2009

УДК 612.018.2:577.175.53].014.1.084

Л. Е. Панин, Л. М. Поляков, И. Ф. Усынин, Д. В. Суменкова, Р. А. Князев

ВЛИЯНИЕ КОРТИКОСТЕРОИДОВ В КОМПЛЕКСЕ С АПОЛИПОПРОТЕИНОМ А-I НА БИОСИНТЕЗ БЕЛКА В КУЛЬТУРЕ ГЕПАТОЦИТОВ

ГУ НИИ биохимии (дир. — акад. РАМН Л. Е. Панин) СО РАМН, Новосибирск

Показано, что стероидные гормоны, содержащие в А-кольце восстановленную Δ^4 , 3-кетогруппу в комплексе с аполипопротеином А-I увеличивают скорость биосинтеза белка в культуре гепатоцитов крыс. Биологическая активность гормонов зависит от положения оксигруппы у 3-го углеродного атома и водорода у 5-го углеродного атома. Для проявления биологического эффекта более предпочтительной является цис-позиция. Оксигруппа в 3-м положении А-кольца гормона может быть заменена на сульфогруппу. Дегидроэпиандростерон-сульфат в комплексе с аполипопротеином А-I увеличивает скорость биосинтеза белка в культуре гепатоцитов крыс, что подтверждает участие этого гормона в регуляции экспрессии генов.

Ключевые слова: стероидные гормоны, аполипопротеин А-I, гепатоциты, биосинтез белка.

L. Ye. Panin, L. M. Polyakov, I. F. Usynin, D. V. Sumenkova, R. A. Knyazev

EFFECT OF A COMPLEX OF CORTICOSTEROIDS WITH APOLIPOPROTEIN A-I ON PROTEIN BIOSYNTHESIS IN CULTURED HEPATOCYTES

Research Institute of Biochemistry, Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences, Novosibirsk

A complex of apolipoprotein A-I with steroid hormones containing reduced Δ^4 , 3-ketogroup in the A ring was shown to increase the rate of protein synthesis in the cultured rat hepatocytes. The biological activity of the hormones depends on the position of the oxygroup of the third carbonic atom and hydrogen at the fifth position of a carbonic atom. The cis-position is more preferable for the biological effect. The oxygroup at the third position of the A-ring may be replaced by the sulfo-group. The complex of dehydroepiandrosterone sulphate with apolipoprotein A-I increases the rate of protein biosynthesis in the cultured rat hepatocytes, which confirms the involvement of this hormone in the regulation of gene expression.

Key words: steroid hormones, apolipoprotein A-I, hepatocytes, protein biosynthesis.