

ванный") характер, в то время как при гипопаратиреозе наблюдаются выраженные ("диффузные") формы ОБГ [12]. Интересно, что экстрапирамидные нарушения имеют лишь около 20% больных с синдромом Фара, у остальных пациентов клинические признаки поражения базальных ганглиев отсутствуют [9], что имело место в представленном случае.

Сочетанное развитие гипопаратиреоза и поражения подкорковых центров возможно также при болезни Вильсона—Коновалова в результате отложения меди в парашитовидных железах и подкорковых ядрах [2]. Отсутствие таких характерных проявлений болезни Вильсона—Коновалова, как гепатомегалия, кольца Кайзера—Флешнера, деменция, экстрапирамидные расстройства, а также нормальный уровень церулоплазмينا в крови и результаты печеночных тестов позволили отвергнуть этот диагноз у наблюдаемого нами пациента.

Представленный случай является первым описанием сочетанного развития идиопатического гипопаратиреоза, ОБГ, энцефалопатии, лейкодистрофии, атрофии зрительных нервов и синдрома ПТС. Ранее С. Billard и соавт. [4] выделили вариант ОБГ, протекающий с энцефалопатией, очаговой демиелинизацией, дегенерацией сетчатки или атрофией зрительных нервов, а также с нанизмом и микроцефалией. Генетическая природа и патогенез подобных синдромов в настоящее время не вполне ясны. В литературе описано несколько случаев развития гипопаратиреоза и ПТС у детей [5, 13]. По-видимому, прямая причинно-следственная связь между гипопаратиреозом и ПТС отсутствует. Наиболее вероятной причиной формирования ПТС у наблюдаемого нами больного явились внутричерепная гипертензия и гидроцефалия.

Представленное наблюдение демонстрирует, что идиопатический гипопаратиреоз может протекать как

неуклонно прогрессирующее заболевание, приводящее к тяжелому поражению ЦНС. Особого внимания заслуживают больные гипопаратиреозом с эпилептиформным синдромом, у которых возможно развитие эпилептического статуса. В комплекс обследования таких пациентов следует включать ЭЭГ, а также магнитно-резонансную томографию головного мозга. Целесообразно совместное ведение этих больных специалистом-эндокринологом и неврологом.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Величко М. А., Васильев В. В., Филиппов Ю. Л. // Клиническая медицина. — 1993. — Т. 71, № 2. — С. 55—58.
2. Эндокринология / Под ред. Н. Лавина: Пер. с англ. — М., 1999. — С. 439—454.
3. Avrahami E., Cohn D. F., Feibel M., Tadmor R. // J. Neurol. — 1994. — Vol. 241, N 6. — P. 381—384.
4. Billard C., Dulac O., Boulache J. et al. // Neuropediatrics. — 1989. — Vol. 20, N 1. — P. 12—19.
5. Franzese A., Valerio G., Di Maio S. et al. // J. Endocrinol. Invest. — 1999. — Vol. 22, N 1. — P. 66—69.
6. Fulop M., Zeifer B. // Am. J. Med. Sci. — 1991. — Vol. 302, N 5. — P. 292—295.
7. Gupta M. M. // J. Assoc. Physicians India. — 1989. — Vol. 37, N 10. — P. 629—631.
8. Hattori H., Yorifuji T. // Brain Dev. — 2000. — Vol. 22, N 7. — P. 449—450.
9. Jorens P. G., Appel B. J., Hilte F. A. et al. // Acta Neurol. Scand. — 1991. — Vol. 83, N 2. — P. 137—140.
10. Kline C. A., Esekogwu V. I., Henderson S. O., Newton K. I. // J. Emerg. Med. — 1998. — Vol. 16, N 5. — P. 715—718.
11. Nakamura Y., Matsumoto T., Tamakoshi A. et al. // J. Epidemiol. — 2000. — Vol. 10, N 1. — P. 29—33.
12. Ogata A., Ishida S., Wada T. // Acta Neurol. Scand. — 1987. — Vol. 75, N 2. — P. 117—124.
13. Shulman D. I., Martinez C. R., Bercu B. B., Root A. W. // J. Pediatr. — 1986. — Vol. 108, N 4. — P. 540—544.
14. Uncini A., Tartaro A., Di Stefano E., Gambi D. // J. Neurol. — 1985. — Vol. 232, N 2. — P. 109—111.

Поступила 17.07.02

## ◆ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЭНДОКРИНОЛОГИЯ

© Г. М. АРТЫКБАЕВА, Я. Х. ТУРАКУЛОВ, 2004

УДК 616.441-006-008.9-074

Г. М. Артыкбаева, Я. Х. Туракулов

### ЭКСПРЕССИЯ 5'-ДЕЙОДИНАЗЫ В РАЗЛИЧНЫХ ОПУХОЛЯХ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ<sup>1</sup>

Лаборатория биохимии гормонов (зав. — акад. АН Республики Узбекистан Я. Х. Туракулов) Института биохимии АН Республики Узбекистан

5'-Дейодирование является важным путем метаболизма  $T_4$ , определяя его большую роль как прогормона для  $T_3$ .  $T_4$  метаболизируется двумя 5'-дейодирующими ферментами: ДІ и ДІІ, которые кодируются различными генами, регулируются различными способами и экспрессируются в разных тканях. Целью настоящей работы явилось изучение экспрессии ДІ и ДІІ в норме и в различных опухолях щитовидной железы человека. Были использованы 18 образцов щитовидной железы: 10 — из опухолей и 8 — из нормальных, окружающих узлов, тканей щитовидной железы. РНК, изолированные из тканей методом обратной транскрипции с последующей полимеразной цепной реакцией, были транскрибированы до кДНК. Гель-электрофорез показал полосы, соответствующие 777 п. н. для ДІ и 796 п. н. для ДІІ. Наши эксперименты показали наличие генов обоих изоферментов 5'-дейодиназ в тканях тиреоидной карциномы. Гель-электрофорез показал разный уровень экспрессии ПЦР-продуктов в различных опухолях щитовидной железы для ДІ и ДІІ на уровне мРНК.

Ключевые слова: щитовидная железа, карцинома, аденома, 5'-дейодирование.

<sup>1</sup> Выражаем глубокую благодарность проф. J. Kohrle (Германия) за предоставленные праймеры.

*5'-deiodination is an important pathway for the metabolism of  $T_4$  by determining its great role as a prohormone for  $T_3$ .  $T_4$  is metabolized by two 5'-deiodinases: DI and DII which are encoded by different genes, regulated by different modes and expressed in various tissues. The aim of the present study was to examine DI and DII expression in health and in various human thyroid tumors. Eighteen thyroid specimens (10 from tumors and 8 from the intact thyroid tissues surrounding the nodes) were used. RNA isolated from the tissues by reverse transcription, followed by polymerase chain reaction (PCR) were transcribed to cDNA. Gel electrophoresis showed the bands corresponding to 777 b. p for DI and 796 b. p for DII. The experiments demonstrated that there were genes of both isoenzymes of 5'-deiodinases in thyroid carcinoma tissues. Gel electrophoresis indicated the different expression of PCR products in different thyroid tumors for DI and DII at the level of mRNA.*

**Key words:** thyroid, carcinoma, adenoma, 5'-deiodination.

Щитовидная железа продуцирует тироксин ( $T_4$ ) и небольшую фракцию активного тиреоидного гормона 3,3',5-трийодтиронина ( $T_3$ ), который опосредует влияние тиреоидных гормонов на рост, дифференциацию, энергетический метаболизм.  $T_4$  метаболизируется двумя 5'-дейодирующими энзимами: типов I и II. Эти энзимы кодируются двумя генами, регулируются различными способами и экспрессируются в различных тканях.

5'-дейодиназа I (DI) преимущественно дейодирует обратный  $T_3$  ( $oT_3$ ), а также  $T_4$  с константой Михаэлиса (KM) в микромолярном ряду. 5'-дейодиназа II (DII) предпочитает  $T_4$ , а не  $oT_3$  в качестве субстрата KM в наномолекулярном ряду [2].

Хорошо изученная DI в основном локализована в печени, почках, щитовидной железе, эутиреоидном аденогипофизе и мозге. Печень производит 70–80% циркулирующего  $T_3$  за счет 5'-дейодирования. Почки и щитовидная железа продуцируют меньшие количества циркулирующего  $T_3$ . Природа секретируемого из щитовидной железы  $T_3$  противоречива. До сих пор неясно, прямо ли происходит  $T_3$ , секретируемый щитовидной железой, из не полностью йодированного тироглобулина или локально за счет DI в тироцитах.

Активность тиреоидной DI изменяется при различных патофизиологических условиях, т. е. и тиреотропный гормон (ТТГ), и стимулирующие ТТГ-рецептор антитела приводят к увеличению активности 5'-дейодиназы в щитовидной железе человека и крыс. Эти данные предполагают регуляцию DI через ТТГ-рецептор G, аденилатциклазу, цАМФ-путь. Показано, что стимуляция DI через систему цАМФ имеет место в щитовидной железе, но не в печени, почках, гипофизе и мозге [2].

DII обеспечивает внутриклеточный пул  $T_3$  в гипофизе, мозге, бурой жировой ткани и плаценте и является ключевым регуляторным элементом в локальном тиреоидном гомеостазе. Недавно активность DII найдена в щитовидной железе человека, но не крыс, т. е. этот фермент является видоспецифичным [1]. Одним из наиболее удивительных аспектов DII является различие тканевой специфической экспрессии у человека и крыс. DII экспрессируется в ЦНС, гипофизе, бурой жировой ткани и плаценте человека и крыс, но не в щитовидной железе, скелетной и сердечной мышцах крыс. Хотя предполагалось, что DII обеспечивает первоначально внутриклеточный  $T_3$ , сейчас рассматривается возможность того,

что у человека DII может обеспечивать плазменный  $T_3$  [5].

В связи с последними данными возникает вопрос о биологической природе мРНК DII. Активность DII стимулируется агентами, увеличивающими продукцию цАМФ, — кортикостероидами (дексаметазон), а также разными факторами роста. Подобно DI, DII — мембранно-связанный белок, локализованный в плазматической мембране. Клеточная и тканеспецифичная экспрессия DI и DII различна. Нет убедительных доказательств того, изменяется ли экспрессия двух энзимов при трансформации [4]. В связи с этим целью данной работы явилось изучение экспрессии DII и DI в норме и при различных опухолях щитовидной железы.

## Материалы и методы

Мы использовали 18 образцов щитовидной железы: 10 из опухолей и 8 из нормальных, окружающих узлы, тканей щитовидной железы. РНК выделяли с помощью коммерческого реактива Trifast (Германия). Обратную транскрипцию (ОТ) выполняли с Oligo-dT (12–18) ("Life Technologies") как праймером. Для каждой полимеразной цепной реакции (ПЦР) использовали 1  $\mu$ л кДНК. Амплификацию выполняли с помощью Taq DNA Polymerase ("Quiagen", Германия). Использовали праймеры для  $\beta$ -актина коммерческой фирмы "Stratagen" (Германия). Праймеры для амплификации DI и DII (см. таблицу) были синтезированы в лаборатории проф. J. Kohrle.

Условия для ПЦР следующие: нагревание при 95°C, денатурация при 95°C 45 с, отжиг при 60°C для  $\beta$ -актина, при 62°C для DI, при 58°C для DII в течение 45 с и элонгация при 72°C в течение 60 с. Для DI и DII проводили 35 циклов амплификации, для  $\beta$ -актина 25 [7]. После амплификации 10  $\mu$ л ПЦР-продукта анализировали в 1,5% агарозном геле.

## Результаты

Выделенные из тканей РНК методом ОТ-ПЦР были транскрибированы до кДНК. Для доказательства успешности выделения РНК и ОТ был амплифицирован  $\beta$ -актин. На рисунке видно, что во всех пробах  $\beta$ -актин-продукт был обнаружен на агарозном геле, окрашенном бромидом этидия, после 25 циклов амплификаций. ОТ-ПЦР-амплификация РНК, выделенных из всех тканей щитовидной железы, дала полосы, соответствующие 777 п. н. для DI и 796 п. н. для DII, что согласуется с данными литературы [7].

## Последовательность праймеров для ПЦР

| Фермент | Праймер   | Последовательность                  | Размер продукта, п. н. |
|---------|-----------|-------------------------------------|------------------------|
| β-Актин | β-Актин 1 | 5'-TGACGGGGTACCCACACTGTGCCCATCT-3'  | 661                    |
|         | β-Актин 2 | 5'-CTAGAAGCATTTGCGGTGGACGATGGAGG-3' |                        |
| ДІ      | TJ63      | 5'-TGCATGTGGTTCGTGGGTA-3'           | 777                    |
|         | TG64      | 5'-GTCAAGCCATTTTCGGTCTGA-3'         |                        |
| ДІІ     | RW9       | 5'-TTCCTGCTGGTCTACTT-3'             | 796                    |
|         | RW2       | 5'-GGGAATTTTCCAAGTGGG-3'            |                        |

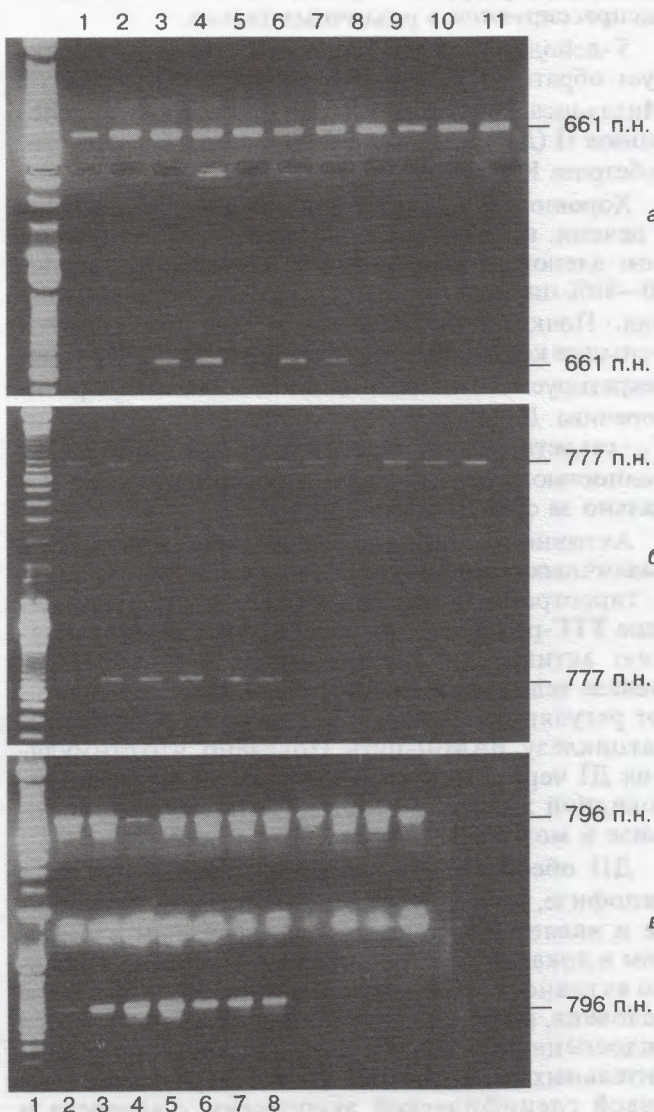
## Обсуждение

В данной работе мы пытались обнаружить различия в регуляции активации тиреоидных гормонов при опухолях щитовидной железы, которые могут терять свою зависимость от  $T_3$ , образованного 5'-дейодированием, контролирующего зависимость от  $T_3$  рост, пролиферацию и дифференциацию щитовидной железы. Большинство опухолей щитовидной железы происходят из фолликулярного эпителия и демонстрируют либо фолликулярную, либо папиллярную архитектуру. Ранее при опухолях щитовидной железы обнаружено снижение экспрессии ДІ в фолликулярной тиреоидной карциноме и очень низкий или необнаруживаемый уровень активности ДІ при анапластической тиреоидной карциноме [6]. Также снижение активности обнаружено в большинстве случаев папиллярной карциномы с некоторыми исключениями, показывающими активность выше нормы [6].

В нашей работе короткие фрагменты мРНК ДІІ, кроме мРНК ДІ, в щитовидной железе человека были получены с использованием ОТ-ПЦР, которая позволяет идентифицировать достоверные транскрипты. Гель-электрофорез показывает различный уровень экспрессии ПЦР-продуктов для ДІ и ДІІ при различной тиреоидной патологии, отмечая регуляцию для ДІ и ДІІ на уровне мРНК.

При изучении экспрессии генов ДІ и ДІІ показано нарушение регуляции экспрессии на уровне транскрипции, т. е. обнаружено визуальное уменьшение мРНК для генов ДІ и ДІІ. Возможно, существует обратная корреляция между экспрессией этих генов и клеточной пролиферацией в эпителиальных клетках щитовидной железы. Экспрессия для ДІ и ДІІ мРНК нарушается от степени дифференциации опухоли — от фолликулярной, папиллярной до анапластической карциномы. В настоящее время обсуждается возможное использование экспрессии ДІ как дифференциального маркера для рака щитовидной железы [3]. Нарушение экспрессии ДІ и тесно связанной с ней продукции  $T_3$  в процессе дедифференциации может быть одним из молекулярных дефектов контроля роста и увеличивающейся тенденции к инвазии. Мы не нашли корреляции или параллелизма в экспрессии ДІ и ДІІ мРНК в различных образцах щитовидной железы (см. рисунок). Нарушение уровня мРНК ДІІ было обнаружено в 3 образцах (N 1310, 1296, 1294) при аденоме и в 1 (N 457) — при папиллярной карциноме по сравнению с их собственными нормальными, окружающими узлы тканями. Считается, что экспрессия ДІІ мРНК в щитовидной железе человека регулируется еще не известными факторами

и предполагает различный механизм регуляции ДІІ по сравнению с ДІ. Независимо от этого можно сделать заключение о наличии экспрессирующихся генов обеих 5'-дейодиназ (типов I и II) в тканях тиреоидной карциномы. Наши данные показали, что экспрессия малоизученной ДІІ в патологических



ПЦР для генов β-актина (а); ДІ (б) и ДІІ (в) (в скобках — номер соответствующего пациента).

а: 1 — аденома; 2 — норма (457); 3 — анапластическая карцинома; 4 — фолликулярная аденома (1296); 5 — норма (1310); 6 — норма; 7 — аденома; 8 — норма; 9 — норма (1294); 10 — фолликулярная карцинома; 11 — капиллярная карцинома (1262); в: 1 — фолликулярная аденома (1310); 2 — норма (1296); 3 — норма; 4 — фолликулярная аденома (1294); 5 — папиллярная карцинома (457); 6 — норма; 7 — аденома; 8 — контроль ( $H_2O$ ).

малигнизированных тканях уменьшена по сравнению с нормальной тканью или доброкачественными опухолями, что, возможно, связано с транскрипционными механизмами.

## Выводы

1. Гены обоих изоферментов 5'-дейодиназы экспрессируются в тканях тиреоидной карциномы.
2. Выявлены нарушения регуляции экспрессии гена ДИ в опухолях щитовидной железы на уровне транскрипции.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Germain D. L. S., Galton V. A. // *Thyroid*. — 1997. — Vol. 7, N 4. — P. 655—668.
2. Kohrle J. // *Acta Med. Austriaca*. — 1996. — Vol. 23. — P. 17—30.
3. Kohrle J. // *Mol. Cell. Endocrinol.* — 1999. — Vol. 151. — P. 103—119.
4. Larsen P. R. // *Thyroid Int.* — 1997. — Vol. 4. — P. 8—14.
5. Salvatore D., Tu H., Harway J. W. et al. // *J. Clin. Invest.* — 1996. — Vol. 98, N 4. — P. 962—968.
6. Schreck R., Schnieders F., Schmutzler C. et al. // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* — 1994. — Vol. 79. — P. 791—798.
7. Winzer R., Schmutzler C., Jakobs T. C. et al. // *Thyroid*. — 1998. — Vol. 8, N 11. — P. 981—987.

Поступила 02.09.02

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2004

УДК 616.379-008.64-092:612.331.018]-092.9

М. А. Орловский, Ю. М. Колесник, А. В. Абрамов

## ВЛИЯНИЕ МНОГОКРАТНЫХ ВВЕДЕНИЙ ХОЛЕЦИСТОКИНИНА 26—33 НА $\alpha$ - И $\beta$ -КЛЕТКИ ОСТРОВКОВ ЛАНГЕРГАНСА В НОРМЕ И ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ ТИПА 1

Кафедра патологической физиологии (зав. — проф. Ю. М. Колесник) Запорожского государственного медицинского университета

В исследованиях, проведенных на здоровых крысах и крысах с экспериментальным стрептозотоцининдуцированным сахарным диабетом типа 1, изучено влияние многократных периферических (интраперитонеальных) и центральных (интрацеребровентрикулярных) введений октапептида холецистокинина 26—33 (ХЦК-8) на функцию  $\alpha$ - и  $\beta$ -клеток островков Лангерганса. Выявление инсулина в  $\beta$ -клетках и глюкагона в  $\alpha$ -клетках осуществляли методом непрямой иммунофлюоресценции. Показано, что оба способа введения у здоровых животных приводят к угнетению секреции инсулина на фоне снижения потребления пищи. При этом центральное введение ХЦК-8 в отличие от периферического вызывает достоверный ( $p < 0,05$ ) рост уровня гликемии и усиление продукции глюкагона в  $\alpha$ -клетках. Введение пептида животным с диабетом, напротив, приводит к достоверному росту концентрации инсулина в крови ( $p < 0,05$ ), снижению уровня гликемии ( $p < 0,05$ ) и угнетению полифагии ( $p < 0,01$ ), что связано с активацией функции  $\beta$ -клеток и подавлением патологически высокой активности  $\alpha$ -клеток. Установленные факты свидетельствуют о нарушении нейроэндокринных взаимодействий при сахарном диабете и подтверждают высказанные ранее предположения о важной роли холецистокинина в патогенезе этого заболевания.

**Ключевые слова:** экспериментальный сахарный диабет, холецистокинин, панкреатические островки, конъюнктивальные инстилляции.

*The impact of multiple peripheral (intraperitoneal) and central (intracerebroventricular) administrations of cholecystokinin 26-33 (CCK-8) octapeptide on the function of  $\alpha$ - and  $\beta$ -cells of the islets of Langerhans was studied in investigations made on normal rats and rats with experimental streptozotocine-induced type 1 diabetes mellitus. Insulin in  $\beta$ -cells and glucagon in  $\alpha$ -cells were found by indirect immunofluorescence. Both routes of administration to normal animals were shown to lead to the suppressed secretion of insulin with decreased food intake. At the same time the central administration of CCK-8, unlike the peripheral one, caused a significant ( $p < 0.05$ ) rise in the level of glycemia and enhanced glucagon production in  $\alpha$ -cells, while the administrations of the peptide to diabetic animals resulted a significant increase in the blood concentration of insulin ( $p < 0.05$ ), to the lower level of glycemia ( $p < 0.05$ ) and to suppressed polyphagia ( $p < 0.01$ ), which is associated with the activation of  $\beta$ -cell function and with the suppression of the pathologically high activity of  $\alpha$ -cells. The established facts suggest that neuroendocrine interactions are impaired in diabetes mellitus and confirm the previously made suggestions that cholecystokinin plays an important role in the pathogenesis of this disease.*

**Key words:** experimental diabetes mellitus, cholecystokinin, pancreatic islets, conjunctival instillations.

Исследованиями последних лет установлена важная роль одного из основных гуморальных регуляторов пищевого поведения — холецистокинина (ХЦК) — в стимуляции секреции инсулина [15, 17], а также доказано его участие в патогенезе сахарного диабета [3, 11, 16]. В настоящее время известно, что молекула ХЦК, состоящая из 58 аминокислотных остатков, после секреции подвергается ряду расщеплений с последовательным образованием различных природных фрагментов, среди которых наибольшей биологической активностью обладают тетрапептид (30—33) и октапептид (26—33) [3, 7]. Тетрапептид ХЦК (ХЦК-4) представляет собой конечный продукт процессинга ХЦК, актив-

ный лишь в отношении рецепторов ХЦК 2-го типа (ХЦК<sub>2</sub>R) [6, 9, 10], в то время как октапептид ХЦК (ХЦК-8) влияет как на 1-й (ХЦК<sub>1</sub>R), так и на 2-й тип рецепторов [3, 9, 14], являясь при этом основной секретируемой формой ХЦК в мозге [5] и в окончаниях блуждающего нерва [7]. В наших предыдущих работах показано, что развитие экспериментального сахарного диабета приводит к усилению продукции ХЦК в гипоталамусе [2], а многократное интрацеребровентрикулярное и интраперитонеальное введение ХЦК-4 крысам с диабетом ухудшает течение заболевания [1].

С целью определения роли ХЦК-8 в патогенезе сахарного диабета типа 1 мы изучили влияние мно-