

Д. А. Кадырова, Б. А. Атаханова, Я. Х. Туракулов

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА ТИРЕОГЛОБУЛИНА ПРИ ВРОЖДЕННОМ ЗОБЕЛаборатория биохимии гормонов (зав. — акад. АН Республики Узбекистан Я. Х. Туракулов)
Института биохимии АН Республики Узбекистан, Ташкент

Из клеток щитовидной железы человека в норме и при врожденном зобе выделена и охарактеризована поли-А-содержащая тиреоглобулиновая мРНК (мРНК_{ТГ}). На матрице поли-А-содержащей мРНК_{ТГ} путем обратной транскрипции в присутствии ингибитора РНКазы из плаценты человека синтезирована однонитевая комплементарная ДНК (кДНК), которая была использована в экспериментах по гибридизации для количественного определения мРНК. Показано, что в данном случае врожденного зоба отмечается нормальное количество мРНК_{ТГ} при дефиците ТГ, что свидетельствует о нарушении экспрессии гена ТГ на уровне трансляции.

A polyA-containing thyroglobulin mRNA (mRNA_{TH}) was isolated from human thyroid in health and congenital goiter. A single-stranded complementary DNA (cDNA) was synthesized on a polyA-containing mRNA_{TH} matrix by reverse transcription in the presence of RNase inhibitor from human placenta; this cDNA was used in hybridization experiments for measurements of mRNA. The amount of mRNA_{TH} in the presence of TH deficiency was normal in the examined goiter case, indicating an impaired TH gene expression at the translation level.

Тиреоглобулин (ТГ) — основной белок, синтезируемый щитовидной железой. Нативный ТГ состоит из двух идентичных 12S-субъединиц мол. массой по 330 кД, кодируемых 33S мРНК. мРНК — одна из самых больших матричных РНК, описанных у млекопитающих, ее мол. масса равна $2,8 \cdot 10^6$ Д. В норме содержание ТГ составляет 50—60% от общей массы белков тиреоидной ткани. При ряде заболеваний щитовидной железы содержание ТГ в тиреоидной ткани значительно уменьшается, отмечаются изменения и в структуре ТГ [6].

Врожденный зоб является редкой клинической аномалией, приводящей к задержке роста и умственного развития. Эта форма тиреоидной патологии часто сопровождается явлениями кретинизма. Зоб развивается вследствие хронически увеличенного уровня тиреоидстимулирующего гормона, когда причиной заболевания является метаболический дефект одного или нескольких этапов биосинтеза ТГ — предшественника тиреоидных гормонов. При врожденном зобе экстракты щитовидной железы практически не содержат ТГ [7].

Низкий уровень ТГ при зобах а priori можно объяснить нарушениями, происходящими на одном из этапов регуляции биосинтеза белка: 1) транскрипция гена ТГ; 2) созревание мРНК_{ТГ} в ядре; 3) транспорт мРНК_{ТГ} из ядра и вхождение в полисомы; 4) трансляция мРНК_{ТГ}.

Представленные в настоящей работе результаты свидетельствуют о возможном нарушении экспрессии гена ТГ на уровне трансляции при врожденном зобе.

Материалы и методы

Для выделения мРНК_{ТГ} использовали щитовидные железы, удаленные во время операции по поводу врожденного зоба. Контролем служили щитовидные железы людей, погибших в результате несчастных случаев (трупный судебно-медицинский материал), взятые при аутопсии не позднее 6—12 ч после смерти.

Суммарные полирибосомы выделяли магниевым методом [5], суммарную полисомальную РНК —

SDS-фенол-хлороформным методом. Полисодержащую мРНК исследовали хроматографией суммарной полисомальной РНК на колонке с поли-У-сефарозой 4В при 30°C в буфере, содержащем 0,1 М NaCl, 0,01 М ЭДТА, 0,01 М трис-НСl pH 7,5 и 0,2% SDS. Ультрацентрифугирование мРНК проводили в 5—20% сахарозном линейном градиенте при 49 000 об/мин в течение 3 ч (Spinco 2, ротор SW 65). В качестве маркера использовали цитоплазматическую РНК из клеток печени мыши.

Инкубационная смесь для синтеза кДНК содержала: 0,05М трис-НСl pH 8,3, 0,05М KCl, 0,005 М MgCl₂, меркаптоэтанол; 2 мкг/мл мРНК_{ТГ}, 4 мкг/мл олиго-(dT)₁₀, 100 мкг/мл актиномицина D, 24% ед/мл РНК-зависимой ДНК-полимеразы, по 0,5 мМ dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 0,1 мМ (³H) dCTP (17—19 мКи/мл) 100 мкг ингибитора рибонуклеазной активности из плаценты человека [9].

Рекомбинантные плазмиды Ph Tg 68, штамм E. Coli C600, содержали последовательности хромосомного гена ТГ (7,9 т. п. н.), полученные в лаборатории Vassart (Бельгия) и любезно предоставленные нам для исследований. Введение радиоактивной метки в ДНК проводили методом нуклеотидного замещения по R. Rigby и соавт. [11]. Гибридизацию поли-А-мРНК с ³H-ТГ кДНК проводили по методу, описанному ранее [8].

Результаты и их обсуждение

Данные, характеризующие выход поли-А-содержащей мРНК в зависимости от вида тиреоидной патологии, представлены в таблице.

Наибольшим был выход поли-А-содержащей мРНК из клеток нормальной щитовидной железы; из клеток диффузного токсического зоба он выше, чем из клеток узлового эутиреоидного зоба. Это согласуется с нашими предыдущими данными, полученными при определении размера популяции ТГ-синтезирующих полирибосом в норме и при тиреоидной патологии [1]. Выход поли-А-содержащей мРНК из клеток врожденного зоба не отличается от нормы.

Выход поли-А-содержащей мРНК из клеток щитовидной железы человека

Объект выделения	Выход поли-А-содержащей мРНК, мкг/г	Количество ТГ-синтезирующих полисом, %	Содержание ТГ в ткани щитовидной железы, мкг/г
Нормальная щитовидная железа	$20,0 \pm 0,11$	$16,2 \pm 0,40$	$86,6 \pm 0,71$
Врожденный зоб	19,5	Не исследовали	0
Узловой эутиреоидный зоб	$12,0 \pm 0,60$	$7,6 \pm 0,20$	$70,2 \pm 1,40$
Диффузный токсический зоб	$17,0 \pm 0,80$	$12,6 \pm 0,14$	$87,7 \pm 2,00$

При ультрацентрифугировании в 5—20% градиенте плотности сахарозы поли-А-содержащая мРНК из клеток врожденного зоба выходила в трех пиках: 33S, 28S, 18S (рис. 1, кривая 2), так же как и мРНК_{ТГ} из клеток нормальной щитовидной железы (рис. 1, кривая 1).

Нативность поли-А-содержащей мРНК из клеток щитовидной железы при врожденном зобе определяли электрофорезом в 1,5% агарозе в присутствии 7 М мочевины (рис. 2). Различий в размере мРНК из клеток нормальной щитовидной железы и при врожденном зобе не обнаружено. Для того, чтобы измерить количество мРНК_{ТГ} при врожденном зобе и в клетках нормальной тиреоидной ткани, более точно были построены Rot кривые (рис. 3). В нормальной тиреоидной ткани (кривая 1) гибридуемость достигала 85%, при врожденном зобе (кривая 2) — 82%. Как видно из представленных данных, и этот анализ не выявил разницы в концентрациях мРНК_{ТГ} в норме и в исследованном нами случае врожденного зоба.

Согласно современным представлениям, первичные механизмы, лежащие в основе недостаточности белков — генных продуктов при ряде наследственных заболеваний, могут быть обусловлены разнообразными внутри- или внегенными мутациями, вызывающими полные либо частичные блоки экспрессии генов на различных уровнях этого сложного и многоступенчатого процесса (нарушение информационной специфичности кодирующих после-

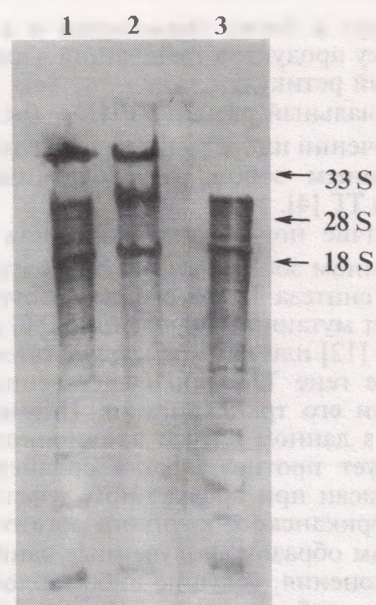


Рис. 2. Электрофорез в 1,5% агарозе в присутствии 7 М мочевины.

1 — поли-А-содержащая мРНК из клеток нормальной щитовидной железы; 2 — поли-А-содержащая мРНК из клеток щитовидной железы при врожденном зобе; 3 — цитоплазматическая РНК из печени мыши.

довательностей гена, недостаточность транскрипции, блоки созревания мРНК, трансляционная недостаточность [3].

Ранее нами было показано, что при врожденном зобе наблюдается резкое уменьшение способности образования гибридов: она составляла всего 12%, что указывало на уменьшение содержания мРНК_{ТГ} в 4,8 раза, нарушение экспрессии гена ТГ происходило на уровне транскрипции [2].

Представленные результаты свидетельствуют о недостаточной экспрессии гена ТГ в клетках щитовидной железы при врожденном зобе. В данном случае врожденного зоба значительных изменений в структуре или транскрипции гена ТГ не происходит. Возможно, в этом случае наблюдаются точковая мутация или неправильное соединение, кото-

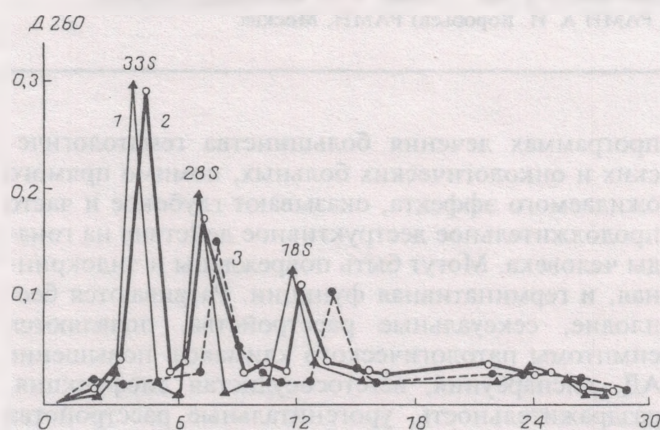


Рис. 1. Ультрацентрифугирование в градиенте плотности 5—20% сахарозы (Spinco L2, SW 65; 3 ч).

1 — поли-А-содержащая мРНК из клеток нормальной щитовидной железы; 2 — поли-А-содержащая мРНК из клеток щитовидной железы при врожденном зобе; 3 — цитоплазматическая РНК из печени мыши.

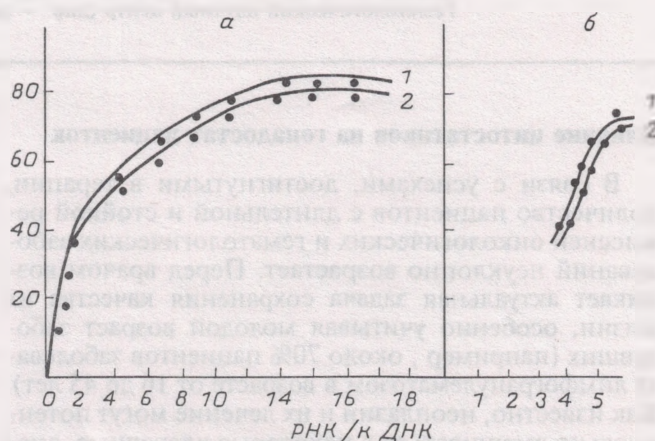


Рис. 3. Кривые гибридизации кДНК_{ТГ} с поли-А-мРНК_{ТГ}.

1 — нормальная щитовидная железа; 2 — врожденный зоб. а — прямые кривые; б — логарифмические кривые. По оси ординат — гибридизация (в %).

рые ведут к блоку трансляции и к аномальному переносу продуктов трансляции через эндоплазматический ретикулум.

Нормальный размер мРНК_{ТГ} был обнаружен и при изучении инбредной породы голландских коз с врожденным зобом, обусловленным дефицитом синтеза ТГ [4].

Наличие нормальных количеств мРНК_{ТГ} при врожденном зобе исключает вероятность того, что дефект синтеза ТГ обусловлен отсутствием экзона 4 за счет мутации в положении С G на участке интрона 3 [12] или является результатом большой делеции в гене ТГ либо существенных изменений скорости его транскрипции. Нормальный размер мРНК в данном случае врожденного зоба свидетельствует против дефекта сплайсинга, который был описан при врожденном дефекте сплайсинга ТГ у африканского крупного рогатого скота [10].

Таким образом, полученные данные указывают на отклонения, ведущие либо к блоку трансляции мРНК_{ТГ}, либо к структурному дефекту молекулы ТГ, который влияет на ее нормальное прохождение через систему клеточной мембраны.

Выводы

1. Из клеток щитовидной железы в норме и при врожденном зобе выделена и охарактеризована поли-А-содержащая мРНК.

2. Показано, что при врожденном зобе не происходит снижения содержания мРНК, что свидетельствует о нарушении экспрессии гена ТГ на уровне трансляции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Атаханова Б. А., Кадырова Д. А., Туракулов Я. Х., Шипицына Г. И. // Биохимия. — 1989. — Т. 54, № 1. — С. 81—87.
2. Гайцхоки В. С. // Биополимеры и клетка. — 1990. — Т. 6, № 11. — С. 31—46.
3. Кадырова Д. А., Атаханова Б. А., Туракулов Я. Х. и др. // Биохимия. — 1979. — Т. 44, № 2. — С. 259—263.
4. Кадырова Д. А., Атаханова Б. А., Туракулов Я. Х., Шипицына Г. И. // Молекул. биол. — 1989. — Т. 23, № 4. — С. 1101—1106.
5. Лейтин В. Л., Лерман М. И. // Биохимия. — 1969. — Т. 34. — С. 839—850.
6. Туракулов Я. Х., Бабаев Т. А., Саатов Т. С. Йодпротеины щитовидной железы. — Ташкент, 1974.
7. Туракулов Я. Х., Атаханова Б. А., Кадырова Д. А. // Пробл. эндокринологии. — 1983. — Т. 29, № 5. — С. 38—41.
8. Kafatos F. C., James C. H. // Nucl. Acids Res. — 1979. — Vol. 7. — P. 1541—1551.
9. De Martinoff R. S. E., Vassart G. // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1970. — Vol. 93. — P. 645—654.
10. Richets M. H., Pohl V., De Martinoff C. D. et al. // Eur. molec. Biol. Organ. — 1985. — Vol. 44, N 3. — P. 731—737.
11. Rigby R. W. J., Dickman M., Ponder G. // J. molec. Biol. — 1977. — Vol. 113. — P. 237—251.
12. Sterk A., van Dijk J., Veenber J. M. et al. // Endocrinology. — 1989. — Vol. 124, N 1. — P. 477—483.

Поступила 03.09.98

♦ ОБЗОРЫ

© Д. Е. Шилин, Е. В. Игнашина, 1999

УДК 615.357.03:618.176-02:615.277.3.03

Д. Е. Шилин, Е. В. Игнашина

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ОВАРИОПРОТЕКТОРОВ ПРИ ЦИТОСТАТИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ У ПАЦИЕНТОК РЕПРОДУКТИВНОГО ВОЗРАСТА

Кафедра эндокринологии детского и подросткового возраста (зав. — проф. Э. П. Касаткина) РМАПО, Гематологический научный центр (дир. — акад. РАМН А. И. Воробьев) РАМН, Москва

Влияние цитостатиков на гонадостат пациенток

В связи с успехами, достигнутыми в терапии, количество пациентов с длительной и стойкой ремиссией онкологических и гематологических заболеваний неуклонно возрастает. Перед врачом возникает актуальная задача сохранения качества их жизни, особенно учитывая молодой возраст заболевших (например, около 70% пациентов болеет лимфогранулематозом в возрасте от 16 до 45 лет). Как известно, неоплазии и их лечение могут потенциально вмешиваться в некоторые клеточные, анатомические или поведенческие процессы, определяющие нормальное сексуальное и репродуктивное функционирование [16, 18, 25, 43, 45, 67]. Цитостатики и антиметаболиты, используемые в

программах лечения большинства гематологических и онкологических больных, помимо прямого ожидаемого эффекта, оказывают глубокое и часто продолжительное деструктивное действие на гонады человека. Могут быть повреждены и эндокринная, и герминативная функции. Развиваются бесплодие, сексуальные расстройства, появляются симптомы патологического климакса: повышение АД, диспареуния, вегетососудистая дисфункция, раздражительность, урогенитальные расстройства и преждевременная менопауза. На фоне гипопестрогении в менопаузе возникают сердечно-сосудистые заболевания, распространенный остеопороз, крауроз и глубокая психологическая травматизация пациентки [2, 3, 5, 50, 54, 58].