

І. А. Громакова, С. Ц. Зільберман, О. О. Коноваленко

Вікові особливості перебігу експериментального гіпотиреозу у щурів

Исследовали интенсивность синтеза белков печени и плазмы крови и активности РНК-полимераз 1 и 2 в печени животных разного возраста в условиях модельного гипотиреоза. С возрастом отмечен более резкий спад включения метки в белки плазмы крови по сравнению с белками печени. При гипотиреозе интенсивность включения метки в белки печени и плазмы крови снижалась. При этом в большей степени ингибировался синтез белков плазмы крови. У старых животных изменение тиреоидного статуса слабо влияло на абсолютные величины включения метки и не отражалось на балансе синтеза белков печени и плазмы крови. Развитие гипотиреоза снижало активности РНК-полимераз 1 и 2. Во всех исследованных возрастах наблюдалось преимущественное снижение активности связанной формы фермента. Активность РНК-полимеразы 2 в условиях экспериментального гипотиреоза подавлялась в большей степени, чем РНК-полимеразы 1. Снижение интенсивности белок- и РНК-синтетических процессов в печени коррелировало с особенностями углеводного обмена: у молодых животных, характеризующихся нарушенной толерантностью к глюкозе в условиях модельного гипотиреоза, интенсивность синтеза белков и РНК подавлялась больше по сравнению со старыми.

ВСТУП

Відповідно до сучасної моделі механізму дії тиреоїдних гормонів їх ефект зумовлюється взаємодією гормон-рецепторного комплексу з генетичним апаратом клітини з наступною стимуляцією транскрипції та транспорту РНК у цитоплазму, індукцією білкового синтезу через збільшення швидкості елонгації білкових молекул, а також активацією метаболічних процесів у клітині [1, 13, 15, 16]. Такий механізм дії тиреоїдних гормонів визначає багатосторонні прояви дисфункцій щитовидної залози, які останнім часом набули широкого розповсюдження. Стрес на стадії виснаження, незбалансоване харчування, цукровий діабет, гостре порушення кровообігу тощо супроводжуються розвитком гіпотиреоїдних станів [2, 6, 11, 12]. Для старіння також характерні дисфункція щитовидної залози і розвиток гіпотиреозу [10, 19].

Мета нашої роботи - дослідження перебігу експериментального гіпотиреозу у тварин різного віку, вивчення таких тироксиназалежних ланок метаболізму, як стан глюкозного гомеостазу та активності білок- і РНК-синтетичних процесів.

МЕТОДИКА

Досліди проводили на самцях щурів (196 тварин) лінії Вістар 1, 3, 12 та 24-місячного віку. Гіпотиреоз моделювали введенням мерказолілу внутрішньоочеревинно у дозі 1 мг/100 г щодобово до реєстрації 40 - 50%-го зниження вмісту тиреоїдних гормонів відносно їх вихідного значення у кожній віковій групі. Час досягнення потрібної глибини гіпотиреозу коливався від 14 діб введення мерказолілу у 1-місячних тварин до 9 діб у старих 24-місячних щурів.

Швидкість утилізації глюкози оцінювали за допомогою глюкозотолерантного тесту, порівнюючи рівні глікемії через 30 та 150 хв після внутрішньоочеревиного введення глюкози у дозі 100 мг/100 г. Концентрацію глюкози визначали ортотолуїдиновим методом, а концентрацію тиреоїдних гормонів та інсуліну - радіоімунологічним методом з використанням стандартних наборів реактивів.

Синтез білків у печінці та плазмі крові оцінювали за включенням ¹⁴C - гідролізату білків хлорели через 45 хв після його внутрішньоочеревиної ін'єкції. Інтенсивність синтезу білків оцінювали за відносними питомими активностями білків печінки і плазми крові, які визначали як відношення питомої активності білків печінки або плазми крові до концентрації мічених амінокислот у печінці [20].

Селективну активність РНК-полімераз 1 і 2 вивчали в модельній системі з ізольованими ядрами клітин печінки за включенням ¹⁴C-УТФ у РНК при наявності різних концентрацій α -аманітину [8]. Активність вільних РНК-полімераз 1 і 2 досліджували у лізаті ядер при наявності актиноміцину Д і

полі (А) [7]. Активність зв'язаних з матрицею ферментів визначали за рівнем РНК-полімеразної активності фракцій осаду ядер, що були піддані лізису, після екстракції зростаючими концентраціями КСІ [7].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Базальний рівень глюкози в крові у тварин з гіпотиреозом істотно не відрізнявся від зареєстрованого у інтактних тварин у всіх вікових групах (рис. 1). Спостереження за динамікою глікемії під час проведення проби на толерантність до глюкози показали, що при гіпотиреозі її утилізація відбувається повільніше, ніж у нормі, лише у молодих тварин. Так, в 1- і 3-місячному віці у щурів з гіпотиреозом вміст глюкози в крові на 150-й хвилині після глюкозного навантаження все ще залишався на високому рівні, тоді як у інтактних тварин він на цей час повертався до базальних значень. У старих тварин з гіпотиреозом концентрація глюкози в досліджені часові інтервали суттєво не відрізнялася від тієї, що реєструвалася у інтактних щурів.

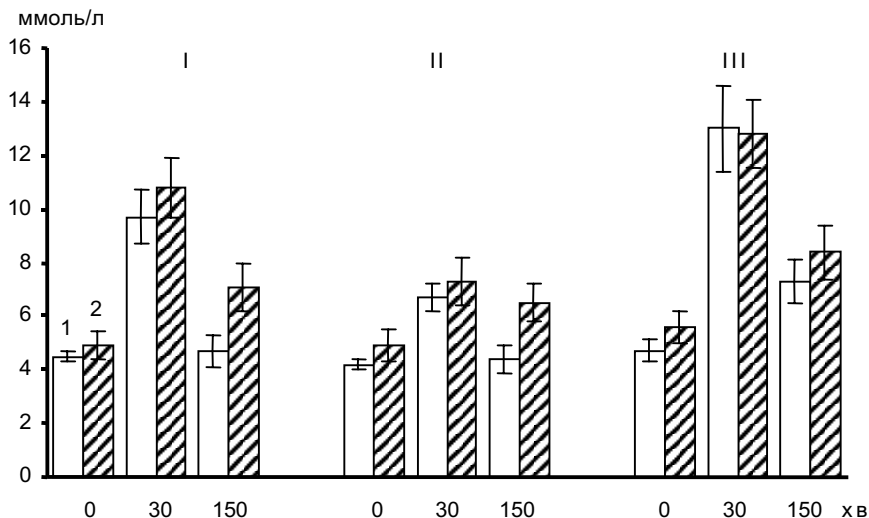


Рис. 1. Вплив гіпотиреозу на динаміку глікемії (2) під час глюкозотолерантного тесту у щурів різного віку порівняно з контрольними тваринами (1): I - 1 міс, II - 3 міс, III - 24 міс.

* $P < 0,05$ при порівнянні значень у контрольних та експериментальних групах тварин 1- і 3-місячного віку на 150-й хвилині досліду.

Про більш значні зрушення в механізмах, що контролюють глюкозний гомеостаз, саме у молодих щурів свідчили показники інсулінемії, зафіксовані в ході глюкозо-толерантного тесту (рис.2). У контрольних тварин найбільший приріст концентрації інсуліну припадав на 30-ту хвилину. У дослідних 1- і 3-місячних щурів максимум інсулінемії зміщувався до 60-ї хвилини, а абсолютні його значення наближалися до рівня 24-місячних тварин, які в нормі характеризуються найбільш високими концентраціями інсуліну в крові.

Таким чином, у молодих щурів при гіпотиреозі спостерігається уповільнена, хоча і висока інсулінемічна реакція на введення глюкози. У цьому разі високий вміст інсуліну не може забезпечити повноцінну утилізацію глюкози за умов гіпотиреозу. Відомо, що тиреоїдні гормони контролюють продукцію та обіг глюкози, причому ці ефекти, принаймні частково, є незалежними від гормонів підшлункової залози [9,14]. За нашими результатами, у молодих щурів при дефіциті тиреоїдних гормонів порушується толерантність до глюкози. Вірогідно, випадіння такої важ-

ливої ланки метаболізму вуглеводів, як незалежна від інсуліну утилізація глюкози, більш помітно відбивається на гомеостатичних показниках тварин з недостатньо сформованою інсуліновою системою, тобто статеві незрілих. Крім того, зміни у стані вуглеводного обміну у разі гіпотиреозу можуть спричинятися зниженням кількості інсулінових рецепторів при дисбалансі тиреоїдних гормонів [6].

Порушення утилізації глюкози при гіпотиреозі призводить до обмеження ефективності ланцюга калоригенних реакцій і може відобразитися на характері та обсязі енергомістких процесів у клітинах-мішенях.

Одним з таких процесів, що знаходяться під багатостороннім контролем тиреоїдних гормонів, є білковий синтез. Виходячи з цього, нами було проведено дослідження інтенсивності білкового синтезу в печінці.

У нормі в печінці спостерігається поступове зменшення синтезу власних і секреторних білків у тварин віком від 1 до 24 міс.

Вікове зниження включення мітки до білків печінки і плазми крові має різний ступінь виявлення. Старіння супроводжується більш різким падінням включення мітки до

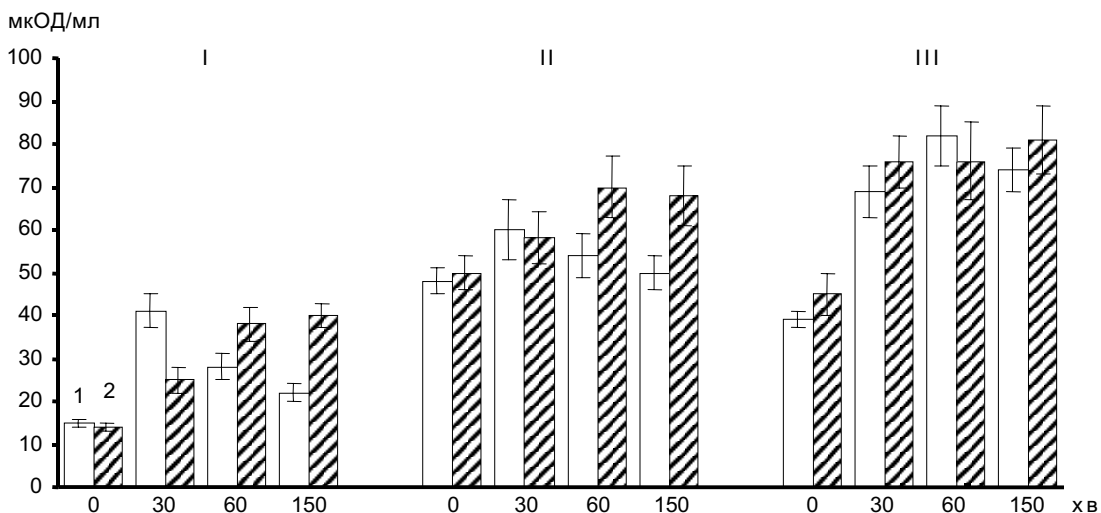


Рис. 2. Вплив гіпотиреозу (2) на динаміку інсулінемії під час глюкозотолерантного тесту у щурів різного віку порівняно з контрольними тваринами (1): I - 1 міс, II - 3 міс, III - 24 міс.

* $P < 0,05$ при порівнянні значень у контрольних та експериментальних групах тварин 1- і 3-місячного віку на 60-й і 150-й хв

білків плазми порівняно із власними білками печінки. Відношення відносної питомої активності білків (ВПА) плазми до ВПА білків печінки становило 0,53 у одномісячних і знижувалося до 0,33 у старих 24-місячних тварин (рис. 3).

Переважна реєстрація міченого попередника у білках, що були виділені з печінки старих тварин, зумовлена, можливо, як затримкою виходу новосинтезованих білків із печінки у кровотік [18], так і зниженням синтезу секреторних білків внаслідок зменшення в старості кількості зв'язаних полісом, на яких синтезується основна маса білків «на експорт» [5].

При введенні мерказолілу спостерігалось зниження інтенсивності синтезу білків у печінці і плазмі крові. Абсолютна величина і вікова динаміка виявлених змін відрізнялися для власних білків печінки і білків плазми крові (див.рис. 3).

Зменшення ВПА білків печінки було подібним у тварин 1- і 12-місячного віку. У 24-місячних щурів не виявлено зменшення включення мітки до білків, що були виділені із печінки. Відповідно, вікові відміни ВПА білків печінки у щурів з гіпотиреозом менш показові, ніж у інтактних тварин.

Зміни інтенсивності синтезу білків плазми крові мали дещо інший характер. Зниження ВПА білків плазми було більш значним порівняно з білками печінки і мало таку вікову динаміку: максимальне зниження відмічалось у молодих тварин (1-3 міс), у старих тварин (24 міс) інтенсивність включення мітки в білки плазми крові майже не змінювалася. Однак за умов гіпотиреозу зберігалися чіткі вікові відмінності показників інтенсивності синтезу білків плазми крові: максимальне значення ВПА білків плазми у тварин з гіпотиреозом, як і у інтактних, припадає на 1-місячний вік, потім, до 24-місячного віку, відбувається поступове зниження цього показника.

Таким чином, введення мерказолілу змінювало баланс білкового синтезу в печінці, пригнічуючи здебільшого синтез білків, що

виробляються «на експорт». Дані про переважне пригнічення синтезу білків плазми крові при гіпотиреозі наводяться також Muller та співавт. [13]. У тварин з гіпотиреозом спостерігалось також нівелювання міжвікової різниці показників інтенсивності синтезу білків печінки і плазми крові. При цьому більш істотно це позначалося на власних білках печінки, що, очевидно, зумовлене деякими відмінами темпів вікового зниження синтезу власних білків печінки і білків, які синтезуються «на експорт».

Під впливом тиреоїдних гормонів специфічно активується лише невелика кількість генів [17]. Разом з тим тиреоїдні гормони являють собою потужний регулятор процесів транскрипції, стан якої при гіпотиреозі у віковому аспекті досліджений недостатньо. Під впливом тиреоїдних гормонів підвищується матрична активність хроматину, збільшується швидкість синтезу РНК і білків [16,

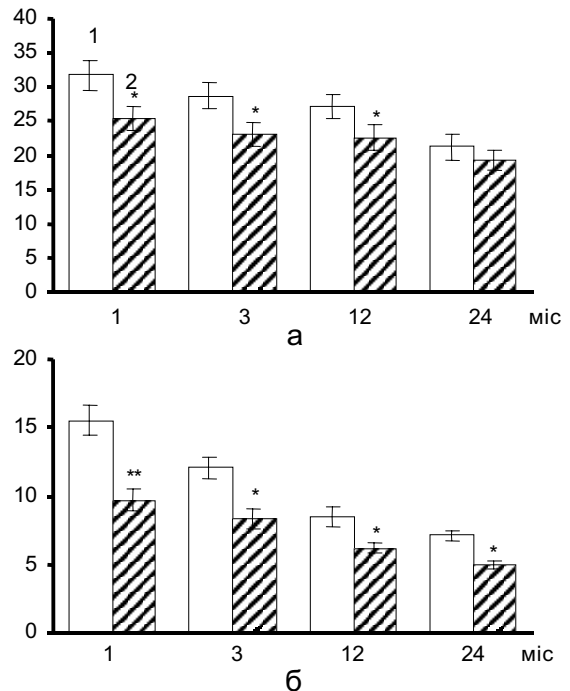


Рис. 3. Вплив гіпотиреозу (2) на відносні питомі активності білків печінки (а) і плазми крові (б) щурів різного віку порівняно із контрольними тваринами (1).

*P < 0,05, **P < 0,01 відносно контролю.

17]. Перший процес зумовлюється опосередкованою або безпосередньою взаємодією гормону з "тиреоїдкомпетентною" ділянкою ДНК, внаслідок чого відбувається збільшення кількості ділянок транскрипції [3]. Підвищення швидкості синтезу РНК спричинюється також активністю РНК-полімераз. Про стан цих процесів дає уявлення рівень синтезу РНК і співвідношення вільної та зв'язаної фракцій РНК-полімерази.

Відомо, що в клітині РНК-полімерази існують у двох фракціях: зв'язаного з матрицею ферменту, який, власне, здійснює синтез РНК, і вільного ферменту, який є депонованою формою, здатною переходити у фракцію матрично пов'язаного ферменту за потребою.

У нормі при старінні ми спостерігали зменшення активності фракції зв'язаних РНК-полімераз. Активність вільних РНК-полімераз підвищувалася до 3-місячного віку і не зазнавала суттєвих змін під час онтогенезу. Падіння загальної активності РНК-полімераз відбувається, головним чином, внаслідок виведення частини ферментів із активно функціонуючого пулу, а не за рахунок зменшення синтезу ферментів [7].

Введення мерказолілу призводило до зменшення РНК-полімеразної активності в ядрах клітин печінки (рис. 4). При цьому зменшувались активності обох фракцій ферменту (як зв'язаної, так і вільної), причому, на усіх досліджених етапах онтогенезу активність зв'язаної форми зменшувалася більшою

мірою, ніж вільної, що вказує як на обмеження діапазону транскрипції, так і на зменшення кількості ферментів та/або на зниження їх обігу в циклі синтезу РНК.

Вікові характеристики досліджуваних фракцій РНК-полімераз у разі гіпотиреозу мають свої особливості. Максимального зниження активність РНК-полімерази 1 зазнає у 3-місячних щурів. Тварини старшого віку відповідають на дію тиреостатичного агенту меншою мірою. РНК-полімераза 2 більш істотно, ніж РНК-полімераза 1, реагує на дефіцит тиреоїдних гормонів. Зниження її активності не має суттєвих онтогенетичних особливостей: у всіх тварин в інтервалі 1-24 міс реєструвалася подібна різниця досліджуваного показника. Це, на наш погляд, може бути свідченням схожих рівнів тироксинрегулю-

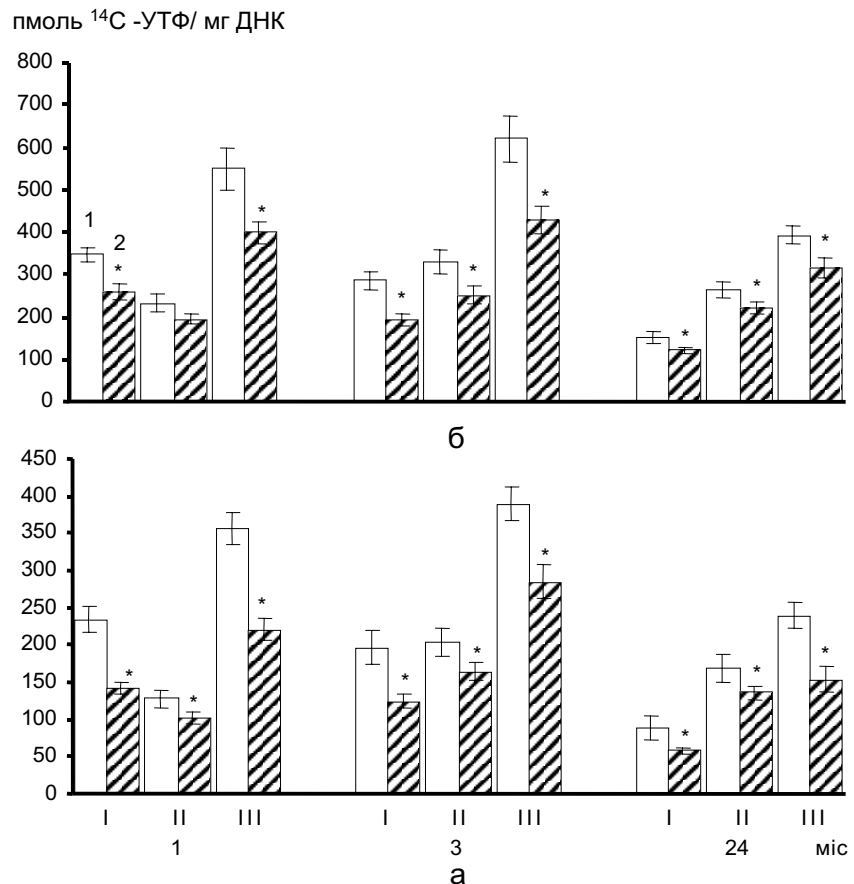


Рис. 4. Вплив гіпотиреозу (2) на активність РНК-полімерази 1 (а) і 2 (б) печінки щурів різного віку порівняно із контрольними тваринами (1). I - зв'язана, II - вільна, III - загальна. * $P < 0,05$ відносно контролю.

ваної транскрипції у вказаному віковому діапазоні.

Слід зазначити, що при гіпотиреозі, як і при старінні, зниження синтезу РНК відбувається на тлі достатнього забезпечення РНК-полімеразою. Це свідчить про те, що падіння синтезу РНК у печінці за таких умов зумовлено не дефіцитом ферментів, а визначається, переважно, матричною активністю ДНК. Навпаки, синтез РНК-полімераз при старінні знижується незначно, порівняно з загальним синтезом білків. Цей феномен можна пояснити даними про чисельну локалізацію генів РНК-полімераз [4].

Таким чином, моделювання гіпотиреозу однакової глибини у тварин різних вікових груп дозволило виявити онтогенетичні особливості впливу дефіциту гормонів щитовидної залози на показники вуглеводного та білкового обміну. Тиреоїдна недостатність більш істотно відбивається на процесах метаболізму у молодих щурів. У старості формується особлива метаболічна ситуація, яка характеризується відносною незалежністю від дії ендокринних регуляторів.

Одержані результати свідчать на користь диференційованого підходу до осіб різних вікових груп при використанні гормональної корекції патологічних станів будь-якого генезу.

**I.A.Gromakova, S.Ts.Zilberman,
O.A.Konovalenko**

AGE PECULIARITIES AT EXPERIMENTAL HYPOTHYROIDISM IN RATS

The rate of both the synthesis of liver and plasma proteins and RNA-1 and RNA-2 polymerase activities in liver were studied in rats of various ages at experimental hypothyroidism. There has been marked more significant decrease in plasma protein synthesis with age. Both the rate of liver and plasma protein synthesis have been shown to be reduced at experimental hypothyroidism but synthesis of plasma proteins was inhibited to a greater extent. Considerable changes were observed neither in liver and plasma protein synthesis nor in the balance between these two groups of the protein synthesis in old rats. RNA-1 and RNA-2 poly-

merase activities decreased at hypothyroidism. At all ages the activity of bound enzymes decreased to a larger extent as compared to free forms. The activity of RNA-polymerase 2 was more inhibited than that of RNA-polymerase 1. Reducing protein- and RNA-synthetic processes in the liver with age correlated with the peculiarities of the carbohydrate metabolism: in those young animals with an impaired glucose tolerance the inhibitory effect of hypothyroidism on the intensity of protein and RNA synthesis was more potent as compared to old animals.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Адылова А.Т., Гарафутдинова Е.А., Петрова О.С., Абдукаримов А. Влияние тиреоидных гормонов на ядерно-цитоплазматический транспорт РНК // Пробл. эндокринологии. - 1986. - **32**, N 2. - С. 74-77.
2. Белецкая О.М. Патогенез и перспективы лечения синдрома низкого трийодтиронина при нетиреоидных заболеваниях. - Харьков: ХИУВ, 1992 - 82 с.
3. Зильберман С.Ц., Паскевич И.Ф. Возрастные особенности синтеза и активности основных форм ДНК-зависимой РНК-полимеразы ядер клеток печени белых крыс. Физиологические и молекулярные аспекты онтогенеза. - К.: Наук. думка, 1977. - С. 68-74.
4. Льюин Д. Гены. - М.: Наука, 1987. - 724 с.
5. Хасигов П.З., Николаев А.Я. Метаболизм поли (А) – содержащих информационных РНК полирибосом клеток печени крыс в онтогенезе // Биохимия. - 1983. - **48**, вып. 3. - С. 512-517.
6. Azam M., Gupta B.L., Baquer N.Z. Effect of hyperthyroidism and hypothyroidism on rat blood cell insulin receptors and catecholamines; relationship with cellular ageing // Biochem. Int. - 1990. - **21**, N 1. - С. 135-144.
7. Bolla R., Denkla W.D. Effect of hypophysectomy on liver nuclear RNA synthesis in ageing rats. // Biochem. J. - 1979. - **184**, N 1. - P. 669-674.
8. Castle T., Katz A., Richardson A. Comparison of RNA synthesis by liver nuclei from rats of various ages // Mech. Ageing and Develop. - 1978. - **8**, N 3. - P. 383-395.
9. Dillmann W. H. Mechanism of action of thyroid hormones // Med. Clin. N. Amer. - 1985. - **69**, N 5. - P. 849-861.
10. Fleury - Goyon M.C., Dufey P., Charrie A. Variations de l'hormonémie thyroïdienne libre avec l'age // Rev. for endocrinol. clin. nutr. et metab. - 1988. - **29**, N 6. - P. 573-582.
11. Hillgartner F. B., Romsos D.R. Nuclear triiodothyronine receptor binding characteristics and occupansy in obese (ob/ob) mice // Amer. J. Physiol. - 1987 - **252**, N 3, Pt. I. - P. E414-E425.

12. Kaptein E.M. Thyroid hormone metabolism and thyroid diseases in chronic renal failure // Endocrine reviews. - 1996. - **17**, N 1. - P. 45-63.
13. Muller M.J., Seitz N.J. Thyroid hormone action on intermediary metabolism. III. Protein metabolism in hyper- and hypothyroidism // Klinische Wochenschrift. - 1984. - **62**, N 3. - P. 97-102.
14. Muller M.J., Burger A.G., Ferrannini E. et al. Glucoregulatory function of thyroid hormones : Role of pancreatic hormones // Amer. J. Physiol. - 1989. - **256**. - P. E101-E110.
15. Nikodem V., Trus B.L., Rall J. Two-dimensional gel analyses of rat liver nuclear proteins after thyroidectomy and thyroid hormone treatment // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Biol. Sci. - 1981. - **78**, N 88. - P. 4411-4415.
16. Oppenheimer J.H., Samuels H.H.. Molecular basis of thyroid hormone actions. - N-Y.: Acad. Press, 1983. - 274 p.
17. Oppenheimer J.H. Thyroid hormone action at the nuclear level // Ann. Intern. Med. - 1985. - **102**, N 3.- P. 374-384.
18. Popper H. Relations between liver and ageing. // Seminars in liver disease. - 1985.- **5**, N 3.- P. 221-227.
19. Reymond F., Denereaz N., Lemarchand-Beraud Th. Thyrotropin action is impaired in the thyroid gland of old rats // Acta endocrinol. - 1992. - **126**, N 1. - P. 55-63.
20. Szian G., Kalbermann L.E., Gomes S.J. Hormonal regulation of brain development. 4. Effect of neonatal thyroidectomy upon incorporation in vivo of ³H-phenylalanine into proteins of developing rat cerebral tissues and pituitary gland // Brain Res. - 1971. - **27**, N 2. - P.309-318.

*Харків. нац. ун-т ім. В.Н.Каразіна М-ва
освіти та науки України*

*Матеріал надійшов до
редакції 19.09.2000*