

*Державна установа «Інститут ендокринології та обміну речовин
ім. В. П. Комісаренка АМН України»
State Institution «V. P. Komisarenko Institute of Endocrinology and
Metabolism of the Academy of Medical Sciences of Ukraine»*

ЕНДОКРИНОЛОГІЯ

ENDOKRYNOLOGIA

2008

Том 13, № 1
Volume 13, No. 1

Журнал заснований у 1996 р.

Founded in 1996

Київ
Kyiv

Редакційна колегія:

ТРОНЬКО М. Д. (головний редактор), БЕЗВЕРХА Т. П. (відповідальний секретар), БОЛЬШОВА О. В., ГОРБАНЬ Є. М., ЄФІМОВ А. С. (заступник головного редактора з клінічної ендокринології), КАРАЧЕНЦЕВ Ю. І., КОВЗУН О. І., КОРПАЧОВ В. В., КРАВЧЕНКО В. І., МАНЬКОВСЬКИЙ Б. М., МАРКОВ В. В., МИКОША О. С. (заступник головного редактора з експериментальної ендокринології), НАУМЕНКО В. Г., ОЛІЙНИК В. А., ОРЛЕНКО В. Л., ПОЛТОРАК В. В., РЕЗНІКОВ О. Г., РИБАКОВ С. Й., ТОМАШЕВСЬКИЙ Я. І.

Редакційна рада:

БОДНАР П. М. (Київ), БОЦЮРКО В. І. (Івано-Франківськ), ВЕНДЗИЛОВИЧ Ю. М. (Львів), ВЛАСЕНКО М. В. (Вінниця), ВОЙНІЛОВИЧ В. О. (Чернігів), КОМІСАРЕНКО І. В. (Київ), ПАВЛОВСЬКИЙ М. П. (Львів), ПАВЛЮК П. М. (Київ), СЕЛІВАНОВА К. Ф. (Сімферополь), ТУРЧИН І. С. (Київ)

Адреса редакції:

ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В. П. Комісаренка АМН України»,
вул. Вишгородська, 69, м. Київ, 04114, Україна
тел.: (044) 430-36-94, 431-02-64
факс: (044) 430-36-94
E-mail: endorg@ukrpost.ua

Address of the Editorial Board:

State Institution «V.P. Komisarenko Institute of Endocrinology and Metabolism of the Academy of Medical Sciences of Ukraine»,
Vyshgorodska Str., 69, Kyiv 04114, Ukraine
Tel.: +380 44 430 36 94, +380 44 431 02 64
Fax: +380 44 430 36 94
E-mail: endorg@ukrpost.ua

Редакція не завжди поділяє думки авторів статей. За точність викладеного матеріалу відповідає автор публікації, за зміст реклами – рекламодавець.

ISSN 1680-1466

Свідоцтво про державну реєстрацію – КВ № 5223 від 20.06.2001

Здано до набору 24.03.2008. Підп. до друку 7.05.2008. Формат 70 x 108/16.
Офсетний друк. Ум.-друк. арк. 14,2. Наклад 300 прим.

ТОВ «Фірма «ЕСЕ», бульв. Академіка Вернадського, 34/1, м. Київ, 03142, Україна

ЗМІСТ

Оригінальні дослідження

Особлива субпопуляція тироцитів в пункційному матеріалі папілярних карцином щитоподібної залози <i>Ю. М. Божок, Г. В. Зелінська, А. Г. Ніконенко</i>	4
Ризик виникнення злоякісних пухлин інших локалізацій у хворих на диференційований рак щитоподібної залози, які зазнали впливу негативних чинників аварії на ЧАЕС <i>О. В. Тепла, О. М. Коваленко</i>	13
Клінічна характеристика та диференціальна діагностика фолікулярних аденом і фолікулярних карцином щитоподібної залози <i>Г. Р. Янчій</i>	21
Стан вегетативної регуляції серцевого ритму у молодих хворих на рак щитоподібної залози у перед- і післяопераційному періодах <i>С. Т. Зубкова, Ю. В. Булдігіна, С. Я. Варгачий</i>	28
Особливості проникливості мембран мітохондрій клітин з ділянок нормальної тироїдної паренхіми мікро- та нормофолікулярної будови <i>Т. М. Мишуніна, О. В. Калініченко</i>	35
Виявлення гена RET та онкогенів RET/PTC в пухлинах щитовидної залози за методом кількісної полімеразної ланцюгової реакції <i>Л. Г. Воскобойник</i>	45
Екстракція та зберігання нуклеїнових кислот з умовно нормальної та пухлинної тканин щитоподібної залози: порівняння сучасних методів <i>В. М. Пушкар'юв, О. І. Ковзун, Л. Г. Воскобойник, Н. М. Костюченко, Л. Ю. Зурнаджи, Т. І. Богданова, Г. П. Кашеваров, В. А. Негрецький, О. С. Лукашеня</i>	58
Вплив шунтування та бандажування шлунка на рівень показників глюкозотолерантного тесту, інсуліну та С-пептиду у хворих морбідним ожирінням <i>О. С. Тивончук, А. С. Лаврик, С. П. Кожара, О. Д. Фурманенко</i>	66
Застосування альфафоркалу у лікуванні хворих на цукровий діабет з артропатіями <i>В. Л. Орленко</i>	76
Нефропротекторные свойства пресартана-50 у больных сахарным диабетом <i>Л. В. Корпачева-Зинич, Н. Н. Кушнарєва, В. Н. Скибун</i>	83
Використання препарату остеовіту для профілактики глюкокортикоїдного остеопорозу <i>А. П. Левицький, О. А. Макаренко</i>	92
Вплив таксолу на рівень фрагментації ДНК і стероїдоге. рункцію в доброякісній гормонально-неактивній пухлині та поза лінній тканині кори надниркових залоз людини <i>Н. І. Левчук, В. М. Пушкар'юв</i>	98

Огляди

Тотожність (мімікрія) антигенів підшлункової залози та вірусів (огляд літератури і власні дослідження) <i>Н. В. Іванська, С. В. Мельниченко, Р. Г. Лукашова, Е. М. Жеребцова</i>	104
---	-----

Локальна реактивація глюкокортикоїдів – нова терапевтична мішень чи манливе світло в кінці тунелю ? (огляд літератури) 117
Т. П. Безверха, М. Д. Тронько

Зв'язок підвищення кількості заліза в організмі з метаболічними порушеннями при інсулінорезистентному синдромі та цукровому діабеті 2 типу (огляд літератури) 136
В. М. Скибун

Коротке повідомлення

Пренатальне застосування налтрексону запобігає порушенням стресової реактивності гіпоталамо-гіпофізарно-адренокортикальної системи у щурів із синдромом пренатального стресу 146
Н. Д. Носенко

Лекція

Уроджений гіпотироз: сучасні погляди на стару проблему 151
В. М. Пилипенко

Рецензія

Обереги й дороговкази дивної людини 163
Про книгу «В. П. КОМІСАРЕНКО. Життєвий і творчий шлях»
/За заг. ред. М. Д. Тронька. К.: Авіцена, 2007. 144 с., іл.
Юрій Віленський

ОСОБЛИВА СУБПОПУЛЯЦІЯ ТИРОЦИТІВ В ПУНКЦІЙНОМУ МАТЕРІАЛІ ПАПІЛЯРНИХ КАРЦИНОМ ЩИТОПОДІБНОЇ ЗАЛОЗИ

Ю. М. Божок*, Г. В. Зелінська, А. Г. Ніконенко¹

Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В. П. Комісаренка АМН України, м. Київ, 04114; ¹Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, м. Київ, 01024, Україна

Цитоморфологічне дослідження матеріалу тонкогілкових пункційних біопсій 45 папілярних карцином дозволило виявити гетерогенність популяції клітин фолікулярного епітелію цих новоутворень. Одна з досліджених субпопуляцій надзвичайно відрізнялась від інших тироцитів особливим виглядом поверхні клітин, а за імуноцитохімічними ознаками – пригніченням експресії тироглобуліну та епітеліальних глікопротеїнів (антиген Ber-EP4) при збереженні синтезу цитокератинів № 7 та 8. Такі клітини не знайдено у пункційному матеріалі 120 аденоматозних вузлових зобів, 72 кістозно-дегенеруючих вузлових зобів та 23 фолікулярних аденом. Отримані дані дають можливість використовувати виявлення описаних клітин в якості маркера малігнізації фолікулярного епітелію.

Ключові слова: щитоподібна залоза, папілярна карцинома, тонкогілкова аспіраційна біопсія, субпопуляції епітеліоцитів.

Цитологічна діагностика, на відміну від патогістологічних досліджень, не може використовувати для ідентифікації злоякісних пухлин такі безсумнівні ознаки злоякісної «поведінки» клітин карцином, як інвазії в судини або проростання капсули. Натомість, при визначенні злоякісних новоутворень цитологічна діагностика спирається на особливості морфологічної будови та біохімічного складу клітин. Ці особливості не пов'язані безпосередньо з реалізацією інвазивних властивостей клітин, але певною мірою відображають рівень нестабільності їх геному, внаслідок якої виникають клони, що здатні утворювати метастази.

Точність цитологічної діагностики суттєво зросла б, якби вона спиралась на визначенні тих ознак, що мають пряме відношення до фундаментальних процесів онкогенезу та прогресії карцином.

Сучасні теорії онкогенезу розглядають злоякісні пухлини, зокрема карциноми щитоподібної залози, як популяції моноклональних за походженням клітин [1-3]. Відповідно до стохастичної моделі, початок цій популяції кладе мутація в одній з клітин паренхіми органа. Згідно з іншою, найбільш поширеною на сьогоднішній день гіпотезою, пухлини утворюються завдяки дизрегуляції самооновлення стовбурових клітин, що, вірогідно, містяться в кожному органі, в тому числі і в щитоподібній залозі [4-7]. Це призводить до експансії такої популяції та формування новоутворення. Обидві теорії вказують,

*Адреса для листування (Correspondence): Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В. П. Комісаренка АМН України, вул. Вишгородська, 69, м. Київ, 04114, Україна

що завдяки генетичним та епігенетичним змінам (абераційній диференціації) моноклональна за походженням популяція клітин злоякісної пухлини з часом розпадається на ряд субклонів та стає фенотипічно гетерогенною [8, 9]. Саме серед згаданих субклонів з'являються такі, що здатні до інвазивного росту та утворення метастазів. Ось чому при розробці нових методів цитологічної діагностики варто було б звернути увагу на субклональну організацію популяції епітеліальних клітин карцином, та визначення наявності субклонів, здатних до інвазивного росту.

На сьогоднішній день нам невідомі дослідження, в яких би в зазначеному вище аспекті аналізувався матеріал пункційних біопсій щитоподібної залози. Стосовно цього органа лише в роботі Н. Studer et al. [10] на гістологічних зрізах тканин вузлового зоба було продемонстровано гетерогенність популяції фолікулярного епітелію за ознакою проліферативної активності. N. Mitsutake et al. [7] в дослідках *in vitro* на культурах ліній анапластичних карцином щитоподібної залози показали, що лише невелика субпопуляція цих клітин має певні властивості стовбурових.

Виходячи з викладених міркувань, ми поставили собі за мету визначити, чи можливо продемонструвати певні ознаки наявності субклонів у популяції епітеліальних клітин папілярних карцином щитоподібної залози шляхом виявлення фенотипічної гетерогенності тиреоцитів на матеріалі пункційних біопсій таких пухлин.

Матеріали та методи дослідження

Для цитоморфологічних досліджень було використано матеріал діагностичних тонкоіголкових аспіраційних біопсій 120 аденоматозних вузлових зобів та 72 кістозно-дегенеруючих вузлових зобів, 23 фолікулярних аденом та 45 папілярних карцином щитоподібної залози пацієнтів обох статей віком від 21 до 65 років. Цитохімічні та імуноцитохімічні дослідження було проведено на пункційному матеріалі 15 папілярних карцином щитоподібної залози.

Цитоморфологічні дослідження проводились на мазках пункційного матеріалу, зафіксованих в метанолі та пофарбованих розчином суміші Романовського на фосфатному буфері при рН 6,4.

Відносна оптична щільність цитоплазми клітин визначалась за допомогою інтерференційного мікроскопа з двошпроменевою системою.

Визначення локалізації РНК в клітинах проводили за допомогою перетравлення РНК-азою (SIGMA, 1 мг/10 мл, 1 год при 37 °С) після екстракції барвників з препаратів 5 % оцтовою кислотою. Після закінчення перетравлення препарати знов фарбували сумішню Романовського.

Нейтральні полісахариди виявляли ШИК-реакцією також після екстракції барвників 5 % оцтовою кислотою.

Для визначення наявності в клітинах певних антигенів застосовували непрямий імунопероксидазний метод з використанням моноклональних антитіл миші до цитокератинів № 7, 8, 17, 20, Рап Ск, епітеліальних глікопротеїнів (Ber-EP4), загальнолейкоцитарного антигену CD45, макрофагального антигену CD68 та тироглобуліну (Dako, Данія). Для визначення кальцитоніну використовували поліклональні антитіла тієї ж фірми. Мічені пероксидазою вторинні антитіла були також виробництва фірми Dako.

Імуноцитохімічні реакції проводили на препаратах, попередньо пофарбованих сумішню Романовського і досліджених морфологічно. Перед реакцією відновлювали активність антигенних детермінант за допомогою методу, розробленого в нашій лабораторії [11]. Для точного зіставлення морфологічних та цитохімічних характеристик одних і тих самих клітин, їх фотографували цифровою камерою до та після проведення цитохімічних або імуноцитохімічних реакцій.

Площа проекції була вибрана як показник розміру ядер клітин папілярних карцином. Виміри цього параметру здійснювали за допомогою програми UTHSCSA ImageTool (версія 3, University of Texas, США) на цифрових мікрофотографіях п'яти випадків папілярних карцином, зроблених на мікроскопі Olympus камерою Olympus DP12 (Японія). Статистичну вірогідність розбіжностей між виборками аналізували за допомогою непараметричного тесту Колмогорова-Смірнова. Вірогідними вважали розбіжності при $P < 0,05$.

Результати досліджень та їх обговорення

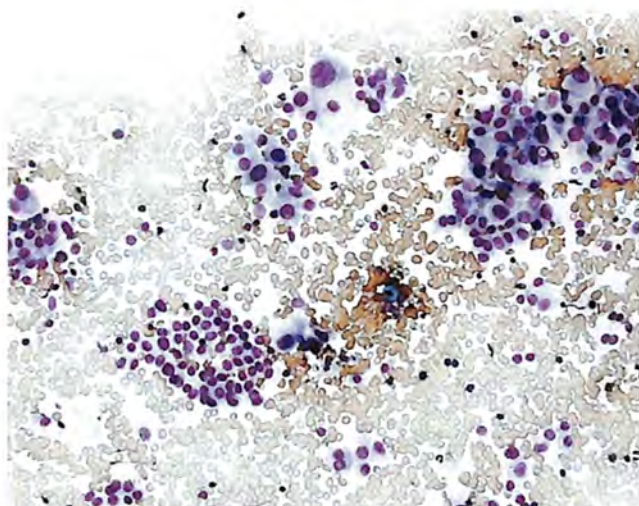
Серед досліджених нами випадків папілярного раку суттєвий поліморфізм в популяції клітин фолікулярного епітелію (А-клітин) спостерігався у 82 % пухлин. Звичайно він проявлявся у варіаціях розміру епітеліоцитів, а особливо – розмірах та формі їх ядер при збереженні загальних тінкторіальних властивостей цитоплазми та типової структури хроматину. Але нашу увагу привернула інша особливість морфологічної картини пункційного матеріалу ряду папілярних карцином. На цитологічних препаратах цих новоутворень в загальній популяції епітеліоцитів часто можна було виділити окремі субпопуляції. Вони були представлені клітинними угрупованнями (або комплексами), що відрізнялись одне від одного морфологічними характеристиками та взаєморозташуванням тироцитів, які їх складали (мал. 1).

Вбагатьох випадках можна було виділити принаймні 2 типи таких угруповань. Найчисельнішими були групи 1-го типу, утворені епітеліальними клітинами невеликого розміру (12-20 мкм) з помірним ядерно-цитоплазматичним співвідношенням. Ці групи складались з одноманітних клітин, що мали амфотильну або слабооксифільну цитоплазму та утворювали одношаровий пласт із відносно регулярним розташуванням тироцитів (мал. 2).

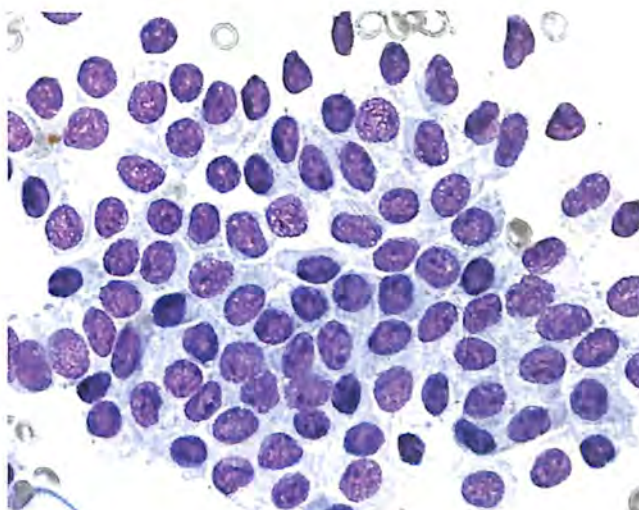
Групи 2-го типу складались із збільшених за розмірами (24-48 мкм) поліморфних базотильних клітин, що мали зменшене ядерно-цитоплазматичне співвідношення. Розташування тироцитів в межах груп 2-го типу було нерегулярним, а самі групи скоріше можна було назвати комплексами клітин чи кластерами, ніж фрагментами епітеліальних пластів (мал. 3). Іноді в клітинану в цитоплазмі біля ядра. Як показали експерименти з перетравленням РНК-азою, базотильність такої макули обумовлена саме вмістом рибонуклеїнової кислоти. Епітеліальну природу клітин з «макулою» доводить їх інтенсивна реакція з антитілами проти цитокератинів № 7 та 8. Такі «макули» не було знайдено в епітеліальних клітинах з пункційного матеріалу жодного із 215 досліджених нами доброякісних утворень щитоподібної залози (мал. 4).

Серед епітеліоцитів, що утворювали групи 2-го типу, привертала увагу особливі клітини, які вкрай відрізнялись від інших станом своєї поверхні. На відміну від інших клітин, вони мали надзвичайно чіткі межі, обумовлені різкою різницею у світлозаломленні між цитоплазмою та оточуючим середовищем (мал. 5). Згадані клітини мали округлу або грушовидну форму, мале ядерно-цитоплазматичне співвідношення та широкі варіації у розмірах (18-40 мкм). Їх цитоплазма виявляла помірну базотильність в центральній частині і була безбарвна на периферії, від чого такі клітини виглядали світлішими від оточуючих. Умовно ми назвали їх клітинами «субклону А». Ми знайшли їх у 46 % обстежених папілярних карцином.

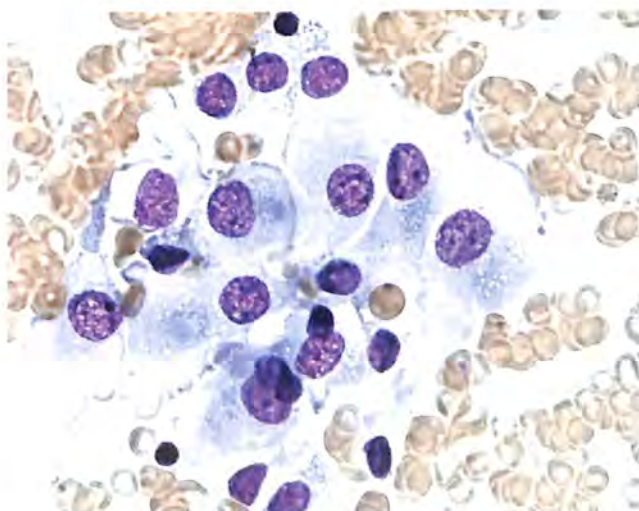
Надзвичайно чіткі межі клітин можна було б пояснити винятковою щільністю або, навпаки, розрідженістю їх цитоплазми. Але дослідження за допомогою інтерференційної мікроскопії показали, що оптична щільність цитоплазми клітин «субклону А» не відрізняється від інших, тому наявність надзвичайно чіткої межі скоріше за все обумовлена станом їхньої поверхні.



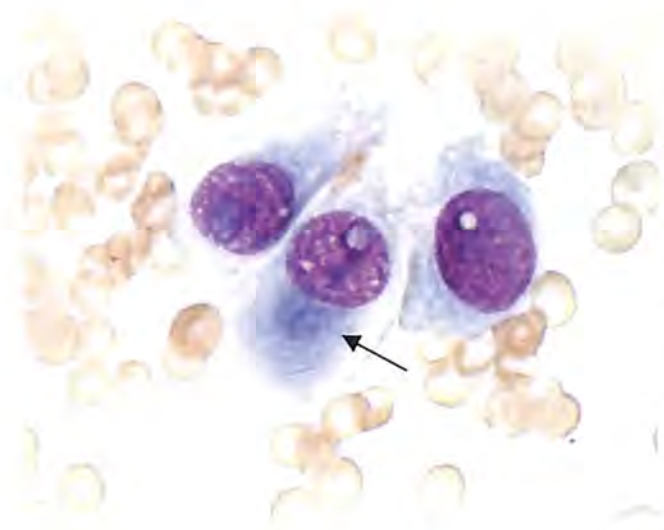
Мал. 1. Кластери та пласти різних за морфологією епітеліальних клітин в пунктаті папілярної карциноми. Об. х 10.



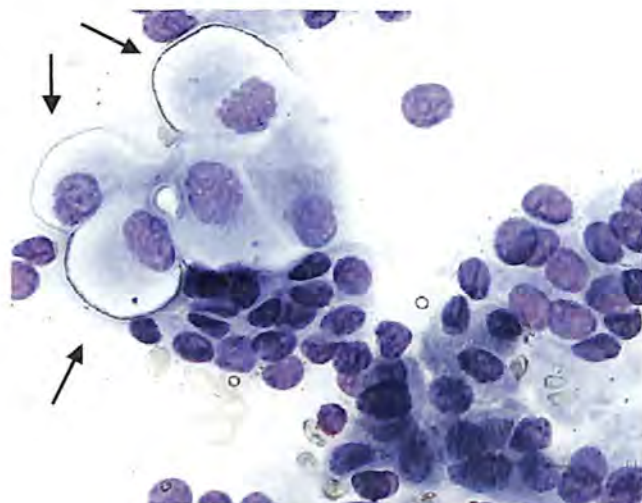
Мал. 2. Групи епітеліоцитів 1-го типу. Пунктат папілярної карциноми. Пофарбування за Романовським. Об. х 40.



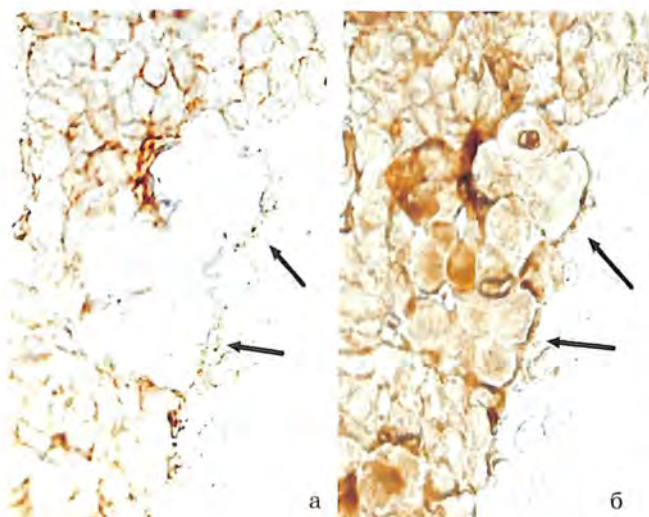
Мал. 3. Групи епітеліоцитів 2-го типу. Пунктат тієї ж папілярної карциноми. Пофарбування за Романовським. Об. х 40.



Мал. 4. Базофільна «макула» (вказана стрілкою) в цитоплазмі епітеліоцита з групи 2-го типу. Пофарбування за Романовським. Об. х 60.



Мал. 5. Група клітин «субклону А» (вказана стрілкою) серед інших епітеліоцитів в пунктаті папілярної карциноми. Пофарбування за Романовським. Об. х 40.



Мал. 6. Послідовні імуноцитохімічні реакції з антитілами проти епітеліальних глікопротеїнів (а) та цитокератину № 7 (б) на одних і тих самих клітинах пунктату папілярної карциноми. Стрілки вказують на клітини «субклону А». Непряма імунопероксидазна реакція. Об. х 40.

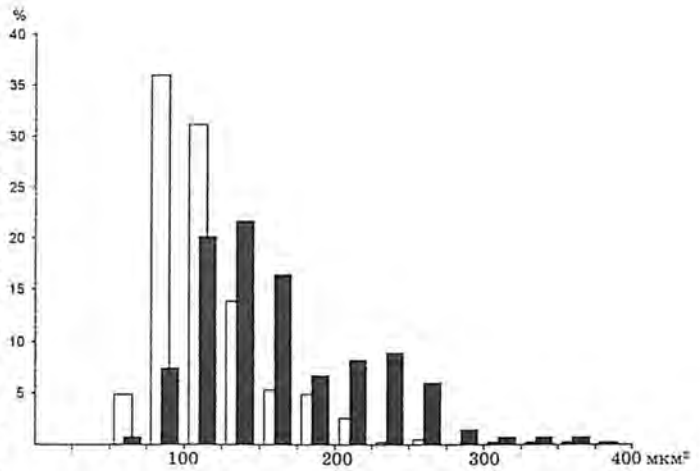
Тінкторіальні властивості цитоплазми клітин «субклону А» не можна також пояснити накопиченням нейтральних мукополісахаридів, оскільки ці клітини давали ШИК-реакцію, аналогічну за інтенсивністю такій інших клітин фолікулярного епітелію карцином. Накопичення кислих мукополісахаридів теж можна виключити, тому що цитоплазма цих клітин не забарвлювалась метакромично азурами суміші Романовського. Краплі ліпідів в ній наявні лише у випадках папілярних карцином з виразною жировою дистрофією фолікулярного епітелію. Іноді клітини «субклону А» містили згадану вище базофільну макулу. Вакуолізація цитоплазми для них не була характерною.

Імуноцитохімічні дослідження показали, що клітини «субклону А» дійсно є епітеліальними клітинами. Вони не містять загальнолейкоцитарного (CD45) та макрофагального антигенів (CD68). В той же час їм, як і іншим клітинам фолікулярного епітелію, притаманні чітка реакція з антитілами Рап Ск, високий вміст цитокератинів № 7 і № 8 та відсутність цитокератину № 20. Клітини «субклону А» лише іноді зв'язували антитіла проти цитокератину № 17, експресія якого часто спостерігається у папілярних карциномах цитоподібної залози.

Між тим, клітини «субклону А» не давали реакції з антитілами проти епітеліальних глікопротеїнів (Ber-EP4) (мал. 6). Це досить дивно, адже цей антиген завжди є в А-, В- і С-клітинах цитоподібної залози як в нормі, так і при малігнізації. Клітини «субклону А» також не давали чіткої реакції з антитілами проти тиреоглобуліну і не містили кальцитоніну.

Морфометричні дослідження показали, що клітини «субклону А» вірогідно відрізняються від інших клітин фолікулярного епітелію папілярних карцином. Площа проекції ядер цих клітин дорівнювала $169,6 \pm 4,5 \text{ мкм}^2$ ($n=196$) та була вірогідно більшою за відповідний показник загальної популяції епітеліоцитів – $112,1 \pm 1,6 \text{ мкм}^2$ ($n=500$, $P < 0,05$). Аналіз гістограм розподілу цього показника також продемонстрував наявні відмінності клітин «субклону А» (мал. 7). В той час як мода гістограми загальної популяції епітеліоцитів відповідала ядрам з площею проекції до 100 мкм^2 , гістограма клітин «субклону А» мала два максимуми – до 150 мкм^2 та до 250 мкм^2 . Однак за структурою хроматину та наявністю псевдовключень цитоплазми у ядро між клітинами двох популяцій відмінності були відсутні.

Ми порівняли окремі папілярні карциноми в дослідженій групі за ознаками наявності клітин «субклону А», оксифілії цитоплазми клітин, наявності псевдовключень цитоплазми у ядро, ступеня руйнування цитоплазми, наявності ліпідних включень та присутності мікрофолікулярних структур. З'ясувалось, що присутність в популяції тиреоцитів карцином клітин «субклону А» не залежить від прояву перелічених вище ознак.



Мал. 7. Розподіл значень площі проекції ядер епітеліальних клітин папілярних карцином (чорні стовпчики – клітини «субклону А», білі стовпчики – всі інші клітини фолікулярного епітелію).

Також було проведено порівняння за ступенем агресивності (відповідно до класифікації TNM) 15 папілярних карцином, в популяції епітеліальних клітин яких були наявні клітини «субклону А», та 12 папілярних карцином, що не містили цих клітин. Не виявлено кореляції між присутністю клітин «субклону А» та агресивністю пухлин. В той же час, їх не було знайдено в жодному випадку із досліджених нами аденоматозних чи кістозно-дегенеруючих вузлових зобів та фолікулярних аденом.

Відносно слабке фарбування цитоплазми клітин «субклону А» надає їм характерного «світлого» вигляду. В літературі описано ряд пухлин щитоподібної залози, утворених так званими «світлими клітинами». Такі варіанти зустрічаються серед фолікулярних аденом та карцином [12], пухлин з клітин Hurthle, папілярних та анапластичних карцином [13]. За даними M. L. Carcangiu et al. причиною своєрідного вигляду цитоплазми «світлих клітин» є формування везикул мітохондріального походження (в пухлинах з клітин Hurthle), накопичення глікогену (в папілярних або недиференційованих карциномах) та тиреоглобуліну (в клітинах фолікулярних пухлин) [13]. H. R. Narach et al. також відмітили виразну вакуолізацію цитоплазми тироцитів у випадках «світлоклітинних» фолікулярних аденом та карцином [12]. В інших дослідженнях показано, що в папілярних карциномах з муцинозною метаплазією клітини стають «світлими» також за рахунок утворення вакуолей з депозитами муцину [14]. Описані нами клітини «субклону А» не можна віднести до жодної із згаданих категорій «світлих клітин», оскільки за результатами відповідних реакцій слабке фарбування їх цитоплазми не обумовлене вакуолізацією з накопиченням депозитів тиреоглобуліну, полісахаридів чи ліпідів.

Ознаки «субклону А» проявляються незалежно від присутності в епітелії карцином таких маркерів малігнізації, як псевдовключення цитоплазми у ядро, експресія цитокератину № 17 та стійкість до руйнації цитоплазми. В той же час, такі клітини ніколи не зустрічались в пункційному матеріалі доброякісних утворень щитоподібної залози. Це дає підстави вважати, що виявлення клітин «субклону А» може бути використане як нова незалежна ознака малігнізації тироїдного епітелію.

Якщо поглянути з іншого боку, значні морфологічні та імуноцитохімічні відмінності клітин «субклону А» від загальної популяції тироцитів та утворення ними окремих кластерів дозволяє припустити, що ці клітини є представниками одного із субклонів, що утворюється при прогресії папілярних карцином. Якщо це дійсно так, то перед цитологічною діагностикою відкривається перспектива визначення малігнізації за ознаками, що мають пряме відношення до фундаментальних процесів, що відбуваються при тироїдному канцерогенезі.

Висновки

1. На цитологічних препаратах тонкогілкових пункційних біопсій папілярних карцином щитоподібної залози в загальній популяції епітеліальних клітин можна виділити окремі субпопуляції, що відрізняються морфологічними характеристиками.

2. Світлі клітини з чіткими межами з пунктів папілярних карцином можуть бути представниками одного із субклонів, який має виразні відмінності від типових клітин фолікулярного епітелію за рядом цитоморфологічних та імуноцитохімічних ознак.

3. Наявність клітин «субклону А» в пункційному матеріалі пухлин може бути використане як нова незалежна ознака малігнізації фолікулярного епітелію щитоподібної залози.

Література

1. Kim H., Piao Z., Park C. et al. Clinical significance of clonality in thyroid nodules // *Br. J. Surg.* 1998, 85, Is. 8, 1125-1128.
2. Harrer P., Broecker M., Zint A. et al. Thyroid nodules in recurrent multinodular goiters are predominantly polyclonal // *J. Endocrinol. Invest.* 1998, 21, N 6, 380-385.
3. Moniz S., Catarino A. L., Marques A. R. et al. Clonal origin of non-medullary thyroid tumours assessed by non-random X-chromosome inactivation // *Eur. J. Endocrinol.* 2002, 146, 27-33.
4. Wicha M. S., Liu S., Dontu G. Cancer stem cells: an old idea – a paradigm shift // *Cancer Res.* 2006, 66, 1883-1890; discussion 1895-1896.
5. Burkert J., Wright N. A., Alison M. R. Stem cells and cancer: an intimate relationship // *J. Pathol.* 2006, 209, N 3, 287-297.
6. Zhang P., Zuo H., Ozaki T. et al. Cancer stem cell hypothesis in thyroid cancer // *Pathol. Int.* 2006, 56, N 9, 485-489.
7. Mitsutake N., Iwao A., Nagai K. et al. Characterization of side population in thyroid cancer cell lines: cancer stem-like cells are enriched partly but not exclusively // *Endocrinology.* 2007, 148, N 4, 1797-1803.
8. Ling V., Chambers A. F., Harris J. F., Hill R. P. Dynamic heterogeneity and metastasis // *J. Cell. Physiol. Suppl.* 1984, 3, 99-103.
9. Hill R. P., Chambers A. F., Ling V., Harris J. F. Dynamic heterogeneity: rapid generation of metastatic variants in mouse B16 melanoma cells // *Science.* 1984, 224, 998-1001.
10. Studer H., Gerber H., Zbaeren J., Peter H. J. Histomorphological and immunohistochemical evidence that human nodular goiters grow by episodic replication of multiple clusters of thyroid follicular cells // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1992, 75, N 4, 1151-1158.
11. Божок Ю. М., Тавокина Л. В., Епштейн О. В. Нове в діагностиці рака щитовидної залози. Оптимальне поєднання морфологічних та імуноцитохімічних методів дослідження пункційного матеріалу // *Лікарський вісник (США).* 1996, 138, № 1, 40-43.
12. Harach H. R., Virgili E., Soler G. et al. Cytopathology of follicular tumours of the thyroid with clear cell change // *Cytopathology.* 1991, 2, N 3, 125-135.
13. Carcangiu M. L., Sibley R. K., Rosai J. Clear cell change in primary thyroid tumors. A study of 38 cases // *Am. J. Surg. Pathol.* 1985, 9, 705-722.
14. Morrison C., Wakely P. Aspiration cytopathology of metastatic mucinous papillary thyroid carcinoma // *Mod. Pathol.* 2001, 14, N 4, 361-365.

Особая субпопуляция тироцитов в пункционном материале папиллярных карцином щитовидной железы

Ю. М. Божок, А. В. Зелинская, А. Г. Никоненко¹

Институт эндокринологии и обмена веществ им. В. П. Комиссаренко АМН Украины, г. Киев, 04114; ¹Институт физиологии им. А. А. Богомольца НАН Украины, г. Киев, 01024, Украина

Цитоморфологическое исследование материала тонкоигольных пункционных биопсий 45 папиллярных карцином позволило выявить гетерогенность популяции клеток фолликулярного эпителия этих новообразований. Одна из исследованных субпопуляций значительно отличалась от остальных тироцитов особым видом поверхности клеток, а по иммуноцитохимическим признакам – угнетением экспрессии тирогло-

булина и эпителиальных гликопротеинов (антигена Ber-EP4) при сохранении синтеза цитокератинов № 7 и 8. Такие клетки не были найдены в пункционном материале 120 аденоматозных узловых зобов, 72 кистозно-дегенерирующих узловых зобов и 23 фолликулярных аденом. Полученные данные дают возможность использовать выявление описанных клеток в качестве маркера малигнизации фолликулярного эпителия.

Ключевые слова: щитовидная железа, папиллярная карцинома, тонкоигольная аспирационная биопсия, субпопуляции эпителиоцитов.

A special subpopulation of thyrocytes in the material from fine-needle aspiration biopsies of thyroid papillary carcinomas

Yu. M. Bozhok, A. V. Zelinska, A. G. Nikonenko¹

V. P. Komisarenko Institute of Endocrinology and Metabolism of AMS, 04114 Kyiv;

¹O. O. Bogomolets Institute of Physiology of NAS, 01024 Kyiv, Ukraine

A cytomorphologic study of the material obtained from fine-needle aspiration biopsies of 45 papillary carcinomas allowed to reveal heterogeneity of follicular epithelial cell population from these lesions. There was a cell population dissimilar from other thyrocytes by highly specific cell surface appearance, as well as by a number of immunocytochemical features – down-regulated expression of thyroglobulin and epithelial glycoproteins (Ber-EP4 antigen) and preserved expression of 7 and 8 cytokeratins. These cells were not found in biopsy material from 120 adenomatous goiter cases, 72 cystic-degenerative nodular goiter cases and 23 follicular adenoma cases. The data obtained suggest the possibility of using the identification of described cells as a marker of follicular epithelial malignization.

Key words: thyroid gland, papillary carcinoma, fine-needle aspiration biopsies, subpopulation of epitheliocytes.

(Надійшла 17.03.2008)

РИЗИК ВИНИКНЕННЯ ЗЛОЯКІСНИХ ПУХЛИН ІНШИХ ЛОКАЛІЗАЦІЙ У ХВОРИХ НА ДИФЕРЕНЦІЙОВАНИЙ РАК ЩИТОПОДІБНОЇ ЗАЛОЗИ, ЯКІ ЗАЗНАЛИ ВПЛИВУ НЕГАТИВНИХ ЧИННИКІВ АВАРІЇ НА ЧАЕС

О. В. Тепла*, О. М. Коваленко

Науковий центр радіаційної медицини АМН України, м. Київ, 03115, Україна

За допомогою регресійної моделі пропорційного ризику Соx у 177 хворих на диференційований рак щитоподібної залози, які зазнали негативних наслідків аварії на ЧАЕС, був досліджений вплив статі, віку на момент захворювання, гістологічної форми раку і ад'ювантних методів лікування на виникнення злоякісних пухлин інших локалізацій. Отримані результати свідчать, що лише вік, в якому діагностовано рак щитоподібної залози, впливає на розвиток пухлин інших локалізацій. Зроблено висновок, що схеми спостереження за хворими на диференційований рак щитоподібної залози повинні включати методи обстеження шкіри і внутрішніх органів, в яких найбільш ймовірно виникнення злоякісних пухлин, насамперед, нирок.

Ключові слова: диференційований рак щитоподібної залози, первинні злоякісні пухлини, аварія на ЧАЕС, телегамматерапія, радіоїодотерапія.

У онкологічних хворих виникнення первинних злоякісних пухлин інших локалізацій (ЗПЛ) не є рідкісним явищем [1-3]. Серед його причин розглядають генетичну обумовленість (синдроми Гарднера і Туркота, хвороба Ковдена, комплекс Карні) [4-6], значення більш ретельного медичного обстеження цих хворих та ймовірний вплив променевої, хіміо- і радіоїодотерапії, які входять до протоколів лікування злоякісних новоутворень [7-9].

Аналіз об'єднаних даних 13 канцер-реєстрів Канади, Австралії, Сінгапура і країн Європи показав збільшення ЗПЛ у хворих на диференційований рак щитоподібної залози (ДРЩЗ) на 30 % [10]. Серед потенційно вразливих органів називають молочні залози, матку, нирки, сечовий міхур, яечка, простату, наднирники, мозок, шлунок, гортань [2, 3, 5, 11-18]. Описані пухлини центральної нервової і лімфатичної систем, неходжкінські лімфоми, меланоми [2, 3, 5, 14]. На існування певного взаємозв'язку між раком щитоподібної залози (ЩЗ) і молочних залоз вказує ряд робіт [1, 2, 5, 11-13]. Вважається, що фолікулярний рак ЩЗ, діагностований у жінок віком до 40 років, десятикратно підвищує ризик раку молочних залоз [12]. Існує думка, що збільшується вірогідність розвитку тільки неінвазивного раку молочних залоз *in situ* серед жінок, хворих на ДРЩЗ [14], але в деяких дослідженнях зв'язок між раком ЩЗ і молочних залоз не підтверджується [15]. Немає єдиної думки стосовно впливу статі на вірогідність розвитку ЗПЛ. Одні автори вважають, що у чоловіків ризик появи інших неоплазій вищий [15, 18], інші до групи ризику відносять тільки жінок [16]. Пухлини інших локалізацій частіше виявляють у пацієнтів, що захворіли на ДРЩЗ у віці 36-45 років [11-13, 15]. Хворі, в яких ДРЩЗ виник до 40 років, мали на 39 % вищий ризик ЗПЛ, після 40 років – лише

*Адреса для листування (Correspondence): Науковий центр радіаційної медицини АМН України, просп. Перемоги, 119/121, м. Київ, 03115, Україна

на 6 %, ніж очікуваний в популяції [17]. Проте зустрічаються дослідження, що свідчать про збільшення ризику ЗПЛ після 40 років [16].

Зовнішнє γ -опромінення та ^{131}I , які використовуються в якості ад'ювантної терапії ДРЩЗ, мають потенційний канцерогенний ефект. До цього часу залишається відкритим питання про вплив самого лікування на виникнення ЗПЛ [17, 19]. Підвищення ризику солідних пухлин і лейкемій знайдено при збільшенні кумулятивної активності ^{131}I , відмічено також зв'язок між самим фактом призначенням радіоїоду і розвитком раку кісток, м'яких тканин, слинних залоз, ободової і прямої кишки [20]. При значній дозі ^{131}I приблизно у 1 % пацієнтів лікування призводило до виникнення лейкемій [21]. Однак в низці досліджень не виявлено впливу радіоїодотерапії або зовнішнього опромінення на розвиток ЗПЛ [16, 22-24]. Оскільки значна кількість неоплазій виникла через проміжок часу менший, ніж латентний період, припущення, що опромінення, як складова лікування, призводить до розвитку ЗПЛ, було відхилено [25].

Метою дослідження був аналіз ризику виникнення ЗПЛ серед хворих на ДРЩЗ, що зазнали впливу негативних чинників наслідків аварії на ЧАЕС.

Метою дослідження був аналіз ризику виникнення ЗПЛ серед хворих на ДРЩЗ, що зазнали впливу негативних чинників наслідків аварії на ЧАЕС.

Матеріали і методи

До аналізу залучено 177 хворих на ДРЩЗ, потерпілих внаслідок аварії на ЧАЕС, які проходять регулярне обстеження у відділенні радіаційної ендокринології НЦРМ АМН України. Серед них: ліквідаторів «йодного» періоду – 42 особи, ліквідаторів «нейодного» періоду – 23, евакуйованих з Прип'яті та 30-кілометрової зони відчуження – 36, жителів контрольованих територій – 76. Реконструкція доз від компоненти зовнішнього опромінення у ліквідаторів і евакуйованих була проведена аналітичним методом, розробленим у відділі дозиметрії та радіаційної гігієни Інституту радіаційної гігієни та епідеміології НЦРМ АМН України. Середня доза для ліквідаторів «йодного» періоду склала $27,66 \pm 2,66$ сГр, «нейодного» періоду – $9,19 \pm 1,27$ сГр, евакуйованих – $8,75 \pm 1,12$ сГр. Середня доза на ЩЗ для мешканців контрольованих територій, розрахована на основі результатів тиродозиметричної паспортизації, дорівнювала $12,82 \pm 2,05$ сГр.

В обстеженій групі було 112 жінок і 65 чоловіків. Вік хворих коливався від 17 до 72 років (середній – $42,5 \pm 1,2$ роки). Папілярний рак діагностований у 150, фолікулярний – у 27 обстежених. Розподіл хворих за стадіями TNM: $T_1N_0M_0$ – 52 особи, $T_1N_1M_0$ – 1, $T_2N_0M_0$ – 47, $T_2N_{1-2}M_0$ – 19, $T_3N_0M_0$ – 31, $T_3N_{1-2}M_0$ – 27. Тривалість періоду спостереження становила від 2 до 20 років (в середньому – $7,6 \pm 0,3$ роки). В 74,6 % випадків (132 хворих) період спостереження був 5 років і більше. Хірургічне лікування пройшли 38 хворих (21,5 %); 55 пацієнтів (31,1 %), окрім оперативного лікування, отримали телегамматерапію (ТГТ), 73 хворих (41,2 %) – абляційну радіоїодотерапію (^{131}I -терапія), у 11 осіб (6,2 %) були використані обидва методи ад'ювантної терапії. Середні дози на ділянку щіи при проведенні ТГТ становили $59,54 \pm 3,50$ Гр. Середня доза радіофармпрепарату (РФП) при лікуванні радіоїодом була $4299,46 \pm 509,86$ МБк.

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою пакету аналізу даних Microsoft Excel 2000 (9.0.2812). Критичний рівень значущості при перевірці статистичної гіпотези був 0,05. Результати наводили як вибіркоче середнє \pm похибка середнього ($M \pm m$). Для оцінки вірогідності різниці результатів вимірювань використовували двовибірковий t-критерій. Для виявлення значущих чинників при проведенні уні- та мультиваріантного аналізу була застосована регресійна модель пропорційного ризику Соx. В якості залежної змінної було обрано термін спостереження або період до виявлення ЗПЛ. Регресійний аналіз виконували за допомогою програми Med Calculator (версія 8.1.1.0).

Результати досліджень

В обстеженій групі ЗПЛЛ виявлені у 6 випадках: у 3 чоловіків виник рак нирки, у одного – протягом року розвинувся базальноклітинний рак шкіри лівої вушної раковини і також рак нирки, в однієї жінки – гемангіоміоліпома нирки з малігнізацією, а в другій – базальноклітинний рак шкіри лівого передпліччя, причому майже одночасно з ДРЩЗ. Характеристика пацієнтів зі ЗПЛЛ наведена в табл. 1.

Таблиця 1. Характеристика хворих зі ЗПЛЛ

Категорія	Стать	Гістологічна форма ДРЩЗ	Ад'ювантна терапія	Гістологічна форма ЗПЛЛ	Вік (років)		
					в 1986	На час виявлення ДРЩЗ	На час виявлення ЗПЛЛ
Ліквідатор «йодного» періоду	ч	фолікулярний	ТГТ – 50 Гр	Конвекційний нирково-клітинний рак лівої нирки	41	49	54
Ліквідатор «нейодного» періоду	ч	папілярний	ТГТ – 65 Гр	Базальноклітинний рак шкіри лівої вушної раковини + папілярний рак правої нирки	47	52	59
Ліквідатор «йодного» періоду	ч	папілярний	¹³¹ I-терапія 2588,8 МБк	Світлоклітинний рак лівої нирки	48	60	61
Ліквідатор «йодного» періоду	ч	папілярний	¹³¹ I-терапія 4000,0 МБк	Папілярний рак правої нирки	29	48	49
Евакуйована з Прип'яті	ж	папілярний	ТГТ– 46,5 Гр	Гемангіоміоліпома з малігнізацією лівої нирки	39	44	54
Евакуйована з Прип'яті	ж	фолікулярний	ТГТ – 40,2 Гр	Базальноклітинний рак шкіри лівого передпліччя	46	56	56

Середня доза на ділянку шиї при проведенні ТГТ у хворих без ЗПЛЛ вірогідно не відрізнялася від такої у 4 хворих зі ЗПЛЛ (60,12±3,70 Гр та 50,43±5,26 Гр, відповідно, P>0,1). Так само, як і середня доза РФП у хворих зі ЗПЛЛ, що пройшли ¹³¹I-терапію, була близькою до середньої дози РФП у хворих, в котрих не діагностовано ЗПЛЛ (3294,4±705,6 МБк та 4324,0±521,9 МБк, відповідно, P>0,1).

Вважаючи, що на появу ЗПЛЛ може впливати комплекс чинників, проведено Сох-регресійний аналіз, за допомогою якого вивчено значення методів лікування, отриманих при їх проходженні доз опромінення або лікувальних доз РФП, вплив статі, віку на час захворювання, гістологічної форми ДРЩЗ (табл. 2). Прорахувати повну дозу опромінення серед ліквідаторів «йодного» періоду і евакуйованих не було можливості внаслідок відсутності індивідуальних

доз внутрішнього опромінення. Достеменно невідомо, як могли корелювати між собою показники зовнішнього і внутрішнього опромінення. Існує погляд, що серед евакуйованого населення компонента внутрішнього опромінення (без урахування опромінення ЩЗ) була меншою або дорівнювала компоненти зовнішнього опромінення. Там, де евакуація була затримана на 10-15 днів (села 30-кілометрової зони), дози внутрішнього опромінення перевищували зовнішнє опромінення в 2-4 рази [21]. Тому скласти повне уявлення про дозу опромінення як евакуйованих, так і ліквідаторів «йодного» періоду не було можливості. З цієї ж причини не можна було додати між собою дози опромінення, отримані внаслідок Чорнобильської аварії і при проведенні ТГТ або ^{131}I -терапії. Тому окремо оцінювалися дози ТГТ і дози РФП і як категорійний показник вводилися дані про відношення обстежених до аварії на ЧАЕС.

Як видно з табл. 2, і при уніваріантному, і при мультиваріантному аналізі значущим показником був тільки вік хворих на момент виявлення ДРЩЗ

Таблиця 2. Вплив різних чинників на відносний ризик виникнення ЗПЛ у хворих на ДРЩЗ (регресійна модель пропорційного ризику Cox)

Коваріати	b	Стандартна помилка	P	Exp(b)	95 % ДІ Exp(b)
Уніваріантний аналіз					
Вік на момент захворювання (років)	0,0834	0,0378	0,0274	1,0869	1,0097 - 1,1701
Гістологія	0,7903	0,8746	0,3662	2,2040	0,4004 - 12,1318
Факт проведення ^{131}I -терапії	-0,3569	0,8747	0,6832	0,6998	0,1271 - 3,8524
Доза РФП (МБк)	-0,0001	0,0002	0,5597	0,9999	0,9995 - 1,0003
Факт проведення ТГТ	0,8961	0,8772	0,3070	2,4500	0,4429 - 13,5523
Доза ТГТ (Гр)	0,0038	0,0097	0,6983	1,0038	0,9850 - 1,0229
Категорія	0,8168	0,4225	0,0532	2,2632	0,9929 - 5,1586
Стать	1,2381	0,8661	0,1529	3,4492	0,6371 - 18,6736
Мультиваріантний аналіз					
Вік на момент захворювання (років)	0,0820	0,0417	0,0492	1,0854	1,0007 - 1,1773
Категорія	0,4941	0,4164	0,2354	1,6390	0,7277 - 3,6914
Стать	0,9061	0,9053	0,3169	2,4748	0,4235 - 14,4625
Факт проведення ТГТ	0,5920	0,9088	0,5148	1,8076	0,3072 - 10,6352
Гістологія	0,5920	0,8987	0,6085	1,5846	0,2747 - 9,1419
Доза ^{131}I (МБк)	0,0000	0,0001	0,8362	1,0000	0,9998 - 1,0003

Примітки: b – регресійний коефіцієнт Cox; Exp(b) – коефіцієнт відносного ризику; ДІ – довірчий інтервал.

($P=0,027$ та $P=0,049$, відповідно). Відносний ризик вказує на те, що з кожним роком вірогідність захворіти на інший первинний рак зростає в 1,087 рази. Його 95 % довірчий інтервал не включає 1, що підтверджує статистичну значущість показника. Вплив інших досліджених чинників не можна вважати доведеним.

Зрозуміло, що нирки несуть певне променеве навантаження під час виведення радіоїоду. В обох хворих з обстеженої групи, яким проводилася терапія з його використанням, рак нирки був діагностований протягом першого року після операції з приводу ДРЩЗ і менше року після радіоїодтерапії. Вже через цей факт можна зробити висновок про відсутність взаємозв'язку між виникненням ЗПЛ і радіоїодтерапією, оскільки радіоіндуковані пухлини мають латентний період.

Базальноклітинний рак шкіри в однієї хворої також виник менше ніж за 1 рік після діагностики ДРЩЗ і проведення ТГТ, тому ТГТ навряд чи могла вплинути на його появу. Вплив проведення ТГТ на виникнення базальноклітинного раку шкіри лівої вушної раковини в одного з хворих обстеженої групи здається досить ймовірним принаймні з трьох причин. По-перше, на час появи пухлини пройшло 12 років після участі в ліквідації наслідків аварії на ЧАЕС і 7 років після ТГТ. По-друге, локальне опромінення проходило поряд з місцем виникнення пухлини. По-третє, значення рентгенотерапії відносно базальноклітинного раку шкіри є визнаним фактом [26]. Можливо в даному випадку відбулося об'єднання впливу загального опромінення, якого хворий зазнав як ліквідатор, з наслідками ТГТ.

Латентний період, тобто термін між появою ДРЩЗ і пухлин нирок, в 3 випадках, коли проводилась ТГТ, був 5, 7 і 10 років. Результати аналізу моделі Сох і в цих випадках не виявили взаємозв'язку з лікуванням, що співпадає з даними інших дослідників [16, 22, 23, 24]. Деякі вчені зафіксували збільшення ризику ЗПЛ у хворих на ДРЩЗ для верхніх відділів травного тракту та злоякісних пухлин червоного кісткового мозку [27]. В обстеженій групі цього не відмічено протягом зазначеного терміну спостереження. Не виявлено збільшення раку молочних залоз серед жінок на противагу іншим дослідженням. [1, 2, 5, 11-13]. Серед доброякісних пухлин у 18 пацієток (16,1 %) діагностовано фіброміоми матки і у 4 (3,6 %) – фіброаденоми молочних залоз.

Метастазування ДРЩЗ у нирки являє собою дуже рідкісний факт. До 2005 р. в науково-медичній літературі описано менше 20 таких випадків [28]. А поєднання злоякісних пухлин нирок і ДРЩЗ відображено в епідеміологічних дослідженнях ($SIR = 3,9$ та $SIR=7.02$) [14,16]. Але перше з них оцінювало ризик ЗПЛ у жінок, хворих на ДРЩЗ, і виявило 4-разове збільшення випадків раку нирок, а друге, вивчаючи появу ЗПЛ у представників обох статей, встановило, що цей ризик існує лише для жінок. За нашими даними, стать не має значення. Не можна виключити значення генетичної обумовленості появи пухлин ЩЗ і нирок в одного й того ж хворого. Описано спадковий синдром, який включає папілярний рак ЩЗ, вузловий зоб і папілярну ниркову неоплазію [29]. Відомо, що ген *SNEK2* відновлює ДНК в багатьох типах клітин. З його мутаціями пов'язують раки ЩЗ, нирок, молочних залоз та інших локалізацій [30]. Знайдені докази значення мутацій генів ядерного рецептора гормонів ЩЗ в розвитку світлоклітинного раку нирок [31].

Отримані дані вказують на те, що у хворих на ДРЩЗ, які зазнали впливу негативних наслідків аварії на ЧАЕС, існує ймовірність виникнення ЗПЛ. Це зумовлює необхідність включення в схему довготривалого спостереження методів обстеження шкіри і внутрішніх органів, в першу чергу, нирок.

Висновки

1. У хворих на ДРЩЗ, які зазнали впливу негативних наслідків аварії на ЧАЕС, нерідко виявляються злоякісні пухлини інших локалізацій (3,4 %).
2. Уні- і мультиваріантний аналіз дає підставу вважати, що на появу злоякісних пухлин інших локалізацій, у хворих на ДРЩЗ впливає тільки вік хворого, в якому діагностовано ДРЩЗ.
3. Схеми спостереження хворих на ДРЩЗ обов'язково повинні включати методи обстеження шкіри і внутрішніх органів, в яких найбільш ймовірно виникнення злоякісних пухлин інших локалізацій, насамперед, нирок.

Література

1. Tucker M. A., Boice J. D., Hoffman D. A. Second cancer following cutaneous melanoma and cancers of the brain, thyroid, connective tissue, bone, and eye in Connecticut, 1935-82 // Natl. Cancer Inst. Monogr. 1985, 68, 161-189.

2. Johns M. E., Shikhani A. H., Kashima H. K. et al. Multiple primary neoplasms in patients with salivary gland or thyroid gland tumors // *Laryngoscope*. 1986, 96, N 7, 718-721.
3. Osterlind A., Olsen J. H., Lynge E. et al. Second cancer following cutaneous melanoma and cancers of the brain, thyroid, connective tissue, bone, and eye in Denmark, 1943-80 // *Natl. Cancer Inst. Monogr.* 1985, 68, 361-388.
4. Stoffer S. S., Van Dyke D. L., Bach J. V. et al. Familial papillary carcinoma of the thyroid // *Am. J. Med. Genet.* 1986, 25, N 4, 775-782.
5. Hrafnkelsson J., Tulinius H., Jonasson J. G. et al. Papillary thyroid carcinoma in Iceland. A study of the occurrence in families and the coexistence of other primary tumours // *Acta Oncol.* 1989, 28, N 6, 785-788.
6. Ванушко В. Э., Кузнецов Н. С., Гарбузов П. И. и др. Рак щитовидной железы // *Пробл. эндокринолог.* 2005, 51, № 4, 43-53.
7. Swerdlov A. J., Barber J. A., Hudson G. V. et al. Risk of second malignancy after Hodgkin's disease in a collaborative British cohort: the relation to the age at treatment // *J. Clin. Oncol.* 2000, 18, 498-509.
8. Van Leeuwen F. E., Klokman W. J., Stovall M. et al. Roles of radiation dose, chemotherapy, and hormonal factors in breast cancer following Hodgkin's disease // *J. Natl. Cancer Inst.* 2003, 95, 971-980.
9. Bhatia S., Yasui Y., Robison L. L. et al. High risk of subsequent neoplasms continues with extended follow-up of childhood Hodgkin's disease: report from the Late Effects Study Group // *J. Clin. Oncol.* 2003, 21, 4386-4394.
10. Sandeep T. C., Strachan M. W., Reynolds R. M. et al. Second primary cancers in thyroid cancer patients: a multinational record linkage study // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2006, 91, N 5, 1819-1825.
11. Shinozaki N., Sakamoto A., Kasai N. et al. Multiple primary malignancies associated with thyroid cancer // *Gan. No. Rinsho.* 1983, 29, N 12, 1385-1391.
12. Ron E., Curtis R., Hoffman D. A. et al. Multiple primary breast and thyroid cancer // *Br. J. Cancer.* 1984, 49, N 1, 87-92.
13. Li C. I., Rossing M. A., Voigt L. F. et al. Multiple primary breast and thyroid cancers: role of age at diagnosis and cancer treatments (United States) // *Cancer Causes Control.* 2000, 11, N 9, 805-811.
14. Canchola A. J., Horn-Ross P. L., Purdie D. M. Risk of second primary malignancies in women with papillary thyroid cancer // *Am. J. Epidemiol.* 2006, 15, N 163(6), 521-517.
15. Hall P., Holm L. E., Lundell G. Second primary tumors following thyroid cancer. A Swedish record-linkage study // *Acta Oncol.* 1990, 29, N 7, 869-873.
16. Berthe E., Henry-Amar M., Michels J. J. et al. Risk of second primary cancer following differentiated thyroid cancer // *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* 2004, 31, N 5, 685-691.
17. Ronckers C. M., McCarron P., Ron E. Thyroid cancer and multiple primary tumors in the SEER cancer registries // *Int. J. Cancer.* 2005, 1, N 117(2), 281-288.
18. Akssen L. A., Glatte E. Second malignancies in thyroid cancer patients: a population-based survey of 3658 cases from Norway // *Eur. J. Cancer.* 1992, 28, N (2-3), 491-495.
19. Wang K. L., Lin L. Y., Chen P. M. et al. Chronic myeloid leukemia after treatment with I-131 for thyroid carcinoma // *J. Chin. Med. Assoc.* 2005, 68, N 5, 230-233.
20. Rubino C., de Vathaire F., Dottorini M. E. et al. Second primary malignancies in thyroid cancer patients // *Br. J. Cancer.* 2003, 3, N 89(9), 1638-1644.
21. Bennett B., Repacholi M., Carr Z. Health effects of the Chernobyl accident and special health care programmes. Report of the UN Chernobyl Forum Expert Group «Health». Geneva, 2006. 160 p.

22. Verkooijen R. B., Smit J. W., Romijn J.A. et al. The incidence of second primary tumors in thyroid cancer patients is increased, but not related to treatment of thyroid cancer // *Eur. J. Endocrinol.* 2006, 155, N 6, 801-806.
23. Bhattacharyya N., Chien W. Risk of second primary malignancy after radioactive iodine treatment for differentiated thyroid carcinoma // *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 2006, 115, N 8, 607-610.
24. Hall P., Holm L. E., Lundell G. et al. Tumors after radiotherapy for thyroid cancer. A case-control study within a cohort of thyroid cancer patients // *Acta Oncol.* 1992, 31, N 4, 403-407.
25. Sadetzki S., Calderon-Margalit R., Peretz C. et al. Second primary breast and thyroid cancers (Israel) // *Cancer Causes Control.* 2003, 14, N 4, 367-375.
26. Bader R. S. Basal cell carcinoma. June 20. 2006. Режим доступа: <http://www.emedicine.com/med/topic214.htm>.
27. Chuang S. C., Hashibe M., Yu G. P. et al. Radiotherapy for primary thyroid cancer as a risk factor for second primary cancers // *Cancer Lett.* 2006, 238, N 1, 42-52.
28. Ruggiero F. P., Fraunhoffer E. E., Stack B. C. Papillary thyroid cancer with an initial presentation of abdominal and flank pain // *Am. J. Otolaryngol.* 2005, 26, N 2, 142-145.
29. Malchoff C. D., Sarfarazi M., Tendler B. et al. Papillary thyroid carcinoma associated with papillary renal neoplasia: genetic linkage analysis of a distinct heritable tumor syndrome // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2000, 85, 1758-1764.
30. Cybulski C., Gorski B., Huzarski T. et al. CHEK2 is a multiorgan cancer susceptibility gene // *Am. J. Hum. Genet.* 2004, 75, 1131-1135.
31. Kamiya Y., Puzianowska-Kuznicka M., McPhie P. et al. Expression of mutant thyroid hormone nuclear receptors is associated with human renal clear cell carcinoma // *Carcinogenesis.* 2002, 23, 25-33.

Риск возникновения злокачественных опухолей других локализаций у больных дифференцированным раком щитовидной железы, которые подверглись влиянию негативных факторов аварии на ЧАЭС

Е. В. Теплая, А. Н. Коваленко

Научный центр радиационной медицины АМН Украины, г. Киев, 03115, Украина

С помощью регрессионной модели пропорционального риска Соx у 177 больных дифференцированным раком щитовидной железы, пострадавших вследствие аварии на ЧАЭС, изучено влияние пола, возраста на момент заболевания, гистологической формы рака и адьювантных методов лечения на возникновение злокачественных опухолей других локализаций. Полученные результаты свидетельствуют о том, что только возраст, в котором диагностирован рак щитовидной железы, влияет на развитие опухолей других локализаций. Сделан вывод, что схемы наблюдения за пациентами с дифференцированным раком щитовидной железы должны включать методы обследования кожи и внутренних органов, в которых наиболее вероятно возникновение злокачественных опухолей, прежде всего, почек.

Ключевые слова: дифференцированный рак щитовидной железы, первичные злокачественные опухоли других локализаций, авария на ЧАЭС, телегамматерапия, радио- йодтерапия.

Risk of second primary malignancies in patients with differentiated thyroid cancer who were exposed to negative factors of Chernobyl Power Plant Accident

O. V. Tepla, O. M. Kovalenko

Research Centre for Radiation Medicine of AMS, Kyiv, 03115, Ukraine

The authors have studied the influence of sex, age at the time of diagnosis, histological type of differentiated thyroid cancer, and adjuvant methods of treatment on the development of second primary malignancies in 177 patients with differentiated thyroid cancer who were exposed to negative factors of Chernobyl Nuclear Power Plant Accident. Cox regression analysis has been used. The results revealed that the only important factor which influenced the risk of second primary malignancies was the age at the time of diagnosis. It was concluded that monitoring of patients with differentiated thyroid cancer should include the methods of investigation of skin and internal organs, especially kidneys.

Key words: differentiated thyroid cancer, second primary malignancies, Chernobyl Nuclear Power Plant Accident, external radiotherapy, radioiodine treatment.

(Надійшла 13.12.2007)

КЛІНІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ТА ДИФЕРЕНЦІАЛЬНА ДІАГНОСТИКА ФОЛІКУЛЯРНИХ АДЕНОМ І ФОЛІКУЛЯРНИХ КАРЦИНОМ ЩИТОПОДІБНОЇ ЗАЛОЗИ

І. Р. Янчій*

*Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В. П. Комісаренка АМН
України, м. Київ, 04114, Україна*

Проаналізовано результати обстежень 214 хворих, котрі знаходились на лікуванні в хірургічному відділі Інституту ендокринології та обміну речовин ім. В. П. Комісаренка АМН України з приводу фолікулярної аденоми і фолікулярної карциноми щитоподібної залози. Цитологічний діагноз «фолікулярна неоплазія» (аденома – 39,0 %, карцинома – 47,6 %) не дозволяв виключити злоякісність пухлини, що було показанням для проведення оперативного лікування. Клінічних ознак, патогномонічних для злоякісних пухлин, не було виявлено, але при виборі діагностичної програми необхідно враховувати такі чинники, як тривалість анамнезу, скарги хворого, розміри та консистенцію вузлів щитоподібної залози.

Ключові слова: фолікулярна неоплазія, аденома, карцинома, щитоподібна залоза.

За останні роки значно розширились можливості доопераційної діагностики пухлин щитоподібної залози (ЩЗ). При цьому найважчою є диференціальна діагностика інкапсульованого мінімально-інвазивного фолікулярного раку та фолікулярної аденоми ЩЗ [1-3].

За своїми цитоморфологічними характеристиками ці пухлини об'єднані в групу «фолікулярних неоплазій» (follicular neoplasm) [4, 5]. Фолікулярна архітектоніка найбільш розповсюджена серед новоутворень ЩЗ, оскільки саме фолікул розглядається як структурно-функціональна одиниця цього органа. Термін «фолікулярний» застосовується для пухлин ЩЗ, коли мова йде про гістогенез, або для характеристики особливостей будови.

Саме ці пухлини «фолікулярної» будови зумовлюють найбільші складності у вирішенні питання про вибір методу лікування, що повинен бути індивідуалізований у кожного пацієнта. Слід зазначити, що в цих випадках на вибір методу лікування впливають не тільки цитологічні, але і інші клінічні характеристики захворювання, котрі виявляються при фізикальному та інструментальному обстеженні хворого [6]. Звертає увагу, що у вітчизняній літературі проблема клінічної диференціальної діагностики цієї групи пухлин не отримала належного висвітлення.

Матеріали та методи

Вивчені результати обстеження 214 хворих (171 жінка і 33 чоловіки) у віці від 9 до 31 року, що знаходились з 1996 по 2007 р. на лікуванні в хірургічному відділі Інституту ендокринології та обміну речовин ім. В. П. Комісаренка АМН України з приводу фолікулярної аденоми (172 спостереження) і фолікулярної карциноми (42 спостереження).

*Адреса для листування (Correspondence): Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В. П. Комісаренка АМН України, вул. Вишгородська, 69, м. Київ, 04114, Україна

На етапі доопераційного обстеження виконувались стандартні процедури: збір анамнезу, пальпація, ультразвукове обстеження органа та регіонарних лімфатичних вузлів, визначення розмірів пухлини, тонкоголкова аспіраційна пункційна біопсія з цитологічним дослідженням. Аналізувались результати отриманих даних у пацієнтів з фолікулярними аденомами ЩЗ у порівнянні із фолікулярними карциномами.

Результати дослідження

У табл. 1 представлено розподіл хворих за віком та статтю. Співвідношення пацієнтів жіночої та чоловічої статі у групах, що порівнювались, вірогідно не відрізнялося. Середній вік хворих з фолікулярною аденомою становив $23,4 \pm 0,1$ року, з фолікулярною карциною – $22,9 \pm 0,12$ років. При цьому середній вік пацієнтів жіночої статі із фолікулярною аденомою склав $23,7 \pm 0,14$ років, а з фолікулярною карциною – $23,1 \pm 0,12$ років. Тобто, вірогідних відмінностей віку пацієнтів з фолікулярною аденомою і фолікулярною карциною у цих двох статевих групах не виявлено.

Аналіз розподілу пацієнтів за віком показав, що максимальна кількість хворих як з аденомою, так і з карциною серед осіб жіночої статі відмічена

Таблиця 1. Розподіл хворих за віком і статтю

Вікова група, роки	Жінки		Чоловіки	
	Фолікулярна аденома	Фолікулярна карцинома	Фолікулярна аденома	Фолікулярна карцинома
До 10	2 (1,4 %)	3 (9,1 %)*	1 (2,9 %)	–
11-20	51 (37,0 %)	10 (30,3 %)	15 (44,1 %)	5 (55,6 %)
21-30	56 (40,6 %)	12 (36,4 %)	12 (35,3 %)	2 (22,2 %)
31-40	29 (21,0 %)	8 (24,2 %)	6 (17,7 %)	2 (22,2 %)
Всього	138	33	34	9

Примітка: * – вірогідність розбіжностей ($P < 0,05$) у порівнянні з групою фолікулярних аденом серед хворих жіночої статі.

у віковій групі 21-30 років (40,0 % і 36,4 %, відповідно). В групі пацієнтів чоловічої статі максимальна кількість хворих відмічалась у більш молодому віці – 11-20 років (фолікулярна аденома – 44,1 %, фолікулярна карцинома – 55,6 %). Вірогідне збільшення відсотка фолікулярних карцином (9,1 %) у порівнянні з таким фолікулярних аденом (1,4 %) знайдено тільки в групі дівчаток у віці до 10 років.

Звертає на себе увагу, що серед жінок фолікулярні карциноми домінували в групі хворих 21-40 років (60,6 % у порівнянні з групою пацієнток у віці до 20 років – 39,4 %). У чоловіків мала місце протилежна ситуація – карциноми домінували у молодих пацієнтів у віці до 20 років (55,6 % у порівнянні з чоловіками вікової групи 21-40 років – 44,4 %), що також може мати діагностичну значимість.

На сьогоднішній день основним методом обстеження вузлів ЩЗ, що дозволяє з найбільшою долею вірогідності об'єктивно оцінити їх онкологічну небезпеку, є тонкоголкова пункційна біопсія з цитологічним та імуноцитохімічним дослідженням пунктату новоутворення. Відомо, що найскладніша цитологічна діагностика пухлин ЩЗ, які мають фолікулярну цитоархітектоніку [2, 4]. Ми оцінили діагностичну значимість різноманітних цитологічних діагнозів, що відображають основні клініко-патогенетичні варіанти патологічних змін ЩЗ (табл. 2).

Відмічено, що достеменно підтвердити наявність карциноми ЩЗ можна було тільки в одному випадку. Цитологічний діагноз, котрий вказує на можливу наявність вузлового колоїдного зоба, що проліферує, зустрічався з однаковою

Таблиця 2. Характер доопераційних цитологічних висновків при фолікулярній аденомі і фолікулярній карциномі щитоподібної залози

Стандартизовані цитологічні висновки, котрі відображають основні клініко-патогенетичні варіанти патології ЩЗ	Кінцевий діагноз «фолікулярна аденома», n=172	Кінцевий діагноз «фолікулярна карцинома», n=42
Вузловий колоїдний зоб з різним ступенем проліферації (вузловий колоїдний зоб, вузловий зоб з аденоматозною гіперплазією фолікулярного епітелію, вузловий зоб з кістovidною дегенерацією, кістозно-змінений вузол)	100 (58,1 %)	20 (47,6 %)
Автоімунна тиропатія (вузловий зоб із супутнім автоімунним тироїдитом)	4 (2,3 %)	1 (2,4 %)
Неоплазія (аденоматозний вузол мікрофолікулярної будови, вузловий зоб із В-клітинною метаплазією епітелію, пухлина із клітин Ашкіназі, вузол із В-клітин, пухлина мікрофолікулярної будови)	67 (39,0 %)	20 (47,6 %)
Рак або підозра на малігнізацію	1 (0,6 %)	1 (2,4 %)

частотою як в групі фолікулярних аденом, так і в групі фолікулярних карцином (відповідно 58,1 % та 47,6 %). Підозра на гіперпластичний автоімунний процес траплялася рідко в обох групах (2,3 % та 2,4 %, відповідно). Неоплазія фолікулярного епітелію із А- та В-клітин однаково часто відмічалася у фолікулярній аденомі (39,0 %) та у фолікулярній карциномі (47,6 %).

В цілому аналіз доопераційних цитологічних діагнозів показав, що остаточний морфологічний діагноз фолікулярної карциноми ЩЗ цитологічно встановити практично неможливо, бо злоякісний процес може зустрічатись при будь-якому цитологічному діагнозі.

Розмір утворення, що виявлене в ЩЗ, є одним із чинників, котрі впливають на хірургічну тактику [6]. Серед пухлин до 4 см в максимальному діаметрі вірогідних розбіжностей в групах фолікулярних аденом та фолікулярних карцином не було виявлено, тобто пухлина до 4 см може бути однаковою мірою як злоякісною, так і доброякісною. Суттєво більше фолікулярних карцином було тільки в групі з розмірами пухлини 4,1-5,0 см (23,8 %) у порівнянні з фолікулярними аденомами (15,0 %) (табл. 3).

Фолікулярні аденоми до 4 см в діаметрі зустрічались в 73,3 % спостережень, що дещо вище у порівнянні з карциномами таких самих розмірів – 64,3 %. Серед пухлин розміром більше 4 см, навпаки, домінували фолікулярні карциноми – 35,7 %, що вище, ніж при фолікулярних аденомах – 26,7 %.

Таблиця 3. Характеристика розмірів фолікулярних аденом та фолікулярних карцином щитоподібної залози

Розмір пухлини, см	Фолікулярна аденома	Фолікулярна карцинома
до 1	4 (2,3 %)	1 (2,4 %)
1,1 – 2,0	30 (17,5 %)	7 (16,7 %)
2,1 – 3,0	49 (28,5 %)	9 (21,4 %)
3,1 – 4,0	43 (25,0 %)	10 (23,8 %)
4,1 – 5,0	26 (15,0 %)	10 (23,8 %)*
5,1 – 6,0	14 (8,2 %)	5 (11,9 %)
6,1 – 7,0	4 (2,3 %)	-
7,1 – 8,0	2 (1,2 %)	-

Примітка: У таблицях 3-7: * – вірогідність розбіжностей ($P < 0,05$) у порівнянні з групою фолікулярних аденом.

Загалом розмір пухлини не є основним критерієм, за яким можна судити про характер захворювання, тим більше, про злоякісність, але до проліферуючих пухлин фолікулярної будови більших розмірів, що визначаються при ультразвуковому дослідженні, необхідно відноситись з певною онкологічною настороженістю.

Поняття «анамнестичний період» розвитку пухлини ЩЗ достатньо суб'єктивне, визначається самим пацієнтом і залежить від різних чинників, починаючи від уваги до себе самого пацієнта, закінчуючи вмінням лікаря правильно і прискіпливо збирати анамнез у хворого. При обстеженні хірург повинен цікавитись давністю виявлення захворювання та враховувати цей фактор при визначенні діагностичної програми і виборі методу лікування.

Результати дослідження строків виявлення захворювання представлені в табл. 4.

Як впливає з наведених даних, фолікулярні карциноми мали менший період спостереження у порівнянні з фолікулярними аденомами. Звертає на себе увагу те, що із числа хворих з встановленими строками «маніфестації» захворювання 66,7 % пацієнтів з фолікулярними карциномами були оперовані протягом першого року спостереження, що майже втричі більше прооперованих за цей час хворих з фолікулярними аденомами – 23,5 %.

Серед пацієнтів із «анамнестичним періодом», що тривав більше 3 років, явне домінування виявлене при фолікулярній аденомі у порівнянні з фолікулярною карциномою. У частини хворих строк тривалості хвороби точно визначити не вдалося.

Підвищення онкологічної компетенції лікарів всіх клінічних спеціальностей лежить в основі раннього виявлення злоякісних пухлин. Результати дослідження характеру виявлення фолікулярних аденом і фолікулярних карцином на догоспітальному етапі представлені в табл. 5. Фолікулярні аденоми значно частіше виявлялись самими пацієнтами (50,6 %), ніж фолікулярні карциноми (21,4 %). Належних обґрунтувань цього чинника ми не знайшли. В той же час при проходженні профогляду частота виявлення обох форм пухлин була близькою, а виявлення злоякісної пухлини лікарем при зверненні з приводу іншого захворювання в два рази перевищувало виявлення доброякісної пухлини (42,9 % та 21,5 %, відповідно).

Скарги пацієнтів є основним чинником, на який повинен звертати увагу лікар при зборі анамнезу. Аналіз скарг хворих (табл. 6) показав, що вони, як правило, неспецифічні, і в більшості випадків не мали чітких розбіжностей в групі аденом та

Таблиця 4. Тривалість «анамнестичного періоду» при фолікулярних аденомах і фолікулярних карциномах щитоподібної залози

Давність захворювання за анамнезом, роки	Фолікулярні аденоми	Фолікулярні карциноми
До 1	56 (32,5 %)	28 (66,7 %)*
До 3	69 (40,1 %)	6 (14,3 %)*
До 5	22 (12,8 %)	3 (7,1 %)
До 10	15 (8,7 %)	2 (4,8 %)
Більше 10	3 (1,8 %)	-
Точно не виявлено	7 (4,1 %)	3 (7,1 %)

Таблиця 5. Характер виявлення захворювання на догоспітальному етапі

Метод виявлення	Фолікулярна аденома	Фолікулярна карцинома
Самим хворим	87 (50,6 %)	9 (21,4 %)*
При проходженні профогляду	48 (27,9 %)	15 (35,7 %)
Лікарем при зверненні з приводу іншого захворювання	37 (21,5 %)	18 (42,9 %)*

карцином. Хоча слід зазначити, що в групі карцином значно частіше зустрічались пацієнти зі скаргами на охриплість голосу або зміну його тембру, а також ті, котрі скаржились на зниження маси тіла за останній час більш ніж на 2 кг. На вищеописані скарги слід звертати особливу увагу при клінічному обстеженні пацієнтів, хоча вони не є дуже частими.

Абсолютна більшість хворих скаржились на пухлиноподібне утворення на передній поверхні ший, котре можна пальпувати (понад 97 % в кожній групі), також багато пацієнтів відмічали загальну слабкість, задишку, відчуття «клубка» в горлі, порушення сну. Значно рідше пацієнти скаржились на болі в ділянці новоутворення, явища дисфагії, зміни голосу.

Слід зазначити, що шийна лімфаденопатія виявлена тільки у одного пацієнта із групи фолікулярних карцином, що зайвий раз підтверджує неспецифічність цього симптому для даного виду злоякісних пухлин ЩЗ. Лімфаденопатія більш характерна для папілярних карцином.

Обстеження ЩЗ за допомогою пальпації не втратило свого значення і тепер, незважаючи на широку розповсюдженість інструментальних методів обстеження. Дані пальпації ЩЗ мають достатньо суб'єктивний характер і не можуть слугувати самостійним діагностичним критерієм для визначення характеру патологічного процесу в залозі, однак повинні бути враховані дослідником.

Результати пальпаторного дослідження консистенції пухлини ЩЗ представлені в табл. 7.

Слід зазначити, що в групі фолікулярних аденом значно переважали пухлини м'яко-еластичної консистенції (45,9 %) у порівнянні з фолікулярними карциномами (23,8 %). Дещо меншою була кількість пухлин щільно-еластичної консистенції (34,8 %), що помітно не відрізняється від фолікулярних карцином (42,8 %). Ще менше визначалось щільних пухлин (16,3 %), частота виявлення яких була нижчою у порівнянні із карциномами (26,2 %), і зовсім мало зустрічалось пухлин кам'янистої щільності (1,7 %), що менше, ніж в групі фолікулярних карцином (4,8 %).

Таблиця 6. Скарги хворих з фолікулярною аденомою і фолікулярною карциномою

Скарги хворих	Фолікулярна аденома	Фолікулярна карцинома
Утворення, що пальпується	170 (98,8 %)	97,6 (41 %)
Кашель, лоскіт (дере) в горлі	18 (10,46 %)	7 (16,6 %)
Зниження маси тіла більше ніж на 2 кг	24 (13,9 %)	9 (21,4 %)*
Охриплість або зміна тембру голосу	9 (5,2 %)	4 (9,5 %)*
«Клубок» при ковтанні	30 (17,4 %)	10 (23,8 %)
Дисфагія	7 (4,1 %)	3 (7,1 %)
Біль в ділянці новоутворення	8 (4,6 %)	3 (7,1 %)
Загальна слабкість	44 (25,6 %)	14 (33,3 %)
Задишка	30 (17,4 %)	10 (23,8 %)
Безсоння або поганий сон	19 (11 %)	6 (14,2 %)
Шийна лімфаденопатія	0 (0)	1 (2,4 %)

явища дисфагії, зміни голосу.

Таблиця 7. Порівняльна характеристика консистенції фолікулярних аденом і фолікулярних карцином щитоподібної залози

Пальпаторна характеристика консистенції пухлин	Фолікулярна аденома	Фолікулярна карцинома
Чітко не пальпується	2 (1,2 %)	1 (2,4 %)
М'яко-еластична	79 (45,9 %)	10 (23,8 %)*
Щільно-еластична	60 (34,8 %)	18 (42,8 %)
Тверда	28 (16,3 %)	11 (26,2 %)*
Кам'яниста	3 (1,7 %)	2 (4,8 %)

Що стосується карцином, то в цій групі відмічалась перевага пухлин щільно-еластичної консистенції, приблизно рівна кількість була щільних та м'яко-еластичних утворень, хоча останніх все ж таки менше, і зовсім мало, як і в першій групі, пухлин кам'янистої щільності. Необхідно відзначити, що кам'яниста щільність пухлини більш характерна для папілярних карцином, в наших спостереженнях така виражена щільність, скоріш за все, була зумовлена вторинними дегенеративними змінами у вузлі.

Аналіз даних, котрі характеризують консистенцію пухлини, показав, що, не дивлячись на деякий суб'єктивізм дослідження, явну онкологічну настороженість повинні викликати вузли більш щільної консистенції.

Висновки

1. Цитологічне дослідження є одним із основних методів діагностики вогнищевих новоутворень ЩЗ, котре дозволяє об'єктивно оцінити їх онкологічний ризик. Однак у випадках пухлин «фолікулярної» цитоархітекτονіки диференційний діагноз між аденомами та карциномами цитологічно встановити неможливо.

2. Вірогідних клінічних розбіжностей між фолікулярними аденомами та фолікулярними карциномами не було виявлено, хоча в наших дослідженнях відмічено, що при фолікулярних карциномах був дещо меншим «анамнестичний» період захворювання, пухлини характеризувались меншим розміром і більш щільною консистенцією, частіше відмічались ознаки втягнення в процес органів аеродигестивного тракту у порівнянні з доброякісними аденомами. Ці клінічні ознаки не можна вважати патогномонічними для злоякісного процесу, але вони повинні бути враховані при обстеженні і викликати онкологічну настороженість у лікаря при визначенні діагностичної та лікувальної програми.

3. Цитологічний діагноз «фолікулярна неоплазія» не може виключити наявність фолікулярної карциноми і є прямим показанням до оперативного втручання. Мінімальним об'ємом операції слід вважати гемітиреоїдектомію. Інтраопераційне експрес-гістологічне дослідження в даних випадках неінформативне, тому подальша тактика лікування вирішується тільки після отримання патогістологічного висновку.

Література

1. Фридман М. В., Демидчик Ю. Е. Макроскопическая диагностика опухолей щитовидной железы фолликулярного строения // Медицинская панорама. 2004, № 5, 22-23.
2. Thompson L. D., Wieneke J. A., Paal E. A clinicopathologic study of minimally invasive follicular carcinoma of the thyroid gland with a review of the english literature // Cancer. 2001, 91, 505-524.
3. LiVolsi V. A., Baloch Z. W. Follicular carcinoma of the thyroid // Pathology case reviews. 2003, 8, N 1, 4-15.
4. Baloch Z. W., Fleisher S., LiVolsi V. A., Gupta P. K. Diagnosis of «follicular neoplasm»: a gray zone in thyroid fine-needle aspiration cytology // Diagnostic cytopathology. 2002, 26, N 1, 41-44.
5. Hirokawa M., Carney A., Goellner J. R. Observer variation of encapsulated follicular lesions of the thyroid gland // Am. J. Surg. Pathol. 2002, 26, 1508-1514.
6. Cooper D. S., Doherty G. M., Haugen B. R. et al. Management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. The American Thyroid Association Guidelines Taskforce // Thyroid. 2006, 16, N 2, 1-33.

Клиническая характеристика и дифференциальная диагностика фолликулярных аденом и фолликулярных карцином щитовидной железы

И. Р. Янчий

Институт эндокринологии и обмена веществ им. В. П. Комиссаренко АМН Украины, г. Киев, 04114, Украина

Проведен анализ результатов обследования 214 больных, находившихся на лечении в хирургическом отделе Института эндокринологии и обмена веществ им. В. П. Комиссаренко АМН Украины по поводу фолликулярной карциномы и фолликулярной аденомы щитовидной железы. Цитологическое заключение «фолликулярная неоплазия» (аденома – 39,0 %, карцинома – 47,6 %) не позволяло исключить злокачественность опухоли, что явилось показанием для проведения оперативного вмешательства. Клинических признаков, патогномичных для злокачественности, не было выявлено, но при выборе диагностической программы необходимо учитывать такие факторы, как длительность анамнеза, жалобы больного, размеры и консистенцию узлов щитовидной железы.

Ключевые слова: щитовидная железа, фолликулярная неоплазия, аденома, карцинома.

Clinical profile and differentiated diagnosis of follicular thyroid carcinoma and follicular thyroid adenoma

I. R. Ianchii

V. P. Komisarenko Institute of Endocrinology and Metabolism of AMS, 04114 Kyiv, Ukraine

The results have been analyzed of examination of 214 patients having received medical treatment at the Surgery Department of V. P. Komisarenko Institute of Endocrinology and Metabolism of AMS of Ukraine for follicular thyroid carcinoma and follicular thyroid adenoma. Cytological conclusion «follicular neoplasia» (adenoma – 39.0 %, carcinoma – 47.6 %) did not allow to exclude the malignant tumor which is a surgical indication. No clinical signs pathognomonic for a malignant tumor has been found, but the diagnostic program should take into consideration such factors as anamnesis period, patient complaints, size and consistency of thyroid nodes.

Key words: thyroid, follicular neoplasia, adenoma, carcinoma.

(Надійшла 23.01.2008)

СТАН ВЕГЕТАТИВНОЇ РЕГУЛЯЦІЇ СЕРЦЕВОГО РИТМУ У МОЛОДИХ ХВОРИХ НА РАК ЩИТОПОДІБНОЇ ЗАЛОЗИ У ПЕРЕД- І ПІСЛЯОПЕРАЦІЙНОМУ ПЕРІОДАХ

С. Т. Зубкова*, Ю. В. Булдігіна, С. Я. Варгатий

Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В. П. Комісаренка АМН України, м. Київ, 04114, Україна

У 107 хворих молодого віку (17-35 років), прооперованих з приводу раку щитоподібної залози, вивчали стан вегетативної регуляції ритму серця за допомогою оцінки добової варіабельності серцевого ритму методом 24-годинного моніторингу ЕКГ. Результати дослідження аналізувались у перед- і післяопераційному періодах, через 1,5-2 міс до призначення супресивної терапії та в залежності від тривалості призначення супресивної терапії L-тироксином (через 6-12, 12-48 міс, 3-5 років). На тлі супресивної терапії, за даними аналізу часових показників (SDNN, SDANN, RMDSS), встановлено збільшення чи зменшення варіабельності ритму серця. Характер змін залежав від терміну лікування. За даними спектральних показників (LF, HF, VLF), у ранні строки після операції виявлено напруження регуляторних зв'язків для збереження вегетативного балансу і забезпечення адаптаційних можливостей організму, а при тривалості лікування понад 3 роки спостерігалось їх зрушення і поява десинхронозу добової вегетативної регуляції ритму серця, що може бути провісником розвитку чи наявності систолічної дисфункції лівого шлуночка і формування артеріальної гіпертензії.

Ключові слова: рак щитоподібної залози, супресивна терапія, варіабельність ритму серця.

Дослідження останніх років виявили зростання захворюваності на рак щитоподібної залози в більшості країн світу. На тлі незміненої залози ця недуга зустрічається в 16-21 % випадків, на тлі вузлового зоба – в 2-35 % випадків, на тлі багатовузлового зоба – в 5-30 % випадків [1-4].

При комбінованому радикальному лікуванні злоякісних новоутворень щитоподібної залози (ЩЗ) в післяопераційному періоді використовують супресивне лікування синтетичним тироксином (2,1-2,5 мкг/кг/добу) з метою пригнічення секреції ТТГ, що є необхідним для попередження проліферації клітин залишкової тканини ЩЗ [5, 6].

Біологічна дія гормонів ЩЗ різноманітна. Окрім впливу на метаболічні процеси, тиройдні гормони підвищують інотропну і хронотропну функцію серця, що призводить до зростання частоти скорочень серця і ударного об'єму, пульсового тиску, а також зміни стану вегетативної нервової системи (ВНС), підвищуючи активність її симпатичного відділу. Тому при використанні тиройдних гормонів в осіб з явною чи прихованою кардіальною патологією можливе виникнення їх побічної дії [5, 7].

Існують поодинокі повідомлення, які ґрунтуються на невеликих пілотних дослідженнях (10-30 хворих на тиройдний рак) стану серцево-судинної

*Адреса для листування (Correspondence): Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В. П. Комісаренка АМН України, вул. Вишгородська, 69, м. Київ, 04114, Україна

системи у хворих на тлі супресивної терапії L-тироксином [7, 8]. Так, В. Biondi et al. [8] на основі використання ЕКГ, Холтер-ЕКГ, двомірної ЕхоКГ, велоергометрії встановили у хворих середнього віку наявність діастолічної дисфункції лівого шлуночка у поєднанні з клінічними проявами адренергічного напрямку порушення ритму серця та підвищеною масою лівого шлуночка. Після 4-місячного використання біспрололу вказані зміни зменшувались чи зникали. Адренергічна блокада підвищувала також толерантність до фізичних навантажень. Подібні серцево-судинні зміни, за такими ж методами, пізніше виявили G.W. Ching et al. та G. Mercuro et al. [2, 9, 10].

Отже, у хворих на рак ЩЗ відмічено потенційний вплив хронічної супресивної терапії лівотироксином на серце в результаті розвитку екзогенного тиротоксикозу і встановлено можливість корекції виявлених зрушень призначенням β -адреноблокаторів. Однак в існуючих малочисельних повідомленнях не вивчалась роль вегетативної нервової системи, дослідження були проведені лише у хворих старших вікових груп.

Одним із сучасних неінвазивних методів діагностики стану ВНС є визначення діяльності серця за методом оцінки варіабельності ритму серця (ВРС) при добовому моніторингу ЕКГ. Метод дозволяє оцінити ступінь напруги регуляторних систем організму шляхом математичного аналізу серцевого ритму [11].

Для уникнення серцево-судинних ускладнень при призначенні супресивного лікування має значення оцінка вегетативної регуляції серцевого ритму у доопераційному періоді, а також в динаміці супресивної терапії лівотироксином при довгостроковому післяопераційному нагляді, що дозволить при необхідності модифікувати вегетативні впливи за допомогою використання адекватних терапевтичних засобів. Зазначена проблема є особливо актуальною, оскільки стосується насамперед осіб працездатного віку, що прооперовані з приводу карциноми щитоподібної залози.

Мета дослідження: вивчити у молодих хворих на рак ЩЗ стан вегетативної регуляції ритму серця за оцінкою добової варіабельності серцевого ритму методом варіаційної пульсометрії в перед- і післяопераційному періодах (через 2-6-12 міс, та більше 2-4 років) на тлі супресивної терапії.

Матеріали і методи дослідження

Оцінка стану вегетативної регуляції серцевої діяльності проводилась за допомогою комп'ютерного програмно-апаратного комплексу «Холтерівська система моніторингу ЕКГ DIACARD» (програмне і технічне забезпечення фірми «Сольвейг», Київ, Україна) за аналізом хвильової структури варіабельності серцевого ритму згідно з рекомендаціями Робочої групи Європейського товариства кардіологів і Північно-Американського товариства кардіостимуляції і електрофізіології (1996). Аналізувались часові (SDNN, SDANN, RMDSS) та спектральні (VLF, LF, HF, LF/HF) показники і трикутний індекс, що дозволило оцінити всю ВРС і її компоненти, тривалі і короткі. Вказані показники характеризують стан симпатичного та парасимпатичного відділів ВНС протягом доби. Аналізувався стан циркадного ритму.

Добовий моніторинг ВРС проведений 107 хворим на рак ЩЗ у віці 17-35 років (середній вік – $28,6 \pm 4,5$ роки), із яких 47 осіб склали групу обстежених у передопераційному періоді, 10 хворих обстежені через 1,5-2 міс після операції до призначення супресивної терапії L-тироксином (1-ша група), 15 пацієнтів обстежені через 6-12 міс після здійсненої операції (2-га група) на тлі супресивної терапії, 14 осіб – через 12-48 міс терапевтичного лікування (3-тя група) і 21 хворий – через 4-5 років після операції (4-та група). Результати дослідження порівнювали з величинами контрольної групи (20 практично здорових осіб відповідного віку) та між групами хворих. Левотироксин хворі приймали у дозі від 150 мкг до 225 мкг на добу. Рівень тиротропіну крові на тлі супресивної терапії коливався у межах 0,006 – 0,28 мО/л.

Результати дослідження та їх обговорення

В результаті добового моніторингування і аналізу показників ВРС з розрахунком показника стандартного відхилення NN (SDNN) і показника RMSS (табл. 1), який відображає варіабельність компоненти з малою тривалістю циклів, у хворих на рак ШЗ в доопераційному періоді встановили відсутність змін середніх величин сумарної ВРС у порівнянні з величинами контрольної вікової групи, як протягом доби, так і в денний, і нічний періоди. При індивідуальному аналізі у 18 з 47 (42 %) обстежених було виявлено зниження варіабельності серцевого ритму за даними показників RMSSD, SDNN, у 16 (34 %) осіб вказані чинники збільшувались, що свідчило про підвищення ВРС.

Таблиця 1. Середні значення показників варіабельності ритму серця у хворих на рак ШЗ у передопераційному періоді

Показники ВРС	Час доби	Контрольна група, n=20	Хворі на рак ШЗ, n=47
SDNN, мс	1	70,0 ± 7,7	73,2 ± 4,5
	2	59,8 ± 3,7	61,5 ± 3,9
	3	67,8 ± 3,5	73,0 ± 3,2
SDANN, мс	1	161,0 ± 7,9	151,5 ± 27,0
	2	84,0 ± 6,0	99,2 ± 14,8
	3	133,0 ± 9,6	138,0 ± 7,2
RMSSD, мс	1	48,2 ± 5,1	48,4 ± 2,7
	2	42,2 ± 1,5	42,7 ± 2,9
	3	58,3 ± 3,3	47,7 ± 5,6
LF, мс ²	1	2130,0 ± 355,0	2350,0 ± 218,0
	2	1498,0 ± 211,0	1790,0 ± 298,0
	3	1901,0 ± 322,0	1693,0 ± 248,0
NF, мс ²	1	1221,0 ± 176,0	1455,0 ± 159,0
	2	848,0 ± 153,0	707,5 ± 139,0
	3	1645,0 ± 315,0	1380,0 ± 318,0
LF/NF	1	1,74 ± 0,51	1,45 ± 0,02
	2	1,77 ± 0,21	2,39 ± 0,03*
	3	1,16 ± 0,20	1,13 ± 0,13

Примітка. У табл. 1 і 2: 1 – доба, 2 – денний період, 3 – нічний період; * – $P < 0,05$ – вірогідність різниці між величинами контрольної групи і хворими на рак ШЗ.

Встановлено [11, 12], що при серцевій недостатності ступінь зниження ВРС вірогідно пов'язаний з фракцією викиду і послаблення парасимпатичної регуляції відображає важкість систолічної дисфункції лівого шлуночка (ЛШ). Відносно хворих, обстежених нами, може йтися про можливу наявність прихованої дисфункції ЛШ і початкової серцевої недостатності, що вказує на необхідність поглибленого аналізу стану серцево-судинної системи і може бути провісником розвитку зазначеної патології.

Спектральний аналіз ВРС в передопераційному періоді при добовому моніторингуванні показав відсутність змін середніх величин потужності всіх спектральних компонент: високочастотної (HF), низького і дуже низького спектру (LF, VLF). Однак у 18 (42 %) із 47 обстежених відмічалось зниження величини HF (діапазон величин – 246-529 мс²) і у 20 % – LF (діапазон величин – 200-554 мс²), що відображало зниження парасимпатичного впливу на ритм серця у першому випадку і симпатичного – у другому, протягом доби та в різні її періоди. Переважав нічний тип симпатичного впливу. Між тим відомо, що для молодих здорових людей у стані спокою характерний високий парасимпатичний тонус [12].

Таким чином, у більшості обстежених хворих на рак ШЗ у доопераційному періоді спостерігається збереження вегетативної регуляції ритму серця. Хворі із змінами вегетативної регуляції серцевої діяльності на інших ета-

пах дослідження у післяопераційному періоді повинні бути під ретельнішим наглядом при призначенні супресивної терапії.

В післяопераційному періоді у хворих 1-ої групи (табл. 2), які були прооперовані і ще не приймали L-тироксин, встановлено підвищення показників, що характеризують ВРС за рахунок збільшення величин великої тривалості циклу (SDANN) вдень, чи малої (RMSSD) тривалості циклів NN в денний і нічний періоди. В групі хворих (2-а група), що приймали L-тироксин протягом 6-12 міс, спостерігали зниження варіабельності показників сумарної (SDNN) і малої тривалості (RMSSD) інтервалів NN, що вказувало на зниження варіабельності

Таблиця 2. Середні значення показників варіабельності ритму серця у хворих на рак ЩЗ після тиреоїдектомії в залежності від строку обстеження

Показники ВРС	Час доби	Контрольна група, n = 20	Хворі			
			Група 1, n = 10	Група 2, n = 15	Група 3, n = 14	Група 4, n = 21
SDNN, мс	1	70 ± 7,7	63 ± 1,10	54 ± 3,30*	71 ± 13,60	54 ± 2,5*
	2	59,8 ± 3,7	60 ± 3,0	53 ± 6,16	69 ± 3,70*	53 ± 2,3
	3	67,8 ± 3,5	64 ± 3,2	59 ± 3,64	72 ± 4,94	51 ± 4,3*
SDANN, мс	1	161,0 ± 7,9	129 ± 13,70	115 ± 9,36*	122 ± 7,96*	119 ± 9,20*
	2	84,0 ± 6,0	112 ± 8,64*	84 ± 7,84	113 ± 15,85	112 ± 12,5*
	3	133,0 ± 9,6	145 ± 14,10	129 ± 6,80	134 ± 16,03	108 ± 8,6
RMSSD, мс	1	48,2 ± 5,2	52 ± 5,38	31 ± 3,80*	56 ± 4,91	34 ± 3,6*
	2	32,2 ± 2,9	48 ± 6,73*	32 ± 3,90	59 ± 3,62*	32 ± 3,4
	3	42,3 ± 3,3	56 ± 5,49*	34 ± 3,64	37 ± 3,85	29 ± 4,5*
VLF, мс ²	1	2345 ± 154	2146 ± 300	1731 ± 201*	2630 ± 213	1850 ± 150*
	2	1677 ± 136	1721 ± 156	1291 ± 176	2308 ± 186*	1558 ± 153
	3	2587 ± 251	2427 ± 196	1961 ± 185	2470 ± 175	1900 ± 134*
LF, мс ²	1	2130 ± 355	1321 ± 306*	1086 ± 133*	1061 ± 70*	1085 ± 258*
	2	1498 ± 211	1213 ± 101*	882 ± 141*	1013 ± 120	826 ± 206*
	3	1901 ± 322	1565 ± 155	1069 ± 187*	1588 ± 135	1134 ± 186*
HF, мс ²	1	1221 ± 176	1720 ± 196*	533 ± 119*	819 ± 66*	786 ± 125*
	2	848 ± 153	1349 ± 350	398 ± 84*	879 ± 96	663 ± 112*
	3	1645 ± 315	2067 ± 383	662 ± 33*	1662 ± 245	513 ± 234*
LF/HF	1	1,74 ± 0,31	0,71 ± 0,09*	1,98 ± 0,09	1,48 ± 0,12	1,51 ± 0,13
	2	1,77 ± 0,21	1,36 ± 0,08*	2,55 ± 0,11*	1,57 ± 0,22	1,26 ± 0,91*
	3	1,16 ± 0,20	0,94 ± 0,14	1,84 ± 0,20*	0,93 ± 0,16	2,10 ± 0,22*

ритму серця. У пацієнтів 3-ї групи з більш тривалим періодом супресивної терапії (12-24 міс) виявили, навпаки, підвищення показника сумарної тривалості SDNN та RMSSD в денний період порівняно з величинами контрольної групи та 1-ої і 2-ої груп ($P < 0,05$). У хворих 4-ї групи відмічали зниження показника сумарної варіабельності за добу і в нічний період, за рахунок величин малої тривалості в нічний час і великої тривалості – в денний. Отже, на характер змін стану ВРС впливає тривалість приймання супресивної дози тироксину.

При індивідуальному аналізі показників варіабельності серцевого ритму відмічали збільшення частоти виникнення їх змін з продовженням тривалості захворювання. Так, у доопераційному періоді величини SDNN, SDANN чи RMSSD були зміненими у 15 осіб (73%), а у хворих 3-ї і 4-ї груп – у 98% і 91% обстежених, відповідно.

Аналіз середніх величин спектральних показників (VLF, LF, HF), що характеризують стан нейрогормональної регуляції серця та активність симпатичного і парасимпатичного відділів ВНС (табл. 2), встановив у хворих, що ще не приймали L-тироксин в післяопераційному періоді (1-ша група), зниження величини LF як впродовж доби, так і в денний час, у порівнянні з величинами контрольної групи, що вказувало на зменшення адренергічного

впливу на діяльність серця. В той же час, за відсутності ЩЗ в результаті тироїдектомії, спостерігали підвищення показника HF впродовж доби та його тенденцію до підвищення в денний період, що свідчило про збільшення хо- лінергічних впливів на серцеву діяльність, і підтверджувалось зниженням величини співвідношення LF/HF.

У пацієнтів 2-ї групи, що приймали L-тироксин протягом 6-12 міс, протягом всіх періодів обстеження продовжувалося зниження величини показника LF та зменшення величини NF у порівнянні з хворими 1-ї групи. Однак в денний і нічний періоди за величиною співвідношення вказаних чинників (LF/NF), що підвищувалось, спостерігалось превалювання впливів симпатичного відділу ВНС (табл. 2).

У хворих з більш тривалим прийомом препарату (3-я і 4-а групи), у порівнянні з контрольною групою, також відмічали зменшення вказаних величин (LF, HF), більш виражене у пацієнтів 4-ї групи. Величини співвідношення LF/HF у хворих 3-ї групи були у межах контрольної групи і підтверджували наявність збереженого вегетативного балансу. У пацієнтів 4-ї групи у денний час величина співвідношення була меншою, ніж в осіб контрольної групи, а в нічний період співвідношення було збільшене, що вказувало на перевагу у першому випадку парасимпатичного впливу на ритм серця, в другому – симпатичного. Встановлене свідчить про зрушення вегетативного балансу, яке проявляється появою парасимпатичного денного та симпатичного нічного типів активності вегетативної нервової системи.

При індивідуальному аналізі величини співвідношення LF/HF встановлено зростання частоти його змін при більшій тривалості захворювання. Співвідношення груп обстежених з 1-ї до 4-ї, відповідно, становило: 50 %, 51 %, 77 % і 76 %.

Слід підкреслити також динаміку чинника VLF, який відображає стан нейро-гормональної регуляції серцевої діяльності. Його величина знижувалась впродовж доби у хворих 2-ї і 4-ї груп і підвищувалась (зростання регуляції) в денний час у пацієнтів 3-ї групи, що свідчило про різну спрямованість змін нейро-гуморальної регуляції в залежності від тривалості лікування.

Дослідження добових ритмів вегетативного тону методом варіаційної пульсометрії у здорових осіб показали, що вдень переважає тонус симпатичної, а вночі – парасимпатичної нервової системи. У обстежених нами хворих, за даними абсолютних значень величин HF і LF/HF вночі, встановлено перебільшений парасимпатичний вплив у прооперованих хворих, які ще не приймали супресивну дозу L-тироксину, що можна розцінити як відповідь на збільшення симпатичних впливів у цей період доби. У пацієнтів 2-ї групи показник співвідношення LF/HF значно вищий, ніж його величина у контрольній групі і вказує на некомпенсовану рівновагу між двома відділами ВНС. У хворих 3-ї групи підвищення активності симпатичних впливів супроводжується адекватним підвищенням парасимпатичних впливів (показник LF/HF у межах величин контрольної групи). За тривалості захворювання більше 3 років, частіше появляються зміни варіабельності ритму серця і зрушення вегетативного балансу, десинхроноз добової вегетативної регуляції ритму серця, що вказує на необхідність корекції встановлених змін.

Отже, у молодих хворих, прооперованих з приводу раку ЩЗ, супресивна терапія супроводжується напруженням регуляторних зв'язків для збереження вегетативного балансу і забезпечення адаптаційних можливостей організму, а при тривалості лікування більше 3 років наступають їх зрушення і проявляється десинхроноз добової вегетативної регуляції ритму серця.

Порушення функції ВНС асоціюються з низкою захворювань (артеріальна гіпертензія, аритмія, нейроциркуляторна дистонія тощо), у зв'язку з чим зміни ВРС, оцінені методом Холтерівського моніторингування ЕКГ, у хворих, прооперованих з приводу раку ЩЗ, можуть бути раннім проявом серцево-

судинних змін і використовуватись для стратифікації ризику серцево-судинних ускладнень при даному захворюванні [10, 13].

Висновки

1. У більшості молодих хворих на рак ЩЗ у передопераційному періоді спостерігається збереження вегетативної регуляції ритму серця, у меншій частині – зниження варіабельності ритму серця та підвищення симпатичного впливу на серцеву діяльність у нічний період доби, що може бути передвісником розвитку чи наявності систолічної дисфункції лівого шлуночка і формування артеріальної гіпертензії.

2. Підвищена варіабельність ритму серця у післяопераційному періоді (через 1,5-2 міс після операції) до призначення супресивної терапії супроводжується зниженням парасимпатичного впливу на серцевий ритм і підвищенням впливу симпатичного відділу ВНС.

3. У пацієнтів молодого віку, прооперованих з приводу диференційованої карциноми, супресивна терапія L-тироксином спричиняє різний вплив на вегетативну регуляцію ритму серця в залежності від тривалості лікування надмірними дозами гормонів. При початковому (6-12 міс) прийомі препарату виникає зниження ВРС, що в подальшому при більш тривалій супресивній терапії (12-24 міс) підвищується чи прогресивно знижується (у строки довші 24 міс).

4. Збільшення ВРС супроводжується збалансованою активацією симпатичного та парасимпатичного впливів на регуляцію ритму серця. Зниження ВРС асоціюється з підвищенням активності симпатичних впливів у нічний період та появою десинхронозу добової вегетативної регуляції ритму серця.

Література

1. Демидчик Е. П., Цыб А. Ф., Лушников Е. Ф. и др. Рак щитовидной железы у детей (последствия аварии на Чернобыльской АЭС). М.: Медицина, 1996. 208 с.
2. Ching G. W., Franklyn J. A., Stallard T. J. et al. Cardiac hypertrophy as a result of long-term thyroxine therapy and thyrotoxicosis // Heart. 1996, 42, 363-368.
3. Тронько Н. Д., Олейник В. А., Корпачев В. В. и др. Заместительная и супресивная терапия тиреоидными гормонами при заболеваниях щитовидной железы // Эндокринология. 2001, 6, № 2, 235-244.
4. Матасар И., Голубчиков М., Водопьянов В. и др. Частота заболеваний щитовидной железы среди населения Украины // Ліки України. 2002, № 10, 48-53.
5. Герасимов Г. А. Лечение препаратами тироксина больных с заболеваниями щитовидной железы, зарубежный опыт и его использование в России (лекция) // Пробл. эндокринолог. 1996, 42, № 1, 30-33.
6. Саидова Ф. Х. Современные аспекты диагностики и лечения полинодозного эутиреоидного зоба // Эндокринология. 2001, 6, № 2, 221-227.
7. Kuma K., Matsuzuka F., Yokozawa T. et al. Fate of untreated benign thyroid nodules: results of long-term follow-up // World. J. Surg. 1994, 18, № 4, 495-499.
8. Biondi D., Fazio C., Carellf C. et al. Cardiac effects of long-term thyrotropin-suppressive therapy with levothyroxine // J. Clin. Endocrinol. Metab. 1993, 77, 334-338.
9. Wemeau J. L., Proust-Lemoine E., Ladsous M. TSH-suppressive treatment and cardiac function // The Thyroid and Cardiovascular Risk. Merck European Thyroid Symposium, Berlin, 2004, 73-78.
10. Mercurio G., Panzuto M. G., Bina F. et al. Cardiac function, physical exercise capacity, and quality of life during long-term thyrotropin suppressive therapy with levothyroxine: effect of individual dose tailoring // J. Clin. Endocrinol. Metab. 2000, 85, 159-164.

11. Бобров В. О., Чубучний В. М., Жаринов О. Й. Дослідження варіабельності серцевого ритму у кардіологічній практиці: Метод. рекомендації. К., 1999. 25 с.
12. Carditello A., Monaco M., Barresi P. Neoplasie maligne della tiroide: Trattamento chirurgico mediante thyroidectomia totale // *Acta chir. Ital.* 1998, 54, N 3, 241-244.
13. Malik M., Camm A. J. Components of heart rate variability – what they really mean and what we really measure // *Am. J. Cardiol.* 1993, 72, N 11, 821-822.

Состояние вегетативной регуляции сердечного ритма у молодых больных раком щитовидной железы в пред- и послеоперационном периодах

С. Т. Зубкова, Ю. В. Булдыгина, С. Я. Варгатый

Институт эндокринологии и обмена веществ им. В. П. Комиссаренко АМН Украины, г. Киев, 04114, Украина

У 107 больных молодого возраста, прооперированных по поводу рака щитовидной железы, изучали состояние вегетативной регуляции ритма сердца с помощью оценки суточной вариабельности сердечного ритма (ВРС) при проведении 24-часового холтеровского мониторирования ЭКГ. Пациенты обследовались до оперативного лечения и в послеоперационном периоде через 1,5-2 мес до назначения супрессивной терапии L-тироксином и, затем, в зависимости от длительности курса супрессивной терапии (через 6-12 мес, 12-48 мес, 3-5 лет). На фоне супрессивной терапии, согласно данным временных показателей (SDNN, SDANN, RMSSD), зафиксировано увеличение или снижение ВРС. Характер изменений зависел от длительности лечения. В ранние сроки после операции, на основании изменения спектральных показателей (LF, HF, VLF), выявлено напряжение регуляторных связей для сохранения вегетативного баланса и обеспечения адаптации организма. При длительности лечения более 3 лет установлен их патологический сдвиг и появление десинхроноза суточной ВРС, что может быть предвестником появления или наличия систолической дисфункции левого желудочка и формирования артериальной гипертензии.

Ключевые слова: рак щитовидной железы, супрессивная терапия, вариабельность ритма сердца.

The state of vegetative regulation of young patients with thyroid cancer during pre- and postoperative periods

S. T. Zubkova, Yu. V. Buldygina, S. Ya. Vargaty

V. P. Komisarenko Institute of Endocrinology and Metabolism of AMS, 04114, Kyiv, Ukraine

The state of vegetative regulation of cardiac rhythm (CRV) by means of estimation of daily heart rate variability (HRV) using 24-hour Holter ECG-monitoring was studied in 107 young patients operated for a thyroid cancer. The patients were examined before surgical treatment and in postoperative period in 1,5-2 months before prescription of suppressive therapy with L-thyroxin (STT), and then depending on the duration of STT course (in 6-12 months, 12-48 months, 3-5 years). In the presence of STT, according to the time indices data (SDNN, SDANN, RMSSD) an increase or decrease of HRV was established. The character of changes depended on treatment duration. Based on spectral indices (LF, HF, VLF) in the early period after the operation, the tension of regulative relations for preservation of vegetative balance and provision of organism adaptation was determined. In case of treatment for more than 3 years, a shift and appearance of desynchronose daily vegetative regulation of cardiac rhythm were observed. This may predict the manifestation or presence of left ventricular systolic dysfunction and development of arterial hypertension.

Key words: thyroid cancer, suppressive therapy, heart rate variability.

(Надійшла 20.03.2008)

ОСОБЛИВОСТІ ПРОНИКЛИВОСТІ МЕМБРАН МІТОХОНДРІЙ КЛІТИН З ДІЛЯНОК НОРМАЛЬНОЇ ТИРОЇДНОЇ ПАРЕНХІМИ МІКРО- ТА НОРМОФОЛІКУЛЯРНОЇ БУДОВИ

Т. М. Мишуніна*, О. В. Калініченко

Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В. П. Комісаренка АМН
України, м. Київ, 04114, Україна

Досліджені інтенсивність, швидкість та особливості динаміки набряку мітохондрій, а також визначена величина трансмембранного потенціалу мітохондрій, виділених з позавузлової незміненої тканини щитоподібної залози хворих з вузловою патологією останньої. Характеристики набряку мітохондрій з незміненої тканини залози нормофолікулярної будови, реакція їх на внесення до середовища інкубації іонів Ca^{2+} відкриттям мітохондріальних пор та зниження при цьому величини трансмембранного потенціалу, а також гальмування цього процесу при попередній інкубації із антиоксидантами (мелатоніном і α -токоферолом) свідчать як про нативність та життєздатність мітохондрій, так і про адекватність біохімічних та молекулярних процесів у тканині нормофолікулярної будови, зокрема тих, що регулюють стан проникливості мембрани мітохондрій для проапоптозних молекул. У незміненій тканині залози мікрофолікулярної будови спостерігали порушення як базального рівня проникливості мітохондріальної мембрани, що ілюструється змінами швидкості набряку мітохондрій та значними індивідуальними варіаціями величини трансмембранного потенціалу, так і механізмів ініціації під впливом іонів Ca^{2+} відкриття мітохондріальних пор, а також антиоксидантних реакцій за участю мелатоніну та α -токоферолу. Обговорюється значення виявлених порушень для реалізації мітохондріальних механізмів ініціації та реалізації апоптозу.

Ключові слова: тканина щитоподібної залози нормо- та мікрофолікулярної будови, трансмембранний потенціал мітохондрій, набряк мітохондрій, іони Ca^{2+} , антиоксиданти, апоптоз.

На сьогодні вже не викликає сумнівів, що порушення бар'єрних властивостей мембран мітохондрій та вихід цитохрому с і деяких інших проапоптозних чинників в цитоплазму займають одне з центральних місць у процесах, які ведуть до загибелі клітини.

Вихід цитохрому с з мітохондрій може відбуватися внаслідок принаймні двох різних процесів. Один з них пов'язаний зі збільшенням об'єму (набряком) матриксу мітохондрій та розривом зовнішньої мембрани під тиском внутрішньої, а інший – із утворенням великих пор у зовнішній мембрані, що обумовлено в основному білком Вах. Причиною набряку мітохондрій, зрештою, є підвищення іонної проникливості внутрішньої мембрани, що, у свою чергу, зумовлено або гідролізом фосфоліпідів ендогенною фосфоліпазою A_2 , яка локалізується у внутрішній мембрані мітохондрій та активується позамітохондріальними іонами Ca^{2+} , або пероксидацією ліпідів мембрани, що при-

зводить до окиснення тіолових груп білків. Отже, відкриттю пор та деполаризації мембрани сприяють високий рівень Ca^{2+} та значна концентрація сполук активного кисню [1]. Суттєве значення при цьому має відкриття електрозалежних аніонних каналів, які діють у місцях контакту зовнішньої та внутрішньої мембран і дозволяють неспецифічний прохід йонів та молекул розмірами меншими ніж 1,5 кДа. Відкриття цих каналів на внутрішній мембрані призводить до вирівнювання концентрації йонів у межах матриці та простору у мембрані, а це зменшує електрохімічний трансмембранний градієнт ($\Delta\psi$) та роз'єднує ланцюг дихання, який веде до утворення АТФ. Показано, що це є найранішим проявом апоптозу. У стані високої провідності канал стабілізується у відкритій позиції і починає пропускати у білкову мембранну матрицю воду. Це викликає набряк мітохондрій; внутрішня мембрана, яка має значно більшу поверхню, ніж зовнішня, тисне на останню, що призводить до її розриву та виходу проапоптозних факторів у цитоплазму [2]. Назагал, процеси відкриття пор як внутрішньої мембрани мітохондрій, так і в зовнішній мембрані, регулюються білками сім'ї Bcl-2/Bax. При цьому молекули Bcl-2 надходять зсередини, а інші (Bag-1, Ras, Raf, Grb 10) – із цитоплазми, вони вбудовуються у зовнішню мембрану і можуть асоціюватися, формуючи комплекс, який регулює відкриття мітохондріальних мегаканалів [3]. Це призводить до втрати органелами їх головної функції – здатності синтезувати АТФ та слугувати основним джерелом його внутрішньоклітинних запасів.

Різка зміна проникливості мембран мітохондрій за підвищення рівня позамітохондріального кальцію одержала назву «permeability transition», а канал, який у стані високої провідності дозволяє неспецифічний прохід йонів у білкову мембранну матрицю – неселективна мітохондріальна пора («mitochondrial permeability transition», MPT). Основними структурними компонентами MPT (міжбілкового комплексу) є пори зовнішньої мембрани (потенціалзалежний аніонний канал) та АДФ/АТФ-антипортер внутрішньої мембрани мітохондрій [3].

Отже, мітохондрії є основним місцем інтеграції про- та антиапоптозних сигналів, і тому справедливо вважають, що мітохондріальні механізми розвитку апоптозу можуть відігравати важливу роль у патогенезі різних патологічних станів. Проте за умов патології щитоподібної залози (ЩЗ) на цей час досліджені лише окремі ланки багатоланцюгових механізмів апоптозу, більшість із них, зокрема мітохондріальних, залишаються маловивченими.

Дослідження різних аспектів метаболізму та молекулярно-біологічних процесів у тканинах людини при будь-якій патології потребує вирішення складного питання – формування групи зразків тканин, для яких величина показників, що вивчаються, могла б вважатися за контрольну. Зважаючи на високу частоту патологічних змін у позавузловій тканині ЩЗ хворих із вузловою тироїдною патологією, ми вже вказували на необхідність прискіпливого відбору зразків незміненої тканини, які можуть бути включені до групи порівняння [4, 5].

В ході досліджень з вивчення стану проникливості мітохондріальних мембран було проаналізовано 65 зразків позавузлової тканини ЩЗ, які не мали макроскопічних ознак патології. Серед них лише для 9 зразків висновок патолога виглядав як «тканина нормофолікулярної будови» і ще для 8 – як «тканина мікрофолікулярної будови» (без будь-яких інших застережень). В інших випадках патолог відзначав наявність різних гістологічних ознак певних патологічних змін. В той же час, одержані дані засвідчили існування суттєвої різниці у характері показників, що вивчалися, між мітохондріями, які були виділені з незміненої тканини ЩЗ нормофолікулярної будови та незміненої тканини мікрофолікулярної будови. Результати аналізу такої різниці в залежності від особливостей фолікулярної будови ЩЗ є предметом цього

повідомлення. Досліджені інтенсивність, характер та швидкість набряку мітохондрій, як одного з найбільш адекватних параметрів оцінки індукції неспецифічної проникливості, та визначено величину різниці електрхімічного потенціалу (трансмембранний потенціал) мітохондріальної мембрани, як інтегрального параметру енергетичного статусу мітохондрій, зниження якого обумовлює вивільнення проапоптозних факторів.

Матеріал та методи

На проведення досліджень був одержаний дозвіл від комісії Інституту з біоетики.

Досліджено 17 зразків позавузлової незміненої тканини ШЗ, отриманих від хворих на вузлову еутиреоїдну патологію. Тканину звільняли від жиру і крововиливів, промивали охолодженим фізіологічним розчином, зважували, подрібнювали та гомогенізували у 10-кратному об'ємі середовища наступного складу (мМ): цукроза 250, трис-НСІ-буфер – 20, ЕДТА- Na_2 – 1 (рН 7,4). Мітохондрії виділяли загальноприйнятим методом диференціального центрифугування та суспендували їх осад у середовищі виділення, яке не містило ЕДТА. Всі процедури проводили при 4 °С.

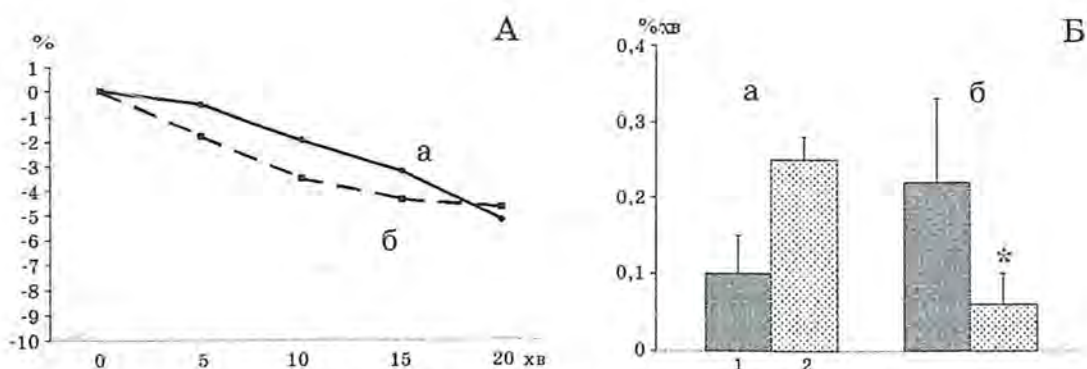
Інтенсивність набряку мітохондрій визначали за величиною зниження (у відсотках від початкової величини, ΔA %) оптичної густини суспензії мітохондрій, яку реєстрували впродовж 20 хв при кімнатній температурі на спектрофотометрі при довжині хвилі 540 нм в середовищі наступного складу (мМ): КСІ – 120, трис-НСІ – 25, KH_2PO_4 – 3, АТФ – 1, глутамат – 2 (рН 7,4). Концентрація білка становила біля 0,4 мг/мл. Швидкість набряку мітохондрій розраховували як відсоток зниження оптичної густини суспензії за 1 хв в межах кожного 5-хвилинного періоду спостережень. Відкриття мітохондріальних пор індукували CaCl_2 (10^{-7} - 10^{-3} М), розчин якого вносили безпосередньо у кювету при реєстрації набряку мітохондрій. При визначенні впливу α -токоферолу чи мелатоніну мітохондрії перед додаванням CaCl_2 (10^{-5} М) попередньо інкубували з препаратами впродовж 5 хв. Використання зазначених концентрацій CaCl_2 у цих серіях досліджень обумовлено відомими даними літератури про фізіологічну концентрацію іонів Ca^{2+} у цитоплазмі клітин (10^{-6} - 10^{-8} М), а також про найбільш адекватну концентрацію іонів Ca^{2+} , яка необхідна для ініціації відкриття мітохондріальної пори [6, 7]. Кінцева розрахункова концентрація антиоксидантів у середовищі інкубації становила 10^{-3} М та 10^{-7} М. Препарати попередньо розчиняли у невеликій кількості етилового спирту, після чого готували їх буферні розчини. Присутність етилового спирту у концентрації менш ніж 3 % не впливає на інтенсивність набряку мітохондрій [8].

Визначення величини трансмембранного електрхімічного потенціалу ($\Delta\psi$) проводили за методом Akerman та Wikstrom [9]. Вміст білка у суспензії мітохондрій визначали за однією з модифікацій методу Lowry [10]. Одержані дані опрацьовані статистично із використанням критерію t Стьюдента та непараметричного критерію Вілкоксона-Мана-Уїтні. Критичний рівень значимості приймали за 0,05.

Результати та їх обговорення

Як видно з даних мал. 1, характер кривої набряку мітохондрій, які були виділені із позавузлової незміненої тканини ШЗ нормофолікулярної будови, свідчить про помірне зниження оптичної густини суспензії мітохондрій впродовж 20 хв інкубації. Наприкінці інкубації це зниження склало 5 % від початкового рівня, що співпадає із інтенсивністю набряку мітохондрій, які були виділені, наприклад, з тканини серця інтактних щурів [7]. Характер кривої динаміки набряку мітохондрій з незміненої тканини нормофолікулярної будови вказує на відносну рівномірність цього процесу із помірним підвищенням його швидкості у часі (мал. 1, А).

Характер та інтенсивність набряку мітохондрій, які були виділені з незміненої тканини мікрофолікулярної будови, не відрізнялися від цих характе-



Мал. 1. Характер динаміки (А) та швидкість (Б) набряку мітохондрій з позавузлової незміненої тканини ЩЗ нормо- (а) та мікрофолікулярної (б) будови: 1 – початкова швидкість, 2 – прикінцева швидкість; * – різниця у порівнянні зі швидкістю набряку мітохондрій нормофолікулярної будови вірогідна ($P < 0,05$).

ристик набряку мітохондрій з незміненої тканини нормофолікулярної будови (табл. 1, мал. 1, А). В той же час, швидкість набряку мітохондрій з незміненої тканини мікрофолікулярної будови з часом інкубації зменшувалася (мал. 1, Б), тоді як для мітохондрій, виділених з незміненої тканини нормофолікулярної будови, вона зростала (див. мал. 1, А).

Внесення до середовища інкубації мітохондрій з незміненої тканини ЩЗ нормофолікулярної будови іонів Ca^{2+} призводило до підвищення інтенсивності набряку мітохондрій без суттєвої залежності його ступеня від концентрації іонів Ca^{2+} (табл. 1, мал. 2, А – на малюнку наведена, як приклад, лише крива впливу іонів Ca^{2+} в концентрації 10^{-5} М). При цьому за умов дії іонів Ca^{2+} в усіх досліджених концентраціях спостерігали підвищення початкової швидкості набряку мітохондрій, найбільш виразно за концентрації Ca^{2+} 10^{-7} М (мал. 3, А), тоді як прикінцева швидкість набряку мітохондрій зменшувалася за дії іонів Ca^{2+} в цій концентрації та статистично значуще зростала за концентрації іонів Ca^{2+} 10^{-3} М.

Слід відмітити, що для мітохондрій, виділених з тканини серця інтактних щурів, діапазон впливу іонів Ca^{2+} на набряк мітохондрій був дещо іншим – 10^{-6} - 10^{-4} М, тоді як концентрація 10^{-7} М не викликала прискорення набряку мітохондрій. Автори вважають, що останнє пов'язане із тим, що концентрація іонів Ca^{2+} 10^{-7} М є фізіологічною для мітохондрій кардіоміоцитів, які знаходяться у стані спокою [7]. Найзначніший набряк мітохондрій в цих дослідках встановлено для концентрації Ca^{2+} 10^{-4} М. Виявлена різниця у характері впливу різних концентрацій іонів Ca^{2+} на набряк мітохондрій з незміненої тканини ЩЗ нормофолікулярної будови та тканини серця щурів може відображати особливості кальцієвого гомеостазу, що спостерігаються у клітинах різних типів. Отже, наведені результати свідчать, що при дії на ізольовані мітохондрії іонів Ca^{2+} в діапазоні концентрацій 10^{-7} - 10^{-3} М відбувається відкриття мітохондріальних пор, причому за дії концентрації, наближеної до фізіологічної (10^{-7} М), цей процес відбувався швидко та в подальшому у часі швидко гальмувався, а за дії більшої концентрації іонів Ca^{2+} був тривалішим.

Внесення іонів кальцію до середовища інкубації мітохондрій з позавузлової незміненої тканини ЩЗ мікрофолікулярної будови суттєво не впливало на інтенсивність їх набряку (табл. 1, мал. 2, Б). Початкова та прикінцева швидкість набряку мітохондрій дещо підвищувалась при дії іонів Ca^{2+} , статистично значущі зміни зафіксовані лише для прикінцевої швидкості набряку за концентрації іонів Ca^{2+} 10^{-7} М (мал. 3, Б). Таким чином, в мітохондріях з позавузлової незміненої тканини мікрофолікулярної будови не спостерігали суттєвої індукції

відкриття мітохондріальних пор, що свідчить про порушення механізмів регуляції проникливості мітохондріальної мембрани клітин такої тканини.

Попередня інкубація мітохондрій із мелатоніном попереджувала розвиток індукованого іонами Ca^{2+} набряку мітохондрій, які були виділені із позаузлової незміненої тканини ШЗ нормофолікулярної будови (табл. 1, мал. 2, А – на малюнку наведена, як приклад, лише крива впливу мелатоніну в концентрації 10^{-7} М та була низькою при концентрації гормону 10^{-3} М (мал. 4, А). Прикінцева швидкість набряку мітохондрій при дії мелатоніну не відрізнялася від такої за індукції іонами Ca^{2+} . Ефект α -токоферолу виявився виразнішим: антиоксидант не тільки попереджував індукований іонами Ca^{2+} набряк мітохондрій, але і зменшував у порівнянні із базальним рівнем його інтенсивність (табл. 1, мал. 2, А – на малюнку наведена, як приклад, лише крива впливу α -токоферолу в концентрації 10^{-3} М). Зміни швидкості набряку мітохондрій під впливом α -токоферолу також стосувалися лише зменшення початкової швидкості (мал. 4, А).

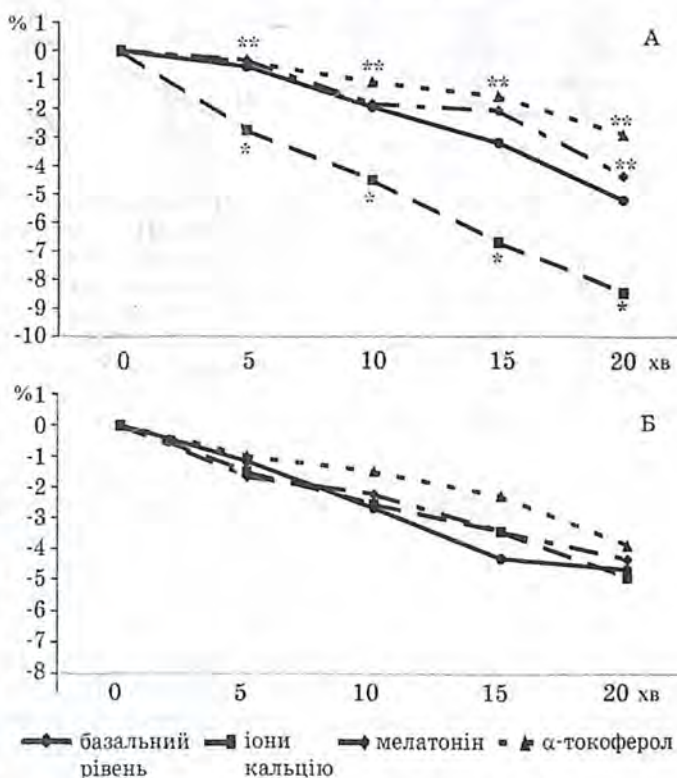
Ні мелатонін, ні α -токоферол не впливали на

Таблиця 1. Інтенсивність набряку мітохондрій з позаузлової незміненої тканини цитоподібної залози та вплив на неї іонів кальцію і антиоксидантів ($M \pm m$, $n=4$)

Умови досліджень	ΔA (%) для тканини	
	нормофолікулярної	мікрофолікулярної
Базальний рівень	$-5,19 \pm 0,22$	$-4,68 \pm 1,51$
Іони Ca^{2+} , 10^{-7} М	$-8,17 \pm 1,19$ *	$-6,85 \pm 2,48$
Іони Ca^{2+} , 10^{-5} М	$-8,44 \pm 0,22$ *	$-4,94 \pm 1,33$
Іони Ca^{2+} , 10^{-3} М	$-8,11 \pm 1,12$ *	$-4,01 \pm 1,10$
Мелатонін, 10^{-7} М	$-5,07 \pm 1,16$ **	$-4,13 \pm 0,40$
Мелатонін, 10^{-3} М	$-4,34 \pm 0,30$ **	$-4,32 \pm 1,02$
α -Токоферол, 10^{-7} М	$-3,85 \pm 0,59$ **	$-4,09 \pm 1,34$
α -Токоферол, 10^{-3} М	$-2,90 \pm 0,46$ **	$-3,89 \pm 0,91$

Примітка: * – різниця у порівнянні із базальним рівнем набряку вірогідна ($P < 0,05$);

** – різниця у порівнянні із рівнем набряку за умов впливу іонів Ca^{2+} в концентрації 10^{-5} М вірогідна ($P < 0,05$).



Мал. 2. Вплив іонів Ca^{2+} (10^{-5} М), мелатоніну (10^{-3} М) та α -токоферолу (10^{-3} М) на характер динаміки набряку мітохондрій з позаузлової незміненої тканини цитоподібної залози нормо- (А) та мікрофолікулярної (Б) будови:

* – різниця у порівнянні із базальним рівнем вірогідна ($P < 0,05$), ** – різниця у порівнянні із впливом іонів Ca^{2+} вірогідна ($P < 0,05$).

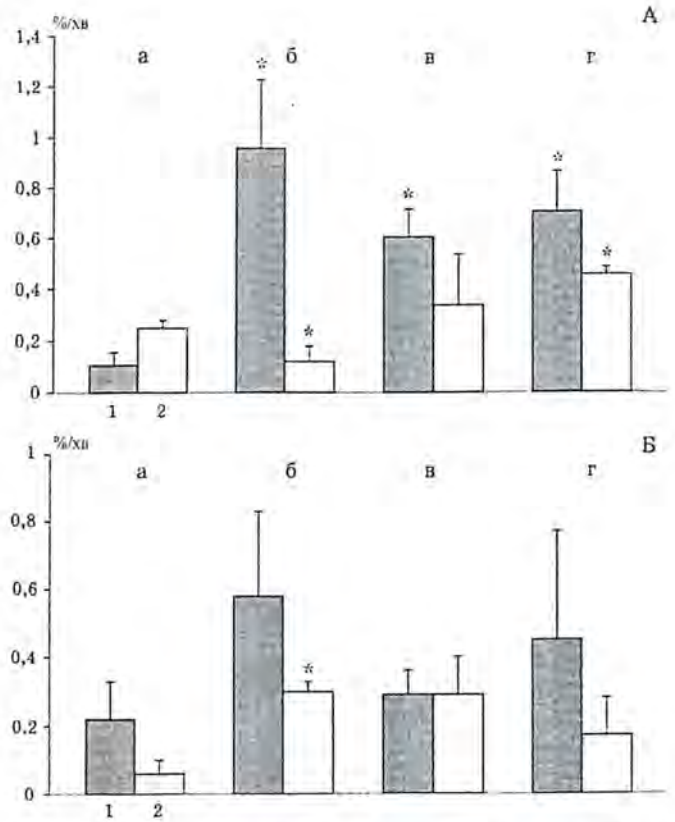
інтенсивність, швидкість та характер динаміки набряку мітохондрій, які були виділені з позавузлової незміненої тканини мікрофолікулярної будови (табл. 1, мал. 2, Б, мал. 4, Б).

Дослідження спектрофотометричним методом із застосуванням сафраніну О різниці електрорхімічного потенціалу мембран мітохондрій з позавузлової незміненої тканини ЩЗ нормофолікулярної будови дозволило визначити її величину для мітохондрій окремих зразків у межах 120-250 мВ (табл. 2). Це співпадає із даними, які були отримані іншими авторами при вивченні трансмембранного потенціалу мітохондрій, виділених з різних тканин, як при використанні цього реактиву, іонофору валіноміцину, деяких флуоресцентних зондів [9], так і при застосуванні мікроелектродної техніки [11]. У разі мікрофолікулярної будови позавузлової незміненої тканини ЩЗ середнє

значення $\Delta\psi$ суттєво не відрізнялося від такого для мітохондрій позавузлової незміненої тканини нормофолікулярної будови, проте спостерігали дуже значну розбіжність значень між окремими зразками тканин (табл. 2).

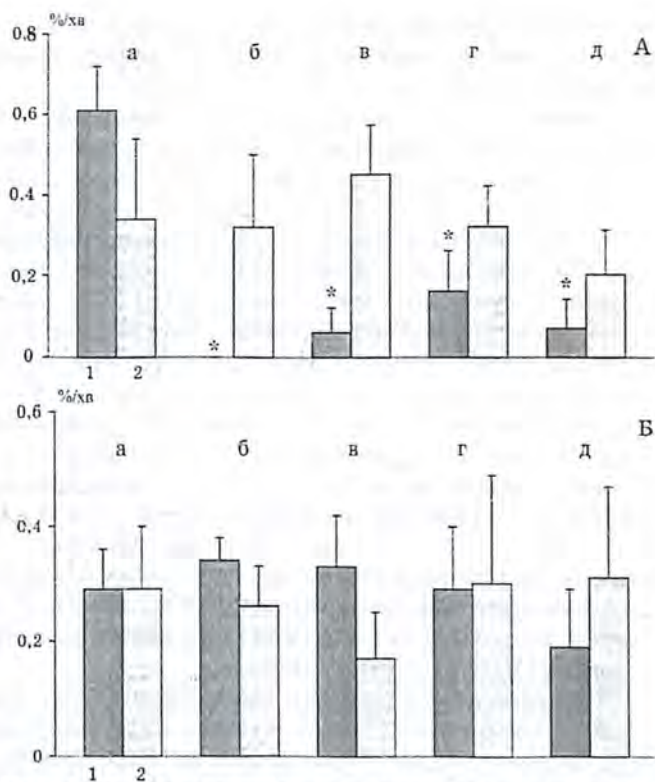
Зважаючи, що іони Ca^{2+} є індукторами відкриття мітохондріальних пор, при якому відбувається зниження трансмембранного потенціалу мітохондрій, були проведені дослідження з визначення величини $\Delta\psi$ мембран мітохондрій у присутності різних концентрацій іонів Ca^{2+} . Як видно з даних табл. 2, іони Ca^{2+} , незалежно від концентрації, однаковою мірою знижували величину $\Delta\psi$ мембран мітохондрій, які були виділені з позавузлової незміненої тканини ЩЗ нормофолікулярної будови. Цей процес мав протилежний за напрямком характер у разі мітохондрій з позавузлової незміненої тканини мікрофолікулярної будови. При цьому також спостерігали суттєву розбіжність у реакції мітохондріальних мембран на дію іонів Ca^{2+} різних зразків тканин, що не дозволило підтвердити закономірність процесу.

Отже, мітохондрії з позавузлової незміненої тканини ЩЗ нормофолікулярної будови реагують на внесення до середовища інкубації іонів Ca^{2+} відкриттям мітохондріальних пор та зниженням при цьому величини трансмембранного потенціалу, а антиоксиданти – мелатонін та α -токоферол (при попередній до внесення іонів Ca^{2+} інкубації) швидко гальмують цей процес. «Класичний»



Мал. 3. Вплив іонів Ca^{2+} на початкову (1) та прикінцеву (2) швидкість набряку мітохондрій з позавузлової незміненої тканини щитоподібної залози нормо- (А) та мікрофолікулярної (Б) будови: а – базальний рівень (безкальцієве середовище); б – Ca^{2+} , 10^{-7} М; в – Ca^{2+} , 10^{-5} М; г – Ca^{2+} , 10^{-3} М; * – різниця у порівнянні із відповідною швидкістю у безкальцієвому середовищі вірогідна ($P < 0,05$).

характер реакцій таких мітохондрій на зазначені чинники свідчить про їх нативність, життєздатність та адекватність біохімічних молекулярних процесів у тканині нормофолікулярної будови, зокрема тих, що регулюють стан проникливості мембрани мітохондрій для проапоптозних молекул. У позавузловій незмінній тканині ЩЗ мікрофолікулярної будови без будь-яких інших гістологічних особливостей спостерігали порушення як базального рівня проникливості мітохондріальної мембрани, що ілюструється змінами швидкості набряку мітохондрій та значними індивідуальними варіаціями величини трансмембранного потенціалу, так і механізмів Ca^{2+} -індукованого відкриття мітохондріальних пор, а також антиоксидантних реакцій за участю мелатоніну та α -токоферолу. Зазначене може мати суттєве значення для реалізації мітохондріальних механізмів ініціації та реалізації апоптозу.



Мал. 4. Вплив мелатоніну та α -токоферолу на початкову (1) та прикінцеву (2) швидкість набряку мітохондрій з позавузлової незмінної тканини щитоподібної залози нормо- (А) та мікрофолікулярної (Б) будови: а – Ca^{2+} , 10^{-5} М; б – Ca^{2+} , 10^{-5} + мелатонін, 10^{-7} М; в – Ca^{2+} , 10^{-5} М + мелатонін, 10^{-3} ; г – Ca^{2+} , 10^{-5} + α -токоферол, 10^{-7} М; д – Ca^{2+} , 10^{-5} + α -токоферол, 10^{-3} М; * – різниця у порівнянні із відповідною швидкістю у середовищі із Ca^{2+} , 10^{-5} М вірогідна ($P < 0,05$).

Таблиця 2. Різниця електрохімічного потенціалу мембран мітохондрій з позавузлової незмінної тканини щитоподібної залози хворих та вплив на неї іонів Ca^{2+} ($M \pm m$)

Тканина	$\Delta\psi$, мВ	$\pm\Delta\%$ при концентрації Ca^{2+}	
		10^{-5} М	10^{-7} М
Нормофолікулярної будови (7)	$166,3 \pm 31,5$	$-52,9 \pm 16,2$ *	$-55,7 \pm 17,8$ *
Мікрофолікулярної будови (5)	$121,6 \pm 118,8$	$+94,8 \pm 115,7$	$+60,8 \pm 88,2$

Примітка: в дужках – кількість спостережень; * – різниця у порівнянні із вихідним рівнем $\Delta\psi$ вірогідна ($P < 0,05$, метод різниць).

Постає питання, чому мітохондрії з незмінної тканини мікрофолікулярної будови, по суті, є резистентними до індуктора відкриття мітохондріальних пор та чинників, що модулюють цей процес у нормі? На цей час вважається, що у здорових людей мікрофолікулярна будова ЩЗ є варіантом норми і зустрічається переважно у молодому віці, тоді як з віком з'являється суттєва різниця між розмірами фолікулів. Проте вік пацієнтів, зразки тканини яких

мали нормофолікулярну будову, становив $30,5 \pm 1,1$ років, тоді як пацієнтів, зразки тканини ЩЗ яких мали мікрофолікулярну будову, був значно більшим – $51,3 \pm 4,5$ роки.

Відомо також, що зменшення розмірів фолікулів відбувається за умов дії чинників, що стимулюють функцію залози. Всі пацієнти, тканину яких досліджували, знаходилися в еутиреоїдному стані. В той же час, раніше було з'ясовано, що рівень ТТГ та вільного тироксину у хворих із карциномою ЩЗ може бути підвищеним, але не перевищувати значень верхньої межі норми [12, 13]. При цьому, подібне спостерігали лише у хворих із папілярною, але не із фолікулярною карциномою ЩЗ [13]. Аналіз груп пацієнтів, тканина ЩЗ яких була досліджена нами, показав, що до групи з 9 зразків тканин нормофолікулярної будови увійшли 4 зразки, одержані від пацієнтів із вузловим зобом, 1 зразок від пацієнта із фолікулярною та 4 зразки від пацієнтів із папілярною карциномою ЩЗ (8 з 9 зразків були відібрані з тієї ж долі, де локалізовано новоутворення). До групи зразків тканин мікрофолікулярної будови увійшли виключно ті, які були одержані від пацієнтів із папілярною карциномою (7 зразків з 8 були відібрані з контрлатеральної, до локалізації пухлини, долі). Отже, припускаємо, що у частини хворих на папілярну карциному ЩЗ може мати місце прихована мінімальна стимуляція з боку ТТГ, що і позначається на величині фолікулів. Було показано, що відсоток таких хворих може сягати понад 60 [12], проте клінічні симптоми порушення функції залози у них не виявляються.

Наведені дані свідчать, що в тиреоїдному епітелії позавузлової тканини мікрофолікулярної будови можуть мати місце певні порушення метаболізму та функціонування мітохондрій, що позначається, насамперед, на енергозabezпеченості клітин. Зазначені факти, проте, не дають відповіді на питання, чому мітохондрії з незміненої тканини мікрофолікулярної будови контрлатеральної, до локалізації пухлини, долі ЩЗ не реагують на дію іонів Ca^{2+} та антиоксидантів, що спостерігається для мітохондрій з тканини нормофолікулярної будови? В літературі ми не знайшли жодної інформації щодо порівняння будь-яких параметрів метаболізму клітин тиреоїдного епітелію за умов нормо- чи мікрофолікулярної будови тканини ЩЗ. Зважаючи на той факт, що позавузлова тканина ЩЗ мікрофолікулярної будови в наших дослідженнях була отримана виключно від хворих із карциномою ЩЗ, можна ризиковано припустити, що подібна резистентність мітохондріальних пор до індуктора їх відкриття свідчить про гальмування мітохондріальних механізмів ініціації та реалізації апоптозу, що, в свою чергу, може мати значення для створення сприятливих умов для розповсюдження пухлинних клітин у залозі, особливо, зважаючи на деяку стимуляцію останньої ТТГ.

Зробивши таке припущення, ми ретроспективно проаналізували власні дані щодо інтенсивності фрагментації ядерної ДНК у позавузловій незміненій тканині ЩЗ [4], зважаючи при цьому на особливості її фолікулярної будови. У групу тканин нормофолікулярної будови увійшли 8 зразків, серед яких 2 були відібрані з залози при папілярній, 1 – при фолікулярній карциномі та 5 – при вузловому зобі (7 з 8 зразків були відібрані з тієї ж долі, де було локалізовано новоутворення). У групу тканин мікрофолікулярної будови увійшли 3 зразки, які були відібрані з контрлатеральної долі, де була локалізована пухлина папілярної карциноми. Отже, ці дві групи тканин були подібними до тих, що аналізуються в даній роботі (див. вище). Виявлено, що концентрація фрагментованої ДНК у тканині ЩЗ мікрофолікулярної будови в 3,5 рази, а відсоток її (до загального вмісту ДНК) у 2,4 рази нижчі, ніж відповідні показники для позавузлової незміненої тканини ЩЗ нормофолікулярної будови (концентрація фрагментованої ДНК: $0,16 \pm 0,001$ мкг/мг тканини та $0,57 \pm 0,07$ мкг/мг тканини, частка фрагментованої ДНК: $14,9 \pm 0,51$ % та $35,8 \pm 2,03$ %, від-

повідно, у тканині мікро- та нормофолікулярної будови). Дані про зниження рівня фрагментованої ядерної ДНК у тканині мікрофолікулярної будови можуть вказувати на гальмування прикінцевої стадії апоптозу, що підтверджує припущення, висловлене вище. І хоча цей обережний висновок потребує, безумовно, додаткових доказів, слід відмітити, що він відповідає сучасним уявленням про існування взаємозалежності між пухлинами та тканинами, органами і системами організму.

Література

1. Annunziato L., Amoroso S., Pannaccione A. et al. Apoptosis induced in neuronal cells by oxidative stress: role played by caspases and intracellular calcium ions // *Toxicol. Lett.* 2003, **139**, N 2-3, 125-133.
2. Humlova Z. Protooncogene bcl-2 in process of apoptosis. Review article // *Sb. Lek.* 2002, **103**, N 4, 419-425.
3. Владимиров Ю. А. Нарушение барьерных свойств внутренней и наружной мембран митохондрий, некроз и апоптоз // *Биологические мембраны.* 2002, **19**, № 5, 356-377.
4. Пількевич Л. І., Калініченко О. В., Мишуніна Т. М. та ін. Високомолекулярна та фрагментована ДНК у тканині щитоподібної залози хворих з різною тиреоїдною патологією // *Журнал АМН України.* 2007, **13**, № 2, 229-240.
5. Мишуніна Т. М. До питання про формування контрольної групи зразків тканини щитоподібної залози від пацієнтів, хворих на вузлову патологію останньої // *Ендокринологія.* 2007, **12**, додаток, с. 184.
6. Gunter T., Gunter K., Sheu S-S., Gavin C. Mitochondrial calcium transport: physiological and pathological relevance // *Amer. J. Physiol.* 1994, **267**, N 2, C313-C339.
7. Сагач В. Ф., Вавилова Г. Л., Струтинська Н. А., Рудик О. В. Старіння підвищує чутливість до індукторів мітохондріальної пори в серці щурів // *Фізіол. журн.* 2004, **50**, № 2, 49-63.
8. Комісаренко В. П., Тюленев В. І., Мікоша О. С. Дослідження впливу о'п'-ДДД на АТФазну активність та набрякання мітохондрій печінки і нирок // *Фізіол. журн.* 1973, **19**, № 2, 195-199.
9. Akerman K., Wikstrom K. Safranin as a probe of the mitochondrial membrane potential // *FEBS Lett.* 1976, **68**, N 2, 191-197.
10. Hartree T. Determination of protein: A modification of Lowry method that gives a linear photometric response // *Anal. Biochem.* 1972, **48**, N 2, 422-427.
11. Туракулов Я. Х., Гайнутдинов М. Х. Физиологическая регуляция энергетических реакций митохондрий. Ташкент.: Из-во «ФАН» УзССР, 1980. 188 с.
12. Иванов П. К., Казеев К. Н., Каретников Ю. П. Тиролибериновый тест в диагностике рака щитовидной железы // *Пробл. эндокринолог.* 1984, **30**, №5, 34-38.
13. Комісаренко І. В., Славнов В. М., Рибаків С. І. та ін. Радіоімунологічний аналіз у визначенні функціонального стану гіпофізарно-тиреоїдної системи у хворих на рак щитоподібної залози // *УРЖ.* 1997, **5**, №22, 22-24.

Особенности проницаемости мембран митохондрий клеток из участков нормальной тироидной паренхимы микро- и нормофолликулярного строения

Т. М. Мишунина, Е. В. Калиниченко

Институт эндокринологии и обмена веществ им. В. П. Комиссаренко АМН Украины, г. Киев, 04114, Украина

Исследованы интенсивность, скорость и особенности динамики набухания митохондрий, а также определена величина трансмембранного потенциала митохондрий, выделенных из внеузловой неизменной ткани щитовидной железы больных с узловой патологией последней. Характеристики набухания митохондрий из неизменной ткани железы нормофолликулярного строения, реакция их на внесение в среду инкубации ионов Ca^{2+} открытием митохондриальных пор и снижение при этом величины трансмембранного потенциала, а также торможение этого процесса при предварительной инкубации с антиоксидантами (мелатонином и α -токоферолом) свидетельствуют как про нативность и жизнеспособность митохондрий, так и про адекватность биохимических и молекулярных процессов в ткани нормофолликулярного строения, в частности тех, что регулируют состояние проницаемости мембран митохондрий для проапоптотических молекул. В неизменной ткани железы микрофолликулярного строения наблюдали нарушение как базального уровня проницаемости митохондриальной мембраны, что иллюстрируется изменениями скорости набухания митохондрий и существенными индивидуальными вариациями величин трансмембранного потенциала, так и механизмов инициации под влиянием ионов Ca^{2+} открытия митохондриальных пор, а также антиоксидантных реакций с участием мелатонина и α -токоферола. Обсуждается значение выявленных нарушений для реализации митохондриальных механизмов инициации и реализации апоптоза.

Ключевые слова: ткань щитовидной железы нормо- и микрофолликулярного строения, трансмембранный потенциал митохондрий, набухание митохондрий, ионы Ca^{2+} , антиоксиданты, апоптоз.

Peculiarities of permeability of membranes of mitochondria of cells from areas of normal thyroid parenchyma with micro- and normofollicular structure

Т. М. Myshunina, O. V. Kalinichenko

V. P. Komisarenko Institute of Endocrinology and Metabolism of AMS, 04114 Kyiv, Ukraine

The authors have studied the dynamics, velocity, and intensiveness of mitochondria swelling, and determined the value of transmembranous potential of mitochondria isolated from extranodular unchanged thyroid tissue of patients with thyroid nodular pathology. The features of swelling of mitochondria isolated from unchanged thyroid tissue of normofollicular structure, their reaction to being introduced into a medium of Ca^{2+} ion incubation by mitochondria pore opening, and simultaneous decrease in transmembranous potential value, as well as inhibition of this process in case of preliminary incubation with antioxidants (melatonin and alpha-tocopherol), suggested both nativity and viability of mitochondria, and adequacy of biochemical and molecular processes in the tissue of normofollicular structure, in particular, those that regulate the state of mitochondria membrane permeability for proapoptosis molecules. In unchanged thyroid tissue of microfollicular structure abnormalities were observed both in basal level of mitochondria membrane permeability (which is illustrated by changes in mitochondria swelling velocity and significant individual variations of transmembranous potential value) and in mechanisms of initiation – under the influence of Ca^{2+} ions – of mitochondria pore opening, as well as in antioxidant reactions involving melatonin and alpha-tocopherol. The significance of the detected abnormalities for realization of mitochondrial mechanisms of apoptosis initiation and realization, is discussed.

Key words: Thyroid tissue of normo- and microfollicular structure, transmembranous potential of mitochondria, mitochondria swelling, Ca^{2+} ions, antioxidants, apoptosis.

(Надійшла 6.02.2008)

ВИЯВЛЕННЯ ГЕНА RET ТА ОНКОГЕНІВ RET/PTC В ПУХЛИНАХ ЩИТОВИДНОЇ ЗАЛОЗИ ЗА МЕТОДОМ КІЛЬКІСНОЇ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ

Л. Г. Воскобойник

Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В. П. Комісаренка АМН України, м. Київ, 04114, Україна

Перебудови RET/PTC досить часто асоційовані із папілярними карциномами щитовидної залози, як радіоіндукованими, так і спонтанними. Незмінений ген RET (wtRET – wild type RET) також виявляється у значній кількості пухлин ЩЗ. Крім того, деякі автори визначали коекспресію wtRET та онкогенів родини RET/PTC. Наявність перебудов RET/PTC встановлюють за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (PCR) з відповідними праймерами та підтверджують результати наступним Southern blotting. Однак за таких обставин повний скринінг всіх відомих транслокацій гена RET (на сьогодні відомі 16 різних форм перебудов RET/PTC) є надзвичайно складною процедурою, що потребує проведення чисельних PCR із різними праймерами. Існує інший метод непрямого скринінгу онкогенів RET/PTC, за яким експресія тирозинкіназного домена (ТК) гена RET за відсутності його екстраклітинного домена (ЕК) вказує на наявність перебудов RET/PTC. Однак використання зазначеного методу не є доцільним за умов одночасної експресії wtRET. Тому безумовний інтерес викликає кількісна оцінка рівнів експресії різних доменів гена RET та їх співвідношення. В даній роботі проаналізовано 58 післячорнобильських пухлин ЩЗ (35 папілярних карцином і 23 фолікулярних аденоми) та 22 зразки відносно незміненої тканини (НТ) ЩЗ з метою виявлення wtRET, перебудов RET/PTC та кількісної оцінки рівнів експресії ТК і ЕК доменів гена RET. Проведено порівняльний аналіз результатів щодо експресії wtRET, визначеної за допомогою кількісної real-time PCR та Southern blotting. Запропоновано використання кількісної real-time PCR з подальшою оцінкою співвідношення ТК/ЕК для проведення скринінгу перебудов RET/PTC, що надає можливість виявляти наявність RET/PTC-транскриптів навіть на тлі експресії wtRET.

Ключові слова: папілярна карцинома, фолікулярна аденома, ген wtRET, перебудова RET/PTC1, перебудова RET/PTC3, кількісна real-time PCR.

Ген RET кодує трансмембранний рецептор, що належать до родини білків з тирозинкіназною активністю, і містить екстраклітинний домен (ЕК), інтраклітинний тирозинкіназний домен (ТК) та трансмембранний домен [1]. Ген RET людини розміщений на хромосомі 10q.11.2 і включає 21 екзон [2]. Рецептор RET зв'язує ростові фактори клітин гліального походження, що належать до родини нейротропних факторів [2-4]. Взаємодія RET-білка з лігандами призводить до його димеризації та наступним автофосфорилуванням [3]. Інші ростові фактори також здатні активувати рецептор RET, зокрема нервовий ростовий фактор (NGF) [2]. Загалом RET активує внутрішньоклітинний сигнальний каскад, що регулює широкий спектр клітинних функцій: виживання, диференціювання,

*Адреса для листування (Correspondence): Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В. П. Комісаренка АМН України, вул. Вишгородська, 69, м. Київ, 04114, Україна; e-mail: vslora@mail.ru

проліферацію, міграцію клітин, їх хемотаксис, морфогенез та синаптичну пластичність [2].

У щитовидній залозі (ЩЗ) експресія гена RET спостерігається в нейроендокринних С-клітинах та в пухлинах, що походять із зазначених клітин, зокрема, в медулярних карциномах. Фолікулярні тироцити у звичайних умовах не здатні до експресії гена RET, однак присутність незміненого рецептора спостерігається за умов злоякісної трансформації тироїдних клітин, зокрема, в папілярних карциномах (ПК) ЩЗ [1, 5]. За даними літератури, експресія wtRET у ПК є фактором ризику щодо агресивної біологічної поведінки таких пухлин [6]. Однак присутність wtRET виявлено і в доброякісних пухлинах ЩЗ, що суперечить попереднім висновкам [7-8].

В клітинах папілярної карциноми ЩЗ ген RET здатний до транслокацій, що призводять до формування онкогенів родини RET/PTC з активованою тирозинкіназою [1, 2, 5, 6, 9-11]. Зазначені онкогени в ПК ЩЗ були відкриті у дев'яностих роках ХХ сторіччя [12-13]. На сьогодні відомі 11 різних потенційних генів, що можуть включати тирозинкіназну послідовність гена RET, формуючи 16 химерних онкогенів родини RET/PTC, зокрема, RET/PTC1, 1L, 2, 3, Δ3, 4-12, H4/P TEN та інші [14-16]. Відкриття нових типів онкогенів RET/PTC є також можливим. Серед усіх відомих онкогенів родини RET/PTC, найпоширенішими є RET/PTC1 та RET/PTC3 форми [6, 12, 17]. В переважній більшості публікацій наведені дані, що стосуються саме цих альтерацій. Інколи, крім зазначених онкогенів, виявляють також RET/PTC2 та невідомі, так звані, RET/PTCX онкогени [8-9]. На наявність перебудов RET/PTCX вказує експресія тирозинкіназного домена, яка не асоційована із експресією екстраклітинного домена гена RET. Однак наявність незміненого гена wtRET в пухлинних зразках за таких обставин не дозволяє визначити альтерації RET/PTCX.

Вважають, що перебудови RET/PTC відіграють важливу роль в тироїдному канцерогенезі [1, 2]. Дійсно, соматичні хромосомні транслокації гена RET, відомі як перебудови RET/PTC, досить часто асоційовані із ПК, однак їх частка коливається у широкому діапазоні (від 5 до 87 %) в залежності від географічних та вікових характеристик хворих [9-11]. На відміну від спонтанних ПК, що характеризуються високим відсотком точкових мутацій гена BRAF, в післячорнобильських пухлинах переважають перебудови RET/PTC, що, можливо, пов'язано з молодим віком хворих [10, 12]. Лише окремі повідомлення свідчать про здатність гена RET до транслокацій в доброякісних новоутвореннях та фолікулярних карциномах ЩЗ [7-8, 13].

Мета даного дослідження полягала у визначенні wtRET в доброякісних і злоякісних пухлинах щитовидної залози, та оцінки кількісного рівня експресії мРНК доменів ТК і ЕК гена RET в залежності від наявності перебудов RET/PTC.

Матеріали та методи

Зразки тканин. Досліджено 80 екстрактів РНК, що були виділені з післячорнобильських пухлин та відносно незміненої тканини (НТ) щитовидної залози. Гістологічний контроль матеріалу та його адекватність дослідженням проведено на заморожених зрізах, виготовлених із зразків, що підлягали екстракції. Проаналізовано 58 зразків пухлин (35 папілярних карцином, 23 фолікулярні аденоми – ФА) та 22 зразки відповідної відносно незміненої тироїдної тканини. Патогістогічний діагноз встановлений в лабораторії морфології ендокринної системи Інституту ендокринології та обміну речовин ім. В. П. Комісаренка АМН України і додатково верифікований міжнародною групою експертів-патологів [18]. Середній вік пацієнтів на час операції (21±5 років для ПК і 23±7 років для ФА) та середній латентний період (14±1 років для ПК і ФА) були майже рівними в обох досліджених групах. Культура клітин ме-

дулярної карциноми ТТ (CRL-1803, «American Type Culture Collection-ATCC», США) використана для екстракції РНК, яка слугувала позитивним контролем при виявленні експресії різних доменів гена RET (ТК і ЕК).

Реакція зворотної транскрипції (RT), полімеразна ланцюгова реакція (PCR) та блот-гібридизація ДНК за Саузерном (Southern blotting). Екстракцію РНК проводили з реагентом TRIzol («Sigma», США) згідно з рекомендаціями виробника. Концентрацію та чистоту РНК визначали на спектрофотометрі «Nanodrop» при довжині хвилі 260 нм. Якість і цілісність отриманої РНК оцінювали за допомогою біоаналізатора «Aligent» 2100.

Реакцію зворотної транскрипції для отримання кДНК проводили за допомогою зворотної транскриптази («Promega», США) за методом, що описаний раніше [19]. Якість кДНК тестували за допомогою ланцюгової полімеразної реакції з праймерами до гена гліцеральдегід-3-фосфат-дегідрогенази (GAPDH). Отриману кДНК використовували для виявлення перебудов RET/PTC1 і RET/PTC3 та доменів ТК і ЕК гена RET за допомогою методу PCR з наступним Southern blotting. Умови проведення PCR та послідовність праймерів і зондів описані раніше [19]. В якості позитивного контролю до RET/PTC-транскриптів використані РНК папілярних карцином з чітко встановленими відповідними перебудовами. Для виключення можливості контамінації PCR-продуктами проведена додаткова реакція з зовнішньою парою праймерів. Лише випадки, що були позитивними за двома парами праймерів (зовнішніх та внутрішніх) були визнані дійсно позитивними. В якості позитивного контролю для різних доменів (ТК і ЕК) гена RET використана РНК, що була отримана із клітин ТТ. Зразки, що проявляли лише ТК експресію на тлі негативної реакції з праймерами до ЕК вважали позитивними до химерних онкогенів RET/PTCX. Одночасна експресія мРНК доменів ТК і ЕК гена RET свідчила про наявність незміненого wtRET.

Для проведення Southern blotting PCR-продукти розділяли методом електрофорузу на 1,5 % агарозному гелі з наступним їх перенесенням на нейлонову мембрану («Amersham Pharmacia Biotech», Швеція) згідно з рекомендаціями виробника. Кожну мембрану гібридували з відповідними зондами [19] та визначали наявність відповідних транскриптів за допомогою люмінесцентної мітки з використанням комерційних наборів «Gene Images 3'-Oligolabelling» та «CDP-Star Detection System» («Amersham Pharmacia Biotech», Швеція).

Кількісна полімеразна ланцюгова реакція в реальному часі (real-time PCR). Кількісну real-time PCR проводили на отриманих кДНК. Для ампліфікації мРНК гена GAPDH, який використано для нормалізації даних, обраний набір стандартних праймерів та зонда HuGAPDH Probe dye VIC («Applied Biosystems», США). Праймери до ТК і ЕК доменів гена RET синтезовані комерційною компанією «Promega» (США), а зонди – підприємством «Custom Oligo Synthesis Service» («Applied Biosystems», США). Для домена ТК: нуклеотидна послідовність прямого праймера – CGGTGGCCGTGAAGATG, зворотного – TCTGACAGCAGGTCTCGAAGC, зонда (5'-3') – 6FAM-TGAAAGAGAACGCCCTCCCGAGTG, довжина транскрипта – 64 пари основ. Для домена ЕК: нуклеотидна послідовність прямого праймера – TGCTTCTGCGAGCCCG, зворотного – ATCACCGTGCGGCACAG, зонда (5'-3') – 6FAM-CATCCAGGATCCACTGTGCGACGA, довжина транскрипта – 62 пари основ.

Кількісну real-time PCR проводили на отриманих кДНК на приладі «ABI PRISM 7700 Sequence Detection System» (США). Кількість циклів – 40. Умови виконання реакції описані раніше [19]. Кожний зразок кДНК досліджували у триплеті та визначали середній показник. При проведенні кожної real-time PCR обов'язково використовували негативний контроль. Дані аналізували за допомогою комп'ютерної програми «ABI7700». Показник C_t відповідав пороговому циклу, на якому відбувалася детекція флуоресцентного сигналу, і застосовувався для розрахунку рівня експресії мРНК. Для негативного контролю C_t повинен дорівнювати 40. Рівень експресії мРНК доменів ТК і ЕК гена RET (нормалізація даних за геном GAPDH) визначали як $2^{-\Delta Ct}$ ($\Delta Ct = C_{t, \text{дт}} - C_t$

GAPDH, ДТ – досліджуваний транскрипт) [21-22]. Для побудови стандартної кривої, що відображає залежність між величиною C_t та концентрацією РНК гена GAPDH і доменів ТК і ЕК гена RET, використані клітини лінії ТТ [20].

Статистичний аналіз отриманих даних проведений за допомогою комп'ютерної програми Excel за χ^2 -критерієм та парним t-критерієм.

Результати

Southern blotting. За результатами досліджень PCR та Southern blotting експресія wtRET визначена у 82,9 % папілярних карцином (29/35), 69,6 % (16/23) фолікулярних аденом та 68,2 % (15/22) зразків НТ (табл. 1). Статистична різниця між експресією wtRET в ПК та ФА ЩЗ була відсутня ($P = 0,235$ за χ^2 -критерієм).

Перебудови RET/PTC1 та RET/PTC3 виявлено лише в папілярних карциномах ЩЗ в 11,4 % і 20,0 %, відповідно (табл. 1). В одному випадку спостерігалася коекспресія онкогенів RET/PTC1 та RET/PTC3. Відсоток перебудов RET/PTC3 був дещо вищим за RET/PTC1, однак невірогідно ($P = 0,324$ за χ^2 -критерієм). Експресія ТК домена за відсутністю ЕК домена гена RET (перебудови RET/PTCX) спостерігалася як в папілярних карциномах, так і в фолікулярних аденомах без вірогідної різниці даних (2,9 % і 13,0 %, відповідно, $P = 0,134$ за χ^2 -критерієм). Загалом, будь-які перебудови RET/PTC виявлено в 37,1 % ПК (13/35) та 13,0 % ФА (3/23). Слід зауважити, що в усіх папілярних карциномах разом з перебудовами RET/PTC1 чи RET/PTC3 спостерігалася і експресія wtRET.

Таблиця 1. Наявність wtRET і перебудов RET/PTC в доброякісних та злоякісних післячорнобильських пухлинах щитовидної залози

Методи	Групи	wtRET	RET/PTC1	RET/PTC3	RET/PTC1 і RET/ PTC3	RET/PTCX
Southern blotting	ПК (n = 35)	29 (82,9 %)	4 (11,4 %)	7 (20,0 %)	1 (2,9 %)	1 (2,9 %)
	ФА (n = 23)	16 (69,6 %)	0	0	0	3 (13,0 %)
	НТ (n = 22)	15 (62,2 %)	0	0	0	0
Real-time PCR	ПК (n = 35)	30 (85,7 %)	-	-	-	1 (2,9 %)
	ФА (n = 23)	18 (78,3 %)	-	-	-	4 (17,4 %)
	НТ (n = 22)	17 (77,3 %)	0	0	0	0

Кількісна real-time PCR. За результатами кількісної real-time PCR одночасна експресія мРНК ТК і ЕК доменів гена RET визначена в 30 із 35 ПК (85,7 %), у 18 із 23 ФА (78,3 %) та 17 із 22 (77,3 %) зразках НТ (табл. 1). Експресія мРНК домена ТК за відсутності експресії мРНК домена ЕК гена RET (перебудови RET/PTCX) спостерігалася в одній ПК і 4 ФА. Всі випадки ПК з перебудовами RET/PTC1 та RET/PTC3 характеризувалися експресією wtRET, як і при використанні методів PCR із наступним Southern blotting.

Порівняльний аналіз даних Southern blotting та real-time PCR щодо експресії незміненого гена RET в пухлинах показав співпадіння результатів в 94,8 % спостережень (табл. 2). Більш того, в усіх випадках експресія wtRET,

що була визначена за допомогою методу Southern blotting, підтверджена результатами real-time PCR. В 3 пухлинах експресія wtRET виявлялася тільки за допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції, що може свідчити про більшу чутливість зазначеного методу.

Таблиця 2. Порівняльний аналіз результатів Southern blotting та кількісної real-time PCR

Групи	Експресія wtRET за результатами Southern blotting та real-time PCR	Відсутність експресії wtRET за результатами Southern blotting та real-time PCR	Експресія wtRET за результатами виключно Southern blotting	Експресія wtRET за результатами виключно real-time PCR
ПК (n = 35)	29 (82,6 %)	5 (14,3 %)	0	1 (2,9 %)
ФА (n = 23)	16 (69,6%)	5 (21,7 %)	0	2 (5,7 %)
НТ (n = 22)	15 (62,2 %)	5 (22,7 %)	0	2 (9,1 %)
Всього (n = 58)	45 (77,6 %)	10 (17,2 %)	0	3 (5,2 %)

Порівняльний аналіз даних щодо наявності перебудов RET/PTCX встановив, що в 3 випадках із 4 результати Southern blotting та real-time PCR співпали. Різниця спостерігалася лише в одній фолікулярній аденомі, яка була негативною щодо наявності перебудов RET/PTCX за результатами Southern blotting (експресія доменів ТК і ЕК гена RET була відсутня), однак за допомогою real-time PCR відзначена експресія мРНК ТК гена RET, що свідчило за наявність RET/PTCX. Такі результати, знов таки, вказують на те, що метод кількісної real-time PCR є більш чутливим порівняно з Southern blotting.

Однак виникає питання, real-time PCR є об'єктивно більш чутливим методом порівняно із Southern blotting, чи має місце гіперчутливість? Можливо існують деякі обмеження при використанні методу real-time PCR щодо отриманих кількісних даних? Саме тому ми вирішили проаналізувати кількісний рівень експресії мРНК доменів ТК і ЕК на культурі клітин.

РНК, що була отримана із клітин лінії ТТ, була використана для побудови стандартних кривих, що відображають кореляцію між кількістю дослідженої РНК та показником C_t . Стандартні криві були одержані для мРНК гена GAPDH та доменів ТК і ЕК гена RET. В усіх випадках спостерігалася лінійна залежність між показником C_t та концентрацією РНК за $R^2 > 0,89$ (мал. 1). Достатність ампліфікації (визначена як $10^{-1/slop} - 1$) в усіх випадках перевищувала 0,86, що було близько до одиниці. Слід зазначити, що найбільш виражена лінійна кореляція ($R^2 > 0,98$) між показником C_t та кількістю дослідженої РНК для всіх транскриптів спостерігалася при $C_t \leq 35$, що відповідало концентрації дослідженої РНК в межах 10^{-3} - 10^2 нг. В той час, як при більш низькій концентрації РНК показник C_t завжди перевищував 35 і було відмічено порушення такої залежності (мал. 1). Таким чином, показник C_t , вищий за 35, відповідає дуже низькій концентрації мРНК і тому не може бути використаний для об'єктивних кількісних оцінок, а лише вказує на наявність відповідної мРНК в екстракті.

На екстрактах РНК із клітин лінії ТТ було також проаналізовано і співвідношення між рівнем експресії мРНК доменів ТК і ЕК гена RET в залежності від концентрації дослідженої РНК. Встановлено, що чітка лінійна кореляція простежувалася лише при концентрації дослідженої РНК в межах від 10^{-3} до 10^2 нг (мал. 2), тобто при $C_t \leq 35$. Співвідношення ТК/ЕК при цьому було близьким до одиниці ($0,82 \pm 0,14$). Зниження концентрації до 10^{-3} і далі, що відповідало $C_t > 35$, супроводжувалося порушенням балансу між рівнями експресії мРНК доменів ТК і ЕК (мал. 2). Даний факт можна пояснити технічними по-

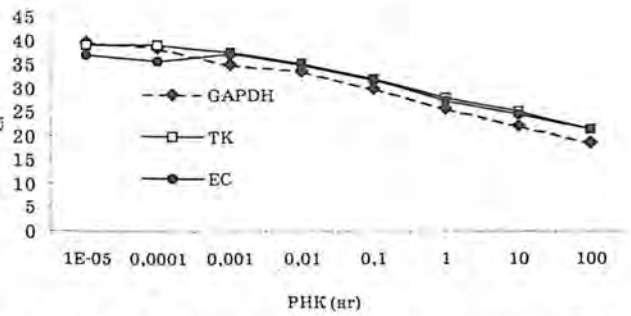
хибками, що обумовлені дуже низькою кількістю ампліфікованої мРНК. Таким чином, проведення кількісної оцінки рівня експресії мРНК доменів ТК і ЕК гена RET та аналіз їх співвідношення є доцільним і об'єктивним тільки за достатньої кількості мРНК, тобто за умов, коли показник C_t не перевищує 35.

Аналіз попередніх даних, які стосуються порівняння результатів Southern blotting та real-time PCR, встановив, що різниця між використаними методами спостерігалася лише у випадках, коли показник C_t (для мРНК доменів ТК та ЕК) був вищим за 35. На підставі отриманих даних було вирішено вважати матеріал адекватним для об'єктивних кількісних підрахунків, зокрема для аналізу співвідношення ТК/ЕК, при $C_t \leq 35$, як для ТК, так і ЕК.

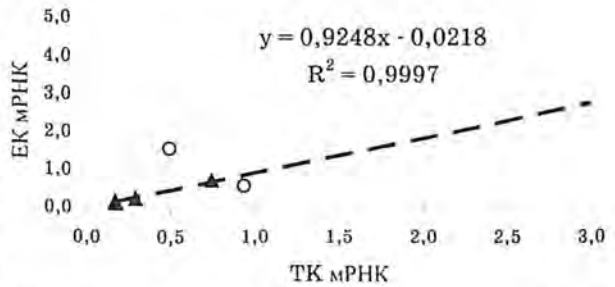
На нашу думку, доцільним було проаналізувати залежність між рівнями експресії мРНК доменів ТК і ЕК гена RET в пухлинах та відносно незмінній тканині щитовидної залози. У зв'язку з усім вищезазначеним, для отримання об'єктивних даних були обрані зразки, в яких для ТК і ЕК величина порогового циклу C_t не перевищувала 35. Досліджено 31 ПК, 21 ФА і 15 зразків НТ ЩЗ. Серед зазначених ПК 11 пухлин характеризувалися наявністю перебудов RET/PTC (RET/PTC1 – 3 випадки, RET/PTC3 – 7 випадків, коекспресія RET/PTC1 та RET/PTC3 – 1 випадок).

Подібно до результатів, що отримані при дослідженні мРНК клітин лінії ТТ, чітка лінійна кореляція ($R^2 = 0,99$) між рівнями експресії доменів ТК і ЕК гена RET спостерігалася в зразках відносно незміненої тканини ЩЗ (мал. 3). На відміну від НТ, деякі папілярні карциноми характеризувалися незбалансованою експресією мРНК домена ТК гена RET і лінійна кореляція між рівнями експресії зазначених доменів не простежувалася ($R^2 = 0,08$).

Аналіз співвідношення ТК/ЕК встановив, що в зразках НТ, як і в клітинах ТТ, зазначений показник наближався до одиниці ($0,96 \pm 0,38$ та $0,82 \pm 0,14$, відповідно) і навіть із урахуванням довірчого інтервалу (при $P < 0,001$) не перевищував двох (мал. 4). У переважній більшості фолікулярних аденом співвідношення ТК/ЕК також було близьким до одиниці



Мал. 1. Стандартна крива ампліфікації мРНК гена GAPDH та доменів ТК і ЕК гена RET за умов розведення дослідженої РНК клітин лінії ТТ. Встановлена чітка лінійна кореляція між показником C_t та концентрацією РНК для всіх досліджених мРНК за $R^2 > 0,89$. За умов концентрації РНК в межах від 10^{-3} до 10^2 нг показник $C_t \leq 35$ і $R^2 > 0,98$.



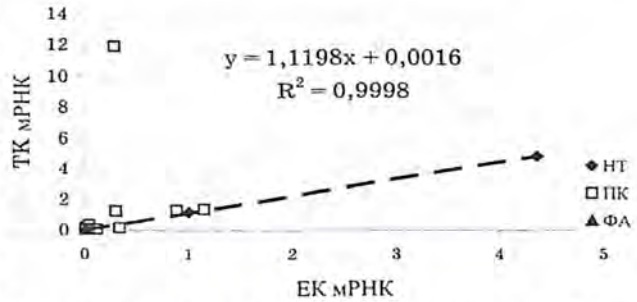
Мал. 2. Кореляція між рівнями експресії мРНК доменів ТК і ЕК гена RET в клітинах лінії ТТ. Рівні експресії мРНК нормалізовані за геном GAPDH і визначені як $2^{-\Delta C_t}$. Трикутники на графіку відповідають зразкам, що мали $C_t \leq 35$. Кільця відповідають зразкам, що мали $C_t > 35$. Пунктиром наведена лінійна регресія між рівнями експресії ТК і ЕК мРНК, що побудована за зразками з $C_t \leq 35$ ($R^2 = 0,99$).

($1,03 \pm 0,73$), однак в одній пухлині становило 2,5. Папілярні карциноми, в яких були виявлені перебудови RET/PTC1 і RET/PTC3, характеризувалися вірогідним збільшенням зазначеного показника (28,9 і 5,43, відповідно; $P < 0,05$ за парним t-критерієм у порівнянні з НТ). В той же час, в папілярних карциномах без перебудов RET/PTC співвідношення ТК/ЕК коливалося в межах від 0,7 до 15,2.

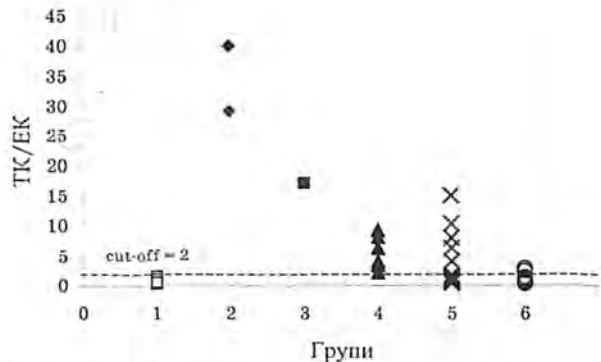
Підсумовуючи отримані дані, ми звернули увагу на наступні факти. По-перше, за умов експресії wtRET (НТ і клітини ТТ) співвідношення ТК/ЕК завжди наближалось до одиниці. По-друге, наявність перебудов RET/PTC1 і RET/PTC3 супроводжувалася вірогідним підвищенням зазначеного показника. По-третє, в 11 ПК спостерігалася одночасна експресія wtRET та онкогенів RET/PTC (RET/PTC1 чи RET/PTC3).

Таким чином, наведені дані свідчать за можливість коекспресії wtRET та онкогенів RET/PTC, а підвищення співвідношення ТК/ЕК обумовлено саме наявністю перебудов RET/PTC. Однак відкритим залишилося питання – яке саме співвідношення ТК/ЕК слід вважати підвищеним? З нашого погляду, доцільним є визначення такого суміжного показника cut-off як суми середнього співвідношення ТК/ЕК для НТ і клітин ТТ ($0,92 \pm 0,33$) та 3 стандартних відхилень, тобто рівним 2. Випадки із співвідношенням ТК/ЕК більшим за 2 слід вважати позитивними щодо перебудов RET/PTC.

Таким чином, ми встановили, що всі папілярні карциноми ЩЗ з наявністю перебудов RET/PTC1 і RET/PTC3 характеризувалися підвищеним співвідношенням ТК/ЕК (від 3,5 до 40,1). Крім того, слід зауважити, що в пухлинах з перебудовами RET/PTC1 рівень експресії мРНК домена ТК був суттєво вищим в порівнянні з ПК, що були позитивними до онкогена RET/PTC3 (ТК/ЕК від 29,0 до 40,1 і від 2,2 до 9,4, відповідно). В 6 ПК спостерігалася експресія невідомих онкогенів RET/PTCХ. В одній з них визначена експресія лише ТК домена на тлі негативної реакції із праймерами до ЕК домена, а в 5 – співвідношення ТК/ЕК перевищувало 2 (коливалось в межах 4,2-15,2).



Мал. 3. Кореляція між рівнями експресії мРНК доменів ТК і ЕК гена RET в ПК, ФА та НТ ЩЗ. Рівні експресії мРНК нормалізовані за геном GAPDH і визначені як $2^{-\Delta Ct}$. Пунктиром наведена лінійна регресія між рівнями експресії ТК і ЕК РНК в НТ з $R^2 = 0,99$.



Мал. 4. Співвідношення ТК/ЕС в ПК, ФА і НТ ЩЗ. Рівні експресії мРНК нормалізовані за геном GAPDH і визначені як $2^{-\Delta Ct}$. 1 – НТ, 2 – ПК із експресією RET/PTC1, 3 – ПК із коекспресією RET/PTC1 і RET/PTC3, 4 – ПК із експресією RET/PTC3, 5 – ПК із відсутніми перебудовами RET/PTC за методом Southern blotting, 6 – ФА. Пунктирна лінія відповідає показнику cut-off. В 5 групі чітко виділяються 5 ПК з великим значенням співвідношенням ТК/ЕК, що вказує на незбалансовану експресію мРНК домена ТК, яка обумовлена наявністю перебудов RET/PTC.

В групі фолікулярних аденом перебудови RET/PTCХ визначені в 4 пухлинах. Серед них в трьох спостереженнях експресія незміненого гена RET була відсутня, а в одному про наявність перебудов RET/PTCХ свідчило підвищення співвідношення ТК/ЕК до 2,5. Звертає на себе увагу той факт, що в папілярних карциномах ЩЗ рівень експресії тирозинкіназного домена гена RET порівняно з екстраклітинним був суттєво вищим, ніж у ФА, однак невелика кількість спостережень не дозволяє зробити остаточний висновок.

Запропонований нами підхід щодо оцінки кількісного рівня експресії мРНК доменів ТК і ЕК гена RET дозволив виявити додаткові (табл. 3) випадки пухлин з перебудовами RET/PTCХ (5 ПК і одну ФА). Слід зауважити, що використання традиційних методів (Southern blotting) не дозволяло визначати наявність онкогенів RET/PTCХ на тлі експресії гена wtRET. Таким чином, запропоноване нами використання кількісної оцінки рівнів експресії мРНК доменів ТК і ЕК гена RET на підставі аналізу їх співвідношення ТК/ЕК є корисним і сприяє проведенню поширеного скринінгу онкогенів RET/PTC в тироїдних пухлинах навіть за наявності wtRET. Оскільки ПК з перебудовами RET/PTC характеризуються більш агресивною біологічною поведінкою та гіршим прогнозом [19], подібні дослідження набувають практичну цінність в клінічній практиці, тому що дозволяють виділити хворих, які потребують більш ретельного спостереження.

Таблиця 3. Порівняльний аналіз результатів виявлення перебудов RET/PTC в доброякісних та злоякісних післячорнобильських пухлинах щитовидної залози за традиційними методами (Southern blotting) та за кількісною оцінкою рівнів експресії мРНК доменів ТК і ЕК гена RET

Групи	Метод Southern blotting		Метод кількісної оцінки рівнів експресії мРНК доменів ТК і ЕК гена RET	
	Кількість випадків	%	Кількість випадків	%
ПК (n = 35)	13	37,1	19	54,3
ФА (n = 23)	3	13,0	4	17,4

Обговорення результатів досліджень

Наші дослідження встановили, що експресія wtRET спостерігалася у значній кількості післячорнобильських доброякісних і злоякісних пухлин щитовидної залози. Деякі автори вважають, що експресія wtRET асоційована із найагресивнішими карциномами ЩЗ, що характеризуються найгіршим прогнозом захворювання [6]. Однак значна кількість ПК з наявністю wtRET (82,6 %), а також його експресія в переважній більшості ФА (69,6 %) і зразках НТ (68,2 %), виключають таку можливість. Іншими дослідниками також було доведено, що експресія wtRET спостерігалася в 50-100 % папілярних карцином ЩЗ [22-24]. Подібну розбіжність можна, на нашу думку, пояснити різною чутливістю використаних методів та віком пацієнтів. Слід зауважити, що в групі дорослих хворих експресія wtRET спостерігалася лише в карциномах, і була відсутня в доброякісних пухлинах та відносно незміненій тканині ЩЗ [24]. В наших дослідженнях, що були проведені на групі підлітків та молодих дорослих, не виявлено вірогідної різниці між експресією wtRET в ПК, ФА та НТ.

Наявність wtRET можна виявити за допомогою Southern blotting чи кількісної real-time PCR. Ми провели порівняльний аналіз результатів зазначених

методів. Встановлено, що в переважній більшості випадків (94,8 %) результати Southern blotting та real-time PCR співпадають. Різниця обумовлена вищою чутливістю методу кількісної реакції порівняно із Southern blotting, що відомо з даних літератури [20].

За результатами Southern blotting наявність перебудов RET/PTC ми визначили в 37,1 % ПК і 13,0 % ФА. За даними літератури, післячорнобильські папілярні карциноми дітей з коротким латентним періодом розвитку після опромінення (4-8 років) характеризуються вищою (до 97 %) часткою онкогенів RET/PTC, однак результати робіт, що проведені на пухлинах з довшим латентним періодом майже співпадають з отриманими даними [25-27]. Поодинокі повідомлення свідчать про можливість виникнення перебудов RET/PTC і за умов доброякісних уражень щитовидної залози [2, 8, 28]. Ми також спостерігали експресію онкогенів родини RET/PTC в невеликій кількості фолікулярних аденом ЩЗ.

Слід зауважити, що дослідження перебудов RET/PTC, як правило, обмежені скринінгом онкогенів RET/PTC1, 2 та 3, однак на сьогодні відомі 16 різних типів транслокацій гена RET [5, 6, 22]. Лише в окремих повідомленнях наведені дані щодо загального виявлення перебудов гена RET (так званих онкогенів RET/PTCX) в пухлинах щитовидної залози [2, 8, 9]. При цьому автори досліджують експресію мРНК доменів ТК і ЕК гена RET, і випадки, що характеризуються виключно експресією домена ТК, вважають позитивними щодо онкогенів RET/PTCX [8, 26, 27]. Однак за умов експресії wtRET в новоутвореннях ЩЗ використання такого методу є неможливим. Слід також зауважити, що згідно з результатами інших авторів, експресія саме wtRET спостерігається у значній кількості пухлин ЩЗ [6, 20, 26]. Ми також відмічали наявність wtRET у переважної більшості досліджених пухлин щитовидної залози. Крім того, в усіх випадках папілярних карцином із перебудовами RET/PTC1 і RET/PTC3 спостерігалася і експресія wtRET. Таким чином, коекспресія wtRET та інших типів онкогенів родини RET/PTC (RET/PTC2, RET/PTC4, RET/PTC та ін.) також можлива. Присутність wtRET супроводжується збалансованою експресією його доменів ТК і ЕК, тобто співвідношення ТК/ЕК повинно бути близьким до одиниці. Так, в наших дослідженнях співвідношення ТК/ЕК в зразках НТ ЩЗ і клітинах ТТ дорівнювало саме одиниці. На відміну від НТ і клітин ТТ, в пухлинах ЩЗ (як доброякісних, так і злоякісних) в окремих випадках спостерігалася помітне збільшення цього співвідношення, що свідчило про незбалансовану експресію домена ТК гена RET. Ми вважаємо, що така незбалансована експресія домена ТК була асоційована саме з наявністю перебудов RET/PTC. Однак відкритим залишається питання, яке саме співвідношення ТК/ЕК відповідає незбалансованій експресії домена ТК? Ми запропонували вважати експресію домена ТК незбалансованою при співвідношенні ТК/ЕК вищим за 2. Доцільність такого підходу доведено експериментально.

Заслуговує також уваги ще один факт, а саме, чітка лінійна кореляція між рівнями експресії доменів ТК і ЕК спостерігалася лише при кількості ампліфікованої мРНК в межах 10^{-3} - 10^2 нг, що відповідало величині $C_t \leq 35$. Тому ми вважаємо, що проведення кількісних підрахунків рівнів експресії транскриптів з подальшою оцінкою величини співвідношення ТК/ЕК для виявлення перебудов RET/PTC є доцільним і об'єктивним лише при $C_t \leq 35$ (для ТК і ЕК).

Висновки

1. Переважна більшість післячорнобильських пухлин щитовидної залози (як злоякісних, так і доброякісних) характеризується експресією wtRET.

2. Експресія онкогенів RET/PTC1 і RET/PTC3 в папілярних карциномах щитовидної залози супроводжується експресією wtRET.

3. За умов експресії звичайного гена wtRET спостерігаються майже однакові рівні експресії мРНК його доменів ТК і ЕК (співвідношення ТК/ЕК наближається до одиниці). Підвищення співвідношення ТК/ЕК більше за 2 свідчить про наявність перебудов RET/PTC.

4. Використання методу кількісної real-time PCR для виявлення перебудов RET/PTC в пухлинах щитовидної залози за оцінкою співвідношення ТК/ЕК можливе лише за умов, що і для ТК, і для ЕК показник C_t не перевищує 35.

Подяка

Автор висловлює подяку керівнику лабораторії морфології ендокринної системи, д.б.н., проф. Т. І. Богдановій за консультативну допомогу; с. н. с. цієї ж лабораторії Л. Ю. Зурнаджи – за діагностику досліджених випадків; міжнародній групі експертів-патологів за проектом банку тканин післячорнобильських тироїдних пухлин – за додаткову верифікацію діагнозів; співробітникам відділів ендокринології та молекулярної біології університету м. Пізи (Італія) – за можливість проведення досліджень (керівники: проф. А. Пінкейра і проф. Р. Елізеї) та міжнародну організацію боротьби з раком (UICC) – за надання наукового гранту для виконання роботи.

Література

1. Jhiang S. M. The RET proto-oncogene in human cancers // *Oncogene*. 2000, **19**, 5590-5597.
2. Arighi E., Borrello M. G., Sariola H. RET tyrosine kinase signaling in development and cancer // *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 2005, **16**, 441-467.
3. Panta G. R., Du L., Nwariaku F. E., Kim L. T. Direct phosphorylation of proliferative and survival pathway proteins by RET // *Surgery*. 2005, **138**, 269-274.
4. Cerchia L., Duconge F., Pestourie C. et al. Neutralizing aptamers from whole-cell selex inhibit the RET receptor tyrosine kinase // *PLoS Biol*. 2005, **3**, N 4, 697-704.
5. Bunone G., Uggeri M., Mondellini P. et al. RET receptor expression in thyroid follicular epithelial cell-derived tumors // *Cancer Res*. 2000, **60**, 2845-2849.
6. Kjellman P., Learoyd D. L., Messina M. et al. Expression of the RET proto-oncogene in papillary thyroid carcinoma and its correlation with clinical outcome // *British J. Surgery*. 2001, **88**, 557-563.
7. Ishizaka Y., Kobayas H. S., Ushijima T. et al. Detection of ret TCP/PTC transcripts in thyroid adenomas and adenomatous goiter by an RT-PCR method // *Oncogene*. 1991, **6**, 1667-1672.
8. Elisei R., Romei C., Vorontsova T. et al. RET/PTC rearrangements in thyroid nodules: studies in irradiated and not irradiated, malignant and benign thyroid lesions in children and adults // *J. Clin. Endocrinol*. 2001, **86**, N 7, 3211-3216.
9. Nikiforov Y. E., Rowland J. M., Monforte-Munos H., Fagin J. A. Distinct pattern of ret oncogene rearrangements in morphological variants of radiation-induced and sporadic thyroid carcinomas in children // *Cancer Res*. 1997, **57**, N 9, 1690-1694.
10. Nikiforov Y. RET/PTC rearrangement in thyroid tumors // *Cancer Res*. 2002, **13**, N 1, 3-16.
11. Brzezianska E., Karbownik M., Migdalska-Sek M. et al. Molecular analysis of the

- RET and NTRK1 gene rearrangements in papillary thyroid carcinomas in the Polish population // *Mutat. Res.* 2006, 599, N 1-2, 26-35.
12. Powell N. G., Jeremiah S. I., Morishita M. et al. Frequency of BRAF T1794A mutation in thyroid papillary carcinoma relates to age of patient at diagnosis and not to radiation exposure // *J. Pathol.* 2005, 205, 558-564.
 13. Sozzi G., Pierotti M. A., Miozzo M. et al. Refined localization to contiguous regions on chromosome 10q of the two genes (H4 and RET) that form the oncogenic sequence PTC // *Oncogene.* 1991, N 6, 339-342.
 14. Musholt T. J., Brehm C., Haback J. et al. Identification of differentially expressed genes in papillary thyroid carcinomas with and without rearrangements of the tyrosine kinase receptors RET and/or NTRK1 // *J. Surg. Res.* 2006, 131, 15-25.
 15. Sadetzki S., Calderon-Margalit R., Modan B. et al. Ret/PTC activation in benign and malignant thyroid tumors arising in a population exposed to low-dose external-beam irradiation in childhood // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2004, 89, 2281-2289.
 16. Celetti A., Cerrato A., Merolla F. et al. H4 (D10S170), a gene frequently rearranged with RET in papillary carcinomas: functional characterization // *Oncogene.* 2004, 23, 109-121.
 17. Jarzab B., Wiench M., Fujarewicz K. et al. Gene expression profile of papillary thyroid cancer: sources of variability and diagnostic implications // *Cancer Res.* 2005, 65, N 4, 1587-1597.
 18. Thomas G. A., Williams E. D., Becker D. V. et al. Thyroid tumor banks // *Science.* 2000, 289, N 9, 2945-2948.
 19. Воскобойник Л. Г. Онкогенна активація генів RET, BRAF та NTRK1 в доброякісних та злоякісних післячорнобильських пухлинах щитовидної залози // *Ендокринологія.* 2007, 12, № 1, 33-47.
 20. Rhoden K. J., Johnson C., Brandao G. et al. Real-time quantitative RT-PCR identifies distinct c-RET, RET/PTC1 and RET/PTC3 expression patterns in papillary thyroid carcinoma // *Lab. Invest.* 2004, 84, 1557-1570.
 21. Livak K. J., Schmittgen Th. D. Analysis of relative expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta Ct}$ method // *Methods.* 2001, 25, 402-408.
 22. Rhoden K. J., Unger K., Salvatore G. et al. RET/PTC rearrangement in non-neoplastic thyrocytes: follicular cells of Hashimoto's thyroiditis share low level recombination events with a subset of papillary carcinoma // *J. Clin. Endocrin. Metab.* 2006, 91, N 6, 2414-2423.
 23. Mai K. T., Vaccani J., Thomas J., Odell P. F. Immunostaining for RET oncogene proteins in papillary thyroid carcinoma: a correlation of RET immunoreactivity and potential of lymph node metastasis // *Thyroid.* 2001, 11, N 9, 859-863.
 24. Lee S., Hong S. W., Moon W. C. et al. High prevalence of c-RET expression in papillary thyroid carcinomas from the Korean population // *Thyroid.* 2005, 15, N 3, 259-266.
 25. Nikiforov Y. E., Rowland J. M., Bove K. E. et al. Distinct pattern of ret oncogene rearrangements in morphological variants of radiation-induced and sporadic thyroid papillary carcinomas in children // *Cancer Res.* 1997, 57, 1680-1684.
 26. Santoro M., Thomas G.A., Vecchio G. et al. Gene rearrangements and Chernobyl related thyroid cancers // *British J. Cancer.* 2000, 82, N 2, 315-322.
 27. Lima J., Trovisco V., Soares P. et al. BRAF mutations are not a major event in post-Chernobyl childhood thyroid carcinomas // *J. Clin. Endocrinol.* 2004, 89, N 9, 4267-4271.
 28. Domingues R., Mendoca E., Sobrinho L., Bugalho M. J. Searching for RET/PTC rearrangements and BRAF V599E mutation in thyroid aspirates might contribute to establish a preoperative diagnosis of papillary thyroid carcinoma // *Cytopathol.* 2004, N 16, 27-31.

Выявление гена RET и онкогенов RET/PTC в опухолях щитовидной железы методом количественной полимеразной цепной реакции

Л. Г. Воскобойник

Институт эндокринологии и обмена веществ им. В. П. Комиссаренко АМН Украины, г. Киев, 04114, Украина

Перестройки RET/PTC часто ассоциированы с папиллярными карциномами (ПК) щитовидной железы (ЩЖ), как радиоиндуцированными, так и спонтанными. Неизменный ген RET (wtRET – wild type RET) также выявляется в значительном количестве опухолей ЩЖ. Кроме того, некоторые авторы наблюдали коэкспрессию wtRET и онкогенов семейства RET/PTC. Наличие перестроек RET/PTC устанавливают с помощью полимеразной цепной реакции (PCR) при использовании соответствующих праймеров и подтверждают результаты последующим Southern blotting. Однако следует учитывать, что при таких условиях полный скрининг всех известных транслокаций гена RET (в настоящее время известны 16 разных форм перестроек RET/PTC) является чрезвычайно сложной процедурой, требующей проведения большого количества PCR с использованием разных праймеров. Существует и метод непрямого скрининга онкогенов RET/PTC, в соответствии с которым, экспрессия тирозинкиназного домена (ТК) гена RET при отсутствии экспрессии его экстраклеточного домена (ЕК) свидетельствует о наличии перестроек RET/PTC. Однако применение вышеупомянутого метода не является целесообразным при одновременной экспрессии wtRET. Поэтому, безусловный интерес вызывает количественная оценка уровня экспрессии разных доменов гена RET, а также их соотношение. В данной работе проанализированы 58 послечернобыльских опухолей ЩЖ (35 папиллярных карцином и 23 фолликулярных аденом) и 22 образца относительно неизменной ткани (НТ) ЩЖ с целью выявления wtRET, перестроек RET/PTC и количественной оценки уровней экспрессии ТК и ЕК доменов гена RET. Проведен сравнительный анализ данных об экспрессии wtRET, выявленной с помощью Southern blotting и количественной real-time PCR. Предложено использовать количественную real-time PCR с последующей оценкой соотношения ТК/ЕК для проведения скрининга перестроек RET/PTC, что предоставляет возможность выявлять наличие RET/PTC-транскриптов на фоне экспрессии wtRET.

Ключевые слова: папиллярная карцинома, фолликулярная аденома, ген wtRET, перестройка RET/PTC1, перестройка RET/PTC3, количественная real-time PCR.

Detection of RET wild type and RET/PTC rearrangements in thyroid tumors by real-time quantitative PCR method

L. G. Voskoboynyk

V. P. Komisarenko Institute of Endocrinology and Metabolism of AMS, Kyiv, 04114, Ukraine

RET/PTC rearrangements could be very often associated with papillary thyroid carcinomas, both radio-induced and sporadic ones. Non-rearranged wtRET has also been detected in a great part of thyroid tumors. Coexpression of RET wild type (wtRET – wild type RET) and RET/PTC fused gene has also been shown by some authors. Usually, a method of polymerase chain reaction (PCR) with the following Southern Blotting has been used for detection of RET/PTC abnormalities, but in such situations full screening of all known rearrangements (till now 16 different forms of RET/PTC rearrangements were described) is very complicated because a lot of PCR with different pairs of primers are required. Indirect method based on the detection of TK domain of RET gene without EC domain expression could be used, but not in cases showing also wtRET presence. With this purpose, quantitative analysis of the expression levels of different domains of RET gene should be useful, but it has never been carried out. In the present study we analyzed 58 post-Chernobyl tumors (35 papillary carcinomas and 23 follicular adenomas) and 22 samples of normal tissues. For detection of wtRET, RET/PTC rearrangements and quantitative evaluation of expression levels of TK, and EC domains of RET gene. A comparative analysis of the results for wtRET expression detected by Southern Blotting and quantitative real-time PCR was carried out. We propose a new method for detection of RET/PTC rearrangements based on a quantitative expression analysis of mRNA of TK and EC domains of RET gene using real-time RT-PCR followed by evaluation of TK/EC values, that could be useful for detecting RET/PTC-transcripts, particularly for study samples showing wtRET expression.

Key words: papillary thyroid carcinoma, follicular thyroid adenoma, wtRET gene, RET/PTC1 rearrangement, RET/PTC3 rearrangement, real-time quantitative PCR.

(Надійшла 13.11.2007)

ЕКСТРАКЦІЯ ТА ЗБЕРІГАННЯ НУКЛЕЇНОВИХ КИСЛОТ З УМОВНО НОРМАЛЬНОЇ ТА ПУХЛИННОЇ ТКАНИН ЩИТОПОДІБНОЇ ЗАЛОЗИ: ПОРІВНЯННЯ СУЧАСНИХ МЕТОДІВ

В. М. Пушкарьов, О. І. Ковзун, Л. Г. Воскобойник, Н. М. Костюченко, Л. Ю. Зурнаджи, Т. І. Богданова, Г. П. Кашеваров, В. А. Негрецький, О. С. Лукашеня*

Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В. П. Комісаренка АМН України, м. Київ, 04114, Україна

Аналізували два сучасних методи екстракції нуклеїнових кислот з умовно нормальної та пухлинної тканин щитоподібної залози. Висвітлено переваги та недоліки кожного з цих методів. Показано, що кількість РНК в пухлинах щитоподібної залози значно переважає її кількість в умовно нормальній тканині, що свідчить про більшу інтенсивність синтетичних процесів та меншу кількість колоїду в пухлинних клітинах. Кількість РНК в метастазах також з високою вірогідністю переважає кількість РНК в умовно нормальній тканині щитоподібної залози. Продемонстровано переваги зберігання нуклеїнових кислот у складі заморожених фрагментів залози порівняно із замороженим розчином РНК та ДНК.

Ключові слова: пухлини щитоподібної залози, РНК, ДНК, методи екстракції.

Патологічно незмінена (умовно нормальна) тканина щитоподібної залози (ЩЗ) є незручним об'єктом для екстракції нуклеїнових кислот (НК) порівняно з іншими ендокринними залозами. Наявність в ЩЗ великої кількості колоїду заважає гомогенізації тканини та зменшує вихід НК. В тканині ж пухлин ЩЗ, наприклад, папілярної карциноми, суттєва кількість колоїду визначається лише при, так званому, фолікулярному варіанті папілярної карциноми, тоді як при типовому папілярному чи солідному варіантах колоїд в тканині майже відсутній, що суттєво відбивається на виході НК. Сучасні методи виділення НК є простими та зручними і забезпечують досить високу якість матеріалу. Вони відрізняються між собою вартістю реагентів та обладнання, кількісним виходом НК, їх чистотою та цілісністю. Для серійних екстракцій НК з тканини ЩЗ застосовуються головним чином два методи. Перший, з використанням TRIzol'у, базується на класичній методиці із застосуванням фенолу та сильних детергентів. Другий метод, більш затратний, використовує ферменти та сильні детергенти з наступним перенесенням НК на мікроколони і послідовним промиванням їх спеціальними буферними розчинами. Його перевагою є відсутність фенолу в методиці, пари якого є токсичними.

Важливим завданням при тривалій (роки) роботі з НК є необхідність їх збереження в цілісному, непошкодженому стані. Особливої гостроти ця проблема набуває при роботі з препаратами РНК, які повинні зберігатися при якомога нижчих температурах, бажано не вище -70 °С. При створенні

*Адреса для листування (Correspondence): Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка АМН України, вул. Вишгородська, 69, м. Київ, 04114, Україна; e-mail: endo@i.kiev.ua

української частини банку тканин післячорнобильських пухлин щитоподібної залози та виділених з них нуклеїнових кислот [1, www.Chernobyltissuebank.com], необхідно було здійснити правильний вибір між двома способами збереження матеріалу для досліджень молекулярно-біологічними методами: а) у вигляді заморожених водних розчинів екстрагованих НК та б) збереженням відповідних зразків тканин у стані глибокої заморозки, екстракція НК з яких проводилась би за потребою. Іншим практичним питанням було дослідження впливу кількості заморожень-відтавань препаратів РНК на її цілісність.

Важливо було також визначити співвідношення РНК/ДНК у нормальній та пухлинній тканинах, яке може бути однією з характерних ознак пухлини.

Матеріали та методи

Метод 1. НК виділяють за методикою, що надається фірмою-виробником TRIzol^у. Тканину гомогенізують в TRIzol^і, гомогенат струшують з хлороформом, центрифугують, відбирають верхню водну фазу з РНК і осаджують її ізопропанолом. Осад збирають центрифугуванням, промивають 75 % етанолом, підсушують і розчиняють у воді з прогріванням препарату РНК при 60 °С. Для екстракції ДНК нижню фазу разом з інтерфазою розбавляють буфером для екстракції ДНК (4 М гуанідинтіоціанат, 50 мМ цитрат натрію, 1 М трис), центрифугують, відбирають верхню фазу і ДНК осаджують ізопропанолом. Після центрифугування осад промивають 75 % етанолом, підсушують і розчиняють в буфері, що містить 10 мМ трис, 5 мМ ЕДТА рН 8,0, прогриваючи препарат при 50 °С [1-3].

Метод 2. Метод фірми «Quiagen» є більш сучасним, але й одночасно більш дорогим, порівняно з першим методом екстракції. Протоколом методики супроводжуються набори фірми-виробника. Суть методу полягає в гомогенізації тканини, її розчиненні в лізис-буфері, обробці матеріалу ферментами, адсорбції НК на спеціальних колонках, промиванні НК, адсорбованих на колонці і розчиненні очищених НК у воді (РНК), або в спеціальному буфері (АЕ-буфер).

Тканину гомогенізують в 500 мкл лізис-буферу RLT, що містить сильні детергенти та хаотропні речовини в спеціальному гомогенізаторі – млині фірми Retsch MM200. Для цього шматочок тканини вагою біля 25 мг кладуть в 2 мл пробірку з округлим дном та металевою кулькою з сталі, що не ржавіє. Пробірки розміщують в штативі і тканину гомогенізують протягом 2 хв. Розтирання тканини відбувається за допомогою металевої кульки, яка з великою швидкістю рухається по пробірці з тканиною внаслідок різких рухів штатива. Вміст пробірок центрифугують протягом 15 с і ділять на 320 мкл для виділення РНК та 180 мкл – для ДНК. В останньому випадку до пробірок додають буфер RLT (30 мкл) та протеїназу К (20 мкл) і витримують протягом ночі при 56 °С. Вранці в пробірки додають буфер AL (200 мкл), який містить гуанідин гідрохлорид, добре змішують і інкубують 10 хв при 70 °С. До вмісту пробірок додають 200 мкл 100 % етанолу, перемішують і суміш переносять на колонки, що містять QIAmp-мембрану з силікагелю. рН суміші забезпечує максимальне зв'язування ДНК з силікагелем. Мембрану з ДНК промивають центрифугуванням послідовно буферами AW1 (містить гуанідин гідрохлорид), AW2, переносять в кінчну пробірку фірми «Епендорф» на 1,5 мл і розчиняють в 100 мкл буферу АЕ (10 мМ трис-НСl, 0,5 мМ ЕДТА, рН 9,0) і зберігають при -20 °С.

Для виділення РНК до відібраних 320 мкл гомогенату додають ще по 150 мкл буферу RLT, розводять з 590 мкл води без РНКаз та додають 10 мкл готового розчину протеїнази К з набору. Суміш перемішують, інкубують при 55 °С 10 хв і центрифугують в настільній центрифугі фірми «Епендорф» в стандартному кутовому роторі при 13000 об/хв протягом 3 хв. Супернатант (приблизно 1 мл) відбирають піпеткою і додають половину об'єму (до 0,5 мл) 96-100 % етанолу. Суміш перемішують і вміст пробірок переносять на спеціальну колонку. Після центрифугування РНК залишається на фільтрі. Фільтр промивають буфером RW1 (350 мкл), наносять ДНКазу в бу-

фері RDD, інкубують при кімнатній температурі 15 хв і знову промивають буфером RW1. Після центрифугування протягом 15 с при максимальній швидкості ротора і заміни пробірок для збирання центрифугату, фільтр двічі промивають буфером RPE, просушують центрифугуванням, переносять в кінчну пробірку фірми «Епендорф» на 1,5 мл і розчиняють очищену РНК у 50 мкл води без РНКа. Зберігають при -86 °С.

Контроль якості одержаних НК здійснювали за допомогою спектрофотометра Nanodrop, капілярного електрофорезу на наночіпах біоаналізатора Agilent-2100 та електрофорезу в 1 % агарозному гелі з додаванням в розчин НК флуоресцентного барвника SYBRgreen або етидій броміду.

Результати та їх обговорення

Вибір методу екстракції значною мірою обумовлює успіх подальших досліджень, що базуються на використанні одержаних НК. З табл.1 видно, що метод із застосуванням TRIzol'у (метод 1) забезпечує кращий вихід РНК порівняно з методом фірми «Quiagen». Середня концентрація РНК в стандартному об'ємі 50 мкл, одержаної з умовно нормальної тканини, становить 756,97

Таблиця 1. Залежність кількісного виходу та якості НК від типу тканини ЦЗ

Показник	Тип тканини	Концентрація НК, нг/мкл	Вихід НК, нг/мкг	A260/A280	A260/A230	n	
Метод 1	РНК	Ум. норм.	756,97	1,38	1,71	нв	60
		Пухлина	1067,75	2,37	1,74	нв	60
		Р	0,005	$2,3 \times 10^{-10}$			
		Метастази	858,16	2,92	1,75	нв	14
		Р	-	$1,5 \times 10^{-10}$			
	ДНК	Ум. норм.	859,11	6,92 (0,199)	1,53	нв	60
		Пухлина	569,70	3,05 (0,777)	1,61	нв	60
		Р	0,03	$9,9 \times 10^{-4}$	0,05		
		Метастази	425,29	3,55 (0,823)	1,68	нв	14
		Р	0,04	0,09	0,05		
Метод 2	РНК	Ум. норм.	199,43	нв	2,00	1,86	60
		Пухлина	434,37	нв	2,02	2,01	60
		Р	0,0003		-	0,04	
	ДНК	Ум. норм.	244,97	нв	2,08	1,81	60
		Пухлина	837,37	нв	2,09	1,88	60
		Р	$6,5 \times 10^{-9}$		-	-	

Примітка: Р – вірогідність відмінності даного значення від такого ж в умовно нормальної тканині; нв – не визначалося. В дужках після величини виходу ДНК – індекс РНК/ДНК.

нг/мл проти 199,43 нг/мл при екстракції методом 2. У пухлинах – відповідно 1067,75 нг/мл проти 434,37 нг/мл. Проте якість очистки РНК та ДНК помітно нижча – співвідношення A260/A280 нм, яке характеризує вміст домішок білка в препаратах РНК, виділених методом 1, становить 1,71-1,75 проти 2,0-2,02 для другого методу. Різниця у якості очистки ДНК є ще більш значною:

співвідношення A260/A280 нм становить відповідно 1,53-1,61 проти 2,08-2,09. До того ж, за деякими даними, в препаратах РНК, одержаних методом з використанням TRIzol'у, втрачається значна частина низькомолекулярних ядерних РНК, які останнім часом інтенсивно досліджуються і роль яких у сигнальних регуляторних процесах важко переоцінити [4]. Крім того, для подрібнення тканини при застосуванні методу 1 використовувався гомогенізатор ІКА Т18, що зумовлює необхідність ретельної очистки частин гомогенізатора, які контактують з біологічним матеріалом, та інактивації можливих залишків матеріалу жорстким ультрафіолетовим випромінюванням (UVC), щоб запобігти перехресному забрудненню препаратів.

Отже, метод з використанням колонок (метод 2) дає можливість одержати препарати РНК та ДНК з більш високим ступенем очистки, але кількісний вихід РНК є нижчим у порівнянні з методом 1, де використовується TRIzol. Враховуючи, що вартість останнього методу є значно нижчою у порівнянні з методом фірми «Quiagen», цей метод доцільно рекомендувати для рутинного одержання рРНК та основної маси цитоплазматичної мРНК. Для тонких досліджень мРНК, малих ядерних РНК з подальшим використанням сучасних дороговартісних методів, таких як ДНК-матричні методи, необхідно екстрагувати РНК за методом фірми «Quiagen», при цьому збільшуючи кількість тканини для отримання достатньої кількості РНК. Для екстракції ДНК можна однозначно рекомендувати метод 2, оскільки ДНК, одержана методом з використанням TRIzol'у, характеризується низькою якістю і потребує додаткової очистки, особливо при її наступному дослідженні із застосуванням методів полімеразної ланцюгової реакції (кількісної, в першу чергу) та інших методів, де використовуються чутливі ферменти.

З табл. 1 також видно, що кількість РНК, одержаної з пухлинної тканини та метастазів методом з використанням TRIzol'у, є значно вищою від такої з умовно нормальної тканини ШЗ. Цей показник стосується як концентрації РНК в водному розчині (об'єм 50 мкл), так і більш надійного показника – кількісного виходу РНК на одиницю ваги тканини. За останнім показником кількість РНК в пухлині складає 173 % порівняно з нормою, а в метастазах – 212 %. Різниця у концентрації РНК між умовно нормальною та пухлинними тканинами стає особливо очевидною при використанні сучаснішого методу фірми «Quiagen» (табл. 1). Цікаво, що індекс A260/A230 нм, який свідчить про ступінь очистки НК від вуглеводнів, також є вищим в пухлинній тканині порівняно з нормою.

Такі відмінності між нормальною та пухлинними тканинами можна пояснити більш інтенсивними синтетичними процесами, що відбуваються в пухлинах, і які пов'язані з синтезом як мРНК, так і, особливо, рРНК, а також вищою «клітинністю» пухлини у порівнянні з нормальною тканиною, насиченою колоїдом. В той же час, кількість ДНК вірогідно вища у нормальній тканині. За даними літератури, загальний вміст ДНК в ядрах пухлинних та нормальних тироцитів не відрізняється, а одним з факторів, що може обумовлювати зміни вмісту ДНК є порушення плідності хромосом [5]. Однак тироїдним клітинам (як трансформованим, так і звичайним) такі зміни не властиві. Можливо, факт зниження вмісту ДНК в пухлинних зразках пояснюється більшими розмірами клітин в пухлинній тканині та генетичною нестабільністю трансформованих тироцитів, зокрема, утворенням чисельних точок розриву в ДНК [6, 7]. Індекс РНК/ДНК в нормальній тканині ШЗ становить біля 0,2, в той час як в пухлинній він вищий майже в 4 рази (0,78), а в метастазах – більш ніж в 4 рази (0,82).

У подальшому аналізували вибірку (n = 39) із загальної кількості зразків тканин (n = 60), яка включала тільки умовно нормальну та пухлинну тканину папілярної карциноми (РТС). Виявилось, що вказане вище співвідношення РНК в умовно нормальній і пухлинній тканині, та співвідношення РНК/ДНК є влас-

тивим саме РТС (табл. 2). У тканинах 21 фолікулярної аденоми кількість (вихід) РНК у нормальній та пухлинній тканині не відрізнялась (не показано). Отже, індекс РНК/ДНК (~ 0,2) може слугувати додатковою ознакою, яка характеризує папілярну карциному ЩЗ, а можливо, може мати і певне діагностичне значення.

Таблиця 2. Порівняння кількісного виходу та якості НК в умовно нормальній тканині та тканині папілярної карциноми ЩЗ

НК	Тип тканини	Концентрація, мкг/мл	A260/A280	Вихід НК, мкг/мг	РНК/ДНК
РНК	Ум. норм.	835,78	1,71	1,34	
	РТС	1101,10	1,74	2,37	
	P	0,05	-	7×10^{-9}	
ДНК	Ум. норм.	953,40	1,53	6,51	0,206
	РТС	594,43	1,63	3,14	0,755
	P	0,026	0,06	0,008	

Примітка: P – вірогідність відмінності даного значення від такого ж в умовно нормальній тканині (n = 39).

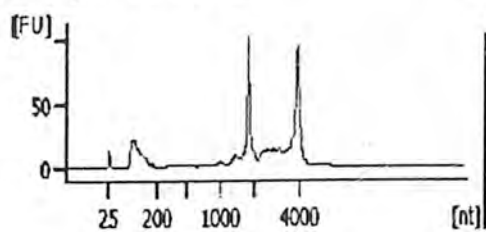
Проблема зберігання НК стає актуальною при необхідності порівняльних досліджень, що тривають багато років, або навіть десятиліть. Особливо жорсткі умови зберігання необхідні для збереження нативності РНК. Вважається, що мінімальною температурою для зберігання РНК є -70 °С, хоча бажані і нижчі температури – до -86 °С. При відсутності заморожувань-відтавань, РНК може повністю зберегти свою нативну структуру і цілісність протягом багатьох років. Для зберігання ДНК достатньо температури -20 °С.

Ми порівнювали РНК, щойно одержану із замороженої тканини, із РНК, яка тривалий час зберігалась при температурі -70-80 °С у водному розчині. Для порівняння брали зразки тканини з однаковим гістологічним номером і, відповідно, номером у банку тканин. N1, T1 – означають препарати РНК, що зберігалися замороженими у водному розчині протягом кількох (до 9) років; N2, T2 – щойно одержані препарати РНК з тканин, які зберігались протягом такого ж часу. Щоб виключити чинник заморожування-відтавання, свіжо виділену РНК (зразки N2, T2) також заморожували з наступним відтаванням. З мал. 1 видно, що якість РНК, одержаної із замороженої тканини, є значно вищою від РНК, яка зберігалась у розчині. Показник RIN (індекс інтегрованості РНК) практично у всіх досліджених зразках був вищим у РНК із замороженої тканини ЩЗ. Деякі зразки РНК, що зберігались у розчині, були повністю деградовані (мал. 1, зразки 103 N1, 103T1). Отже, зберігання НК у складі заморожених фрагментів ЩЗ з екстракцією їх безпосередньо перед дослідом є більш надійним порівняно зі зберіганням очищених НК в розчині.

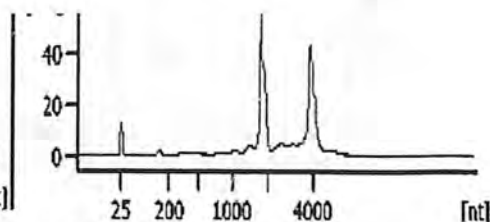
Аналіз НК часто потребує кількаразового розморожування одного й того ж зразка. Щоб оцінити значення заморожування-відтавання для цілісності РНК, порівнювали РНК, яка була розморожена один раз, з РНК, яка пройшла два цикли розморожування-відтавання. З мал. 2.1 видно, що для зразка UA103T2 показник RIN є однаковим, хоча кількість низькомолекулярної 5S РНК при повторному розморожуванні дещо зростає. Надалі була використана РНК позитивного контролю з клітин колоректального раку людини для оцінки 4 циклів розморожування-відтавання. Видно, що однократне розморожування практично не впливає на індекс інтегрованості РНК, порівняно з свіжовиділеною РНК, що не заморожувалась. Проте подальші цикли розморожування-відтавання істотно зменшують RIN з 10 до 9,3 (мал. 2.2).

Зразки РНК, які зберігали в розчині при $-70-80^{\circ}\text{C}$

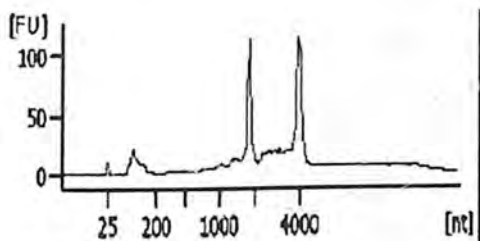
Зразки РНК, які екстрагували із замороженої ($-70-80^{\circ}\text{C}$) тканини



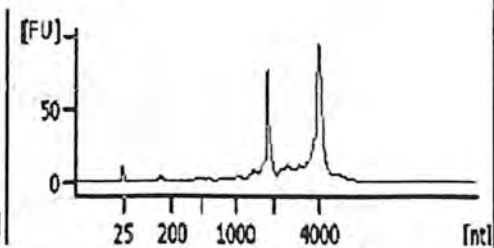
UA135T1
RIN 8,40



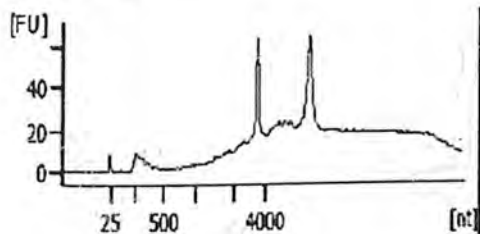
UA135T2
RIN 9,30



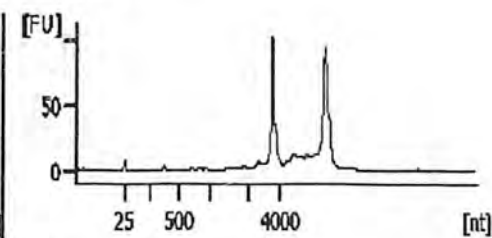
UA103N1
RIN N/A



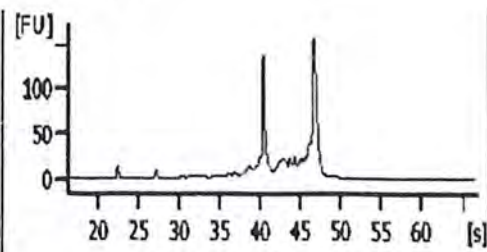
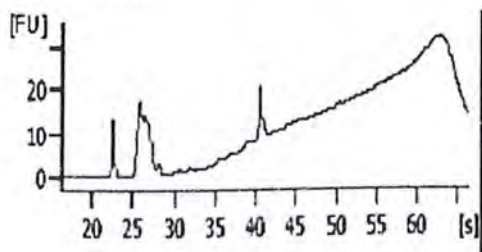
UA103N2
RIN: 9



UA103T1
RIN N/A



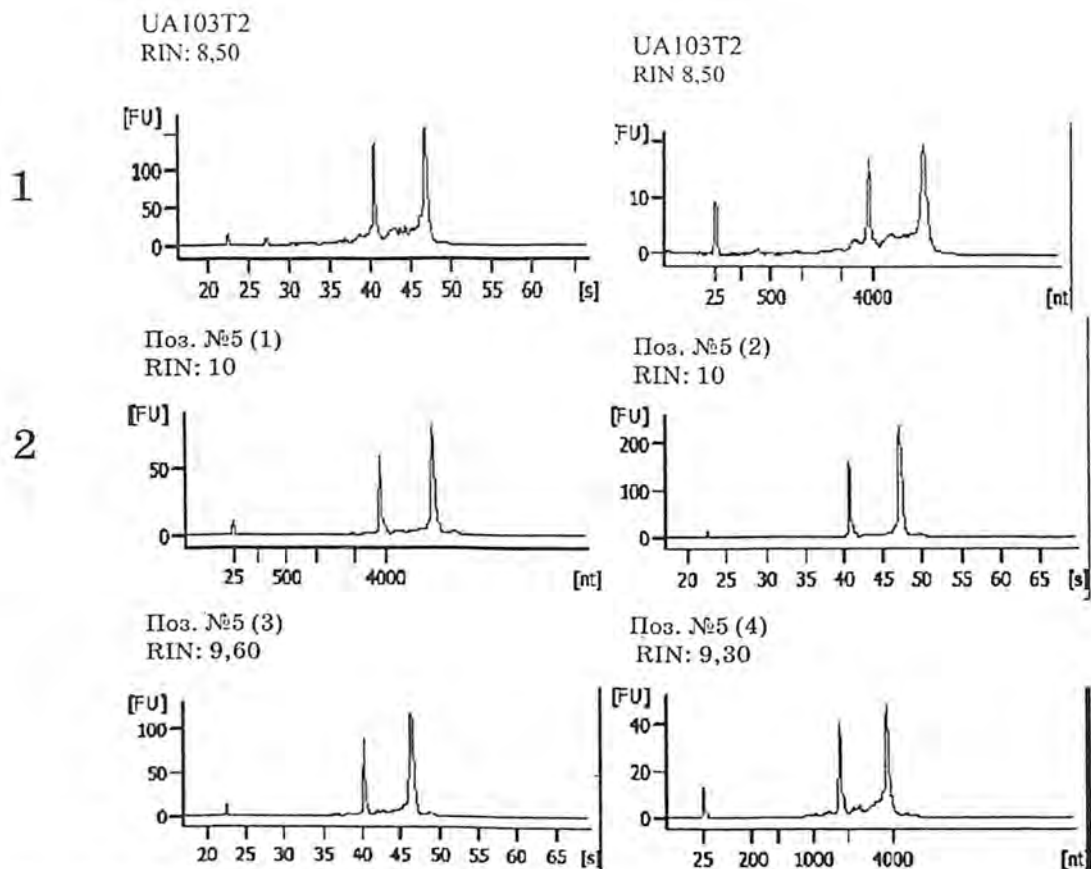
UA103T2
RIN 8,50



Мал. 1. Порівняння нативності РНК, що зберігалась у вигляді замороженого водного розчину (N1, T1) з свіжовиділеною РНК зі зразків замороженої тканини ЩЗ, що зберігалась протягом такого ж часу (N2, T2).

N – умовно нормальна тканина, T – пухлинна тканина ЩЗ. RIN – показник інтегрованості РНК. РНК з RIN < 7 для подальших дослідів непридатна. N/A – RIN не визначався внаслідок деградації РНК.

Ордината – оптична густина; абсциса – час проходження РНК різного розміру через капіляр. Представлена вибірка з 8 дослідів зі 120.



Мал. 2. Вплив заморожування-відтавання водних розчинів РНК на її нативність. 1 – однократне розморожування РНК з пухлини ЩЗ; 2 – 1-4-кратне заморожування-відтавання РНК з пухлини колоректального раку людини. Позначення ті ж, що й на мал. 1.

Висновки

1. Застосування методу 2, хоча і пов'язане з більшими витратами, дає можливість одержати більш якісні НК у порівнянні з методом 1, що дозволяє рекомендувати його використання для одержання повного спектру цитоплазматичних та ядерних РНК. Метод 1 можна рекомендувати для рутинної екстракції рРНК та цитоплазматичної мРНК.

2. НК краще зберігаються у складі заморожених зразків відповідної тканини.

3. При необхідності багаторазового використання однієї і тієї ж проби РНК, з метою запобігання деградації препарату не бажано заморожувати-відтавати її розчин більше 4 разів.

4. Кількість РНК в тканині первинної пухлини та, особливо, в метастазах значно переважає її кількість в умовно нормальній тканині. Кількість ДНК – більша в нормальній тканині ЩЗ у порівнянні з пухлинною.

5. Індекс РНК/ДНК помітно відрізняється в умовно нормальній та пухлинній тканині папілярної карциноми і може бути додатковою біохімічною характеристикою папілярної карциноми.

Література

1. Thomas G.A., Williams E.D., Becker D.V. et al. Thyroid tumor banks // Science. 2000, 289, 29: September, science's compass.

2. Santoro M., Thomas G. A., Vecchio G. et al. Gene rearrangement and Chernobyl related thyroid cancer // *British J. Cancer*. 2000, **82**, N 2, 315-322.
3. Lima J., Trovisco V., Soares P. et al. BRAF mutations are not a major event in post-Chernobyl childhood thyroid carcinomas // *J. Clin. Endocrinol.* 2004, **89**, N 9, 4267-4271.
4. Kumagai A., Namba H., Saenko V. A. et al. Low frequency of BRAF^{FY1796A} mutations in childhood thyroid carcinomas // *J. Clin. Endocrinol. Metabolism*. 2004, **89**, N 9, 4280-4284.
5. Stephens L. A., Powell N. G., Grubb J. et al. Investigation of loss of heterozygosity and SNP frequencies in the RET gene in papillary thyroid carcinoma // *Thyroid*. 2005, **15**, N 2, 100-104.
6. Збарский И. Б. Организация клеточного ядра. М.: Медицина, 1988. 368 с.
7. Nikiforov Y. E., Koshoffer A., Nikiforova M. et al. Chromosomal breakpoints suggest a direct role for radiation in inducing illegitimate recombination between the ELE1 and RET genes in radiation-induced thyroid carcinomas // *Oncogene*. 1999, **18**, 6330-6334.

Экстракция и хранение нуклеиновых кислот из условно нормальной и опухолевой ткани щитовидной железы: Сравнение современных методов

В. М. Пушкарев, Е. И. Ковзун, Л. Г. Воскобойник, Н. Н. Костюченко, Л. Ю. Зурнаджи, Т. И. Богданова, Г. П. Кашеваров, В. А. Негрецкий, О. С. Лукашеня
Институт эндокринологии и обмена веществ им. В. П. Комиссаренко АМН Украины, г. Киев, 04114, Украина

Анализировали два современных метода экстракции нуклеиновых кислот из условно нормальной и опухолевой ткани щитовидной железы. Освещены преимущества и недостатки каждого из этих методов. Показано, что содержание РНК в опухолях щитовидной железы значительно превосходит её количество в условно нормальной ткани, что свидетельствует о большей интенсивности синтетических процессов и меньшее количество коллоида в опухолевых клетках. Количество РНК в метастазах также с высокой степенью вероятности превосходит количество РНК в условно нормальной ткани щитовидной железы. Продемонстрированы преимущества хранения нуклеиновых кислот в составе замороженных фрагментов железы по сравнению с замороженным раствором РНК и ДНК.

Ключевые слова: опухоли щитовидной железы, РНК, ДНК, методы экстракции.

Extraction and storage of nucleic acids from conventionally normal and tumour tissue of thyroid: Comparison of modern methods

V. M. Pushkarev, O. I. Kovzun, L. G. Voskoboynyk, N. M. Kostyuchenko, L. Yu. Zurnadzy, T. I. Bogdanova, G. P. Kashevarov, V. A. Negretsky, O. S. Lukashenia
V. P. Komisarenko Institute of Endocrinology and Metabolism of AMS, 04114 Kyiv, Ukraine

Two modern methods of nucleic acids extraction from conventionally normal and tumour thyroid tissue were analyzed. The advantages and shortcomings of both methods were elucidated. It has been shown that RNA content in thyroid tumours significantly exceeds its quantity in conventionally normal tissue, which suggested more intensive synthetic processes and lesser amounts of colloid in tumour cells. RNA quantity in metastases also exceeded with a high degree of probability of RNA in conventionally normal tissue of thyroid. The advantages of nucleic acids storage as frozen thyroid tissue pieces, compared to a frozen solution of RNA and DNA, were demonstrated.

Key words: thyroid tumours, RNA, DNA, extraction methods.

(Надійшла 18.02.2008)

ВПЛИВ ШУНТУВАННЯ ТА БАНДАЖУВАННЯ ШЛУНКА НА РІВЕНЬ ПОКАЗНИКІВ ГЛЮКОЗОТОЛЕРАНТНОГО ТЕСТУ, ІНСУЛІНУ ТА С-ПЕПТИДУ У ХВОРИХ МОРБІДНИМ ОЖИРІННЯМ

О. С. Тивончук*, А. С. Лаврик, С. П. Кожара, О. Д. Фурманенко

Національний інститут хірургії та трансплантології ім. О. О. Шалімова АМН України, м. Київ, 03680, Україна

Проведений порівняльний аналіз впливу операцій шунтування та бандажування шлунка на окремі показники вуглеводного обміну у 147 хворих на морбідне ожиріння. Вивчена динаміка змін показників глюкозотолерантного тесту, рівнів інсуліну та С-пептиду до операції і у віддаленому післяопераційному періоді. Встановлено, що у всіх хворих морбідним ожирінням виявлена гіперінсулінемія, а у 41 % з них спостерігалось суттєве порушення вуглеводного обміну. Вказані бариатричні втручання є високоєфективним і патогенетично обґрунтованим методом лікування при поєднанні цукрового діабету 2 типу та морбідного ожиріння. У порівнянні з бандажуванням, шунтування шлунка більш ніж в 2 рази ефективніше коригує вуглеводний обмін при цукровому діабеті 2 типу.

Ключові слова: морбідне ожиріння, шунтування шлунка, бандажування шлунка, цукровий діабет 2 типу, вуглеводний обмін.

На сьогодні відомо, що ожиріння набуло розмірів глобальної епідемії і тісно пов'язане з виникненням цілого ряду захворювань, зокрема, цукрового діабету 2 типу [1-3], у розвитку якого відіграє суттєву роль. Загроза діабету існує для 64 % чоловіків та 77 % жінок, що страждають на ожиріння [4].

У зв'язку з тим, що при ожирінні III ступеня, коли індекс маси тіла (ІМТ) хворого перевищує 40 кг/м², спостерігається дуже висока частота розвитку супутніх захворювань, і в літературі стали використовувати термін морбідне (хворобливе) ожиріння (МО). Консервативне лікування МО визнане не ефективним, оскільки 95 % всіх хворих швидко набирають втрачену вагу або збільшують її ще більше вже через 6 міс після закінчення лікування [5].

Довгостроковий клінічний аналіз результатів консервативної терапії обґрунтовує необхідність використання хірургічного методу, як єдиного ефективного лікування морбідного ожиріння [6].

В середині минулого сторіччя почали застосовуватись перші патогенетично націлені операції для лікування ожиріння. На сьогодні окремо відділена хірургія ожиріння, яку частіше називають бариатричною хірургією. Бариатрична хірургія [грец. *barus* – важкий, пов'язаний з вагою, та грец. *iatrike* – медицина] – розділ загальної хірургії, в якому зусилля спрямовують на зниження надлишку маси тіла хворих на морбідне ожиріння шляхом виконання операцій на органах шлунково-кишкового тракту. На даний час відомо не менше 64 способів бариатричних операцій, які можна розділити на 3 групи: мальабсорбтивні втручання; операції, що зменшують об'єм шлунка (гастрорестрик-

* Адреса для листування (Correspondence): Національний інститут хірургії та трансплантології ім. О. О. Шалімова АМН України, вул. Героїв Севастополя, 30, м. Київ, 03680, Україна; E-mail: o.t.@ua.fm, ot@zeos.net

тивні), та комбіновані оперативні втручання (гібридні). Пластичні операції (дерматоліпектомії, абдомінопластики та інше) до бариатричних операцій не належать. Згідно з даними Міжнародної Федерації Хірургії Ожиріння (IFSO) протягом 2003 року у світі виконано 146 301 бариатричне втручання, причому 103 000 операцій були виконані в США і Канаді [7].

Аналіз віддалених результатів бариатричних операцій показав, що разом із стійким і адекватним зниженням маси тіла, у хворих МО відбувається корекція супутніх захворювань. В результаті довготривалого 14-літнього спостереження за пацієнтами, що перенесли шунтування шлунка, W. Pories і R. Albercht [8] встановили, що у 82,9 % хворих, у яких до операції діагностувався цукровий діабет 2 типу, і у 98,7 % пацієнтів з порушеною толерантністю до глюкози відмічена вірогідна, швидка та стабільно тривала нормоглікемія, нормальні рівні глікованого гемоглобіну та інсуліну в післяопераційному періоді. Однак автори окремо зазначають, що лише одне зменшення маси жирової тканини внаслідок операції не може пояснити антидіабетичний ефект шунтування шлунка по Ру [8]. Порівняльна оцінка результатів хірургічного методу показала, що він дає кращі результати в лікуванні цукрового діабету 2 типу, ніж консервативне лікування [9]. При цьому рівень смертності, включно з інтраопераційною, за тривалий час спостереження був майже в три рази менший, ніж в групі хворих, що лікувались консервативно [10].

В даний час окреслились два бариатричних втручання, що отримали найширше застосування. Перше – це операція шунтування шлунка (ШШ), на долю якої випадає близько 65 % від всіх бариатричних операцій, що зараз виконуються у світі. Друге – операція бандажування шлунка (БШ), яка є найбільш розповсюдженою бариатричною операцією в Європі [7]. Треба зазначити, що ці операції значно різняться за технікою виконання. На відміну від БШ, метод ШШ передбачає відключення від контакту з хімутом дна шлунка, дванадцятипалої кишки та початкового відділу порожньої кишки. Враховуючи зазначені суттєві відмінності, стає очевидним, що вони можуть спричинити неоднаковий метаболічний ефект в післяопераційному періоді. Тому вивчення та порівняння їх впливу на окремі показники вуглеводного обміну у хворих МО дозволять більш різносторонньо оцінити результати хірургічного втручання, уточнити показання для вибору методу бариатричної операції [11-13].

Матеріали і методи дослідження

В основу роботи покладені результати обстеження 147 хворих морбідним ожирінням (117 жінок та 30 чоловіків віком від 18 до 62 років з середнім ІМТ – $51,8 \pm 8,5$ кг/м²), яким були виконані операції бандажування або шунтування шлунка. В строки 12-24 міс (в середньому $18,2 \pm 3,4$ міс) після операції обстежено 76 хворих (51,7 %): 50 пацієнтів, що перенесли бандажування шлунка, та 26 – після шунтування шлунка за Fobi-Capella. До них увійшли 57 жінок та 19 чоловіків віком від 20 до 64 років з середнім ІМТ – $38,7 \pm 7,5$ кг/м². Контрольну групу становили 25 практично здорових добровольців (17 жінок та 8 чоловік аналогічного віку з ІМТ 22-28 кг/м²).

Рівень глюкози в капілярній крові визначали під час стандартного перорального глюкозотолерантного тесту (ГТТ): натще та через кожні 30 хв протягом трьох годин. Разом з цим, проводився забір венозної крові для визначення інсуліну та С-пептиду сироватки радіоімунним методом (стандартні набори для радіоімунного аналізу «Immunotech», Чехія; підрахунок активності проб виконували на гамма-лічильнику «Tracor», Голландія).

В залежності від змін рівня глюкози у крові за результатами проведення ГТТ виділяли наступні групи: нормальна толерантність до глюкози, порушення глікемії натще, порушена толерантність до глюкози, цукровий діабет. Всім хворим з діагнозом

цукрового діабету 2 типу ГТТ робили лише після отримання їх добровільної згоди. У хворих контрольної групи рівень інсуліну та С-пептиду натще і після стимуляції відповідав загальноприйнятим показникам норми.

Відмінності отриманих результатів досліджень між групами вивчали з використанням t-критерію Стьюдента та визначенням вірогідності різниці (P) [14].

Результати та їх обговорення

Як свідчать дані табл. 1, серед 147 хворих на МО в доопераційному періоді лише у п'ятій частини (20,4 %) з них були нормальні показники рівня глюкози у крові. Порушення глікемії натще спостерігалось у 38,8 % хворих, цю групу ми розглядали як перехідний стан від норми до патології. У четвертій частини обстежених (26,5 %) встановлена порушена толерантність до глюкози, а у 14,3 % – різного ступеня важкості цукровий діабет 2 типу (ЦД).

Таблиця 1. Результати ГТТ у 147 хворих на морбідне ожиріння до операції

Час взяття крові	Рівень глюкози в капілярній крові (ммоль/л)			
	Нормальний ГТТ, n = 30 (20,4 %)	Порушення глікемії натще, n = 57 (38,8 %)	Порушена толерантність до глюкози, n = 39 (26,5 %)	Цукровий діабет, n = 21 (14,3 %)
Натще	5,2±0,3	5,7±0,3	6,0±0,2	11,8±1,2
Через 30 хв	6,1±0,4	8,4±1,0	9,8±0,4	13,4±0,8
60 хв	6,6±0,4	9,4±1,0	13,6±1,5	15,3±1,0
90 хв	5,1±0,2	5,9±0,2	11,3±1,0	15,4±1,0
120 хв	4,9±0,1	5,9±0,2	7,9±0,3	14,1±0,6
180 хв	4,5±0,1	3,1±0,1	3,4±0,1	11,7±0,3

В доопераційному періоді у хворих МО рівень інсуліну натще зазнавав значних коливань: від нормальних значень (2,52-9,7 мкМО/мл) до підвищених (33,73-49,20 мкМО/мл), а в 1 хворого він був більш ніж у 6 разів вищим норми (66,70 мкМО/мл). Як відображено в табл. 2, в групі хворих МО з нормоглікемією спостерігалась статистично вірогідна (P<0,001) гіперінсулінемія: рівень інсуліну натще був в 3,5 рази вищий, ніж в контрольній групі. Стимуляція глюкозою спричиняла неадекватне збільшення рівня гормону в групі МО з нормоглікемією: на 30-й хв – в 1,3 рази, на 60-й хв – в 6,4, на 90-й хв – в 8, а на 120-й і 180-й хв – в 4,3 рази (P<0,05 – P<0,001). Таким чином, на кінець ГТТ рівень інсуліну в цій групі перевищував рівень контрольної групи в 4,3 рази. Крім того, в групі з нормальним ГТТ вміст С-пептиду у сироватці крові натще був в 1,9 рази вищим порівняно з контрольною групою (P<0,05). Після стимуляції максимальний рівень С-пептиду відмічено на 60-й хв, що практично не відрізнялось від контрольної групи (P>0,5); в подальшому відбувалось його зниження і в кінці дослідження вміст С-пептиду у сироватці був таким же, як і в контролі.

В групі з порушенням глікемії натще також спостерігалась гіперінсулінемія натще та після стимуляції глюкозою, але на відміну від інших груп, реакція-відповідь на стимуляцію була більш одноманітною. Вміст С-пептиду у сироватці крові натще наближався до норми, але при стимуляції проявляв тенденцію до підвищення. На кінець дослідження величина С-пептиду залишалася в 2 рази вищою, ніж в контрольній групі (P<0,01).

Для групи хворих із порушеною толерантністю до глюкози початковий рівень та реакція-відповідь на стимуляцію також супроводжувались підвище-

Таблиця 2. Показники рівня інсуліну (мкМО/мл) та С-пептиду (пг/мл) у хворих на морбідне ожиріння до операції

Група обстежених	Показник	Час забору крові під час ГТТ					
		Натще	Через 30 хв	60 хв	90 хв	120 хв	180 хв
Контрольна група, n=25	Інсулін	9,5 ± 1,4	35,4 ± 2,7	19,7 ± 2,3	10,5 ± 1,8	8,2 ± 1,5	7,4 ± 1,9
	С-пептид	2,0 ± 0,5	5,5 ± 0,9	5,9 ± 0,9	5,3 ± 0,7	4,5 ± 0,7	3,3 ± 0,6
Нормальний ГТТ, n=30	Інсулін P	33,4 ± 4,5 <0,001	46,9 ± 2,7 <0,05	126,9 ± 25,3 <0,001	80,5 ± 12,4 <0,001	34,3 ± 2,1 <0,001	31,9 ± 2,9 <0,001
	С-пептид P	3,9 ± 0,4 <0,05	3,2 ± 0,4 <0,05	6,0 ± 0,7 >0,5	5,9 ± 0,6 >0,5	2,0 ± 0,4 <0,005	3,3 ± 0,5 >0,5
Порушення глікемії натще, n=57	Інсулін P	21,9 ± 1,2 <0,002	66,1 ± 3,9 <0,001	61,3 ± 5,8 <0,001	45,9 ± 3,1 <0,001	37,8 ± 2,9 <0,001	21,1 ± 2,7 <0,001
	С-пептид P	2,7 ± 0,4 >0,5	3,9 ± 0,5 >0,5	4,5 ± 0,5 >0,5	6,3 ± 0,9 >0,5	5,6 ± 0,8 >0,5	7,0 ± 0,9 <0,01
Порушена толерантність до глюкози, n=39	Інсулін P	14,8 ± 1,2 <0,05	64,7 ± 3,7 <0,01	82,9 ± 2,8 <0,001	31,9 ± 1,5 <0,002	59,1 ± 2,4 <0,001	14,9 ± 1,7 <0,01
	С-пептид P	2,3 ± 0,2 >0,5	4,8 ± 0,4 >0,5	5,9 ± 0,9 >0,5	7,4 ± 0,8 <0,05	6,9 ± 0,9 <0,05	3,4 ± 0,5 >0,5
ЦД, n=21	Інсулін P	26,2 ± 4,3 <0,001	37,3 ± 2,9 >0,5	41,9 ± 2,3 <0,002	41,9 ± 3,4 <0,001	30,6 ± 1,2 <0,001	34,4 ± 2,5 <0,001
	С-пептид P	3,2 ± 0,5 <0,05	3,6 ± 0,3 <0,05	5,0 ± 0,9 >0,5	3,1 ± 0,5 <0,05	5,9 ± 0,8 >0,5	3,9 ± 0,5 >0,5

Примітка: P вчислено при порівнянні з відповідними показниками контрольної групи.

ним рівнем інсуліну сироватки, хоча динаміка підвищення відрізнялась від попередньо описаної групи. Початковий рівень інсуліну перевищував рівень контрольної групи в 1,6 рази, на 30-й хв – в 1,8, на 60-й хв – в 4,2, 90-й – в 3,0 рази, на 120-й хв – у 7,2 і на 180-й хв – в 2,0 рази ($P < 0,05$ – $P < 0,001$). Таким чином, в динаміці рівня інсуліну в цій групі спостерігали менш виражену реакцію відповідь після стимуляції, а наприкінці дослідження – більш адекватне зниження рівня гормону. В цій групі було відмічено суттєве підвищення концентрації С-пептиду після стимуляції. У порівнянні з контрольною групою, С-пептид на 90-й хв збільшився в 1,4 рази, а на 120-й хв – в 1,5 ($P < 0,05$), повернувшись до норми на 180-й хв ($P > 0,5$).

У хворих на ЦД початковий рівень інсуліну був в 2,8 рази вищим, ніж у контрольній групі ($P < 0,001$), але нижчий, ніж в групі з нормоглікемією. Продукція інсуліну на стимуляцію глюкозою на 30-й хв практично не відрізнялась в абсолютних цифрах ($P > 0,5$) від контрольної групи. Проте динаміка підвищення була різною: якщо в контрольній групі на 30-й хв рівень інсуліну збільшувався в 3,7 рази від рівня натще, то в групі ЦД та в групі нормоглікемії – лише в 1,4 рази. На 60-й та 90-й хв рівень гормону практично однаковий – збільшився в 1,6 разів. В контрольній групі у ці проміжки часу відбувалось підвищення в 2,1 і 1,1 рази, відповідно. В той же час у групі хворих з нормоглікемією спостерігається суттєво вищий рівень – в 3,8 та 2,4 рази, відповідно. В подальшому рівень інсуліну в групі ЦД на 180-й хв залишається в 1,3 рази вищим початкового рівня, що відрізняється від контрольної та групи нормоглікемії. На цей час рівень інсуліну в групі ЦД в 4,6 рази вищий, ніж в контрольній ($P < 0,001$). Для порівняння – рівень інсуліну на 180-й хв в групі нормоглікемії також вищий контрольної в 4,3 рази ($P < 0,001$). Рівень С-пептиду натще в групі ЦД був в 1,6 разів вищим, ніж у контрольній групі, і становив $3,2 \pm 0,5$ пг/мл із вірогідністю $P < 0,05$. У подальшому його рівень хоча підвищується на 120-й хв, але не настільки вагомо, як рівень інсуліну, а на 180-й хв наближається до початкового рівня ($P > 0,5$).

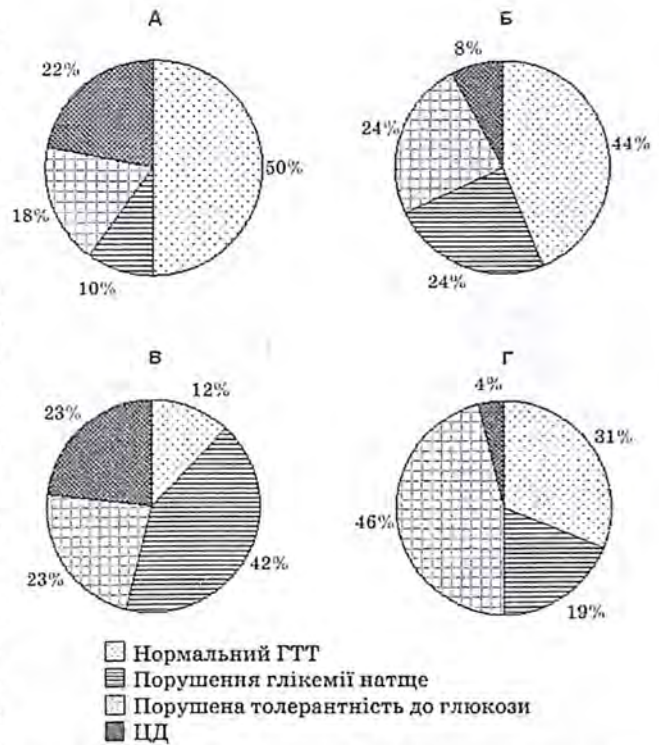
Проведені дослідження показали, що до операції у хворих на морбідне ожиріння всіх вищезазначених груп, особливо, у пацієнтів з нормальним ГТТ, спостерігалася виражена гіперінсулінемія. Хворі, що увійшли в групу із порушеною толерантністю до глюкози мали підвищений рівень інсуліну, що не завжди відповідав рівню глікемії. Проте в кінці ГТТ рівень інсуліну знижувався до початкового. Рівень С-пептиду був підвищений і натще, і після стимуляції, а на кінець дослідження в 1,4 рази перевищував початковий рівень. В групі хворих з клінічними проявами цукрового діабету, навпаки, підвищений рівень інсуліну більш відповідав підвищеному рівню глюкози, але на кінець ГТТ його величина залишалася вище початкової. Рівень С-пептиду був підвищений натще, більш вагомо після стимуляції, але не так суттєво, як рівень інсуліну.

Післяопераційні дані. Порівнюючи післяопераційні результати бандажування та шунтування шлунка, треба відмітити, що обидві операції покращують вуглеводний обмін у хворих на МО, але не однаково. Як відображено на мал. 1А, Б, через 18 міс після БШ частота порушень, характерних для ЦД 2 типу, виявлялась в 2,8 разів менше, ніж до операції, після ПШШ – майже в 6 разів менше (мал. 1В, Г). Це відбувалось за рахунок кількісних змін в інших групах, пов'язаних із зменшенням (ослабленням) ступеня метаболічних порушень у прооперованих хворих і переходом частини з них у групи з меншими розладами вуглеводного обміну. Так, за вказаний термін, ми спостерігали збільшення кількості хворих в групі із порушенням толерантності до глюкози: після шунтування – в 2 рази, після бандажування – в 1,3. Крім того, після ПШШ вагомо збільшилася група з нормальною толерантністю до глюкози – в 2,7 рази, а після БШ – навпаки, зменшилась в 1,1 рази. Також звертає на себе увагу, що

група з порушенням глікемії натще після ІІІІ зменшилась в 2,2 рази, а після БШ – навпаки, збільшилась в 2,4 рази (мал. 1).

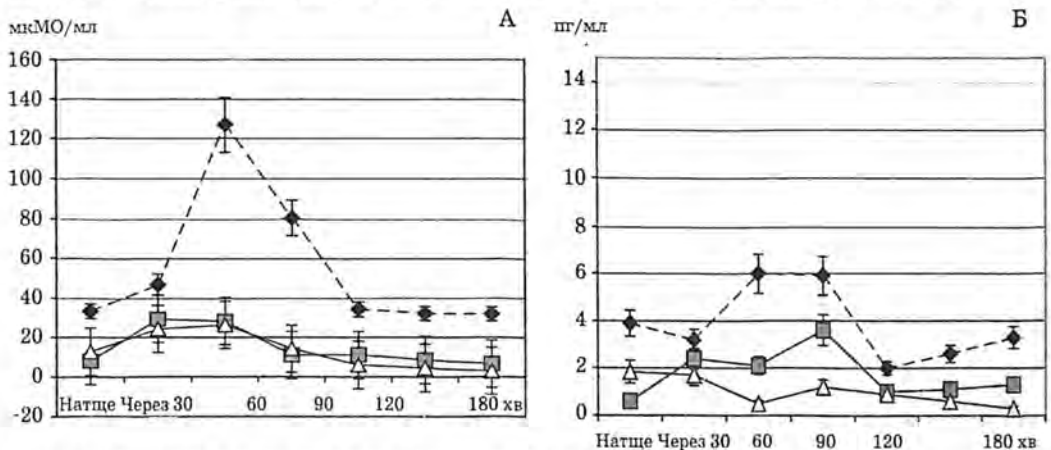
У віддалені строки після БШ та ІІІІ в групі з нормальною до операції толерантністю до глюкози рівень імунореактивного інсуліну вагомо знизився по відношенню до доопераційного, особливо на 60-й хв і 90-й хв (мал. 2А). В цій групі після обох операцій рівень інсуліну натще відповідав нормі, а у відповідь на стимуляцію криві рівня інсуліну після БШ та ІІІІ були дуже схожі.

Рівні С-пептиду (мал. 2Б) після БШ та ІІІІ в групі з нормальною толерантністю до глюкози були нижчими доопераційного рівня протягом всього дослідження. Максимальне післяопераційне підвищення рівня С-пептиду відмічалось на 90-й хв. При цьому його рівень після БШ був в 3 рази нижчим доопераційного, а після ІІІІ – у 12 разів нижчим доопераційного. Стрімке падіння вмісту С-пептиду після БШ спостерігалось на 120-й хв і його значення майже зрівнялось з рівнем після ІІІІ. Хоча в кінці дослідження після ІІІІ рівень С-пептиду знизився нижче початкового, на відміну від кривої БШ. Ймовірно, такі зміни можуть відбуватися внаслідок сповільнення



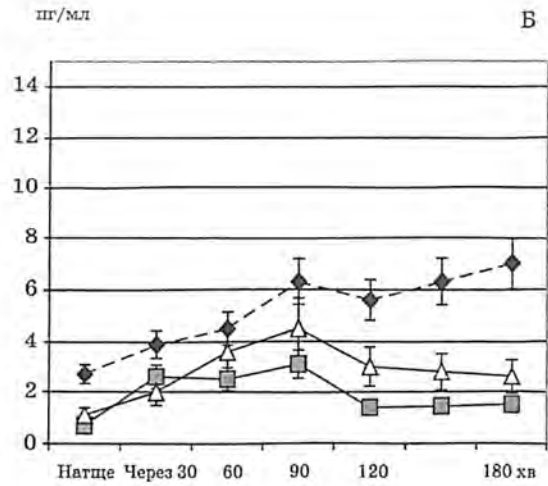
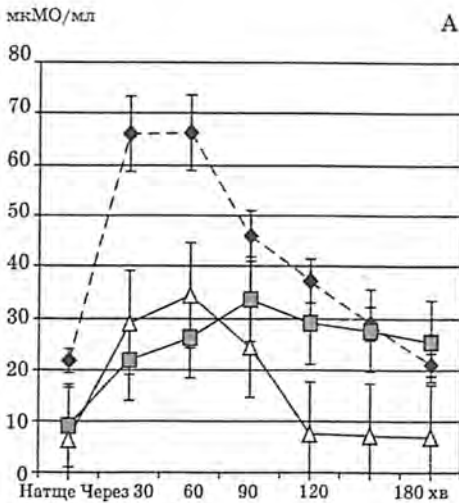
Мал. 1. Результати ГТТ у 76 хворих на морбідне ожиріння у періопераційному періоді в залежності від методу бариатричної операції:

А – до БШ, Б – після БШ, В – до ІІІІ, Г – після ІІІІ.



Мал. 2. Динаміка показників рівня інсуліну (А) і С-пептиду (Б) у групі хворих з нормальним до операції ГТТ. На мал. 2-5 дані позначено:

—◆— До операції —■— Після БШ —△— Після ІІІІ

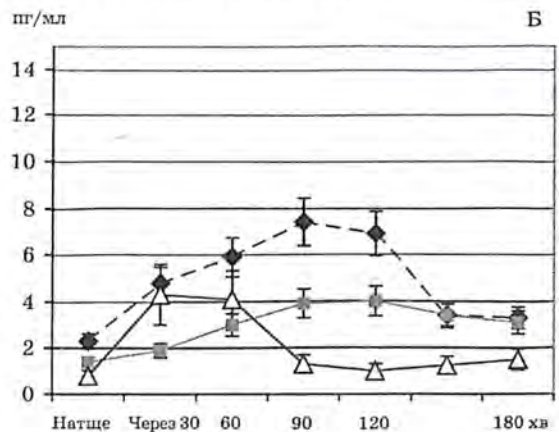
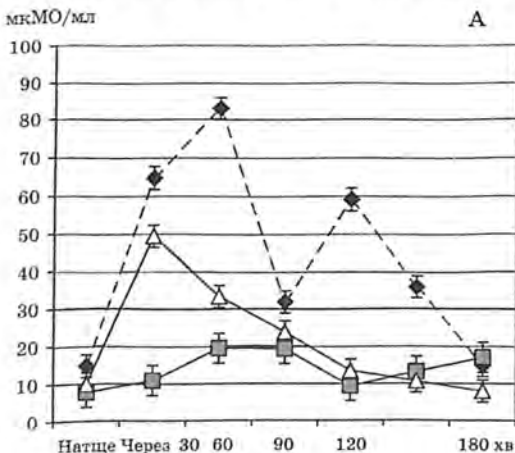


Мал. 3. Динаміка показників рівня інсуліну (А) і С-пептиду (Б) у групі хворих з порушенням до операції глікемії натще.

деградації інсуліну, що спричиняється зміною синтезу окремих гастроінтестинальних гормонів у зв'язку з новоствореними анатомо-фізіологічними умовами, що передбачені методом ШШ.

В групі хворих із порушенням до операції глікемії натще криві рівня інсуліну після БШ і ШШ через 60 хв після стимуляції значно різняться (мал. 3А). На відміну від БШ, інсулінова відповідь після ШШ була адекватною і на 120-й хв рівень інсуліну знизився до початкового рівня. Динаміка змін рівня С-пептиду в цій групі хворих відображена на мал. 3Б.

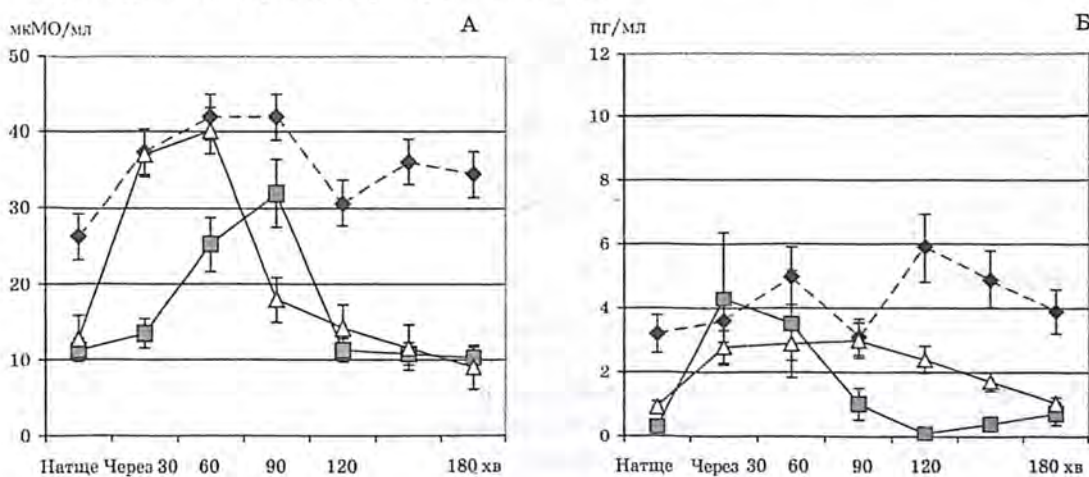
В групі хворих з порушеною до операції толерантністю до глюкози, що перенесли БШ, рівень інсуліну натще був у 2 рази нижчий доопераційного і 1,2 рази нижчий рівня контрольної групи; максимальна відповідь на стимуляцію була неадекватна (мал. 4А). Значно адекватнішою була відповідь інсуліну після операції ШШ в цій групі. Відповідно рівню інсуліну, коливання вмісту С-пептиду після ШШ були більш адекватними і наближеними до контрольної



Мал. 4. Динаміка показників рівня інсуліну (А) і С-пептиду (Б) у групі хворих із порушеною до операції толерантністю до глюкози.

групи (мал. 4Б). На відміну від рівня С-пептиду після БШ та доопераційного, крива С-пептиду після ШШ стрімко знижувалась на 90-й хв (в 5,6 разів нижче від доопераційного рівня) і стабільно утримувалась в подальшому на рівні трохи вищому від початкового.

Серед хворих групи ЦД, що перенесли операцію БШ або ШШ, у порівнянні до контрольної групи спостерігався підвищений рівень інсуліну натще, але від доопераційного він був нижчим у 2 рази (мал. 5А). Після БШ максимальне збільшення гормону спостерігалось на 90-й хв і в 2,8 рази перевищувало початковий рівень. Після ШШ динаміка рівня інсуліну відрізнялась швидшою та вираженішою відповіддю на стимуляцію та швидшим на 90-й хв і стрімкішим зниженням (в 1,8 рази нижче рівня БШ). Крім того, на 180-й хв спостерігалось зниження кривої інсуліну нижче початкового рівня і воно було вагомніше, ніж після БШ. Таким чином, шунтування шлунка корегує не тільки продукцію інсуліну натще, але призводить до більш адекватної реакції відповіді на стимуляцію у порівнянні з БШ.



Мал. 5. Динаміка показників рівня інсуліну (А) і С-пептиду (Б) у групі хворих на цукровий діабет після оперативного лікування.

Динаміка рівня С-пептиду в групі ЦД (мал. 5Б) виявилася найбільш «драматичною». Вміст С-пептиду натще в обох групах прооперованих був нижчим доопераційного рівня. Максимальне збільшення рівня С-пептиду після БШ відбувалось вже на 30-й хв – в 1,2 рази більше доопераційного, потім суттєве зниження, що призвело на 120-й хв до значення нижчого, ніж початкове. На відміну від цього, у хворих, що перенесли ШШ, рівень С-пептиду не зазнавав ні стрімкого підвищення, ні зниження, залишаючись на 90-й хв майже однаковим з доопераційним рівнем. Така парадоксальна динаміка С-пептиду після ШШ, що мало узгоджується з кривою інсуліну, можливо, відбувається внаслідок сповільнення деградації інсуліну у зв'язку із зміною продукції певних гастроінтестинальних гормонів через виключення гормонально-активних зон верхнього відділу шлунково-кишкового тракту, що передбачено методом ШШ.

Таким чином, проведені дослідження підтвердили, що у всіх обстежених хворих на МО наявна виражена гіперінсулінемія і встановили, що в 41 % з них мають місце клінічно вагомі порушення вуглеводного обміну. І якщо на ранніх стадіях захворювання за рахунок гіперінсулінемії відбувалась компенсація порушень вуглеводного обміну легкого ступеня, то на більш пізніх стадіях цього не спостерігалось. В подальшому виникало поглиблення ано-

мальної інсулінової відповіді на стимуляцію, як наприклад, в групі хворих з порушенням толерантності до глюкози, що в кінцевому результаті призводить до маніфестації цукрового діабету. Отримані результати свідчать, що бариатричні операції можуть ефективно впливати на порушення вуглеводного обміну у хворих на ожиріння.

Передбачене методом шунтування шлунка виключення від контакту із хімусом важливих гормонопродуруючих зон (дна шлунка, дванадцятипалої кишки та початкового відділу порожньої кишки) призводить до змін пептидно-гормональної відповіді кишки на надмірну стимуляцію їжею у хворих на ожиріння і, одночасно, впливає на регуляцію вуглеводного обміну. Окрім безпосереднього зниження маси тіла, метод шунтування шлунка забезпечує додаткові процеси для здійснення відповіднішої корекції порушень вуглеводного обміну.

Висновки

1. Серед обстежених 147 хворих на морбідне ожиріння, яким планувалось оперативне лікування, в 40,8 % пацієнтів були виявленні клінічно значимі порушення вуглеводного обміну.

2. Бандажування та шунтування шлунка суттєво впливають на порушення вуглеводного обміну у хворих на ожиріння. У порівнянні з бандажуванням, шунтування шлунка більш ніж в 2 рази ефективніше коригує вуглеводний обмін при цукровому діабеті 2 типу.

Література

1. Astrup A., Finer N. Redefining type 2 diabetes: «diabesity or «obesity dependent diabetes mellitus»? // *Obes. Rev.* 2000, N 1, 57-59.
2. Mokad A. H., Ford E. S., Bowman B. A. et al. Prevalence of obesity, diabetes and obesity-related health risk factors, 2001 // *JAMA.* 2003, 289, 76-79.
3. Гинзбург М. М., Крюков Н. Н. Ожирение. М.: МЕДПРАКТИКА, 2002. 127 с.
4. Fried M., Hainer V., Basdevant A. et al. Interdisciplinary European guidelines for surgery for severe (morbid) obesity // *Obes. Surg.* 2007, 17, N 2, 260-270.
5. Fobi M. A. L., Lee H., Felahy B. et al. Choosing an operation for weight control, and the transected banded gastric bypass // *Obes. Surg.* 2005, 15, 114-121.
6. Segal K. R., Edano A., Abalos A. et al. Weight gain as a risk factor for clinical diabetes mellitus // *Ann. Intern. Med.* 1995, 122, 481-486.
7. Buchwald H. Bariatric surgery worldwide 2003 // *Obes. Surg.* 2004, 14, N 9, 1157-1164.
8. Pories W., Albercht R. Etiology of type II diabetes mellitus: role of the foregut // *World J. Surg.* 2001, 25, N 4, 527-531.
9. Rubino F., Gagner M. Potential of surgery for curing Type 2 diabetes mellitus // *Ann. Surg.* 2002, 236, N 5, 554-559.
10. Pories W. J., Swanson M. S., MacDonald K.G. et al. Who would have thought it? An operation proves to be the most effective therapy for adult-onset diabetes mellitus // *Ann. Surg.* 1995, 222, 339-350.
11. Саєнко В. Ф., Лаврик А. С., Тивончук А. С., Бубало О. Ф. Проблеми цукрового діабету в аспекті хірургічного лікування морбідного ожиріння // *Матер. з'їзду ендокринологів України. Ендокринологія.* 2001, 6, додаток, с. 163.
12. Лаврик А. С., Саєнко В. Ф., Тивончук А. С. и др. Шунтирование желудка в хирургическом лечении патологического ожирения // *Клін. хірургія.* 2003, № 3, 14-17.

13. Лаврик А. С., Тывончук А. С., Кожара С. П. и др. Опыт применения шунтирования желудка в хирургии морбидного ожирения // *Анналы хирургии*. 2006, № 2, 36-40.
14. Урбах В.Ю. Статистический анализ в биологических и медицинских исследованиях. М.: Медицина, 1975. 295 с.

Влияние шунтирования и бандажирования желудка на уровень показателей глюкозотолерантного теста, инсулина и С-пептида у больных морбидным ожирением
А. С. Тывончук, А. С. Лаврик, С. П. Кожара, Е. Д. Фурманенко
Национальный институт хирургии и трансплантологии им. А. А. Шалимова АМН Украины, г. Киев, 03680, Украина

Проведен сравнительный анализ влияния операций шунтирования и бандажирования желудка на некоторые показатели углеводного обмена у 147 больных морбидным ожирением. Изучено и проведено сравнение динамики показателей глюкозотолерантного теста, инсулина, С-пептида в дооперационном и отдаленном послеоперационном периоде. Установлено, что у всех больных морбидным ожирением наблюдаются гиперинсулинемия, а у 41 % из них – выраженные нарушения углеводного обмена. Указанные бариатрические операции являются высокоэффективным и патогенетически обоснованным методом лечения сочетания морбидного ожирения и сахарного диабета 2 типа. По сравнению с операцией бандажирования, шунтирование желудка более чем в 2 раза эффективнее корригирует углеводный обмен при СД 2 типа.

Ключевые слова: морбидное ожирение, шунтирование желудка, бандажирование желудка, сахарный диабет 2 типа, углеводный обмен.

Comparison of the influence of gastric bypass and gastric banding on the changes in the indices of fasting blood glucose test, levels of insulin and C-peptide in patients with morbid obesity

А. Tyvonchuk, А. Lavryk, S. Kozhara, E. Furmanenko
A.A. Shalimov National Institute of Surgery and Transplantology of AMS, Kyiv, 03680, Ukraine

The authors have carried out a comparative analysis of the influence of operations –gastric bypass and gastric banding – on some indices of carbohydrate metabolism among 147 patients with morbid obesity. The dynamics has been studied, of changes in the indices of fasting blood glucose test, insulin and C-peptide levels before and in long terms after surgery. It has been established that all patients with morbid obesity had hyperinsulinemia, and 40 % of these had notable disturbances of carbohydrate metabolism. The above bariatric operations represent a highly effective and pathogenetically grounded method of treatment for morbid obesity associated with type 2 diabetes mellitus. Compared to gastric banding, gastric bypass is more than twice effective in improving carbohydrate metabolism in type 2 diabetes mellitus.

Key words: morbid obesity, gastric bypass, gastric banding, type 2 diabetes mellitus, carbohydrate metabolism.

(Надійшла 19.12.2007)

ЗАСТОСУВАННЯ АЛЬФАФОРКАЛУ У ЛІКУВАННІ ХВОРИХ НА ЦУКРОВИЙ ДІАБЕТ З АРТРОПАТІЯМИ

В. Л. Орленко*

Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В. П. Комісаренка АМН України, м. Київ, 04114, Україна

Вивчалася клінічна ефективність та безпечність препарату «Альфафоркал» фірми «Кусум Хелтхкер» (Індія) у хворих на цукровий діабет 1 та 2 типу з артропатіями, що супроводжуються остеопенічним синдромом. Препарат приймали по 1 таблетці 2 рази на добу, курс лікування становив 3 міс. На тлі лікування альфафоркалом вірогідно зменшився больовий синдром, покращилися функціональні можливості хворих, нормалізувалися показники мінерального обміну, поліпшився структурно-функціональний стан кісткової тканини, про що свідчать показники ультразвукової денситометрії. Побічних ефектів, що вимагають відміни препарату, не зафіксовано. Таким чином, альфафоркал рекомендується як ефективний препарат для лікування діабетичних артропатій на тлі остеопенічного синдрому.

Ключові слова: цукровий діабет, діабетичні артропатії, остеопенічний синдром, ультразвукова денситометрія, кальцій, фосфор.

За останні 10 років розповсюдженість цукрового діабету (ЦД) збільшилася в Україні майже в 1,5 рази. Пізні ускладнення ЦД, до яких відносять, поряд із класичними (мікро-, макроангіопатії, нефропатії, ретинопатії, нейропатії), і діабетичні артропатії, призводять до ранньої інвалідизації, що обумовлює велику соціальну значимість цього захворювання. Незважаючи на значні успіхи, досягнуті у вивченні патогенезу ЦД, його впливу на стан різних органів та систем організму, чимало аспектів цієї проблеми залишаються недостатньо дослідженими.

Діабетичні артропатії небезпечні тим, що розвиваючись досить повільно і поступово, можуть тривалий період бути безсимптомними. І тільки з часом у хворого з'являється клінічна симптоматика, нерідко у вигляді обмеження рухливості суглобів і контрактури Дюпюїтрена, лікування яких не завжди ефективне. Розвиток малозворотних змін опорно-рухової системи, їхній вагомий внесок у формування стійкої непрацездатності хворих на ЦД визначає необхідність подальшого вивчення цієї проблеми. Її вирішення є надзвичайно важливим, як у плані ранньої діагностики зазначених порушень, вибору патогенетично обумовленої терапії, так і розробки профілактичних засобів.

Діабетичні артропатії, як специфічне ускладнення ЦД, розвиваються в результаті дегенеративно-дистрофічних змін в сполучнотканинних біля- та суглобових структурах (хрящах, зв'язках, сухожиллях, апоневрозах), з часом з'являються вторинні зміни в кістковій тканині, що призводить до розвитку остеопорозу [1].

Дотепер найбільш дискусійним є питання про вплив ендокринних чинників на розвиток дегенеративно-дистрофічних змін суглобів. Останніми

* Адреса для листування (Correspondence): Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В. П. Комісаренка АМН України, вул. Вишгородська, 69, м. Київ, 04114, Україна

роками показано, що гормони є істотними регуляторами процесів росту і розвитку хрящів, а хондроцити, поряд із фібробластами, мають специфічні рецептори до ряду гормонів, у тому числі і до інсуліну. Крім того, дія інсуліну на синтез хондроцитами специфічних макромолекул може також реалізуватися через рецептори до соматомедину А. Встановлено, що інсулін у фізіологічних концентраціях впливає на процеси розвитку, диференціації хряща, проте, як дефіцит цього гормону, так і його високі концентрації можуть призвести до розвитку в суглобах дистрофічних змін [2, 3]. Крім того, метаболічні зміни, які виникають при цукровому діабеті, сприяють порушенню процесів ремоделювання кісткової тканини [4].

Інсулін відносно білкового синтезу є анаболічним гормоном. Він стимулює синтез кісткової матриці, забезпечує нормальну мінералізацію кістки за рахунок активації утворення колагену і переходу амінокислот у кістку [1, 5]. Багатьма авторами показано, що за недостатності інсуліну порушується протеоглікановий склад кістки і хряща [1, 2, 6]. Стимулююча дія інсуліну на синтез кісткової матриці здійснюється шляхом зростання секреції чи активності інсуліноподібних факторів росту (ІФР), переважно ІФР-1, а за іншими дослідженнями, і ІФР-2 [3, 7], активуючих остеобластний остеопоез [8].

Декомпенсація цукрового діабету внаслідок абсолютного чи відносного дефіциту інсуліну, що супроводжується підвищенням секреції контрінсулінових гормонів (глюкокортикоїдів, соматотропіну, глюкагону), зниженням продукції статевих стероїдів, призводить до активації остеокластів і посилення катаболічних процесів у кістковій матриці [9-11].

Виражений осмотичний діурез внаслідок підвищеної глюкозурії у хворих на цукровий діабет зумовлює порушення реабсорбції кальцію в ниркових канальцях і розвитку гіперкальціурії і гіпокальціємії. Для підтримки гомеостазу кальцію активується функція паращитоподібних залоз, розвивається вторинний гіперпаратиреоз, який сприяє декальцинації скелету і виникненню остеопорозу [12]. В деяких дослідженнях [8] виявлено вірогідне підвищення рівня паратиреоїдного гормону (ПТГ) та кальцитоніну у крові хворих на ЦД, причому вищий рівень ПТГ відмічено при 1 типі діабету. Крім того, відмічено залежність секреції ПТГ від ступеня компенсації ЦД: при декомпенсації рівень ПТГ зростає. Між тим, показники загального та іонізованого кальцію, а також неорганічного фосфору не мали вірогідних відмінностей у хворих на ЦД та у здорових. За даними інших авторів [13, 14], у хворих на ЦД виявлено зниження рівня як загального, так і іонізованого кальцію у сироватці крові. Гіперкальціурія та гіперфосфатурія характерна для хворих як 1, так і 2 типу ЦД, при декомпенсації захворювання рівень їх зростає. У стані субкомпенсації ЦД виявляли зниження екскреції кальцію та фосфору, а при компенсації захворювання вірогідних відмінностей в екскреції кальцію та фосфору, порівняно з контрольною групою, не встановлено. Було виявлено позитивну кореляційну залежність між показниками глюкозурії та кальціурії, а також показниками глюкозурії та фосфатурії [15].

Наявність остеопенії у хворих на цукровий діабет констатована в багатьох дослідженнях [1, 5, 7, 10, 12]. Показано, що кісткові зміни у хворих на цукровий діабет виникають імовірно частіше, ніж у контрольній групі, і проявляються рарифікуючою остеопатією без суттєвої перебудови кістки [16].

Зміни вмісту активних метаболітів вітаміну D_3 у крові хворих на ЦД виявляються досить часто. Частіше за все сповіщається про зниження концентрації 1,25-дигідрохолекальциферолу та 24, 25-дигідрохолекальциферолу [4, 12], хоча з самого початку захворювання вміст $1,25(OH)_2D_3$ може бути підвищеним [3, 13]. Із зниженням утворення активних метаболітів вітаміну D_3 зв'язують часто порушене при ЦД всмоктування кальцію в кишечнику. Виявлений дефект вітаміну D-залежних кальційзв'язуючих білків, зокрема,

дуоденального кальбіндину – D-9K [1]. Крім того, порушення всмоктування кальцію в кишечнику відбувається за рахунок збільшення в мембранах епітеліоцитів вмісту холестерину, фосфоліпідів та загальних ліпідів [16]. Вміст 25(OH)D₃, який являється основним субстратом для утворення активних метаболітів вітаміну D₃ в нирках, при ЦД також знижений [1]. Це відбувається за рахунок порушення транспорту холекальциферолу та розподілу його у клітинах печінки, порушення його гідроксилування в результаті зниження активності ферментів при гепатопатіях, характерних для ЦД [13, 17]. Деякі автори у розвитку діабетичної остеопатії вбачають велику роль порушень обміну вітаміну D₃, так як відомий вплив його активних метаболітів на проліферацію та диференціювання клітин кісткової тканини [15].

Крім того, останнім часом з'явилися роботи, які вказують на вплив вітаміну D₃ на функціональну активність підшлункової залози. В β-клітинах підшлункової залози виявлені рецептори до холекальциферолу, що дає можливість розглядати їх як клітини-мішені для вітаміну D₃ [5, 18]. В експерименті було показано, що недостатня кількість вітаміну D₃ призводить до пришвидшення деструкції β-клітин та розвитку ЦД [1].

На теперішній час питання лікування діабетичних артропатій є дискусійним. Але ні в кого не викликає сумнівів необхідність включення в комплексну терапію цих хворих активних метаболітів вітаміну D₃ та препаратів кальцію.

Останніми роками на українському ринку з'явився новий перспективний препарат для лікування остеопорозу – Альфафоркал (альфакальцидол, 0,25 мкг), що метаболізується у печінці у кальцитріол.

Метою нашого дослідження було вивчення терапевтичної ефективності та терпимості до препарату Альфафоркал фірми «Кусум Хелтхкер» (Індія) у хворих на цукровий діабет 1 та 2 типу з діабетичними артропатіями.

Матеріали та методи дослідження

Обстежено 30 хворих на ЦД 1 та 2 типу (20 жінок і 10 чоловіків), середній вік яких дорівнював 46,1±3,05 років, середня тривалість захворювання –14,8±1,55 років. Хворі отримували Альфафоркал у дозі 1 таблетка 2 рази на добу. Пацієнти знаходились за умов стаціонарного харчування з добовим споживанням 800-1000 мг кальцію – відповідно до загальноприйнятих рекомендацій [19]. Хворих із наявністю патології шлунково-кишкового тракту і запальних захворювань сечостатевої системи з обстеження виключали. Протягом дослідження пацієнти не приймали нестероїдних протизапальних засобів та хондропротекторів.

В комплекс обстежень входили традиційні клінічні тести (загальний аналіз крові, сечі, біохімічний аналіз крові, глікемічний та глюкозуричний профіль). Визначення загального та іонізованого кальцію у сироватці крові виконувалось за традиційними методиками [20].

Тяжкість ураження суглобів оцінювали за альгофункціональним індексом Лекена. Силу больового синдрому вивчали за допомогою візуальної аналогової шкали Huskisson.

Дослідження структурно-функціонального стану кісткової тканини проводили методом ультразвукової денситометрії з використанням апарату «Achilles plus» фірми «Lunar incorporated» (США). За допомогою приладу визначали такі параметри: швидкість поширення ультразвуку через кістку (ШПУ, м/с), від щільності й еластичності якої залежить обумовлений показник; широкосмугове ослаблення ультразвуку (ШОУ, дБ/МГц), що відображає як щільність кістки, так і кількість, розміри та просторову орієнтацію трабекул; індекс міцності кістки (ІМ, %), що вираховувався комп'ютером на основі показників ШПУ та ШОУ за формулою:

$$ІМ=0,5 \times (nШОУ+nШПУ),$$

де $n_{\text{ШОУ}} = (\text{ШОУ} - 50) : 0,75$, $n_{\text{ШПУ}} = (\text{ШПУ} - 1380) : 1,8$.

Він відображає стан губчастої кісткової тканини пацієнта стосовно категорії дорослих людей у віці 20 років. Z-показник свідчить на яку частку середнього квадратичного відхилення відрізняється індекс міцності обстежуваного у порівнянні з віковою нормою [20].

Загальну оцінку ефективності лікування, за думкою лікаря та пацієнта, оцінювали як значне покращення (4 бали), помірне покращення (3 бали), незначне покращення (2 бали), без змін (1 бал), погіршення (0 балів). Ефективність та терпимість до препарату оцінювали при залученні до дослідження та через 3 міс після початку прийому препарату.

Статистичну обробку отриманих результатів виконували методами варіаційної статистики за допомогою стандартного пакету статистичного розрахунку даних Microsoft Excel на персональному комп'ютері Pentium-233. Вірогідну статистичну відмінність визначали за критерієм t-Стюдента та за допомогою t-критерію Фішера (для відносних величин). Розходження вважали вірогідними при $P < 0,05$; тенденція до зміни показників визначалася при $0,05 < P < 0,1$; значення кореляції між рядами показників розраховували за Спірменом.

Результати та їх обговорення

Оцінка функціональних можливостей хворого, яка визначалася за індексом Лекена у балах, показала вірогідне зниження всіх показників (наявність болю, максимальну відстань пересування, труднощі при підйомі та спуску сходами та ін.) через 3 міс після початку лікування. Так, якщо при початковому огляді суглобів у більшості хворих мала місце виражена діабетична артропатія, яка проявлялася вираженим больовим синдромом, скутістю рухів, обмеженням рухливості суглобів, запальним процесом суглобів, важкістю рухів, то в процесі лікування ці симптоми поступово зменшувались. Так, в кінці лікування показники індекса Лекена зменшилися на 48,5 % (табл.).

Таблиця. Показники ефективності препарату альфафоркал у хворих на цукровий діабет з артропатіями

Час обстеження	Індекс Лекена	Шкала Huskisson	Вміст загального кальцію у сироватці крові, ммоль/л	Вміст іонізованого кальцію у сироватці крові, ммоль/л
До лікування	13,44±2,29	64,81±3,24	2,01±0,02	0,95 ±0,02
Через 3 міс після початку лікування	6,52±1,77*	38,8±2,77*	2,23±0,1*	1,16±0,02*

Примітка: * – вірогідна статистична відмінність між показниками до та після лікування.

Одним з головних критеріїв ефективності досліджуваного препарату є динаміка інтенсивності больового синдрому, яка оцінена за аналоговізуальною шкалою Huskisson (табл.) Аналіз результатів показав вірогідне зниження больового синдрому через 3 міс прийому препарату у хворих на ЦД 1 та 2 типу з діабетичними артропатіями, що свідчить про виражений аналгетичний ефект альфафоркалу.

Важливим показником ураження кісткової тканини є порушення вмісту кальцію у крові. Показники рівня загального кальцію у сироватці крові обстежених відрізнялись від контролю і мали широкі індивідуальні коливання – від 1,75 ммоль/л до 2,5 ммоль/л, при цьому у 6 обстежених показники загального

кальцію були нижчі 2 ммоль/л. Після 3 міс терміну лікування вищевказані показники коливалися: від 2,1 до 2,4 ммоль/л і практично у всіх хворих знаходилися в межах норми. Середній вміст загального кальцію у сироватці після лікування вірогідно підвищився.

Рівень іонізованого кальцію знаходився в межах 0,85 ммоль/л – 1,18 ммоль/л, при цьому у 16 хворих цей показник був нижчим за 1,0 ммоль/л. Середній вміст Ca^{2+} вірогідно був знижений порівняно з нормою, а після лікування встановлено його вірогідне ($P < 0,05$) підвищення (табл.).

За даними ультразвукової денситометрії, зміни міцності та еластичності кісткової тканини виявлено практично у всіх обстежених хворих.

Характеристика швидкості проходження ультразвуку по кісткових структурах п'ятки виявила індивідуальні коливання показників у обстежених хворих, вони знаходилися у межах 1504-1564 м/с до лікування, після лікування – 1545-1610 м/с. При зіставленні середніх показників ($1544,2 \pm 5,37$ м/с – до лікування проти $1598 \pm 6,2$ м/с – після лікування) було відмічено вірогідне ($P < 0,001$) підвищення швидкості проходження ультразвуку по кісткових структурах п'ятки після проведеного курсу терапії. Оскільки цей показник залежить від еластичності та щільності кісткової тканини, то його підвищення може свідчити про нормалізацію еластичності та збільшення щільності кісткової тканини у хворих на ЦД з артропатіями.

Індивідуальні дані індексу міцності кістки коливались від 64 % до 89 %. Середні показники ($85,03 \pm 2,7$ % – до лікування; $106 \pm 4,1$ % – після лікування) вірогідно підвищилися ($P < 0,001$) після закінчення прийому препарату.

Індивідуальні величини широкосмугового ослаблення ультразвуку (ШОУ) становили 86-131 дБ/МГц, після лікування – 106-128 дБ/МГц. Середні показники у хворих після лікування були вірогідно ($P < 0,05$) підвищені ($105,2 \pm 2,2$ дБ/МГц – до лікування проти $118 \pm 2,1$ дБ/МГц – після лікування). Показник ШОУ відображає втрату інтенсивності ультразвуку в середовищі його розповсюдження, а також характеризує як щільність, так і кількість, розміри та просторову орієнтацію трабекулярної кісткової тканини. Його підвищення у всіх обстежених хворих свідчить про нормалізацію структури трабекулярної кісткової тканини у хворих на ЦД.

При оцінці загальної ефективності препарату думки лікаря та пацієнта практично співпали. Оцінка ефективності препарату лікарем становила $3,74 \pm 1,13$ бали, пацієнтами – $3,65 \pm 0,96$ балів. Таким чином, ефективність альфафоркалу через 3 міс лікування наближалася до 4 балів – значного поліпшення. Терпимість до препарату альфафоркалу була доброю. Будь-яких побічних ефектів, які б потребували відміни препарату, не було.

Висновки

1. Застосування альфафоркалу у хворих на цукровий діабет протягом 3 міс призвело до вірогідного зменшення больового синдрому та покращення функціональних можливостей пацієнтів.

2. Застосування альфафоркалу у хворих з діабетичними артропатіями сприяло поліпшенню мінерального обміну у пацієнтів, що проявлялося збільшенням у сироватці крові загального та іонізованого кальцію.

3. Лікування альфафоркалом хворих з діабетичними артропатіями сприяло покращенню структурно-функціонального стану кісткової тканини. Про це свідчить вірогідне збільшення показників ультразвукової денситометрії після терміну лікування.

4. Альфафоркал добре переноситься хворими, про що свідчить відсутність побічних реакцій у пацієнтів, які приймали препарат протягом тривалого часу (3 міс).

5. Адьфафоркал може рекомендуватися як ефективний засіб при лікуванні діабетичних артропатій на тлі остеопенічного синдрому.

Література

1. Nielsen J. F., Anderstent H., Sinkjer T. Decreased stiffness at the ankle joint in patients with long-term type 1 diabetes // *Diabet. Med.* 2004, 12, N 21, 539-544.
2. Shiavon F., Circhetta C., Dani L. The diabetic hand // *Reumatissimo.* 2004, 56, N 3, 139-142.
3. Crispin J. S., Alcocer-Varela J. Rheumatologic manifestation of diabetes mellitus // *Am. J. Med.* 2003, 114, N 6, 753-757.
4. Олійник В. А., Поворознюк В. В., Терехова Г. М. Вторинний остеопороз при ендокринній патології // *Пробл. остеології.* 1998, № 1, 51-58.
5. Arkilla P. E. T., Koskinen P. J., Kantola I. M. et al. Biochemical markers of types I and III collagen and limited joint mobility in type 1 diabetic patients // *Acta Diabetol.* 2003, 14, N 40, 151-155.
6. Zimmi S., Schats H., Pfohl M. The role of limited joint mobility in diabetic patient with an at-risk foot // *Diabet. Care.* 2004, 23, N 27, 942-946.
7. Handa A., Gotoh M., Hamada K. et al. Vascular endothelial growth factor 121 and 165 in the subacromial bursa are involved in shoulder joint contracture in type II diabetics with rotator cuff // *J. Orthop. Res.* 2003, 21, N 6, 1138-1144.
8. Kim R.P. The musculoskeletal complications of diabetes // *Curr. Diab. Rep.* 2002, 2, N 1, 49-52.
9. Forst T., Pfutzner A., Schehler B. et al. Peripheral osteopenia in adult patients with insulin-dependent diabetes mellitus // *Diabet Med.* 1995, 12, N 10, 874-879.
10. Cai L., Okumu F. W., Cleland J. L. et al. A slow release formulation of insulin as a treatment for osteoarthritis // *Osteoarthritis Cartilage.* 2002, 10, N 9, 692-706.
11. Sauseng S., Kastenbauer T., Irsigler K. Limited joint mobility in selected hand and foot joints in patients with type 1 diabetes mellitus: a methodology comparison // *Diabetes Nutr. Metab.* 2002, 15, N 1, 1-6.
12. Nielsen J. F., Andersen H., Sinkjaer T. Decreased stiffness at the ankle joint in patients with long-term Type 1 diabetes // *Diabet. Med.* 2004, 21, N 6, 539-544.
13. Lekholm C., Sundkvist G., Lundborg G., Dahlin L. The diabetic hand – complications of diabetes // *Lakartidningen.* 2001, 98, N 4, 306-312.
14. Хасанова Е. Р. Состояние фосфорно-кальциевого обмена и секреция кальцийрегулирующих гормонов у больных сахарным диабетом: Автореф. дис. канд. мед. наук. М., 1989. 23 с.
15. Frost D., Beischer W. Limited joint mobility in type 1 diabetic patients: associations with microangiopathy and subclinical macroangiopathy are different in men and women // *Diabetes Care.* 2001, 24, N 1, 95-99.
16. Yang K., Yeo S. J., Lee B. P., Lo N. N. J. Total knee arthroplasty in diabetic patients: a study of 109 consecutive cases // *Arthroplasty.* 2001, 16, N 2, 102-106.
17. Kastenbauer T., Sauseng S. Risk factors for increased plantar pressure in type 2 diabetes // *Acta Med. Austriaca.* 1999, 26, N 5, 173-177.
18. Коев А. З., Вохчelian Н., Клисарова А. Bone changes in patients with insulin-dependent diabetes mellitus // *Diabetologia.* 1997, 40, N 1, 579-582.
19. Остеопороз: эпидемиология, клиника, диагностика, профилактика и лечение / Под ред. Н. А. Коржа, В. В. Поворознюка, Н. В. Дедух, И. А. Зупанца. Харьков: Золотые страницы, 2002. 648 с.
20. Варганян К. Ф. Патология костной ткани при сахарном диабете // *Остеопороз и остеопатии.* 1999, № 4, 31-33.

Использование альфафоркала в лечении больных сахарным диабетом с артропатиями

В. Л. Орленко

Институт эндокринологии и обмена веществ им. В. П. Комиссаренко АМН Украины, г. Киев, 04114, Украина

Проведено изучение клинической эффективности и переносимости препарата Альфафоркал фирмы «Кусум Хелтхкер» (Индия) у больных сахарным диабетом 1 и 2 типа с диабетическими артропатиями, сопровождающимися остеопеническим синдромом. Курс препарата составил 3 мес, пациенты принимали по 1 таблетке 2 раза в сутки. На фоне лечения альфафоркалом достоверно уменьшился болевой синдром, улучшились функциональные возможности больных. Трехмесячный курс лечения препаратом привел к нормализации показателей минерального обмена, улучшению структурно-функционального состояния костной ткани, о чем свидетельствуют показатели ультразвуковой денситометрии. Побочных эффектов, требующих отмены препарата, не зафиксировано. Таким образом, альфафоркал рекомендуется как эффективный препарат для лечения диабетических артропатий на фоне остеопенического синдрома.

Ключевые слова: сахарный диабет, диабетические артропатии, остеопенический синдром, ультразвуковая денситометрия, кальций, фосфор.

Use of alphaforkal therapy in diabetes mellitus patients with arthropathies

V. L. Orlenko

V. P. Komisarenko Institute of Endocrinology and Metabolism of AMS, 04114 Kyiv, Ukraine

Clinical efficacy and tolerability of the preparation Alphaforkal (Company «Kusum Heltkhker», India) have been studied in patients with type 1 and 2 diabetes mellitus with diabetic arthropathies associated with osteopenic syndrome. Patients were taking one tablet twice a day during 3 months. In the presence of Alphaforkal therapy, patients showed a reliable improvement of pain syndrome and functional abilities. The three-month course of Alphaforkal therapy led to a normalization of mineral metabolism indices, improvement of structural-functional state of osseous tissue, which is confirmed by ultrasound densitometry indices. No side effects were reported, which would require drug canceling. Thus, Alphaforkal is recommended as an effective preparation for the treatment of arthropathies in the presence of osteopenic syndrome.

Key words: diabetes mellitus, diabetic arthropathies, ultrasound densitometry, potassium, phosphor.

(Надійшла 28.01.2008)

НЕФРОПРОТЕКТОРНЫЕ СВОЙСТВА ПРЕСАРТАНА-50 У БОЛЬНЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ

Л. В. Корпачева-Зинич, Н. Н. Кушнарєва, В. Н. Скибун*

Институт эндокринологии и обмена веществ им. В. П. Комиссаренко
АМН Украины, г. Киев, 04114, Украина

Проведена оценка эффективности ренопротекторного и гипотензивного действия препарата пресартан-50 производства «Ипка лабораториз Лимитед» (Индия) у 20 больных сахарным диабетом 1 и 2 типа с диабетической нефропатией (на стадии микроальбуминурии) на фоне артериальной гипертензии. После 60-дневного курса лечения пресартаном-50 у пациентов не выявлено достоверных изменений массы тела, частоты сердечных сокращений, основных лабораторных показателей. Переносимость препарата оценена как очень хорошая (1,0 балл), не отмечено побочных эффектов, а также негативного влияния на эффективность сахароснижающей терапии. После проведенного лечения у пациентов выявлено достоверное снижение систолического и диастолического артериального давления. Достоверное значительное снижение уровня микроальбуминурии (почти на 60 %) свидетельствует о выраженном нефропротекторном действии исследуемого препарата. Полученные данные позволяют рекомендовать использование пресартана-50 в комплексной терапии сахарного диабета 1 и 2 типов как средства для предотвращения (замедления) прогрессирования диабетической нефропатии и гипертонической болезни.

Ключевые слова: сахарный диабет 1 и 2 типа, диабетическая нефропатия, артериальная гипертензия, микроальбуминурия, пресартан-50, эффективность, фармакотерапия.

В последние годы убедительно доказано, что микроальбуминурия (МАУ) у больных сахарным диабетом (СД) ассоциируется не только с развитием диабетической нефропатии (ДН), но и с высоким риском сердечно-сосудистой смертности. Установлено, что от терминальной почечной недостаточности (уремии) умирают 3-8 % больных СД 2 типа, в то время как сердечно-сосудистые осложнения являются причиной смерти таких больных в 58 % случаев [1-4]. Связь с высоким риском сердечно-сосудистых заболеваний объясняют наличием связи между МАУ и такими патогенетическими звеньями СД 2 типа и метаболического синдрома, как гипертензия, гипергликемия, дислипидемия, повышенное перекисное окисление липидов, дисфункция эндотелия, которые одновременно являются независимыми факторами риска сердечно-сосудистых заболеваний. В целом ряде экспериментальных и клинических исследований показано, что эффективный контроль перечисленных показателей потенциально может остановить развитие заболевания почек. Наивысшему риску быстрого прогрессирования заболевания почек, по современным оценкам, подвержены больные сахарным диабетом 1 и 2 типа с относительно высокими уровнями гломерулярной фильтрации и экскреции альбумина с мочой на ранней стадии диабета, с повышенным артериальным давлением и недостаточным контролем гликемии [5-7].

* Адреса для листування (Correspondence): Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В. П. Комісаренка АМН України, вул. Вишгородська, 69, м. Київ, 04114, Україна; тел. 8 044 4310284

Наиболее убедительные экспериментальные и клинические доказательства значения контроля артериального давления (АД) получены при использовании ингибиторов ангиотензин-превращающего фермента (АПФ), которые оказывают особо благоприятное антипротеинурическое и ренопротекторное действие, независимое от их воздействия на снижение артериального давления [8,9]. Очевидно, что такое воздействие связано с противодействием многообразным патогенетическим эффектам ангиотензина II (АТII) – эффекторной молекулы ренин-ангиотензиновой системы.

На сегодняшний день установлено, что АТII является главным связующим звеном и ключевым патогенетическим фактором в развитии как ДН, так и артериальной гипертензии и сердечно-сосудистых осложнений. В частности, описаны вазоконстрикторные эффекты АТII, которые реализуются путем стимуляции гладкомышечных клеток сосудов или адренергических нейронов, высвобождающих катехоламины. Действие АТII на почку включает ренальную вазоконстрикцию, угнетение высвобождения ренина, стимуляцию задержки соли и жидкости проксимальными канальцами, а также повышенную секрецию альдостерона путем активации коры надпочечников. Получены экспериментальные доказательства того, что действие АТII может обуславливать гипертрофию сосудов сердца и клубочков за счет прямых трофических эффектов, сопряженных с активацией внутриклеточных тирозинкиназных каскадов ростовых факторов и независимых от гемодинамических эффектов [10]. Активация системы моноцитов/макрофагов под действием АТII ведет к повышенной выработке супероксидного аниона, способствуя развитию локальных воспалительных реакций и ангиопатии, в частности, в клубочках почек.

Практически все негативные эффекты АТII реализуются через стимуляцию рецепторов АТII 1 типа (АТ1), представленных в структурах сосудистой стенки, головного мозга, миокарда, почек, надпочечников. В целом, активация рецепторов АТ1 может лежать в основе артериальной гипертензии и выступать в качестве патогенетического фактора сердечно-сосудистых и почечных осложнений.

Недавно выявлен рецептор АТII 2 типа (АТ2), активация которого вызывает эффекты, прямо противоположные активации рецепторов АТ1: вазодилатацию (вместо вазоконстрикции), антипролиферативное действие (вместо стимуляции ростовых факторов), усиление натрийуреза (вместо задержки натрия). Рецепторы АТ2 опосредуют стимуляцию продукции брадикинина и оксида азота, обеспечивают усиление репарационных процессов после повреждения тканей и снижение апоптоза.

Фармакологическое блокирование действия АТII может осуществляться на уровне превращения ангиотензина I в АТII, которое катализируется ангиотензин-превращающим ферментом. Однако у многих пациентов с признаками диабетической нефропатии ингибиторы АПФ сами по себе не позволяют достичь целевых уровней АД, что может быть связано с наличием дополнительных путей образования АТII, протекающих без участия АПФ [9,11].

Появление препаратов из группы сартанов – блокаторов рецепторов АТ1 (БРАТII) – обеспечивает альтернативный путь блокады РАС на уровне активации клеточных рецепторов этой молекулы. Существенной особенностью действия сартанов является селективный характер блокады рецепторов АТII только 1 типа (но не 2 типа). Кроме того, преимущество БРАТII перед ингибиторами АПФ состоит в том, что ингибирование синтеза АТII, по-видимому, препятствует реализации положительных биологических эффектов активации рецепторов АТ2; более того, предполагают, что фармакологическая блокада рецепторов АТ1 может стимулировать рецепторы АТ2, таким образом, обеспечивая дополнительный механизм противодействия патологическим эффектам АТII [10-13].

Еще одним положительным моментом действия сартанов является отсутствие влияния на систему брадикинина, характерного для ингибиторов АПФ. Это отличие определяет более хорошую переносимость БРАТII, ведь именно с накоплением брадикинина связывают развитие ряда нежелательных эффектов (сухого кашля и др.) при применении ингибиторов АПФ.

Производные сартанов хорошо зарекомендовали себя как в снижении АД, так и в уменьшении кардиоваскулярного риска и смертности, что было показано в ряде крупных исследований. Так, в исследовании LIFE [14] продемонстрировано, что применение лозартана обусловило кардиопротекторный эффект и выраженное снижение риска инсульта: при систолической гипертензии – на 40 %, сахарном диабете 2 типа – на 22 %, протеинурии – на 26 %, в общей группе больных – на 25 %. Выраженный нефропротекторный эффект БРАТII показан в исследовании RENAAL [15]. В частности, лозартан у больных с диабетической нефропатией в добавление к стандартной антигипертензивной терапии, по сравнению с плацебо, обусловил снижение частоты и скорости развития хронической почечной недостаточности, хотя не влиял на смертность. Сравнение ирбесартана, амлодипина и плацебо показало наибольшую эффективность ирбесартана.

Первым предшественником антагонистов АТII был саралазин. Однако это соединение обладало неполной антагонистической активностью, имело короткий период действия и недостаточную биодоступность, что препятствовало его клиническому использованию.

Эти недостатки отсутствуют у первого непептидного антагониста АТII – лозартана (пресартан). Лозартан (2-бутил-4-хлор-1-[p-(o-1H-тетразол-5-ил фенил)бензил] имидазол-5-метанола монокалийевая соль) стал первым представителем данного класса, доступным для лечения артериальной гипертензии. Ему свойственна высокая селективность и аффинность к рецепторам АТ1: сродство лозартана к этим рецепторам в 10000 раз ниже, чем к рецепторам АТ2. Лозартан и его основные метаболиты блокируют действие АТII путем селективной блокады рецепторов АТ1, благодаря чему предотвращается и снимается вазоконстрикторное действие АТII и стимуляция секреции альдостерона надпочечниками, уменьшается общее периферическое сопротивление сосудов, снижается системное АД и давление в малом круге кровообращения. Лозартан метаболизируется при помощи цитохромных ферментов Р450. Активный метаболит лозартана – карбоновая кислота E-3174 в 10-40 раз более активен, чем исходное соединение, и проявляет себя как обратимый неконкурентный ингибитор АТ1. При этом не угнетается активность АПФ, не происходит связывания с другими ферментами или блокирования других рецепторов и ионных каналов, играющих роль в регулировании сердечно-сосудистой системы. Несмотря на существенное снижение АД, лозартан не оказывает заметного влияния на частоту сердечных сокращений. Отмечается некоторый урикозурический эффект лозартана при постоянном употреблении. При внутреннем употреблении лозартан хорошо всасывается. Системная биодоступность лозартана составляет около 33 %. Максимальная концентрация лозартана и его активных метаболитов достигается через 1 ч и 3-4 ч; период полувыведения составляет 2 ч и 6-9 ч, соответственно. Лозартан и его метаболиты в значительной степени связываются с белками плазмы (>99 %). Выведение происходит с мочой и частично – с желчью [9,11,12,15-18].

Полученные на сегодняшний день данные позволили Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) и Международному обществу гипертензиологов в своих рекомендациях от 2003 г. отнести препараты из группы БРАТ, наряду с ингибиторами АПФ, к средствам первого ряда выбора для лечения и предупреждения проявлений кардиоренального синдрома при СД 1 и 2 типа:

диабетической нефропатии и нефропатиях недиабетического генеза, для лечения сердечной недостаточности и цереброваскулярных заболеваний [12].

Целью данного исследования была оценка эффективности ренопротекторного и гипотензивного действия препарата пресартан-50 производства «Ипка лабораториз Лимитед» (Индия) у больных сахарным диабетом 1 и 2 типа с диабетической нефропатией (на стадии микроальбуминурии) и артериальной гипертензией.

Материалы и методы

В испытании приняло участие 20 человек (8 мужчин и 12 женщин), в возрасте от 18 до 70 лет, из которых 6 больных сахарным диабетом 1 типа (средний возраст – $40,3 \pm 2,2$ лет) и 14 больных сахарным диабетом 2 типа (средний возраст – $57,8 \pm 1,6$ лет). Индекс массы тела (ИМТ) составил в среднем $27,3 \pm 0,95$ кг/м². Это указывает на то, что большинство обследованных пациентов имели избыточный вес.

Условиями включения в исследование было наличие микроальбуминурии (20-200 мкг/мин) и артериальное давление $\geq 130/80$ мм рт. ст. Не включались пациенты с известной гиперчувствительностью к компонентам препарата, с выраженной почечной, печеночной недостаточностью, с сопутствующими онкологическими заболеваниями, тяжелыми соматическими и психическими заболеваниями, а также лица, получавшие в течение последних четырех недель терапию другими препаратами из группы блокаторов рецепторов АПГ и ингибиторов АПФ.

Пациенты получали препарат пресартан-50 (лозартап калия (2-бутил-4-хлор-1-[p-(o-1H-тетразол-5-ил фенил) бензил] имидазол-5-метанола монокалийевая соль) в виде таблеток по 50 мг, один раз в день до еды, в течение 60 дней.

Сопутствующая патология представлена следующими нозологическими единицами: гипертоническая болезнь – у всех больных, дисциркуляторная энцефалопатия – у 3 пациентов, хроническая почечная недостаточность верхних и нижних конечностей – у 1 пациента, хроническая полинейропатия – у 2 больных, хронический холецистит отмечался у 2 больных, желчнокаменная болезнь – у 1 пациента, хронический гепатит – у 1 пациента, остеохондроз – у 1 пациента, хронический бронхит – у 1 пациента. У 2 больных зарегистрирован хронический простатит. Диффузный зоб (эутиреоидный) был у 1 пациента.

Сопутствующая терапия была представлена ангиопротекторными, гипотензивными, ноотропными препаратами. При наличии воспалительных процессов (хронический пиелонефрит, хронический бронхит) назначались антибиотики в адекватных дозах.

Гипогликемизирующая терапия была представлена инсулином в адекватных дозах, а также пероральными сахароснижающими средствами (манинил, сиофор, амарил, диабетон, глибенкламид).

Данное исследование проводилось в соответствии с Законом Украины «О лекарствах» и этическими принципами Хельсинской Декларации.

Больные строго соблюдали режим перорального приема препарата. Врачи-исследователи и средний медицинский персонал регистрировали частоту приема препарата в листе назначений. Коэффициент приверженности лечению был равен 1.

Схема обследования больного. До начала испытания и в ходе исследования пациентам, включенным в испытание, проводили обследование с применением клинических и лабораторных методов по следующим параметрам:

- объективное обследование (определение частоты сердечных сокращений и АД, аускультация сердца и легких, осмотр кожи и слизистых, пальпация и перкуссия живота и оценка субъективных жалоб пациента);
- общий анализ крови;
- общий анализ мочи;
- альбуминурия;
- сывороточный калий;

- сывороточный креатинин;
- гликемия натощак и постпрандиальная;
- гликозилированный гемоглобин;
- систолическое и диастолическое артериальное давление;
- скорость клубочковой фильтрации (СКФ) определялась расчетным методом по формуле Кокрофта-Голта:

$$\text{СКФ} = \frac{k \times (140 - \text{возраст, годы}) \times \text{масса тела, кг}}{\text{креатинин крови, мкмоль/л}},$$

где $k=1,23$ для мужчин и $k=1,05$ для женщин.

Норма СКФ: мужчины – 100–150 мл/мин, женщины – 85–130 мл/мин.

Результаты исследования и их обсуждение

После проведенного 60-дневного курса лечения пресартаном-50 не отмечалось достоверных изменений индекса массы тела и частоты сердечных сокращений. Лабораторные показатели общего анализа крови и мочи (количество эритроцитов и лейкоцитов, цветной показатель, содержание гемоглобина в крови, СОЭ, лейкоцитурия, эритроцитурия) на протяжении проведенного курса достоверно не изменялись и, в целом, соответствовали норме (табл. 1). Не обнаружено достоверных изменений биохимических показателей крови – концентрации холестерина и креатинина в сыворотке крови (табл. 2).

Таблица 1. Динамика показателей общего анализа крови и мочи у обследованных пациентов

Показатель	До начала терапии	После курса терапии	P
Эритроциты $\times 10^{12}/\text{л}$	$4,17 \pm 0,11$	$4,26 \pm 0,10$	$> 0,05$
Цветной показатель	$0,85 \pm 0,05$	$0,84 \pm 0,05$	$> 0,05$
Гемоглобин, г/л	$131,9 \pm 3,1$	$133,9 \pm 2,48$	$> 0,05$
Лейкоциты $\times 10^9/\text{л}$	$6,3 \pm 0,20$	$5,98 \pm 0,20$	$> 0,05$
СОЭ, мм/ч	$9,8 \pm 1,4$	$9,4 \pm 1,48$	$> 0,05$
Лейкоцитурия, в поле зрения	$2,75 \pm 0,31$	$3,12 \pm 0,55$	$> 0,05$
Эритроцитурия, в поле зрения	$0,25 \pm 0,12$	$0,20 \pm 0,12$	$> 0,05$

Примечание: P – достоверность отличий показателей до и после проведенной терапии.

Таблица 2. Динамика биохимических показателей сыворотки крови и показателей углеводного обмена у обследованных пациентов

Показатель	До начала терапии	После курса терапии	P1	P2
Холестерин, ммоль/л	$5,52 \pm 0,16$	$5,38 \pm 0,15$	$> 0,05$	$> 0,05$
Креатинин, ммоль/л	$0,090 \pm 0,08$	$0,083 \pm 0,006$	$> 0,05$	$> 0,05$
Калий, ммоль/л	$4,20 \pm 0,08$	$4,39 \pm 0,67$	$> 0,05$	$< 0,05$
Гликемия натощак, ммоль/л	$10,39 \pm 0,62$	$8,87 \pm 0,36$	$< 0,05$	$< 0,001$
Гликемия постпрандиальная, ммоль/л	$10,99 \pm 0,47$	$10,06 \pm 0,37$	$> 0,05$	$> 0,05$
Гликозилированный гемоглобин, %	$8,42 \pm 0,35$	$7,71 \pm 0,25$	$> 0,05$	$< 0,001$

Примечание: В табл. 2 и 3: P₁ – достоверность отличий показателей до и после проведенной терапии при расчете независимым методом, P₂ – при расчете разностным методом.

Полученные результаты согласуются с данными литературы и свидетельствуют об отсутствии отрицательных воздействий препарата. После курса лечения (табл. 2) отмечено незначительное повышение калиемии у пациентов при расчете достоверности разностным методом ($P_2 < 0,05$).

Проведенное лечение оказало благоприятное влияние на показатели углеводного обмена (табл. 2). Уровень гликемии натощак достоверно снизился, наблюдалось некоторое снижение содержания гликозилированного гемоглобина, которое, очевидно, связано со снижением гликемии; достоверность различия проявляется только при расчете разностным методом ($P_2 < 0,05$). Постпрандиальная гликемия не изменялась. Представленные данные свидетельствуют об эффективности назначенной сахароснижающей терапии и об отсутствии отрицательного влияния пресартана-50 на углеводный обмен.

После проведенного курса лечения у каждого из обследованных пациентов нами отмечено снижение уровня почечной экскреции альбумина. При этом у 10 пациентов показатель МАУ снизился до уровня нормы (менее 20 мкг/мин). Высокодостоверное снижение среднего уровня МАУ почти на 60 % ($P < 0,001$) отражает выраженное нефропротекторное действие исследуемого препарата (табл. 3).

Таблица 3. Динамика показателей микроальбуминурии, скорости клубочковой фильтрации, систолического (САД) и диастолического (ДАД) артериального давления у обследованных пациентов

Показатель	До начала терапии	После курса терапии	% снижения	P_1	P_2
МАУ, мкг/мин	76,4 ± 9,4	31,01 ± 5,03	59,5	< 0,001	< 0,001
СКФ, мл/мин	93,19 ± 5,22	99,2 ± 4,75	-	> 0,05	> 0,05
САД, мм рт. ст.	149,5 ± 3,3	125,25 ± 2,2	17	< 0,001	< 0,001
ДАД, мм рт. ст.	90,2 ± 2,42	77,25 ± 2,04	14	< 0,001	< 0,001

Показатель скорости клубочковой фильтрации, рассчитанный по формуле Кокрофта-Голта, у части обследованных (11 человек) находился в пределах нормы. У остальных 9 больных (4 мужчины и 5 женщин) показатели СКФ исходно были снижены (73,3 ± 4,6 мл/мин), а после лечения они несколько повысились (до 83,3 ± 3,8 мл/мин), хотя и не достигли уровня нормы. Изменения достоверны при расчете разностным методом ($P < 0,05$). Обнаруженная тенденция к улучшению показателя почечной фильтрации, возможно, будет сохраняться при более длительном лечении пресартаном.

Артериальное давление (систолическое и диастолическое) значительно снизилось после лечения у всех пациентов, приблизившись к целевому уровню. Изменения показателей САД (на 17 %) и ДАД (на 14 %) высокодостоверны ($P < 0,001$). Полученные данные доказывают высокую антигипертензивную эффективность препарата пресартан-50 у пациентов с сахарным диабетом.

Переносимость исследуемого препарата оценивалась в баллах на основании субъективных симптомов и ощущений, сообщаемых пациентом, и объективных данных, выявленных медицинским персоналом, по следующим критериям:

1 балл	Очень хорошая (не отмечаются побочные эффекты)
2 балла	Хорошая (наблюдаются незначительные побочные эффекты, не причиняющие серьезных проблем пациенту и не требующие отмены препарата)
3 балла	Удовлетворительная (отмечаются побочные эффекты, оказывающие влияние на состояние пациента, но не требующие отмены препарата)
4 балла	Неудовлетворительная (имеет место нежелательный побочный эффект, оказывающий значительное отрицательное влияние на состояние больного, требующий отмены препарата)
5 баллов	Крайне неудовлетворительная (побочный эффект, требующий отмены препарата и применения дополнительных медицинских мероприятий)

Все 100 % обследованных нами пациентов отмечали очень хорошую переносимость препарата (1 балл).

Выводы

1. Проведенные испытания показали, что таблетированный препарат пресартан-50 (производство «Ипка лабораториз Лимитед», Индия) является высокоэффективным средством лечения микроальбуминурии и артериальной гипертензии у больных сахарным диабетом (снижение показателей МАУ в среднем на 60 %, САД – на 17 %, ДАД – на 14 %).

2. Переносимость препарата оценена как очень хорошая (1,0 балл). Не отмечались побочные эффекты во время приема препарата. Также не отмечалось ухудшения лабораторных показателей и отрицательного влияния на эффективность сахароснижающей терапии.

3. Препарат пресартан-50 может быть рекомендован для использования в комплексной терапии у больных сахарным диабетом 1 и 2 типов в качестве средства, предотвращающего (замедляющего) прогрессирование диабетической нефропатии и гипертонической болезни.

Литература

1. Дедов И. И., Шестакова М. В. Диабетическая нефропатия. М.: Универсум Паблшинг, 2000. 239 с.
2. Аметов А. С., Демидова Т. Ю., Косых С. А. Микроальбуминурия у больных сахарным диабетом 2-го типа и артериальной гипертензией. Возможности терапии // Пробл. эндокринологии. 2005, 51, №4, 1-4.
3. Балаболкин М. И. Диабетология. М.: Медицина, 2000. 672 с.
4. Ефимов А. С., Скробонская Н. А., Бездробный Ю. В. и др. Клиническая диабетология. К.: Здоров'я, 1998. 320 с.
5. Mogensen C. Microalbuminuria predicts clinical proteinuria and early mortality in maturity-onset diabetes // Diabet. Med. 1984, 310, N 2, 356-360.
6. Schmitz M. Microalbuminuria: a major risk factor in non-insulin-dependent diabetes. A 10-year follow-up study of 503 patients // Diabet. Med. 1988, 5, N 1, 126-134.
7. Valmadrid C., Klein R., Moss S., Klein B. The risk of cardiovascular disease mortality associated with microalbuminuria and gross proteinuria in persons with older-onset diabetes mellitus // Arch. Intern. Med. 2000, 160, N 10, 1093-1100.
8. Коваленко В. Н. Блокаторы рецепторов ангиотензина // Лечение артериальной гипертензии / Под ред. В. Н. Коваленко и Е. П. Свищенко. К.: БПВ, 2004, 1-10.

9. Pahor M., Psarty B., Alderman M. et al. Therapeutic benefits of ACE inhibitions and other antihypertensive drugs in patients with type 2 diabetes // *Diabetes Care*. 2000, 23, N 7, 888-892.
10. Дзау Б. Рецепторы ангиотензина II: молекулярная биология и фармакологическая блокада // Матер. симпозиума Междунар. конгресса нефрологов (Сидней, Австралия, 25 мая 1997 г.). Репринт рус. Merck & Co, Inc., 1997, 2-3.
11. Сиренко Ю. Н. Сартаны и их роль в лечении артериальной гипертензии // *Здоров'я України*. 2006, 154, № 21, 14-15.
12. Шестакова М. В., Александров А. А., Ярек-Мартынова И. Р. Кардиоренальный синдром при сахарном диабете: факторы риска, возможности профилактики и лечения: Пособие для врачей. М.: Изд. МЗ РФ, 2005. 24 с.
13. Berl T., Hunsicker L., Lewis J. et al. Irbesartan Diabetic Nephropathy Trial Collaborative Study Group: Cardiovascular outcomes in the irbesartan diabetic nephropathy trial of patients with type 2 diabetes overt nephropathy // *Ann. Intern. Med.* 2003, 138, N 3, 542-549.
14. Lindholm L., Ibsen H., Dahlöf B. et al. The LIFE Study Group: Cardiovascular morbidity and mortality in patients with diabetes mellitus in the Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension study (LIFE): A randomized trial against atenolol // *Lancet*. 2002, 359, 1004-1010.
15. Brenner B. M., Cooper M. E., de Zeeuw D. et al. For the RENAAL study Investigators: Effects of losartan on renal and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and nephropathy // *N. Engl. J. Med.* 2001, 345, 861-869.
16. Мухин Н. А., Балкаров И. М., Моисеев С. В. и др. Урикозурическое действие лозартана // *Клин. фармакол. терап.* 2003, 12, № 5, 55-58.
17. Дядык А. И., Багрий А. Э., Зборовский С. Р. Антагонисты рецепторов ангиотензина II в современной клинической практике: Метод. рекоменд. Донецк: Изд-во Донецкого гос. мед. ун-та, 2006. 35 с.
18. Dalla Vestra M., Pozza G., Mosca A. et al. Влияние леркандипина на уровень экскреции альбумина у гипертензивных больных со 2 типом сахарного диабета в сравнении с рамиприлом // *Медицина неотложных состояний*. 2006, №2 (3), 53-59.

Нефропротекторні властивості пресартана-50 у хворих на цукровий діабет

Л. В. Корпачева-Зінич, Н. М. Кушнар'ова, В. М. Скибун

Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В. П. Комісаренка АМН України, м. Київ, 04114, Україна

Оцінено ефективність ренопротекторної та гіпотензивної дії препарату пресартан-50 виробництва «Іпка лабораториз Лімітед» (Індія) у хворих на цукровий діабет 1 і 2 типу з діабетичною нефропатією (у стадії мікроальбумінурії) на тлі артеріальної гіпертензії. Після 60-денного курсу лікування пресартаном-50 у пацієнтів не виявлено вірогідних змін маси тіла, частоти серцевих скорочень, лабораторних показників. Терпимість препарату оцінено як дуже добру (1,0 бал), не відзначено побічних ефектів, а також негативного впливу на ефективність цукрознижувальної терапії. Після проведеного лікування у пацієнтів виявлено вірогідне зниження систолічного та діастолічного артеріального тиску. Значне зниження рівня мікроальбумінурії (майже на 60 %) свідчить про виражену нефропротекторну дію досліджуваного препарату. Отримані дані дозволяють рекомендувати використання пресартану-50 у комплексній терапії цукрового діабету 1 і 2 типів як засобу попередження (уповільнення) прогресування діабетичної нефропатії та гіпертонічної хвороби.

Ключові слова: цукровий діабет 1 і 2 типу, діабетична нефропатія, артеріальна гіпертензія, мікроальбумінурія, пресартан-50, ефективність, фармакотерапія.

Nephroprotective properties of Presartan-50 in patients with diabetes mellitus

L. V. Korpacheva-Zinich, N. M. Kushnareva, V. M. Skibun

V. P. Komisarenko Institute of Endocrinology and Metabolism of AMS, Kyiv, 04114, Ukraine

Efficacy of Presartan-50 (produced by Ipca Laboratories Ltd, India) renoprotective and hypotensive action in 20 type 1 and 2 diabetic patients with diabetic nephropathy (at microalbuminuria stage) and hypertension was assessed. It has not been revealed any side effects nor any negative effects on hypoglycemic therapy. Presartan-50 did not alter body mass, heart rate and laboratory indices in patients in 60 days of treatment. It has been determined a significant decrease of systolic and diastolic blood pressure, and microalbuminuria level reduction (by 60 %) that indicates a prominent nephroprotecting effect of the preparation under study. The results allow us to recommend the use of Presartan-50 in the combined therapy of type 1 and 2 diabetes mellitus for preventing (delaying) diabetic nephropathy and hypertensive disease progression.

Key words: type 1, 2 diabetes mellitus, diabetic nephropathy, hypertension, microalbuminuria, Presartan-50, efficacy, pharmacotherapy.

(Надійшла 28.01.2008)

ВИКОРИСТАННЯ ПРЕПАРАТУ ОСТЕОВІТУ ДЛЯ ПРОФІЛАКТИКИ ГЛЮКОКОРТИКОЇДНОГО ОСТЕОПОРОЗУ

*А. П. Левицький, О. А. Макаренко**

Інститут стоматології АМН України, м. Одеса, 65026, Україна

В експериментальному дослідженні, проведеному на щурах лінії Вістар, моделювали глюкокортикоїдний остеопороз за допомогою введення з питною водою преднізолону в дозі 5 мг/кг. Дослідній групі тварин одночасно з преднізолоном профілактично внутрішньошлунково вводили комплексний препарат остеовіт у дозі 500 мг/кг. Препарат містить екстракт бобів сої, цитрат кальцію, сульфат цинку й вітамін D₃. Показано, що преднізолон викликає втрату кісткової тканини (зниження щільності стегнової кістки), порушення білкового обміну (підйом активності еластази, зниження загальної протеолітичної активності й рівня білка в кістковій тканині) і мінерального обміну (збільшення активності кислій й лужної фосфатаз у кістковій тканині). Також встановлено, що преднізолон спочатку призводить до порушення білкового, а пізніше – мінерального обміну в кістковій тканині. Застосування остеовіту в досліджуваній дозі ефективно запобігало метаболічним порушенням в кістковій тканині й зниженню щільності стегнової кістки, які викликані преднізолоном. Проведене експериментальне дослідження дозволяє рекомендувати препарат остеовіт для призначення одночасно із тривалою глюкокортикоїдною терапією з метою попередження розвитку остеопорозу.

Ключові слова: глюкокортикоїдний остеопороз, білковий обмін, мінеральний обмін, щільність стегнової кістки, профілактика, остеовіт.

Роль глюкокортикоїдів у лікуванні автоімунних захворювань постійно росте у зв'язку з їх високою терапевтичною ефективністю. У той же час тривалий прийом цих препаратів є важливим чинником ризику розвитку вторинного остеопорозу [1-5]. Найбільша швидкість втрати кісткової тканини спостерігається протягом першого року терапії глюкокортикоїдами [1]. Загальмувати розвиток глюкокортикоїдного остеопорозу (ГОП) деякою мірою можна шляхом зміни способу введення (інгаляції, пероральне, внутрішньом'язове, периартикулярне й ін.), а також зниженням дози й частоти прийому гормонів [1].

Ми показали здатність препарату з бобів сої ЕКСО запобігати негативним наслідкам прийому преднізолону: втрати маси тіла, зниженню щільності стегнової кістки й порушенню активності кісткових ферментів у молодих щурів [6]. Відома також профілактична роль при ГОП препаратів кальцію, вітаміну D, антирезорбентів [1, 4, 5]. У зв'язку із цим метою запропонованої роботи стало вивчення можливості профілактики ГОП за допомогою комбінованого препарату остеовіт, до складу якого входить екстракт із сої ЕКСО, цитрат кальцію, вітамін D₃ і сульфат цинку. Препарат випускають у таблетках по 0,6 г (НВА «Одеська біотехнологія»), він дозволений до застосування в якості дієтичної біологічно активної добавки (висновок МОЗ України № 05.03.02 06/47503 від 25.11.2004).

* Адреса для листування (Correspondence): Інститут стоматології АМН України, вул. Ришельовська, 11, м. Одеса, 65026, Україна

Матеріали й методи

Експеримент проведений на 12-місячних самках щурів лінії Вістар стадного розведення, середньою масою 247 ± 12 г. Тварин утримували в стандартних умовах віварію. Глюкокортикоїдний остеопороз відтворювали за допомогою введення в питну воду преднізолону з розрахунку одержання кожним щуром 5 мг/кг щодня [5]. 36 щурів були розділені на три групи, по 12 особин у кожній: 1 – інтактний контроль, 2 – модель ГОП, 3 – модель ГОП із введенням остеовіту 500 мг/кг. Препарат вводили внутрішньощлунково щодня у вигляді водної суспензії. Тварин виводили з експерименту у два етапи: через 15 і 60 днів під тіопенталовим наркозом (20 мг/кг). Виділяли стегнові кістки, у яких визначали щільність [7].

У гомогенатах стегнових кісток, які виготовляли на цитратному буфері рН 6,1 з розрахунку 75 мг/мл, оцінювали активність кислій й лужної фосфатази (КФ і ЛФ, відповідно), загальну протеолітичну активність (ЗПА), активність еластази й вміст розчинного білка [7]. Статистичну обробку отриманих результатів проводили з використанням *t*-критерію Стьюдента [8].

Результати і їх обговорення

Дані, представлені у табл. 1, свідчать про негативний вплив преднізолону на щільність стегнової кістки тварин. Так, після 30-денного прийому преднізолону в дозі 5 мг/кг щільність стегнової кістки щурів знизилася несуттєво ($P > 0,2$), а через 60 днів – вірогідно ($P < 0,001$). Зменшення цього показника говорить про зниження рівня мінеральних речовин у кістковій тканині, що прогресує при тривалому вживанні глюкокортикоїдів.

Одночасне введення тваринам преднізолону й остеовіту попереджало зниження щільності стегнової кістки. При проведенні аналізу через 30 днів щільність стегнової кістки щурів, що одержували остеовіт, не відрізнялася від щільності кісток у здорових тварин. А через 60 днів щільність кісток щурів, яким одночасно вводили преднізолон і остеовіт, знизилася на 0,9 % у порівнянні з 6,0 % у тварин, що одержували тільки преднізолон. Таким чином, результати, які представлені у табл. 1, переконливо показують остеопротекторну дію остеовіту на тлі тривалого застосування глюкокортикоїдів.

Преднізолон викликав істотні порушення метаболізму в кістковій тканині тварин, причому, більшою мірою білкового, ніж мінерального. Результати дослідження активності протеолітичних ферментів, фосфатази і вмісту білка в кістковій тканині щурів при моделюванні ГОП і його профілактиці остеовітом представлені у табл. 2.

Аналіз активності фосфатази кісткової тканини через 15 днів після застосування преднізолону не виявив істотних змін активності КФ і ЛФ. Введення остеовіту протягом 15 днів також не справило помітного впливу на активність кісткових фосфатаз. При дослідженні кісткової тканини на 60 день експерименту виявилось, що преднізолон викликав вірогідне зростання активності КФ ($P < 0,001$) і ЛФ ($P < 0,001$). Збільшення активності КФ свідчить

Таблиця 1. Щільність стегнової кістки (г/см³) у щурів експериментальних груп

Тривалість дослідження	Інтактні тварини	Тварини з ГОП	Тварини з ГОП, які отримували остеовіт
15 днів	$1,674 \pm 0,010$	$1,651 \pm 0,013$ $P > 0,2$	$1,685 \pm 0,007$ $P > 0,4$ $P_1 > 0,6$
60 днів	$1,662 \pm 0,005$	$1,561 \pm 0,018$ $P < 0,001$	$1,646 \pm 0,003$ $P < 0,02$ $P_1 < 0,001$

Примітка: В обох таблицях: *P* – вірогідність відмінностей з інтактною групою, *P*₁ – із групою ГОП.

Таблиця 2. Активність фосфатаз, протеаз та вміст білка у кістковій тканині щурів

Показники	Тривалість досліджу, днів	Інтактні тварини	Тварини з ГОП	Тварини з ГОП, які отримували остеовіт
Активність КФ, нкат/г	15	19,41 ± 1,61	23,89 ± 3,76 P > 0,5	20,17 ± 1,96 P > 0,8 P ₁ > 0,4
	60	21,47 ± 1,82	37,19 ± 2,96 P < 0,001	25,18 ± 1,43 P > 0,4 P ₁ < 0,002
Активність ЛФ, нкат/г	15	93,7 ± 6,3	89,5 ± 7,2 P > 0,5	84,7 ± 5,1 P > 0,25 P ₁ > 0,6
	60	84,9 ± 5,1	157,9 ± 10,8 P < 0,001	103,4 ± 12,6 P > 0,2 P ₁ < 0,002
Загальна протеолітична активність, нкат/г	15	0,51 ± 0,03	0,35 ± 0,02 P < 0,01	0,46 ± 0,05 P > 0,5 P ₁ < 0,01
	60	0,46 ± 0,05	0,21 ± 0,02 P < 0,001	0,50 ± 0,07 P > 0,6 P ₁ < 0,001
Активність еластази, нкат/г	15	4,62 ± 0,41	7,38 ± 0,59 P < 0,002	4,87 ± 0,54 P > 0,7 P ₁ < 0,01
	60	4,15 ± 0,27	7,26 ± 0,53 P < 0,001	5,60 ± 0,43 P < 0,05 P ₁ < 0,02
Вміст білка, мг/г	15	31,21 ± 1,92	28,67 ± 1,17 P > 0,25	38,9 ± 2,7 0,05 < P < 0,1 P ₁ < 0,001
	60	39,75 ± 2,72	25,32 ± 1,84 P < 0,001	34,73 ± 4,12 P > 0,3 P ₁ < 0,05

про підвищення фізіологічної активності остеокластів і, отже, про посилення резорбції кісткової тканини. Підйом активності ЛФ у кістковій тканині (маркера остеобластів), імовірно, є компенсаторною реакцією на негативну дію преднізолону. Виявленими порушеннями мінерального обміну в кістковій тканині можна пояснити істотне зниження щільності стегнової кістки щурів після тривалого прийому преднізолону (табл. 1).

Якщо застосування остеовіту протягом 15 днів не вплинуло на активність кісткових фосфатаз, то через 60 днів цей препарат ефективно гальмував підвищення активності обох ферментів. У кістковій тканині щурів, яким вводили остеовіт 60 днів, активність КФ і ЛФ відповідала рівню у інтактних тварин (табл. 2).

На 15 день одержання щурами преднізолону вміст розчинного білка в кістковій тканині істотно не змінився ($P > 0,25$), а на 60 день – зменшився ($P < 0,05$), що може свідчити про порушення білкового обміну в кістковій тканині (табл. 2). Поряд із цим, у кістках тварин, яким вводили профілактично остеовіт, рівень білка на 15 день експерименту проявляв тенденцію до підвищення

($0,05 < P < 0,1$), а на 60 день експерименту відповідав значенням у інтактних щурів ($P > 0,3$).

В наших попередніх роботах встановлено, що комплекс протеолітичних ферментів, активність яких визначають за гідролізом казеїну при рН 7,6 (ЗПА), бере участь в утворенні колагену кісткової тканини [9]. У табл. 2 показано зниження ЗПА уже через 15 днів прийому преднізолону і ще більш виражене падіння її через 60 днів. Отримані результати свідчать про пригнічення преднізолоном біосинтезу колагену кістковою тканиною. Профілактичне введення остеовіту запобігало негативному впливу преднізолону й сприяло збереженню ЗПА на нормальному рівні в обидва строки дослідження ($P > 0,5$ і $P > 0,6$) (табл. 2).

Поряд із пригніченням утворення колагену, застосування преднізолону призвело до інтенсифікації гідролізу білкової матриці кісткової тканини, про що свідчить активація однієї із протеаз, що бере участь у цьому процесі, а саме еластази. Активність цього ферменту в кістковій тканині щурів виросла в 1,5 рази на 15 день прийому преднізолону й збереглася на такому високому рівні через 60 днів його застосування (табл. 2).

У кістковій тканині тварин, яким одночасно із преднізолоном вводили остеовіт, активність еластази не відрізнялася від нормальних значень через 15 днів ($P > 0,7$), і підвищилася на 60 день ($P < 0,05$). Незважаючи на це, можна вважати, що остеовіт має профілактичний вплив, оскільки цей препарат на початковій стадії прийому преднізолону повністю запобігав активації еластази, а через 60 днів – гальмував надмірний ріст активності цього ферменту. Так, у щурів, що одержували 60 днів преднізолон, активність еластази в кістковій тканині підвищилася на 74,9 %, а у тварин, яким додатково давали остеовіт, – усього на 34,9 % (табл. 2).

Проведене дослідження підтвердило негативний вплив преднізолону на кісткову тканину, що збільшується при тривалому вживанні препарату. Необхідно відзначити, що на початкових стадіях (15 день) преднізолон викликає порушення білкового обміну: зниження інтенсивності синтезу (падіння ЗПА) і активацію гідролізу колагену кісткової тканини (збільшення активності еластази), та не впливає на мінеральний обмін. Прийом преднізолону 60 днів ще більшою мірою гальмує інтенсивність біосинтезу колагену й призводить до активації фосфатаз (КФ і ЛФ), що руйнують гідроксиапатит кісткової тканини. Імовірно, внаслідок цих порушень відбувається зниження рівня розчинного білка в кістковій тканині й зменшення щільності стегнової кістки тварин.

Профілактичне регулярне введення щурам остеовіту (екстракту сої, цитрату кальцію, сульфату цинку й вітаміну D₃) за більшістю досліджуваних показників запобігало розвитку метаболічних порушень у кістковій тканині, викликаних преднізолоном, і сприяло збереженню щільності кісток тварин на нормальному рівні. Результати проведеного експериментального дослідження дають підставу рекомендувати комплексний препарат остеовіт для його призначення одночасно із глюкокортикоїдною терапією з метою запобігання розвитку остеопорозу.

Висновки

1. Негативний вплив преднізолону на кісткову тканину (порушення білкового, мінерального обміну, зниження рівня білка й щільності стегнової кістки) збільшується при його тривалому вживанні.

2. Під дією преднізолону спочатку відбуваються зміни білкового обміну: зниження синтезу з одночасною активацією гідролізу колагену кісткової тканини. При тривалому вживанні препарату спостерігаються порушення мінерального обміну в кістковій тканині.

3. Комплексний препарат остеовіт, який містить екстракт із сої ЕКСО, цитрат кальцію, вітамін D₃ і сульфат цинку, ефективно запобігає негативним метаболічним змінам в кістковій тканині, що викликані тривалим прийомом преднізолону, і зберігає в нормі щільність стегнової кістки щурів.

Література

1. Поворознюк В. В., Григорьева Н. В. Менопауза и костно-мышечная система. К.: ИПЦ «Экспресс», 2004. 512 с.
2. Фролькис В., Поворознюк В., Евтушенко О., Григорьева Н. Экспериментальный остеопороз // Doctor. 2003, № 6, 48-52.
3. Франке Ю., Рунге Г. Остеопороз. Пер. с нем. М.: Медицина, 1995. 304 с.
4. Зиганшина Л. Е., Бурнашова З. А., Валеева И. Х. и др. Сравнительное изучение эффективности димефосфона и ксидифона при стероидном остеопорозе у крыс // Эксперим. клин. фармакология. 2000, 63, № 6, 39-42.
5. Кропотов А.В., Колодник О.Л., Колдаев В.М. Влияние экстракта элеутерококка и иприфлавона на развитие глюкокортикоидного остеопороза // Бюл. эксперим. биол. мед. 2002, 133, № 3, 295-297.
6. Левицкий А. П., Макаренко О. А., Ходаков І. В., Зеленіна Ю. В. Остеотропна ефективність ЕКСО на моделі глюкокортикоїдного остеопорозу // Досягнення біології та медицини. 2006, № 2 (8), 45-49.
7. Левицкий А. П., Макаренко О. А., Деньга О. В. и др. Экспериментальные методы исследования стимуляторов остеогенеза: Метод. рекоменд. К.: ГФЦ, 2005. 36 с.
8. Сернов Л. Н., Гацура В. В. Элементы экспериментальной фармакологии. М.: Медицина, 2000, 117-119.
9. Левицкий А. П., Макаренко О. А., Ходаков І. В., Зеленіна Ю. В. Ферментативний метод оцінки стану кісткової тканини // Одеський медичний журнал. 2006, № 3, 17-21.

Использование препарата остеовит в профилактике глюкокортикоидного остеопороза

А. П. Левицкий, О. А. Макаренко

Институт стоматологии АМН Украины, г. Одесса, 65026, Украина

В экспериментальном исследовании, проведенном на крысах линии Вистар, моделировали глюкокортикоидный остеопороз при помощи введения с питьевой водой преднизолон в дозе 5 мг/кг. Опытной группе животных одновременно с преднизолоном профилактически внутрижелудочно вводили комплексный препарат остеовит, содержащий экстракт бобов сои, цитрат кальция, сульфат цинка и витамин D₃ в дозе 500 мг/кг. Показано, что преднизолон вызывает потерю костной ткани (по снижению плотности бедренной кости), нарушения белкового обмена (по подъему активности эластазы, снижению общей протеолитической активности и уровня белка в костной ткани) и минерального обмена (по увеличению активности кислой и щелочной фосфатаз в костной ткани). Также установлено, что преднизолон вначале приводит к нарушению белкового, и позже – минерального обмена в костной ткани. Применение остеовита в изучаемой дозе эффективно предотвращало метаболические нарушения в костной ткани и снижение плотности бедренной кости, вызванные преднизолоном. Проведенное экспериментальное исследование позволяет рекомендовать комплексный препарат остеовит для назначения в сочетании с длительной глюкокортикоидной терапией с целью предупреждения развития остеопороза.

Ключевые слова: глюкокортикоидный остеопороз, белковый обмен, минеральный обмен, плотность бедренной кости, профилактика, остеовит.

Use of preparation Osteovit in the prevention of glucocorticoid osteoporosis

A. P. Levitsky, O. A. Makarenko

Institute of Stomatology of AMS, 65026 Odesa, Ukraine

In an experimental study on Wistar rats the glucocorticoid osteoporosis was simulated by administration of prednisolone dosed at 5 mg/kg with drinking water. To the animals of experimental group simultaneously with prednisolone, the combined preparation Osteovit, containing soy beans extract, calcium citrate, zinc sulphate and vitamin D₃ at a dose of 500 mg/kg was administered intragastrically with prophylactic purpose. Prednisolone was shown to cause the loss of osseous tissue (by the reduction in femur density), impairment in protein metabolism (by the rise in elastase activity, reduction in general proteolytic activity and protein level in osseous tissue) and mineral metabolism (by the growth of activity of acid and alkaline phosphatases in osseous tissue). It was also revealed that prednisolone first results in disorders in protein – and later mineral metabolism – in osseous tissue. The application of osteovit at the dose under study prevented metabolic disorders in osseous tissue and reduction in femur density, caused by prednisolone. The experimental study allows to recommend prescription the complex preparation Osteovit in combination with long-term glucocorticoid therapy for the prevention of osteoporosis.

Key words: glucocorticoid osteoporosis, protein metabolism, mineral metabolism, femur density, prophylaxis, Osteovit.

(Надійшла 1.10.2007; надійшла в остаточній формі 6.11.2007)

ВПЛИВ ТАКСОЛУ НА РІВЕНЬ ФРАГМЕНТАЦІЇ ДНК І СТЕРОЇДОГЕННУ ФУНКЦІЮ В ДОБРОЯКІСНІЙ ГОРМОНАЛЬНО-НЕАКТИВНІЙ ПУХЛИНІ ТА ПОЗАПУХЛИННІЙ ТКАНИНІ КОРИ НАДНИРКОВИХ ЗАЛОЗ ЛЮДИНИ

Н. І. Левчук*, В. М. Пушкарьов

Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В. П. Комісаренка АМН України, м. Київ, 04114, Україна

Вивчали вплив різних концентрацій протипухлинного препарату таксолу на ступінь фрагментації ДНК та процеси стероїдогенезу в післяопераційній позапухлинній тканині, а також в тканині гормонально-неактивної пухлини кори надниркових залоз людини *in vitro*. Продемонстровано проапоптозний ефект таксолу в цих тканинах. Пухлинна тканина виявилась більш чутливою до дії високих концентрацій препарату у порівнянні з позапухлинною тканиною. В пухлинній тканині спостерігали також пригнічення синтезу кортикостероїдів. Обговорюються можливі механізми впливу таксолу на стероїдогенез та швидкість апоптозних процесів в позапухлинній тканині і тканині гормонально-неактивної пухлини кори надниркових залоз людини.

Ключові слова: таксол, апоптоз, фрагментація ДНК, стероїдогенез, гормонально-неактивна пухлина.

Протягом кількох останніх десятиріч увага дослідників зосереджена на вивченні канцеростатичних ефектів таксолу (паклітаксель, доцетаксель). Відомо, що таксол використовують як протипухлинний препарат при лікуванні деяких видів раку [1]. З'являються публікації, присвячені вивченню можливостей його використання для лікування злоякісних пухлин ендокринного походження, зокрема, раку щитоподібної залози [2, 3].

Раніше ми показали, що таксол посилює апоптоз в деяких типах тканин пухлин надниркових залоз людини [4]. Проте, незважаючи на проведені дослідження, антипроліферативний та проапоптозний ефекти таксолу в різних типах тканин пухлин надниркових залоз людини вивчені недостатньо. Практично не вивчалась дія препарату на функцію та обмін речовин в надниркових залозах.

Діагностика і лікування пухлинних захворювань надниркових залоз без ознак гормональної активності є актуальною проблемою сучасної ендокринології. Подібні пухлини виявляють при обстеженні випадково і їх наявність часто не супроводжується визначеною клінічною симптоматикою [5]. Оскільки частина з них діагностується як злоякісні пухлини, постає питання про необхідність консервативної терапії пухлини та її метастазів.

Метою роботи було дослідження ефектів таксолу щодо стероїдогенної функції та апоптозної фрагментації ДНК в позапухлинній тканині та тканині пухлини кори надниркових залоз людини.

* Адреса для листування (Correspondence): Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В. П. Комісаренка АМН України, вул. Вишгородська, 69, м. Київ, 04114, Україна

Матеріали та методи

На проведення робіт було одержано дозвіл комітету Інституту з біоетики. Об'єктом досліджень слугували зразки тканин з надниркових залоз хворих, прооперованих у хірургічному відділенні Інституту. Всього досліджено 7 позапухлинних тканин (3 в дослідях з таксолем і 4 – в дослідях з визначенням 11-ОКС) та 8 тканин пухлин (відповідно 3 та 5), які за біохімічними показниками виявились гормонально-неактивними.

Умови інкубації зрізів тканин, виділення ДНК та розділення її фрагментів проводили за методикою, що описана раніше [4]. Фотографії гелів обробляли за допомогою програми «Photo Capt Mw». Ефект таксолу виражали у відсотках щодо проби, яка інкубувалась без таксолу. Для визначення ступеня фрагментації важливе значення має кількість ДНК, яка нанесена на кожен трек геля. Щоб виключити цей чинник, інтенсивність фрагментації ДНК розраховували як відношення суми вмісту низькомолекулярних (200-600 пар основ) фрагментів ДНК до загальної кількості ДНК на даному треку агарозного геля, яку приймали за 100 %.

Для дослідження стероїдогенезу зрізи тканини (20 мг) інкубували в 500 мкл живильного середовища 199 (Державний експериментальний завод медичних препаратів, Україна). Інкубаційне середовище також містило 10 мМ HEPES (рН 7,4) «Calbiochem», США) та 2 мг/мл сироваткового альбуміну бика. Тривалість інкубації становила 3 год. До середовища інкубації додавали розчин таксолу в диметилсульфоксиді у кінцевій концентрації 10^{-7} - 10^{-5} М. Контрольна проба містила таку ж кількість диметилсульфоксиду.

Кількісний вміст сумарних 11-ОКС в живильному середовищі визначали спектрофлуориметричним методом [6].

Статистична обробка даних здійснена із застосуванням t-критерію Стьюдента [7].

Результати та їх обговорення

Для оцінки апоптозних змін в тканині надниркових залоз людини ми обрали визначення фрагментації ДНК, яка є свідченням завершальних етапів апоптозу. При розділенні ДНК методом електрофорезу на електрофореграмі утворюється характерна «драбинка» із фрагментів ДНК, кратних ~ 200 пар основ за розмірами. Кількісне визначення ступеня фрагментації ДНК при електрофоретичному розділенні її фрагментів може бути показником інтенсивності апоптозу [4, 8].

Проведені дослідження показали, що інтенсивність фрагментації ДНК в позапухлинній тканині та тканині пухлини кори надниркових залоз відрізнялися. Так, в позапухлинній тканині спостерігали незначне посилення фрагментації ДНК (біля 5 %) у порівнянні з пробою, де таксол був відсутній (табл. 1, мал. А). Пухлинні тканини кори надниркових залоз виявились чутливішими до дії високих концентрацій (10^{-5} М) таксолу (табл. 1, мал., Б). Із збільшенням концентрації таксолу в інкубаційному середовищі з 10^{-7} до 10^{-5} М фрагментація ДНК посилювалась пропорційно концентрації (табл. 1, мал. Б). Більша чутливість пухлинної тканини до таксолу у порівнянні з умовно нормальною, напевно, пояснюється посиленою інтенсивністю проліферативних процесів в пухлинах, що робить їх більш вразливими до дії препарату.

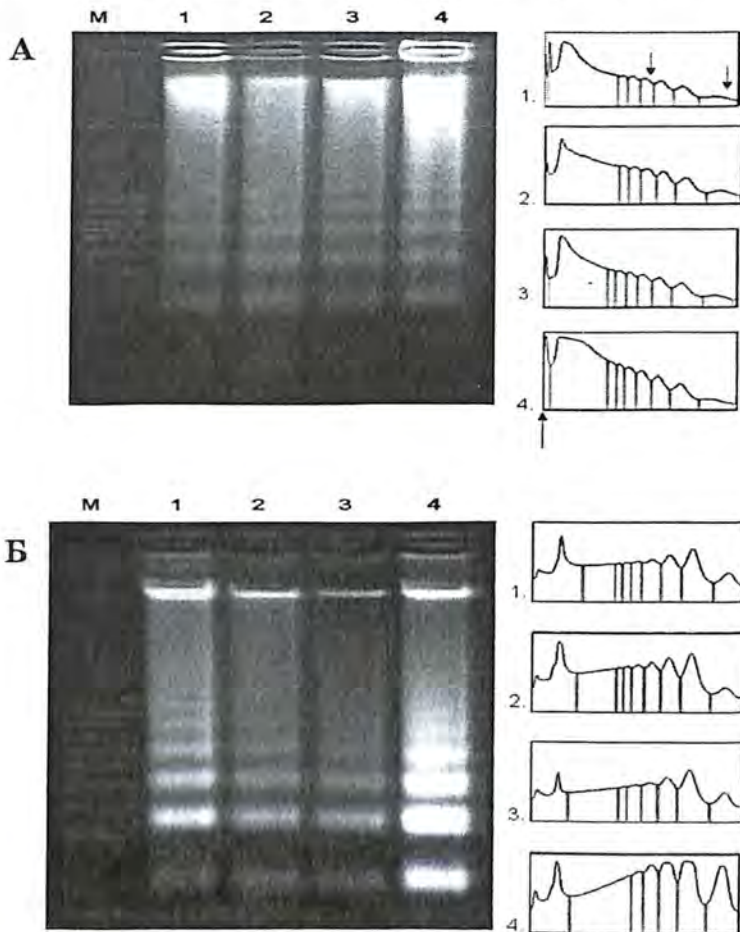
Таким чином, отримані дані свідчать про посилення таксолем апоптозу як в позапухлинній тканині, так і в тканині пухлини надниркової залози, причому, що надзвичайно важливо, остання є більш чутливою до даної сполуки.

Для повнішого розуміння механізмів дії таксолу на тканину надниркової залози необхідно вивчити ефекти таксолу щодо її обміну речовин і, в першу чергу, головної функції – стероїдогенезу. Для цього досліджували вміст 11-ОКС в живильному середовищі при інкубації тканини з таксолем у концентрації 10^{-7} - 10^{-5} М.

Таблиця 1. Вплив таксолу на інтенсивність фрагментації ДНК в позапухлинній тканині та тканині пухлини кори надниркових залоз людини

Тип тканини	Інтенсивність фрагментації ДНК (%) при різних концентраціях таксолу в інкубаційному середовищі			
	Контроль	10^{-7} М	10^{-6} М	10^{-5} М
Позапухлинна тканина (n=3)	100	$105,0 \pm 7,1$	$104,7 \pm 7,9$	$105,0 \pm 1,2^*$
Тканина гормонально-неактивної пухлини (n=3)	100	$106,7 \pm 1,7^*$	$110,7 \pm 5,4$	$116,0 \pm 3,5^{*#}$

Примітка: * – різниця між контролем та дослідом вірогідна ($P < 0,05$); # – різниця між позапухлинною тканиною і тканиною пухлини вірогідна ($P < 0,05$).



Мал. Електрофореграми та сканограми ДНК, одержані з позапухлинної тканини (А) та з тканини гормонально-неактивної пухлини (Б). М – ДНК-маркер (100-1000 п.о.), 1 – контроль, 2 – таксол (10^{-7} М), 3 – таксол (10^{-6} М), 4 – таксол (10^{-5} М). На вертикальній осі сканограм представлена оптична густина, стрілкою відмічена точка старту. Пунктирними стрілками на верхній сканограмі відмічені фрагменти ДНК (200-600 п.о.), які враховували при обчисленні ступеня фрагментації.

Таблиця 2. Вплив таксолу на продукцію 11-ОКС

Тип тканини	Продукція 11-ОКС (%) при різних концентраціях таксолу в інкубаційному середовищі			
	Контроль	10 ⁻⁷ М	10 ⁻⁶ М	10 ⁻⁵ М
Позапухлинна тканина (n=4)	100	95,3±28,9	111,0±27,1	114,0±10,9
Тканина гормонально-неактивної пухлини (n=5)	100	85,6±9,6	79,2±9,2*	98,8±9,4

Примітка: * – різниця між контролем та дослідом вірогідна (P<0,05).

Встановлено, що таксол впливає на рівень 11-ОКС в наднирковій тканині. Причому пухлинна тканина виявилась більш чутливою до дії таксолу, ніж позапухлинна тканина (табл. 2). Вірогідне пригнічення синтезу 11-ОКС в тканині гормонально-неактивної пухлини спостерігалось при концентрації сполуки 10⁻⁶ М. Причиною більшої чутливості пухлинної тканини, можливо, є більш інтенсивна динаміка (полімеризація-деполімеризація) мікротрубочок в такій тканині у порівнянні з позапухлинною, що пов'язано з більшою частотою поділів клітин.

Вважається, що цитотоксичний ефект таксолу пов'язаний з його здатністю стабілізувати мікротрубочки [9] і, як наслідок, порушувати нормальний поділ клітини та провокувати зупинку клітинного циклу у фазі G2/M, що, в свою чергу, може призводити до загибелі клітини шляхом апоптозу або некрозу. Індукція таксолом апоптозних процесів в різних типах клітин здійснюється за рахунок активації родини серин-треонінових протеїнкіназ (МАРК) і, в першу чергу, с-Jun NH2-термінальної кінази або стрес-активованої протеїнкінази (JNK). Меншою мірою ефект таксолу опосередковується р38 МАР-кіназою [2, 10]. Ці ферменти активують відповідні фактори транскрипції, які посилюють експресію генів, необхідних для здійснення апоптозу. Позаклітинні сигнал-залежні кінази (ERK 1/2) зазвичай беруть участь у біохімічних механізмах, що протидіють проапоптозним ефектам таксолу [2].

Цитоскелет відіграє значну роль у регуляції процесу стероїдогенезу в надниркових залозах. Основними структурними елементами цитоскелету є мікротрубочки, мікрофіламенти та проміжні філаменти. Мікротрубочки – це компоненти цитоскелету, які складаються з глобулярного білка тубуліну [11]. Ряд цитостатичних сполук (колхіцин, цитохалазин, вінбластин, таксол) можуть впливати на процеси полімеризації мікротрубочок [12-14]. Ми показали, що порушення функції мікротрубочок у присутності колхіцину пригнічує утворення альдостерону, напевно, за рахунок деполімеризації мікротрубочок [15]. Такі ж дані були одержані й іншими дослідниками [12, 16]. Припускається, що мікротрубочки беруть участь у транспортуванні холестерину до мітохондрій.

Як видно з представлених даних, таксол, який гіперполімеризує мікротрубочки, також пригнічує стероїдогенез в пухлинній тканині надниркових залоз.

Таким чином, для здійснення стероїдогенезу важливим є не збереження структури мікротрубочок, а їх динаміка, яка полягає в циклічній полімеризації-деполімеризації, оскільки і колхіцин, який деполімеризує мікротрубочки, і таксол, який їх гіперполімеризує, пригнічують стероїдогенез в корі надниркових залоз.

Висновки

1. Таксол виявляє проапоптозний ефект в позапухлинній тканині та більшою мірою – в тканині гормонально-неактивної пухлини.

2. В гормонально-неактивних пухлинах таксол пригнічує стероїдогенез, можливо, за рахунок гіперполімеризації мікротрубочок. Оскільки як колхіцин, який деполімеризує мікротрубочки, так і таксол, який їх гіперполімеризує, пригнічують стероїдогенез, можна припустити, що для здійснення стероїдогенезу в корі надниркових залоз важливою є динаміка мікротрубочок, а не їх цілісність.

Література

1. Rowinsky E. K. The development and clinical utility of the taxane class of antimicrotubule chemotherapy agents // *Ann. Rev. Med.* 1997, **48**, 353-374.
2. Pushkarev V. M., Starenki D. V., Saenko V. A. et al. Molecular mechanism of the effects of low concentrations of taxol in anaplastic thyroid cancer cells // *Endocrinology*. 2004, **145**, N 7, 3143-3152.
3. Ain K. B., Egorin M. J., DeSimone P. A. Treatment of anaplastic thyroid carcinoma with paclitaxel: phase 2 trial using ninety-six-hour infusion. Collaborative Anaplastic Thyroid Cancer Health Intervention Trials (CATCHIT) Group // *Thyroid*. 2000, **10**, N 7, 587-594.
4. Kostyuchenko N., Pushkarev V., Kashevarov G. et al. Effects of N-acylethanolamines and various antimitotic agents on apoptotic DNA fragmentation in conventionally normal and tumor tissue of human adrenals // *Exp. Oncol.* 2005, **27**, N 3, 215-219.
5. Кваченюк А. Н. Злокачественные гормонально-неактивные опухоли надпочечников: аспекты диагностики и лечения // *Клінічна хірургія*. 2003, N 10, 29-31.
6. Балашов Ю. Г. Флюориметрический микрометод определения кортикостероидов: сравнение с другими методами // *Физиол. журн. СССР*. 1990, **76**, N 2, 280-283.
7. Рокицкий П. Ф. Биологическая статистика // Минск: Вышэйшая школа, 1973. 318 с.
8. Патент 16825 U UA, МПК G01N 30/00. Процес кількісної оцінки інтенсивності апоптозу при дії антимиіотичних сполук на пухлини надниркових залоз / Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В. П. Комісаренка АМН України; Пушкар'юв В. М., Тронько М. Д., Костюченко Н. М. З.- № u 200603121; Заявл. 23.03.2006; Опубл. 15.08.2006, Бюл. № 8, 2006.
9. Rowinsky E. K., Donehower R. C. Paclitaxel (Taxol) // *N. Engl. J. Med.* 1995, **332**, 1004-1014.
10. Seidman R., Gitelman I., Sagi O. et al. The role of ERK 1/2 and p38 MAP-kinase pathways in taxol-induced apoptosis in human ovarian carcinoma cells // *Exp. Cell Res.* 2001, **268**, 84-92.
11. Jordan M. A., Wilson L. Microtubules as a target for anticancer drugs // *Cancer*. 2004, **4**, 253-265.
12. Denkova R., Ivanov I., Dimitrova M. Microtubules and regulation of granulosa cell steroidogenesis by porcine granulosa cell conditioned medium // *Endocr. Regul.* 1992, **26**, N 4, 195-199.
13. Yvon A.-M. C., Wadsworth P., Jordan M. A. Taxol suppresses dynamics of individual microtubules in living human tumor cell // *Mol. Biol. Cell.* 1999, **10**, N 4, 947-959.
14. Shibaya M., Deptula K. M., Korzekwa A. Involvement of the cytoskeleton in oxytocin secretion by cultured bovine luteal cells // *Biol. Reprod.* 2005, **72**, 200-205.
15. Пушкар'юв В. М., Костюченко Н. М. Вплив деяких антимиіотичних агентів на залежну від калію стимуляцію мічення альдостерону // *Ендокринологія*. 2003, **8**, N 2, 286-290.

16. Carnegie J. A., Tsang B. K. The cytoskeleton and rat granulosa cell steroidogenesis: possible involvement of microtubules and microfilaments // *Biol. Reprod.* 1988, **38**, 100-108.

Влияние таксола на уровень фрагментации ДНК и стероидогенную функцию в доброкачественной гормонально-неактивной опухоли и внеопухолевой ткани коры надпочечников человека

Н. И. Левчук, В. М. Пушкарев

Институт эндокринологии и обмена веществ им. В. П. Комиссаренко АМН Украины, г. Киев, 04114, Украина

Изучали влияние различных концентраций таксола на степень фрагментации ДНК и процессы стероидогенеза в послеоперационной внеопухолевой ткани, а также в ткани гормонально-неактивной опухоли коры надпочечников человека *in vitro*. Продемонстрирован проапоптотический эффект таксола в этих тканях. Опухолевая ткань оказалась более чувствительной к действию соединения в сравнении с внеопухолевой тканью. В опухолевой ткани наблюдали также угнетение синтеза кортикостероидов. Обсуждаются возможные механизмы влияния таксола на стероидогенез и скорость апоптотических процессов во внеопухолевой ткани и в ткани гормонально-неактивной опухоли коры надпочечников человека.

Ключевые слова: таксол, апоптоз, фрагментация ДНК, стероидогенез, гормонально-неактивная опухоль.

Effect of taxol upon the DNA laddering extent and steroidogenesis in benign hormonally inactive tumour tissue and extratumoral tissue of human adrenal cortex

N. I. Levchuk, V. M. Pushkarev

V. P. Komisarenko Institute of Endocrinology and Metabolism of AMS, 04114 Kyiv, Ukraine

The effect of different taxol concentrations upon the DNA laddering extent and steroidogenesis in postoperative extratumoral tissue and hormonally inactive tumour tissue of human adrenal cortex was studied *in vitro*. The proapoptotic effect of taxol on these tissues was shown. The tumour tissue was more sensitive to the action of the compound compared to extratumoral tissue. Suppression of corticosteroid synthesis in tumour tissue was also observed. The possible mechanisms of influence of taxol on steroidogenesis and rate of apoptotic processes in extratumoral tissue and hormonally inactive tumour tissue of human adrenal cortex are discussed.

Key words: taxol, apoptosis, DNA fragmentation, steroidogenesis, hormonally inactive tumour.

(Надійшла 24.01.2008)

ТОТОЖНІСТЬ (МІМІКРІЯ) АНТИГЕНІВ ПІДШЛУНКОВОЇ ЗАЛОЗИ ТА ВІРУСІВ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ І ВЛАСНІ ДОСЛІДЖЕННЯ)

Н. В. Іванська^{1}, С. В. Мельниченко², Р. Г. Лукашова²,
Е. М. Жеребцова¹*

¹Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л. В. Громашевського АМН України, м. Київ, 03038; ²Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В. П. Комісаренка АМН України, м. Київ, 04114, Україна

В огляді представлено дані щодо впливу збудників інфекційних хвороб на виникнення у людей цукрового діабету 1 і 2 типів. Наведено приклади участі вірусу Коксаки серотипів В4 та В5, вірусу червонички, цитомегаловірусу та інших інфекційних чинників у патогенезі цього захворювання. Вважається, що можливою причиною такого явища є перехресні реакції імунної системи людського організму на інфекційні чинники та автоантигени підшлункової залози. Автоімунні реакції при виникненні цукрового діабету пов'язуються з молекулярною тотожністю (мімікрією) структур антигенів, що передують появі діабету (глутаматдекарбоксілази, інсуліну, тирозинфосфатази, острівцевих клітин) з амінокислотною послідовністю вірусних пептидів. Зазначено, що для «запуску» процесів імунного «розпізнавання» автоантигенів та інфекційних антигенів, необхідна участь багатьох компонентів імунної системи людського організму і наявність певного генетичного підґрунтя.

За нашими даними, сироватки крові деяких хворих на цукровий діабет 1 типу та 2 типу містять антитіла проти ВІЛ-специфічних білків, причому титри таких антитіл не корелюють з наявністю антитіл до інсуліну.

Ключові слова: цукровий діабет 1 типу, цукровий діабет 2 типу, мімікрія, антитіла, віруси.

Цукровий діабет (ЦД) належить до хвороб, дуже поширених у сучасному світі. За даними ВООЗ, сьогодні на нашій планеті нараховується біля 130 млн чоловік з цим захворюванням і передбачено, що до 2010 р. ця цифра зросте аж до 300 млн [1]. Частота самого лише ЦД першого типу (ЦД-1), виникнення якого пов'язують з деструкцією бета-клітин, протягом останнього десятиріччя щороку підвищувалась на 3 % [2-3]. Щодо хворих на ЦД другого типу (ЦД-2), для яких характерне поступове зниження секреції інсуліну на тлі інсулінорезистентності, то частка осіб з таким діагнозом становить 85-90 % від загальної кількості хворих на ЦД; в останні роки спостерігають також зростання кількості хворих на ЦД-2. Такий результат може частково пояснюватись тим, що клінічні обстеження охоплюють все ширші верстви населення, а чутливість та специфічність використовуваних методів невпинно підвищується. Проблеми ЦД всебічно досліджуються із застосуванням найрізноманітніших методологічних підходів, опрацьованих у процесі загального стрімкого розвитку біологічних та медичних галузей знань. Завдяки цьому отримано багато

* Адреса для листування (Correspondence): Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л. В. Громашевського АМН України, вул. Амосова 5, м. Київ, 03038, Україна

нових результатів. Деякі з висновків, що на них ґрунтуються, стали достатньо несподіваними для медичного загалу. Принаймні, протягом останнього десятиліття багато в чому доповнилися та змінилися уявлення про походження та механізми виникнення ЦД. Якщо виражатися точніше, то йдеться про типи ЦД, які можуть відрізнятися як за своїм походженням, так і за механізмами їх запуску [4].

За сучасними уявленнями, у появі ЦД відіграють суттєву роль спадкові чинники, але до самих лише спадкових чинників не можна звести виникнення цього захворювання. Важливу роль відіграють і фактори довкілля, серед яких істотна роль належить збудникам інфекційних захворювань [5, 6]. За деякими даними, взаємодія цих двох груп факторів і визначає появу хвороби або уникнення цієї небезпеки для організму. Аналіз відомостей з цього питання міститься в поданому огляді.

Протягом останніх 20 років все частіше повідомляли про те, що багато осіб стають пацієнтами діабетологів після перенесених інфекційних недуг, іноді досить швидко, а іноді й з деякою, часом і значною, затримкою в часі. Збудники багатьох з цих захворювань (хоча й не всіх) не розмножуються в тканинах підшлункової залози та не могли, здавалося б, прямо пошкоджувати й руйнувати β -клітини острівців Лангерганса. Роль таких збудників, очевидно, є опосередкованою і багато в чому визначається участю імунної системи хазяїна.

Один з найяскравіших прикладів безпосередньої участі вірусів у розвитку ЦД-1 отримано при роботі з чутливими до цього захворювання лініями мишей та діабетогенним штамом вірусу мишачого енцефаломіокардиту (ЕМС-D) [5]. При зараженні мишей цим штамом у високих титрах класичний ЦД-1 розвивається протягом усього лише трьох днів після зараження завдяки швидкому розмноженню вірусу в β -клітинах острівців Лангерганса та руйнуванню цих клітин у результаті прямої цитопатичної дії (ЦПД) збудника. Подібний же процес спостерігають в організмі хом'яків. У даному випадку важко говорити про якусь імунну опосередкованість виникнення ЦД-1: за такий короткий час імунна система просто не встигає відреагувати на появу збудника та на його розмноження в організмі.

Слід, правда, відмітити, що вірус ЕМС-D стає діабетогенним внаслідок точкової мутації після однієї амінокислотної заміни, що посилює спорідненість вірусу до рецепторів β -клітин [7]. Зрозуміло, що спорідненість чи неспорідненість рецепторів до вірусу – один з найважливіших чинників, які визначають розвиток ЦД-1 або ж стають йому на заваді.

При застосуванні для зараження ЕМС-D у низьких титрах вірус розмножується дещо повільніше, а тому присутність вірусу викликає синтез антитіл (АТ), які нейтралізують ЕМС-D та появу активованих макрофагів. У цьому випадку розвиток ЦД-1 викликається активацією макрофагів під впливом Src-кіназ та наступним синтезом фактора некрозу пухлин- α (TNF- α), інтерлейкіну-1 β та оксиду азоту (NO).

Про ЦПД вірусу-збудника на клітини підшлункової залози мишей та людини, де розмножується збудник, можна також однозначно стверджувати щодо РНК-вмісного вірусу Коксакі серотипів В4 та В5 з родини ентеровірусів (Enteroviridae). У деяких хворих вірус Коксакі В4 виділяли з тканин ураженої підшлункової залози при гострому ЦД-1 [8]; у цьому випадку введення мишам вірусу, виділеного від людини, викликало в тварин розвиток ЦД. Проте при невисоких титрах вірусу Коксакі В4 може йтися, мабуть, не лише про токсичний вплив самого вірусу на клітину, але також про опосередкований імунною системою механізм (чи механізми) ураження організму вже за участю антитіл до антигенів вірусу або β -клітин підшлункової залози та цитотоксичних лейкоцитів.

Крім вірусів Коксакі В4 та В5, вивчали вплив інших вірусів людини на виникнення ЦД-1 [9]. Йдеться про екховірус типу 11 (EV11), поліовірус типу 1, гексоновий білок аденовірусу та синтетичний ентеровірусний пептидний антиген (KEVPALTA VETGAT-C), який виявився спільним епітопом декількох ентеровірусів. Автори намагалися дослідити роль ентеровірусів у патогенезі ЦД-1, визначаючи антитіла класів IgG та IgA проти названих вірусів у дітей до виникнення клінічного діабету. Аналізували наявність рівня протівірусних антитіл класу IgG та автоантитіл проти антигенів підшлункової залози, що передують появі діабету, у сироватках крові новонароджених немовлят та у крові їхніх матерів наприкінці третього місяця вагітності. Антигени клітин підшлункової залози, проти яких виявляються автоантитіла у сироватках крові хворих на ЦД, – це антигени острівцевих клітин (ICA), інсуліну (IAA), декарбоксилази глутамінової кислоти (GAD) та тирозинфосфатази (IA-2) [10]. Рівень антитіл до цих антигенів виявився високим у крові матерів та в пуповинній крові всіх немовлят. Після народження у немовлят рівні цих антитіл падали аж до шестимісячного віку. У контрольній групі дітей та в дітей, у яких пізніше виявили автоімунні антитіла, кількість протівірусних IgG теж не відрізнялася до 6-місячного віку. Пізніше, від півроку до двох років, вміст антитіл проти вірусів Коксакі В4, EV11 та синтетичного пептиду у дітей з автоантитілами виявився вищим, ніж у контрольній групі, в той час як рівні антитіл проти вірусу поліомієліту та аденовірусу були близькими в обох групах обстежених дітей. Різниця щодо вмісту антитіл проти вірусів Коксакі В4, EV11 та синтетичного пептиду особливо помітна у хлопців та в осіб з генотипом HLA-DQB1*0302/х, тобто імунна відповідь на ентеровірусні інфекції перебуває під впливом факторів, визначуваних HLA [11].

На відміну від згаданих вище патогенів, такі збудники як вірус червонички (краснухи, RV) та цитомегаловірус (CMV) іншим чином пов'язані з розвитком ЦД-1, оскільки встановлено кореляцію між часом виникнення ЦД-1 та довготривалим виявленням названих вірусів у крові [11]. Щоб встановити взаємозв'язки між захворюванням та збудником червонички, працювали з набором моноклональних антитіл (МКА), що впізнають капсидний білок RV [12]. Як виявилось, ці антитіла приєднуються до певної капсидної ділянки RV і здатні реагувати також з екстрактами острівцевих β -клітин. Скориставшись методом імуноблотингу, показали, що епітоп, подібний до послідовності, атакованої МКА С9, міститься в структурі острівцевого білка завбільшки 52 кДа і стає мішенню для автоантитіл при ЦД-1 у людини і в мишей лінії NOD, тобто тварин без генетичної схильності до ожиріння та з високою частотою розвитку ЦД в популяції. Можна припустити, що RV посилює здатність до утворення автоімунних антитіл проти β -клітин також в осіб з відповідним генотипом.

Аналіз послідовностей з антигенів GAD та RV доводить, що в них присутні схожі відрізки пептидів, які можуть реагувати з клітинами генотипу HLA DR3/DR4. Група дослідників Ванкуверського університету [13] показала, що за результатами реакції проліферації лімфоцитів у випадку первинно виявленого ЦД найчастіше позитивну відповідь отримано з пептидом GAD65 (252-266) – у 77 % осіб, в той час як при дослідженнях з пептидом GAD67 (212-226) позитивні результати одержували у 61 % осіб з пізніше встановленим діабетом. Послідовність RVE1 (157-176), яка характерна для вірусу червонички, розпізнається лімфоцитами всіх груп хворих на ЦД. Що стосується Т-клітинних клонів з рецепторами, специфічними для пептидів GAD65 (252-266), GAD65 (274-286) та GAD67 (212-226), то кожен з них у пробах на цитотоксичність показав перехресне реагування з двома-чотирма пептидами RV, включаючи RVE1 та RVE2 (87-107). Отримано статистично значиму кореляцію між амплітудою відповіді мононуклеарних клітин периферичної крові з RV1, RV2 та GAD65 у хворих з недавно виниклим діабетом і з GAD67 в осіб, що давно хворіють на ЦД. RV

та CMV, як і інші хвороботворні чинники, можуть сприяти виникненню ЦД-1 при певному генетичному підґрунті. Показано, що в ДНК осіб, у яких виникає ЦД-1 за наявності довготривалої присутності CMV, існує три сайти рестрикції BamHI-DQ та три сайти рестрикції TaqI-DQ.

Автоантитіла проти острівцевих клітин у людини описано також після захворювання на інфекційний паротит. Іноді до виникнення ЦД-1 бувають причетні такі патогени, як вірус Епштейна-Барра та вірус вітряної віспи-оперезного лишая в людини [14].

У автоімунних реакціях важлива роль належить антигенам людських лейкоцитів (HLA), молекулам класів I та II основного комплексу гістосумісності (МНС). Як і інші антигени МНС, вони, при певному спадковому підґрунті, стають учасниками автоімунних реакцій, в яких провідну роль відіграє антигенна мімікрія різних за походженням білків. Приклади такого явища – відомі та поширені захворювання, як-от анкілозивний спондиліт, ревматоїдний артрит, розсіяний склероз та автоімунні реакції при виникненні і розвитку різних типів ЦД [15].

Як вище було зазначено, нові результати, що стосуються автоімунних реакцій при ЦД, пов'язані з численними відкриттями в галузі імунології та суміжних знань, зокрема, з випадками молекулярної (антигенної) мімікрії, яку розуміють як наявність тотожних чи подібних структур у різних, часто й дуже віддалених організмів, наприклад, у збудника захворювання та в ураженого хазяїна [16-18]. Подібні структури бувають представлені цілими молекулами або ж частинами молекул різних генетичних наборів. Вони можуть існувати як результат наявності тотожних секвенційних епітопів (однакових чи дуже подібних амінокислотних послідовностей різної довжини) або ж виникати як наслідок утворення конформаційних епітопів через певну просторову укладку первинних структур біомолекул. Деякі дослідники [19] наголошують на неправомірності зведення молекулярної мімікрії до самої лише значної подібності секвенційних епітопів. Комп'ютерно-аналітичні порівняння амінокислотних та нуклеотидних послідовностей – метод, необхідний для досліджень молекулярної мімікрії, але йому притаманні значні обмеження. При порівнюванні нуклеотидних послідовностей різних геномів не беруться до уваги модифікації, які виникають вторинно, вже після трансляції антигенів. Часто трапляється, що прямий імунохімічний пошук провести важко, бо невідомо, в яких саме хазяїнських структурах знаходиться епітоп, виявлений у вірусу чи іншого хвороботворного чинника, і наскільки він важливий з погляду виникнення певної патології. Заслужує на увагу інший підхід, коли виявляють та вивчають мішені-рецептори біологічно активних вірусних компонентів у клітинах хазяїна. Потім, виходячи з структури рецепторів (вони у багатьох випадках відомі), вишукують комплементарні структури у вірусних білках та геномах. Обидва ці підходи застосовували при вивченні впливу збудників інфекційних хвороб на виникнення ЦД у випадках, коли не йшлося про пряму ЦПД вірусу на острівцеві тканини. Однак все ж найбільш вивченою причиною виникнення ЦД після інфекційних хвороб є антигенна мімікрія антигенів β -клітин та інфекційних чинників.

Така думка підтримується вже не поодинокими фактами. Наприклад, послідовність з шести амінокислот (PEVKKEK) виявилася спільною для острівцевого антигену – GAD65 та для ферментів, причетних до розмноження вірусу Коксакі В4 в заражених клітинах [20]. Цю послідовність виявляють у четвертій частини хворих з нововиявленим ЦД-1, а клінічні дослідження однозначно показали високу кореляцію між імунними реакціями на GAD та наявністю чи розвитком ЦД-1.

Існують інші дані відносно причетності мімікрії вірусів та антигенів підшлункової залози до захворювання на ЦД. Ротавіруси (RoV) містять пептидні

послідовності, подібні до автоантигенів GAD та IA-2. Це передбачає можливість запуску процесу автоімунітету, спрямованого на руйнування острівцевих клітин під впливом RoV. Виявлено специфічний та дуже виражений взаємозв'язок між сероконверсією RoV та наявністю антитіл до власних антигенів у крові хворих на ЦД: у 86 % випадків – проти IA-2, у 62 % обстежених осіб – проти інсуліну та у половини їх – проти GAD. Під впливом RoV антитіла до цих антигенів починають синтезуватися або підвищуються їхні рівні [21]. Імунодомінантний епітоп (805-820) білка IA-2 містить 56 % послідовностей, тотожних з ротавірусом людини, та 100 % подібності з ротавірусом за дев'ятьма амінокислотами у послідовності VP7, що являє собою основний імуногенний білок людського ротавірусу. Суміжна послідовність VP7 на 75 % тотожна та на 92 % подібна за 13 амінокислотами до відомого Т-клітинного епітопа GAD [21]. Обидва пептиди приєднуються до рецептора HLA-DR4(*0401) та вважаються тотожними за амінокислотною послідовністю рецепторам Т-лімфоцитів. За первинною структурою імунодомінантний епітоп IA-2 має 75-45 % тотожності та 88-64 % подібності до епітопів вірусу лихоманки Денге, цитомегаловірусу, вірусів кору, гепатиту С, а також бактерій, наприклад, *Nemophilus influenzae*. Крім того показано, що до виникнення ЦД-1 можуть бути причетні певні токсини бактерій, зокрема, бафіломіцин А1, продукований *Streptomyces* spp., що здатний ушкоджувати острівцеві клітини, які втрачають здатність синтезувати інсулін [22]. Послідовності трьох інших епітопів IA-2 на 71-100 % подібні (за 7-12 амінокислотами) до послідовностей антигенів вірусу герпесу, риновірусів, хантавірусів та флавівірусів. З цього також логічно випливає факт причетності інфекційних патогенів до виникнення ЦД-1.

Питання про роль молекулярної мімікрії при ЦД привернуло до себе особливу увагу після того, як з'явилися повідомлення про те, що виникнення деяких захворювань пов'язане з активацією автореактивних Т-клітин [23]. Виникнення автоімунних захворювань не зводиться до участі одного причинного фактора. Крім генетичної ланки – участі МНС – у виникненні таких недуг беруть участь також чинники довкілля. Як підкреслюють [24-25], існують переконливі клінічні та епідеміологічні докази того, що при автоімунних хворобах немає збігу щодо розвитку захворювання в однояйцевих близнят. Крім того, при структурному аналізі антитіл чи Т-клітинних рецепторів, причетних до захворювання, виявлено соматичні мутації, що свідчить про запуск процесу саме під дією антигену, а не спадкових факторів. Автоімунітет може виникнути в тому разі, коли взаємодія Т-клітин зі збудником, що заражає організм, призводить до активації Т-клітин, які перехресно реагують з біологічно важливим автоантигеном.

Структурна подібність (молекулярна мімікрія) поміж вірусними епітопами та власними антигенами хазяїна може під впливом структур МНС класу II викликати індукцію автоагресивних Т-клітин CD4⁺, а під впливом структур МНС класу I – Т-клітин CD8⁺. Накопичується все більше клінічних та експериментальних відомостей про те, що інфекційні чинники, подібні до власних хазяйських білків, відіграють суттєву роль у молекулярній мімікрії і сприяють розвитку захворювання на ЦД [6, 26].

Ідентифіковано понад два десятки вірусів з гомологією до певних ділянок GAD; отже, перехресна реактивність поміж GAD65 та вірусом Коксакі – це аж ніяк не унікальне явище [5-6, 27]. Як наголошують Джонс та Армстронг, зазначена перехресна реактивність свідчить про значну поширеність схожих епітопів і тому треба з обережністю судити про роль перехресної реактивності епітопів GAD65 та вірусу Коксакі, про специфічність взаємодії антитіл з антигенами вірусів і клітинами підшлункової залози, та загалом, про роль молекулярної мімікрії при ЦД.

Виходить, таким чином, що ряд вірусів – ентеровіруси, включаючи вірус Коксакі, ротавіруси та інші, які в момент їх відкриття фахівці класифікували

як «сирітські, безпритульні, безневинні віруси», тобто віруси, не причетні, як тоді видавалося, до будь-якої патології, а нині виявилися чинниками, що служать пусковим механізмом, «ініціатором» тяжкої недуги. Про це, зокрема, йшлося в давно виданій монографії Кристофера Ендрюса [28]. Значення впливу таких факторів особливо помітне у випадках, коли інфекційні чинники потрапляють до організму в ранньому дитинстві при вигодовуванні немовлят грудним молоком [23].

Цікаво, що з розвитком інсулітів у мишей NOD та ЦД-1 у людей пов'язують участь ретровірусів. Є також дані про причетність до розвитку ЦД-1 ендемічного вірусу людини K-18 (HERV-K18) та його геному. Встановлено, що HERV-K18 кодує Т-клітинний суперантиген (SAg). На початку захворювання на ЦД-1 у Т-клітинах з Т-рецепторними ланцюгами V β 7, які взаємодіють з SAg, виявляють підвищені рівні мРНК HERV-K18. Транскрипцію HERV-K18 та функціонування SAg у клітинах, здатних презентувати антиген, можуть викликати такі стимулятори, як віруси та інтерферон α ; вони запускають процес виникнення та розвиток інсулітів до чітко вираженого ЦД-1. Ретровірус HERV-K18 розташований всередині інтрона CD48 на хромосомі людини 1q, і на генетичну чутливість до ЦД-1 можуть впливати алельні варіації HERV-K18 чи гена CD48, що оточує HERV-K18 [29].

Впізнавання вірусних антигенних пептидів Т-клітинними рецепторами – це процес специфічний, але структурно змінені антигенні варіанти чи мімікрині пептиди, які можуть бути й неспорідненими з точки зору первинної послідовності вірусного антигену, все ще можуть розпізнаватися Т-клітинами CD4 $^{+}$ чи CD8 $^{+}$. Функціональні особливості таких пептидів залежать від їхньої структури, а взаємодія їх з Т-рецепторами може призвести до повної чи часткової активації Т-клітин. Вважають, що подібні перехресно-реактивні пептиди відіграють певну роль при таких патофізіологічних станах, як селекція Т-клітин, анергія, «вислизання» вірусу з-під імунного нагляду хазяїна та автоімунні процеси.

Хоча розвиток автоімунного розладу звичайно приписують участі Т-клітин CD4 $^{+}$, опубліковано клінічні й експериментальні спостереження, які доводять роль у цьому процесі клітин з рецепторами CD8 $^{+}$. Вивчаються молекулярні механізми участі таких клітин у розвитку автоімунітету. Дослідники з США та Франції [26] намагалися розпізнати можливі ділянки мімікрії поміж антигенами хазяїна та вірусу, охарактеризувати їхні структурні та функціональні особливості і визначити їхнє біологічне значення. З цією метою використано трансгенних мишей з імунодомінантним епітопом, контрольованим ділянкою H-2D b , та епітоп, розташований на нуклеопротеїні (NP)-(396-404) вірусу лімфоцитарного хоріоменінгіту (LCMV). Дія цитотоксичних клітин, обумовлених H-2D b , направлена проти послідовності NP-(396-404) LCMV. У заражених мишей відбувається активація та масове розмноження цитотоксичних клітин, кількість яких зберігається на високому рівні протягом усього життя тварин, навіть за відсутності в них помітних кількостей вірусу чи вірусного антигену. Такі цитотоксичні Т-клітини (CTLs) являють собою щедre джерело автореактивності, особливо якщо не обмежено їхню цитолітичну дію. Трансгенні миші H-2 b , що виражають NP LCMV під контролем промотора щурячого інсуліну, являють собою цінну модель автоімунної недуги *in vivo*. Після зараження вірусом чи внаслідок адаптивного переносу противірусних CTLs у таких мишей розвивається автоімунний діабет. У цьому процесі беруть участь клітини CD4 $^{+}$ та CD8 $^{+}$, причому знищення β -клітин острівців Лангерганса відбувається під дією клітин CD8 $^{+}$, які активуються молекулами MHC класу I. Отже, структурна подібність поміж вірусними епітопами та власними антигенами хазяїна може призвести до індукції автоагресивних Т-клітин CD4 $^{+}$ та CD8 $^{+}$. Через гнучкість розпізнавання Т-клітинних рецепторів антигенами MHC припускають,

що Т-клітини можуть замість вірусних структур розпізнавати власні епітопи і таким чином залучатися до патогенетичного процесу.

Щодо діабету типу 2, то досі отримано менше даних про причетність вірусів до його виникнення та розвитку, але певні відомості з цього питання опубліковано.

Вже досить давно встановлено чіткий взаємозв'язок між хронічно присутнім в організмі вірусом гепатиту С (ВГС) та розвитком різноманітних численних недуг [30-31]. Епідеміологічні дослідження доводять, що, на відміну від гепатиту В, захворюваність на гепатит С асоціюється з підвищеною частотою ЦД-2: існує якась сполучна ланка (чи ланки) поміж носійством ВГС та антитіл проти нього з появою ЦД-2. Чинники, що підвищують ризик ЦД-2 у носіїв ВГС, – чоловіча стать, підвищений тиск крові, надмірна маса тіла; крім того, ризик зростає по мірі старіння людини. Не розглядаючи тут всебічно дуже різноманітних небезпечних наслідків для людського організму, спричинених присутністю ВГС (вірусним навантаженням), ми лише коротко згадаємо дані про причетність цього збудника саме до виникнення аутоімунних захворювань. Давно показано, що зараження ВГС викликає розвиток численних порушень імунних механізмів, які призводять до криоглобулінемії, гломерулонефриту, тироїдиту та синдрому Шегрена. З погляду виникнення ЦД-2 цікаво, що присутність ВГС (зокрема, генотипів 3a та 1b) в організмі підвищує резистентність клітин до інсуліну [31], причому основна роль у даному процесі належить серцевинному (core) вірусному білкові ВГС, який заважає передачі сигналу до інсулінового рецептора.

За первинною структурою епітоп ІА-2 має послідовності, тотожні та подібні до епітопів ВГС та бактерії *Neisseria meningitidis*. [21]. Епітоп, який впізнається Т-клітинами CD8⁺, що циркулюють у крові та інфільтрують печінку хворих, заражених штамом ВГС_{NS3-1073}, являє собою пептид CVNGCWTV. Цитотоксичні клітини, які його розпізнають, виділені не лише з крові хворих на гепатит С, але й з крові ВГС-негативних донорів. Т-клітинна відповідь цих здорових донорів опосередковується клітинами імунної пам'яті, що перехресно реагують також з Т-клітинною детермінантою вірусу грипу А/PR/8/34 (IV). Обидва пептиди – А/PR/8/34 (IV) та NS3 ВГС – мають значну гомологію у амінокислотних послідовностях, які з високою афінністю приєднуються до молекул HLA-A*02 та розпізнаються цитотоксичними Т-лімфоцитами. Як було показано [32], у трансгенних мишей ВГС-специфічні Т-клітини можуть індукуватися в організмі під впливом вірусу грипу. Спленоцити мишей, заражених вірусом грипу, у момент найвищої первинної імунної відповіді впізнають пептид NS3, розчиняють клітини, які містять цей пептид, та синтезують γ-інтерферон. Таким чином, реакція організму на інфекційний чинник може визначатися клітинами імунної пам'яті, які виникли при попередньому зараженні далеким, неспорідненим, гетерологічним патогеном. Описана ситуація, як і інші, до неї подібні, може у певному випадку стати цілком зрозумілою причиною хибнопозитивної відповіді при діагностуванні гепатиту С.

Нещодавно групою іспанських дослідників [33], що вперше скористались статистичним аналізом даних при встановленні ролі незалежних чинників, причетних до виникнення ЦД-2, достеменно доведено, що один з таких чинників – це постійне виявлення ВГС в організмі зараженої людини. Специфічні механізми, що беруть участь у розвитку ЦД-2, пов'язаного з гепатитом С, до кінця незрозумілі. Цілковито очевидно, що в даному випадку не йдеться про розмноження вірусу у підшлунковій залозі та пряму ЦПД ВГС. Як вважають, ключову роль у цьому процесі може відігравати посилення інсулінорезистентності, викликане жировою дегенерацією під непрямим впливом інфекції та надмірною продукцією цитокінів, що викликають запалення. Можна припустити, що викорінення гепатиту С сприяло б значному зниженню частоти випадків виникнення ЦД-2.

Роль гетерофільних антитіл у хибнопозитивних реакціях (ХПР) визначили вже при початкових спробах тестування на ВІЛ-інфекцію, і дані про них швидко накопичувалися у фаховій літературі [34]. З отриманих спостережень випливало, що ХПР може виникати через наявність у досліджуваних сироватках якихось інших «природних антитіл» проти невідомих антигенів. У ході поліпшення серологічної діагностики ВІЛ у ряді випадків стало ясно, проти яких природних антигенів, чужорідних чи власних, направлено імунні реакції, відповідальні за ХПР.

Авторами даної статті було проведено дослідження з вивчення перехресної взаємодії антитіл з антигенами вірусу імунодефіциту людини (ВІЛ) у хворих на ЦД і отриманні ХПР при діагностиці ВІЛ-інфекції.

Матеріали і методи дослідження

Сироватки від хворих на ЦД отримано з клініки Інституту ендокринології та обміну речовин ім. В. П. Комісаренка АМН України.

Використано рекомбінантні білки Env (аналоги оболонкових білків gp120 та gp41 ВІЛ) і Gag (аналоги внутрішніх білків p24 і p17 ВІЛ) виробництва АТЗТ НВК «Діапроф-Мед».

Олігопептиди, тотожні послідовностям варіабельних ділянок gp120 субтипів А (KSVNIGPGQAFYATG), В (KSIHIGPGRAFYTG) і С (ESVRIGPGQTFYATN) ВІЛ-1, отримано з лабораторії синтезу олігопептидів Інституту особливо чистих біопрепаратів (Санкт-Петербург, РФ).

Імуноферментний аналіз для визначення неспецифічної взаємодії АТ з сироватками крові хворих на ЦД та білками ВІЛ проводили за методом [35].

Для роботи використано тест-систему для визначення антитіл до інсуліну «ІФА-АТ-інсулін» [36], сумісного виробництва АТЗТ НВК «Діапроф-Мед» і Інституту ендокринології та обміну речовин ім. В. П. Комісаренка АМН України та тест-систему для визначення антитіл до ВІЛ «DIA-HIV 1/2» виробництва АТЗТ НВК «Діапроф-Мед». Дослідження виконували згідно з інструкціями до діагностикумів.

Результати і їх обговорення

Ми дослідили більш як 100 сироваток від хворих на ЦД в тест-системах для визначення антитіл до інсуліну і ВІЛ. З них було відібрано 18 сироваток, які давали ХПР при діагностиці ВІЛ-інфекції.

Характеристику досліджуваних сироваток крові від хворих на ЦД, що давали ХПР при діагностиці ВІЛ-інфекції, наведено у табл. 1 і 2.

Таблиця 1. Характеристика сироваток крові від хворих на ЦД-1

№ сироватки	Вік і стать хворих на ЦД	Тривалість хвороби, років	Анти-інсулінові АТ (ОГ/ГЗ)	Анти-ВІЛ АТ (ОГ/ГЗ)
1	32-м	9	2,0	1,35
2	28-ж	-	10,4	1,06
3	31-ж	18	7,36	0,87
4	55-ж	15	7,6	1,25
5	32-ж	26	12,7	1,13
6	23-м	12	0,26	1,28
7	27-ж	27	0,37	2,43
8	44-ж	7	0,30	2,22

Примітка. У табл. 1 і 2: ОГ – оптична густина проб, після постановки ІФА; ГЗ – граничне значення в системі.

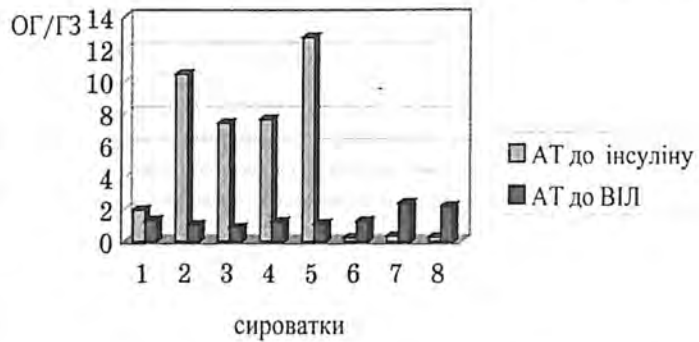
Таблиця 2. Характеристика сироваток крові від хворих на ЦД-2

№ сироватки	Вік і стать хворих на ЦД	Тривалість хвороби, років	Анти-інсулінові АТ (ОГ/ГЗ)	Анти-ВІЛ АТ (ОГ/ГЗ)
1	42-ж	2	6,5	1,55
2	58-ж	6	1,9	1,72
3	68-ж	4	3,8	1,01
4	71-м	20	0,46	2,23
5	69-м	22	0,22	2,01
6	67-ж	11	0,46	2,56
7	67-м	10	0,43	1,35
8	53-ж	18	0,23	1,12
9	67-ж	6	0,14	1,05
10	46-ж	1	0,19	1,06

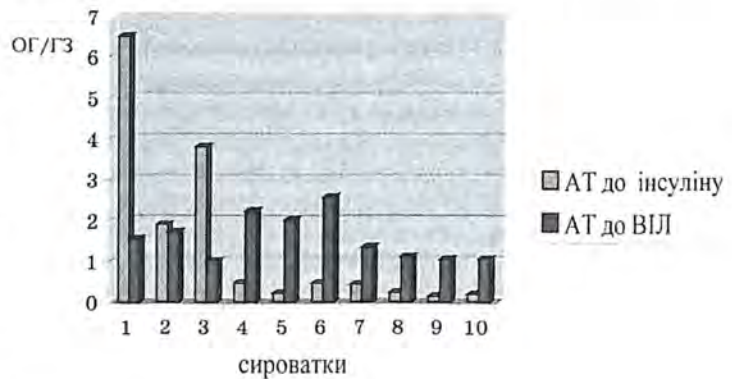
Як видно з табл. 1 та 2, ХПР при діагностиці ВІЛ-інфекції методом ІФА отримали в досліджуваних сироватках, взятих як від осіб з ЦД-1, так і від хворих з ЦД-2, незалежно від наявності або відсутності антитіл до інсуліну в їхніх сироватках крові.

На мал. 1 показано гістограму розподілу АТ до інсуліну і ВІЛ у сироватках хворих на ЦД-1, а на мал. 2 – у сироватках хворих на ЦД-2.

Далі ми проаналізували, до яких саме білків ВІЛ синтезувались протівірусні наявні антитіла. Використали олігопептиди-аналоги білків субтипів А, В і С ВІЛ-1, рекомбінантні поліпептиди Env і Gag ВІЛ, а також суміш цих білків. В табл. 3 наведено дані співвідношення ОГ/ГЗ у сироватках від хворих на ЦД-1, в табл. 4 – у сироватках від хворих на ЦД-2, що отримані при проведенні ІФА з олігопептидами і білками ВІЛ.



Мал. 1. Розподіл антитіл до інсуліну і ВІЛ у сироватках хворих на ЦД-1.



Мал. 2. Розподіл антитіл до інсуліну і ВІЛ у сироватках хворих на ЦД-2.

Таблиця 3. Визначення взаємодії антитіл із сироваток хворих на ЦД-1 з олігопептидами і білками ВІЛ

№ сироватки	Анти-інсулінові АТ	Олігопептиди ВІЛ			Рекомбінантні білки ВІЛ		
		А	В	С	160	Env	Gag
1	2,0	0,4	0,5	0,6	0,5	0,6	1,9
2	10,4	0,5	0,8	0,7	0,8	0,4	1,6
3	7,4	0,3	0,6	0,9	0,2	0,9	3,4
4	7,6	0,9	0,8	0,5	0,5	0,6	2,8
5	12,7	0,7	0,5	0,2	0,4	0,9	2,5
6	0,6	0,4	0,4	0,6	0,8	0,9	2,6
7	0,7	0,5	0,8	0,4	0,6	0,9	1,6
8	0,30	0,8	0,9	0,7	0,5	0,7	1,3

Як видно з табл. 3, антитіла в досліджуваних сироватках від хворих на ЦД-1 взаємодіють з білком Gag ВІЛ і не взаємодіють з олігопептидами і рекомбінантними поліпептидами-аналогами оболонкових білків gr 160 і Env.

Таблиця 4. Визначення взаємодії антитіл із сироваток хворих на ЦД-2 з олігопептидами і білками ВІЛ

№ сироватки	Анти-інсулінові АТ	Олігопептиди ВІЛ			Рекомбінантні білки ВІЛ		
		А	В	С	160	Env	Gag
1	6,5	0,4	0,5	0,6	1,5	1,6	0,9
2	10,4	0,5	0,8	0,7	0,8	1,4	0,6
3	3,8	0,3	1,6	0,9	1,2	1,9	0,4
4	0,46	0,9	0,8	0,5	0,5	1,6	0,8
5	0,22	0,7	0,5	0,2	1,4	0,9	2,5
6	0,46	0,4	0,4	0,6	0,8	0,9	2,6
7	0,43	0,5	0,8	0,4	1,6	0,9	1,6
8	0,23	0,8	0,9	0,7	0,5	1,7	1,3
9	0,14	0,9	1,2	0,6	0,4	1,5	2,6
10	0,19	0,5	0,6	0,9	0,9	0,6	4,2

В той же час, у сироватках хворих на ЦД-2 є антитіла, які взаємодіють як з оболонковими білками Env ВІЛ, так і з Gag. У сироватках від хворих на ЦД-2 № 1, № 2 і № 3 визначені антитіла до інсуліну, а також до оболонкових білків gr 160 і Env ВІЛ, у сироватках № 6 і № 10 – до білків Gag ВІЛ.

При встановленні діагнозу «ВІЛ-інфекція» орієнтуються на рекомендації ВООЗ, де вказано, що позитивність сироватки встановлюється за наявністю в ній специфічних антитіл не менш як до двох білків ВІЛ: одного з ділянками Env (gr160, gr120, gr41) і одного з ділянки Core (p55, p25, p17) за методом імуноблотингу.

У нашому випадку дослідження сироваток на перехресну взаємодію з білками ВІЛ проводили методом ІФА, використовуючи рекомбінантні поліпептиди-аналоги білків ВІЛ; у сироватках № 5, № 7 і № 9 було виявлено антитіла до оболонкових білків gr 160 або Env і Gag. Згідно з анамнезом, вік хворих на ЦД-2, у яких виявлено такі антитіла, становив 67 років, і вони не

належать до груп ризику; тому ці сироватки ми віднесли до хибнопозитивних. В подальшому ми перевіримо їх методом імуноблотингу.

Таким чином, викладені дані сприяють висвітленню значення антигенної мімікрії у виникненні та подальшому розвитку цукрового діабету 1 і 2 типів за умов наявності певного генетичного підґрунтя; виходить, що необхідно враховувати можливість отримання ХІР при діагностиці ВІЛ-інфекції за рахунок антигенної мімікрії при проведенні серологічних досліджень сироваток крові пацієнтів з ЦД.

Література

1. Дедов И. И., Шестакова М. В. Сахарный диабет. М.: Универсум Паблишинг, 2003. 455 с.
2. Тронько М. Д., Корпачев В. В. Основы клінічної фармакології цукрового діабету та його ускладнень. К.: Книга плюс, 2004. 103 с.
3. Werf N., Kroese F. G., Rozing J., Hillebrands J. L. Viral infections as potential triggers of type 1 diabetes // *Diabetes Metab. Res. Rev.* 2007, 23, N 3, 169-183.
4. Эндокринология. Под ред. П. Н. Боднара, Винница: Нова книга, 2007. 344 с.
5. Jun H. S., Yoon J. W. The role of viruses in type I diabetes: two distinct cellular and molecular pathogenic mechanism of virus-induced diabetes in animals // *Diabetologia.* 2001, 44, 271-285.
6. Judkowsky V. A., Allicotti G. M., Sarvetnick N., Pinilla C. Peptides from common viral and bacterial pathogens can efficiently activate diabetogenic T-cells // *Diabetes.* 2004, 53, 2301-2309.
7. Notkins A. L. Immunologic and genetic factors in type 1 diabetes // *JBC Papers in Press.* www.jbc.org.
8. Yoon J. W., Austin M., Onodera T., Notkins A. L. Virus-induced diabetes mellitus: isolation of a virus from the pancreas of a child with diabetic ketoacidosis // *New England J. Med.* 1989, 300, 1173-1179.
9. Sadeharju K., Lönnrot M., Kimpimäki T. et al. Enterovirus antibody levels during the first two years of life in prediabetic autoantibody-positive children // *Diabetologia.* 2001, 44, 818-823.
10. Winter E. W., Harris N., Schatz D. Type 1 diabetes islet autoimmunology markers // *Diabetes Technol. Therapeut.* 2002, 4, N 6, 817-839.
11. Yoon J. W., Ihm S. H., Kim K. W. Viruses as a triggering factor of type 1 diabetes and genetic markers related to the susceptibility to the virus-associated diabetes // *Diabetes Res. Clin. Pract.* 1989, 7, N 1, 47-58.
12. Karounos D. G., Wolinsky J. S., Thomas J. W. Monoclonal antibody to rubella virus capsid protein recognizes a beta-cell antigen // *J. Immunol.* 1993, 150, N 7, 3080-3085.
13. Ou D., Mitchell L. A., Metzger D. L. et al. Cross-reactive rubella virus and glutamic acid decarboxylase (65 and 67) protein determinants recognised by T cells of patients with type I diabetes mellitus // *Diabetologia.* 2000, 43, N 6, 750-762.
14. Jaekel E., Manns M., von Herrath M. Viruses and diabetes // *Ann. New York Acad. Sci.* 2002, 958, 7-25.
15. Anonymous. Autoimmune diseases: the invasion of the body // http://www.drshradler.com/autoimmune_diseases.htm.
16. Oldstone M. B. A. Molecular mimicry and immune-mediated diseases // *FASEB J.* 1998, 12, 1255-1265.
17. Жилинская И. Н. Новые аспекты изучения механизмов патогенеза вирусных инфекций // *Успехи соврем. биол.* 2002, 122, N 5, 414-421.
18. Новиков Д. К. Разнообразие путей распознавания антигенов и развития иммунного ответа, роль CD1 молекул // <http://nature.web.ru/db>.

19. Ашмарин И. П. О приоритетных направлениях развития молекулярной биологии и генетики в обеспечении биологической безопасности // Сб. докл. I Росс. симпозиум по биологической безопасности. <http://www.bio.su/ashr.htm>.
20. Flodstrom-Tullberg M., Hultcrantz M., Stotland A. et al. RNase L and double-stranded RNA-dependent protein-kinase exert complementary roles in islet cell defense during Coxsackievirus infection // *J. Immunol.* 2005, **174**, N 3, 1171-1177.
21. Honeyman M. C., Stone N. L., Harrison L. C. T-cell epitopes in type 1 diabetes autoantigen tyrosine phosphatase IA-2: potential for mimicry with rotavirus and other environmental agents // *Molecular Medicine.* 1998, **4**, 231-239.
22. Lammi N., Karvonen M., Tuomilehto J. Do microbes have a causal role in type 1 diabetes? // *Med. Sci. Mon.* 2005, **11**, N 3, 63-69.
23. Botič B. Diabetes and autoimmunity // <http://www.ifcc.org/ejifcc/voll13no5/1305200206n.htm>.
24. Oldstone M. B. A. Molecular mimicry as a mechanism for the cause and as a probe uncovering etiologic agent(s) of autoimmune disease // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 1989, **145**, 127-135.
25. Benoist Ch., Mathis D. Autoimmunity provoked by infection: how good is the case for T-cell epitope mimicry? // *Nature Immunology.* 2001, **2**, 797-801.
26. Hudrisier D., Rioud J., Burlet-Schiltz O. et al. Structural and functional identification of major histocompatibility complex class I-restricted self-peptides as naturally occurring molecular mimics of viral antigens. Possible role in CD8⁺ T cell mediated, virus-induced autoimmune disease // *J. Biol. Chem.* 2001, **276**, N 22, 19396-19403.
27. Jones D. B., Armstrong N. W. Coxsackie virus and diabetes revisited // *Nat. Med.* 1995, **1**, p. 284.
28. Эндриус К. Естественная история вирусов. М.: Мир, 1969. 312 с.
29. Marguerat S., Wang W. Y. S., Todd J. A., Conrad B. Association of human endogenous retrovirus K-18 polymorphisms with type 1 diabetes // *Diabetes.* 2004, **53**, 852-854.
30. Huang J. F., Dai C. Y., Hwang S. J. et al. Hepatitis C viremia increases the association with type 2 diabetes mellitus in a hepatitis B and C endemic area: an epidemiological link with virological implication // *Am. J. Gastroenterol.* 2007, **102**, N 6, 1237-1243.
31. Paziienza V., Clément S., Pugnale P. et al. The hepatitis C virus core protein of genotypes 3a and 1b downregulates insulin receptor substrate 1 through genotype-specific mechanisms // *Hepatology.* 2007, **45**, N 5, 1164-1171.
32. Wedemeyer H., Mizukoshi E., Davis A. R. et al. Cross-reactivity between hepatitis C virus and influenza A virus determinant-specific cytotoxic T cells // *J. Virol.* 2001, **75**, N 23, 11392-11400.
33. Simó R., Lecube A., Genescà J. et al. Sustained virological response correlates with reduction of glucose abnormalities in patients with chronic hepatitis C infection // *Diabetes Care.* 2006, **29**, 2462-2466.
34. Kricka L.J. Human anti-animal antibody interferences in immunological assays // *Clin. Chem.* 1999, **45**, 942-956.
35. Іванська Н. В., Рибалко С. Л., Кислих О. М. та ін. Антигенна мімікрія між вірусом сказу та ВІЛ-1 // *Лаб. діагностика.* 2007, **40**, № 2, 37-43.
36. Корпачев В. В., Мельниченко С. В., Лукашова Р. Г. та ін. Опрацювання методу імуноферментного аналізу для визначення антитіл до інсуліну у сироватці крові здорових людей та хворих на цукровий діабет // *Ендокринологія.* 2003, **8**, № 1, 24-30.

Антигенная мимикрия и сахарный диабет
(обзор литературы и собственные исследования)

Н. В. Иванская¹, С. В. Мельниченко², Р. Г. Лукашова², Э. Н. Жеребцова¹

¹Институт эпидемиологии и инфекционных заболеваний им. Л. В. Громашевского АМН Украины, г. Киев, 03038;

²Институт эндокринологии и обмена веществ им. В. П. Комиссаренко АМН Украины, г. Киев, 04114, Украина

В обзоре представлены данные, касающиеся влияния возбудителей инфекционных заболеваний на возникновение у людей сахарного диабета 1 и 2 типов (СД-1, СД-2). Приведены примеры участия вируса Коксаки серотипов В4 и В5, вируса краснухи, цитомегаловируса и других инфекционных факторов в патогенезе этого заболевания. Считается, что возможной причиной такого явления являются перекрестные реакции иммунной системы человеческого организма на инфекционные факторы и аутоантигены поджелудочной железы. Аутоиммунные реакции при возникновении СД увязываются с молекулярной схожестью (мимикрией) структур антигенов, которые предшествуют развитию диабета (глутаматдекарбоксилазы, инсулина, тирозинфосфатазы, островковых клеток) и аминокислотной последовательностью вирусных пептидов. Указано, что для «запуска» процессов иммунного «узнавания» аутоантигенов и инфекционных антигенов, необходимо участие многих компонентов иммунной системы человеческого организма и присутствие определенных генетических факторов. По нашим данным, сыворотки крови некоторых больных СД-1 и СД-2 содержат антитела против ВИЧ-специфичных белков, причем титры таких антител не коррелируют с присутствием антител к инсулину.

Ключевые слова: сахарный диабет 1 типа, сахарный диабет 2 типа, мимикрия, антитела, вирусы.

Antigenic mimicry and diabetes mellitus

(review and experimental data)

N. V. Ivanskaya¹, S. V. Melnichenko², R. G. Lukashova², E. N. Zherebtsova¹

¹Lev Gromashevski Institute of Epidemiology & Infectious Diseases of AMS, Kyiv, 03038;

²V. P. Komisarenko Institute of Endocrinology & Metabolism of AMS, Kyiv, 04114, Ukraine

This review deals with data concerning the influence of infectious agents on the onset and development of type 1 (T1DM) and type 2 (T2DM) diabetes mellitus in humans. The authors demonstrate a lot of examples of different viruses participation (Cocksakie viruses serotypes B4 and B5, rubella virus, cytomegalovirus, and other ones) in the pathogenesis of this disease. A possible cause of such phenomenon is thought to be cross reactions of the human immune system against infectious agents and pancreas autoantigens. Such auto-immune reactions that develop during the diabetes onset are considered as a consequence of molecular similarity (mimicry) between antigen structures (glutamate decarboxylase, insulin, tyrosine phosphatase, islet cells), and viral peptide sequences. The authors suggest that for induction of autoantigen and infectious antigen recognition by the immune system, many components of this system must be involved, the presence of genetic background being also of great importance.

According to our data, some sera of DM1 and DM2 patients contain antibodies against HIV-specific proteins; interestingly, these antibody titers do not correlate with the presence of antiinsulin antibodies.

Key words: type 1 diabetes mellitus, type 2 diabetes mellitus, mimicry, antibodies, viruses.

(Надійшла 14. 11. 2007)

ЛОКАЛЬНА РЕАКТИВАЦІЯ ГЛЮКОКОРТИКОЇДІВ – НОВА ТЕРАПЕВТИЧНА МІШЕНЬ ЧИ МАНЛИВЕ СВІТЛО В КІНЦІ ТУНЕЛЮ? (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

Т. П. Безверха*, М. Д. Тронько

Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В. П. Комісаренка АМН
України, м. Київ, 04114, Україна

Трансгенні моделі ожиріння і цукрового діабету 2 типу на гризунах виявили важливу роль у механізмах розвитку цих хвороб дорецепторного локального обміну глюкокортикоїдів за участю ферментів 11 β -гідроксистероїд-дегідрогеназ, що зворотно перетворюють у людей інертний кортизон у біологічно активний кортизол, і навпаки. Особливу увагу привертає 11 β -гідроксистероїд-дегідрогеназа 1 типу, що має окисно-відновні властивості, але *in vivo* діє переважно як редуктаза і регенерує кортизол із кортизону. Характерною рисою цього ізоферменту є не лише тканнна специфічність (максимальна активність у печінці, жировій тканині), а й різний ступінь активності в залежності від місця розташування жирової тканини у тілі (сальник, підшкірний жир на череві чи сідницях). Застосування інгібіторів 11 β -гідроксистероїд-дегідрогенази 1 типу у тварин продемонструвало сприятливі ефекти – зниження ендогенної продукції глюкози, гіперглікемії, дисліпідемії і підвищення чутливості до інсуліну. Це дає надію на успішне використання подібних інгібіторів і у людей. Висвітленню сучасного стану цієї проблеми і присвячений даний огляд літератури.

Ключові слова: цукровий діабет 2 типу, метаболічний синдром, ожиріння, 11 β -гідроксистероїд-дегідрогеназа, обмін глюкокортикоїдів.

Високі темпи техніко-економічного розвитку забезпечити поліпшення якості життя людей в багатьох країнах світу. Але прогрес цивілізації поєднується із зміною способу життя: малорухомість, збільшення в раціоні харчування кількості рафінованих вуглеводів і жирів тваринного походження, стреси. Все це породило зростання у населення надлишку ваги і ожиріння. В даний час ожиріння є найбільшим глобальним хронічним захворюванням. За даними ВООЗ, опублікованими в 2003 р., біля 1,7 млрд людей на планеті (практично кожний четвертий житель) мають надлишкову масу тіла або ожиріння. Передбачається, що до 2025 р. від ожиріння будуть страждати уже 40 % чоловіків і 50 % жінок [1]. Безсумнівним лідером у розповсюдженні ожиріння є США: надлишкова маса відмічається у 60 % населення, ожиріння – у 27 %.

Низкою клінічних та епідеміологічних досліджень показано, що найбільш значущими медичними наслідками ожиріння є цукровий діабет 2 типу і серцево-судинні захворювання. Катастрофічне збільшення числа хворих на цукровий діабет (ЦД), що дістало назву «неінфекційної епідемії XXI століття», спостерігається в усіх розвинених країнах світу і привертає пильну увагу дослідників із-за серцево-судинних ускладнень, які є основною причиною інвалідизації та смертності цієї категорії хворих. Збільшення захворюваності на ЦД відбувається переважно за рахунок ЦД 2 типу (ЦД-2), що є найпоширенішою

* Адреса для листування (Correspondence): Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В. П. Комісаренка АМН України, вул. Вишгородська, 69, м. Київ, 04114, Україна

формою цієї хвороби (80-90 % усіх хворих) і виникає, здебільшого, у людей зрілого і похилого віку. Відповідно до міжнародних статистичних даних, у теперішній час 194 млн людей страждає від ЦД, а до 2025 р. їх кількість становитиме 333 млн. Пропорційно до росту захворюваності на ЦД відповідно зростає число його хронічних ускладнень, які можуть мати серйозні наслідки. В осіб з ЦД серцево-судинні ускладнення – інфаркт, інсульт – розвиваються в 2-4 рази частіше і мають тяжчий перебіг, ніж без нього [2]. Біля 90 % хворих на ЦД-2 мають надлишкову масу тіла або ожиріння.

Ожиріння, що ускладнюється розвитком ЦД-2, часто супроводжується такими захворюваннями, як ішемічна хвороба серця (ІХС) і артеріальна гіпертензія. Найчастіше ці патології реалізуються в осіб з андройдним (абдомінальним) ожирінням. Андройдний (від грец. andros – чоловік) тип ожиріння характеризується відкладенням жиру в ділянці живота і в черевній порожнині. Внутрішньочеревний жир складається із ретроперитонеального і інтраперитонеального або вісцерального, останній, в свою чергу, поділяється на мезентеріальний (брижа) і сальниковий жир. Підшкірно-жирова основа в ділянці живота разом з вісцеральним жиром черевної порожнини утворюють абдомінальний жир.

Зважаючи на часті випадки поєднання кількох чинників ризику серцево-судинних захворювань у хворих з абдомінальним ожирінням, стали розглядати різні метаболічні порушення і/або захворювання, асоційовані з ожирінням, в комплексі, і висловлювати думку про спільні механізми їх розвитку. Врешті-решт, у 90-ті роки минулого століття сформувався концепція «метаболічного синдрому» або «синдрому інсулінорезистентності».

Метаболічний синдром (МС) – це сполучення різних обмінних порушень і/або захворювань, що є чинниками ризику раннього розвитку атеросклерозу і його серцево-судинних ускладнень. Упродовж останніх двох десятиліть класичні уявлення про МС зазнавали певних змін. У 2005 р. Міжнародна Федерація Діабету дала нове визначення МС, відповідно до якого МС є поєднанням абдомінального ожиріння, інсулінорезистентності, гіперглікемії, дисліпідемії, артеріальної гіпертензії, порушення системи гемостазу і хронічного субклінічного запалення [3].

Розповсюдженість МС в загальній популяції дорослого населення є високою і коливається від 10 % (Китай) до 24 % (США) [4]. Частота МС збільшується з віком від 6,7 % в осіб 20-29 р. до 42 % у людей старших 70 р. (США). Виявлені етнічні відмінності у розповсюдженні МС і його компонентів [5]. Дослідження вкладає МС у розвиток серцево-судинних ускладнень показали, що у хворих на МС ризик ІХС вищий в 2,9-4,2 рази, смертності від ІХС – в 2,6-3 рази, а ішемічний інсульт спостерігається в 2 рази частіше, ніж у пацієнтів без метаболічних розладів. В осіб з МС і порушенням толерантності до глюкози ризик розвитку ЦД у найближчі 5 років становив 40 %, що в 2,5 рази вище у порівнянні з групою хворих з порушеною толерантністю до глюкози без МС [4]. Так як розповсюдженість МС приблизно у два рази перевищує поширеність ЦД і в найближчому майбутньому очікується збільшення темпів його зростання, то високий ризик серцево-судинних ускладнень МС також є серйозною медико-соціальною проблемою.

За провідними симптомами, ЦД-2 і МС є близькими, що вказує на спорідненість цих патологій і можливість наявності спільних механізмів розвитку. Оскільки і ЦД-2, і МС розвиваються, в основному, у людей старшого віку з надлишковою вагою чи ожирінням, то найперше звернули увагу на гормональні чинники метаболічних порушень і розладів серцево-судинної системи – гормони кори надниркових залоз.

Функціональна активність надниркових залоз у хворих на цукровий діабет інтенсивно досліджувалася у 70-80-ті роки минулого століття.

На підставі всебічного обстеження 517 хворих на діабет у віці від 16 до 75 років з тривалістю хвороби від 1 тиж до 38 років встановлено, що єдиним чинником, що викликає збільшення продукції кортикостероїдів при ЦД, є декомпенсація захворювання. У період декомпенсації показники глюкокортикоїдної і мінералокортикоїдної функції наднирників підвищені у порівнянні з нормою в 2-3 рази, а показники андрогенної функції – в 1,5 рази [6]. ✓

Виразником активації глюкокортикоїдної функції є збільшення швидкості секреції кортизолу наднирниками, підвищення концентрації вільного і зв'язаного з білком кортизолу та кортикостерону у циркулюючій крові, зростання екскреції вільного кортизолу і його метаболітів (глюкуронідів і сульфатів) з сечею. Ні вік хворих і наявність спадкової схильності, ні тривалість і характер перебігу діабету, ні час клінічної маніфестації хвороби (в молодому чи зрілому віці) суттєво не впливають на функціональний стан надниркових залоз. З нівелюванням метаболічних розладів секреція кортизолу знижувалася і при компенсації вуглеводного обміну у пацієнтів з нормальною масою тіла суттєво не відрізнялася від її величини у здорових людей: знижувалася концентрація у крові кортизолу і кортикостерону та вміст вільного кортизолу і його метаболітів у сечі. Але навіть в осіб зі стійкою клінічною компенсацією вуглеводного обміну величина вільного кортизолу у плазмі зберігала тенденцію до збільшення, як і вміст вільних глюкокортикоїдів у сечі. У хворих на ЦД з ожирінням в періоди захворювання з нерізко вираженими метаболічними порушеннями швидкість секреції кортизолу зберігала тенденцію до підвищення, була збільшена концентрація кортизолу у плазмі і вища екскреція глюкокортикоїдів з сечею, порівняно з хворими на діабет з нормальною масою тіла. Постійне підвищення рівня глюкокортикоїдів в організмі у хворих з поєднаною патологією супроводжувалося виразним зростанням у них частоти мікро- та макроангіопатій [6].

Результати функціональних проб з кортикотропіном і дексаметазоном засвідчили, що у хворих на цукровий діабет між гіпоталамо-гіпофізарною системою і наднирковими залозами зберігаються звичні взаємовідносини, і система від'ємного зворотного зв'язку функціонує, в основному, нормально. Однак у хворих з підвищеним базальним рівнем глюкокортикоїдів в організмі реакція-відповідь на АКТГ і дексаметазон була виражена слабше, ніж у здорових людей. Така ж закономірність відмічалась і у реакції на стресовий вплив фізичного навантаження. Ця особливість пояснювалась розвитком в гіпоталамо-гіпофізарно-адреналовій системі (ГГАС) деякої рефрактерності до дії стресорів з підвищенням порогу чутливості внаслідок частой активації надниркових залоз у відповідь на ендогенний метаболічний стрес при декомпенсації хвороби [6].

В той же час у більшості хворих на ЦД було встановлено порушення нормальної періодичності виділення глюкокортикоїдів упродовж доби, що не проявляло зв'язку із рівнем компенсації вуглеводного обміну, але частіше спостерігалось у пацієнтів з вираженими мікроангіопатіями [6]. Механізми порушення циркадіанного ритму роботи ГГАС при діабеті нез'ясовані до цього часу [7].

Сучасні дослідження підтверджують і доповнюють наведені результати та основну увагу зосереджують на ролі глюкокортикоїдів і ожиріння у розвитку ЦД-2.

На підставі визначення кортизолу і АКТГ у плазмі після проб з дексаметазоном і кортикотропін-релізінг-гормоном та вимірювання кількості вільного кортизолу у добовій сечі у 9,4 % хворих на ЦД-2 встановлено субклінічний гіперкортизолізм проти 2,1 % ($P=0,004$) у інших пацієнтів без діабету [8]. А середні показники нічного (23.00 год) кортизолу слини у хворих на ЦД-2 були вірогідно вищими, ніж в осіб без ЦД-2 (2,6 [1,8-4,1] проти 1,6 [1,0-2,0] нмоль/л), а також вищими у хворих старшого віку порівняно з молодшими (≥ 60 : 2,7 [2,0-4,3] проти < 60 років: 1,9 [1,4-2,9] нмоль/л, $P < 0,001$ для обох

порівнянь). Встановлено зв'язок ($P < 0,05$) підвищеного рівня нічного кортизолу у слині із збільшенням віку, наявністю ЦД-2 та підвищенням артеріального тиску [9]. Визначення концентрації кортизолу у слині 5 разів на добу у амбулаторних хворих на ЦД-2 показало, що жоден з обстежених не мав величини гормону, яка б перевищувала межі нормальних коливань. В той же час кортизол позитивно корелював з глюкозою крові натще і постпрандіальною, з глюкозою сечі, глікованим гемоглобіном, систолічним і діастолічним артеріальним тиском (для всіх показників $P < 0,05$). Концентрація кортизолу також корелювала з відповідною черевною масою ($P < 0,05$), коли була вилучена глюкозурія [10]. Це спостереження продемонструвало прямі взаємозв'язки між пов'язаними з діабетом метаболічними порушеннями і рівнем кортизолу в організмі, що не виходить за межі норми. У хворих на ЦД-2 був вірогідно більший об'єм надниркових залоз, між вісцеральним жиром і відношенням вісцерального жиру до підшкірного та об'ємом наднирників виявлена пряма кореляція ($r = 0,36$, $P = 0,04$ та $r = 0,48$, $P = 0,008$, відповідно) [11].

Представлені дані засвідчують зв'язок між збільшенням глюкокортикоїдів в організмі, абдомінальним ожирінням і ЦД-2, що піддержує гіпотезу про можливість включення підвищеної продукції глюкокортикоїдів при ожирінні в патогенез ЦД-2.

Важливі ролі глюкокортикоїдів в патогенезі ЦД-2 підтримується і тим фактом, що індукований цими гормонами цукровий діабет клінічно подібний до спонтанного діабету і потребує лікування, аналогічного ЦД-2. Придатними є пероральні протидіабетичні препарати, особливо, метформін і глітазон, що підвищують чутливість до інсуліну, або лікування інсуліном. Пацієнти з глюкокортикоїд-індукованим ЦД, порівняно з пацієнтами з іншими типами діабету, мають значний ризик атеросклеротичних та кардіоваскулярних хвороб і потребують інтенсивного лікування [12].

Ожиріння при метаболічному синдромі клінічно дуже схоже з таким при хворобі Іценка-Кушинга, але для гіперкортицизму характерним є високий (у 2-3 рази вищий за норму) рівень кортизолу у плазмі крові, а для ожиріння – нормальний чи легко знижений, хоча екскреція глюкокортикоїдів з сечею помітно збільшена. Однак метаболічний кліренс кортизолу при ожирінні збільшений і як наслідок – підвищена секреція кортизолу під дією АКТГ. Цей парадокс залишався інтригуючою загадкою для ендокринологів аж до відкриття локальної внутрішньоклітинної регенерації глюкокортикоїдів у трансгенних гризунів, що мають вибірково посилену експресію 11β -гідроксистероїд-дегідрогенази 1 типу у жировій тканині.

11β -гідроксистероїд-дегідрогенази (11β -HSD) відіграють критичну роль у пререцепторному метаболізмі глюкокортикоїдів. Є дві ізоформи ферменту, їх утворення кодують різні гени, вони мають різні фізіологічні ролі, регуляцію і розподілення у тканинах [13].

11β -HSD 1 типу (11β -HSD1) є широко розповсюдженою в організмі, включаючи печінку, жирову тканину, мозок, легені та інші чутливі до глюкокортикоїдів тканини. 11β -HSD1 є двонаправленим ферментом, і хоча *in vivo* переважає редуктазна активність, в гомогенатах тканин спостерігається тільки дегідрогеназна активність. 11β -HSD1 діє як домінуюча 11β -редуктаза в багатьох інтактних клітинах, цілих органах і *in vivo*. Ця реакція керує місцевою регенерацією активних глюкокортикоїдів в межах клітин, використовуючи реальні циркулюючі рівні інертних 11-кетостероїдів: активні глюкокортикоїди – кортизол у людей і кортикостерон у гризунів генеруються із неактивних 11-кетостероїдів – кортизону і 11-дегідрокортикостерону, відповідно.

11β -HSD 2 типу (11β -HSD2) є високої спорідненості NAD-залежною дегідрогеназою, що інактивує кортизол до кортизону. Вона локалізується принципово в тканинах-мішенях мінералокортикоїдів, включаючи нирки і плаценту.

Це служить для захисту мінералокортикоїдних рецепторів від незаконної окупації кортизолом, який має таку ж спорідненість, як альдостерон, але значно вищу концентрацію у тканинах. Швидка інактивація кортизолу 11 β -HSD2 таким чином забезпечує вибірковий доступ альдостерону до неселективних мінералокортикоїдних рецепторів у дистальному нефроні. При мутації гена 11 β -HSD2 розвивається рідкісна, загрозлива для життя, вроджена форма гіпертензії і гіпокаліємії з симптомами надлишку мінералокортикоїдів, в якій кортизол діє як потенційний мінералокортикоїд [14]. 11 β -HSD2 майже не експресується у жировій тканині людини [15].

Розходження між близькою до норми концентрацією кортизолу у плазмі крові і підвищеною продукцією та екскрецією глюкокортикоїдів з сечею на вело на думку про порушення обміну цих гормонів при ожирінні.

Зіставлення метаболізму кортизолу у трьох груп осіб (чоловіків і жінок 23-44 років) з різною масою тіла (20-25 кг/м² – група А, 25-30 кг/м² – група В і понад 30 кг/м² – група С) виявило тенденцію до підвищення екскреції метаболітів глюкокортикоїдів з сечею в осіб з ожирінням (P = 0,08), але екскреція вільного кортизолу з сечею, як і відношення кортизол/кортизон у сечі, були подібними у трьох групах. Відмічалось вірогідне зменшення у сечі при ожирінні відношень тетрагідропохідних кортизолу (5 α -ТНФ+ТНФ) до тетрагідрокортизону (ТНЕ) і кортолу до кортолону (P<0,05). Після прийому 1 мг дексаметазону опівночі концентрації циркулюючих кортизолу, кортизону і АКТГ у плазмі крові в 9 год ранку були близькими в трьох групах. Але через 180 хв після орального прийому 25 мг кортизону ацетату і затим проведеного тесту з дексаметазоном, спостерігалось зниження продукції кортизолу в осіб з надлишком маси тіла: 546 \pm 37 нмоль/л – група А, 412 \pm 40 нмоль/л – група В (P<0,05) і 388 \pm 38 нмоль/л – група С (P<0,01). Інсулінорезистентність встановлена в групах В і С, але регресійний аналіз не виявив взаємозв'язку між метаболітами кортизолу чи відношенням 5 α -ТНФ+ТНФ/ТНЕ і дією інсуліну (НОМА і величини інсуліну під час орального глюкозотолерантного тесту). Однак знайдений зворотний зв'язок між відношенням 5 α -ТНФ+ТНФ/ТНЕ і ІМТ (t=-3,44, P<0,01) та загальним жиром тіла (t=-2,27, P<0,01) для обох статей [16]. Падіння відношення 5 α -ТНФ+ТНФ/ТНЕ, але незмінність відношення кортизол/кортизон у сечі, разом з ослабленням периферичної продукції кортизолу після орального прийому кортизону вказують на пригнічення 11 β -HSD1 в осіб з ожирінням, як у чоловіків, так і у жінок [16].

У чоловіків 22-57 років з ІМТ 20,6-35,6 кг/м² показники ожиріння (ІМТ, % жиру у тілі, відношення обвід талії/обвід стегон – ОТ/ОС) асоціювалися з підвищенням у добовій сечі 5 α - і 5 β -відновлених метаболітів кортизолу (P<0,05-0,01) та підвищенням активності 11 β -HSD1 у підшкірному червоному жирі (P<0,05). Печінкова акумуляція жиру пов'язувалася з вибіркоким підвищенням екскреції з сечею 5 β -відновлених метаболітів кортизолу і кортизону (P<0,01) та пониженим відношенням 5 α -ТНФ+ТНФ/ТНЕ (P<0,001), але *in vivo* не було різниці у перетворенні кортизону в кортизол після оральної дози кортизону. Підвищена екскреція 5 β -відновлених метаболітів кортизолу була незалежно пов'язана з інсулінорезистентністю і гіпертригліцеридемією. Однак маса вісцерального жиру не асоціювалася з показниками метаболізму кортизолу [17].

Аналіз екскреції з сечею метаболітів глюкокортикоїдів у товстих пубертатних дітей 12-18 років показав збільшення виділення сумарних метаболітів кортизолу та зменшення відношення 5 α -ТНФ+ТНФ/ТНЕ. Активність 11 β -HSD1 була вірогідно зв'язана з віком і не корелювала з ІМТ та загальною кількістю метаболітів кортизолу у сечі. Величина виділених з сечею глюкокортикоїдів і активність ізоферменту не проявляли зв'язку з інсулінорезистентністю (НОМА-індекс), масою жиру (% від маси тіла) та ОТ/ОС [18].

У опасистих чоловіків і жінок швидкість ендогенної продукції кортизолу була такою ж, як і у нетовстих осіб, і не відрізнялась за статтю. Підвищення швидкості

метаболічного кліренсу кортизолу виявилось більшим у ожирілих жінок, ніж у чоловіків, але в обох статей прямо корелювало з відношенням метаболітів кортизолу до метаболітів кортизолу у сечі [19]. Окисно-відновна активність 11 β -HSD1 у конверсії кортизолу в кортизон, і навпаки, визначена за тривалої інфузії міченого кортизолу, виявила більше утворення міченого кортизолу у чоловіків, ніж у жінок, і ця статевая особливість зберігалася при ожирінні. У опасистих чоловіків кількість генерованого кортизолу із міченого кортизолу була більшою, ніж в осіб з нормальною масою тіла [20].

З метою в'яснення стану обміну глюкокортикоїдів у самців жирних і худих щурів Zuckerman визначали стероїди у 72-годинній сечі і пробі крові о 9 год, активність 5-редуктази 1 типу і 11 β -HSD1 – у тканинах на розтині [21]. Ожирілі тварини мали підвищений вміст кортикостерону у крові і виділяли з сечею майже у 6 разів більше метаболітів кортикостерону, ніж худі, з більшою пропорцією 5-відновлених чи 5-окиснених метаболітів. 11-Дегідрокортикостерон був також підвищений у плазмі в 4 рази і в сечі – у 14 разів. У печінці ожирілих щурів 5-редуктаза 1 типу мала у 1,5 рази більшу активність, ніж у худих, але активність 11 β -HSD1 і рівень її мРНК були у 2 рази нижчими. В той же час, у ожирілих щурів активність 11 β -HSD1 не відрізнялася у скелетних м'язах і підшкірному жири, але у 2 рази була більшою у жири сальника, тоді як активність 11 β -HSD2 у 1,5 рази була вищою у нирках. Автори припускають, що збільшена інактивація глюкокортикоїдів 5-редуктазою у печінці і 11 β -HSD2 у нирках разом з погіршеною реактивацією глюкокортикоїдів 11 β -HSD1 у печінці може підвищувати метаболічний кліренс глюкокортикоїдів і знижувати місцеву концентрацію їх в цих місцях. Навпаки, підвищення активності 11 β -HSD1 у жири сальника може підвищувати локально активацію глюкокортикоїдного рецептора і сприяти ожирінню.

Щоб випробувати важливість цього ізоферменту в організмі, у мишей здійснювали цілеспрямоване руйнування гена 11 β -HSD1. Ці миші були неспроможні перетворювати інертний 11-дегідрокортикостерон в активний кортикостерон *in vivo*. Не дивлячись на компенсаторну гіперплазію надниркових залоз і збільшення секреції кортикостерону, голодання гомозиготних мутантів виснажувало активацію ключових печінкових ферментів глюконеогенезу (глюкозо-6-фосфатази і фосфоенолпіруват-карбоксикинази), очевидно, внаслідок відносної внутрішньопечінкової недостатності глюкокортикоїдів. Миші 11 β -HSD1^{-/-} були резистентні до гіперглікемії, викликаній стресом чи ожирінням [22].

Подальше вивчення метаболічних наслідків недостатності 11 β -HSD1 у мишей 11 β -HSD1^{-/-} виявило у них нижчий рівень тригліцеридів у плазмі, підвищений холестерин ліпопротеїдів високої щільності, з підвищенням мРНК у печінці і рівня аполіпропротеїну A1 у сироватці [23].

Отже, недостатність чи пригнічення 11 β -HSD1 справляє благотворні метаболічні ефекти на вуглеводний і жировий обміни. Миші 11 β -HSD1^{-/-} мають удосконалену толерантність до глюкози і поліпшений профіль ліпідів. Вони опираються метаболічним наслідкам стресу і високожирової дієти через підвищення чутливості до інсуліну та інші сприятливі ефекти у печінці і жировій тканині. Ці миші протистоять діабету і надлишку ваги, хоча з'їдають більше корму [24].

На противагу наведеному вище, трансгенні миші з надекспресією 11 β -HSD1 вибірково у жировій тканині мали підвищений рівень кортикостерону у жири і розвинуте вісцеральне ожиріння, яке посилювалося високожировою дієтою. Вони проявляли інсулінорезистентний діабет і гіперліпідемію [25]. В іншому дослідженні, миші aP2-HSD1 із спорідненою трансгенною надекспресією цього ферменту в жирових клітинах не тільки розвивали вісцеральне ожиріння з інсулінорезистентністю і дисліпідемією, але також і чутливу до солі гіпертензію [26], тобто мали характерні ознаки метаболічного синдрому.

При полігенній моделі ожиріння, що виникла завдяки довготривалій селекції відхилення маси тіла (жирні і худі миші з 23 % і 4 % жиру у тілі, відповідно), у жирних мишей спостерігався інсулінорезистентний МС з жирною печінкою і гіпертензією. Несподівано у цих мишей виявився недостаток глюкокортикоїдів у плазмі і недостатність 11 β -HSD1 у жировій тканині, але високою виявилася дія гормонів у печінці. Коли мишам давали екзогенні глюкокортикоїди чи високожирову дієту, МС загострювався тільки у жирних мишей [27]. Ці дані наводять на думку, що і у людей ідіопатичний МС може асоціюватися з такими новими зразками дії і чутливості до глюкокортикоїдів, які реалізуються через тканинну специфічність 11 β -HSD1.

З метою визначення потенціального вкладу збільшення тільки внутрішньопечінкових глюкокортикоїдів у розвиток інсулінорезистентного синдрому, у печінці трансгенних мишей вибірково генерували експресивне підвищення активності 11 β -HSD1 [28]. Отримані результати дали авторам підставу передбачати, що підвищення 11 β -HSD1 у печінці може мати відношення до патогенезу специфічного ожиріння печінки, інсулінорезистентності і гіпертензивного синдрому, як це трапляється, наприклад, при МС в осіб з нормальною масою тіла.

Нааявність тканинно-специфічної активності 11 β -HSD1 у трансгенних гризунів спонукала до пошуків відповідних особливостей у людей. У 34 чоловіків визначали кортизол у плазмі після прийому малої дози дексаметазону опівночі, після внутрішньовенного введення кортикотропін-релізінг гормону і після орального прийому кортизону. Метаболіти кортизолу визначали у сечі, зібраній за добу, а в отриманому біопсією підшкірному жирі досліджували метаболізм кортизолу *in vitro* [29]. Підвищений ІМТ асоціювався із збільшенням екскреції метаболітів глюкокортикоїдів з сечею ($r = 0,47$, $P < 0,01$). Опасисті чоловіки виділяли з сечею пропорційно більше метаболітів кортизону, ніж кортизолу ($r = 0,43$, $P < 0,02$) і менше перетворювали кортизон в кортизол після орального прийому кортизону ($r = 0,49$, $P = 0,01$), що схиляє до думки про ослаблення активності 11 β -HSD1 у печінці. Протилежно цьому *in vitro* активність 11 β -HSD1 у підшкірному жирі була виразно підвищеною у опасистих чоловіків ($r = 0,66$, $P < 0,01$). Автори вважають, що при ожирінні реактивація кортизону в кортизол 11 β -HSD1 у печінці погіршується, тому рівень кортизолу у плазмі має тенденцію до зниження і це може компенсуватися підвищенням секреції кортизолу наднирниками, опосередкованою нормально функціонуючою ГГАС. Однак зміни 11 β -HSD1 є тканинно-специфічні: незвичайно підвищена реактивація кортизону в кортизол у підшкірній жировій основі може загострювати (поглиблювати) ожиріння.

Для в'яснення функціонального стану 11 β -HSD1 у підшкірному і вісцеральному жирі опасистих жінок і жінок нормальної ваги визначали рівні мРНК 11 β -HSD1 і гексозо-6-фосфат-дегідрогенази (фермента, відповідально за синтез кофактора, потрібного для здійснення окисно-відновної активності 11 β -HSD1) з використанням реакції зворотної транскрипції (RT) і кількісної полімеразної ланцюгової реакції (PCR) в реальному часі. Вміст мРНК 11 β -HSD1 був вірогідно підвищений і у підшкірному, і у вісцеральному жирі (720 % і 450 % проти контролю, відповідно; $P < 0,05$) і корелював з рівнями мРНК гексозо-6-фосфат-дегідрогенази. Рівень мРНК 11 β -HSD1 у вісцеральному жирі вірогідно корелював з антропометричними параметрами: ІМТ, об'ємом талії, черевним сагітальним діаметром і відсотком жиру у тілі [30].

З використанням напівкількісного методу гібридизації *in situ*, вивчали експресію мРНК 11 β -HSD1 в адипоцитах і стромальних компартментах підшкірної черевної жирової тканини, отриманої від 12 худих пацієнтів (ІМТ – $23 \pm 3,7$ кг/м², вік – 33 ± 10 р.), та у підшкірній і вісцеральній жировій тканинах, отриманих від 18 товстих пацієнтів (ІМТ – $41 \pm 6,3$ кг/м², вік – 41 ± 12 р.). мРНК 11 β -HSD1 була

експресована в адипоцитах, стромі і стінках судин. Розташування мРНК 11 β -HSD1 не відрізнялося у худих і товстих осіб. Рівні мРНК 11 β -HSD1 в адипоцитах підшкірної жирової тканини від опасистих пацієнтів були вірогідно підвищені у порівнянні з худими ($P=0,01$), тоді як у стромальних компартментах не було змін. Експресія мРНК 11 β -HSD1 у товстих пацієнтів в стромальних компартментах вісцеральної жирової тканини була вірогідно підвищена ($P=0,01$) порівняно з підшкірною, але різниці не було в адипоцитах [31]. Отже, виявлено підвищення мРНК 11 β -HSD1 в адипоцитах черевного підшкірного жиру і в адипоцитах та стромі вісцерального жиру опасистих пацієнтів. На думку авторів, надекспресія 11 β -HSD1 може пояснити частину індукованих глюкокортикоїдами метаболічних розладів, зв'язаних з ожирінням, і може сприяти відкладанню вісцерального жиру.

Зміна активності ферменту нерозривно пов'язана зі зміною експресії його гена. Експресію гена 11 β -HSD1 у пробах жирової тканини з різних жирових депо (вісцеральне, підшкірний черевний жир, підшкірний жир сідниць) у худих і товстих чоловіків і жінок визначали за допомогою RT-PCR в реальному часі. Худі жінки мали нижчу експресію гена 11 β -HSD1 у підшкірному жирі, ніж чоловіки (62 % нижчу, $P<0,01$), тоді як між товстими чоловіками і жінками різниці не було. мРНК 11 β -HSD1 у жировій тканині була вищою у товстих осіб порівняно з худими, як у чоловіків, так і в жінок, як у вісцеральному, так і в підшкірному жирі. Не було різниці в експресії мРНК 11 β -HSD1 між вісцеральною і підшкірною жировою тканиною, і між підшкірною жировою тканиною з різних депо [32].

В реалізації ефектів глюкокортикоїдів важливим є і стан глюкокортикоїдного рецептора (ГР). З використанням методу кількісної RT-PCR вивчали експресію ізоформ мРНК ГР (активний, ГР α ; неактивний, ГР β) у циркулюючих мононуклеарних лейкоцитах, отриманих від жінок нормальної маси і жінок з гіноїдним чи андроїдним ожирінням, а за допомогою гібридизації *in situ* визначали рівні мРНК ГР α у жировій тканині від контрольних і ожирілих пацієнтів [33]. Рівні мРНК ГР α були вірогідно нижчими у черевній підшкірній тканині, отриманій від опасистих пацієнтів, у порівнянні з нетовстими, що наводить на думку про існування негативного зворотного зв'язку в експресії гена ГР. А це, в свою чергу, дозволяє припустити, що вісцеральна, а не підшкірна жирова тканина, зберігає повну здатність відповідати на підвищену місцеву генерацію кортизолу.

В іншій роботі, рівні мРНК 11 β -HSD1 і глюкокортикоїдного рецептора (ГР α) визначали RT-PCR у пробах жирової тканини із підшкірних (черевно, стегно, сідниці) і внутрішньочеревних (сальник) жирових депо опасистих жінок з МС. мРНК 11 β -HSD1 була найвищою у черевному підшкірному ($P<0,001$) і сальниковому ($P<0,001$) депо та позитивно корелювала з вісцеральним жиром. Сальникова 11 β -HSD1 корелювала з відсотком жиру у тілі ($r=0,46$, $P<0,05$), з розміром жирових клітин ($r=0,46$, $P<0,001$) і тригліцеридами ($r=0,46$, $P<0,05$). Навпаки, мРНК ГР α була найвищою у жирі сальника ($P<0,001$) і негативно корелювала з ІМТ, черевним підшкірним ($r=-0,589$, $P<0,05$) і сальниковим депо ($r=-0,627$, $P<0,05$). мРНК ГР α із сальника була зворотно пов'язана з вісцеральним жиром ($r=-0,507$, $P<0,05$), розміром жирових клітин ($r=-0,52$, $P<0,01$) і тригліцеридами ($r=-0,50$, $P<0,05$) [34]. Отже, ожиріння асоціюється з підвищенням рівня мРНК 11 β -HSD1 в усіх жирових компартментах. Виявлений зв'язок 11 β -HSD1 з величиною жирових клітин сальника передбачає, що внутрішньоклітинна регенерація кортизолу є строгим провісником гіпертрофії сальника.

Представлені дослідження переконливо свідчать, що підшкірні і вісцеральні жирові депо не є ідентичні, і є локально специфічні особливості активації 11 β -HSD1 в осіб з ожирінням, що найбільше виражені у вісцеральному жирі, але можуть спостерігатися також у жировій тканині з підшкірних жирових депо.

Активация 11 β -HSD1 підтверджується зростанням рівня її мРНК та експресією гена 11 β -HSD1. Механізм цієї підвищувальної регуляції (up-regulation) залишається неясним. В той же час функціонування цього ізоферменту у печінці пригнічено при ожирінні, на що вказує ослаблення генерації кортизолу із прийнятого перорального кортизону і зменшення відношення 5 α -THF+THF/THE у добовій сечі. Пригнічення 11 β -HSD1 знижує рівні глюкокортикоїдів у печінці і таким чином зменшує глюконеогенез і продукцію глюкози та адипогенез. Порушення перетворення кортизону в кортизол при ожирінні може представляти захисний механізм запобігання приросту ваги і нетолерантності до глюкози.

Експресія 11 β -HSD1 в жировій тканині регулює диференціацію адипоцитів і проліферацію преадипоцитів, вона є важливим модулятором цих процесів. Підвищення експресії 11 β -HSD1 у жирі сальника не є первинною причиною ожиріння, але підвищення проліферації преадипоцитів у сальнику може сприяти збільшенню вісцеральної жирової маси у небезпечних пацієнтів. Висловлена гіпотеза, що фермент 11 β -HSD1 може бути важливим аутокринним регулятором маси жиру [35]. Поглиблення дизрегуляції 11 β -HSD1 із зростанням ІМТ у пацієнтів з ожирінням проявляє сильний зв'язок з вісцеральним жировим депо, але причинні фактори, що становлять фундамент цих взаємозв'язків, залишаються невідомими.

Через 10 тиж перебування на низькокалорійній дієті небезпечні пацієнти (6 чоловіків і 6 жінок, ІМТ – 35,9 \pm 0,9 кг/м²) добилися вірогідної втрати ваги (14,1 \pm 1,3 % від початкової ваги). До того ж, у них знизилася загальна маса жиру (з 41,8 \pm 1,9 до 32,0 \pm 1,7 кг (P<0,001), систолічний артеріальний тиск (з 135 \pm 5 до 121 \pm 5 мм рт. ст., P<0,01), загальний холестерин сироватки (з 5,4 \pm 0,2 до 4,8 \pm 0,2 ммоль/л, P<0,05). Після втрати ваги у крові підвищилось відношення кортизол/кортизон (P<0,01), а експресія мРНК 11 β -HSD1 в ізольованих адипоцитах збільшилася в 3,4 рази (P<0,05). На думку авторів, зниження активності і експресії 11 β -HSD1 при ожирінні через зменшення тканинно-специфічної концентрації кортизолу може бути компенсаторним механізмом щодо подолання інсулінорезистентності. В цьому плані пригнічення 11 β -HSD1 виступає мішенню нової терапевтичної стратегії підвищення чутливості організму до інсуліну [36].

Зважаючи на зовнішню схожість ожиріння при гіперкортицизмі і МС, в жирі сальника хворих з синдромом Іценка-Кушинга внаслідок аденоми наднирника оцінювали експресію мРНК 11 β -HSD1 і білка за допомогою методів RT-PCR і вестерн-блот. Виявилось, що мРНК 11 β -HSD1 була в 13 разів вищою у небезпечних осіб порівняно з контролем, але не було різниці між пацієнтами з синдромом Іценка-Кушинга і контролем [37]. Ці дані підтвердили залучення ферменту 11 β -HSD1 у вісцеральне ожиріння, що було більш очевидним в осіб з вираженим ожирінням, ніж у хворих з синдромом гіперкортицизму. Недостатнє підвищення експресії 11 β -HSD1 у пацієнтів з синдромом Іценка-Кушинга нашоує на думку про знижувальну регуляцію (down-regulation) ферменту при цій патології внаслідок тривалої надмірної стимуляції глюкокортикоїдами.

Наскільки встановлені у небезпечних людей особливості функціонування 11 β -HSD1 мають місце при поєднаній патології – цукровому діабеті і ожирінні – вияснили у декількох дослідженнях.

Обстеження хворих на ЦД у стані декомпенсації засвідчило, що у пацієнтів з нормальною масою тіла екскреція з сечею вільного кортизолу збільшилася на 65,7 %, а його тетрагідрометаболітів (5 α -THF+THF) – на 46,1 %, тоді як екскреція вільного кортизону збільшилася на 37 %, а тетрагідрокортизолу – лише на 17,6 %. Тобто, наявним було виразне превалювання у добовій сечі стероїдів групи кортизолу над стероїдами групи кортизону. У хворих на ЦД і ожиріння виділення індивідуальних 17-оксикортикостероїдів з сечею

суттєво не відрізнялося від хворих з нормальною масою. Так, відношення кортизол/кортизон і $5\alpha\text{-THF}+\text{THF}/\text{THE}$ (як параметри загальної активності $11\beta\text{-HSD}$) у хворих з нормальною масою відповідно становили 1,57 і 0,52, у хворих з супутнім ожирінням – 1,72 і 0,41 (у здорових – 1,29 і 0,42). Не виявлено також суттєвих відмінностей в екскреції кортизолу і його похідних в залежності від віку хворих [38]. З нівелюванням метаболічних розладів екскреція глюкокортикоїдів з сечею зменшувалася, але переважання стероїдів групи кортизолу зберігалася. Згладжування виявлених порушень обміну глюкокортикоїдів (сповільнення відновлення кільця А стероїдів $5\alpha\text{-}$ і $5\beta\text{-}$ редуктазою у печінці та ослаблення функції $11\beta\text{-HSD}$) при досягненні клінічної компенсації цукрового діабету вказує на безперечний зв'язок їх з метаболічними розладами, обумовленими недостатком інсуліну.

У 25 нелікованих худих чоловіків з гіперглікемією (20 – з ЦД-2 і 5 – з порушеною толерантністю до глюкози, з ІМТ до 32 кг/м^2), які знаходилися на контрольованій дієті і не мали діабетичних ускладнень, на тлі вищого HbA_{1c} ($6,9\pm 0,2\%$ проти $6,0\pm 0,1\%$ у контролі, $P < 0,0001$) і тригліцеридемії спостерігалася схожа зі здоровими людьми секреція кортизолу, концентрація кортизолу у плазмі в 9 год ранку і екскреція метаболітів глюкокортикоїдів з сечею. Однак пропорції кортизолу, що екскретувалися як $5\alpha\text{-}$ і $5\beta\text{-}$ відновлені метаболіти, були підвищені у хворих на ЦД. Після прийому *per os* 25 мг кортизону утворення печінковою $11\beta\text{-HSD1}$ кортизолу було ослабленим у пацієнтів з ЦД ($P < 0,005$). Але біопсія підшкірного жиру з сідниць (5 – ЦД і 12 – контроль) *in vitro* не виявила різниці в активності $11\beta\text{-HSD1}$ [39].

Ці знахідки свідчать, що ізольована гіперглікемія асоціюється з деякими, але не всіма, змінами метаболізму і дій кортизолу, які спостерігаються в осіб з ожирінням і МС. Виявлення нормальної секреції кортизолу і його нормального вмісту у циркулюючій крові у гіперглікемічних пацієнтів передбачає, що якщо кортизол відіграє роль у патогенезі ЦД-2, він повинен мати варіанти чутливості периферичних тканин до гормону, що і відмічено у обстежених хворих на діабет – підвищення центральної чутливості до глюкокортикоїдів в механізмі негативного зворотного зв'язку у пробі з дексаметазоном, і підвищення периферичної чутливості до глюкокортикоїдів у пробі з бекламетазоном (поблідніння шкіри). Тобто, хоча секреція і концентрація в крові кортизолу нормальна, вона є невідповідною до підвищеної чутливості організму до гормону [39]. У худих гіперглікемічних чоловіків при першому проходженні через печінку конверсія кортизону в кортизол була ослаблена. Ймовірно, що ця печінкова дизрегуляція пов'язана з недостатком дії інсуліну.

Порівняння 33 чоловіків, хворих на ЦД-2 (вік $44,2\pm 13$ р., ІМТ – $31,1\pm 7,5\text{ кг/м}^2$), і 38 опасистих чоловіків (вік $41,4\pm 14$ р., ІМТ – $38,2\pm 12,8\text{ кг/м}^2$) виявило у хворих на ЦД-2 підвищення концентрації кортизолу у плазмі крові о 9 год ранку і підвищення відношення кортизол/кортизон, за відсутності різниці в загальній екскреції глюкокортикоїдів з сечею та відношеннях кортизол/кортизон і $5\alpha\text{-THF}+\text{THF}/\text{THE}$ у сечі. Коли обстежуваних розділили відповідно до ІМТ (<25 , $25\text{-}30$, $>30\text{ кг/м}^2$), відношення кортизол/кортизон і $5\alpha\text{-THF}+\text{THF}/\text{THE}$ також були схожими в обох групах [40]. Однак у контрольних осіб з підвищенням ІМТ відношення $5\alpha\text{-THF}+\text{THF}/\text{THE}$ вірогідно знижувалося ($1,29\pm 0,4$ проти $0,96\pm 0,2$, ІМТ <25 проти $>30\text{ кг/м}^2$, $P < 0,05$), засвідчуючи сповільнення активності $11\beta\text{-HSD1}$ без зміни відношення кортизол/кортизон у сечі. У них спостерігалась зворотна кореляція між відношенням $5\alpha\text{-THF}+\text{THF}/\text{THE}$ і ІМТ ($r = -0,32$, $P = 0,04$) та вісцеральним жиром ($r = -0,49$, $P < 0,05$), але не у хворих на діабет. У групі діабету, але не в контролі, відношення кортизол/кортизон у крові корелювало з НОМА-S ($r = 0,34$, $P = 0,03$) і холестеринном сироватки ($r = 0,34$, $P = 0,03$) [40]. Автори припускають, що сповільнення конверсії кортизону в кортизол при ожирінні є захисним

механізмом, що зменшує інсулінорезистентність і адипогенез. Нездатність до понижувальної регуляції (down-regulation) 11 β -HSD1 у пацієнтів з ЦД-2 може бути потенційована дисліпідемією, інсулінорезистентністю і ожирінням. В цій ситуації пригнічення 11 β -HSD1 може представляти терапевтичну стратегію у хворих на ЦД-2 і ожиріння.

З метою в'ясування зв'язку інсулінорезистентності при ЦД-2 із загальною зміною активності 11 β -HSD1 у напрямку кортизолу, у 8 чоловіків з ЦД-2 і 8 здорових чоловіків визначали відношення кортизол/кортизон у плазмі та відношення кортизол/кортизон і 5 α -THF+THF/THF у добовій сечі відразу і через 1 тиж після введення їм протягом 24 год інсуліну [41]. Не дивлячись на погіршення чутливості до інсуліну у хворих на ЦД-2 (величина M дорівнювала 11,6 \pm 7,7 проти 28,5 \pm 11,6 мкмоль/кг · хв, у хворих на діабет і здорових, відповідно), базальне відношення кортизол/кортизон у плазмі в 8 год і відношення 5 α -THF+THF/THF у сечі були близькими в обох групах. Чутливість до інсуліну не корелювала з цими показниками. Інсулін не діяв на відношення кортизол/кортизон у сечі в жодній з груп. Це дослідження не є опорою для гіпотези про асоціацію інсулінорезистентності при ЦД-2 з загальною зміною активності 11 β -HSD1 у напрямку кортизолу. Однак з погляду стимулюючого впливу інсуліну і кортизолу на адипогенез, тривала стимуляція редуцтазної активності 11 β -HSD1 інсуліном може робити тяжчим вісцеральне ожиріння.

Порівняння експресії 11 β -HSD1 у підшкірному і вісцеральному жирі опасистих осіб (ІМТ 39,1 \pm 5,3 кг/м²) з МС і ЦД-2 показало, що у більшості товстих пацієнтів експресія 11 β -HSD1 була вищою у вісцеральному жирі, ніж у підшкірному. Рівні мРНК 11 β -HSD1 у підшкірному жирі були вищі в осіб з МС, ніж без нього, у хворих на ЦД-2, ніж в осіб з порушеною толерантністю до глюкози. Експресія 11 β -HSD1 у підшкірному жирі, але не у вісцеральному, асоціювалася з погіршенням метаболічних умов, хоча не залежала від рівня глюкози натще і рівня вільного кортизолу у сечі [42].

Зіставлення наведених вище даних наочно демонструє розбіжності у функціонуванні 11 β -HSD у пацієнтів з ожирінням, цукровим діабетом та поєднаною патологією (ЦД + ожиріння). У хворих на ЦД, незалежно від маси тіла, відношення кортизол/кортизон у циркулюючій крові і кортизол/кортизон та 5 α -THF+THF/THF у сечі відображають перевагу в організмі біологічно активного гормону кортизолу.

Щоб в'яснити, чи є зміни у експресії мРНК і активності 11 β -HSD1 та 11 β -HSD2 у скелетних м'язах хворих на ЦД-2, у взятих біопсією м'язах вивчали рівень мРНК 11 β -HSD1, 11 β -HSD2 і гексозо-6-фосфат-дегідрогенази (H6PDH) кількісною RT-PCR в реальному часі та ферментну активність – через відсоток перетворення ³H-кортизону в ³H-кортизол [43]. За вихідних умов рівень мРНК всіх трьох ферментів був подібним у хворих на ЦД-2 і контрольних осіб. Активність 11 β -HSD1 у пацієнтів з діабетом була нижчою (% конверсії ³H-кортизону в ³H-кортизол становив 11,4 \pm 2,5 % проти 18,5 \pm 2,2 %, P=0,04), а активність 11 β -HSD2 – вищою, ніж у контролі (% конверсії ³H-кортизолу в ³H-кортизол дорівнював 17,2 \pm 2,6 % проти 9,2 \pm 1,3 %, P=0,01). Після дексаметазону (4 мг на добу упродовж 4 днів) активність 11 β -HSD1 зросла у пацієнтів з діабетом (P=0,02), але не в контролі, а активність 11 β -HSD2 не змінилася у жодній з груп. У вихідному положенні відмічена вірогідна зворотна кореляція між активністю 11 β -HSD1 і 11 β -HSD2 (r=-0,46, P=0,03).

Отже, м'язова окисно-відновна активність 11 β -HSD1 є зниженою у хворих на ЦД-2, але суттєво підвищувально регулюється у відповідь на введення потенційних глюкокортикоїдів. Ця підвищувальна регуляція (up-regulation) не асоціюється зі змінами H6PDH, яка наявна з надлишком. У м'язах людей 11 β -HSD2 також експресується і при діабеті її функція підвищена, забезпечуючи інактивацію кортизолу. Спираючись на виявлені закономірності, автори [43]

вважають, що у скелетних м'язах система ізоферментів 11β -HSD зменшує несприятливі метаболічні наслідки високого рівня кортизолу у хворих на ЦД. Цей захисний механізм втрачається після дексаметазону, який може мати частку в етіології індукованої глюкокортикоїдами гіперглікемії. Тому для лікування глюкокортикоїдної чи індукованої метаболічним стресом інсулінорезистентності можуть бути використані специфічні інгібітори 11β -HSD1.

Кортизол індукує безліч адаптивних відповідей організму для підтримання гомеостазу. Кортизол опосередковує ефекти активації внутрішньоклітинного глюкокортикоїдного і мінералокортикоїдного рецепторів, є зв'язуючою ланкою між ними, і модифікує локальний метаболізм глюкокортикоїдів через 11β -HSD. 11β -HSD1 експресується в тканинах, які важливі для метаболізму (печінка, жирова тканина), запалення (макрофаги) і кардіоваскулярної функції (гладенькі м'язи судин). 11β -HSD1 є домінуюче редуктазою, що регенерує кортизол з інертного кортизолу, у зв'язку з чим розширюється активація глюкокортикоїдів. Загалом, метаболічні ефекти глюкокортикоїдів проявляють спротив ефектам інсуліну і підвищують оборот зарезервованої енергії (в глікогені, тригліцеридах та білках) і широко доступного палива для мітохондріального окиснення (глюкоза і вільні жирні кислоти). Глюкокортикоїди також піднімають тиск крові, мають прямі ефекти на серце і кровоносні судини, вони підтримують прогресування атеросклерозу і впливають на судинне ремоделювання після внутрішньосудинного пошкодження та ішемії.

Перечислене вище спонукає до пошуків захисту від надмірної дії глюкокортикоїдів, і в цьому напрямку пригнічення ферменту 11β -HSD1, що генерує кортизол, видається привабливим і перспективним.

Примінення відібраного потужного інгібітора 11β -HSD1 – сполуки 544 – у мишей ApoE KO з моделлю MC знижує масу тіла, інсулін, глюкозу натще, тригліцериди і холестерин у сироватці крові, а у мишей з моделлю ЦД-2 – знижує глюкозу натще, інсулін, глюкагон, тригліцериди і вільні жирні кислоти та поліпшує порушену толерантність до глюкози. Особливо важливо, що пригнічення 11β -HSD1 сповільнює прогресування бляшок в моделі мишачого атеросклерозу. Миші з цільовим вилученням аполіпопротеїну E проявляють на 84 % меншу акумуляцію в аорті загального холестерину, як і зниження холестерину і тригліцеридів у сироватці, коли лікуються інгібітором 11β -HSD1 [44].

На моделі дієтою індукованого ожиріння (дієта з високим вмістом сахарози і жирів) у щурів досліджувалися ефекти фармакологічного пригнічення 11β -HSD1 специфічним інгібітором (сполука А, 3 мг/кг · добу, 21 день). Сполука А не впливала на вживання їжі або збільшення маси тіла, але специфічно зменшувала вагу мезентеріального жиру і розмір адипоцитів, без помітного впливу на епідидимальні і ретроперитонеальні депо. У мезентеріальному жирі інгібітор знизив (на 25-50 % від контролю) рівень мРНК генів, включених у синтез ліпідів і циркуляцію жирних кислот, і підвищив (на 30 %) активність окиснення жирних кислот за сприяння ферменту карнітин-пальмітоїлтрансферази 1. Сполука А сильно зменшила вміст триацилгліцерину у печінці і ліпідів у плазмі [45].

Введення неселективного інгібітора 11β -HSD1 карбеноксолону (KBX) (підшкірно, 4 тиж) гіперліпідемічним мишам призвело до зменшення прибавки ваги і зменшення маси жиру у тілі. Миші $A^{y/a}$ і $LDLR^{-/-}$ показали також величезний ефект препарату [46]. Очевидно, що інгібітор 11β -HSD1 має за мішень не тільки печінку, а також жирову тканину і ослаблює багато чинників ризику MC, з більш вираженими ефектами у випадках тяжкого ожиріння і гіперліпідемії [46].

Випробування карбеноксолону у 6 худих і 6 товстих чоловіків у рандомізованому, плацебо-контрольованому перехресному дослідженні показало, що опасті чоловіки не відрізнялися за швидкістю регенерації кортизолу ($^4\text{H-F}$) в усьому тілі, але мали швидшу конверсію ^3H -кортизолу в ^3H -кортизол у черевній підшкірній жировій тканині (визначали мікродіалізом). Під час

введення інсуліну активність 11β -HSD1 у жирі помітно падала у худих, але не в товстих чоловіків. KBX пригнічував регенерацію кортизолу в усьому тілі, але не пригнічував 11β -HSD1 у жировій тканині і не діяв на чутливість до інсуліну (визначалася введенням $^2\text{H}_2$ -глюкози з інсуліном і без нього) [47]. Отже, товсті чоловіки є менш сприйнятливі до дії KBX, ніж худі. Зроблено висновок, що для використання у товстих пацієнтів інгібітори 11β -HSD1 мають пригнічувати ензим ефективніше у жировій тканині.

Застосування KBX у 6 здорових людей і 6 худих хворих на ЦД-2 (100 мг 3 рази на добу, per os 7 днів) засвідчило, що у здорових людей інгібітор знижував холестерин у сироватці, але не впливав на ліпіди сироватки і холестерин у хворих на діабет. KBX не діяв на швидкість поглинання глюкози чи пригнічення вивільнення вільних жирних кислот під час гіперінсулінемії. Однак KBX зменшував продукцію глюкози під час гіперглюкагоземії у хворих на діабет. KBX сприяв підвищенню тиску крові і зниженню калію у плазмі [48].

У 7 здорових чоловіків-волонтерів, що приймали карбенексолон в дозі 100 мг 3 рази на добу упродовж 3 діб, пригнічення 11β -HSD1 контролювалося з використанням 5 різних механізмів біомаркету. Після прийому KBX кожен з біомаркерів демонстрував ослаблення активності 11β -HSD1: знижувалася генерація кортизолу і преднізолону у сироватці, зменшувалося відношення 5α -THF+THF/THF у сечі, знижувалася кількість наявного кортизолу в інтерстиціальній рідині жирової тканини (мікродіаліз) і знижувалося вивільнення в інтерстиціальну рідину гліцерину із-за пригнічення опосередкованого глюкокортикоїдами ліполізу [49]. Це клінічне дослідження продемонструвало швидке пригнічення активності глюкокортикоїдів у жировій тканині здорових людей, але невідомо, які наслідки будуть від примінення KBX в осіб з ожирінням і цукровим діабетом.

Безумовно, що найкращі результати можна очікувати від вибраних (селективних) інгібіторів ферменту, як це можна спостерігати у тварин з експериментальним ЦД-2.

На моделі спонтанно гіперглікемічних і гіперінсулінемічних мишей KKA(y) застосували новий селективний інгібітор мишачої 11β -HSD1 – BVT. 2733, який вводили підшкірно упродовж 7 днів. На тлі зниження мРНК фосфоенолпіруват-карбоксікінази і глюкозо-6-фосфатази інгібітор знизив концентрацію глюкози в крові і інсуліну у сироватці порівняно з мишами, які отримували розчинник [50]. Подальше випробування інгібітора BVT. 2733 здійснено на трьох моделях ЦД-2 у мишей. Гіперглікемічні і гіперінсулінемічні миші ob/ob, db/db, KKA(y), і нормальні C57BL/6J миші отримували через рот BVT. 2733 (200 мг/кг, двічі на добу). У гіперглікемічних, але не в нормальних мишей, інгібітор знизив глюкозу у циркулюючій крові (до 50-85 % від контролю) і інсулін (на 52-65 %). Після прийому інгібітора при оральному глюкозотолерантному тесті концентрація глюкози у мишей ob/ob і KKA(y) становила 65-75 % від величини контролю, а в мишей KKA(y) концентрація інсуліну знижувалася на 62-74 %. Еуглікемічний гіперінсулінемічний клемп демонстрував зниження продукції ендогенної глюкози на 21-61 %. Аналіз у печінці мишей KKA(y) мРНК фосфоенолпіруват-карбоксікінази показав зменшення її на 71 %. Холестерин, тригліцериди і вільні жирні кислоти знижувалися на 81-86 % у мишей KKA(y) через 4 год після посту. Невелике зменшення споживання їжі спостерігалось у мишей ob/ob і KKA(y) [51]. Отже, селективні інгібітори 11β -HSD1 знижують рівні глюкози і поліпшують чутливість до інсуліну у різних мишачих моделях ЦД-2.

Очевидний зв'язок метаболізму глюкокортикоїдів зі станом вуглеводного і жирового обміну в організмі поставив питання про можливість впливу на цей процес компонентів їжі. У здорових людей після змішаної їжі вміст кортизолу у крові підвищувався, що асоціювалося із збільшенням продукції кортизолу

в усьому тілі, але не було різниці в утворенні гормону у нутрощах і тканинах поза черевною порожниною [52]. Вимірювання регенерації кортизолу в усьому тілі і в жировій тканині здорових чоловіків після введення міченого кортизолу і кортизону та проведенні гіперінсулінемічного еуглікемічного клемпу, інфузії ліпідів і сольового розчину показало, що гіперінсулінемія підвищує 11β -HSD1 в усьому тілі, збільшуючи системну генерацію кортизолу. У жировій тканині гіперінсулінемія і підвищення вільних жирних кислот індукуює гостре зростання активності 11β -HSD1. Інсулін підвищує редуктазну і проявляє тенденцію до підвищення дегідрогеназної активності. Введення ліпідів не справляє ефекту на метаболізм кортизолу в усьому тілі, але підвищує дегідрогеназну і редуктазну активність у жировій тканині [53]. Ці ефекти можуть збільшувати внутрішньоклітинну концентрацію кортизолу після їжі.

Механізми, що лежать в основі зміни активності 11β -HSD1, залишаються невідомими. Транскрипція цього ізоферменту сильно регулюється з включенням багатьох чинників, які змінюються (інсулін, цитокіни, андрогени, вітамін D_3 , агоністи рецептора- γ , що активується проліфератором пероксисом, – PPAR γ) [40, 41, 54-58]. Нещодавно запропонована гіпотеза, за якою редуктазну активність 11β -HSD1 надає гексозо-6-фосфат-дегідрогеназа (H6PDH) – мікросомальний фермент, що генерує NADPH у проєвіті ендоплазматичного ретикулума і розділяє субстрат глюкозо-6-фосфат (G6P) з мікросомальним ферментом глюкозо-6-фосфатазою- α (G6Pase- α). Рух у клітині глюкозо-6-фосфату прямо регулює редуктазну активність 11β -HSD1 і зв'язує метаболізм глюкози у клітині з функцією ГГАС [59].

11β -HSD2 рідко знаходять у жировій тканині. Недавно 11β -HSD2 відкрита в ендотелії судин [60]. Вона діє виключно як дегідрогеназа, що інактивує кортизол. Її експресія ~ в 30 разів нижча, ніж 11β -HSD1. У частини осіб з есенційною гіпертензією є недостатність 11β -HSD2, що призводить до внутрішньоклітинного надлишку кортизолу у стінці судин і гіпертензії. Крім того, такі пацієнти мають підвищену, залежну від глюкокортикоїдного рецептора, чутливість тканин до кортизолу [61-63].

Підсумок

Активація внутрішньоклітинних глюкокортикоїдних рецепторів визначається не тільки концентрацією кортизолу у плазмі, що строго контролюється ГГАС і надлишок секреції пригнічується зворотним зв'язком, але також ферментами 11β -HSD у клітинах-мішенях, де 11β -HSD1 конвертує кортизон у кортизол, а 11β -HSD2 – перетворює кортизол у кортизон. Завдяки цьому тканини піддаються впливу відповідного надлишку кортизолу без підвищення секреції кортизолу або підвищення його концентрації у плазмі. Дані на клітинах в культурі, ізольованих тканинах і трансгенних моделях мишей встановили, що 11β -HSD1 регенерує глюкокортикоїди і посилює активацію глюкокортикоїдного рецептора. У людей швидкість регенерації кортизолу у периферичних тканинах за величиною подібна до секреції кортизолу наднирковими залозами упродовж більшої частини доби, і принциповим виявляється кругообіг у нутрощах. Приблизно 2/3 активності у нутрощах знаходиться у вісцеральній жировій тканині, з якої кортизол через порталну вену доправляється до печінки.

Потенційна важливість 11β -HSD1 у метаболізмі глюкокортикоїдів та опосередкованих ними обмінних процесах ілюструється в сучасних експериментах на трансгенних мишах. Миші з надекспресією 11β -HSD1 вибірково у жировій тканині мають підвищений внутрішньоожиривий і порталний, але не системний, рівень кортикостерону, черевне ожиріння, дисліпідемію, інсулінорезистентність, гіперглікемію і гіпертензію. Трансгенна надекспресія 11β -HSD1 у печінці дає помякшений метаболічний синдром з середньою ін-

сулінорезистентністю, дисліпідемією, гіпертензією і ожирінням печінки, але не загальним ожирінням чи нетолерантністю до глюкози.

Трансгенна надекспресія 11 β -HSD1 у жировій тканині чи печінці мишей спричиняє компоненти метаболічного синдрому, тоді як трансгенне зниження 11 β -HSD1 (миші knock-out) запобігає шкідливим метаболічним ускладненням ожиріння: миші 11 β -HSD1^{-/-} мають низький рівень внутрішньоклітинного глюкокортикоїда, протистоять інсулінорезистентності, гіперглікемії і дисліпідемії та захищені від ожиріння і діабету.

Хоча рівні глюкокортикоїдів плазми не підвищені при ожирінні, спостерігається дизрегуляція 11 β -HSD1 із зменшенням її активності і експресії у печінці та збільшенням – у жировій тканині. За міркуванням більшості дослідників, зменшення активності 11 β -HSD1 може бути аутокринним захисним механізмом до запобігання зростання ожиріння і підвищення продукції глюкози у печінці з прогресуванням ожиріння. Цей адаптивний механізм ослаблення активності 11 β -HSD1 і як наслідок – зменшення регенерації кортизолу, не має місця у пов'язаному з ожирінням цукровому діабеті 2 типу і підвищення глюкокортикоїдів може вносити вклад у патогенез хвороби.

Механізм, що забезпечує підвищення експресії і активності 11 β -HSD1 у жировій тканині при ожирінні залишається невідомим.

Фармакологічне пригнічення 11 β -HSD1, як терапевтичної мішені, знижує рівні глюкокортикоїдів у печінці і жировій тканині і в результаті зменшує глюконеогенез у печінці, продукцію глюкози і адипогенез.

Селективні інгібітори 11 β -HSD1 у гризунів спричиняють зниження глікемії, дисліпідемії, втрату ваги і поліпшення чутливості до інсуліну та затримку прогресування серцево-судинних порушень. Використання інгібіторів 11 β -HSD підтвердило уявлення, що фермент є хорошою терапевтичною мішенню у лікуванні ожиріння, МС і ЦД-2 з вісцеральним ожирінням. Ендокринологи з нетерпінням чекають появи селективних інгібіторів пригнічення 11 β -HSD1 у людей, щоб впровадити у клінічну практику новий терапевтичний підхід для зменшення ризиків кардіоваскулярних захворювань.

Література

1. Бутрова С. А. Метаболический синдром // Ожирение: этиология, патогенез, клинические аспекты / Под ред. И. И. Дедова, Г. А. Мельниченко. М. : Медицинское информационное агентство, 2004, 45-78.
2. Гурьева И. В. Общее руководство Международной Диабетической Федерации по сахарному диабету 2 типа (краткое изложение) // Сахарный диабет. 2007, № 4, 54-56.
3. Magliano D. J., Shaw J. E., Zimmet P. Z. How to best define the metabolic syndrome // Ann. Med. 2006, 38, N 1, 34-41.
4. Мамедов М.Н. Значимость метаболического синдрома в клинической практике: диагностические основы и пути медикаментозной коррекции // Міжнар. ендокрин. журнал. 2007, № 2 (8), 100-103.
5. Ford E. S., Giles W. N., Dietz W. H. Prevalence of the metabolic syndrome among US adult. Findings from the Third National Health and Nutrition Examination Survey // JAMA. 2002, 287, N 3, 356-359.
6. Безверхая Т. П. Функциональная активность коры надпочечников и обмен кортизола у больных сахарным диабетом: Автореф. дисс. д-ра мед. наук. К., 1978. 45 с.
7. Мазурина Н. К. Нарушения гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы при сахарном диабете // Пробл. эндокринолог. 2007, 53, № 2, 29-34.
8. Chiodini I., Torlontano M., Scillitani A. et al. Association of subclinical hypercortisolism with type 2 diabetes mellitus: a case-control study in hospitalized patients // Eur. J. Endocrinol. 2005, 153, N 6, 837-844.

9. Liu H., Bravata D. M., Cabacchan J. et al. Elevated late-night salivary cortisol levels in elderly male type 2 diabetic veterans // *Clin. Endocrinol. (Oxf)*. 2005, **63**, N 6, 642-649.
10. Oltmanns K. M., Dodt B., Schultes B. et al. Cortisol correlates with metabolic disturbances in a population study of type 2 diabetic patients // *Eur. J. Endocrinol.* 2006, **154**, N 2, 325-331.
11. Godoy-Matos A. F., Vieira A. R., Moreira R. O. et al. The potential role of increased adrenal volume in the pathophysiology of obesity-related type 2 diabetes // *J. Endocrinol. Invest.* 2006, **29**, N 2, 159-163.
12. Meyer G., Badenhop K. Glucocorticoid-induced insulin resistance and diabetes mellitus/receptor-, postreceptor mechanisms, local cortisol action, and new aspects of antidiabetic therapy // *Med. Klin. (Munich)*. 2003, **98**, N 5, 266-270.
13. Stewart P. M., Krozowski Z. S. 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase // *Vitam. Horm.* 1999, **57**, 249-324.
14. Stewart P. M., Krozowski Z. S., Gupta A. et al. Hypertension in the syndrome of apparent mineralocorticoid excess due to mutation of the 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 gene // *Lancet*. 1996, **347**, N 8994, 88-91.
15. Bujalska I. J., Kumar S., Stewart P. M. Does central obesity reflect "Cushing's disease of the omentum" ? // *Lancet*. 1997, **349**, N 9060, 1210-1213.
16. Stewart P. M., Boulton A., Kumar S. et al. Cortisol metabolism in human obesity: Impaired cortisone → cortisol conversion in subjects with central adiposity // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1999, **84**, N 3, 1022-1027.
17. Westerbacka J., Yki-Jarvinen H., Vehkavaara S. et al. Body fat distribution and cortisol metabolism in healthy men: enhanced 5β-reductase and lower cortisol/cortisone metabolite ratios in men with fatty liver // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2003, **88**, N 10, 4924-4931.
18. Wiegand S., Richardt A., Remer T. et al. Reduced 11β-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 activity in obese boys // *Eur. J. Endocrinol.* 2007, **157**, N 3, 319-324.
19. Vierhapper H., Nowotny P., Waldhausl W. Production rates of cortisol in obesity // *Obesity Research*. 2004, **12**, N 9, 1421-1425.
20. Vierhapper H., Heinze G., Nowotny P. Sex-specific difference in the interconversion of cortisol and cortisone in men and women // *Obesity*. 2007, **15**, N 4, 820-824.
21. Livingstone D. E. W., Jones G. C., Smith J. K. et al. Understanding the role of glucocorticoids in obesity: tissue-specific alterations of corticosterone metabolism in obese Zucker rats // *Endocrinology*. 2000, **14**, N 2, 560-563.
22. Kotelevtsev Yu., Holmes M. C., Burchell A. et al. 11β-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 knockout mice show attenuated glucocorticoid-inducible responses and resist hyperglycemia on obesity or stress // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997, **94**, 14924-14929.
23. Morton N. M., Holmes M. C., Fievet C. et al. Improved lipid and lipoprotein profile, hepatic insulin sensitivity, and glucose tolerance in 11β-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 null mice // *J. Biol. Chem.* 2001, **276**, N 44, 41293-41300.
24. Morton N. M., Paterson J. M., Masuzaki H. et al. Novel adipose tissue-mediated resistance to diet-induced visceral obesity in 11β-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 – deficient mice // *Diabetes*. 2004, **53**, N 4, 931-938.
25. Masuzaki H., Paterson J., Shinyama H. et al. A transgenic model of visceral obesity and the metabolic syndrome // *Science*. 2001, **294**, N 5549, 2166-2170.
26. Masuzaki H., Yamamoto H., Kenyon C. J. et al. Transgenic amplification of glucocorticoid action in adipose tissue causes high blood pressure in mice // *J. Clin. Invest.* 2003, **112**, 83-90.
27. Morton N. M., Densmore V., Wamil M. et al. A polygenic model of the metabolic syndrome with reduced circulating and intra-adipose glucocorticoid action // *Diabetes*. 2005, **54**, 3371-3378.

28. Paterson J. M., Morton N. M., Fievet C. et al. Metabolic syndrome without obesity: Hepatic overexpression of 11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in transgenic mice // *PNAS*, 2004, **101**, N 18, 7088-7093.
29. Rask E., Olsson T., Soderberg S. et al. Tissue-specific dysregulation of cortisol metabolism in human obesity // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2001, **86**, N 3, 1418-1421.
30. Desbriere R., Vuaroqueaux V., Achard V. et al. 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 mRNA is increased in both visceral and subcutaneous adipose tissue of obese patients // *Obesity*. 2006, **14**, N 5, 794-798.
31. Paulmyer-Lacroix O., Boullu S., Oliver C. et al. Expression of the mRNA coding for 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in adipose tissue from obese patients: an in situ hybridization study // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2002, **87**, N 6, 2701-2705.
32. Paulsen S. K., Pedersen S. B., Fisker S., Richelsen B. 11 β -HSD type 1 expression in human adipose tissue: impact of gender, obesity, and fat localization // *Obesity*. 2007, **15**, N 8, 1954-1960.
33. Boullu-Ciocca S., Paulmyer-Lacroix O., Fina F. et al. Expression of the mRNAs coding for the glucocorticoid receptor isoforms in obesity // *Obesity Research*. 2003, **11**, 925-929.
34. Michailidou Z., Jensen M. D., Dumesic D. A. et al. Omental 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 1 correlates with fat cell size independently of obesity // *Obesity*. 2007, **15**, N 5, 1155-1163.
35. Tomlinson J. W., Sinha B., Bujalska I. et al. Expression of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in adipose tissue is not increased in human obesity // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2002, **87**, N 12, 5630-5635.
36. Tomlinson J. W., Moore J. S., Clark P. M. S. et al. Weight loss increases 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 expression in human adipose tissue // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2004, **89**, N 6, 2711-2716.
37. Mariniello B., Ronconi V., Rilli S. et al. Adipose tissue 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 expression in obesity and Cushing's syndrome // *Eur. J. Endocrinol.* 2006, **155**, N 3, 435-441.
38. Безверхая Т. П. Обмен кортизола у больных сахарным диабетом // *Пробл. эндокринологии*. 1978, № 3, 14-19.
39. Andrews R. C., Herlihy O., Livingstone D. E. W. et al. Abnormal cortisol metabolism and tissue sensitivity to cortisol in patients with glucose intolerance // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2002, **87**, N 12, 5587-5593.
40. Valsamakis G., Anwar A., Tomlinson J. W. et al. 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 activity in lean and obese males with type 2 diabetes mellitus // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2004, **89**, N 9, 4755-4761.
41. Kerstens M. N., Riemens S. C., Sluiter W. J. et al. Lack of relationship between 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase setpoint and insulin sensitivity in the basal state and after 24h of insulin infusion in healthy subjects and type 2 diabetic patients // *Clin. Endocrinol. (Oxf)*. 2000, **52**, N 4, 403-411.
42. Alberti L., Girola A., Gilardini L. et al. Type 2 diabetes and metabolic syndrome are associated with increased expression of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 1 in obese subjects // *Int. J. Obes. (Lond)*. 2007, **31**, N 12, 1826-1831.
43. Jang C., Obeyesekere V. R., Dille R. J. et al. Altered activity of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase types 1 and 2 in skeletal muscle confers metabolic protection in subjects with type 2 diabetes // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2007, **92**, N 8, 3314-3320.
44. Hermanowsky-Vosatka A., Balkovec J. M., Cheng K. et al. 11 β -HSD1 inhibition ameliorates metabolic syndrome and prevents progression of atherosclerosis in mice // *J. Exp. Med.* 2005, **202**, N 4, 517-527.
45. Berthiaume M., Laplante M., Festuccia W. et al. Depot-specific modulation of rat intraabdominal adipose tissue lipid metabolism by pharmacological inhibition of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 // *Endocrinology*. 2007, **148**, N 5, 2391-2397.

46. Nuotio-Antar A. M., Hachey D. L., Hasty A. H. Carbenoxolone treatment attenuates symptoms of metabolic syndrome and atherogenesis in obese, hyperlipidemic mice // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2007, **293**, E1517-E1528.
47. Sandeep T. C., Andrew R., Homer N. Z. M. et al. Increased in vivo regeneration of cortisol in adipose tissue in human obesity and effects of the 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibitor carbenoxolone // *Diabetes.* 2005, **54**, N 3, 872-879.
48. Andrews R. C., Rooyackers O., Walker B. R. Effects of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase inhibitor carbenoxolone on insulin sensitivity in men with type 2 diabetes // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2003, **88**, N 1, 285-291.
49. Tomlinson J. W., Sherlock M., Hughes B. et al. Inhibition of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity in vivo limits glucocorticoid exposure to human adipose tissue and decreases lipolysis // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2007, **92**, N 3, 857-864.
50. Alberts P., Engblom L., Edling N. et al. Selective inhibition of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 decreases blood glucose concentrations in hyperglycaemic mice // *Diabetologia.* 2002, **45**, N 11, 1528-1532.
51. Alberts P., Nilsson C., Selen G. et al. Selective inhibition of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 improves hepatic insulin sensitivity in hyperglycemic mice strains // *Endocrinology.* 2003, **144**, N 11, 4755-4762.
52. Basu R., Singh R., Basu A. et al. Effect of nutrient ingestion on total-body and splanchnic cortisol production in humans // *Diabetes.* 2006, **55**, N 3, 667-674.
53. Wake D. J., Homer N. Z. M., Andrew R., Walker B. R. Acute in vivo regulation of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 activity by insulin and intralipid infusions in humans // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2006, **91**, N 11, 4682-4688.
54. Tomlinson J. W., Moore J. S., Cooper M. S. et al. Regulation of expression of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in adipose tissue: tissue-specific induction by cytokines // *Endocrinology.* 2001, **142**, N 5, 1982-1989.
55. Apostolova G., Schweizer R. A. S., Balazs Z. et al. Dehydroepiandrosterone inhibits the amplification of glucocorticoid action in adipose tissue // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2005, **288**, N 5, E957-E964.
56. Barat P., Livingstone D. E. W., Elferink C. M. C. et al. Effects of gonadectomy on glucocorticoid metabolism in obese Zucker rats // *Endocrinology.* 2007, **148**, N 10, 4836-4843.
57. Morris K. L., Zemel M. B. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ modulation of adipocyte glucocorticoid function // *Obesity Research.* 2005, **13**, N 4, 670-677.
58. Mai K., Andres J., Bobbert T. et al. Rosiglitazone decreases 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in subcutaneous adipose tissue // *Clin. Endocrinol. (Oxf).* 2007, **67**, N 3, 419-425.
59. Walker E. A., Ahmed A., Lavery G. G. et al. 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 regulation by intracellular glucose 6-phosphate provides evidence for a novel link between glucose metabolism and hypothalamo-pituitary-adrenal axis function // *J. Biol. Chem.* 2007, **282**, N 37, 27030-27036.
60. Christy C., Hadoke P. W. F., Paterson J. M. et al. Glucocorticoid action in mouse aorta; localization of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 and effects on responses to glucocorticoids in vitro // *Hypertension.* 2003, **42**, 580-587.
61. Walker B. R., Stewart P. M., Shackleton C. H. et al. Deficient inactivation of cortisol by beta-hydroxysteroid dehydrogenase in essential hypertension // *Clin. Endocrinol. (Oxf).* 1993, **39**, N 2, 221-227.
62. Soro A., Ingram M. C., Tonolo G. et al. Evidence of coexisting changes in 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase and 5 β -reductase activity in subjects with untreated essential hypertension // *Hypertension.* 1995, **25**, 67-70.
63. Lovati E., Ferrari P., Dick B. et al. Molecular basis of human salt sensitivity; the role of the 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1999, **84**, N 10, 3745-3749.

Локальная реактивация глюкокортикоидов – новая терапевтическая мишень или маячащий свет в конце тоннеля? (обзор литературы)

Т. П. Безверхая, Н. Д. Тронько

Институт эндокринологии и обмена веществ им. В. П. Комиссаренко АМН Украины, г. Киев, 04114, Украина

Трансгенные модели ожирения и сахарного диабета 2 типа на грызунах выявили важную роль в механизмах развития этих заболеваний дорецепторного локального обмена глюкокортикоидов с участием ферментов 11β -гидроксистероид-дегидрогеназ, которые превращают у людей инертный кортизон в биологически активный гормон кортизол, и наоборот. Особенное внимание привлекает 11β -гидроксистероид-дегидрогеназа 1 типа, которая имеет окислительно-восстановительные свойства, но *in vivo* действует преимущественно как редуктаза и регенерирует кортизол из кортизона. Характерной особенностью этого изофермента является не только тканевая специфичность (максимальная активность в печени и жировой ткани), но и различная степень активности в зависимости от места расположения жировой ткани в теле (сальник, подкожный жир на животе или ягодицах). Применение ингибиторов 11β -гидроксистероид-дегидрогеназы 1 типа у животных продемонстрировало благоприятные эффекты – снижение эндогенной продукции глюкозы, гипергликемии, дислипидемии и повышение чувствительности к инсулину. Это дает надежду на успех при использовании подобных ингибиторов и у людей. Освещению современного состояния этой проблемы и посвящен настоящий обзор литературы.

Ключевые слова: сахарный диабет 2 типа, метаболический синдром, ожирение, 11β -гидроксистероид-дегидрогеназа, обмен глюкокортикоидов.

Local glucocorticoid reactivation: a new therapeutic target or a light at the end of the tunnel? (literature review)

V. P. Bezverkha, M. D. Tronko

V. P. Komisarenko Institute of Endocrinology and Metabolism of AMS, 04114 Kyiv, Ukraine

Transgenic models of obesity and type 2 diabetes mellitus on rodents have demonstrated an important role in the mechanism of development of these diseases, of prereceptor local glucocorticoid metabolism with involvement of 11β -hydroxysteroid dehydrogenases, which inversely transform cortisone into biologically active cortisol in humans and vice-versa. 11β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 that has oxyreduction properties, but acts *in vivo* mainly as a reductase and regenerates cortisol from cortisone, merits a special attention.

A characteristic feature of this isoenzyme is not only its tissue specificity (maximal activity in liver, adipose tissue), but also a different degree of activity depending on adipose tissue location in the body (epiploon, subcutaneous fat on the abdomen or thighs). Use of 11β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibitors in animals has demonstrated favourable effects – a decrease in endogenous production of glucose, hyperglycemia, dyslipidemia, and increased sensitivity to insulin. This gives hope for successful use of such inhibitors in humans as well. The present literature review is devoted to the current status of this problem.

Key words: type 2 diabetes mellitus, metabolic syndrome, obesity, 11β -hydroxysteroid dehydrogenase, glucocorticoid metabolism.

(Надійшла 5.02.2008)

ЗВ'ЯЗОК ПІДВИЩЕННЯ КІЛЬКОСТІ ЗАЛІЗА В ОРГАНІЗМІ З МЕТАБОЛІЧНИМИ ПОРУШЕННЯМИ ПРИ ІНСУЛІНОРЕЗИСТЕНТНОМУ СИНДРОМІ ТА ЦУКРОВОМУ ДІАБЕТІ 2 ТИПУ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

В. М. Скибун*

*Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В. П. Комісаренка АМН
України, м. Київ, 04114, Україна*

Під перенасиченням організму залізом розуміють надлишок загального вмісту заліза, більша частина якого знаходиться у складі запасних сполук (феритину, гемосидерину) та сироваткового транспортного білка (трансферину). Ступінь насиченості трансферину залізом та концентрація феритину у сироватці крові використовуються як маркери насиченості організму залізом. За умов перенасичення організму негемовим залізом деяка частина його може знаходитись у токсичній «вільній» формі, яка здатна каталізувати реакції утворення вільних радикалів, ушкодження ДНК, порушувати транспорт електронів, стимулювати клітинну проліферацію. У значній кількості епідеміологічних досліджень доведено існування взаємозв'язків між підвищенням запасів заліза і розвитком інсулінорезистентності та інших компонентів метаболічного синдрому: ожиріння, артеріальної гіпертензії, дисліпідемії, гіперглікемії, а також збільшенням ризику розвитку цукрового діабету 2 типу та серцево-судинних захворювань. Показано, що зниження вмісту заліза в організмі асоціюється зі зменшенням ступеня інсулінорезистентності. Такі заходи, як флеботомія, використання хелаторів та антиоксидантів (зокрема десфероксаміну, α -ліпоевої кислоти) можуть зменшувати ризик розвитку цукрового діабету шляхом зниження запасів заліза в організмі.

Ключові слова: негемове залізо, перевантаження залізом, насиченість трансферину залізом, інсулінорезистентність, цукровий діабет 2 типу.

Біологічні функції заліза в організмі різноманітні та багатогранні. Воно бере участь у тканинному диханні, підтримує життєздатність клітин, в комплексі з порфірином входить до складу білків-хромопротейдів, які забезпечують процеси біологічного окиснення, є компонентом гема – структурної одиниці гемоглобіну, який здійснює зв'язування, транспорт та перенесення кисню акцепторним клітинам і тканинам. Залізо впливає на клітинний і неспецифічний імунітет, бере участь у процесах мітозу, біосинтезу колагену, тирозину, катехоламінів та ДНК [1, 2].

Кількість заліза в здоровому організмі надзвичайно стабільна. Гомеостаз заліза забезпечується у першу чергу шляхом регуляції його всмоктування, оскільки здатність до виділення цього елемента є дуже обмеженою [3].

Останнім часом досягнуто значного прогресу у розкритті складних процесів регуляції обміну заліза в організмі. Сучасні технології у галузі молекулярної хімії та генетики дозволили виділити у чистому вигляді (у кристалічній формі) й розшифрувати структуру білків, які беруть участь в обміні заліза: феритину, трансферину, трансферинових рецепторів, феропортину, гепсидину, гепестину, церулоплазміну, гемоксигенази, фратоксину та ін.

* Адреса для листування (Correspondence): Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В. П. Комісаренка АМН України, вул. Вишгородська, 69, м. Київ, 04114, Україна

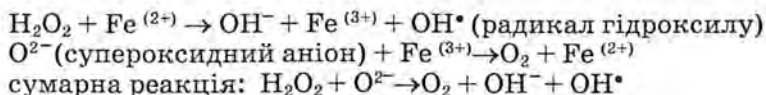
Відкриті залізорегуляторні білки – HFP-1 та HFP-2. Регуляція експресії цих білків забезпечує підтримку балансу заліза в організмі. Розшифровані гени, які регулюють обмін заліза: HFE, HAMP, SLC40F1 та ін. Мутації цих генів зумовлюють спадкове перевантаження організму залізом (первинний гемохроматоз) [4- 6].

Відомо, що з загальної кількості заліза, яка міститься в організмі дорослої людини (4,5-5,5 г), більша частина локалізована внутрішньоклітинно: 60-70 % заліза входить до складу гемоглобіну, близько 10 % – до міоглобіну, цитохромів та залізовмісних ензимів (пероксидази, каталази). Простетичною групою згаданих білків, які беруть участь у транспорті кисню та переносі електронів у дихальному ланцюзі, є протопорфірин; залізо, що входить до складу гемопротейдів, називається гемовим. Негемові форми заліза утворені запасними і транспортними білками, що містять залізо: 15-25 % заліза депонується у вигляді комплексу з феритином (форма, що легко мобілізується) або гемосидерину (резервна форма, що важко мобілізується), і лише 1 % загальної кількості заліза в організмі знаходиться у сироватці крові та лімфі, де воно практично повністю зв'язано з транспортними білками – трансферином і феритином [1,5,6].

Здатність сироватки крові до зв'язування заліза у здорових дорослих чоловіків і жінок становить в нормі 62 мкмоль та 68 мкмоль, відповідно. Величини концентрацій трансферину у плазмі та сироватці крові мають менші статеві та вікові відмінності і становлять в середньому 2,5 мкг/л. Концентрація трансферину в цільній крові, визначена методом кількісної спектроскопії, для чоловіків становить $2,5 \pm 0,63$ мкг/л, для жінок – $2,63 \pm 0,6$ мкг/л. Відомо, що здатність сироватки крові до зв'язування заліза зростає з вичерпанням запасів заліза в організмі [7].

На міжнародному симпозіумі «BIOIRON-99» [8] затверджені основні біомаркери вмісту заліза в організмі. До них належать: відсоток насичення трансферину залізом (% НТЗ), який у нормі повинен перевищувати 45 %, а також концентрація феритину у сироватці крові (> 200 мкг/л у жінок і > 300 мкг/л у чоловіків).

За умов перенасичення організму негемовим залізом деяка частина його може знаходитись у вільній формі, тобто не зв'язаній з трансферином. «Вільне» залізо є токсичною формою, яка завдяки своїй високій здатності до окиснення та відновлення має властивість каталізувати реакції утворення вільних радикалів в реакціях Фентона та Хабер-Вейса [9,10]:



Доведено, що супероксидні та гідроксильні радикали, утворені за участю вільного (каталітичного) заліза, у свою чергу, здатні вивільняти залізо з феритину, таким чином, утворюється замкнене коло, що призводить до формування нових активних фрагментів і подальшого посилення оксидативних процесів. Наслідком цього може бути порушення синтезу ДНК, вплив на активність ряду ферментів, пероксидація поліненасичених ліпідів клітинних мембран тощо. У зв'язку з цим надлишок заліза в організмі є суттєвим чинником оксидативного стресу, що може відігравати помітну роль у розвитку різноманітних патологічних станів, зокрема атеросклерозу, серцево-судинних захворювань, дегенеративних змін нервової системи, пневмосклерозу, а також цукрового діабету (ЦД) [11,12].

Дані про те, що системне перевантаження залізом може бути пов'язане з порушенням метаболізму глюкози, були вперше отримані зі спостережень

про збільшення частоти цукрового діабету серед хворих на класичний спадковий гемохроматоз. Подальші дослідження з цього питання показали, що надлишок заліза, незалежно від його причини та генетичної основи, призводить до підвищення частоти захворювання на ЦД [11]. Останнім часом дедалі більше зростає кількість публікацій, які відповідають принципам доказової медицини та підтверджують значення підвищеного накопичення в організмі заліза у розвитку інсулінорезистентності (ІР), метаболічного синдрому, ЦД 2 типу. Про це переконливо свідчать результати низки великих проспективних досліджень, проведених у різних країнах, у ході яких досліджувались популяції людей різних вікових категорій [7, 13-23].

Так, у дослідженні, проведеному у популяції 6044 дорослих американців [15], показано, що помірне збільшення запасів заліза (нижче за рівень, що спостерігається при спадковому гемохроматозі) є показником ризику метаболічного синдрому у здорових чоловіків (2880 осіб) та у жінок у пре- та постменопаузальному періоді (відповідно, 1645 та 1424 особи). Метаболічний синдром (за сукупною наявністю трьох відомих компонентів) частіше діагностували в осіб з найвищою концентрацією феритину у сироватці крові у порівнянні з особами з відносно низькою концентрацією феритину: у пременопаузальних жінок – 14,9 % проти 6,4 %; у жінок в постменопаузі – 47,5 % проти 28,2 %; у чоловіків – 27,3 % проти 13,8 %, відповідно ($P < 0,002$).

Показано, що концентрація у циркуляції феритину – індикатора клітинних запасів заліза – значимо зв'язана з центральним розподілом жиру та рядом інших показників ожиріння серед американських чоловіків мексиканського походження [16]. Виявлено кореляційний зв'язок між рівнем сироваткового феритину та показниками вмісту вісцерального, підшкірного та печінкового жиру в організмі ($r=0,25$; $0,23$ та $-0,28$, відповідно, $P < 0,0001$), а також індексом інсулінорезистентності НОМА-ІР ($r=0,29$, $P < 0,0008$), у зв'язку з чим автори даного дослідження, в якому обстежено 248 осіб, вважають, що концентрація сироваткового феритину може бути показником ступеня інсулінорезистентності та системного вмісту жиру [17]. В загальній популяції практично здорових чоловіків у східній Фінляндії (1013 осіб) сироваткові рівні феритину позитивно корелювали з базальним рівнем глюкози та з площею під глюкозною кривою при оральному глюкозотолерантному тесті [18].

В довготривалому (6 років) епідеміологічному дослідженні з вивчення інсулінорезистентного синдрому (DESIR, Франція) [7] взяли участь 469 чоловіків, 278 пре- та 197 постменопаузальних жінок віком від 30 до 65 років. Вивчення асоціацій між рівнями феритину і трансферину та метаболічним синдромом (МС) і його компонентами показало, що у випадку підвищеного вмісту маркерів метаболізму заліза частота прояву метаболічного синдрому (за критеріями IDF) дійсно збільшується у всіх досліджених підгрупах пацієнтів. У чоловіків та у постменопаузальних жінок МС зустрічався частіше, ніж у пременопаузальних жінок (21 %, 24 % та 8 %, відповідно). Автори передбачають, що у розвитку МС та, дуже ймовірно, ІР, мають велике значення не тільки запаси заліза в організмі, але й порушення системи транспорту і депонування заліза.

Захворювання на цукровий діабет, що розвивається на тлі ІР, часто супроводжується підвищенням сироваткової концентрації феритину. У роботі Y.Rep et al. [24] було виявлено гіперферитинемію у 6,6 % хворих на цукровий діабет 2 типу, при цьому феритин прогнозував рівень HbA_{1c} незалежно від рівня глюкози. У хворих на ЦД 2 типу спостерігали високу концентрацію феритину у сироватці крові (413 ± 155 мкг/л); дещо нижчий рівень виявлено в осіб з порушенням толерантності до глюкози та родичів хворих на ЦД (354 ± 173 та 231 ± 130 мкг/л), в той час як в осіб контрольної групи концентрація феритину становила 165 ± 110 мкг/л ($P < 0,05$). У пацієнтів зі щойно діагностованим ЦД 2 типу рівень сироваткового феритину був вищим, ніж

в осіб з більшою тривалістю захворювання (462 ± 132 проти 354 ± 173 мкг/л, $P < 0,05$). Таким чином, показано, що рівень сироваткового феритину змінюється у процесі переходу від метаболічного синдрому до маніфестації ЦД 2 типу, а також залежить від тривалості захворювання [24].

На взаємозв'язок між ризиком захворювання на ЦД та ступенем навантаження організму залізом вказують результати цілого ряду проспективних епідеміологічних досліджень [18-29]. Дослідження, що проводились в Куопіо (Фінляндія) в рамках Програми з вивчення факторів ризику ішемічної хвороби серця, виявили залежність частоти цукрового діабету (когорта з 1038 чоловіків у віці 42-60 років) та ішемічної хвороби серця (когорта з 45720 чоловіків у віці 40-75 років) від збільшення запасів заліза в організмі [18]. Відмічено, що ця залежність визначалась при такому навантаженні організму залізом, яке не досягло рівня, необхідного для прояву клінічно вираженого гемохроматозу.

Серед дорослих осіб у США, у яких підвищена концентрація феритину, чоловіки мають коефіцієнт ризику виявлення цукрового діабету 4,94 (3,05-8,01), а жінки – 3,61 (2,01-6,48). Це спостереження видається особливо важливим уваги, якщо зазначити, що серед здорових людей похилого віку в США у 28 % чоловіків та 12 % жінок виявляється підвищений вміст заліза [13].

У дослідженнях R. Jiang et al. [21] було обстежено загалом 32826 жінок та 51529 чоловіків віком 40-75 років. Протягом 12 років спостереження виявлено 716 та 1168 випадків захворювання на ЦД 2-типу, відповідно. З'ясовано, що ризик захворювання на ЦД позитивно асоціювався з вживанням гемового заліза (червоного м'яса), але не залежав від вживання негемового заліза, а також від сумарного споживання заліза з їжею, частоти донорства крові, ІМТ, віку та інших факторів ризику діабету. Схожі висновки щодо асоціації між ризиком розвитку ЦД та перевантаженням організму залізом було зроблено в дослідженнях: Y. Song et al. [25] (з 37309 жінок віком більше 45 років за 8,8 років спостереження виявлено 1558 випадків захворювання на ЦД 2 типу); S. Rajpathak et al. [26, 27] (з 85031 жінок віком від 34 до 59 років за 20 років спостереження виявлено 4599 випадків захворювання на ЦД 2 типу, причому ризик захворювання не залежав від маси тіла обстежених жінок); M. Van Dam et al. [28] (з 42504 чоловіків, віком 40-75 років за 12 років виявлено 1321 випадок ЦД 2 типу).

Відомим маркером інсулінорезистентності, а також предиктором розвитку цукрового діабету 2 типу, є знижений рівень вільного тестостерону та глобуліну, що зв'язує статеві гормони (sex hormone-binding globulin – SHBG). У популяційному дослідженні за участю 1896 фінських чоловіків середнього віку з метаболічним синдромом без ЦД показано, що низький рівень SHBG та тестостерону асоціюється з наявністю запалення (яке оцінювали за рівнем С-реактивного протеїну) та з високим рівнем феритину. Рівень феритину, що характеризує запаси заліза в організмі, був підвищений у чоловіків з низьким вмістом тестостерону у сироватці, як і в чоловіків із встановленим МС, у порівнянні з контрольною групою чоловіків без ознак МС. Концентрації SHBG та тестостерону у сироватці пацієнтів зворотно корелювали з рівнем феритину, а також з вмістом гемоглобіну в крові. Припускають, що зниження рівня тестостерону при гемохроматозі пов'язано з безпосереднім токсичним впливом надлишку заліза на тестикулярну та гіпофізарну тканини. Вплив заліза на рівні тестостерону за умов концентрацій заліза, близьких до верхньої межі норми, невідомий. Відомо, що екзогенний тестостерон стимулює продукцію гемоглобіну незалежно від запасів заліза в організмі, у той же час, низькі рівні тестостерону асоціюються зі зниженням гемоглобіну [29].

Хоча механізми, за допомогою яких підвищення запасів заліза сприяє розвитку ЦД 2 типу, поки що остаточно нез'ясовані, є дані про те, що шляхи

патогенезу індукованого залізом діабету включають три ключові механізми: інсулінодефіцит, інсулінорезистентність та дисфункцію печінки.

Дослідження на моделі гемохроматозу у мишей дозволили виявити, що надлишок заліза та оксидативний стрес викликають апоптоз β -клітин панкреатичних ostrivciv, що призводить до зниження секреції інсуліну [30]. Панкреатичні клітини надзвичайно доступні до оксидативного ушкодження у зв'язку з майже виключною орієнтацією на мітохондріальний метаболізм глюкози та низькою експресією системи антиоксидантного захисту. Висока експресія транспортеру двовалентних металів додатково схиляє ці клітини до накопичення надлишку заліза та посилює небезпеку від каталізованого залізом оксидативного стресу [31].

На користь порушення метаболізму заліза як причини виникнення IP та ЦД 2 типу свідчать дослідження, в яких серед осіб з гемохроматозом виявлено високу частоту розладів гомеостазу глюкози, що супроводжувалося не тільки порушенням інсулінової секреції, але й інсулінорезистентністю. Перевантаження залізом викликало розвиток IP як прямо, так і через печінкову дисфункцію. Більшість пацієнтів з перевантаженням печінки залізом мали також і IP, що вказує на етіологічний зв'язок між печінковим залізом, порушенням функції печінки та IP [32, 33]. Поглинання печінкою та деградація інсуліну знижується з підвищенням запасів заліза, що може бути одним з чинників розвитку гіперінсулінемії [34].

Резистентність периферичних тканин до інсуліну та гіперінсулінемія при ЦД 2 типу або абсолютна недостатність гормону при ЦД 1 типу можуть впливати на механізми, які регулюють метаболізм заліза. Інсулін стимулює поглинання заліза клітинами шляхом перерозподілу трансферинових рецепторів з внутрішньоклітинного мембранного компартменту на поверхню клітини [35]. Показано, що інсулін відповідає за підвищений синтез феритину в культивованих гліомних клітинах щурів. Той факт, що в мікосомальних мембранах культивованих адипоцитів трансферинові рецептори локалізуються разом з інсуліночутливими транспортерами глюкози та рецепторами інсуліноподібного фактора росту 2, вказує на те, що регуляція інсуліном поглинання заліза може відбуватися паралельно з ефектами інсуліну на транспорт глюкози [36].

Відомо, що процеси глікування білків призводять до продукції активних кисневих радикалів. Кінцеві продукти глікування білків здатні зв'язувати транзитні метали з утворенням так званих «глікохелатів» [37], потенціюючи токсичні ефекти реактивних кисневих радикалів, які у свою чергу, впливають на процес проведення інсулінового сигналу на різних рівнях, включаючи порушення інтерналізації комплексів інсуліну з інсуліновими рецепторами та гальмування транслокації GLUT4 до плазматичної мембрани. Припускають, що зниження запасів заліза може поліпшити стан інсуліночутливості шляхом редукції цих процесів [38].

За умов гіперглікемії має місце неферментативне глікування трансферину, що знижує його здатність до зв'язування заліза та призводить до збільшення пулу вільного заліза і одночасно стимулює утворення феритину. Зниження рівня глікемії зменшує глікування білків та супроводжується зниженням вмісту феритину у сироватці крові [39].

Методи корекції

У випадку перенасичення організму залізом, зниження його запасів може бути досягнуто різними шляхами. Перш за все, рекомендується обмежити надходження заліза з їжею (споживання червоного м'яса), не вживати лікарських препаратів (вітамінно-мінеральних комплексів), що містять залізо.

Донорство крові призводить до зниження запасів заліза та знижує постпрандіальну гіперінсулінемію у здорових добровольців, підвищує інсуліночутливість та є захисним фактором стосовно розвитку цукрового діабету 2 типу [40, 41]. Флеботомія супроводжується зниженням глюкози у сироватці, холестерину, тригліцеридів та апопротеїдів В, покращенням секреторної функції β -клітин та периферичної дії інсуліну у хворих на цукровий діабет 2 типу [42, 43]. В роботах J. Fernandez-Real et al. [44, 45] у здорових чоловіків (донорів, $n=21$ та недонорів, $n=66$) порівнювали показники інсуліночутливості (методом MIN MOD) та запаси заліза в організмі. Показано, що донорство крові у період від 6 міс до 5 років до початку обстеження зумовлювало вищу інсуліночутливість, нижчу секрецію інсуліну та значно меншу концентрацію феритину у сироватці крові порівняно з недонорами. Пацієнти обох груп мали практично однакові показники гематокриту та рівня гемоглобіну в крові. Ймовірно, що втрата крові, стимулюючи процеси гемопоезу та синтезу гемоглобіну, сприяє мобілізації заліза з депо та зниженню загальних запасів металу.

Відомий позитивний ефект препаратів α -ліпоевої кислоти при лікуванні цукрового діабету та його ускладнень можна пояснити її здатністю до виведення з організму надлишкового заліза шляхом утворення хелатних комплексів [46, 47]. Антиоксидантні властивості α -ліпоевої кислоти сприяють переведенню Fe^{2+} в Fe^{3+} [48]. Властивість α -ліпоевої кислоти зв'язувати вільні радикали та вільне залізо в тканинах запобігає участі останнього в перекисному окисненні ліпідів. Отримані експериментальні докази залучення процесів взаємодії похідних α -ліпоевої кислоти з залізом в цитопротекторні ефекти ліпоевої кислоти. Показано, що наявність заліза та утворення його комплексів з ДНК є неодмінною умовою вільнорадикального ушкодження ДНК, а попередня обробка хелаторами (ЕДТА) підвищує стійкість ДНК до пошкодження. Втрата після обробки ЕДТА захисної дії α -ліпоевої кислоти щодо ушкодження ДНК вказує на значення взаємодії ліпоевої кислоти з залізом в її протекторному ефекті.

Для лікування хронічного надлишку заліза в організмі використовуються сполуки, здатні утворювати хелатні комплекси з іонами заліза, такі як десферал (дефероксамін – ДФО), який утворює комплекси переважно з тривалентними іонами заліза і алюмінію. Спорідненість ДФО до двохвалентних іонів (Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+}) значно нижча. Хелатування відбувається у молярному співвідношенні 1:1, тобто 1 г ДФО може зв'язати 85 мг заліза.

ДФО, завдяки своїм хелатувальним властивостям, здатний захоплювати вільне залізо в плазмі або в клітинах і утворювати феріоксаміновий комплекс. Залізо може хелатуватись з феритину та гемосидерину, проте цей процес при клінічних концентраціях ДФО відносно повільний. Однак ДФО не видаляє залізо з трансферину, а також з гемоглобіну та інших гемінових сполук.

В експерименті на тваринах показано захисну дію хелаторів щодо розвитку судинних та неврологічних дисфункцій у щурів, яким вводились сполуки заліза. Порушений гомеостаз заліза при цукровому діабеті може бути чинником, що пояснює ускладнення, які не піддаються корекції навіть за умов задовільного глікемічного контролю, тому використання хелаторів у цих випадках може мати терапевтичне значення [49].

Аналіз даних літератури свідчить про актуальність досліджень, спрямованих на з'ясування ролі порушення обміну заліза у розвитку інсулінорезистентного синдрому та цукрового діабету. Незважаючи на велику кількість доказів наявності взаємозв'язків між цими патологічними станами та перевантаженням організму залізом, поки що недостатньо вивчене питання про можливість корекції гіперферемії у пацієнтів з ЦД 2 типу у процесі терапії цукрознижувальними препаратами з різними механізмами дії, зокрема, з використанням протидіабетичних засобів, які підвищують інсуліночутливість та

інших. Крім того, зазвичай не проводиться спостережень стосовно статевозалежних взаємозв'язків між порушеннями обміну заліза та ознаками метаболічного синдрому, хоча у ряді робіт документовано вплив статевих гормонів на величину запасів заліза. Це вказує на необхідність урахування статевих особливостей та забезпеченості статевими гормонами при розробці диференційованих підходів до корекції станів, пов'язаних з переважанням організму залізом, у чоловіків і жінок різного віку.

Література

1. Andrews N. Disorders of iron metabolism // *N. Engl. J. Med.* 1999, **341**, 1986-1995.
2. Brittenham G., Weiss G., Brissot P. et al. Clinical consequences of new insights in the pathophysiology of disorders of iron and heme metabolism // *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program.* 2000, N 1, 39-50.
3. Pietrangelo A. Hereditary hemochromatosis – a new look at an old disease // *N. Engl. J. Med.* 2004, **350**, 2383-2397.
4. Swinkels D., Janssen M., Bergmans J. et al. Hereditary hemochromatosis: genetic complexity and new diagnostic approaches // *Clin. Chemistry.* 2006, **52**, 950-968.
5. Fleming D., Jacques P., Tucker K. et al. Iron status of free-living, elderly Framingham Study cohort: an iron-replete population with a high prevalence of elevated iron stores // *Am. J. Clin. Nutrition.* 2001, **73**, N 3, 638-646.
6. Ganz T. Molecular control of iron transport // *J. Am. Soc. Nephrol.* 2007, N 1-2, 394-400.
7. Vari I., Balkau B., Kettanen A. et al. Ferritin and transferrin are associated with metabolic syndrome abnormalities and their change over time in a general population. Data from an Epidemiological Study on the Insulin Resistance Syndrome (DE-SIR) // *Diabetes Care.* 2007, **30**, 1795-1801.
8. EASL International Consensus Conference Hemochromatosis // *J. Hepatology.* 2000, **33**, 485-504.
9. Reif W. Ferritin as a source of iron for oxidative damage // *Free Rad. Biol. Med.* 1992, **12**, 417-427.
10. Hebbel R. Auto-oxidation and a membrane-associated «Fenton reagent»: A possible explanation of membrane lesions in sickle erythrocytes // *Clin. Haematol.* 1985, **14**, p.129.
11. Swaminatan S., Fonseca A., Alam M., Shan S. The role of iron in diabetes and its complications // *Diabetes Care.* 2007, **30**, N 7, 1926-1933.
12. Wolf S. Diabetes mellitus and free radicals: free radicals, transition metals and oxidative stress in the aetiology of diabetes mellitus and complications // *Br. Med. Bull.* 1993, **49**, 642-652.
13. Ford E., Cogswell M. Diabetes and serum ferritin concentration among U.S. adults // *Diabetes Care.* 1999, **22**, 1978-1983.
14. Fernandez-Real J.-M., Abel L., Wifredo R. Cross-talk between iron metabolism and diabetes // *Diabetes.* 2002, **51**, 2348-2354.
15. Jehn M., Clarc J., Guallar E. Serum ferritin and risk of the metabolic syndrome in U.S. adults // *Diabetes Care.* 2004, **27**, 2422-2428.
16. Gillum R. Association of serum ferritin and indices of body fat distribution and obesity in Mexican American men // *The Third National Health and Nutrition Examination Survey. Int. J. Obes. Rel. Metab. Dis.* 2001, **25**, 639-645.
17. Iwasaki T., Nakajima A., Yoneda M. et al. Serum ferritin is associated with visceral fat area and subcutaneous fat area // *Diabetes Care.* 2005, **28**, N 10, 2486-2491.
18. Tuomainen T.-P., Nyysonen K., Salonen R. et al. Body iron stores are associated with serum insulin and blood glucose concentrations: population study in 1,013 eastern Finnish men // *Diabetes Care.* 1997, **20**, 426-428.

19. Salonen J.T., Tuomainen T.-P., Nyyssonen K. et al. Relation between iron stores and non-insulin-dependent diabetes in men: case-control study // *Br. Med. J.* 1999, **317**, 727-730.
20. Barbieri M., Ragno E., Benvenuti E. et al. New aspects of the insulin resistance syndrome: impact on haematological parameters // *Diabetologia.* 2001, **44**, 1232-1237.
21. Jiang R., Jing M., Ascherio A. et al. Dietary iron intake and blood donations in relations to risk of type 2 diabetes in men: a prospective cohort study // *Am. J. Clin. Nutr.* 2004, **79**, 70-75.
22. Wrede C. E., Buettner R., Bollheimer L. et al. Association between serum ferritin and the insulin resistance syndrome in a representative population // *Eur. J. Endocrin.* 2006, **154**, 333-340.
23. O'Brien T., Basset B., Burray D. et al. Usefulness of biochemical screening of diabetic patients for hemochromatosis // *Diabetes Care.* 1990, **13**, 532-534.
24. Ren Y., Tian H., Li X. et al. Elevated serum ferritin concentrations in a glucose-impaired population and in normal glucose tolerant first-degree relatives in familial type 2 diabetic pedigrees // *Diabetes Care.* 2004, **27**, 622-623.
25. Song Y., Manson J., Buring J. A prospective study of red meat consumption and type 2 diabetes in middle-age and elderly women // *Diabetes Care.* 2004, **27**, N 9, 2108-2115.
26. Rajpathak S., Ma J., Manson J. et al. Iron intake and the risk of type 2 diabetes in women // *Diabetes Care.* 2006, **29**, N 6, 1370-1375.
27. Rajpathak S., Jinc M., Manson J. et al. High iron intake and the risk of type 2 diabetes in women // *Diabetes Care.* 2006, **29**, N 6, 1370-1376.
28. Van Dam R.M., Willett W.C., Rimm E.B. et al. Dietary fat and meat intake in relation to risk of type 2 diabetes in men // *Diabetes Care.* 2002, **25**, N 3, 417-424.
29. Laaksonen D., Niskanen L., Punnonen K. et al. Sex hormones, inflammation and metabolic syndrome: a population-based study // *Eur. J. Endocrin.* 2003, **149**, N 6, 601-608.
30. Cooksey R., Jouihan H., Ajioka R. et al. Oxidative stress, beta-cell apoptosis, and decreased insulin secretory capacity in mouse models of hemochromatosis // *Endocrinology.* 2004, **145**, 5305-5312.
31. Tiedge M., Lortz S., Drinkgern J., Lensen S. Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defence status of insulin-producing cells // *Diabetes.* 1997, **46**, 1733-1742.
32. McClain D., Abraham D., Rogers J. et al. High prevalence of abnormal glucose homeostasis secondary to decreased insulin secretion in individuals with hereditary hemochromatosis // *Diabetologia.* 2006, **49**, 1661-1669.
33. Adams P., Reboussin D., Barton J. et al. Hemochromatosis and Iron Overload Screening (HERIS) Study Research Investigators // *N. Engl. J. Med.* 2005, **352**, 1769-1778.
34. Niederau C., Berger M., Stremmel W. et al. Hyperinsulinemia in non-cirrhotic haemochromatosis: impaired hepatic insulin degradation? // *Diabetologia.* 1984, **26**, 441-444.
35. Davis R., Corvera S., Czech M. Insulin stimulates cellular iron uptake and causes the redistribution of intracellular transferrin receptors to the plasma membrane // *J. Biol. Chem.* 1986, **261**, 870-871.
36. Tanner L., Lienhard G. Localization of transferrin receptors and insulin-like growth factor II receptors in vesicles from 3T3-L1 adipocytes that contain intracellular glucose transporters // *J. Cell. Biol.* 1989, **108**, 1537-1545.
37. Qian M., Liu M., Eaton J. Transition metals bind to glycosylated proteins forming redox active «glycochelates»: implications for the pathogenesis of certain diabetic complications // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998, **250**, 358-359.

38. Bertelsen M., Anggard E., Carrier M. Oxidative stress impairs insulin internalization in endothelial cell in vitro // *Diabetologia*. 2001, 44, 605-613.
39. Fujimoto S., Kawakami N., Ohara A. Nonenzymatic glycation of transferrin: decrease of iron-binding capacity and increase of oxygen radical production // *Biol. Pharm. Bull.* 1995, 18, 396-400.
40. Shafer A., Cheron R., Dluhy R. et al. Clinical consequences of acquired transfusional iron overload in adults // *N. Engl. J. Med.* 1981, 304, 319-324.
41. Aschrio A., Rimm E., Giovannucci E. et al. Blood donations and risk of coronary heart disease in men // *Circulation*. 2001, 103, 52-57.
42. Facchini F. Effect of phlebotomy on plasma glucose and insulin concentrations // *Diabetes Care*. 1998, 21, p. 2190.
43. Bofill C., Joven J., Bages J. et al. Response to repeated phlebotomies in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus // *Metabolism*. 1994, 43, 614-620.
44. Fernandez-Real J., Penarroja G., Castro A. et al. Blood letting in high-ferritin type 2 diabetes: effects on insulin sensitivity and β -cell function // *Diabetes*. 2002, 51, 1000-1004.
45. Fernandez-Real J., Lopez-Bermejo A., Ricart W. Iron stores, blood donation, and insulin sensitivity and secretion // *Clin. Chemistry*. 2005, 51, N 7, 1201-1205.
46. Трахтенберг И. М., Ермакова О. В., Лубянова И. П. Современные аспекты применения α -липоевой кислоты при экзогенных токсических воздействиях // *Соврем. пробл. токсикологии*. 2005, N 3, 27-31.
47. Кундиев Ю. И., Лубянова И. П., Михайлик О. М. и др. Препарат альфа-липоевой кислоты Берлитион® 300 ораль как средство коррекции изменений в организме, связанных с гиперферремией // *Фармакологический вестник*. 2000, N 3, 6-10.
48. Haggen T. M., Ingersoll R. T., Lykkesfeldt J. et al. (R)-alpha-lipoic acid-supplemented old rats have improved mitochondrial function, decreased oxidative damage, and increased metabolic rate // *FASEB J.* 1999, 13, N 2, 411-418.
49. Cotter M., Cameron N. Iron, diabetes and neurovascular dysfunction in rats // *Diabetologia*. 2006, 49, S.1, p. 61.

Взаимосвязь повышения содержания железа в организме с метаболическими нарушениями при инсулинорезистентном синдроме и сахарном диабете 2 типа (обзор литературы)

В. Н. Скибун

Институт эндокринологии и обмена веществ им. В. П. Комиссаренко АМН Украины, г. Киев, 04114, Украина

Под перенасыщением организма железом подразумевается избыточное общее содержание железа, большая часть которого находится в составе запасных соединений (ферритина, гемосидерина) и сывороточного транспортного белка (трансферрина). Степень насыщения трансферрина железом и концентрация ферритина в сыворотке крови используются как маркеры обеспеченности организма железом. В условиях перенасыщения организма железом часть его может находиться в токсической «свободной» форме, которая способна стимулировать реакции образования свободных радикалов, повреждение ДНК, нарушать транспорт электронов, стимулировать клеточную пролиферацию. Целым рядом эпидемиологических исследований установлено существование взаимосвязей между повышением запасов железа и развитием инсулинорезистентности, и других компонентов метаболического синдрома: ожирения, артериальной гипертензии, дислипидемии, гипергликемии, а также повышением риска развития сахарного диабета 2 типа и сердечно-сосудистых заболеваний. Показано, что снижение насыщения организма железом ассоциируется с уменьшением степени

инсулинорезистентности. Такие воздействия, как флеботомия, использование хелаторов железа (дефероксамина) и антиоксидантов (α -липоевой кислоты) могут уменьшить риск развития сахарного диабета путем снижения запасов железа в организме.

Ключевые слова: негемовое железо, увеличение запасов железа, насыщенность трансферрина железом, инсулинорезистентность, сахарный диабет 2 типа.

Association between iron overload and metabolic disorders in insulin resistance syndrome and type 2 diabetes mellitus

V. N. Skibun

V. P. Komisarenko Institute of Endocrinology and Metabolism of AMS, Kyiv, 04114, Ukraine

Iron overload implies an excess of total body iron, most of which is contained by storage compounds (ferritin, hemosiderin), and in transport iron-content protein (transferrin). Transferrin iron saturation (%) and plasma ferritin concentration are used as indexes of whole-body iron status. Under conditions of iron overload, an increased concentration of toxic «free» iron forms is considered to contribute significantly to tissue damage through such mechanisms as free radical reaction catalysis, DNA injury, inhibition of mitochondrial electron transport, cell proliferation. Recent epidemiological studies suggest that there is an association of elevated iron stores with signs of metabolic syndrome: insulin resistance, obesity, arterial hypertension, dyslipidemia, hyperglycemia, as well as with cardiovascular diseases, type 2 diabetes. A decrease in body iron overload was associated with a lesser degree of insulin resistance. Blood donation, iron chelating agents (deferoxamin) and antioxidant agents (such as α -lipoic acid) could decrease the risk of development of diabetes mellitus through decrease of iron overload.

Key words: non-heme iron, increased iron stores, transferrin iron saturation, insulin resistance, type 2 diabetes mellitus.

(Надійшла 25.01.2008)

ПРЕНАТАЛЬНЕ ЗАСТОСУВАННЯ НАЛТРЕКСОНУ ЗАПОБІГАЄ ПОРУШЕННЯМ СТРЕСОВОЇ РЕАКТИВНОСТІ ГІПОТАЛАМО-ГІПОФІЗАРНО- АДРЕНОКОРТИКАЛЬНОЇ СИСТЕМИ У ЩУРІВ ІЗ СИНДРОМОМ ПРЕНАТАЛЬНОГО СТРЕСУ

Н. Д. Носенко

*Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В. П. Комісаренка АМН
України, м. Київ, 04114, Україна*

Ендогенна опіоїдна система відіграє важливу роль в регуляції розвитку головного мозку. Опіоїдні пептиди є одними з провідних фізіологічних регуляторів ембріогенезу, індукторів диференціації нервових клітин, які не тільки забезпечують нормальний розвиток нейроендокринних структур мозку, але й здатні модифікувати цей процес за умов порушення їхнього балансу в організмі [1, 2]. Такий дисбаланс виникає в організмі матері внаслідок дії стресових чинників впродовж останньої третини вагітності. Відомо, що хронічне іммобілізаційне стресування вагітних щурів супроводжується підвищенням рівня опіоїдів в гіпоталамусі та аденогіпофізі матері і плоду [3]. Вважають, що ці зміни мають певний зв'язок із розвитком синдрому пренатального стресу.

В попередніх дослідженнях ми виявили превентивний ефект блокатора опіоїдних рецепторів налтрексону стосовно ранніх проявів синдрому пренатального стресу. Зокрема, було показано, що введення налтрексону перед стресуванням вагітних самок щурів запобігає порушенням деяких нейрохімічних процесів статевої диференціації мозку [4-6], які лежать у підґрунті віддалених наслідків впливу пренатального стресу на нейроендокринну систему регуляції репродукції та адаптації.

Як відомо, синдром пренатального стресу, який виникає у дорослих нащадків стресованих впродовж вагітності самок щурів, характеризується нейроендокринними порушеннями статевої поведінки та стресової реактивності гіпоталамо-гіпофізарно-адренокортикальної системи (ГГАС) [7, 8]. Показано, що введення опіатів, зокрема β -ендорфіну, вагітним щурам відтворює ефекти пренатального стресу відносно «фемінізації» статевої поведінки у нащадків чоловічої статі [9, 10]. З іншого боку, фармакологічна блокада опіоїдних рецепторів під час стресування вагітних щурів попереджає розвиток цих порушень [11, 12]. Натомість й досі залишається нез'ясованим питання щодо причетності ендогенних опіоїдів до індукованих пренатальним стресом порушень стресової реактивності ГГАС у дорослих щурів. Метою роботи було дослідити можливі протекторні властивості налтрексону стосовно змін стресової реактивності ГГАС у щурів із синдромом пренатального стресу.

Матеріали та методи

Дослідження проведено на самцях ($n = 48$) і самках ($n = 45$) щурів лінії Вістар віком 6 міс, масою 180-220 г, яких було поділено на три групи. Першу групу (контроль) склали щури, народжені інтактними самками; другу – щури, народжені самками, яких протягом

останнього тижня вагітності (з 15-ої по 21-шу добу) щодобово піддавали дії одногодинного іммобілізаційного стресу; третю – щури, народжені самками, які у той же термін вагітності за 30 хв до початку іммобілізації щодобово отримували внутрішньом'язові ін'єкції налтрексону гідрохлориду («Sigma», США) в дозі 0,1 мг/кг.

Для досліджень стресової реактивності ГГАС кожную групу самців і самок щурів ділили на 3 підгрупи: 1 – тварини в стані фізіологічного спокою; 2 – тварини, яких піддавали гострому стресу (іммобілізація протягом однієї години); 3 – тварини, яким за 30 хв до початку іммобілізації одноразово внутрішньочеревинно вводили агоніст ГАМК_B-рецепторів баклофен («Sigma», США) в дозі 10 мг/кг.

Утримання і використання лабораторних тварин відповідало методам, які рекомендуються міжнародними нормами з біоетики [13].

Евтаназію тварин робили відразу після закінчення іммобілізації під легким ефіром шляхом швидкої декапітації. Біологічний матеріал у статевозрілих самок щурів забирали в стадії дієструсу, яку визначали за мікроскопічним дослідженням вагінальних мазків. На холоді (4 °C) швидко виймали мозок, видаляли гіпоталамус. Кров, що витікала із судин шиї, збирали у гепаринізовані пробірки. Вміст норадреналіну та дофаміну в гіпоталамусі, а також рівень кортикостерону в плазмі крові визначали відповідними спектрофлуориметричними методами [14, 15]. Статистичну обробку даних здійснювали з використанням критерію t Стьюдента.

Результати та їх обговорення

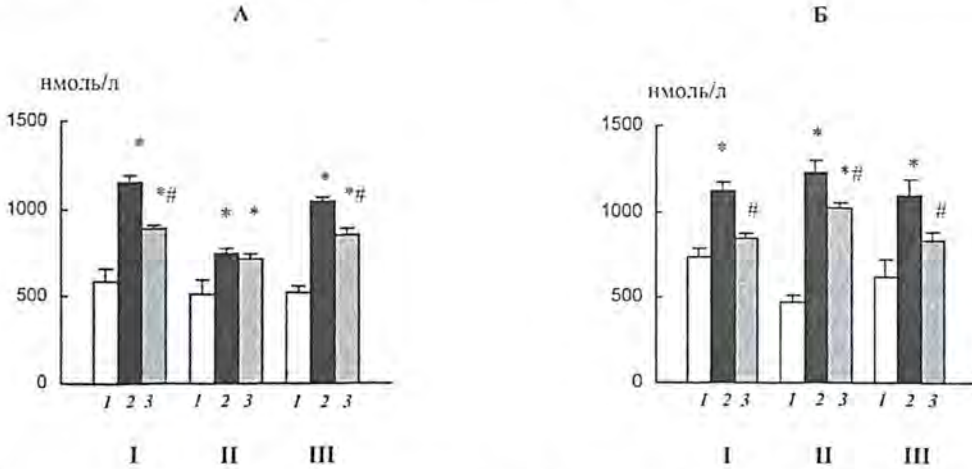
У попередніх дослідженнях ми виявили значні статеві відмінності в чутливості центральних та периферичних ланок ГГАС до стресових стимулів у дорослих щурів із синдромом пренатального стресу [8]. У самців ефект пренатального стресу характеризувався відсутністю постстресорних змін вмісту норадреналіну в гіпоталамусі, послабленням гормональної відповіді кори надниркових залоз на гострий стрес, а також порушенням механізму зворотних зв'язків між ГАМК-ергічними рецепторами та кортикостероїдами. У пренатально стресованих самок за умов збереження реакції норадреналіну гіпоталамуса на гострий стрес спостерігалось помірне посилення стресової адренокортикальної реакції.

Проведені дослідження показали, що введення блокатора опіоїдних рецепторів налтрексону перед стресуванням вагітних самок запобігало розвитку зазначених порушень у дорослих нащадків обох статей. У пренатально стресованих на тлі застосування налтрексону самців щурів зберігались характерні для нормальних тварин постстресорні зміни вмісту норадреналіну в гіпоталамусі (інтактні самці: базальний рівень – $7,1 \pm 0,2$ нмоль/г тканини, після іммобілізації – $5,2 \pm 0,1$ нмоль/г тканини, $P < 0,05$; піддослідні самці: базальний рівень – $6,8 \pm 0,3$ нмоль/г тканини, після іммобілізації – $4,9 \pm 0,1$ нмоль/г тканини, $P < 0,05$). Індуковане гострим стресом зменшення концентрації моноаміну в гіпоталамусі піддослідних самців становило 28 % і не відрізнялось від контролю (27 %). Концентрація дофаміну в гіпоталамусі за умов фізіологічного спокою або гострого стресу не змінювалась (інтактні самці: базальний рівень – $5,1 \pm 0,2$ нмоль/г тканини, після іммобілізації – $4,9 \pm 0,1$ нмоль/г тканини; піддослідні самці: базальний рівень – $5,0 \pm 0,1$ нмоль/г тканини, після іммобілізації – $4,9 \pm 0,1$ нмоль/г тканини).

Протекторний ефект налтрексону відносно порушень стресової активності адренокортикальної ланки ГГАС у пренатально стресованих самців і самок щурів проявився у збереженні типової для нормальних тварин гормональної реакції кори надниркових залоз на гострий стрес (див. мал. А, Б). При цьому амплітуда постстресорного підвищення рівня кортикостерону в плазмі крові була майже однаковою у піддослідних і контрольних щурів відповідної статі. Відносна маса надниркових залоз у піддослідних тварин в стані фізіологічного

спокою залишалась незмінною (інтактні самці – $8,0 \pm 0,2$ мг/100 г маси тіла, піддослідні самці – $8,2 \pm 0,9$ мг/100 г маси тіла; інтактні самки – $17,2 \pm 0,6$ мг/100 г маси тіла, піддослідні самки – $17,7 \pm 1,7$ мг/100 г маси тіла).

У інтактних самців і самок щурів введення агоніста ГАМК_B-рецепторів баклофену за 30 хв до початку одноденної іммобілізації спричиняло вірогідне зниження гормональної реакції кори надниркових залоз на гострий стрес відповідно в 2,0 і 1,5 рази (див. мал. А, Б).



Малюнок. Рівень кортикостерону в плазмі крові інтактних (I), пренатально стресованих (II) і пренатально стресованих на тлі введення налтрексону (III) самців (А) і самок (Б) щурів за умов фізіологічного спокою (1), гострого стресу (2) та достресового введення баклофену (3).

$P < 0,05$ * – порівняно з базальним рівнем, # – порівняно з гострим стресом.

На відміну від інтактних тварин, у пренатально стресованих самців на тлі послабленої стресової адренкортикальної реакції гальмівний ефект баклофену не виявлявся. Рівень кортикостерону в плазмі крові після введення баклофену залишався на тому ж рівні, що й після гострого стресу. Отже, у самців під впливом пренатального стресу ГАМК_B-рецептори втрачають здатність до стресової активації. У пренатально стресованих самок щурів за умов збереження функціональної активності ГАМК_B-рецепторів стрес-лімітуючий ефект баклофену відносно підвищеної стресової секреції кортикостерону був виражений значно слабкіше, ніж у інтактних самок.

Застосування налтрексону в пренатальному періоді запобігало індукованим пренатальним стресом порушенням функціональної активності ГАМК_B-рецепторів. Введення баклофену піддослідним самцям і самкам щурів обмежувало гормональну реакцію кори надниркових залоз на гострий стрес подібно до того, що спостерігалось у інтактних тварин (див. мал. А, Б). При цьому у самок вміст гормону наближався до базального рівня, а у самців – вірогідно його перевищував ($P < 0,05$).

Таким чином, результати проведеного дослідження свідчать про те, що блокада опіоїдних рецепторів в пренатальному періоді має превентивну дію щодо індукованих пренатальним стресом змін стресової реактивності ГГАС у дорослих щурів. Це вказує на причетність ендогенної опіоїдної системи до механізмів опосередкування ефектів пренатального стресу відносно функціональних розладів ГГАС.

Є дані, які свідчать, що ендогенні опіоїди посилюють секреторну реакцію ГГАС на гострий стрес, оскільки налоксон (антагоніст опіоїдів) зменшував

секрецію АКТГ за умов плавання у самок щурів [16, 17]. На тлі цих спостережень, превентивний ефект налтрексону щодо індукованих пренатальним стресом змін активності ГГАС є цілком очікуваним.

З іншого боку, є свідчення про здатність фетального гіпофіза до самостійної секреції β -ендорфіну, при цьому вміст опіоїда в крові плоду значно перевищує цей показник в плазмі крові матері [18]. Відомо, що β -ендорфіни фетального гіпоталамуса та гіпофіза щурів активно реагують на материнський стрес [19]. В свою чергу стресова активація ембріональної опіоїдної системи може модулювати секрецію АКТГ і глюкокортикоїдів на гіпоталамічному рівні. Беручи до уваги те, що налтрексон здатний проникати крізь плацентарний бар'єр [20], не можна виключити й можливість його прямої дії на опіоїдну систему плоду. Отже, блокатор опіоїдних рецепторів налтрексон можна розглядати як один із можливих фармакологічних агентів, що перешкоджають прояву ефектів пренатального стресу шляхом корекції порушень нейронального опіоїдного гомеостазу як в організмі матері, так і плоду. Водночас, враховуючи взаємодію опіоїдної системи з норадренергічною [17] та вазопресинергічною [21] системами, не варто нехтувати і залученням в цей механізм й інших чинників.

Висновок

Наведені дані свідчать про залучення ендогенних опіоїдів в індуковані пренатальним стресом порушення стресової реактивності ГГАС і вказують на потенційну можливість їх фармакологічної профілактики.

Література

1. Zagon I. S., McLaughlin P. J. Opioid antagonist-induced modulation of cerebral and hippocampal development: histological and morphometric studies // *Dev. Brain Res.* 1986, 28, N 2, 233-246.
2. Hauser K. F., McLaughlin P. J., Zagon I. S. Endogenous opioids regulate dendritic growth and spine formation in developing rat brain // *Brain Res.* 1987, 416, 157-161.
3. Ohkawa T., Rohde W., Gotz F. et al. The effect of an acute maternal stress on β -endorphin and growth hormone releasing factor in the rat fetus // *Exp. Clin. Endocrinol.* 1988, 91, 35-42.
4. Резников А. Г., Носенко Н. Д., Тарасенко Л. В. Участие эндогенных опиоидов в патогенезе ранних нейроэндокринных проявлений синдрома пренатального стресса // *Бюлл. эксперим. биол. мед.* 2003, 135, № 5, 421-423.
5. Носенко Н. Д. Превентивний ефект налтрексону щодо ранніх постнатальних змін вмісту катехоламінів у дискретних структурах мозку пренатально стресованих щурів // *Буковинський мед. вісник.* 2003, №1-2, 114-117.
6. Reznikov A. G., Nosenko N. D., Tarasenko L. V. Opioids are responsible for neurochemical feminization of the brain in prenatally stressed male rats // *Neuroendocrinology Letts.* 2005, 26, N 1, 35-38.
7. Ward I. Prenatal stress feminizes and demasculinizes the behavior of males // *Science.* 1972, 175, 82-84.
8. Резников А. Г., Пишак В. П., Носенко Н. Д. и др. Пренатальный стресс и нейроэндокринная патология. Черновцы: Медакадемия, 2004. 320 с.
9. Ward O. B., Orth J. M., Weisz J. A possible role of opiates in modifying sexual differentiation // *Monogr. neural Sci.* 1983, 9, 194-200.
10. Kashon M. L., Ward O. B., Grisham W., Ward I. L. Prenatal β -endorphin can modulate some aspects of sexual differentiation in rats // *Behav. Neurosci.* 1992, 106, 555-562.

11. Ward J. B., Monaghan E. P., Ward I. L. Naltrexone blocks the effects of prenatal stress on sexual behavior differentiation in male rats // *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1986, **25**, 573-576.
12. Keshet G. I., Weinstock M. Maternal naltrexone prevents morphological and behavioral alterations induced in rats by prenatal stress // *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1995, **50**, 413-419.
13. Загальні етичні принципи експериментів на тваринах // *Ендокринологія.* 2002, № 1, 142-145.
14. Jacobowitz D., Richardson J. Method for the rapid determination of norepinephrine, dopamine and serotonin in the same brain region // *Pharmac. Biochem. Behav.* 1978, **8**, 515-519.
15. Балашов Ю. Г., Флюориметрический микрометод определения кортикостерона: сравнение с другими методами // *Физиол. журн. СССР.* 1990, **76**, № 2, 280-283.
16. Douglas A. J., Johnstone H. A., Wigger A. et al. The role of endogenous opioids in neurohypophysial and hypothalamo-pituitary-adrenal axis hormone secretory responses to stress in pregnant rats // *J. Endocrinol.* 1998, **158**, 285-293.
17. Douglas A. J. Central noradrenergic mechanisms underlying acute stress responses of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis: adaptation through pregnancy and lactation // *Stress.* 2005, **8**, N 1, 5-18.
18. Rothenberg S. J., Chicz DeMet A., Schnaas L. et al. Umbilical cord beta-endorphin and early childhood motor development // *Early Hum. Dev.* 1996, **46**, 83-95.
19. Роде И., Окава Т., Шталт Ф. и др. Изменения нейроэндокринной системы плодов крыс при остром стрессе в конце беременности // В кн.: *Онтогенетические и генетико-эволюционные аспекты нейроэндокринной регуляции стресса.* Новосибирск: Наука, 1990, 28-40.
20. Zagon I. S., Hurst W. J., McLaughlin P. J. Transplacental transfer of naltrexone in rats // *Life Sciences.* 1997, **61**, 1261-1267.
21. Watson S. J., Akil H., Fischli W. et al. Dynorphin and vasopressin: common localisation in magnocellular neurones // *Science.* 1982, **216**, 85-87.

(Надійшла 15.02.2008)

УРОДЖЕНИЙ ГІПОТИРОЗ: СУЧАСНІ ПОГЛЯДИ НА СТАРУ ПРОБЛЕМУ

В. М. Пилипенко

*Національна медична академія післядипломної освіти ім. П. Л. Шупика,
м. Київ, 04112, Україна*

Захворювання щитоподібної залози (ЩЗ) – найбільш поширена патологія ендокринної системи у новонароджених, особливо зважаючи на погіршення екологічного стану довкілля, порушення стану здоров'я батьків та розповсюдження хімічних реагентів у побуті і генномодифікованих продуктів харчування. За частотою випадків вони можуть конкурувати, мабуть, що з вродженою дисфункцією кори надниркових залоз. Розповсюдженість гіпотирозу складає 1 : 4500, а уроджений гіпотироз становить 95 % усіх випадків гіпотирозу у дітей. Навіть у Європі, Північній Америці, Японії частота уродженого гіпотирозу (УГ) досить висока і сягає від 1 : 3700 до 1 : 5000-4500. Розповсюдженість УГ серед новонароджених дівчаток вища, ніж серед хлопчиків, приблизно вдвоє.

Серед усіх захворювань ЩЗ у дітей найбільше медично-соціальне значення має уроджений гіпотироз, так як несвоєчасна, або неправильна діагностика захворювання призводить до виникнення ускладнень та інвалідизації дитини. Сучасними дослідженнями виявлено, що гіпотироксинемія, навіть транзиторна, викликає психомоторні порушення та низькі показники IQ у дітей.

Гіпотироз – це клінічний синдром, спричинений тривалим, стійким дефіцитом гормонів щитоподібної залози в організмі або зниженням їхнього біологічного ефекту на тканинному рівні. **УГ** – це синдром недостатності дії гормонів ЩЗ в організмі, який виникає внутрішньоутробно під дією ендогенних та екзогенних чинників і проявляється після народження дитини.

Чому ж така важлива проблема виявлення і своєчасного лікування УГ? Можливо тому, що УГ, перш за все, формує загрозовий для життя стани і тяжкі патологічні синдроми, що спричиняють інвалідизацію людини :

- Розумову відсталість (тирогенний критинізм)
- Тирогенну карликовість
- Акселерацію атеросклерозу
- Скорочення тривалості життя
- Порушення статевого розвитку (частіше – затримку, рідше – прискорення)
- Безпліддя
- Вторинну пухлину гіпофіза (тиротропіному)
- Рак ЩЗ
- Мікседематозну кому
- Синдром раптової смерті у немовлят

Етіологія, фактори ризику

УГ може зумовити дефект закладання ЩЗ чи її фетальне ушкодження антитілами та імуноглобулінами, що проникають через плацентарний бар'єр. УГ також може виникнути як наслідок спадкових генетичних дефектів

формування тканини ЩЗ та рецепторів до тироїдних гормонів (ТГ) у тканинах-мішенях, чи ферментів, які необхідні для процесу синтезу ТГ. Також синдром недостатності ТГ виникає як наслідок морфофункціональної недостатності гіпоталамо-гіпофізарно-тироїдної системи у новонароджених, особливо у недоношених.

Фактори ризику виникнення УГ можна розподілити на екзогенні та ендогенні.

I. Екзогенні чинники ризику УГ :

- Ендемічний дефіцит йоду
- Ендемічний дефіцит селену
- Природні чи штучні струмогени (у тому числі ятрогенні тиростатики, надлишок йоду чи селену)
- Радіаційний вплив на ЩЗ (у тому числі внутрішньоутробне опромінення ЩЗ та вплив ^{131}I на вагітну і плід)
- Дія хімічних полютантів (у тому числі тютюнопаління, особливо внутрішньоутробне)

II. Ендогенні чинники ризику УГ :

- Спадкові (сімейні) варіанти ферментопатій ЩЗ – дисгормоногенез
- Генетична схильність до дії екзогенних чинників (автосомно-рецесивна)
- Антитироїдний аутоімунітет :
 - антитіла, які блокують розвиток ЩЗ
 - антитіла, які інгібують рецепцію тиротропного гормону (ТТГ) у ЩЗ
 - антитіло-залежна клітинно-опосередкована цитотоксичність
- Спадкові (сімейні) варіанти резистентності до тироїдних гормонів (автосомно-рецесивні рецепторопатії)
- Жіноча стать

Ембріологія та фізіологія ЩЗ плода

Закладка ЩЗ відбувається на 3-4 тиж гестації. Приблизно у той же час відбувається закладка ЦНС. ЩЗ плода має здатність захоплювати йод лише з 10-12 тиж вагітності, а синтезувати і секретувати тироїдні гормони починає лише з 12-15 тиж гестації. Отже, розвиток ЩЗ плода повною мірою залежить від тироїдних гормонів вагітної, а функціонування ЩЗ плода залежить від достатньої кількості йоду, який надходить з організму матері через плаценту. Тому зміна кількості ТГ або збільшення кількості антитіл до ферментів, чи тканини ЩЗ у вагітної призводить до аномалії розвитку ЩЗ плода, а недостатність йоду в організмі вагітної чи патологія плаценти – до порушення синтезу і секреції ТГ ЩЗ плода. Таким чином, дія патологічних чинників на організм вагітної у ранні строки гестації (до 12 тиж) спричиняє різні аномалії розвитку тканини ЩЗ чи інших її структурних порушень, а після 12-13 тиж гестації – порушення синтезу і секреції ТГ ЩЗ не тільки у плода, але й у дитини після народження. Спектр йододефіцитних розладів здоров'я, спричинених йодною недостатністю в період онтогенезу, наведений у табл. 1.

Таким чином, найбільш тяжкі наслідки йододефіцитних захворювань безпосередньо пов'язані з порушеннями репродуктивної функції та негативним перинатальним впливом :

- ендемічний кретинізм
- аплазія / дистопія / гіпоплазія ЩЗ
- вроджені аномалії різних органів і систем
- неонатальний зоб
- гіпотироз (уроджений і спонтанний)
- зниження фертильності (безпліддя)
- глухота / глухонімота
- неоплазія ЩЗ

Таблиця 1. Спектр йододефіцитних розладів здоров'я

Період онтогенезу	Йододефіцитна патологія
Ембріональний	Спонтанне переривання вагітності Уроджені аномалії розвитку ЦНС і периферичної Аплазія / дистопія / гіпоплазія ЩЗ Гіпоплазія кортієвого органа (середнього вуха) Косоокість Мікрофтальмія
Фетальний	Спонтанні викидні Передчасні пологи Перинатальна смертність Уроджені аномалії розвитку Гіпоплазія плоду Гіпоксія мозку Міопатія Неврологічні аномалії: мікроцефалія, спастична дисплегія полінейропатія енцефалопатія гіпореклексія Порушення імунітету, фетальні інфекційні захворювання
Неонатальний	Уроджений гіпотироз Уроджений зоб (дифузний / вузловий) Неврологічний кретинізм : розумова відсталість спастична дисплегія полінейропатія енцефалопатія затримка моторного розвитку гіпореклексія Мікседематозний кретинізм: затримка фізичного розвитку (нанізм) розумова відсталість гіпоплазія ЩЗ або зоб (дифузний / вузловий) Міопатія Вторинна імунологічна недостатність

На тлі відносної гіпотироксинемії та гіперстимуляції ЩЗ і розвитку зоба виникають порушення психомоторного розвитку плода, які продовжуються і в післянатальному періоді.

Відомо, що не тільки йододефіцит призводить до патології ЩЗ, перш за все – гіпотирозу. Такі ж негативні наслідки мають тютюнопаління (тіоціанат) та вплив деяких хімічних реагентів (хімічні полютанти) на розвиток і функціонування ЩЗ, особливо на тлі йододефіциту. Основні хімічні полютанти, що впливають на ЩЗ, наведені у табл. 2.

Класифікація уродженого гіпотирозу

А. За рівнем ураження:

1. Первинний (тирогенний)
2. Вторинний (гіпофізарний), третинний (гіпоталамічний)
 - а) Пангіпопітуїтаризм
 - б) Ізольований дефіцит ТТГ
 - в) Аномалії гіпоталамо-гіпофізарної ділянки

Таблиця 2. Вплив хімічних поллютантів на розвиток і функціонування ЩЗ у дітей

Механізми порушення розвитку і функціонування ЩЗ у дітей	Хімічні поллютанти	
Порушення захвату йоду ЩЗ	4-хлоррезорцин	Фіпроніл
Функціонування симпортера натрія йодиду	Пропілтіоурацил Цітрон Гексахлорбензол Фенобарбітал Тіоціонат Селен Резорцин Пірогалол Піриментаніл	Етилентіосечовина Ртуть-хлорметил Гідроксихінол Фенол Багатобромисті біфеніли Сулема Крезол Амітрол Прегненолон-16-карбонітрил
Реакції, що каталізуються тироїдною пероксидазою	Тіоціонат Тіосечовина Аміак Фіпроніл	Багатобромисті біфеніли Сулема Метамізол Ліндан
Зв'язування з альбуміном	Пентахлорфенол	
Зв'язування з тироглобуліном	Органічні сполуки хлору Пентахлорфенол	
Катаболізм 5'-дейодинази I і II типу	Аміодарон Амінотріазол Гексахлорбензол Фенобарбітал Пропілтіоурацил Тіамазол Солі фенвалеріанової кислоти	Хлорид кадмію 3-метилхолантрен Ароклор Діметоат Свинець
Глюкурування T ₃ і T ₄	ДДТ Фенобарбітал Ацетохлор Гексахлорбензол Піриметаніл	Багатобромисті біфеніли Прегненолон-16-карбонітрил 3-метилхолантрен
Катаболізм і екскреція T ₃ і T ₄ з жовчовиділенням	ДДТ Фенобарбітал Гексахлорбензол Гексадрин 2,4,5-трихлорфеноксиоцтова кислота	багатобромисті біфеніли бензіперен 3-метилхолантрен трихлорбензол

3. Тканинний (транспортний, периферичний) – резистентність до гормонів ЩЗ; гіпотироз при нефротичному синдромі

Б. За строком виникнення:

1. Уроджений:

- аномалії розвитку ЩЗ: дисгенезія (агенезія, гіпоплазія, дистопія, ектопія)
- дисгормогенез: уроджені ензимопатії, що супроводжуються порушенням біосинтезу тироїдних гормонів; дефект рецепторів до ТТГ
- уроджений пангіпогітуїтаризм

- d) транзиторний
 - ятрогенний
 - спричинений материнськими тироблокуючими антитілами
 - ідіопатичний

2. Набутий:

- a) тироїдити (автоімунний тироїдит, гіпотироїдна фаза, підгострий вірусний)
- b) післяпроцедурний (операції на щитоподібній залозі)
- c) ятрогенний (тиростатична терапія радіоактивним йодом, тиростатики)
- d) ендемічний зоб

В. За перебігом:

1. Транзиторний
2. Субклінічний (мінімальна тироїдна недостатність)
3. Маніфестний
4. Ускладнений

Г. За станом компенсації:

1. Компенсований
2. Декомпенсований

Д. За строком маніфестації клінічних проявів :

1. Ранні форми:
 - a) перманентний (персистуючий) УГ
 - b) транзиторний УГ
2. Пізні форми:
 - a) класична форма
 - b) атипові (моносимптомні)

Е. За розповсюдженістю в популяції:

- a) ендемічний
- b) спорадичний

Ускладнення УГ: тирогенний нанізм, енцефалопатія, кретинізм, поліневропатія, міопатія, гіпотироїдна кома, порушення статевого розвитку (застримка або передчасне статеве дозрівання) тощо.

Відповідно до Міжнародної статистичної класифікації хвороб 10 перегляду гіпотироз має наступні класифікаційні коди :

Код МКХ-10

- Е 00 – Синдром вродженої йодної недостатності
- Е 02.0 – Субклінічний гіпотироз (мінімальна тироїдна недостатність)
- Е 03.0 – Уроджений гіпотироз з дифузним зобом
- Е 03.1 – Уроджений гіпотироз без зоба
- Е 03.2 – Медикаментозний гіпотироз
- Е 03.3 – Післяінфекційний гіпотироз
- Е 03.4 – Атрофія щитоподібної залози (набута)
- Е 03.5 – Гіпотироїдна кома
- Е 03.8 – Інший уточнений гіпотироз
- Е 03.9 – Не уточнений гіпотироз
- Е. 89 – Післяпроцедурний гіпотироз

Клініка та діагностика

Проблема ранньої діагностики та лікування гіпотирозу, особливо УГ, винятково важлива тому, що пізно почате лікування призводить до тяжких наслідків та інвалідизації дитини із-за тяжких порушень, часто незворотних, центральної нервової системи, фізичного і психічного розвитку. Клінічні ознаки УГ досить специфічні, але різняться в залежності від віку дитини. Симптоми УГ можуть проявлятися зразу ж після народження, а можуть і в

більш дорослішому віці, та можуть бути «класичними» і «атиповими» (моносимптомними), що залежить від тяжкості гормонального дефіциту і характеру вигодовування. За легкої недостатності ТГ симптоми менш примітні, більш «м'які», проявляються пізніше і часто формують неповний синдромокомплекс (моносимптомна, атипова форма) УГ. Якщо немовля вигодовується грудним молоком, то клінічна симптоматика дефіциту ТГ у дітей з УГ мінімальна, так як грудне молоко здорової матері вміщує велику кількість ТГ (приблизно, 100 мкг тироксину), яка відповідає добовій потребі новонародженого. У той же час, штучне вигодовування коров'ячим молоком, яке не містить цих гормонів, не має аналогічних захисних ефектів.

Клінічні ознаки УГ в неонатальному періоді:

- Велика маса тіла новонародженої дитини (більше 3 500 г)
- Тривала жовтяниця
- Пізні відходження меконія
- Ознаки недозрілості новонародженого при доношеній вагітності
- Виражена сонливість
- Бліда, суха шкіра (іноді – шкіра має мармуровий малюнок)
- Щільні набряки на тильних поверхнях кисті, ступнів, у надключичних ямках
- Набряклість обличчя, потовщення краю повік
- Напіввідчинений рот, збільшений у розмірах язик (макроглосія)
- Грубий, низького тембру голос при плачу
- Слабкий смоктальний рефлекс
- Уповільненість рухів, рефлексів
- Погане утримання тепла, швидке переохолодження
- Пізні відпадання пуповини, повільне заживання пупкової ранки
- Респіраторний дистрес-синдром

Якщо лікування не проводиться, то клінічна картина УГ із місяця в місяць стає дедалі більше чіткою та більш очевидною.

У дітей старших 3 міс:

- Затримка психомоторного розвитку
- Пізні закриття тім'ячка
- Сухість, блідість шкіри з жовтявим відтінком
- Ламке, сухе волосся
- Гіпотермія, холодні кисті, ступні
- Широке запале перенісся
- Пізні прорізування і заміна зубів
- М'язи: гіпотонія, гіпертрофія, можливі судоми
- Затримка росту, з відносним укороченням кінцівок («хондродистрофічний тип»)
- Знижений апетит, недостатня прибавка маси тіла
- Метеоризм, закрепи
- Пупкова грижа
- Великий, розпластаний живіт
- Низький тембр голосу
- Затримка осифікації
- Респіраторні порушення : утруднене носове дихання, сопіння, хрипіння,

схильність до респіраторних інфекцій, ціаноз носогубного трикутника.

Поряд з класичними проявами, зустрічаються атипові форми УГ

(моносимптомні) :

- Псевдоанемічна
- Псевдогемолітична хвороба новонароджених
- Псевдогеморагічна
- Псевдо-Гіршпрунг

- Кардіопатична
- З ізольованою пропорційною затримкою росту.

У старших дітей клінічні ознаки УГ більш виражені, особливо відмічається зниження інтелекту, емоційна загальмованість, значне відставання у рості та інші специфічні прикмети гіпотирозу.

У підлітків ознаки гіпотирозу такі ж, як і у дорослих:

- Зниження інтелекту різного ступеня
- Затримка росту (тирогенний нанізм)
- Затримка статевого розвитку (іноді – випередження)
- Сухість, блідість шкіри, мілкі тріщини на шкірі
- Ламке, сухе волосся, підвищене його випадання
- набряки обличчя, кінцівок, язика
- Брадикардія, значне послаблення серцевих тонів
- Зниження гостроти слуху
- Підвищена втомлюваність, сонливість

У старших дітей та підлітків ознаки гіпотирозу можуть бути не тільки класичними, але й атиповими (моносимптомними):

- Гематологічна (геморагічна, анемічна)
- Серцево-судинна
- Ревматоїдна
- Нервово-психотична
- Гіпертензійна
- набрякова
- Кістково-м'язова
- Акромегалоїдна (пухлиноподібна)
- Синдром первинного гіпотирозу-галактореї-аменореї (Van Wik-Ross-Hennes)

Діагностика уродженого гіпотирозу

Діагностика УГ не складна, але проводиться у декілька етапів.

1. Детальний анамнез захворювання, особливо вітальний анамнез і досконале обстеження матері.
2. Наявність клінічних симптомів, характерних для УГ.
3. Гормональне обстеження.

Оскільки клінічна симптоматика у немовлят не дуже виражена і не досить специфічна, та й розумову відсталість можна виявити лише з часом, проводять скринінг усіх новонароджених на УГ (див. схему).

Схема. Неонатальний скринінг на уроджений гіпотироз

1 етап. Забір крові (ТТГ-скринінг) у доношених проводять на 4-5 день від народження, у недоношених – на 7-14 день (ТТГ визначають у капілярній крові).

- ТТГ < 20 мО/л – варіант норми,
- при ТТГ > 20 мО/л здійснюють повторне дослідження із того ж зразка крові.

Якщо ТТГ > 50 мО/л – ймовірний гіпотироз,

якщо ТТГ > 100 мО/л – гіпотироз, що потребує лікування.

- При ТТГ 20-50 мО/л – повторне дослідження із того ж зразка крові, при збереженні високого ТТГ – дослідження ТТГ і вТ₄ у сироватці крові.

При ТТГ > 10 мО/л і вільному Т₄ < 10 пмоль/л – терміново призначаються тироїдні препарати.

При ТТГ 20-50 мО/л і вільному Т₄ > 10 пмоль/л – лікування не призначається, повторне дослідження ТТГ і вільного Т₄ (вТ₄) – через 7 і 30 днів.

У разі наростання рівня ТТГ – призначається замісна терапія.

– При ТТГ 50-100 мО/л – висока вірогідність наявності УГ. Проводять повторне дослідження ТТГ і вТ₄ із того ж зразка крові та у сироватці крові, взятої у дитини амбулаторно. Зразу ж, не очікуючи результатів, призначають лікування тиреоїдними препаратами (L-тироксином).

У разі, якщо показники ТТГ і вТ₄ виявились нормальними – лікування припиняють.

Якщо ТТГ перевищує норму – лікування продовжують під регулярним спостереженням педіатра-ендокринолога.

При ТТГ > 100 мО/л – терміново повідомляють поліклініку за місцем проживання дитини. Повторно забирають кров для дослідження ТТГ і вТ₄ у сироватці крові. Відразу (не очікуючи результатів) призначають лікування тиреоїдними препаратами.

У разі, якщо показники ТТГ і вТ₄ виявились нормальними – лікування припиняють.

Якщо ТТГ перевищував норму – лікування продовжують під регулярним спостереженням педіатра-ендокринолога.

Скринінг на УГ орієнтований на ТТГ, як на первинний маркер, і тому не виявляє гіпотироксинемії без підвищення рівня ТТГ.

Причини гіпотироксинемії :

1. Дефіцит тироксинзв'язуючого глобуліну. Як правило, передається спадково, зчеплений з Х-хромосою, частота 1 : 5000 новонароджених. Рівень вТ₄ у крові нормальний, клініка гіпотирозу відсутня.
2. Вторинний і третинний гіпотироз (знижений вТ₄ крові при нормальному чи зниженому ТТГ).
3. Транзиторна неонатальна гіпотироксинемія.

У недоношених дітей, новонароджених з низькою масою тіла, а також у випадках транзиторної чи ідіопатичної гіпотироксинемії визначення концентрації ТТГ і вТ₄ у крові повторюють кожні 2 тиж для виявлення випадків УГ, що пізно проявляється.

2 етап (проводиться в дитячій поліклініці).

Контрольні забори крові (ТТГ, Т₄, Т₃) – через 2 тиж і 1,5 міс від початку замісної терапії. Орієнтуватись у дітей до 1 року слід на рівень ТТГ і Т₄. Адекватною вважається доза L-тироксину, при якій утримується нормальний рівень ТТГ і Т₄, або нормальний вТ₄ при відносно підвищених показниках ТТГ. Гормональна діагностика УГ повинна проводитись високочутливими наборами.

При субклінічному гіпотирозі відмічається підвищення ТТГ (вище за 2,5 мО/л, але не вище за 10 мО/л) при нормальному рівні вТ₄ і відсутності клінічної симптоматики.

При маніфестному гіпотирозі – підвищення ТТГ (вище за 10 мО/л) і зниження вТ₄.

При вторинному гіпотирозі – рівень ТТГ у межах норми або знижений і знижений вТ₄.

За необхідності диференційної діагностики первинного і вторинного гіпотирозу проводиться *проба з тироліберином*: досліджують рівень ТТГ до і через 30 хв після внутрішньовенного введення препарату. При первинному гіпотирозі ТТГ зростає вище 25 мО/л, при вторинному – залишається на попередньому рівні.

Для диференційної діагностики виконуються додаткові обстеження:

- Рентгенографія кистей рук (затримка «кісткового» віку, епіфізарний дисгенез).
- Визначення титру антитіл до тиропероксидази тироцитів (АТПО),

чи до мікросомальної фракції (АМФ), або антитіл до тироглобуліну (АТТГ) – для діагностики аутоімунного тиреоїдиту, як причини гіпотирозу, або як етіологічного чинника УГ.

- Аналіз крові на токсоплазмоз (для виключення ураження ЦНС інфекційними чинниками).
- Загальний аналіз крові (анемія, іноді прискорення ШОЕ).
- Визначення холестерину, білірубину, β -ліпопротеїдів крові.
- ЕКГ: синусова брадикардія (у перші місяці життя пульс може бути нормальної частоти), зниження вольтажу зубців, уповільнення провідності, подовження систоли.
- Візуалізація щитоподібної залози за допомогою УЗД.

Диференціація УГ наведена у табл. 3 і 4.

Лікування

Першочергова мета при лікуванні УГ – як можна швидше підвищити концентрацію тироксину крові до норми, щоб попередити або звести до мінімуму ураження ЦНС та інтелекту дитини. Лікування проводиться довічно.

Замісна терапія препаратами тиреоїдних гормонів здійснюється, як правило, лівотироксином (L-тироксином), призначається незалежно від рівня ураження і причини, що викликала синдром гіпотирозу. Застосовується відразу повна замісна доза, але можна починати замісну терапію з 50 % необхідної добової дози зі швидким її нарощуванням, в залежності від стану дитини та її серцево-судинної системи.

На тлі проведення замісної терапії L-тироксином призначається симптоматичне лікування енцефалопатії, поліневропатії, анемії тощо.

Контроль ТТГ (при первинному гіпотирозі) або вТ₄ (при вторинному гіпотирозі) проводиться:

- на етапі підбору дози – 1 раз на 1 міс
- при досягненні компенсації (ТТГ 0,5-2,0 мО/л) – 1 раз на 6 міс

Причиною госпіталізації являється важка декомпенсація хвороби.

Критерії ефективності лікування УГ:

- Відсутність клінічних ознак хвороби
- Нормальні темпи росту і статевого дозрівання
- ТТГ 0,4-2,0 мО/л (при первинному УГ)

Профілактика

Так як вагітність являється періодом найбільшого ризику формування самих важких йододефіцитних захворювань, то вже на етапі планування вагітності жінкам необхідне призначення індивідуальної йодної профілактики фізіологічними дозами йоду (йодид калію по 150-200 мкг на добу), яка подовжується і на період вагітності та після пологів в період вигодовування дитини грудним молоком.

Враховуючи, що УГ – хронічне вроджене захворювання, то ця патологія вимагає обов'язкового довічного диспансерного спостереження (табл. 5).

Таким чином, УГ є вродженою патологією ендокринної системи, яка потребує невідкладної обов'язкової ранньої діагностики, більш пильної уваги

Дози L-тироксину:

Вік дитини	Добова доза, мкг/кг
Недоношені	8 – 10
0-3 міс	10 – 15
3-6 міс	8 – 10
6-12 міс	6 – 8
1-3 роки	4 – 6
3-10 років	3 – 4
10-15 років	2 – 4
> 15 років	2 – 3

Таблиця 3. Диференційна діагностика уродженого гіпотирозу у дітей раннього віку за клінічними ознаками

Клінічні ознаки	Уроджений гіпотироз	Хвороба Дауна	Рахіт	Жовтяниці	Анемії	Ахондроплазія
Маса тіла при народженні > 4 кг	+	-	-	-	-	±
Синдром тривалої жовтяниці	+	-	-	±	±	-
Знижений апетит	+	-	±	±	±	-
Загальмованість, сонливість	+	-	-	±	±	-
Недостатнє збільшення маси тіла	+	-	±	±	±	-
Закрепи	+	-	±	-	-	-
Сухість шкіри, «мармуровий» малюнок шкіри, холодні кінцівки	+	±	-	±	±	-
Пупкова грижа	+	±	±	-	-	-
Затримка психофізичного розвитку	+	+	±	-	±	-
Низький тембр голосу	+	±	-	-	-	-
Набряки	+	-	-	-	-	-
Пізнє прорізування зубів	+	±	±	-	±	-
Макроглосія	+	+	-	-	-	-
М'язова гіпотонія	+	+	+	±	±	-
Сідлоподібний ніс	+	+	-	-	-	+
Ослаблення серцевих тонів, додаткові шуми	±	+	±	-	±	-

Таблиця 4. Диференційна діагностика уродженого гіпотирозу у дітей раннього віку за лабораторно-інструментальними ознаками

Лабораторно-інструментальні прикмети	Уроджений гіпотироз	Хвороба Дауна	Рахіт	Жовтяниці	Анемії	Ахондроплазія
Підвищення рівня ТТГ у крові	+	-	-	-	-	-
Зниження вТ ₄ і вТ ₃ у крові	+	±	-	-	-	-
Гіперхолестеринемія	+	-	-	-	-	-
Гіпербілірубінемія	+	-	-	±	-	-
Лабораторні ознаки анемії	+	-	±	±	+	-
Затримка осифікації та епіфізарний дисгенез	+	-	±	-	-	- / ±
ЕКГ : низький вольтаж зубців, брадикардія	+	±	-	-	-	-
Каріотип	норма	трисомія 21 пари	норма	норма	норма	норма

Таблиця 5. Частота і об'єм диспансеризації пацієнтів з уродженим гіпотирозом

Консультації і діагностичні дослідження	Частота обстеження
Лікар-ендокринолог	Дітей до 5 років – 1 раз на 3 міс, дітей старших 5 років – 1 раз на 6 міс
Лікар-окуліст, невролог	За необхідності
Загальний аналіз крові, сечі	1 раз на 3-6 міс
Ліпідний профіль крові	1 раз на 6 міс
УЗД щитоподібної залози	1 раз на рік
ТТГ (первинний гіпотироз)	1 раз на 3-6 міс
вТ ₄ (вторинний гіпотироз)	1 раз на 3-6 міс
АТТГ*, АТПО**	1 раз на рік
Оцінка фізичного і статевого розвитку	1 раз на 6 міс
Рентгенографія кисті (кістковий вік)	1 раз на рік
Аналіз крові на токсоплазмоз	За необхідності
ЕКГ	1 раз на рік і при необхідності
ЕхоКГ	За необхідності

Примітка: * – АТТГ – титр антитіл до тироглобуліну,
** – АТПО – титр антитіл до тиропероксидази тироцитів.

не тільки ендокринологів, але й акушерів-гінекологів, неврологів, педіатрів. Профілактика виникнення патології, а також своєчасне і адекватне лікування УГ запобігає появі розладів нервової системи та інтелекту, підвищує якість життя хворих та продовжує його тривалість. Профілактика виникнення патології та запобігання її ускладнень також вимагають проведення роз'яснювальної роботи серед населення, активної ліквідації йододефіциту в ендемічних місцевостях і запобігання контактування, особливо вагітних, з хімічними сполуками, які впливають на розвиток і функціонування ЩЗ дітей, більш пильного і чіткого підходу до призначення лікарських препаратів і різних реагентів вагітним та дітям.

Рекомендована література

1. Балаболкин М. И., Клебанова Е. М., Креминская В. М. Дифференциальная диагностика и лечение эндокринных заболеваний: Руководство. М.: Медицина, 2002. 752 с.
2. Берман Р. Е. Педиатрия. М.: Медицина, 1989. 567 с.
3. Блунк В. Детская эндокринология. М.: Медицина, 1981. 304 с.
4. Бурумкулова Ф. Ф., Герасимов Г. А. Заболевания щитовидной железы и беременность // Пробл. эндокринологии. 1998, 44, № 2, 27-32.
5. Диагностика и лечение эндокринных заболеваний у детей и подростков: Справочник / Под ред. проф. Н. П. Шабалова. М.: МЕД-пресс-информ, 2003. 544 с.
6. Тронько М. Д., Лапушенко О. В., Кравченко В. І. та ін. Йододефіцит та моніторинг програм йодної профілактики: Метод. рекомендації. К., 2004. 36 с.
7. Мурашко Л. Е., Мельниченко Г. А. и соавт. Щитовидная железа и беременность // Пробл. эндокринологии. 2000, № 1, 7-10.
8. Петунина Н. А. Использование препаратов щитовидной железы в клинической практике // Клиническая тиреоидология. 2003, 1, № 2, 5-16.
9. Дедов И. И., Мельниченко Г. А. (ред.). Рациональная фармакотерапия заболеваний эндокринной системы и нарушений обмена веществ: Руководство для практикующих врачей. М.: Литтерра, 2006. 1080 с. Т. 12: разд. 19, 311-332; разд. 23, 378-390.
10. Хьюм Роберт, Уильямс Фиона, Виссер Тео. Транзиторная гипотироксинемия и развитие головного мозга у недоношенных новорожденных (научный обзор) // Междун. эндокринолог. журнал. 2006, № 1 (3), 75-79.
11. Фадеев В. В. Беременность и заболевания щитовидной железы // Междун. эндокринолог. журнал. 2006, № 1(3), 49-55.
12. Шехтман М. М., Варламова Т. М., Бурдули Г. М. Заболевания эндокринной системы и обмена веществ у беременных. М.: Триада-Х, 2001. 128 с.
13. Massart F., Massai G., Placidi G., Saggese G. Child thyroid disruption by environmental chemicals // Minerva pediat. 2006, 58, N 1, 47-53.
14. Toft A. Thyroid hormone treatment, how and when? // Thyroid International. 2001, N 4, 1-11.
15. Tziomalos K. and Charsoulis F. Endocrine effects of tobacco smoking // Clin. Endocrinol. 2004, 61, N 6, 664-674.

ОБЕРЕГИ Й ДОРОГОВКАЗИ ДИВНОЇ ЛЮДИНИ

Про книгу «В. П. КОМІСАРЕНКО. Життєвий і творчий шлях» / За заг. ред. М. Д. Тронька.
К.: Авіцена, 2007. 144 с., іл.

Колотнеча біля прохідної хімічного заводу ім. Ломоносова на Подолі, ще за радянські часи. Охорона всіляко намагається не пропустити до цеху з виробництва синестролу академіка Василя Павловича Комісаренка. Та він все ж таки потрапляє в зону неспокою. Адже в робітниць, які працюють тут, раптом почали виникати серйозні гінекологічні синдроми гормональної природи. Це результати забруднення приміщення цеху залишками препарату. Але ж він вже виготовляється серійно... Та все ж таки академік-ендокринолог домагається докорінної зміни технології виробництва речовини за умови абсолютного захисту умов праці.

В день його 65-річчя директорові Інституту ендокринології та обміну речовин телефонує перший секретар ЦК Компартії України В. В. Щербицький. Вітаючи ювіляра, запитує, які в нього прохання чи проблеми. Й «В. П.», як його зазвичай звуть між собою співробітники, в цю мить, користуючись нагодою, вирішує найбільш наболіле питання щодо подальшого розвитку інституту – про сприяння будівництву клінічного корпусу з консультативною поліклінікою. Мабуть, й про цей життєвий епізод мусимо пам'ятати.

До кабінету Василя Павловича заходить представник певних органів в районі й пропонує скласти список працівників закладу, які демонстративно носять вишиванки та й взагалі догоджають «буржуазному націоналізму». Директор каже, що цей перелік очолює він, й пропонує відвідувачу залишити інститут.

Ці три епізоди, три невеличкі сюжети з книги, виданої Інститутом ендокринології та обміну речовин ім. В. П. Комісаренка АМН України до 100-річчя від дня народження засновника установи, виразно вимальовують риси характеру та вдачі велетня української науки, причому риси глибоко демократичні в часи складної епохи, надаючи життєопису Вчителя в спогадах та роздумах учнів і сподвижників надихаючої правдивості.

Ясна річ, робота, видана за загальною редакцією члена-кореспондента НАН і АМН України М. Д. Тронька, – передовсім науковий погляд на шлях, здобутки та творчу спадщину академіка В. П. Комісаренка. Недаремно в передмові до книги Президент НАНУ Б. Є. Патон слушно підкреслює, що вчений був гідним продовжувачем справи О. О. Богомольця і В. Я. Данилевського на теренах ендокринологічної науки. Невдовзі після відкриття інсуліну дослідив його пряму дію на нервову систему. В полі зору В. П. Комісаренка знаходилися фізіологічні та біохімічні властивості продуктів секреції надниркових залоз. Він створив всесвітньо відому школу української ендокринології.

На увагу заслуговують роботи вченого з дослідження ролі селезінки в регуляції обміну речовин, зауважує в передньому слові Президент АМНУ О. Ф. Возіанов. Отриманий дослідником безбілковий препарат脾енін міцно увійшов в арсенал медицини. Під керівництвом В. П. Комісаренка проведено комплексну роботу з пошуку блокаторів біосинтезу кортикостероїдів, в результаті яких створено хлодитан, що застосовується для нехірургічного лікування раку кори надниркових залоз і хвороби Іценка-Кушинга.

«Життя і творчість В. П. Комісаренка» – цей цікавий науковий нарис, написаний М. Троньком й Т. Безверхою, є стрижнем роботи. То й факти історії

впровадження спленіну, й новини щодо виявлення та дослідження статевих гормонів, й розповідь про ініціацію розвитку нейроендокринології, відкриття можливостей використання культур клітин ендокринних органів. В нарисі постає й сучасний потенціал інституту.

«Пам'ятається, як на одному з ювілеїв лікарів-ендокринологи з периферії подарували Василю Павловичу чудовий вінок з колосків пшениці з вплетеними в нього кетягами червоної калини», мовиться у прикінцевих рядках вступного нарису. «Цей подарунок знайшов чільне місце в його кабінеті і дуже довго залишався там, милуючи очі. Очевидно, українські обереги були близькі його серцю».

К. Богомолець, Н. Мазепа-Кавецька, І. Комісаренко, Н. Крутикова, Г. Поволоцька, Я. Бальон, К. Зак, О. Шевченко, Т. Валуєва, О. Микоша, В. Гордієнко, О. Резніков, Н. Гула, А. Єфімов, Л. Демків, В. Кравченко, В. Славнов, Ю. Кундієв, І. Трахтенберг – ось коло авторів есе та спогадів про Василя Павловича; це справді штрихи відчуттів та пам'яті серця. Зворушують рядки й роздуми О. Микоші, К. Зака, Н. Крутикової, Я. Бальона – перших волонтерів з плеяди наставника. В щирих спогадах Ігоря Комісаренка наочно постають й епоха становлення Богомольцівської школи в перші післявоєнні роки, й колективний портрет видатних вчених в цьому видноколі, куди входив Василь Павлович, й інші хвилюючі й непідробні миттєвості його життя, зокрема епізод, коли лікар-терапевт Анатолій Пелешук разом з Ігорем переправляються на човні через бурхливий нічний Дніпро, аби вчасно дістатися до Василя Павловича, який тяжко хворіє. Письменницький хист виділяє нарис доктора філологічних наук Наталі Мазепа-Кавецької про щире дружбу між Василем Павловичем Комісаренком і Ростиславом Євгеновичем Кавецьким та витоки створення інститутів ендокринології, експериментальної і клінічної онкології, геронтології, як втілення задумів О. Богомольця про розвиток цих наукових напрямів в нових соціально-політичних умовах.

Книгу спогадів вишукано й гарно підготовлено видавництвом «Авіцена», й в цьому сенсі варто зупинитися й на її ілюстративному ланцюгу. Ми бачимо Любов Іларіонівну Дросовську-Комісаренко й Василя Павловича в різні періоди їх життя, починаючи із днів юності, але завжди їхні очі сяють взаємною любов'ю. На одній із світлин поруч із О. О. Богомольцем його молоді співробітники – Н. Медведєва, Р. Кавецький, В. Комісаренко, П. Марчук. Ось ще рідкісні фото – В. Комісаренко з Н. Ужвій й Л. Первомайським, а далі – з Б. Польовим, Н. Рибакком. Постає відома надзвичайно вдала скульптура В. Зноби «Династія вчених». На ній Василь Павлович з синами Ігорем та Сергієм.

Істотно важливо, що в кінці книги, наведено повний покажчик основних наукових праць В. П. Комісаренка та науково-популярних публікацій щодо його діяльності. В цьому переліку відбито й слід зустрічей з академіком В. П. Комісаренком й автора цих нотаток.

Ошатна, сяюча інтелектуальною й душевною досконалістю книжка – перша вичерпна збірка про життєвий та творчий шлях видатного вченого, який вивів українську ендокринологію на світову орбіту. Й якщо спробувати завітати думкою в ще далекий 2057 рік, коли відзначатиметься черговий вагомий ювілей сина коваля й будівничого наукової думки Василя Комісаренка, рецензована книга, мабуть, стане основною науковою та літературною підвалиною, вчитуючись в рядки якої наші нащадки відтворять образ дивної людини з вічним випромінюванням серця та думки. Бо лише слову й меморіалу в ньому насправді дано тривале життя.

Юрій Віленський,
кандидат медичних наук.