

*С.В. Глинник,
И.В. Романовский,
О.Н. Ринейская*

Коррекция экспериментального гипотиреоза при помощи левотироксина и комплекса аминокислот

Белорусский государственный медицинский университет

Проведена оценка эффективности коррекции экспериментального пропилтиоурацилового гипотиреоза с помощью L-тироксина и комплекса аминокислот по гормональному статусу и по состоянию ферментативных антиоксидантных систем печени и мозга крыс. Применение для коррекции гипотиреоза у крыс левотироксина в дозе 1,5 мкг/кг не приводило к нормализации гормонального статуса. При использовании комплекса аминокислот (селенометионин – 30 мкг/кг, метионин – 25 мкг/кг, серин – 16 мкг/кг) и левотироксина как в дозе 1,5 мкг/кг, так и в дозе 1 мкг/кг уровни гормонов щитовидной железы достигали значений у контрольных животных. Ключевые слова: экспериментальный гипотиреоз, коррекция, гормональный статус, антиоксидантный статус.

Во всем мире заболевания щитовидной железы занимают одно из ведущих мест в патологии эндокринных органов. В Республике Беларусь серьезную проблему представляет гипотиреоз, что, вероятно, объясняется как недостаточным поступлением в организм человека йода, селена и других микроэлементов вследствие их дефицита в почве и питьевой воде, так и влиянием антропогенных факторов окружающей среды. Актуальность данной проблемы резко возросла после аварии на Чернобыльской атомной электростанции. Увеличилось количество случаев врожденного гипотиреоза и тиреоидной патологии (болезнь Грейвса, аутоиммунный тиреоидит, злокачественные новообразования, многоузловой зоб), требующей оперативного вмешательства в виде частичной или полной резекции железы, что приводит к дефициту тиреоидных гормонов [1, 3, 4, 11].

Необходимость изучения тонких механизмов патогенеза данного заболевания, сопровождающегося нарушением всех видов обмена веществ, объясняется тем, что заместительная терапия, используемая при лечении гипотиреоза, не обеспечивает в полной мере необходимый баланс гормонов щитовидной железы и полноценной жизни. По-видимому, недостаточно одной только гормональной коррекции, для того чтобы достичь оптимального качества жизни пациентов с врожденным или приобретенным гипотиреозом [8, 9].

Цель исследования – оценка эффективности коррекции экспериментального гипотиреоза с помощью левотироксина и комплекса аминокислот по гормональному статусу и по состоянию ферментативных антиоксидантных систем мозга и печени крыс.

Материал и методы

Исследования были проведены на белых нелинейных половозрелых крысах-самцах массой 180-300 г. Отбор животных для эксперимента проводили при помощи теста «открытое поле» [2]. Для создания экспериментального гипотиреоза нами была использована отработанная на кафедре биоорганической химии совместно с лабораторией экспериментальной медицины, фармакологии и токсикологии ЦНИЛ БГМУ экспериментальная пропилтиоурациловая модель гипотиреоза. Пропилтиоурацил (Fluka, Швейцария) применяли в виде 0,02%-ного водного раствора, которым заполнялись поилки для животных. На протяжении всего срока эксперимента крысы имели свободный и постоянный доступ к поилкам. По расчетным данным каждое животное получало примерно 0,78 мг ПТУ на 100 г массы тела в сутки. Контрольная группа животных, содержащаяся при том же пищевом и световом режиме, получала в качестве питья обычную воду. Формирование к 14-м суткам эксперимента гипотиреоза подтверждалось соответствующими изменениями уровней тиреотропного гормона гипофиза, трийодтиронина и тироксина в сыворотке крови. Коррекцию экспериментального гипотиреоза проводили при помощи левотироксина натрия (L-тироксин) в составе препарата «Эутирокс» (Nycomed, Германия), селенометионина в составе селеносодержащего органического препарата (Alltech, Ирландия; 1 г препарата содержал 1 мг Se-аминокислот: 50% – Se-метионина и 25% – Se-цистеина), аминокислот: метионина и серина (Sigma, Германия). Все препараты вводили ежедневно, эндогастрально, в виде водных растворов необходимых концентраций на протяжении 14-ти суток в утренние часы животным, которые были разделены на следующие группы (по 8 особей в каждой):

1 группа (Т4 1,5 мкг/кг) – крысы с экспериментальным гипотиреозом, получавшие левотироксин в дозе 1,5 мкг/кг;

2 группа (Т4 1,5 мкг/кг + АМК) – крысы с экспериментальным гипотиреозом, получавшие левотироксин в дозе 1,5 мкг/кг и одновременно комплекс аминокислот (селенометионин – 30 мкг/кг, метионин – 25 мкг/кг, серин – 16 мкг/кг);

3 группа (Т4 1 мкг/кг + АМК) – крысы с экспериментальным гипотиреозом, получавшие левотироксин в дозе 1 мкг/кг и комплекс аминокислот такого же состава, как и во 2-ой группе;

4 группа (гипотиреоз) – животные с экспериментальным гипотиреозом;

5 группа (контроль введения препарата) – эутиреоидные крысы, получавшие на протяжении эксперимента эндогастрально адекватную водную нагрузку.

Животных снимали с эксперимента под тиопенталовым наркозом (60 – 80 мг/кг) забором крови из сонной артерии. Внутренние органы (большие полушария головного мозга, печень, щитовидная железа) после изъятия и отмывания в физиологическом растворе помещались на стоящую во льду чашку Петри. Интенсивность процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в печени и мозге оценивали по уровню малонового диальдегида (МДА) [12]. Определяли активность следующих антиоксидантных ферментов: супероксиддисмутазы (СОД) по методу Nishikimi в модификации

В.Н.Чумакова и Л.П.Осинской [10], каталазы – по методу М.А.Королюка и соавт. [5], глутатионредуктазы (ГР) – по модифицированному нами методу Wendell P.Z. [14], глутатионпероксидазы (ГП) – по методу В.М. Моина [7]. Концентрацию белка в тканях определяли по методу Лоури [13]. Статистическая обработка выполнена с помощью программного пакета Statistica 6.0. Данные представлены в таблицах как медиана и 50% интерквартильный размах (медиана: 25%-й процентиль – 75%-й процентиль), а также описываются в тексте в виде относительных величин. Для оценки достоверности различий между группами использовали тест Манна-Уитни (достоверными считались различия при $p < 0,05$).

Результаты и обсуждение

Применение для коррекции экспериментального гипотиреоза левотироксина в дозе 1,5 мкг/кг приводило к возрастанию уровней трийодтиронина на 90% и в 5,3 раза тироксина в сыворотке крови (табл. 1). Однако содержание указанных гормонов оставалось достоверно ниже уровней этих показателей в группе контрольных животных.

Таблица 1

Гормональный статус крыс с экспериментальным гипотиреозом в зависимости от схемы коррекции

Группа животных	Гормоны			
	Трийодтиронин, нмоль/л	Тироксин, нмоль/л	Кортизол, нмоль/л	Инсулин, пмоль/л
1. T ₄ 1,5 мкг/кг n = 8	1.14 (1.13-1.15) ¹²⁾	27.75 (27.25-28.5) ¹²⁾	30.25 (30.0-30.75) ¹²⁾	63.5 (53.0-70.5) ²⁾
2. T ₄ 1,5 мкг/кг + АМК n = 8	1.63 (1.60-1.71) ¹²⁾	25.75 (23.75-27.5) ^{2) 2)}	10.25 (10.0-10.75) ⁴⁾	79.5(74.5-83.0) ²⁾
3. T ₄ 1,0 мкг/кг + АМК n = 8	1.74 (1.63-1.91) ¹²⁾	36.5 (35.0-40.0) ²⁾	17.0 (13.5-19.0) ²⁾	74.5 (44.75-96.0) ²⁾
4. гипотиреоз n = 8	0.60 (0.57-0.65) ¹⁾	5.21 (4.10-5.32) ¹²⁾	24.0 (14.4-27.0) ¹⁾	27.0 (26.1-29.0) ¹⁾
5. контроль n = 8	1.29 (1.17-1.45)	32.0 (29.0-37.1)	17.0 (10.0-21.0)	61.5 (54.0-90.0)

1) – различия достоверны по сравнению с группой 5 ($p < 0,05$). 2) – различия достоверны по сравнению с группой 4 ($p < 0,05$)

Использование для коррекции гипотиреоза левотироксина в комплексе с органическим селеносодержащим препаратом (Se-метионина + Se-цистеин) и аминокислотами (метионином и серином) обуславливалось рядом факторов. Селен является эссенциальным микроэлементом для человека и животных. Согласно данным литературы [6], селен необходим для синтеза так называемых селеноспецифических селенопротеинов, к которым относятся ферменты: дейодиназы I, II и III типов, глутатионпероксидазы и ряд других белков. В организм человека селен поступает в виде селеносодержащих аминокислот растительного происхождения: селенометионина и селеноцистеина. При алиментарном дефиците восполнить недостаток селена можно путем добавления к рациону неорганических соединений селена (селенита или селената натрия) или органических селеносодержащих добавок микробиального происхождения. При избыточном поступлении в организм неорганического селена он может накапливаться в тканях в виде высоко

токсичного аниона гидроселенида (главного метаболита неорганических форм селена), поэтому большинство авторов рекомендуют в качестве предпочтительной формы для профилактики пищевого селенодефицита использовать селенометионин и селеносодержащие растительные белки [6]. Se-метионин поступающий с пищей и высвобождающийся из белков тканей путем транссульфурации превращается в Se-цистеин, который включается в состав селеноспецифических протеинов. Успешность этого процесса зависит от нормальной обеспеченности организма серой в форме метионина. Кроме того, в литературе имеются данные о важной роли аминокислоты серина в синтезе фермента глутатионпероксидазы. Так, при белковом синтезе остаток Se-цистеина в составе ГП человека кодируется триплетом TGA и т-РНК, несущая соответствующий антикодон ACU в естественных условиях ацилируется серином. Далее в момент включения остатка в полипептидную цепь происходит замещение гидроксильной группы серина на селеноводород (гидроселенид-анион) и остаток Se-цистеина встраивается в состав ГП. Достаточное поступление в организм селена необходимо также для синтеза и работы ферментов дейодиназ, в структуре которых селен участвует в формировании активного центра [6]. Дейодиназы обеспечивают превращение гормонов щитовидной железы в периферических тканях и органах, так как с их помощью дейодируется около 80% тироксина с образованием на порядок более активного трийодтиронина. Кроме того, благодаря работе этих ферментов происходит дезактивация тиреоидных гормонов путем последовательной деградации молекулы тироксина с образованием неактивных продуктов.

Введение экспериментальным животным и левотироксина в дозе 1,5 мкг/кг и комплекса аминокислот (селенометионин – 30 мкг/кг, метионин – 25 мкг/кг, серин – 16 мкг/кг) сопровождалось еще большим увеличением уровня трийодтиронина, который составил 1,63 нмоль/л, что превышает контрольный уровень (у эутиреоидных крыс). В то же время содержание тироксина несколько снизилось (на 7,3%), что, вероятно, объясняется активацией дейодиназ в периферических тканях при введении в организм селеносодержащих аминокислот и превращением тироксина в более активный трийодтиронин.

Нами была предпринята попытка снизить дозу левотироксина до 1 мкг/кг для коррекции экспериментального гипотиреоза при одновременном введении в организм указанного комплекса аминокислот. Результаты указывают на то, что при использовании левотироксина в дозе 1 мкг/кг и комплекса аминокислот произошло наиболее полное восстановление содержания в сыворотке крови крыс гормонов щитовидной железы: уровень трийодтиронина достоверно не отличался от такового во 2-ой группе, а содержание тироксина достигло уровня данного показателя в группе контрольных (эутиреоидных) животных. Необходимо отметить положительное влияние использования селенометионина, метионина и серина вместе с левотироксином для коррекции гипотиреоза на уровни таких гормонов как кортизол и инсулин. Содержание кортизола во 2-й и 3-й

группах достоверно уменьшилось по сравнению с уровнем его в группе гипотиреоидных животных, которые получали только L-тироксин, и достигало уровня данного показателя в группе контроля. Концентрация анаболического гормона инсулина в сыворотке крови крыс, коррекцию гипотиреоза которым проводили только при помощи левотироксина, увеличивалась в 2,3 раза по сравнению с группой 2. Но содержание его еще больше повышалось при использовании в схеме коррекции тиреоидной гипофункции комплекса аминокислот.

Для оценки антиоксидантного статуса исследовался уровень МДА (косвенно свидетельствующий об интенсивности процессов ПОЛ), активность ферментов СОД, каталазы, ГП и ГР в печени и мозге экспериментальных животных. Содержание МДА в мозге гипотиреоидных крыс (табл. 2) при введении им L-тироксина в дозе 1,5 мкг/кг составляло 157% по сравнению со значением аналогичного показателя в группе 4 и превышало уровень у контрольных животных на 15%.

Таблица 2

Состояние процессов ПОЛ и активность ферментов антиоксидантной защиты в тканях мозга крыс при экспериментальном гипотиреозе в зависимости от схемы коррекции

Группа животных	Показатель				
	МДА (нМоль / г ткани)	СОД (ед./ мг белка)	Каталаза (нМоль H ₂ O ₂ / мин x мг белка)	ГР (нМоль / ч x мг белка)	ГП (нМоль / мг белка x мин)
1. T ₄ 1,5 мкг/кг n = 8	0.818 (0.812-0.849) ¹²⁾	3.42 (3.18-4.02)	2.93 (1.46-3.1) ²	37,76 (34.26-42.93) ^b	7.63 (7.01-11.36) ¹¹
2. T ₄ 1,5 мкг/кг + АМК n = 8	0.749 (0.718-0.782) ²	3.11 (3.04-4.02)	4.58 (4.37-7.26) ¹¹²⁾	59.10 (55.9-67.9)	11.70 (11.25-12.10)
3. T ₄ 1,0 мкг/кг + АМК n = 8	0.780 (0.751-0.834) ²	2.42 (2.40-2.46) ²⁾	2.41 (2.24-2.62)	60.68 (58.11-63.29)	9.40 (9.02-12.36) ²⁾
4. гипотиреоз n = 8	0.52 (0.49-0.55)	3.65 (3.40-3.68)	2.88 (2.14-2.70)	70.2 (62.9-71.1)	9.3 (8.8-9.51)
5. контроль n = 8	0.711 (0.54-0.798)	3.47 (2.90-4.17)	2.78 (2.75-2.83)	64.2 (63.1-74.1)	11.27 (10.39-12.02)

1) – различия достоверны по сравнению с группой 5 (p < 0,05). 2) – различия достоверны по сравнению с группой 4 (p < 0,05)

Указанные изменения не сопровождались адекватной активацией ферментов антиоксидантной защиты мозга крыс. При использовании для коррекции экспериментального гипотиреоза комплекса аминокислот вместе с L-тироксином как в дозе 1,5 мкг/кг, так и в дозе 1,0 мкг/кг также наблюдалось увеличение содержания МДА по сравнению с уровнем данного показателя у гипотиреоидных животных (группа 4), однако, оно находилось в пределах значений у контрольных животных. Кроме того, в группе 2 отмечалось увеличение по сравнению с группой 4 активности каталазы на 70%, ГП – на 25%. Применение для коррекции тиреоидной гипофункции у крыс комплекса аминокислот и L-тироксина в дозе 1,0 мкг/кг сопровождалось восстановлением активностей всех исследованных ферментов антиоксидантной системы мозга крыс до уровней, близких к значениям у контрольных животных.

Содержание МДА в печени животных с гипотиреозом (табл. 3) при введении им левотироксина в дозе 1,5 мкг/кг составляло 128% от уровня данного показателя у животных группы 4. Указанные изменения наблюдались на фоне активации СОД на 68%, каталазы – на 65%, ГР – на 76%. При использовании для коррекции экспериментального гипотиреоза комплекса аминокислот и L-тироксина в дозе 1,5 мкг/кг отмечалось увеличение содержания МДА на 50% по сравнению с уровнем его у крыс группы 4. Но снижение дозы левотироксина до 1,0 мкг/кг приводило к нормализации данного показателя. В группах животных 2 и 3 выявлены однонаправленные изменения активности ферментов антиоксидантной защиты печени, а активность всех исследованных ферментов возрастает у животных 3-й группы по сравнению со второй. Интересным и требующим более глубоких исследований и анализа является факт резкого (на 73%) снижения активности ГП при использовании комплекса аминокислот и левотироксина в дозе 1,5 мкг/кг, но не в дозе 1,0 мкг/кг.

Таблица 3

Состояние процессов ПОЛ и активность ферментов антиоксидантной защиты в тканях печени крыс при экспериментальном гипотиреозе в зависимости от схемы коррекции

Группа животных	МДА (мкмоль / г ткани)	СОД (ед / мг белка)	Показатель Каталаза (мкмоль H ₂ O ₂ / мин x мг белка)	ГР (мкмоль / ч x мг белка)	ГП (мкмоль / мг белка x мин)
1. T ₁ 1,5 мкг/кг n = 8	0.0717 (0.069-0.073) ²¹	49.7 (44.1-51.4) ¹¹	545.1 (527.3-611.1) ²¹	44.95 (32.1-48.9) ¹³	10.04 (6.05-13.4)
2. T ₁ 1,5 мкг/кг + АМК n = 8	0.084 (0.079-0.09) ²¹	29.5 (27.6-31.2) ¹¹	345.35 (334.9-411.1) ¹¹	24.6 (21.8-25.6) ²³	2.69 (1.24-6.43) ²³
3. T ₁ 1,0 мкг/кг + АМК n = 8	0.056 (0.054-0.068)	37.4 (33.3-43.7)	425.3 (402.3-453.8) ¹²	31.41 (28.5-31.7)	7.34 (6.14-7.87)
4. гипотиреоз n = 8	0.056 (0.051-0.059) ¹¹	29.42 (24.0-36.6)	329.25 (262.3-351.7) ¹¹	36.1 (31.9-38.1) ¹³	10.03 (7.4-17.7)
5. контроль n = 8	0.079 (0.060-0.124)	35.9 (33.3-43.8)	665.7 (594.0-671.0)	25.4 (25.1-29.2)	10.82 (10.27-11.56)

1) – различия достоверны по сравнению с группой 5 ($p < 0,05$), 2) – различия достоверны по сравнению с группой 4 ($p < 0,05$)

Выводы

1. Применение для коррекции гипотиреоза у крыс левотироксина в дозе 1,5 мкг/кг не приводило к нормализации гормонального статуса. В то же время, уровни гормонов щитовидной железы достигали значений у контрольных животных при использовании комплекса аминокислот (селенометионин – 30 мкг/кг, метионин – 25 мкг/кг, серин – 16 мкг/кг) и левотироксина как в дозе 1,5 мкг/кг, так и в дозе 1 мкг/кг.
2. Применение для коррекции гипотиреоза указанных выше комплексов препаратов у экспериментальных животных сопровождалось нормализацией активности ферментов антиоксидантной защиты в мозге и печени.
3. Использование для коррекции экспериментального пропилтиоурацилового гипотиреоза у крыс L-тироксина в комплексе с аминокислотами

(селенометионин, метионин, серин в указанных дозах) целесообразно и позволяет снизить дозу левотироксина на 34%.

Литература

1. Буглова, Е.Е. Риск радиационно-индуцированного рака щитовидной железы / Е.Е. Буглова // *Здравоохранение*. – 2001. – № 10. – С. 25 – 30.
2. Буреш, Я. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения: Пер. с англ. Е.Н. Живописцевой / Я. Буреш, О. Бурешова, Д.П. Хьюстон; под ред. А.С. Батуева. – М.: Высшая школа, 1991. – 399 с.
3. Кениксберг, Я.Э. Облучение щитовидной железы жителей Беларуси вследствие Чернобыльской аварии: дозы и эффекты / Я.Э. Кениксберг, Ю.Е. Крюк. – Гомель: Институт радиологии, 2004. – 121с.
4. Международное сотрудничество в области изучения патологии щитовидной железы: Актуальные проблемы патологии щитовидной железы: материалы научно-практической конференции, Гомель, 25 ноября 2005 г. / Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека; Министерство Здравоохранения Респ. Беларусь. – Гомель: КИПУП, 2005. – 206 с.
5. Метод определения активности каталазы / М.А. Королюк [и др.] // *Лаб. дело*. – 1988. – № 1. – С. 16 – 19.
6. Микроэлемент селен: роль в процессах жизнедеятельности / И.В. Гмошинский [и др.] // *Экология моря*. – 2000. – № 54. – С. 5-19.
7. Моин, В.И. Простой и чувствительный метод определения глутатионпероксидазы в эритроцитах / В.И. Моин // *Лаб. дело*. – 1986. – № 12. – С. 724 – 727.
8. Хрыщанович, В.Я. Оценка качества жизни пациентов с первичным послеоперационным гипотиреозом, принимающих L-тироксин / В.Я. Хрыщанович // *Белорусский медицинский журнал*. – 2005. – № 1. – С. 103 – 105.
9. Хрыщанович, В.Я. Оценка эффективности заместительной гормональной терапии у пациентов с первичным гипотиреозом / В.Я. Хрыщанович // *Белорусский медицинский журнал*. – 2004. – № 4. – С. 97 – 100.
10. Чумаков, В.Н. Количественный метод определения активности цинк-, медь-зависимой супероксиддисмутазы в биологическом материале / В.Н. Чумаков, Л.Ф. Осинская // *Вопросы медицинской химии*. – 1977. – Т. 23, № 5. – С. 712 – 716.
11. Щитовидная железа у детей: Последствия Чернобыля / под общ. ред. Л.Н. Астаховой. – Минск, 1996. – 216 с.
12. Asakawa, T. Coloring conditions of thiobarbituric acid test, for detecting lipid hydroperoxides / T. Asakawa, S. Matsushita // *Lipids*. – 1980. – Vol. 15. – P. 137 – 140.
13. Lowry, O.H. Protein measurement with the folin phenol reagent / O.H. Lowry // *Biol. Chem.* – 1951. – Vol. 193, № 1. – P. 265 – 275.
14. Wendell, P.Z. Distribution of glutathione reductase and detection of glutathione-cystine transhydrogenase in rat tissues / P.Z. Wendell // *Biochim. Biophys. Acta*. – 1968. – Vol. 159, № 1. – P. 179 – 181.

