



Митюкова Т.А.✉, Чудиловская Е.Н., Басалай А.А.

Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

Активность 5'-дейодиназы йодотиронина I типа в печени у крыс, получающих высококалорийную диету (экспериментальное исследование)

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: концепция, дизайн исследования, обзор литературы, анализ и разработка методических подходов – Митюкова Т.А.; лабораторные методы исследования, статистические расчеты, графическое изображение, обзор литературы – Чудиловская Е.Н.; дизайн исследования, постановка экспериментов, лабораторные методы исследования – Басалай А.А.

Подана: 26.10.2021

Принята: 07.03.2022

Контакты: mityukovat@gmail.com

Резюме

Цель. Адаптировать простой и доступный метод определения активности фермента дейодиназы I типа (D1) по Kaplan, Yaskoski (1980) применительно к его использованию для определения активности фермента в печени лабораторных животных (крыс линии Вистар); оценить влияние высококалорийного питания на состояние ферментативной активности.

Материалы и методы. Проведена адаптация метода определения активности D1 по Kaplan, Yaskoski (1980) в печени крыс. Эксперименты проводились в течение 4 месяцев на крысах-самцах линии Вистар, подразделенных на 2 группы: 1) контроль – стандартный рацион вивария; 2) ВКД – высококалорийная диета, включающая дополнительное содержание жиров животного происхождения и фруктозы. Определяли массу тела, висцерального жира, уровень тироксина и трийодтиронина в сыворотке крови и активность фермента D1 в печени крыс.

Результаты. Представлено подробное описание методической разработки определения D1 в печени крыс. Модификация метода включает разработку подготовительных процедур для определения T3 в спиртовом экстракте с учетом разбавления такового «нулевой» пуловой сывороткой, что обеспечивает возможность использования ИФА-наборов. Показано, что четырехмесячное высококалорийное питание приводит к существенному нарастанию массы тела и висцерального жира, а также к достоверному повышению уровней тироксина и трийодтиронина в крови крыс-самцов линии Вистар одновременно с повышением активности печеночной D1.

Выводы. Высококалорийное питание вызывает у крыс-самцов линии Вистар активацию печеночной D1 и повышение содержания тиреоидных гормонов в крови.

Ключевые слова: 5'-дейодиназа йодотиронина типа I, тироксин, трийодтиронин, высококалорийная диета, крысы линии Вистар



Mityukova T.✉, Chudilovskaya E., Basalai A.

Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

Activity of Type I Iodothyronine 5'-Deiodinase in the Liver in Rats Receiving a High-Calorie Diet (Experimental Study)

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: concept, research design, literature review, analysis and development of methodological approaches – Mityukova T.; laboratory research methods, statistical calculations, graphic image, literature review – Chudilovskaya E.; research design, experiments with rats, laboratory research methods – Basalai A.

Submitted: 26.10.2021

Accepted: 07.03.2022

Contacts: mityukovat@gmail.com

Abstract

Purpose. To adapt a simple and accessible method for determining the activity of the enzyme deiodinase type I (D1) according to Kaplan, Yaskoski (1980) in relation to its use for determining the activity of the enzyme in the liver of laboratory animals (Wistar rats); to evaluate the effect of high-calorie nutrition on the state of enzymatic activity.

Materials and methods. The method of Kaplan and Yaskoski (1980) for determination the activity of the D1 in the liver of rats was adapted. The experiments were carried out for 4 months on male Wistar rats, divided into 2 groups: 1) control – the standard diet; 2) HCD – a high-calorie diet, including an additional content of animal fats and fructose over the standard diet. The body weight, visceral fat, the level of thyroxine and triiodothyronine in the blood serum and the activity of the D1 in the liver of rats were determined.

Results. A detailed description of the determination of D1 in the liver of rats is presented. It was shown that a 4-month high-calorie diet leads to a significant increase in the body mass, the mass of visceral fat and to a significant increase in the levels of thyroxine and triiodothyronine in the blood of male Wistar rats, simultaneously with an increase in the activity of hepatic D1.

Conclusions. High-calorie nutrition causes an increase in the content of thyroid hormones in the blood and activation of hepatic D1 in male Wistar rats.

Keywords: 5'-deiodinase of iodothyronine type I, thyroxine, triiodothyronine, high-calorie diet, Wistar male rats

■ ВВЕДЕНИЕ

Известно, что щитовидная железа выделяет в кровь йодсодержащие тиреоидные гормоны – тироксин (Т4) и трийодтиронин (Т3), причем концентрация Т4 в крови в несколько раз выше, чем Т3, приблизительно в соотношении 6:1 [1]. При этом большая часть циркулирующего Т3 (около 80%) образуется в результате ферментативного дейодирования Т4 на периферическом уровне. Реакции дейодирования катализируются группой изоферментов дейодиназ – Ds. Хорошо изучены три основных изо-типа Ds – D1, D2 и D3, которые являются интегральными мембранными ферментами

с некоторыми различиями между ними, такими как их субклеточная и тканевая локализация, предпочтительные субстраты и генерируемые продукты, что объясняет их функциональные особенности [1]. Ds регулируют биодоступность и соотношение тиреоидных гормонов (Т4 и Т3) на периферическом уровне и в ткани мозга, а также продукцию неактивных метаболитов – реверсивного Т3 (rT3) и дийодотиронина (Т2). Показано, что Т4 проявляет умеренную физиологическую активность и рассматривается как прогормон, в то время как Т3 обладает наиболее высокой физиологической активностью [2, 3]. Основная доля Т3, циркулирующего в крови, образуется путем дейодирования Т4 в печени, почках и других тканях под влиянием D1.

Тиреоидные гормоны (ТГ) являются ключевыми регуляторами основного обмена, термогенеза и внутриклеточного метаболизма, участвуя в обмене углеводов, липидов и белков в различных тканях-мишенях. Гипертиреоз вызывает гиперметаболическое состояние, характеризующееся повышенными затратами энергии в состоянии покоя, снижением уровня холестерина, повышением активности липолиза и глюконеогенеза с последующей потерей массы тела. Гипотиреоз вызывает гипометаболическое состояние, характеризующееся снижением затрат энергии, повышением уровня холестерина, снижением выраженности липолиза и глюконеогенеза с последующим увеличением массы тела [2, 3]. Однако системная концентрация ТГ, циркулирующих в крови, не всегда отражает их метаболические эффекты на уровне клеток и тканей, поскольку их внутриклеточная эффективность регулируется непосредственно в клетках-мишенях механизмом активации/инактивации с участием дейодиназ трех типов, причем D1 и D2 превращают биологически слабоактивный предшественник – Т4 в активный гормон – Т3, а D3 преимущественно инактивирует действие тиреоидных гормонов [2]. Наиболее высокая метаболическая активность фермента D1 регистрируется в печени, что играет ключевую роль в регуляции липидного и углеводного обмена в организме. Исследование активности печеночной D1 представляет большую значимость при изучении энергетического и метаболического баланса организма в измененных условиях питания, а также в состоянии ожирения либо при его коррекции, поскольку этот фермент вносит значительный вклад в количество активного гормона Т3, циркулирующего в крови [1–6]. При этих состояниях также часто изучается активность фермента в жировой ткани, так как локальное повышение уровня Т3 стимулирует липолиз [5].

При изучении активности D1 в настоящее время чаще всего применяются изотопные методы с радиоактивно мечеными тиреоидными гормонами (^{125}I) и определением активности фермента по количеству отщепленной метки – ^{125}I [4, 5]. Однако существуют и другие варианты метода, в которых используется количественная оценка дейодирования Т4 по его превращению в Т3 [7, 8]: такие методы являются технически более доступными. Однако в этом случае необходимо уделить внимание пробоподготовке и разработать методические подходы, обеспечивающие возможность адекватного определения Т3 с использованием ИФА-методов.

Исходя из изложенного, представляло интерес изучение влияния высококалорийной диеты на уровни циркулирующих в крови тиреоидных гормонов (Т4 и Т3) с учетом оценки активности печеночной дейодиназы I типа.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Адаптировать простой и доступный метод определения активности фермента дейодиназы I типа (D1) по Kaplan, Yaskoski (1980) к его использованию для определения



активности фермента в печени лабораторных животных (крыс линии Вистар); оценить влияние высококалорийного питания на состояние ферментативной активности.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Опыты проводились на половозрелых крысах-самцах линии Вистар с соблюдением правил биоэтики. Животные вводились в эксперимент в возрасте 2 месяцев, масса тела составляла 180–200 г. Крысы были разделены на 2 группы: 1) контрольную ($n=12$), включающую животных, пребывающих на стандартном рационе питания и содержащихся в стандартных условиях (не менее 200–250 см² на крысу при групповом содержании – 6–7 животных в клетке); 2) группу животных, содержащихся на высококалорийной диете (ВКД) ($n=20$), которая включала дополнительное содержание жиров животного происхождения (45% от суточной калорийности пищи) и углеводов (питьевая вода замещалась на 10%-ный раствор фруктозы со свободным доступом к поилкам) при стандартных условиях содержания животных.

Продолжительность эксперимента составляла в общей сложности 4 месяца. Проводили прижизненное взвешивание крыс на весах Scout Pro (Китай). После выведения крыс из эксперимента путем декапитации под тиопенталовым наркозом проводили промывание печени физиологическим раствором, забирали печень и кровь для отделения сыворотки и последующего определения в ней Т4 и Т3. Массу висцерального жира оценивали на весах Scout Pro (Китай).

За основу изучения активности D1 в печени у крыс была принята оригинальная методика Kaplan, Yaskoski (1980) [8], которая использовалась также и в публикациях Е.Ф. Конопки и др. [9], но подробное описание методики было дано только в исходной работе [8]. Метод основан на оценке дейодиназной активности печени по превращению Т4 в Т3 в присутствии кофактора дитиотрейтола (ДТТ). Методическая работа позволила установить оптимальные условия приготовления реагентов, проведения реакции, а также подготовительных процедур для определения Т3 с использованием ИФА-наборов «Диагностические системы» (Беларусь) или «Хема» (Россия). Модификация метода включала следующее: 1) отработку приемов растворения тироксина в два этапа в связи с его плохой растворимостью в водной среде; 2) разработку подготовительных процедур для определения Т3 в спиртовом экстракте с учетом разбавления такового «нулевой» пуловой сывороткой, что обеспечивает возможность использования ИФА-наборов. В оригинальной методике Kaplan, Yaskoski (1980) [8] условия пробоподготовки описаны не были, несмотря на то что присутствие спирта в сыворотке может повлиять на иммуноферментную реакцию и исказить полученные результаты.

Статистический анализ полученных данных включал непараметрические методы статистики (Statistica 6.0). Полученные результаты выражали преимущественно в виде медиан и процентилей (Me [25; 75]). Достоверность отличий между группами подтверждали с использованием критерия Манна – Уитни, отличия считали достоверными при $P<0,05$.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ

На первом этапе работы была проведена апробация и модификация метода определения активности D1 в печени крыс. Процедура исследования осуществлялась при различных вариантах инкубации печеночного гомогената с субстратом

дейодиназной реакции – Т4 – и другими компонентами инкубационной смеси. Следует отметить, что L-тироксин практически не растворяется в водной среде, поэтому приготовление субстрата проводилось в два этапа: сначала на метаноле, а затем на буфере с подщелачиванием раствора, примерно до pH 8.

В окончательном варианте методики использовали следующие реагенты: трис-буфер 0,05 моль/л, pH 7,8; фосфатный буфер 0,01 моль/л, pH 7,6, содержащий бычий сывороточный альбумин (БСА) 0,25%; дитиотрейтол (ДТТ) 320 ммоль/л на дистиллированной воде; стандарт Т4 (I) на метаноле – 1000 мкмоль/л с добавлением 0,5 N NaOH (100 мкл на 5 мл раствора); стандарт Т4 (II) получали путем разбавления Т4-I в 20 раз на БСА-фосфатном буфере с добавлением 0,5 N NaOH до pH около 8 – конечная концентрация 50 мкмоль/л. Печеночный гомогенат готовили на трис-буфере (1:5) в условиях охлаждения при температуре тающего льда, затем центрифугировали 15 минут при 3 тыс. об/мин и использовали супернатант.

Состав инкубационной смеси: супернатант – 700 мкл, ДТТ – 40 мкл, стандарт Т4 (II) – 40 мкл. Инкубация при 37 °C в течение 1 часа проводилась в дублях – с использованием 2 опытных и 2 контрольных проб (контрольные пробы без ДТТ и Т4). Остановка реакции достигалась добавлением этилового спирта 96% 700 мкл, при этом в контрольные пробы добавляли ДТТ и Т4. После перемешивания пробы оставляли в холодильнике на 2 часа или на ночь для осаждения белка. Надосадочную жидкость отделяли путем центрифугирования и использовали для определения Т3 ИФА-методом (возможно хранение при –20 °C до проведения анализа). Полученный супернатант содержал около 48% этанола.

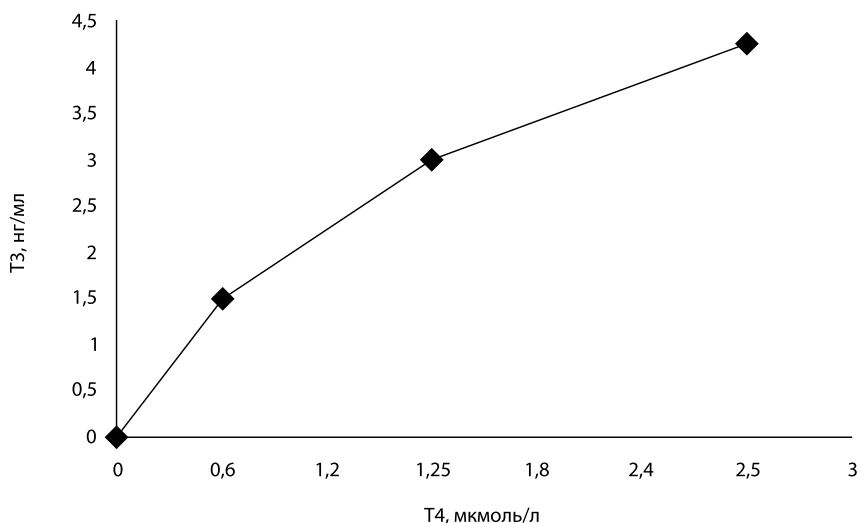


Рис. 1. Влияние концентрации субстрата (Т4) на уровень продукта реакции – Т3 – в инкубационной среде

Fig. 1. Effect of the substrate concentration (T4) on the reaction product concentration – T3 – in the incubation medium



Проведение инкубации с различными концентрациями субстрата в пробе позволило установить оптимальное содержание Т4 – 2,5 мкмоль/л, так как при дальнейшем повышении концентрации субстрата реакция выходила на плато (рис. 1). Работа с низкими концентрациями Т4 в зоне начальной скорости реакции была исключена, поскольку выход продукта был недостаточным для получения стабильных и значимых величин наработки Т3.

Установлено, что при определении Т3 ИФА-методом в спиртосодержащем супернатанте необходимо смешивать таковой с «нулевой» сывороткой (пуловая человеческая сыворотка, обработанная активированным углем), не допуская превышения концентрации этанола более 5% в пробе. Влияние концентрации этанола на определение Т3 ИФА-методом было проверено на «пуловой» сыворотке людей со средним содержанием Т3, равным $1,35 \pm 0,10$ нг/мл. При внесении в эту сыворотку этанола с конечной концентрацией не более 5% содержание Т3 определялось как 1,35–1,40 мкг/л. Повышение концентрации этанола до 10% вызывало искажение результатов анализа. В процессе выполнения методики супернатант вносили в «нулевую» сыворотку в соотношении 10/100 мкл таким образом, чтобы содержание этанола в пробе составляло около 4,8%, что являлось предельно допустимым.

Влияние высококалорийной диеты на массу тела и висцерального жира у крыс линии Вистар (Me [25; 75])
Effect of a high-calorie diet (HCD) on body weight and visceral fat in Wistar rats (Me [25; 75])

Показатели	Контроль (1)	ВКД (2)
Масса тела, г	362 [357; 372]	423 [358; 452]*
Масса висцерального жира, г	5,6 [4,8; 6,3]	22,1 [17,1; 25,4]*

Примечание: * достоверное отличие от группы «Контроль», $p < 0,05$.

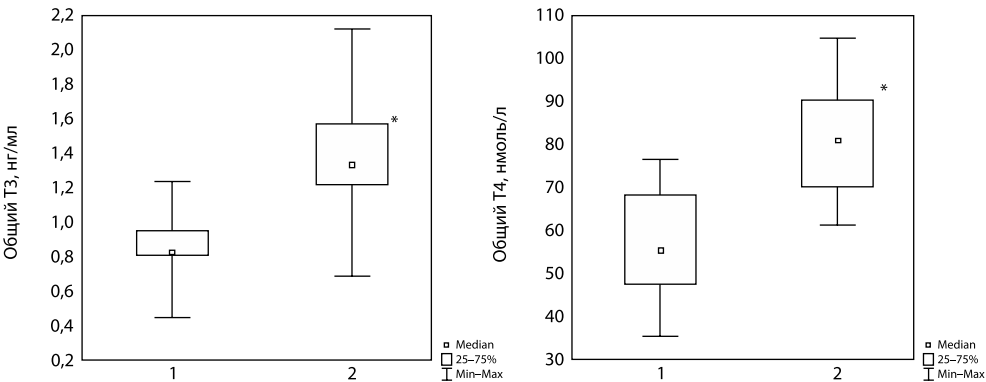


Рис. 2. Содержание общего Т4 и общего Т3 в сыворотке крови экспериментальных крыс

Примечания: «Контроль» – 1; «ВКД» – 2; * достоверные отличия от группы «Контроль», $p < 0,05$.

Fig. 2. The concentration of total T4 and total T3 in the blood serum of experimental rats

Notes: Control – 1; HCD – 2; * significant differences from the Control group, $p < 0.05$.

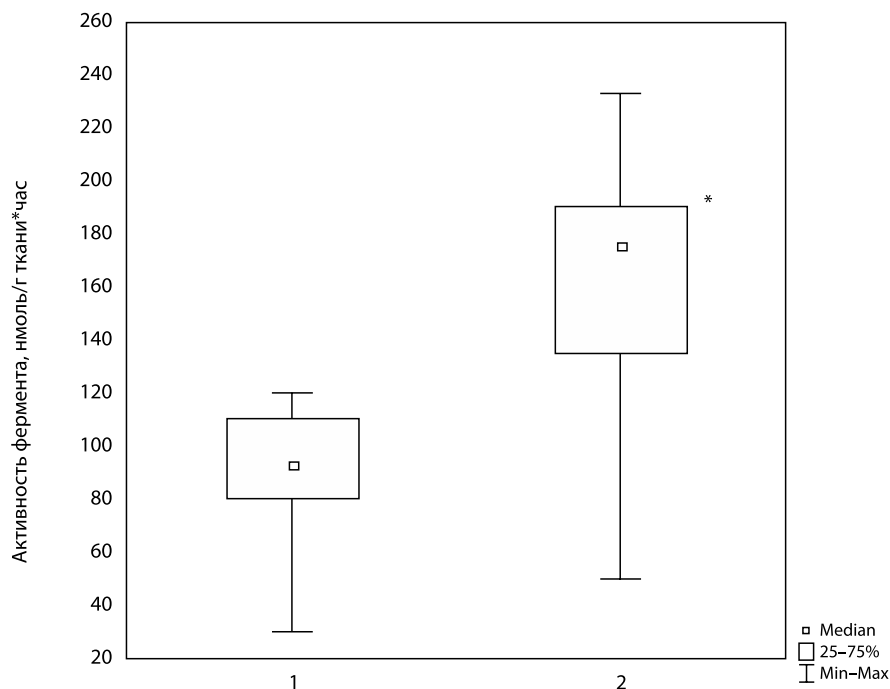


Рис. 3. Дейодиназная активность печени крыс экспериментальных групп

Примечания: «Контроль» – 1; «ВКД» – 2; * достоверные отличия от группы «Контроль», $p < 0,05$.

Fig. 3. Deiodinase activity of the liver of experimental rats

Notes: Control – 1; HCD – 2; * significant differences from the Control group, $p < 0.05$.

На втором этапе работы было проведено определение содержания гормонов Т3 и Т4 в сыворотке крови и активности фермента D1 в печени крыс экспериментальных групп (1-я – контроль, 2-я – ВКД).

Необходимо отметить, что животные группы ВКД имели достоверно более высокую массу тела и массу висцерального жира, чем таковые, получавшие стандартную диету (см. таблицу).

На фоне высококалорийного питания (группа ВКД) отмечалось существенное и достоверное повышение уровней Т4 и Т3 (рис. 2).

Определение дейодиназной активности в печени крыс показало, что у животных, получавших высококалорийную диету, дейодирование Т4 с образованием Т3 проходило более интенсивно, чем в контроле (175 [135; 190] и 138 [113; 165] нмоль/г ткани*час соответственно). Полученные данные представлены на рис. 3.

■ ОБСУЖДЕНИЕ

Первое упоминание о нарастании активности D1 в печени крыс при высокожировой диете можно найти в исследованиях К. Hartmann et al. [10], причем авторы



отмечают, что это было связано не столько с массой тела животных, сколько с характером их диеты. Авторы работы [5] показали, что активность D1 в белом жире у мышей была повышена на фоне диеты с высоким содержанием жиров, которая способствовала нарастанию уровня лептина в плазме, при этом активность D1 в печени тоже резко повышалась. Инъекции лептина увеличивали активность D1 в обеих тканях [5]. Определение активности фермента в белой жировой ткани пациентов с ожирением также выявило повышенные значения D1 [11]. Большой интерес представляют данные, полученные в исследованиях S.-F. Xia et al. [12], которые поставили перед собой цель изучить механизмы ожирения, связанные с тиреоидными гормонами. Опыты проводились на мышах, которые получали диету с низким (LFD) либо высоким (HFD) содержанием жиров в течение 7 и 27 недель. Мыши второй группы были ранжированы по массе тела на склонных к ожирению (obese prone – OP) и резистентных к ожирению (obese resistant – OR). Авторы показали, что у склонных к ожирению мышей были более выраженные метаболические сдвиги. На 27-й неделе у резистентных, но не у склонных к ожирению мышей достоверно повышались уровни T4 и T3 в сыворотке крови. Активность D1 в печени нарастала на 7-й неделе у мышей, резистентных к ожирению; на более поздних сроках она несколько снижалась, но сохранялась разница между OP- и OR-мышами. Авторы делают вывод о том, что ось гипоталамус – гипофиз – ЩЖ и активность D1 вовлечены в реализацию склонности либо резистентности мышей к ожирению на фоне потребления высокожировой диеты [12]. По-видимому, повышение уровней T3 и T4 в крови и нарастание активности D1 в печени характеризуют резистентность к ожирению при высокожировой диете у мышей [12].

При анализе собственных данных с учетом сведений литературы можно предположить, что выявленное нами повышение уровней T4 и T3 в сыворотке крови, а также активности D1 в печени у крыс группы ВКД можно отнести к адаптивным сдвигам, направленным на активацию метаболизма при избыточном поступлении калорий в организм. По-видимому, активация печеночной дейодиназы на фоне ВКД является важным адаптивным механизмом, который направлен на повышение продукции активного гормона T3 при повышенной калорийности диеты.

■ ВЫВОДЫ

1. Проведена адаптация и модификация простого в исполнении метода определения активности 5'-дейодиназы йодотиронина I типа по Kaplan, Yaskoski (1980) применительно к его использованию для определения ферментативной активности в печени лабораторных животных (крыс).
2. Установлено, что четырехмесячное высококалорийное питание приводит к достоверному нарастанию массы тела и висцерального жира и к повышению уровней тироксина и трийодтиронина в крови крыс-самцов линии Вистар одновременно с повышением активности печеночной 5'-дейодиназы йодотиронина I типа.
3. Полученные данные свидетельствуют о том, что сдвиги показателей тиреоидного статуса имеют адаптивное значение для организма, получающего высококалорийную диету, поскольку они направлены на повышение основного обмена.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. García-Solís P. Thyroid hormones and obesity: a known but poorly understood relationship. *Endocrinologia Polska*. 2018;69(3):292–303.
2. Cicatiello A.G. Metabolic Effects of the Intracellular Regulation of Thyroid Hormone: Old Players, New Concepts. *Frontiers in Endocrinology*. 2018;9:474. doi: 10.3389/fendo.2018.00474.
3. Maia A.L. Deiodinases: the balance of thyroid hormone: type 1 iodothyronine deiodinase in human physiology and disease. *J Endocrinol*. 2011;209(3):283–97. doi: 10.1530/JOE-10-0481.
4. Araujo R.L. Tissue-specific deiodinase regulation during food restriction and low replacement dose of leptin in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009 May;296(5):E1157–63. doi: 10.1152/ajpendo.90869.2008.
5. Jilkova Z.M. Modulation of type 1 iodothyronine 5'-deiodinase activity in white adipose tissue by nutrition: possible involvement of leptin. *Physiol Res*. 2010;59:561–569.
6. Marsili A. Physiological role and regulation of iodothyronine deiodinases: a 2011 update. *J. Endocrinol. Invest*. 2011;34:395–407. doi: 10.1007/BF03347465.
7. Donder E. Effect of Selenium on "Low T₃ Syndrome" in Hepatic Failure. *Tr. J. Medical Sciences*. 1998;28:649–653.
8. Kaplan M.N., Yaskoski K. Phenolic and tyrosil ring deiodination of iodothyronines in rat brain homogenates. *J. Clin. Invest*. 1980;66:551–562.
9. Konoplya E.F., Bagel I.M., Gorokh G.A. Activity of iodothyronine 5'-deiodinase in the liver and the content of thyroid hormones in the blood serum of rats after gamma irradiation. *Reports of the Academy of Sciences of Belarus*. 1994;38(6):67–70. (in Russian)
10. Hartmann K., Weber A., Hartmann N. Liver deiodase activity in rats of different body weight and fat contents following high or low fat diet. Comparison of enzymatic deiodination with T4-clearance rate and thyroid activity in animals. *Endokrinologie*. 1980;75(3):357–64.
11. Ortega F.J. Type I iodothyronine 5'-deiodinase mRNA and activity is increased in adipose tissue of obese subjects. *Int. J. Obes*. 2012;36:320–324.
12. Xia S.-F. Role of thyroid hormone homeostasis in obesity-prone and obesity-resistant mice fed a high fat diet. *Metabolism Clin. Exp*. 2015;64:566–579.