

УДК 612.4:632.95.02

©Яглова, Яглов

ИЗМЕНЕНИЯ ПРОДУКЦИИ ТИРЕОИДНЫХ ГОРМОНОВ ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ ВОЗДЕЙСТВИИ НИЗКИХ ДОЗ ЭНДОКРИННОГО ДИЗРАПТОРА ДИХЛОРДИФЕНИЛТРИХЛОРЭТАНА

Н.В. Яглова, В.В. Яглов*

Институт морфологии человека,
117418, г. Москва, ул. Цюрупы, 3; тел./факс: (499) 120-80-65;
эл. почта: yaglova@mail.ru

Эндокринные дизрапторы – экзогенные вещества, которые, поступая в организм, оказывают гормоноподобные эффекты, нарушающие гомеостатические механизмы регуляции эндогенными гормонами процессов жизнедеятельности живых организмов. Наиболее распространенным дизраптором на планете является дихлордифенилтрихлорэтан (ДДТ). Целью настоящего исследования являлось выявление изменений продукции тиреоидных гормонов при длительном воздействии низких доз ДДТ. Эксперимент проводили на самцах крыс Вистар, потреблявших ДДТ в течение 6 и 10 недель в дозах $1,89 \pm 0,86$ и $7,77 \pm 0,17$ мкг/кг/сут. Через 6 недель наблюдалось дозозависимое усиление синтеза общего тироксина и трийодтиронина, тиреопероксидазы. В дальнейшем происходило снижение концентрации свободного тироксина. Такие изменения тиреоидного статуса схожи с изменениями при развитии эндемического зоба. Полученные данные указывают на ведущую роль нарушения продукции тироксина фолликулярными тироцитами, а не снижения дейодиназной активности и транспортных белков крови в изменениях тиреоидного статуса под воздействием ДДТ.

Ключевые слова: эндокринные дизрапторы, щитовидная железа, тиреоидные гормоны, ДДТ.

ВВЕДЕНИЕ

Эндокринные дизрапторы – экзогенные вещества, содержащиеся в почве, воде, воздухе, пищевых продуктах и некоторых промышленных изделиях, которые, поступая в организм, оказывают гормоноподобные эффекты, нарушающие гомеостатические механизмы регуляции эндогенными гормонами процессов жизнедеятельности живых организмов. Известно, что некоторые эндокринные дизрапторы могут длительное время сохраняться в окружающей среде и даже накапливаться в живых организмах, постоянно воздействуя на них и нарушая механизмы их гормональной регуляции. К числу наиболее распространенных эндокринных дизрапторов, содержащихся в окружающей среде, относится пестицид дихлордифенилтрихлорэтан (ДДТ). ДДТ на протяжении многих лет широко использовался в качестве средства для борьбы с переносчиками возбудителей малярии, сыпного тифа и вредителями сельскохозяйственных

культур с нормами расхода 0,3 – 2,0 – 11,2 кг/га. Считают, что в обычных условиях ДДТ в почве может сохраняться до 12 лет. Однако в процессе его естественного разложения образуются метаболиты, биологическое действие некоторых из них выше, чем у самого ДДТ. При повторном введении ДДТ концентрация его метаболитов в почве может сохраняться до 20 лет [1]. После длительного запрета в 2006 г., с разрешения Всемирной организации здравоохранения, вновь началось использование ДДТ в качестве инсектицида для борьбы с переносчиками малярии в странах Африки и Азии. Хорошо известно, что ДДТ в различных концентрациях содержится в водах морей и океанов, почве и накапливается в различных продуктах растительного и животного происхождения. При длительном употреблении в пищу продуктов, содержащих ДДТ, он способен в разных количествах накапливаться в органах животных и человека: печени, мозге, тимусе, семенниках и в большей мере в жировой ткани [2, 3].

* - адресат для переписки

Исследование дизрапторного действия ДДТ на функционирование эндокринных желез является одной из актуальных проблем современной медицинской науки. Международное общество эндокринологов неоднократно высказывалось о необходимости исследования связи между изменениями, вызванными дизрапторами на молекулярном уровне, и развитием патологических изменений, а также клиническими проявлениями этих эндокринных расстройств [4]. Сложность подобного рода исследований связана с необходимостью использования в экспериментах *in vivo* очень низких доз дизраптора, так как использование более высоких доз приводит к развитию токсических эффектов, что затрудняет выявление именно молекулярных механизмов действия ДДТ как эндокринного дизраптора.

Одним из наименее изученных аспектов проблемы является влияние низких фоновых доз ДДТ на процессы метаболизма гормонов щитовидной железы.

Целью настоящего исследования являлось выявление изменений продукции тиреоидных гормонов при длительном воздействии низких доз эндокринного дизраптора ДДТ.

МЕТОДИКА

Эксперимент выполнен на самцах крыс Вистар ($n=64$) массой тела 80-100 г. Расчёт потребляемой дозы ДДТ производили с учётом требований National Toxicology Problem (США) [5] к определению низких доз, с учётом пороговых значений низких доз для ДДТ (50 мкг/кг/сут) [6] и нормативам содержания ДДТ в продуктах питания в Российской Федерации [7]. Животные опытных групп вместо воды получали растворы *o,n*-ДДТ ("Sigma", США) с концентрацией 20 мкг/л ($n=22$) и 80 мкг/л ($n=20$) в течение 6 и 10 недель. Среднесуточное потребление ДДТ составило $1,89 \pm 0,86$ и $7,77 \pm 0,17$ мкг/кг, соответственно. Животные контрольных групп ($n=20$) получали водопроводную воду. Отсутствие в водопроводной воде и корме для лабораторных животных ДДТ, его метаболитов и родственных хлорорганических соединений было подтверждено методом газожидкостной хроматографии. Первую половину опытных и контрольных животных выводили из эксперимента через 6 нед, вторую половину через 10 нед передозировкой золетила. Эксперимент проведен в соответствии с правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных, утверждёнными приказом Минздрава СССР № 577 от 12.08.1977 г. В сыворотке крови методом твёрдофазного

иммуноферментного анализа на основе моноклональных антител с помощью коммерческих наборов ("Cusabio Biotech", Китай; "Monobind", США) определяли концентрации тиреотропного гормона (ТТГ), общего тироксина (T_4), свободного тироксина (cT_4), общего трийодтиронина (T_3), свободного трийодтиронина (cT_3), тиреопероксидазы (КФ 1.11.1.8) и тиреоглобулина. Также рассчитывали долю концентрации свободных форм T_4 и T_3 от общей концентрации T_4 и T_3 ($\%cT_4$ и $\%cT_3$) и соотношение cT_3/cT_4 .

Статистическую обработку проводили с помощью пакета прикладных программ Statistica 7.0 ("Statsoft Inc.", США). Центральные тенденции и рассеяния количественных признаков, имеющих приблизительно нормальное распределение, описывали средним значением и стандартной ошибкой среднего значения. На их основе производили пересчёт абсолютных значений в относительные, приняв значения контрольных групп за единицу. Сравнение независимых групп по количественному признаку проводили с помощью *t*-критерия Стьюдента с учётом значений критерия Левена о равенстве дисперсий, а также критерия Манна-Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,01$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Через 6 нед потребления ДДТ в дозе $1,89 \pm 0,86$ мкг/кг/сут у крыс были зарегистрированы изменения концентраций тиреоидных гормонов и ТТГ в сыворотке крови (рисунок, а). Отмечалось повышение уровня продукции T_4 фолликулярными тироцитами, о чём свидетельствовало повышение концентрации общего ($p=0,019$) и свободного T_4 ($p=0,045$) в системном кровотоке. Доля cT_4 не изменялась по сравнению со значениями контрольной группы. Повышение продукции T_4 фолликулярными тироцитами происходило на фоне повышения в сыворотке крови концентрации тиреопероксидазы – одного из ключевых ферментов, участвующих в процессах органификации йода в клетках щитовидной железы ($p=0,000002$) (рисунок, а). Статистически значимого повышения концентрации тиреоглобулина в системном кровотоке на данном сроке исследования не наблюдалось (рисунок, а). Также выявлено значительное повышение концентрации общего ($p=0,023$) и свободного T_3 ($p=0,000001$). Увеличение продукции тиреоидных гормонов закономерно приводило к уменьшению секреции ТТГ гипофизом.

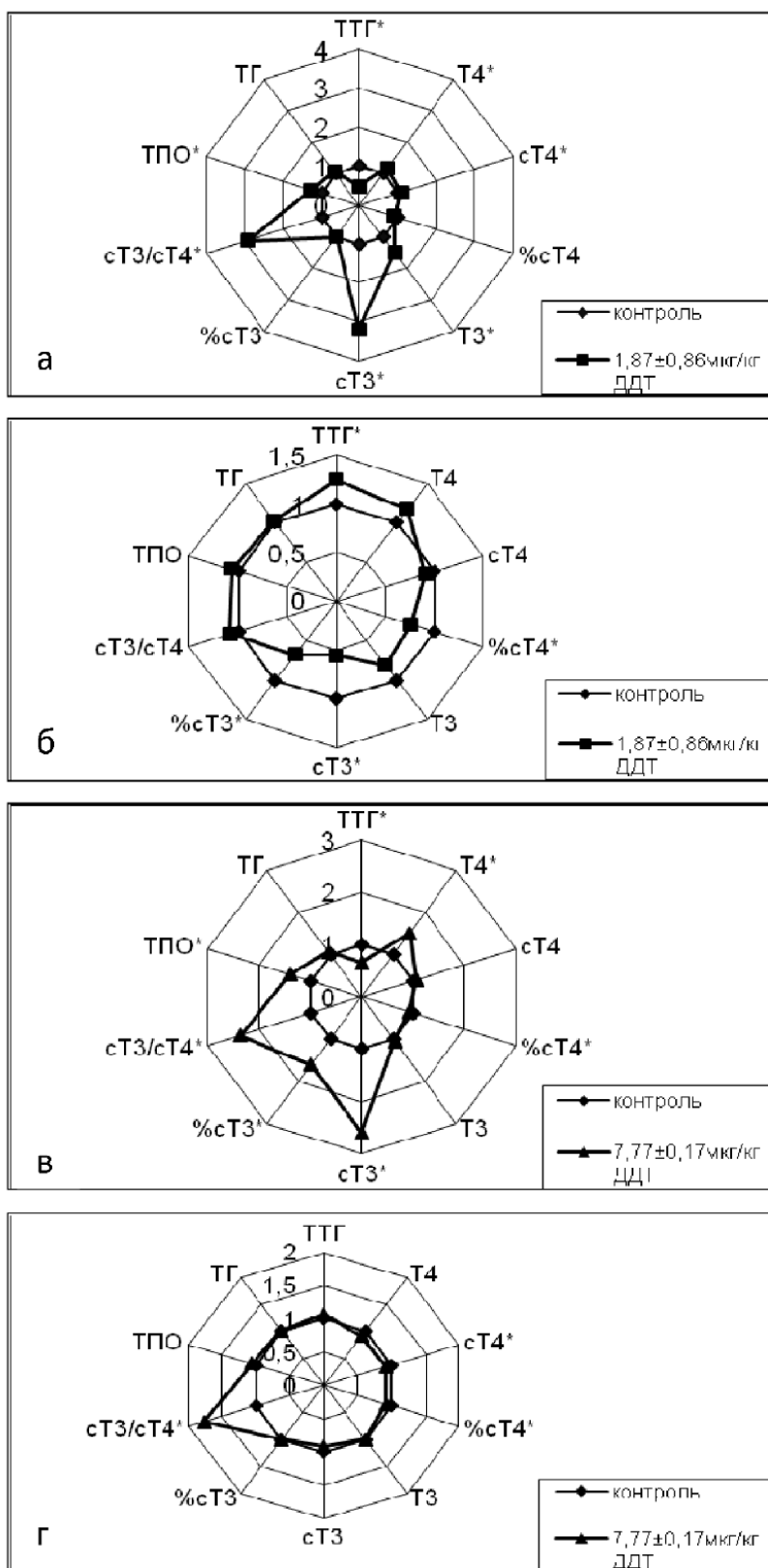


Рисунок. Изменения концентрации тиреоидных гормонов, ТТГ, тиреопероксидазы (ТПО) и тиреоглобулина (ТГ) в сыворотке крови крыс, потреблявших ДДТ в дозе $1,89 \pm 0,86$ мкг/кг/сут в течение 6-ти (а) и 10-ти недель (б) и в дозе $7,77 \pm 0,17$ мкг/кг/сут в течение 6-ти (в) и 10-ти недель (г). Значения контрольной группы приняты за единицу; * - статистически значимые отличия от значений контрольной группы.

Через 6 нед потребления ДДТ в дозе $7,77 \pm 0,17$ мкг/кг/сут было выявлено аналогичное изменение продукции T_4 фолликулярными тироцитами ($p=0,0034$) (рисунок, в). Особенностью были более низкое, не отличающееся от значений контрольной группы, содержание связанного с альбуминами и глобулинами крови T_3 , в то время как концентрация свободного T_3 превышала значения контрольной группы ($p=0,00001$), но в то же время была ниже, чем в группе сравнения ($p=0,0060$). Как и в предыдущей группе наблюдался дисбаланс в соотношении cT_3 и cT_4 в сторону превалирования cT_3 . Вторым отличием было более высокое содержание в системном кровотоке тиреопероксидазы ($p=0,020$). Концентрация тиреоглобулина, также как и в предыдущей группе, была повышена по сравнению с контрольной группой, но эти различия не достигли статистической значимости (рисунок, в).

Через 10 нед потребления ДДТ в дозе $1,89 \pm 0,86$ мкг/кг/сут в сыворотке крови крыс концентрация T_4 незначительно уменьшилась по сравнению с предыдущим сроком исследования ($p=0,10$) и статистически значимо не отличалась от значений контрольной группы для данного срока исследования ($p=0,094$) (рисунок, б). Концентрация свободного T_4 , напротив, значительно снизилась по сравнению с предыдущим сроком исследования ($p=0,023$) и практически сравнялась со значениями контрольной группы. Вследствие этого доля cT_4 статистически значимо уменьшилась как по сравнению с предыдущим сроком исследования ($p=0,0022$), так и значениями контрольной группы ($p=0,0012$). Отмечалось снижение конвертации T_4 в T_3 , что проявлялось уменьшением содержания в системном кровотоке cT_3 ($p=0,000003$) и его доли от общего количества T_3 ($p=0,00061$). По сравнению со значениями контрольной группы для данного срока исследования эти показатели также были статистически значимо ниже ($p=0,00035$ и $p=0,0067$, соответственно). Соотношение свободных фракций T_3 и T_4 нормализовалось. Концентрации тиреопероксидазы и тиреоглобулина в сыворотке крови не отличались от контрольных значений (рисунок, б). Снижение продукции тиреоидных гормонов приводило к повышению секреции ТТГ ($p=0,0018$) и его содержанию в сыворотке по сравнению со значениями контрольной группы ($p=0,021$).

Через 10 нед потребления ДДТ в дозе $7,77 \pm 0,17$ мкг/кг/сут изменения тиреоидного профиля сыворотки крови по сравнению с предыдущим сроком исследования соответствовали изменениям в опытной группе,

потреблявшей ДДТ в меньшей дозе (рисунок, г). Отмечалось снижение продукции T_4 и T_3 и его свободных фракций. Наибольшими изменениями характеризовались доли cT_4 ($p=0,0081$) и cT_3 ($p=0,041$). Снижение cT_4 и доли cT_4 были более выраженными, вследствие чего их значения стали ниже, чем в контрольной группе ($p=0,012$ и $p=0,039$, соответственно). При сравнении концентрации T_4 и cT_4 в сыворотке крови данной опытной группы с группой, потреблявшей ДДТ в меньшей дозе, выявлено более выраженное уменьшение концентрации связанного с транспортными белками T_4 и доли cT_4 с увеличением потребляемой дозы дизраптора ($p=0,036$, $p=0,0064$, соответственно). При сравнении содержания T_3 и cT_3 в системном кровотоке, напротив, статистически значимое различие наблюдалось в концентрации свободной фракции, но её значения в группе, потреблявшей ДДТ в большей дозе, были выше ($p=0,00036$). Сохранялся дисбаланс между свободными фракциями гормонов. Концентрация тиреопероксидазы уменьшилась и не отличалась ни от значений контрольной группы, ни от значений группы сравнения. Уровень тиреоглобулина в системном кровотоке не изменялся и соответствовал значениям контрольной группы (рисунок, г).

Влиянию ДДТ на гормоногенез в различных эндокринных железах посвящено немало работ [8, 9]. Однако выводы о влиянии ДДТ на продукцию тиреоидных гормонов во многом противоречивы. У лиц, подвергавшихся воздействию различных доз ДДТ, отмечалось как снижение продукции T_4 и повышение продукции T_3 , так и отсутствие каких-либо изменений тиреоидного статуса [10-13].

Проведенное исследование показало, что изменения метаболизма тиреоидных гормонов носят двухфазный характер. На первом этапе в щитовидной железе происходит усиление органификации йода, о чём свидетельствует повышение в системном кровотоке концентрации тиреопероксидазы, и усиление протеолиза тиреоглобулина, что подтверждает увеличение концентрации T_4 на фоне неизменяющейся концентрации тиреоглобулина в сыворотке крови. При воздействии более высокой дозы ДДТ отмечалось увеличение продукции тиреопероксидазы и T_4 , что закономерно приводило к меньшей конвертации T_4 в T_3 . Это позволяет сделать вывод, что воздействие низких доз ДДТ приводит к нарушению транспорта йода в фолликулярные тироциты, и, соответственно, к реактивному дозозависимому повышению секреции ТТГ, синтезу

тиреопероксидазы и T_4 , и его превращению в T_3 , находящейся в реципрокной зависимости от продукции T_4 . Такого рода изменения тиреоидного статуса типичны для ранних стадий эндемического зоба, обусловленного йододефицитом [14].

При более длительном потреблении ДДТ продукция тиреоидных гормонов снижается. На этом этапе обнаруживаются различия, связанные с изменением скорости течения двух основных процессов формирования и поддержания тиреоидного статуса – продукции T_4 фолликулярными тироцитами и его превращения в T_3 . Темпы снижения концентрации T_4 и его свободной фракции в сыворотке крови увеличиваются с увеличением потребленной дозы ДДТ, а T_3 и его свободной фракции замедляются. Это приводит к дисбалансу фракций свободных гормонов и формированию тиреоидного статуса с относительно преобладанием T_3 .

Существует мнение, что одним из механизмов уменьшения концентрации T_4 в системном кровотоке при воздействии ДДТ является вытеснение гормона из его связи с альбуминами и глобулинами крови [15-17]. Известно, что аффинность T_3 к связывающим белкам очень низка [18], поэтому соотношение свободной и связанной фракций T_4 является более достоверным показателем. В настоящем исследовании было показано, что увеличение концентрации T_4 при воздействии различных доз ДДТ сопровождалось соразмерным увеличением его свободной фракции и поддержанием доли sT_4 на уровне контрольных значений, следовательно на данном этапе мы не наблюдали снижения связывающей способности белков крови. На более позднем сроке исследования отмечалось снижение, а не повышение доли sT_4 . Но у крыс, потреблявших большую дозу ДДТ, этот показатель был статистически значимо выше. Сопоставление этих данных с результатами других исследований, проводившихся с дозами ДДТ больше в сотни и тысячи раз, позволяет предположить, что снижение связывающей способности транспортных белков крови может происходить при потреблении больших доз, оказывающих токсический эффект на гепатоциты, что, в свою очередь, приводит к снижению синтеза ими альбуминов и глобулинов. Поскольку через 10 недель потребления низких доз ДДТ основным изменением тиреоидного статуса стало снижение концентраций sT_4 , то это указывает на нарушение его продукции фолликулярными тироцитами.

ВЫВОДЫ:

1. Изменения продукции тиреоидных гормонов при воздействии низких доз ДДТ, обусловленных его персистированием в окружающей среде, носят двухфазный характер.

2. На первом этапе происходят изменения аналогичные таковым при развитии йододефицитного состояния – реактивное усиление синтеза тиреотропного гормона, тироксина и трийодтиронина, тиреопероксидазы.

3. В дальнейшем происходит истощение реактивных изменений, что приводит к снижению продукции тироксина и нарушению соотношения тироксина и трийодтиронина.

4. Дозозависимый эффект различных низких доз ДДТ проявляется в усилении синтеза ТТГ, тиреопероксидазы и тироксина на первом этапе и снижении продукции тироксина на втором этапе, что является доказательством ведущей роли нарушения продукции тироксина фолликулярными тироцитами, а не снижения дейодиназной активности трийодтиронина и транспортных белков крови в изменениях тиреоидного статуса под воздействием ДДТ.

5. Воздействие низких доз ДДТ необходимо учитывать как отягощающий фактор патогенеза эндемического зоба и других видов гипотиреоза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Thomas J., Ou L., All-Agely A. (2008) Rev. Environ. Contam. Toxicol., **194**, 55-69.
2. Яглова Н.В., Яглов В.В. (2012) Вестник РАМН, №3, 56-61.
3. Tebourbi O., Driss M., Sakle M., Rhouma K. (2006) J. Environ. Sci. Health., **41**, 167-176.
4. Diamanti-Kandarakis E., Bourguignon J.-P., Guidice L., Hauser R., Prins G., Soto A., Zoeller T., Gore A. (2009) Endocr. Rev., **30**, 293-342.
5. National Toxicology Program. (2001) National Toxicology Program's report of the endocrine disruptors low dose peer review. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences.
6. Vandenberg L., Colborn T., Hayes T., Heindel J., Jacobs D. Jr., Lee D.-H., Shioda T., Soto A., von Saal F., Welshons W., Zoeller T., Myers J. (2012) Endocr. Rev., **33**, 378-455.
7. Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов. (2008) СанПин 2.3.2.1078-01.
8. Orton F., Rosivatz E., Scholze V., Kortenkamp A. (2011) Environ. Health Perspect., **119**, 794-800.
9. Lacroix M., Hontela A. (2003) Toxicol. Appl. Pharmacol., **190**, 197-205.
10. Scollon E., Carr J., Cobb C. (2004) Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol., **137**, 179-189.

11. Schell L., Gallo M., Denham M., Ravenscroft J., De Caproi A., Carpenter D. (2008) Environ. Health Perspect., **116**, 806-813.
12. Langer P. (2010) Frontiers in Neuroendocrinology, **31**, 497-518.
13. Meeker J., Altshul L., Hauser R. (2007) Environ. Res., **104**, 296-304.
14. Дедов И.И., Герасимов Г.А., Свириденко Н.Ю. (1999) Йоддефицитные заболевания в Российской Федерации (эпидемиология, диагностика, профилактика). Методическое пособие. М. 30с.
15. Boas M., Feld-Rasmussen U., Main K. (2012) Mol. Cell. Endocrinol., **355**, 240-248.
16. Kudo Y., Tamauchi K. (2005) Toxicol. Sci., **84**, 29-37.
17. Liu C., Shi Y., Li H., Wang Y., Yang K. (2011) Horm. Metab. Res., **43**, 391-396.
18. Cody V. (1980) Endocr. Rev., **1**, 140-166.

Поступила: 25. 06. 2013.

ALTERATION OF THYROID HORMONE SECRETION AFTER LONG-TERM EXPOSURE TO LOW DOSES OF ENDOCRINE DISRUPTOR DDT

N.V. Yaglova, V.V. Yaglov

Scientific research Institute of Human Morphology,
3, Tsurupy str., Moscow, 117418 Russia; tel./fax: +7(499)120-80-65; e-mail: yaglova@mail.ru

Endocrine disruptors are exogenous substances that exhibit hormone-like action and consequently disrupt homeostatic action of endogenous hormones. DDT is the most common disruptor. The objective was to evaluate changes in thyroid hormone secretion after long-term exposure to low doses of DDT. The experiment was performed on male Wistar rats. The rats were given DDT at doses of 1.89 ± 0.86 mg/kg/day and 7.77 ± 0.17 mg/kg/day for 6 and 10 weeks. Dose dependent increase of serum total thyroxine, total triiodothyronine, and thyroid peroxidase was revealed after 6 weeks exposure. After 10 weeks free thyroxine secretion was reduced. Such alterations of the thyroid status are typical for iodine deficient goiter. The data obtained indicate that the main mechanism of DDT action includes disruption of thyroxine secretion by thyrocytes, but not inhibition of deiodinase activity and decrease of blood thyroid binding proteins.

Key words: endocrine disruptors, thyroid gland, thyroid hormones, DDT.