

Роль фундаментальних досліджень у прогресі діагностики, лікування і профілактики ендокринної патології

М.Д. Тронько,
О.І. Ковзун,
О.С. Микоша

ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка НАМН України»

Резюме. Представлено сучасні напрями та майбутні перспективи розвитку фундаментальної ендокринології. Акцент зроблено на молекулярних механізмах дії гормонів, перспективах застосування генної терапії та стовбурових клітин у лікуванні цукрового діабету 1 типу, розглянуто проблеми онкоендокринології.

Ключові слова: трансдукція сигналів, цукровий діабет, генна терапія, стовбурові клітини, рак щитоподібної залози.

Метою VIII з'їзду Асоціації ендокринологів України є підведення підсумків роботи практиків та дослідників, а також аналіз перспектив розвитку ендокринології в Україні. Хотілося б підкреслити, що в усьому світі розробка нових підходів у медицині ґрунтується на результатах фундаментальних досліджень. Особливістю ендокринології як науки в наш час є її взаємозв'язок із багатьма дисциплінами: біохімією, імунологією, генетикою, молекулярною біологією, що дозволяє докорінно змінити існуючі уявлення про регуляцію функцій залоз та участь гормонів в інтеграції обміну речовин. Встановлено, що механізм дії гормонів різної хімічної будови має

ряд спільних універсальних рис, багато процесів реалізації їх внутрішньоклітинних ефектів співпадають. Вивченню механізму дії гормонів на клітини-мішені присвячувалася значна частка зусиль фахівців в області експериментальної ендокринології. У минулі два-три десятиліття події саме в цій області призвели до розуміння в медико-біологічному співтоваристві, що ендокринологія – це не тільки і не стільки розділ клінічної або експериментальної медицини, але й загально-біологічна теоретична дисципліна. Сьогодні молекулярно-клітинні розділи ендокринології, імунології, онкології і нейробіології важко відокремити. Ще більшу спільність процесів, що вивчаються цими розділами науки, виявив бурхливий прогрес у розумінні внутрішньоклітинних механізмів дії гормонів і біорегуляторів. Спільність ця базується на тому, що процес перене-

* адреса для листування (Correspondence): ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка НАМН України»; вул. Вишгородська, 69, м. Київ, 04114, Україна. e-mail: iem_admi@bigmir.net

сення регуляторної інформації з рецепторів на внутрішньоклітинні події не залежить від того, чи йде мова про рецептор будь-якого гормону або іншого біорегулятора. Всі вони використовують спільні сигнальні шляхи. Будь-який із цих регуляторів запускає один або декілька з безлічі неймовірно складних внутрішньоклітинних механізмів обробки і перенесення регуляторної інформації. У даний час класифікації потребують вже не тільки регулятори, але ще в більшому ступені – шляхи і механізми опосередкування сигналів, які вони запускають у клітині.

Таким чином, внутрішньоклітинна інтерпретація дії гормонів є специфічною просторово-часовою конфігурацією включення і виключення, взаємодії-дисоціації, синтезу-розпаду, фосфорилування-дефосфорилування компонентів даної мережі. Робота таких мереж є складним процесом не тільки з огляду на хімічні і фізико-хімічні процеси, що протікають при цьому, але і з огляду на інформаційні потоки, що проходять, дещо схожі з комп'ютерними мережами. Це дійсно передній край всієї науки про життя, швидше за все, навіть не сьогоднішній, а завтрашній день.

Основними напрямками сучасної фундаментальної ендокринології є:

- Молекулярні механізми дії гормонів; системи внутрішньоклітинної сигналізації.
- Патогенетичні аспекти генезу цукрового діабету та інших ендокринних захворювань.
- Інноваційні технології в лікуванні цукрового діабету.
- Онкоендокринологія: пошук ефективних онкомаркерів, таргетна терапія шляхом блокування ланок сигнальних шляхів проліферативного спрямування.

Розглянемо коротко основні типи рецепторних систем і використовуваних ними сигнальних механізмів. Представники сімейства рецепторів, асоційованих із G-білками мають сім трансмембранних елементів і використовують однаковий тип адапторного механізму, що зв'язує рецептор з ефекторними системами усередині клітини, що складаються з трьох субодиниць – α , β і γ . Складність внутрішньоклітинних подій, які можуть відбуватися в клітині в результаті активації одного лише цього сімейства рецепторів, можна уявити, пригадавши, що зараз відомо декілька сотень типів, підтипів і ізоформ рецепторів, що мають сім трансмембранних ділянок. Гетеротримери G-білків, у свою чергу, можуть бути сформовані з двох десятків відомих ізоформ α -субодиниць, 5 ізоформ – β - і 10 ізоформ – γ -субодиниць. Аналогічна картина виявляється також при аналізі

компонентів будь-якого подальшого ефекторного механізму, скажімо, сАМР-залежного сигнального каскаду – перелік ізоформ для аденілатциклази, протеїнкінази А також поступово поповнюються. сАМР-залежна сигнальна система – не єдина ефекторна система, на яку передають сигнал G-білки з активованого рецептора. Не менш важливою є здатність G-білків активувати протеїнкінази типу С.

Очевидно й те, якими можуть бути для клітини наслідки втрати контролю над сигнальним механізмом такої потужності. Багато рецепторів, що асоціюються з G-білками, здатні також активувати ефекторний механізм, який бере участь у стимулюванні клітинної проліферації.

Наступна дуже велика група мембранних рецепторів, що використовують інший, загальний для всієї групи, принцип перенесення сигналу – тирозинкіназні рецептори. Із цими рецепторами пов'язаний ряд кардинальних відкриттів: 1) нового класу протеїнкіназ, здатних фосфорилувати білки за гідроксильними групами тирозину, а не тільки серину або треоніну, як вважали до цього, 2) нових механізмів активації рецепторів: а) автофосфорилування за залишками тирозину у відповідь на зв'язування рецептором його агоніста і б) димеризації молекули рецептора як необхідного етапу її активації. Відкриття цих механізмів поклало початок новій ері у вивченні молекулярних засад клітинної регуляції, особливо – молекулярних механізмів онкологічної трансформації клітин, оскільки стало очевидно, що багато онкогенів кодують саме тирозинкінази.

Важливим показником практичного значення цього напрямку є дизайн фармакологічних засобів, здатних активно пригнічувати в змінених клітинах сигнальні мережі шляхом блокування передачі сигналу в окремих її ланках, зокрема інгібіторів тирозинкіназ і протеїнкінази С. Терапевтичний вплив таких агентів дозволяє регулювати фізіологію клітини в обхід генетичних змін, які призвели до розвитку тих чи інших патологічних станів.

За останні роки розшифровано механізм дії інсуліну, встановлено, що його дія характеризується певними універсальними механізмами із залученням внутрішньоклітинних сигнальних систем сАМР-залежної протеїнкінази А, протеїнкінази С, мітоген-активованих протеїнкіназ. Одним із найважливіших ефектів інсуліну в організмі є швидке 20-50 разове збільшення транспорту глюкози через мембрани м'язових та жирових клітин шляхом дифузії за градієнтом концентрації за допомогою мембранних білкових

транспортів GLUT-4. Саме транспортери глюкози стали мішенню для створення принципово нового класу цукрознижувальних препаратів. Нирки здатні здійснювати реабсорбцію глюкози за дії натрійзалежних котранспортерів глюкози (НЗКГ) та транспортів глюкози GLUT-2. Застосування інгібіторів НЗКГ типу 2 – глифлозинів – дозволяє пригнічувати реабсорбцію в проксимальних ниркових каналцях, що призводить до зниження рівня глюкози в крові.

Величезне значення в ендокринології, зокрема в діабетології, мають дослідження стовбурових клітин. Стовбурові клітини – це недиференційовані клітини, здатні до самовідновлення протягом тривалого часу шляхом поділу, які за певних фізіологічних або експериментальних умов можуть диференціюватися в клітини зі спеціальними функціями.

Ідентифіковано головні фактори транскрипції, що визначають ембріональний розвиток острівців. Це може дозволити маніпулювати диференціюванням ембріональних стовбурових клітин з утворенням інсулінопродукуючих клітин. Головну роль у розвитку підшлункової залози та експресії генів у зрілих β -клітинах відіграє рівень експресії транскрипційного фактора Pdx 1 – панкреатичний дуоденальний хомеобокс 1. У 2012 р. Нобелівську премію з фізіології та медицини отримали Джон Гардон (*John B. Gurdon*) та Шинья Яманака (*Shinya Yamanaka*) за встановлення факту, що зрілі клітини можуть бути перепрограмовані в плюрипотентні клітини завдяки використанню невеликої кількості транскрипційних факторів. Отримані в такий спосіб клітини є індукованими плюрипотентними стовбуровими клітинами, що відкриває великі перспективи для використання таких клітин для лікування цукрового діабету 1 типу.

Основною проблемою при спробі використати клітини-попередники в замісній терапії β -клітинами є регуляція секреторної активності пересаджених клітин. Диференціювання клітин-попередників у клітини, що продукують інсулін, повинне супроводжуватися індукцією секреторного шляху, забезпечуючи тим самим накопичення інсуліну та його швидке виділення у відповідь на ряд фізіологічних сигналів. Для досягнення цього в клітинах необхідно активізувати складну систему месенджерних шляхів (із залученням аденілатциклази та протеїнкінази А, діацилглицеролу і протеїнкінази С, Са-кальмодулінового сигнального шляху) та експресії генів, яка дуже нагадує таку саму в нормальних β -клітинах. Нарешті, стовбуровим клітинам потрібно уникнути

деструкції імунною системою реципієнта.

За допомогою методів молекулярної біології робляться спроби лікування експериментального діабету 1 типу із застосуванням генної терапії. Клітини печінки, а можливо й інших органів, після введення в них гена проінсуліну набувають здатність синтезувати цей гормон. Разом з Інститутом молекулярної біології і генетики НАН України розпочато експерименти по застосуванню генної терапії стрептозотоциніндукованого діабету в експериментальних тварин. Радикальне лікування ЦД можна здійснити за допомогою генної терапії, яка здатна забезпечити синтез інсуліну в неспецифічних здорових клітинах.

В експерименті показано, що за умов введення діабетичним щурам та мишам гена проінсуліну в піддослідних тварин також встановлено істотне зниження рівня глюкози в крові. Отже, одержано результати про регресію діабету після одноразової генної терапії на моделі експериментального діабету 1 типу в мишей та щурів.

Поки що в дослідженнях генної терапії діабету не вирішеним залишається питання про регуляцію синтезу інсуліну. Синтез гормону в β -клітинах здорового організму регулюється відповідно до рівня глюкози в крові. Ця регуляція здійснюється складною системою переносу сигналів, що активують або гальмують синтез білка. Аналіз цих сигналів, пошук шляхів перенесення інформації в клітині є одним із найважливіших напрямів фундаментальних досліджень в ендокринології.

Проте вивчення властивостей стовбурових клітин та застосування генної терапії, як і багато інших напрямів сучасного наукового пошуку, ставлять нові запитання частіше, ніж дають відповіді на вже поставлені питання. Незважаючи на пріоритетність напряму цих досліджень потрібно зазначити, що широке застосування таких інноваційних підходів у лікуванні діабету та інших ендокринних захворювань – це перспектива майбутнього.

Одним із найбільш важливих завдань, що стоять перед клінічною ендокринологією, є пошук та впровадження в практику нових, високоефективних сполук для лікування пухлин ендокринних залоз. Тривають інтенсивні наукові розробки, що мають на меті підвищити ефективність препаратів для лікування різних видів раку, зменшити клінічно значущу концентрацію, знизити токсичність, поліпшити спосіб доставки в організм та віднайти найефективніші комбінації з іншими канцеростатичними засобами. Щодо розробки нових підходів до лікування анапластичного раку щитоподібної залози (ЩЗ),

перспективними є дослідження із застосуванням таксанів, інгібіторів клітинного циклу, ядерних факторів транскрипції, зокрема фактора NFκB. Показано, що клітини анапластичного раку ЩЗ є чутливими до таксанів, крім того, таксани впливають тільки на пухлинні клітини, не ушкоджуючи нормальні. Подібні ефекти таксанів спостерігаються і в пухлинах надниркових залоз.

Після аварії на ЧАЕС постало питання з'ясування молекулярно-біологічних особливостей радіогенного раку ЩЗ, захворюваність на який різко зросла в Україні.

Виникнення папілярної карциноми щитоподібної залози пов'язують насамперед із хромосомною перебудовою гена рецепторної тирозинкінази *RET*, наслідком перебудови є утворення хімерних форм рецептора з конститутивно-активною тирозинкіназою. Таких перебудов зараз налічують більше 10, але найпоширенішими з них є *RET/PTC1* та *RET/PTC3* транслокації.

Найважливішим відкриттям останніх років стало виявлення онкогенної мутації протеїнкінази Raf – B-Raf. Існують 3 ізоформи серин-треонінової протеїнкінази Raf – A-Raf, B-Raf і C-Raf. B-Raf домінує у фолікулярних клітинах ЩЖ і є найактивнішою серед інших ізоформ. Ця мутація трапляється приблизно в 36-70% випадків папілярної карциноми ЩЖ, переважно у відносно агресивних її підтипах. Мутація є результатом заміни тиміну на аденін у позиції нуклеотиду 1799 гена *B-RAF*.

За участі фахівців Інституту ендокринології та іноземних спеціалістів виявлена експресія різних онкогенів (*RET*, *MET*) у пухлинах ЩЗ, що вказує на їх причетність до розвитку високоінвазійних тиреоїдних папілярних карцином у дітей. Було з'ясовано, що наявність *RET/PTC* транслокацій і *BRAF* мутацій пов'язана з віком пацієнтів та структурними особливостями папілярної карциноми. За короткого латентного періоду папілярним карциномам були більш притаманні *RET/PTC3* транслокації і відсутні *BRAF* мутації. Із збільшенням латентного періоду і віку оперованих пацієнтів відбулися зміни. Переважали пухлини папілярного варіанту, відсоток випадків із *RET/PTC3* транслокаціями знизився, підвищився відсоток випадків із *RET/PTC1* транслокаціями. Якщо взяти до уваги, що вік пацієнтів, що були дітьми і підлітками на час Чорнобильської катастрофи, на сьогодні складає 28-46 років, то в подальшому слід очікувати на суттєве збільшення випадків папілярної карциноми з наявністю *BRAF* мутацій. Спільно з провідними фахівцями США в галузі молекулярної генетики у 2014 р.

розпочато широкомасштабні епідеміологічно-генетичні повногеномні дослідження радіогенних папілярних тиреоїдних карцином, видалених у пацієнтів, постраждалих внаслідок аварії на ЧАЕС, порівняно зі спорадичними раками, що виникли в осіб, народжених після аварії.

Аналіз розвитку фундаментальних напрямків ендокринології показує швидке зростання дослідження естрогенів. Це пояснюється залученням цих сполук до регуляції величезної кількості життєво важливих процесів.

В останні 10 років увагу багатьох дослідників і клініцистів привернули естрогенні гормони. Ці гормони відіграють важливу роль у регуляції фізіологічних процесів, старіння, а також патологічних процесів. Особливо слід підкреслити, що вивчення механізму дії естрогенів, яке реалізується не тільки в органах репродуктивної системи, але й у всіх тканинах організму, показує величезне значення інтегративної ролі гормонів. В останні роки з'ясувалась важлива роль естрогенів у фізіології і патофізіології серцево-судинної системи і мозку.

Обговорення фундаментальних аспектів цієї проблеми стало змістом спеціального випуску журналу *Molecular and Cellular Endocrinology* в травні 2014 р. Дослідженнями клініцистів показано фундаментальну роль естрогенів у діяльності репродуктивної, серцево-судинної, кісткової, нервової систем, а також у розвитку патології цих систем, зокрема, онкопатології.

Зусиллями біохіміків та молекулярних біологів розшифровані основні механізми дії цих гормонів. Показано, що є 2 основних шляхи реалізації їх дії: геномний та негеномний.

Важливу роль естрогени відіграють у регуляції адренкортикальної функції. Естрадіол в умовах *in vitro* та *in vivo* спричиняє істотне дозозалежне збільшення продукції кортикостероїдів корою надниркових залоз. Внаслідок дії гормону *in vitro* спостерігається збільшення рівня cAMP в адренкортикальній тканині, значно зростає активність протеїнкіназ A і C у мікросомальній фракції адренкортикальних клітин. Істотний ефект естрадіолу *in vivo* проявляється в зміні рівня протеїнкіназ, що активуються мітогенами, зокрема ERK1/2. Привертає увагу участь фактора транскрипції AP-1, що утворюється як гомо- або гетеродимер двох транскрипційних факторів – *c-jun* та *c-fos*, у перенесенні сигналу естрадіолу.

Одним із можливих пояснень збільшення синтезу сумарних гідроксикортикостероїдів клітинами надниркових залоз під впливом естрадіолу в дослідах *in vitro* та *in vivo* може бути зміна

рівня цитохрому P450, який забезпечує реакції гідроксилювання стероїдів. Методом зворотної транскрипції – полімеразної ланцюгової реакції встановлено, що експресія мРНК P450_{sc} та StAR під впливом естрадіолу зростає майже вдвічі. Виходячи з отриманих даних, виявлені прямі стимулювальні ефекти естрадіолу на стероїдогенез у корі надниркових залоз можуть пояснюватись залученням цитохрому P450_{sc} та StAR до реалізації дії естрогенів в адренкортикоцитах.

За оцінкою апоптичних змін у корі надниркових залоз людини, внесення естрадіолу до середовища інкубації викликає зниження експресії проапоптичного фактора Вах і зменшення інтенсивності фрагментації ДНК в адренкортикоцитах. Отже, отримані результати свідчать про помітну антиапоптичну дію естрадіолу в адренкортикоцитах.

XXI сторіччя називають сторіччям інтеграції наук. Дійсно, поглиблення науки в таємниці природи призвело до формування певної перебудови поглядів, спрямованих на інтеграцію наукового знання, подальший розвиток фундаментальної науки, що є підґрунтям застосування нових підходів у клінічній ендокринології для діагностики, лікування і профілактики найпоширеніших ендокринних захворювань.

Список використаної літератури

1. Тронько М.Д., Микоша О.С., Ковзун О.І., Пушкарьов В.М. Регулятори функції кори надниркових залоз / Київ: Доктор-Медіа, 2009. 244 с. (Tronko M.D., Mikosha O.S., Kovzun O.I., Pushkarev V.M. Regulators of adrenocortical function / Kiev: Doctor-Media, 2009. 244 p.)
2. Тронько Н.Д., Соколова Л.К., Ковзун Е.І., Пастер І.П. Інсулінотерапія: вчора, сьогодні, завтра / Київ: Медкнига, 2014. 192 с. (Tronko N.D., Sokolova L.K., Kovzun E.I., Pasteur I.P. Insulinotherapy: yesterday, today, tomorrow / Kiev: Medkniga, 2014. 192 p.)
3. Tronko M., Bogdanova T., Saenko V., Thomas G.A., Likhtarov I., Yamashita S. Thyroid cancer in Ukraine after Chernobyl. Dosimetry, epidemiology, pathology, molecular biology / Nagasaki, Japan: E IN-TEX, 2014. 175 p.
4. Hall R.D., Kudchadkar R.R. BRAF mutations: signaling, epidemiology, and clinical experience in multiple malignancies // *Cancer Control*. 2014, 21, 221-230.
5. Plaza-Menacho I., Mologni L., McDonald N.Q. Mechanisms of RET signaling in cancer: current and future implications for targeted therapy // *Cell Signal*. 2014, 26, N8, 1743-1752.
6. Orlando G., Gianello P., Salvatori M., Stratta R.J., Soker S., Ricordi C., Dominguez-Bendala J. Cell replacement strategies aimed at reconstitution of the β -cell compartment in type 1 diabetes // *Diabetes*. 2014, 63, N5, 1433-1444.

(Надійшла до редакції 02.03.2015)

Роль фундаментальных исследований в прогрессе диагностики, лечения и профилактики эндокринной патологии

Н.Д. Тронько, Е.И. Ковзун, А.С. Микоша

ГУ «Институт эндокринологии и обмена веществ им. В.П. Комиссаренко НАМН Украины»

Резюме. Представлены современные направления и перспективы развития фундаментальной эндокринологии. Акцент сделан на молекулярных механизмах действия гормонов, перспективах применения генной терапии и стволовых клеток в лечении сахарного диабета 1 типа, рассмотрены проблемы онкоэндокринологии.

Ключевые слова: трансдукция сигналов, сахарный диабет, генная терапия, стволовые клетки, рак щитовидной железы.

Role of basic research in the progress of diagnosis, treatment, and prevention of endocrine pathology

M.D. Tronko, O.I. Kovzun, A.S. Mikosha

State Institution «V.P. Komisarenko Institute of Endocrinology and Metabolism, Natl Acad. Med. Sci. of Ukraine»

Summary. The authors present the modern trends and prospects of development of basic endocrinology, with emphasis on the molecular mechanisms of hormone action, the prospects of gene therapy and stem cell use in the treatment of type 1 diabetes mellitus, the problems of oncoendocrinology.

Keywords: signal transduction, diabetes mellitus, gene therapy, stem cells, thyroid cancer.