

причин [4]. J. Moserova, E. Houpkova [18] в своей монографии указывают, что морфологически кожа человека наиболее соответствует кожа свиньи. Однако выбор экспериментальной модели нередко ограничен финансовыми возможностями исследователя. Несмотря на перечисленные различия, заживление ран животных служит основной моделью при воспроизведении раневого процесса человека. Как утверждают I. Cohen, B. Mast, видовое различие раневого процесса у млекопитающих почти не влияет на результаты исследований [4].

Видовая специфичность ГР, по данным литературы, имеет немаловажное значение для биологической активности препарата. К концу 1960 г. антигенность ГР по отношению к другим видам животных стала очевидной [1]. Крысы долгое время реагируют на ежедневные инъекции ГР всех млекопитающих, за исключением приматов, действие которых продолжается лишь около 10 дней. Филогенетически низшие виды животных реагируют на ГР высших видов, но обратного действия не наблюдается. Для моделирования процесса заживления ожоговой раны выбор в качестве экспериментальных животных крыс мы считаем обоснованным и правомерным. Не экстраполируя абсолютные значения полученных результатов на сроки заживления ожога у человека, мы оптимистично оцениваем возможность применения биосомы в клинике при лечении тяжелообожженных детей.

Выводы

1. Выбранная нами модель ожога — нагретая до 240°C медная контактная пластина размером 2,2 × 2,2 см и прижатая с силой 1,56 н в течение 14 (10 ± 4) с — вызывает глубокий ожог кожи крыс.

2. Инъекции рекомбинантного ГР человека биосомы в дозе 2,0 мг/кг в сутки сокращают время заживления глубокого ожога кожи крыс на 27%.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лашас Л., Лашене Д. // Соматотропин человека. — Вильнюс, 1987. — С. 24—27.
2. Brans T. A., Dutrieux R. P. et al. // Burns. — 1994. — Vol. 20. — P. 48—51.
3. Ciccoira M., Kalra P. R., Anker S. D. // J. Card. Fail. — 2003. — Vol. 9. — P. 219—226.
4. Cohen I. K., Mast B. A. // J. Trauma. — 1990. — Vol. 30. — P. 149—155.
5. Crowe M. J., McNeill R. B., Schlemm D. J. et al. // J. Burn Care Rehabil. — 1999. — Vol. 20. — P. 155—162.
6. Davies J. W. L. // Physiological response to burning injury. — London, 1982.
7. Dreifuss P. // Am. J. Cardiol. — 2003. — Vol. 92. — P. 245—246.
8. Gilpin D. A., Barrow R. E., Rutan R. L. et al. // Ann. Surg. — 1994. — Vol. 220. — P. 19—24.
9. Henriques F. C., Moritz A. R. // Am. J. Pathol. — 1947. — Vol. 23. — P. 531.
10. Herndon D. N., Barrow R. E., Kunkel K. R. et al. // Ann. Surg. — 1990. — Vol. 212. — P. 424—431.
11. Herndon D. N., Piere E. P., Stokes K. N. et al. // Horm. Res. — 1996. — P. 29—31.
12. Hintz R. L., Rosenfeld R. G., Wilson D. M. et al. // Lancet. — 1982. — Vol. 82. — P. 1276—1279.
13. Jørgensen P. H., Andreassen T. T. // Endocrinology. — 1987. — Vol. 121. — P. 1634—1641.
14. Jørgensen P. H., Andreassen T. T. // Acta Chir. Belg. — 1988. — Vol. 154. — P. 623—626.
15. Kaufman T., Lusthaus S. N., Sacher U. et al. // Burns. — 1990. — Vol. 16. — P. 13—16.
16. Lal S. O., Wolf S. E., Herndon D. N. // Growth Horm. IGF Res. — 2000. — Vol. 10. — Suppl. B. — P. 39—43.
17. Lasiene D., Lasas L. Human Growth Hormone, Its Deficit and Treatment (Monograph in Lithuanian). — Kaunas, 2003.
18. Moserova J., Houpkova E. The Healing and Treatment of Skin Defects. — Basel, 1989.
19. Nagaya N., Kangawa K. et al. // Regulat. Pept. — 2003. — Vol. 15. — P. 71—77.
20. Raine T. J., Heggers J. P., Robson M. C. et al. // J. Trauma. — 1981. — Vol. 21. — P. 394—397.
21. Rasmussen L. H. // Dan. Med. Bull. — 1995. — Vol. 42. — P. 358—370.
22. Waage H. // Lancet. — 1987. — Vol. 2. — P. 1485.
23. Walker H. L., Mason A. D. Jr. // J. Trauma. — 1968. — Vol. 8. — P. 1049—1051.
24. Wilmore D. W. // Wld J. Surg. — 1999. — Vol. 23. — P. 545—552.
25. Wolf S. E., Barrow R. E., Herndon D. N. // Baillieres Clin. Endocrinol. Metab. — 1996. — Vol. 10. — P. 447—463.

Поступила 12.02.04

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2005

УДК 615.357:577.175.444].015.44

А. А. Абдувалиев, М. С. Гильдиева, Т. С. Саатов

БИОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ТИРОКСИНА В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ КАНЦЕРОГЕНЕЗЕ

Институт биохимии АН Республики Узбекистан, Ташкент

Целью настоящего исследования было изучение влияния *in vitro* и *in vivo* тироксина (T_4) в концентрациях 10^{-4} , 10^{-6} и 10^{-8} М на пролиферирующую способность и апоптоз опухолевых клеток различного патогенеза. При проведении исследований использовали одноклеточную взвесь клеток, полученную из операционного материала от 2 больных, оперированных по поводу узловых образований щитовидной железы (1) и опухоли молочной железы при гинекомастии (1), а также определяли противоопухолевую и антипролиферирующую активность T_4 *in vivo* на штамме меланомы В-16, перевитом на мышцах линии C57BL.

В опытах *in vitro* наибольшее цитотоксическое действие на клетки доброкачественной опухоли щитовидной железы T_4 оказывал в дозе 10^{-8} М ($70 \pm 4,58\%$; $p < 0,05$). В этой же дозе T_4 индуцировал наибольшую апоптозную гибель клеток ($9,0 \pm 0,90\%$; $p < 0,05$) по сравнению с контролем ($1,0 \pm 0,30\%$). Воздействие T_4 *in vitro* в дозах 10^{-4} , 10^{-6} и 10^{-8} М на клетки молочной железы с гинекомастией привело к уменьшению количества онкогенного белка HER2/neu в среднем на $27,25 \pm 1,14\%$ ($p < 0,001$). В опытах *in vivo* на модели опухолевого штамма меланомы В-16 T_4 в концентрациях 10^{-4} , 10^{-6} и 10^{-8} М показал высокую противоопухолевую активность ($59,00 \pm 5,54\%$; $p < 0,001$ торможения роста опухоли по массе и $74,12 \pm 0,26\%$; $p < 0,001$ по объему). Наибольшую антипролиферативную активность T_4 показал в дозе 10^{-8} М (МИ $1,3 \pm 0,16\%$; $p < 0,001$; АИ $10,65 \pm 1,39\%$; $p < 0,001$) по сравнению с контрольной группой (МИ $4,96 \pm 0,43\%$; АИ $4,43 \pm 0,40\%$).

Ключевые слова: тироксин, узловые образования щитовидной железы, опухоль молочной железы, меланома В-16, пролиферация, апоптоз

The study was undertaken to examine the *in vitro* and *in vivo* effects of thyroxine (T_4) at the concentrations of 10^{-4} M, 10^{-6} M, 10^{-8} M on the proliferative capacity and apoptosis of tumor cells of various pathogenesis. During the investigations, the authors used the unicellular suspension prepared from the surgical material obtained from 2 patients operated on for thyroid nodules ($n = 1$) and breast tumors in gynecomastia ($n = 1$) and evaluated the *in vivo* antitumor and antiproliferative activities of T_4 , by using the melanoma B-16 inoculated in C57B1 mice. In the *in vitro* experiments, T_4 given in a dose of 10^{-8} M produced the highest cytotoxic activity against benign thyroid tumor cells ($70 \pm 4.58\%$; $p < 0.05$). When used in this dose, T_4 induced the greatest apoptotic death of the cells ($9.0 \pm 0.90\%$; $p < 0.05$) as compared with the controls ($1.0 \pm 0.30\%$). The *in vitro* effect of T_4 in doses of 10^{-4} M, 10^{-6} M, 10^{-8} M on breast tumor cells in the presence of gynecomastia led to a decrease in levels of the oncogenic protein HER2/neu by an average of $27.25 \pm 1.14\%$ ($p < 0.001$). In the *in vivo* experiments on a model of the tumor strain of melanoma B-16, T_4 at the concentrations of 10^{-4} M, 10^{-6} M, 10^{-8} M showed a high antitumor activity ($59.00 \pm 5.54\%$; $p < 0.001$ of tumor growth suppression by mass and $74.12 \pm 0.26\%$; $p < 0.001$ by volume). When given in a dose of 10^{-8} M, T_4 displayed the highest antiproliferative activity (MI, $1.3 \pm 0.16\%$, $p < 0.001$; AI, $10.65 \pm 1.39\%$, $p < 0.001$) as compared with the control group (MI, $4.96 \pm 0.43\%$; AI, $4.43 \pm 0.40\%$).

Key words: thyroxine, thyroid nodule, breast tumor, melanoma B-16, proliferation, apoptosis

Тироксин (T_4) применяют в онкологической фармакотерапии уже несколько десятков лет. Создаваемая высокая концентрация T_4 в организме позволяет снизить экспрессию этого гормона щитовидной железы при злокачественных и доброкачественных новообразованиях. Однако в последние годы проводятся исследования, результаты которых позволяют утверждать, что влияние T_4 или препаратов на его основе на различные метаболические процессы, протекающие в органах и тканях организма, может приводить к индуцированию апоптоза и снижению пролиферативной активности клеток различной этиологии. Это касается как нетрансформированных клеток, таких как клетки молочной железы [10], β -клетки поджелудочной железы [4], так и злокачественно пролиферирующих клеток, в частности рака молочной железы [2] и кожных лимфом [7].

Цель настоящего исследования — изучение влияния T_4 на пролиферирующую способность и апоптоз опухолевых клеток различного патогенеза в опытах *in vitro* и *in vivo*.

Материалы и методы

При проведении исследований использовали операционный материал от 2 больных, оперированных по поводу узловых образований щитовидной железы (1) и опухоли молочной железы при гинекомастии (1).

Полученные образцы опухолей обрабатывали 0,25% раствором трипсина. Воздействие T_4 производства "Берлин-Хеми" (Германия) проводили на одноклеточную взвесь клеток опухоли щитовидной железы *in vitro*, содержащую $16 \cdot 10^6$ клеток в среде 199 на каждую дозу препарата, время инкубации 24 ч при 37°C в присутствии 5% CO_2 . Контролем служил опыт без воздействия T_4 . Для количественного учета цитопатического действия T_4 клетки окрашивали 0,1% трипановым синим и при увеличении в 80 раз подсчитывали количество окрашенных (погибших) клеток. Значение цитотоксического действия (ЦТД) определяли по формуле

$$ЦТД(\%) = (A/B) \cdot 100,$$

где A — количество погибших клеток; B — общее количество исследованных клеток.

В экспериментах *in vivo* использовали мышей линии C57B1 массой 20–22 г, содержащихся в пластмассовых клетках (по 6 в каждой) при стандартизованных условиях относительной влажности

(50–60%), температуры (22°C) и светового режима (по 12 ч темноты и света). Мыши получали стандартный коммерческий корм и питьевую воду *ad libitum*.

Мышам подкожно перевивали штамм меланомы B-16. Через 48 ч после имплантации мышей распределяли на группы по 6 животных и вводили им либо разные концентрации T_4 10^{-4} , 10^{-6} и 10^{-8} М/0,3 мл в физиологическом растворе, либо физиологический раствор внутривенно ежедневно в течение 10 сут.

Для определения противоопухолевой активности T_4 на 21-й день после имплантации опухоли животных декапитировали под эфирным наркозом и выделяли образцы опухоли, которые фиксировали в 10% нейтральном формалине. Срезы толщиной 4–5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином.

Апоптотные клетки идентифицировали по морфологическим признакам [3] и вычисляли апоптотный индекс (АИ) по формуле

$$АИ(\%) = (a/b) \cdot 100,$$

где a — количество апоптотных клеток; b — общее количество исследованных клеток. Митотический индекс (МИ) определяли по формуле

$$МИ(\%) = (c/d) \cdot 100,$$

где c — митотически делящиеся клетки; d — 1000 интерфазных клеток.

Средний объем опухоли (в см³) находили по формуле

$$V_{cp} = (\pi/6) \cdot ABC,$$

где A , B , C — длина, ширина и высота опухоли. Процент торможения роста опухоли определяли в конце опыта по формуле

$$T\% = \{(B_k - B_0)/B_k\} \cdot 100,$$

где B_k — средняя масса опухоли у животных контрольной группы, B_0 — средняя масса опухоли у животных опытной группы.

Определение рецепторов HER2/neu проводили с помощью коммерческого набора HercepTest фирмы "Dako" (Дания). Расчет H-баллов проводили по формуле

$H = (3 \cdot \% \text{ сильноокрашенных клеток}) + (2 \cdot \% \text{ умеренно окрашенных клеток}) + (1 \cdot \% \text{ слабоокрашенных клеток})$.

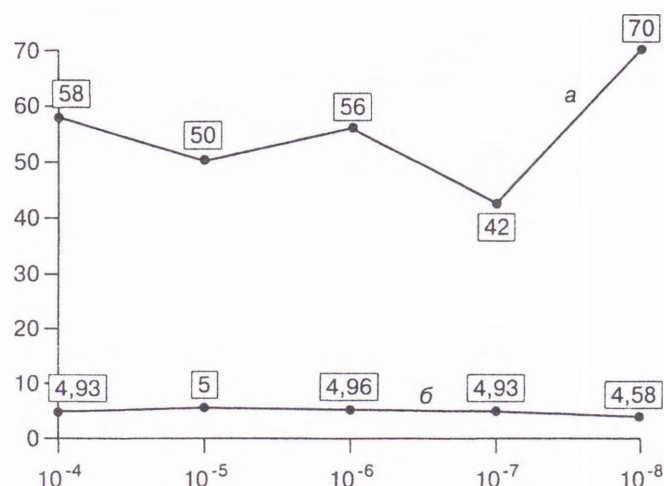


Рис. 1. Действие T_4 на клетки доброкачественной опухоли щитовидной железы в эксперименте *in vitro*. Здесь и на рис. 2 время инкубации 24 ч. Здесь и на рис. 3 для всех значений опытных групп $p < 0,05$.

а — действие T_4 ; б — ошибка ($m \pm$); по оси ординат — количество погибших клеток (в %); по осям абсцисс здесь и на рис. 2, 3 — доза воздействия T_4 (в молях).

Результаты и их обсуждение

В опытах *in vitro* влияние T_4 на клетки доброкачественной опухоли щитовидной железы в течение 24-часовой инкубации было дозозависимым и давало цитотоксический эффект (рис. 1). Наибольшую цитотоксическую активность T_4 проявлял в дозе 10^{-8} М. Индуцирование T_4 гибели клеток в остальных разведениях достоверно не различалось и варьировало в пределах 40–50%. Количество апоптотических клеток в опыте с применением T_4 в дозе 10^{-8} М также было самым большим ($9,0 \pm 0,90\%$; $p < 0,05$) по сравнению с остальными концентрациями ($3,2 \pm 0,55\%$, $p < 0,05$; $2,5 \pm 0,49\%$, $p < 0,05$; $4,5 \pm 0,65\%$, $p < 0,05$; $5,0 \pm 0,68\%$, $p < 0,05$ для концентраций T_4 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} М соответственно) и контролем ($1,0 \pm 0,30\%$). Следует отметить, что тироксинподавляющая терапия при многоузловой патологии щитовидной железы дает нежелательные побочные эффекты, в основном это касается изменений в метаболизме костной ткани и сердечной мышцы [1, 6]. Снижение дозы терапевтического воздействия T_4 может уменьшить неблагоприятные проявления тироксинподавляющей терапии с сохранением способности ингибировать пролиферацию и индуцировать апоптоз трансформированных клеток.

Одним из регуляторных белков, отвечающих за пролиферацию клеток, в частности эпителиальных, является HER2/neu (C-erbB-2). HER2/neu — онкогенный белок массой 185 кД, принадлежащий к семейству рецепторов эпидермального фактора роста EGFR [5]. Активация HER2/neu вызывает внутриклеточные сигнальные изменения, которые являются критическими для роста, дифференцировки и выживания клеток. При патологических трансформациях ткани молочной железы экспрессия HER2/neu увеличивается, а при лекарственной терапии уменьшение представ

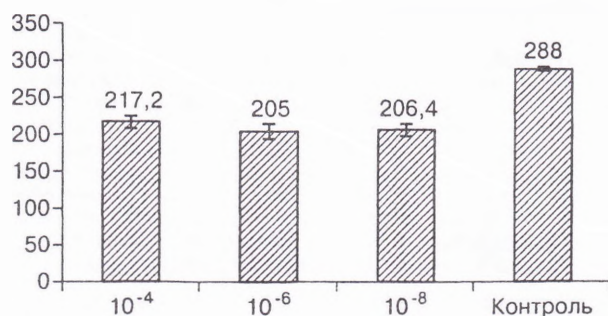


Рис. 2. Количественные изменения представительства HER2/neu на мембранах клеток молочной железы с гинекомастией при воздействии T_4 *in vitro*. Для всех значений опытных групп $p < 0,001$.

По оси ординат — Н-баллы.

ительства этого рецептора на мембране клеток свидетельствует о хорошем прогнозе лечения заболевания. В случае изучения биологических эффектов T_4 мониторинг изменения представительства HER2/neu на мембране клеток молочной железы может помочь раскрыть механизм ингибирования пролиферативной активности этой ткани. Мы исследовали количественные характеристики нахождения рецепторов HER2/neu на мембране опухолевых клеток молочной железы при воздействии T_4 *in vitro* в дозах 10^{-4} , 10^{-6} и 10^{-8} М (рис. 2). Воздействие T_4 во всех концентрациях привело к уменьшению количества рецепторов HER2/neu на мембранах клеток молочной железы в среднем на $27,25 \pm 1,14\%$ ($p < 0,001$). Столь значительные изменения могут быть связаны с ингибированием T_4 пролиферативной активности исследуемых клеток посредством сигнального управления от T_4 -опосредованных рецепторов. В свою очередь следует предположить, что подобные процессы затрагивают и генетический аппарат клетки, что приводит к изменению экспрессии определенных генов, в частности отвечающих за митотическую активность, например HER2/neu.

В опыте *in vivo* по определению противоопухолевой активности T_4 в экспериментальном канцерогенезе на модели перевиваемого штамма меланомы В-16 дозозависимый эффект T_4 по ингибированию роста опухоли не проявился (рис. 3). В сред-



Рис. 3. Противоопухолевая активность T_4 *in vivo* в экспериментальном канцерогенезе на модели меланомы В-16. Данные приведены на 21-е сутки после имплантации опухоли.

Митотическая активность и апоптоз клеток экспериментальной меланомы В-16 при воздействии T_4 ($M \pm m$)

Доза T_4 , моль на 1 введение	Число иссле- дован- ных клеток	Количество митозов, %		Метафазы, %		Анафазы, %		К-митоз	АИ, %	МИ, %
		норма	патология	норма	патология	норма	патология			
—	6000	11,2 ± 0,57	88,80 ± 0,57	7,46 ± 0,47	88,05 ± 0,59	3,73 ± 0,34	0,74 ± 0,15	—	4,43 ± 0,40	4,96 ± 0,43
10^{-4}	6000	5,17 ± 0,40	94,83 ± 0,40	1,29 ± 0,20	85,16 ± 0,64	3,87 ± 0,35	—	9,67 ± 0,53	6,25 ± 0,47	4,6 ± 0,36
									$p < 0,05$	$p > 0,05$
10^{-6}	6000	6,04 ± 0,37	93,96 ± 0,37	1,5 ± 0,19	72,86 ± 0,70	4,52 ± 0,32	6,04 ± 0,37	19,59 ± 0,62	5,9 ± 0,44	4,925 ± 0,27
									$p < 0,05$	$p > 0,05$
10^{-8}	6000	7,7 ± 0,59	92,3 ± 0,59	—	76,92 ± 0,94	7,69 ± 0,59	—	15,38 ± 0,80	10,65 ± 1,39	1,3 ± 0,16
									$p < 0,001$	$p < 0,001$

нем препарат показал $59,00 \pm 5,54\%$ ($p < 0,001$) торможения роста опухоли по массе и $74,12 \pm 0,26\%$ ($p < 0,001$) по объему; данные между опытными группами статистически достоверно не различались. Однако при исследовании пролиферативной и апоптотической активности клеток меланомы В-16 отмечено, что наибольшее ингибирование митозов и индуцирование апоптоза происходит при применении T_4 в дозе 10^{-8} М (см. таблицу), при этом значения МИ и АИ у этой группы экспериментальных животных отличались от других опытных групп и контроля более чем в 3 раза, а индекс отношения апоптотической активности к митотической (АИ, МИ) составил 8,19, что свидетельствует о высокой скорости регрессии опухоли. Введение T_4 в других концентрациях (10^{-4} и 10^{-6} М) не вызывало статистически достоверных отличий МИ по сравнению с контролем, хотя количество апоптотических клеток у животных этих опытных групп достоверно выше контроля, и это, а также высокая противоопухолевая активность T_4 в этих дозах позволяют утверждать, что получаемые значения АИ/МИ > 1 (1,35 для дозы 10^{-4} М и 1,19 для дозы 10^{-6} М) достаточно объективны и свидетельствуют о протекании процесса регрессии опухоли.

T_4 ингибирует пролиферацию и индуцирует апоптоз клеток, имеющих на мембране рецепторы к T_4 и способных изменять течение метаболических процессов под его воздействием. Спектр T_4 -мишеней довольно широк и в сферу его влияния входят не только клетки гормонпродуцирующих органов, например молочной железы, но и другие типы клеток, в частности меланинсодержащие. T_4 -эффекты приводят к перестройке в презентации регуляторных белков на поверхности мембраны клеток, изменению секреции гормонов и коррекции Ca^{2+} -гомеостаза, что в итоге и может активизировать процесс апоптотической гибели клеток [8, 9].

Выводы

1. Наибольшую цитотоксическую активность *in vitro* в отношении клеток доброкачественной опухоли щитовидной железы T_4 проявил в дозе 10^{-8} М ($70 \pm 4,58\%$; $p < 0,05$). В этой же дозе T_4 индуцировал наибольшую апоптотическую гибель клеток ($9,0 \pm 0,90\%$; $p < 0,05$) по сравнению с контролем ($1,0 \pm 0,30\%$).

2. Воздействие T_4 *in vitro* в дозах 10^{-4} , 10^{-6} и 10^{-8} М на клетки молочной железы с гинекомастией привело к уменьшению количества онкогенного белка HER2/neu в среднем на $27,25 \pm 1,4\%$ ($p < 0,001$).

3. В экспериментальном канцерогенезе на модели опухолевого штамма меланомы В-16 T_4 в концентрациях 10^{-4} , 10^{-6} и 10^{-8} М проявил *in vivo* высокую противоопухолевую активность ($59,00 \pm 5,54\%$, $p < 0,001$ торможения роста опухоли по массе и $74,12 \pm 0,26\%$, $p < 0,001$ по объему). Наибольшую антипролиферативную активность T_4 показал в дозе 10^{-8} М (МИ $1,3 \pm 0,16\%$, $p < 0,001$; АИ $10,65 \pm 1,39\%$, $p < 0,001$) по сравнению с контрольной группой (МИ $4,96 \pm 0,43\%$; АИ $4,43 \pm 0,40\%$).

ЛИТЕРАТУРА

1. Герасимов Г. А. // Пробл. эндокринолог. — 1996. — № 1. — С. 30–33.
2. Funahashi H., Imai T., Tanaka Y. et al. // Jpn. J. Cancer Res. — 1999. — Vol. 90. — P. 922–927.
3. John F. R. Kerr, Glenda C. Gobe, Clay M. Winterford et al. // Meth. Cell Biol. — 1995. — Vol. 46. — P. 3–28.
4. Jorns A., Tiedge M., Lenzen S. // Diabetologia. — 2002. — Vol. 45. — P. 851–855.
5. Klapper L. N., Kirschbaum M. H., Sela M. et al. // Adv. Cancer Res. — 2000. — Vol. 77. — P. 25–79.
6. Kowalczyk P., Sielanczyk A., Nowak J. et al. // Pol. Arch. Med. Wewnet. — 2001. — Vol. 105. — P. 123–130.
7. Lowe M. N., Plosker G. L. // Am. J. Clin. Dermatol. — 2000. — Vol. 1. — P. 245–250.
8. Menon J., Wahrman M. Z. // In Vitro Cell Dev. Biol. Anim. — 2001. — Vol. 37. — P. 283–292.
9. Monici M. C., Rodolico C., Toscano A. // Muscle Nerve. — 2002. — Vol. 26. — P. 383–388.
10. Varas S. M., Muoz E. M., Hapon M. B. et al. // Reproduction. — 2002. — Vol. 124. — P. 691–702.

Поступила 30.09.03