БИОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ГОРМОНОВ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Т. С. СААТОВ, А. А. АБДУВАЛИЕВ

Институт биоорганической химии Академии наук Республики Узбекистан, Ташкент;
e-mail: t.saatov@yandex.ru

В статье приведены результаты исследования многофункционального действия тиреоидных гормонов в отношении нормальных и злокачественно трансформированных тканей и клеток. Описаны «быстрые» и «медленные» эффекты действия гормонов, включающие калоригенные эффекты и эффекты через систему аденилатциклаза – cAMP.

Установлено, что тироксин (T4) способен ингибировать пролиферацию и индуцировать апоптоз клеток, несущих на своей мембране рецепторы к T4 и способных изменять течение метаболитических процессов под его воздействием. Спектр T4-мишеней довольно широк, и в сферу его управления входят не только клетки гормонпродуцирующих органов, например, молочной железы и толстой кишки, но и другие типы клеток, в частности меланинсодержащие, а T4-эффекты приводят к перестройке в презентации регуляторных протеинов на поверхности мембраны клеток, что, в конечном результате, и может активизировать процесс апоптотической гибели клеток.

Полученные нами результаты помогают определить альтернативные пути гормональной регуляции пролиферации и апоптоза клеток гормонозависимых опухолей, и, в частности, рака молочной железы, при невозможности регулировать эти процессы традиционными методами. Это помогает понять механизмы активации сигнальной системы клеток рака молочной железы гормонами при наличии изменений в экспрессировании рецепторов на поверхности клеток, что, в свою очередь, позволит выработать новую стратегию заместительной терапии гормонозависимых опухолей при низкой эффективности консервативного лечения.

Ключевые слова: тиреоидные гормоны, рак молочной железы, апоптоз, гормональная регуляция пролиферации, эстроген, прогестерон.

Многогранное действие гормонов щитовидной железы: тироксина (T4) и трийодтиронина (T3) на физиологические функции, скорость метаболических процессов, на активность различных энзимных систем как в целом организме, так и в препаратах тканей, известно уже давно. Природа этих явлений довольно разнообразна: инициация метаморфоза амфибий, влияние на развитие структуры и организацию нервных элементов в центральной нервной системе и появление первичных центров оссификации в костях, влияние на поглощение кислорода целым организмом или препаратами тканей *in vitro*, на различные стороны обмена веществ и на активность отдельных энзимов [1]. Многочисленные данные литературы показывают, что основное действие гормонов щитовидной железы направлено на биохимические процессы биосинтеза протеина и митохондриальное дыхание. В 60-е годы прошлого столетия ряд исследователей сформулировали гипотезу, согласно которой тиреоидные гормоны оказывают прямое действие на митохондрии, что приводит к разобщению окислительного фосфорилирования [2–5]. Этот эффект T4 и T3, наблюдаемый как в митохондриях, выделенных из ткани гипертиреоидных крыс, так и при добавлении тиреоидных гормонов к суспензии митохондрий *in vitro* считается ключевым, а все последующие изменения на уровне тканей, включая изменение поглощения кислорода, энзиматической активности, синтеза протеина – вторичными феноменами.

В те же годы Tata [6] выдвинул противоположную гипотезу, согласно которой физиологическая реакция на действие тиреоидных гормонов опосредуется через активирование генетического аппарата клетки с усилением биосинтеза специфических протеинов.

Как видно, метаболические эффекты тиреоидных гормонов реализуются, по крайней мере, двумя путями: путем стимуляции сигнального пути аденилатциклаза – cAMP и путем связывания ядерными рецепторами и стимуляции генетической активности [1, 7–9]. Следовательно, в многофункциональном действии тиреоидных гормонов можно разделить их «быстрые» и «медленные» эффекты. Быстрые реакции развиваются в течение первых

минут, и включают в себя калоригенные эффекты и эффекты через систему аденилатциклаза – cAMP. Медленные «пролонгированные» эффекты развиваются через несколько часов. Они предотвращаются ингибиторами синтеза протеина и нуклеиновых кислот.

Пусковым механизмом быстрых клеточных ответов на тиреоидные гормоны является их действие на плазматическую мембрану и митохондрии. На плазматической мембране тироксин путем взаимодействия со специфическим рецептором стимулирует активность аденилатциклазы с последующим увеличением внутриклеточной концентрации cAMP. Последний, в свою очередь, через протеинкиназную реакцию активирует энзимы и усиливает метаболические процессы в клетке [10].

Медленные эффекты тиреоидных гормонов обусловлены активацией соответствующих генов. Эта активация опосредована через цитозольные рецепторы, которые затем перемещаются в ядро, где происходит взаимодействие гормонрецепторного комплекса с ДНК и хроматином и усиление синтеза соответствующего матричного РНК [7].

В нашей лаборатории с использованием радиолигандного метода и метода флуоресцентных зондов доказано специфическое связывание тироксина с препаратами высокоочищенных плазматических мембран печени и мозга крыс. Установлено наличие двух тироксинсвязывающих мест, различающихся как сродством, так и гормонсвязывающей емкостью [11, 12]. Установлено влияние липидного состава плазматических мембран печени и мозга на параметры связывания тироксина с рецептором [8, 13, 14]. В дальнейшем рецептор тироксина был выделен и очищен из плазматической мембраны печени крыс. Очищенный рецептор является гликопротеином с молекулярной массой 40 кДА, состоит из 322-х остатков аминокислот и удерживается в мембране за счет гидрофобных взаимодействий [9]. Установлено, что высокоочищенный рецептор теряет способность связывать тироксин вследствие делипидизации в процессе очистки. Связывающая способность рецептора восстанавливается путем встраивания его в искусственную фосфолипидную мембрану, что указывает на важную роль мембранных липидов в реализации гормонального эффекта тироксина.

Другая группа исследователей нашей лаборатории [15] также занималась проблемой рецепции тиреоидных гормонов на клеточной мембране. Было исследовано взаимодействие меченого ^{125}I-тироксина с изолированными плазматическими мембранами клеток печени крыс и установили специфическое связывание меченого гормона с этими мембранами. Расчеты, проведенные в координатах Scatchard, выявили высокое сродство (Kacc равна $6{,}4 \cdot 10^9$ M^{-1}) и ограниченную емкость связывания тироксина (максимальная связывающая способность равна 14 nM T4 на 1 мг протеина). Обнаружено, что немеченый тироксин и трийодтиронин проявляют конкуренцию за места связывания с ^{125}I-T4, причем конкурирующая способность у T3 была выше, чем у холодного T4. Этот факт наводит на мысль, что в плазматической мембране клеток печени имеются рецепторы для T3. Результаты наших исследований относительно рецепции T4 на уровне плазматических мембран клеток были подтверждены в экспериментах французских ученых Gharbi и Torresani [16, 17]. Они установили наличие в очищенных препаратах плазматических мембран печени крыс участков связывания T4 двух типов с высоким сродством. Места с высоким сродством связывания T4 не обнаружены в препаратах грубых и гладких микросомных фракций, а также в цитозоле. По данных этих авторов T4 связывается с высокой стереоспецифичностью как при замене йода в молекуле тиронина, так и при модификации в аланиновой цепочке молекулы гормона.

Как известно, связывание гормона с рецептором оказывает положительное стимулирующее влияние на аденилатциклазу, вызывая ее активацию. На высокоочищенных препаратах плазматической мембраны печени крыс нами установлено, что T4 стимулирует активность системы аденилатциклаза – cAMP.

В наших исследованиях стимулирующий эффект T4 на активность аденилатциклазы доказан в экспериментах как *in vivo*, так и *in vitro*.

На экспериментальной модели гипертиреоза у крыс, вызванного путем введения T4 в течение пяти дней в дозе 1 мг/кг веса показано достоверное повышение активности аденилатциклазы в плазматических мембранах ряда органов. Так, в плазматической мембране печени наблюдалась стимуляция активности энзима на 23, сердца – на 67 и почек – на 46% по сравнению с нормой. У тиреоидэктомированных крыс в плазматических мембранах вышеуказанных органов мы отмечали ингибирование активности аденилатциклазы, которое составляло в печени – 32, сердце – 44 и в почках – 26% по отношению к контролю. Следует отметить, что избыток или недостаток тиреоидных гормонов в организме экспериментальных животных не оказывает влияния на ак-

тивность аденилатциклазы в плазматических мембранах селезенки и мозга, считающихся органами неотзывчивыми к действию гормонов щитовидной железы.

Исследования, проведенные в условиях *in vitro*, путем добавления экзогенного Т4 в плазматические мембраны органов-мишеней у крыс также показали стимуляцию активности аденилатциклазы. При этом установлена дозовая зависимость влияния Т4 на активность аденилатциклазы. Т4 при физиологических концентрациях (10^{-8} М) приблизительно в 1,5 раза стимулирует активность энзима в плазматических мембранах печени, почек и сердца по сравнению с контрольными значениями. В противоположность этому инкубация плазматических мембран изученных органов с токсическими дозами гормона (10^{-4} М) вызывает заметное торможение активности аденилатциклазы. Различные концентрации Т4 не оказывают существенного эффекта на активность аденилатциклазы в плазматических мембранах селезенки и мозга крыс.

Таким образом, представленные данные доказывают, что метаболические эффекты гормонов щитовидной железы реализуются путем взаимодействия со специфическим рецептором на плазматической мембране и запуском аденилатциклазной реакции с повышением внутриклеточной концентрации cAMP.

В механизме действия тиреоидных гормонов особое место занимает их участие в процессах апоптоза и пролиферации клеток. Эта проблема интенсивно разрабатывается в последние 10—15 лет. В литературе накоплено уже достаточно данных о том, что гормоны щитовидной железы могут индуцировать развитие апоптоза в различных типах клеток. Анализ механизма апоптогенного действия тиреоидных гормонов указывает на то, что они оказывают влияние на процесс апоптоза на различных этапах его развития и по различным механизмам: как активированием митохондриальных и цитоплазматических процессов, так и активированием специфических генов.

Результаты исследования, проведенные в последние годы, позволяют утверждать, что влияние Т4 или препаратов на его основе на различные метаболические процессы, протекающие в органах и тканях организма, может приводить к индуцированию апоптоза и снижению пролиферативной активности в клетках различной этиологии. Это касается как нетрансформированных клеток, таких как клетки молочной железы [18], β-клетки поджелудочной железы [19], так и злокачественно пролиферирующих клеток, в частности рака молочной железы [20] и кожных лимфом [21].

Первые сведения о возможном эффекте тиреоидных гормонов на апоптоз клеток получены при изучении метаморфоза головастиков. В присутствии Т4 наблюдалось ускорение метаморфоза головастиков в лягушки и при этом исчезновение хвоста происходило в результате запуска программы апоптоза.

В нашей лаборатории были изучены особенности механизма регуляции пролиферации и программированной гибели — апоптоза — в опухолевых клетках различного генеза при действии тиреоидных гормонов.

Нами были проведены исследования на изолированных опухолевых клетках перевиваемого штамма аденокарциномы толстого кишечника АКАТОЛ у мышей линии BALB/c. Сразу же после внесения препарата Т4 проводился прижизненный анализ состояния ядра и цитоплазмы нескольких выбранных и зафиксированных в поле зрения клеток. К концу анализируемого периода (45 мин — достоверная продолжительность жизни клеток *in vitro* в контроле) было отмечено постепенное изменение состояния хроматина ядра до маргинации и образование апоптозных телец, а также изменение цитоплазмы с образованием выпячиваний и протуберанцев. Таким образом, было показано, что воздействие Т4 в концентрации 10^{-4} М вызывает апоптоз у опухолевых клеток штамма АКАТОЛ в эксперименте *in vitro*.

Воздействие Т4 на клетки доброкачественной опухоли щитовидной железы в течение 24 ч *in vitro* оказалось дозозависимым и вызывало цитотоксический эффект у значительного количества клеток (рис. 1).

Наибольшую цитотоксическую активность Т4 проявлял в дозе 10^{-8} М. Индуцирование гибели клеток Т4 в остальных разведениях статистически достоверно не различалось и варьировало в пределах 40—50%. Количество апоптозных клеток в опыте с применением Т4 в дозе 10^{-8} М также было самым большим (9,0 ± 0,90%, $P < 0,05$) по сравнению с остальными концентрациями (3,2 ± 0,55%, $P < 0,05$; 2,5 ± 0,49%, $P < 0,05$; 4,5 ± 0,65%, $P < 0,05$; 5,0 ± 0,68%, $P < 0,05$ для концентраций Т4 10^{-7}, 10^{-6}, 10^{-5}, 10^{-4} М соотвественно) и контролем (1,0 ± 0,30%). Одним из регуляторных протеинов, отвечающих за пролиферацию клеток, в частности, эпителиальных, является HER2/neu (C-erbB-2). HER2/neu — онкогенный протеин (185 кДа), принадлежащий к семейству рецепторов эпидермального фактора роста EGFR [22]. Активация HER2/neu вызывает внутри-

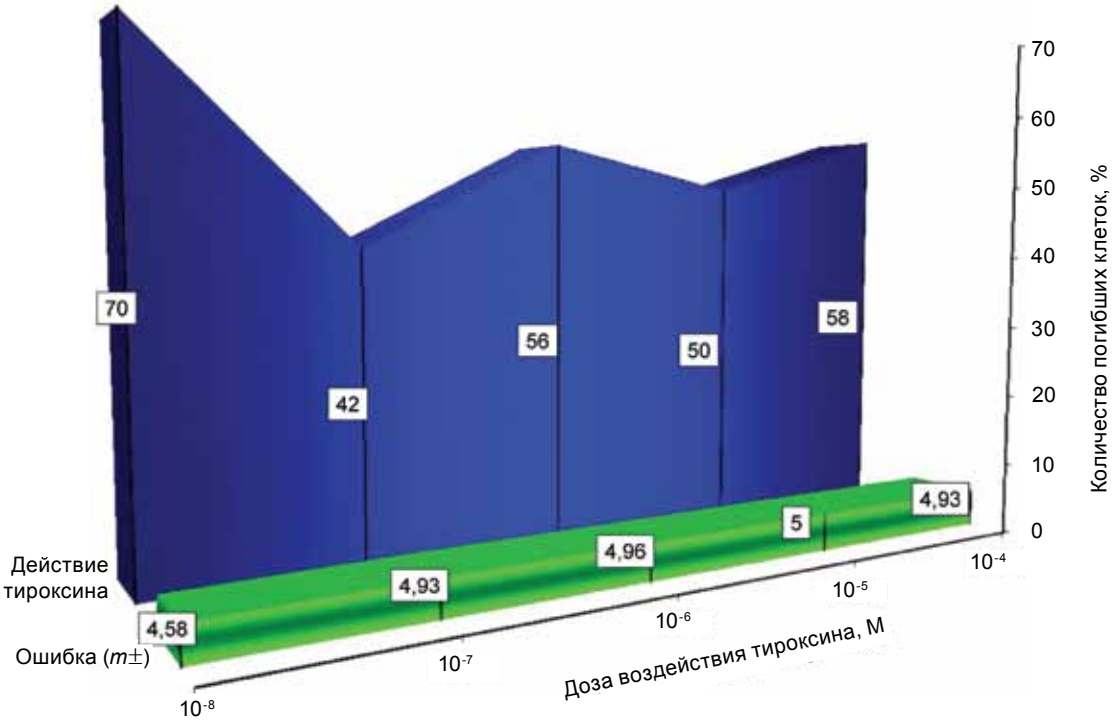

Рис. 1. Действие тироксина (Т4) на клетки доброкачественной опухоли щитовидной железы в эксперименте in vitro. Время инкубации — 24 ч. Для всех значений опытных групп $P < 0,05$

клеточные 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 представительства этого рецептора на мембране клеток говорит о хорошем прогнозе лечения заболевания. В случае изучения биологических эффектов Т4 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 Т4 *in vitro* в дозах 10^{-4}, 10^{-6} и 10^{-8} М (рис. 2).

Воздействие Т4 во всех концентрациях привело к уменьшению количества рецепторов HER2/neu на мембранах клеток молочной железы в среднем на 27,25 ± 1,14%, $P < 0,001$. Столь значительные изменения могут быть связаны с ингибированием пролиферативной активности Т4 исследуемых клеток посредством сигнального управления от Т4-опосредованных рецепторов.

В эксперименте *in vitro* на культуре опухолевых клеток рака молочной железы и куриных фибробластов было исследовано воздействие Т4 как на опухолевые, так и на нетрансформированные клетки (рис. 3). Проведение подобного эксперимента позволило установить следующее: в дозах воздействия Т4 10^{-5} М происходит ингибирование роста как опухолевых, так и нетрансформированных клеток (3,64 и 3,01% деструкции клеточного слоя соответственно), причем эти данные, как и в случае использования Т4 в концентрации 10^{-8} М сопоставимы с результатами контрольного опыта, что говорит о неэффективности подобных доз Т4 для ингибирования пролиферации клеточных моделей. В концентрациях Т4 10^{-7} и 10^{-6} М ингибирование клеточного роста происходит более эффективно, однако, если сравнивать подобное воздействие в отношении клеток рака молочной железы и куриных фибробластов, можно увидеть значительные отличия (рис. 3). Так, в концентрации 10^{-6} М Т4 преимущественно тормозит рост куриных фибробластов (38,82% деструкции клеточного слоя), в то время как ингибирование роста клеток рака молочной железы было более слабым (5,16% деструкции клеточного слоя). При концентрации Т4 10^{-7} М подобная диспропорция принимает обратный порядок и ингибирование пролиферации рака молочной железы (18,72% деструкции клеточного слоя) превышает ингибирование роста

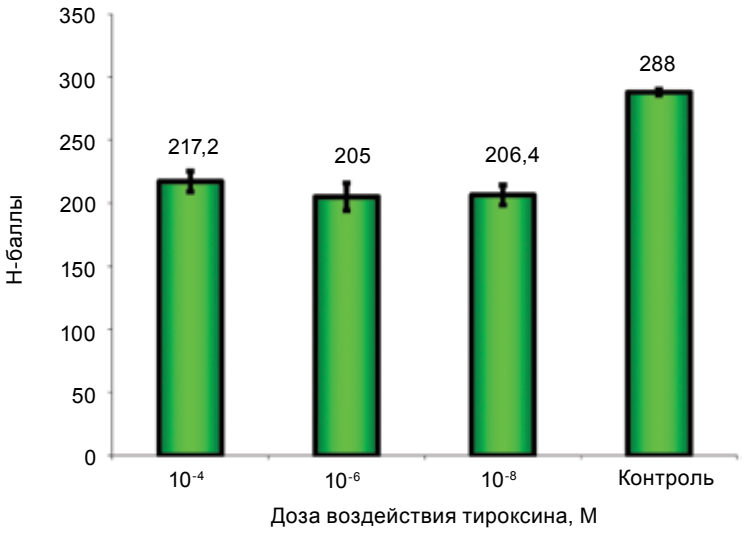

Рис. 2. Количественные изменения представительства HER2/neu на мембранах клеток молочной железы с патологией гинекомастии при воздействии тироксина (Т4) in vitro. Время инкубации – 24 ч. Для всех значений опытных групп P < 0,001

клеток куриных фибробластов (11,58% деструкции клеточного слоя). Полученные данные позволяют сделать вывод, что воздействие Т4 на опухолевые и нетрансформированные клетки является дозозависимым, а наиболее приемлемой концентрацией для ингибирования роста клеток рака молочной железы в эксперименте *in vitro* является 10^{-7} М.

В эксперименте *in vivo* на модели опухолевого штамма меланомы В-16 была определена противоопухолевая активность L-тироксина. Экспериментальные животные были разбиты на 3 группы: I группа – животные получали Т4 в дозе 1 мг/кг внутривенно в физиологическом растворе (10 инъекций); II группа – животные получали Т4 в дозе 0,1 мг/кг внутривенно в физиологическом растворе (10 инъекций); III группа – контроль, животные получали растворитель (физиологический раствор, 10 инъекций).

В табл. 1 представлены результаты противоопухолевой активности Т4 в используемых дозах 1,0 мг/кг и 0,1 мг/кг. Введение животным Т4 в высоких концентрациях (1,0 мг/кг, группа I) вызывает тенденцию к уменьшению роста опухолевой ткани (ТРО – 50,6%). Уменьшение дозы Т4 до 0,1 мг/кг оказывает высокую противоопухолевую активность (ТРО – 91,4%).

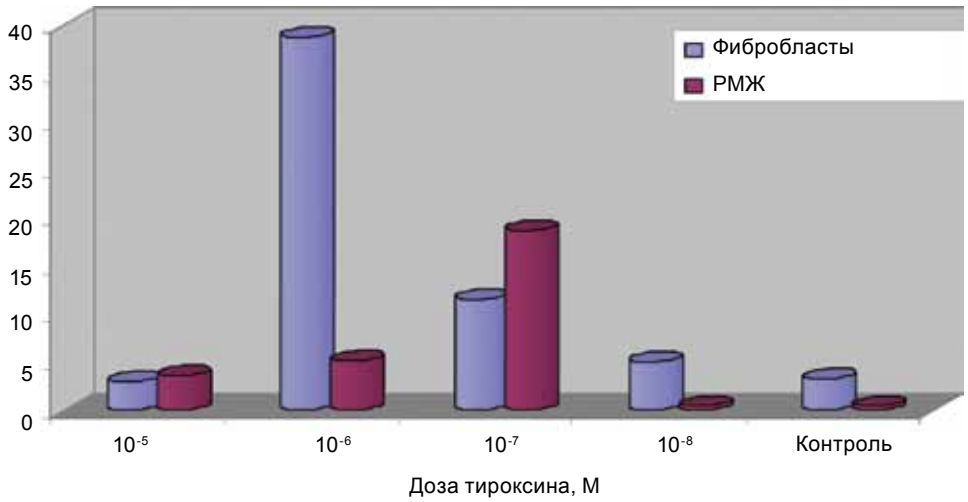

Рис. 3. Влияние тироксина (Т4) на деструкцию монослоя куриных фибробластов и клеток рака молочной железы

Таблица 1. Изменение массы и объема опухоли меланомы В-16 у экспериментальных животных после введения L-тироксина (Т4) ко дню окончания эксперимента (16-й день) (M ± m; n = 30)

Группа	Доза воздействия (количество введений), мг/кг	Масса опухоли, г	Объем опухоли, см^3	Торможение роста опухоли, %
Группа I	1,0 (10)	0,3656 ± 0,108	0,55 ± 0,16	50,59
Группа II	0,1 (10)	0,0634 ± 0,011*	0,020 ± 0,006	91,43
Группа III (контроль)	–	0,740 ± 0,072	0,67 ± 0,18	–

* $P < 0,05$

Как в случае использования Т4 в высоких дозах, так и при снижении действующей концентрации гормона, имеет место цитотоксическая гибель опухолевых клеток в результате нарушения жизненно важных функций, регулируемых Т4: перестройке в презентации регуляторных протеинов на поверхности мембраны клеток, изменение секреции гормонов и коррекции Ca^{2+}-гомеостаза. Однако в случае использования высоких доз Т4 возникает риск возникновения рецептороцитоза, что может привести к снижению терапевтических эффектов гормона. В нашем исследовании, по-видимому, высокая доза использования Т4 (1,0 мг/кг, группа I) привела к рецептороцитозу, что не позволило достичь эффективной концентрации гормона в опухолевых клетках для подавления их жизнедеятельности.

Таким образом, Т4 в дозе 0,1 мг/кг проявляет высокую противоопухолевую активность, тогда как повышение дозы воздействия гормона до 1,0 мг/кг не приводит к статистически достоверному торможению роста опухоли меланомы В-16.

В табл. 2 представлены результаты определения количества делящихся клеток и формы протекания митозов в опухолевой ткани меланомы В-16 под воздействием Т4. Как видно из представленных данных, в опухолевой ткани преобладают патологические формы деления клеток, различий в процентном отношении патологических форм митоза между опытными группами не наблюдается. Примечательно, что в опытных группах под действием гормона появляются К-митозы. Появление этих форм патологического деления обычно иллюстрирует цитотоксические проявления действия биологически активных веществ.

В срезах опухолей у контрольной группы животных клеток с конденсированным хроматином было незначительное количество (3,5% ± 0,4). Большинство опухолевых клеток активно делятся преимущественно с патологичным протеканием митоза (МИ 4,96 ± 0,43). Некротические участки маленьких размеров встречаются редко. В целом, исследуемая ткань представляет собой низкодифференцированный клеточный массив с высокой митотической активностью, с повсеместным прорастанием мышечных волокон, с тенденцией к разрастанию.

При микроскопировании срезов опухолей животных, получавших Т4 в дозе 0,1 мг/кг (группа II) митотическая активность ткани оказалась невысокой, преимущественно с патологическим протеканием стадий деления – чаще встречаются патологические метафазы (МИ 1,30 ± 0,16). Исследуемая ткань представляет собой высокодифференцированный клеточный массив с низкой митотической активностью, с повсеместным протеканием процессов некроза, с тенденцией к деградации ткани.

В опухолевой ткани экспериментальных животных группы I, получавших Т4 в дозе 1,0 мг/кг, значительных морфологических изменений в сравнении с гистологическими препаратами контрольной группы не наблюдается. Большое количество опухолевых клеток находятся в стадии активного деления, преимущественно с патологическим протеканием митоза (МИ 4,60 ± 0,36). Таким образом, исследуемая ткань представляет собой низкодифференцированный клеточный массив с высокой митотической активностью.

Другим параметром, отражающим процессы гибели опухолевых клеток, является апоптотический индекс (АИ). Важность этого параметра для построения адекватной картины кинетических процессов опухолевой ткани объясняется отличиями в ином цикле деления опухолевых клеток. В частности, при трансформации клетка приобретает способность входить из G_0-фазы (состояние клетки до получения стимула деления) в G_1 (подготовка к синтезу ДНК) и проходить весь цикл деления

Таблица 2. Митотическая активность и апоптоз клеток экспериментальной опухоли меланомы B-16 при воздействии L-тироксином (T4)

Группы	Доза, мг/кг	Количество исследованных клеток	Количество митозов, %		Метафазы, %		Анафазы, %		К-митоз	АИ, %	МИ, ‰
			норма	патология	норма	патология	норма	патология			
Группа I	1,0	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*	4,60±0,36
Группа II	0,1	6000	7,70±0,59	92,30±0,59	–	76,92±0,94	7,69±0,59	–	15,38±0,80	10,65±1,39**	1,30±0,16**
Группа III (контроль)	–	6000	11,20±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

* $P < 0,05$; ** $P < 0,001$

без внешней или при ослабленной стимуляции [23]. Продолжительность фаз G_1+S+G_2+M у опухолевых клеток не уменьшается по сравнению с нормой. Механизм интенсивного нестимулированного деления опухолей связан в большинстве случаев с мутацией в протоонкогене, кодирующем протеин-рецептор в клеточной мембране и делающем этот протеин постоянно активированным, передающим сигналы к делению по цепи внутрь клетки, или с мутациями в генах одного из промежуточных протеинов, что также приводит к его постоянной активации и к передаче сигнала следующим компонентам цепи [24].

Воздействие противоопухолевых препаратов на ингибирование пролиферации патологических тканей должно приводить к прерыванию в цепи стимулирования деления путем влияния на рецепторы или протеины, отвечающие за митоз, или к изменениям в геноме клетки. В обоих случаях мы можем говорить об активации механизмов программируемой клеточной гибели или апоптозе. Поэтому при проведении анализа пролиферативной активности опухолевой ткани невозможно говорить о прогрессирующем или же, наоборот, регрессирующем характере этого процесса только учитывая количество митозов, так как при морфологическом анализе невозможно адекватно оценить абсолютно все количество делящихся клеток из-за скоротечности некоторых фаз митоза, а апоптозный индекс вкупе с митотическим индексом дает объективную оценку процессам роста или гибели опухоли.

В табл. 2 представлены результаты определения апоптотического индекса (АИ) в опухолевой ткани меланомы B-16 под действием T4 в дозах 1,0 мг/кг (группа I) и 0,1 мг/кг (группа II). При всех использованных дозах гормона наблюдается увеличение количества апоптозных клеток. Наибольшие значения АИ наблюдаются в группе II (АИ = 10,65 ± 1,39%), наименьшие – в контрольной группе экспериментальных животных (АИ = 4,43 ± 0,40%).

Следует также отметить, что во всех опытных группах количество опухолевых клеток, находящихся в стадии апоптотической гибели, превышает количество митотически делящихся клеток, тогда как в контрольной группе животных значения МИ превосходят значения АИ, что говорит о росте опухолевой ткани. Индекс роста опухолевой ткани (ИРО), т.е. отношение количества апоптозных клеток к количеству клеток, находящихся в состоянии деления – АИ/МИ – позволяет оценить скорость регрессии или прогрессии опухоли. В случае полу-

чения значений менее 1,0 мы имеем место с прогрессией опухолевой ткани, так как количество митотически делящихся клеток превосходит количество гибнущих клеток, а в случае получения значений АИ/МИ > 1,0 – мы имеем место с регрессией опухоли, соответственно значения показывают скорость роста или гибели опухолевой ткани.

В табл. 3 приведены значения ИРО (АИ/МИ) для всех опытных групп. Как видно из полученных значений, и в случае применения Т4 в дозе 1,0 мг/кг, и в дозе 0,1 мг/кг, опухолевая ткань регрессирует, при этом степень регрессии значительна для опухолевых образцов группы II. В то же время, опухолевая ткань в контрольной группе животных прогрессирует, т.е. увеличивает свою клеточную популяцию.

С целью исследования влияния Т4 на ингибирование роста раковых клеток различного гистогенеза нами были проведены эксперименты по изучению цитотоксических эффектов этого гормона на клетки рака молочной железы. Выбор этого опухолевого заболевания не случаен. Рак молочной железы относится к одной из наиболее частых опухолей человека и является главной причиной смертности женщин среднего возраста в экономически развитых странах. Заболеваемость раком молочной железы у женщин в России составляет 18,9–20,4% в структуре злокачественных новообразований, а в Узбекистане, несмотря на более низкую заболеваемость, чем в странах Европы, частота развития опухолей молочной железы не обнаруживает тенденции к снижению [25]. Другой причиной выбора этого объекта для наших исследований явилось то, что пролиферация клеток рака молочной железы находится под влиянием ряда гормонов, основными из которых являются эстрогены и прогестерон. Однако в последние годы с приходом в клиническую практику новых диагностических наборов по определению экспрессии рецепторов к эстрогенам и прогестерону было установлено, что отсутствие на поверхности клеток рака молочной железы рецепторов этих гормонов не позволяет придерживаться традиционной терапии этого заболевания и требует изменения фармакологического воздействия, при этом данная патология встречается приблизительно у 15% пациентов [26]. Исходя из этого, нами было сделано предположение о возможности регуляции Т4 пролиферации клеток рака молочной железы в случае невозможности воздействия на этот процесс традиционными агентами.

Таблица 3. Индекс роста опухоли (ИРО) меланомы В-16 после введения L-тироксина ко дню окончания эксперимента (16-й день)

Группа	Доза воздействия (количество введений), мг/кг	АИ/МИ
Группа I	1,0 (10)	1,35
Группа II	0,1 (10)	8,19
Группа III (контроль)	–	0,89

С помощью иммуногистохимического метода анализа нами были обследованы образцы 6 опухолей молочной железы разного генеза, полученных из операционного материала пациентов Республиканского онкологического научного центра МЗ РУз (г. Ташкент). В четырех из шести образцов опухолевой ткани молочной железы количество рецепторов к эстрогенам и прогестерону соответствовало 2+ и 3+ баллам, то есть в этих клетках отсутствовали генетические нарушения экспрессии рецепторов к эстрогенам (рис. 4). В одном из шести образцов опухолей представительство рецепторов к эстрогенам и прогестерону было незначительно и соответствовало 1+ баллу. И только один образец трансформированных клеток молочной железы показал полное отсутствие рецепторов к эстрогенам и прогестерону – 0 баллов (рис. 5). Для проведения дальнейших экспериментов нами был взят опухолевый материал как с наличием, так и с полным отсутствием рецепторов к эстрогенам и прогестерону.

После культивирования клеток рака молочной железы с наличием рецепторов к эстрогенам и прогестерону и получения слоя средней плотности этих клеток в лунки полистиролового планшета вносили Т4 в концентрациях 10^{-4}, 10^{-6} и 10^{-8} М. Здесь следует отметить, что концентрация гормона в 10^{-8} М является физиологической, т.е. соответствует концентрации гормона в организме в норме, она коррелирует с использованной нами в предыдущих экспериментах дозой Т4 в 0,1 мг/кг. Концентрация Т4 в 10^{-4} М является гиперконцентрацией гормона и соответствует дозе в 1,0 мг/кг, подобная концентрация гормона встречается при патологиях щитовидной железы, например, при тиреотоксикозе.

При исследовании ингибирования роста клеток различными концентрациями тироксина было установлено, что влияние гормона

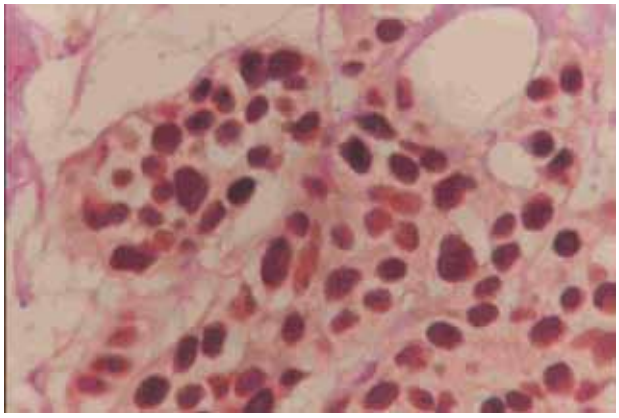

Рис. 4. Рак молочной железы. Резко положительная иммуногистохимическая реакция на рецепторы к эстрогенам и прогестерону (3+). Иммунопероксидазный метод. Ок. 10х, об. 40х

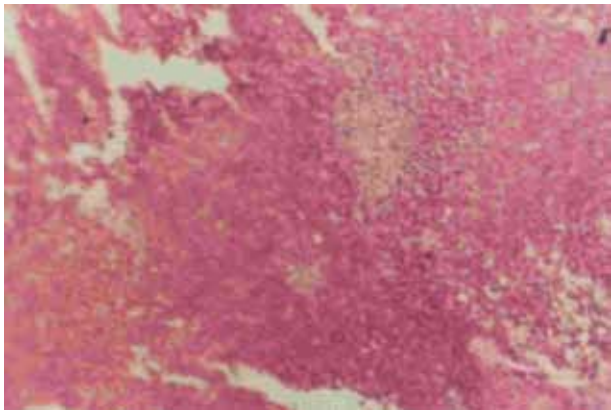

Рис. 5. Рак молочной железы. Отрицательная иммуногистохимическая реакция на рецепторы к эстрогенам и прогестерону (0). Иммунопероксидазный метод. Ок. 10х, об. 20х

на пролиферацию опухолевых клеток с наличием рецепторов к эстрогенам и прогестерону незначительно, что не позволяет говорить об активной регуляции этим гормоном процессов деления и роста опухолевых клеток молочной железы подобного фенотипа (табл. 4).

После культивирования клеток рака молочной железы с отсутствием рецепторов к эстрогенам и прогестерону и получения слоя средней плотности этих клеток в лунки полистиролового планшета вносили Т4 в тех же концентрациях – 10^{-4}, 10^{-6} и 10^{-8} М. Результаты ингибирования роста клеток различными концентрациями Т4 представлены в табл. 4. Как видно из приведенных данных, Т4 при отсутствии рецепторов к эстрогенам и прогестерону на поверхности опухолевых клеток способен значительно ингибировать пролиферацию клеток рака молочной железы. При этом этот гормон проявляет ярко выраженное дозозависимое действие. Влияние Т4 на клетки рака молочной железы в концентрации 10^{-4} и 10^{-8} М приводит к тому, что до половины опухолевых клеток оказываются погибшими (СД равняется 43,875% ± 11,12 и 50,25% ± 1,47 соответственно), тогда как в концентрации 10^{-6} М аналогичный эффект проявляется слабее и цитотоксическое действие гормона близко к контролю (26,0% ± 0,98).

Таким образом, проведенное исследование показало, что воздействие Т4 на клетки рака молочной железы способно ингибировать пролиферацию этих клеток, при этом подобная гормональная регуляция процессов деления клеток зависит от степени и формы патологической трансформации раковых клеток. В случае невозможности регуляции пролиферации клеток специфическими гормонами из-за генетических трансформаций, такими как эстрогены и прогестерон, возможен механизм альтернативного регулирования роста и гибели опухолевых клеток, в частности, Т4. Также следует отметить дозозависимое влияние Т4 на пролиферацию клеток рака молочной железы,

Таблица 4. Степень деструкции слоя клеток рака молочной железы с наличием и отсутствием рецепторов к эстрогенам и прогестерону при воздействии L-тироксина

Концентрация воздействия L-тироксином, моль	Степень деструкции (СД) слоя клеток рака молочной железы, %	
	с наличием рецепторов к эстрогенам и прогестерону	отсутствием рецепторов к эстрогенам и прогестерону
10^{-4}	16,0 ± 1,62*	43,875 ± 11,12*
10^{-6}	14,125 ± 2,26*	26,00 ± 0,98*
10^{-8}	10,50 ± 7,34*	50,25 ± 1,47*
контроль	1,0 ± 0,4	1,0 ± 0,4

* $P < 0,05$

при этом эффективная концентрация этого гормона лежит в низких разведениях, что позволяет надеяться на снижение побочных эффектов при его длительном терапевтическом применении.

Как показывают наши исследования и результаты коллег, Т4 способен участвовать в регуляции пролиферативной активности опухолевых клеток различной этиологии. В то же время существуют данные об участии Т4 в возникновении злокачественных новообразований при нарушении секреции этого гормона щитовидной железой. Так, при заболеваниях молочной железы, в том числе и рака молочной железы, происходят нарушения гормонального статуса женщин, состоящие из изменений секреции стероидных гормонов и снижения экспрессии рецепторов к эстрогенам и прогестерону, в основе которого заложена патология щитовидной железы, приводящая к существенному уменьшению выработки Т4 [27].

Т4 способен ингибировать пролиферацию и индуцировать апоптоз клеток, несущих на своей мембране к нему рецепторы и способных изменять течение метаболитических процессов под его воздействием. Спектр Т4-мишеней довольно широк и в сферу его управления входят не только клетки гормонпродуцирующих органов, например, молочной железы и толстой кишки (АКАТОЛ), но и другие типы клеток, в частности, меланинсодержащие, а Т4-эффекты приводят к перестройке в презентации регуляторных протеинов на поверхности мембраны клеток, что, в конечном счете, может активизировать процесс апоптотической гибели клеток.

Полученные нами результаты помогают определить альтернативные пути гормональной регуляции пролиферации и апоптоза клеток гормонозависимых опухолей, в частности рака молочной железы, при невозможности регулировать эти процессы традиционными методами. Это помогает понять механизмы активации сигнальной системы клеток рака молочной железы гормонами при наличии изменений в экспрессировании рецепторов на поверхности клеток. Это, в свою очередь, позволит выработать новую стратегию заместительной терапии гормонозависимых опухолей при низкой эффективности консервативного лечения.

БІОЛОГІЧНІ ЕФЕКТИ ГОРМОНІВ ЩИТОПОДІБНОЇ ЗАЛОЗИ

Т. С. Саатов, А. А. Абдувалієв

Інститут біоорганічної хімії Академії наук Республіки Узбекистан, Ташкент;
e-mail: t.saatov@yandex.ru

У статті наведено результати дослідження багатофункціональної дії тиреоїдних гормонів у відношенні до нормальних і злоякісно трансформованих тканин і клітин. Описано «швидкі» і «повільні» ефекти дії гормонів, в які включено калоригенні ефекти і ефекти завдяки системі аденилатциклаза – cAMP.

Установлено, що тироксин (Т4) спроможний інгібувати проліферацію та індукувати апоптоз клітин, які мають на своїй мембрані рецептори до Т4 і які можуть змінювати перебіг метаболічних процесів під його дією. Спектр Т4-мішеней є досить широким, і у сферу його управління входять не тільки клітини гормонопродукуючих органів, наприклад, молочної залози та товстої кишки, але й інші типи клітин, зокрема меланіновміщуючі, а Т4-ефекти призводять до перебудови в репрезентуванні регуляторних протеїнів на поверхні мембрани клітин, що, насамкінець, може активувати процес апоптотичної загибелі клітин.

Одержані нами результати допомагають визначити альтернативні шляхи гормональної регуляції проліферації й апоптозу клітин гормонозалежних пухлин, і, зокрема, раку молочної залози, за неможливості регулювати ці процеси традиційними методами. Це допомагає зрозуміти механізми активації сигнальної системи клітин раку молочної залози гормонами за наявності змін в експресуванні рецепторів на поверхні клітин. Це, в свою чергу, дозволить розробити нову стратегію замісної терапії гормонозалежних пухлин за низької ефективності консервативного лікування.

Ключові слова: тиреоїдні гормони, рак молочної залози, апоптоз, гормональна регуляція проліферації, естроген, прогестерон.

BIOLOGICAL EFFECTS OF THYROID HORMONES

T. S. Saatov, A. A. Abduavaliev

Institute of Bioorganic Chemistry, Uzbekistan Academy of Sciences, Tashkent;
e-mail: t.saatov@yandex.ru

The article presents the findings from the study on multifunctional effects of thyroid hormones in relation to normal and malignantly transformed tissues and cells. Both «rapid» and «slow» effects of thyroid hormones including calorigenic effects and effects over adenylate cyclase - cAMP system have been described.

Thyroxin (T4) has been established capable to inhibit proliferation and to induce apoptosis of cells carrying T4 receptors on their membranes as well as to change course of metabolic processes under its effect. Spectrum of T4 targets is quite broad to include not only cells of hormone-producing organs, to name those of the breast and the colon, but also other types of cells to name melanin-containing ones; T4 effects resulting in reconstruction of presentation of regulatory proteins on the cell membrane surface to ultimately activate the process of cell apoptosis.

Our findings help determine alternative paths for hormonal regulation of cell proliferation and apoptosis of cells of hormone-dependent tumors, breast cancer, in particular, upon impossibility to regulate the processes by conventional methods. This facilitates understanding mechanisms for activation of signal system of the breast cancer's cells by hormones upon changes in expression of receptors on the cells' surface, making possible development of novel strategy for replacement therapy of hormone-dependent tumors upon low efficacy of drug therapy.

Key words: thyroid hormones, breast cancer, apoptosis, proliferation, hormonal regulation of proliferation, estrogen, progesterone.

1. *Туракулов Я. Х., Саатов Т. С., Халиков С. К. и др.* Циклические нуклеотиды и регуляция клеточного метаболизма. – Из-во «ФАН» УзССР, Ташкент, 1983. – 237 с.
2. *Buchanan I., Tapley D. F.* // Endocrinology. – 1966. – **79**. – P. 81–88.
3. *Buchanan I., Tapley D. F.* / In: The Thyroid (S. C. Werner and S. H. Ingbar,ets), Harper, N.Y., 1971. – P. 90–92.
4. *Hoch F. L.* // Physiol. Rev. – 1962. – **42**. – P. 605.
5. *Sokoloff L. et al.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1968. – **60**. – P. 652–661.
6. *Tata I. R.* IX-th intern. Congress of biochem, Stockholm, 1973.
7. *Абдукаримов А.* Молекулярно-биохимические механизмы регуляции генетической активности тиреоидными гормонами : автореферат дисс. ... докт. биол. наук. – Ташкент, 1979. – 24 с.
8. *Саатов Т. С.* // Укр. биохим. журн. – 1981. – № 2. – С. 44–51.
9. *Яковлева Н. Н.* Характеристика и механизм функционирования рецепторов тиреоидных гормонов на плазматических мембранах : автореферат дисс. ... канд. биол.наук. – Ташкент, 1993. – 20 с.
10. *Туракулов Я. Х., Халиков С. К., Далимова С. Н.* Участие с АМР в механизме действия тиреоидных гормонов. I Всесоюзный симпозиум «Циклические нуклеотиды». – Красноярск, 1976. – С. 101–102.
11. *Кахарова О. У.* Липиды и рецепция тиреоидных гормонов на плазматической мембране печени и мозга крыс в онтогенезе : автореферат дисс. ... канд. биол. наук. – Ташкент, 1991. – 18 с.
12. *Кахарова О., Гулямова Ф. Я., Яковлева Н.* О природе тироксинсвязывающих участков на ПМ., тез. докл. X объединенного симп. биохим.обществ СССР-ГДР «Механизмы регуляции клеточной активности». – Москва, 1989. – С. 36–37.
13. *Гулямова Ф. Я., Зайнутдинов Б., Яковлева Н., Кахарова О.* // Тезы докл. III Всесоюзн. симп. по биохимии липидов. – Москва, 1987. – С. 50.
14. *Saatov T. S. Gulamova F. Ya., Kakharova O.* Characterization of thyroxine receptor from rat liver and brain plasma membranes in ontogenesis, abstracts 20th FEBS conference. – Budapesht, 1990. – P. 256.
15. *Саатов Т. С., Зайнутдинов Б. Р., Мучник С. Е.* I Всесоюзный биофизический съезд, тезисы докладов. – Москва, 1982. – **3**. – С. 1901.
16. *Gharbi C. I., Torresani I.* // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1979. – **88**, N 1. – P. 170–177.
17. *Gharbi C. I., Torresani I.* // J. Endocrinol. Invest. – 1981. – **4**. – P. 177–183.
18. *Varas S. M., Muoz E. M., Hapon M. B. et al.* // Reproduction. – 2002. – **124**. – P. 691–702.
19. *Jorns A., Tiedge M., Lenzen S.* // Diabetologia. – 2002. – **45**. – P. 851–855.
20. *Funahashi H., Imai T., Tanaka Y. et al.* // Jpn. J. Cancer. Res. – 1999. – **90**. – P. 922–927.
21. *Lowe M. N., Plosker G. L.* // Am. J. Clin. Dermatol. – 2000. – **1**(4). – P. 245–250.

22. *Petrovici A., Schmid K. W., Faessler A. et al.* // Phys. Rev. C. Nucl. Phys. – 1996. – **53**(5). – P. 2134–2141.
23. *Cordes N., Rödel F., Rodemann H. P.* // Strahlenther. Onkol. – 2012. – Suppl 3. – P. 308–311.
24. *Агол В. И.* // Сорос. образов. журн. – 1996. – № 6. – С. 20–24.
25. *Чиссов В. И., Старинский В. В., Ковалев Б. Н.* Состояние и перспективы развития онкологической службы в России / Гормонозависимые опухоли: Мат. IX Всерос. конфер. онкологов. – С.-Петербург, 2002. – С. 17–21.
26. *Пожарисский К. М., Линман Е. Е.* // Архив патологии. – 2000. – № 5. – С. 3–11.
27. *Тарутинов В. И., Досенко И. В., Шпилёв С. И.* Принципы формирования индивидуальных планов этапного лечения больных раком молочной железы с учетом основных патогенетических форм заболевания / Метод. рекомендации. – 2003, Киев. – 18 с.