

ОСОБЕННОСТИ РАЗВИТИЯ КАРЦИНОМЫ ЛЕГКОГО ЛЬЮИСА НА ФОНЕ ГИПЕРТИРЕОЗА У МЫШЕЙ ОБОЕГО ПОЛА

Франциянц Е.М.¹, Каплиева И.В.¹, Васильева Е.О.¹, Нескубина И.В.¹, Сурикова Е.И.¹, Трепитаки Л.К.¹, Качесова П.С.¹, Черярина Н.Д.¹, Верескунова А.А.²

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Ростов-на-Дону, e-mail: sunsur2000@mail.ru;

²ФГБОУ ВО Ростовский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации, Ростов-на-Дону

Выявленная взаимосвязь повышенного общего риска развития солидного рака с высоким уровнем свободного тироксина, а также стимулирующий эффект тиреоидных гормонов на рост злокачественных опухолей диктуют необходимость изучения патогенетических механизмов этих явлений. Целями работы были создание экспериментальной модели роста карциномы легких Льюиса (LLC) на фоне гипертиреоза у мышей обоего пола и оценка влияния гиперфункции щитовидной железы на развитие злокачественной опухоли. В создании модели использовали самок и самцов мышей C57BL (n=40). Гипертиреоз моделировали внутрибрюшинным введением лиотиронина натрия (Тирумел, Турция) в дозе 20 мкг на 100 г массы мыши в 0,5 мл физиологического раствора ежедневно в течение всего эксперимента, подтверждая определением в крови уровня тиреотропного гормона и общих форм тиреоидных гормонов Т3 и Т4 радиоиммунным методом. В основной группе (n=24) при получении стойкого гипертиреоза мышам перевивали LLC подкожно. Контрольная группа (n=16) – мыши с перевивкой LLC без введения экзогенного Т3. Были показаны более быстрая динамика объема опухолей, увеличение количества метастатических очагов в легких, уменьшение продолжительности жизни мышей обоего пола в основной группе. Результаты свидетельствуют об усилении злокачественного потенциала LLC на фоне гипертиреоза и о возможности использования разработанной модели для изучения патогенеза опухолевого процесса в условиях коморбидной патологии – гиперфункции щитовидной железы.

Ключевые слова: онкология, гипертиреоз, коморбидная патология, карцинома легкого Льюиса, мыши, экспериментальная модель, половые различия.

FEATURES OF DEVELOPMENT OF LEWIS LUNG CARCINOMA DURING HYPERTHYROIDISM IN MICE OF BOTH SEXES

Frantsiyants E.M.¹, Kaplieva I.V.¹, Vasileva E.O.¹, Neskubina I.V.¹, Surikova E.I.¹, Trepitaki L.K.¹, Kachesova P.S.¹, Cheryarina N.D.¹, Vereskunova A.A.²

¹FSBI «National Medical Research Centre for Oncology of the Ministry of Health of Russia», Rostov-on-Don, e-mail: sunsur2000@mail.ru;

²FSBI of Higher Education «Rostov State Medical University» of the Ministry of Health of Russian Federation, Rostov-on-Don

The revealed relationship between the increased overall risk of solid cancer development and high levels of free thyroxine, as well as the stimulating effect of thyroid hormones on the growth of malignant tumors necessitates the study of the pathogenetic mechanisms of these phenomena. The purpose of the study was to create an experimental model of Lewis lung carcinoma (LLC) growth in the background of hyperthyroidism in mice of both sexes and to evaluate the effect of thyroid hyperfunction on the development of malignant tumors. Female and male C57BL mice (n=40) were used to create the model. Hyperthyroidism was modeled by intraperitoneal injection of sodium liothyronine (Tiromel, Turkey) at a dose of 20 µg per 100 g of mouse weight in 0.5 ml of physiological solution daily throughout the experiment, confirmed by determining the level of thyroid-stimulating hormone and general forms of thyroid hormones T3 and T4 in the blood by radioimmune method. In the main group (n=24), when persistent hyperthyroidism was obtained, mice were transfected with LLC subcutaneously. Control group (n=16) consisted of mice with LLC transplantation without administration of exogenous T3. Faster dynamics of tumor volume, increased number of metastatic foci in the lungs, decreased life expectancy of mice of both sexes in the main group were shown. The results indicate the increased malignant potential of LLC against the background of hyperthyroidism and the possibility of using the developed model to study the pathogenesis of the tumor process in conditions of comorbid pathology – thyroid hyperfunction.

Keywords: oncology, hyperthyroidism, comorbid pathology, Lewis lung carcinoma, mice, experimental model, sex differences.

Тиреоидные гормоны оказывают широкий спектр физиологических эффектов практически на все ткани и метаболические пути. Основными гормонами, вырабатываемыми щитовидной железой, являются тироксин (или тетраiodтиронин) и трийодтиронин. В клетках тиреоидные гормоны оказывают геномное действие, опосредуемое главным образом ядерными тиреоидными рецепторами, изменяющими экспрессию генов. Трийодтиронин является предпочтительным лигандом тиреоидных рецепторов, тогда как тироксин, концентрация которого в сыворотке крови в 100 раз выше, чем другого гормона щитовидной железы, подвергается экстратиреоидному превращению в трийодтиронин. Это превращение катализируется 5'-дейодиназами 1 и 2 – ферментами, активирующими тиреоидные гормоны. Регуляция дейодиназ позволяет клеточно-целенаправленно регулировать гомеостаз щитовидной железы, влияя на метаболические пути как в здоровом организме, так и при патологии [1].

Растущее число исследований выявило стимулирующий эффект тиреоидных гормонов на рост злокачественных опухолей [2, 3, 4]. В некоторых обсервационных исследованиях были получены аналогичные результаты. Например, в проспективном когортном исследовании более 10 000 участников, проведенном Sr. Khan et al. (2016), было показано, что более высокие уровни свободного тироксина были связаны с более высоким общим риском развития солидного рака (скорректированный ОР 1,42) [5]. Ассоциация была несколько ослаблена за счет пациентов, принимавших препараты, влияющие на щитовидную железу. Такое влияние обусловлено тем, что тиреоидные гормоны, специфически воздействуя на мембранные и ядерные рецепторы, приводят к активации различных канцерогенных сигнальных путей, тем самым стимулируя рост клеток, ангиогенез и ингибируя апоптоз. Например, трийодтиронин через тиреоидные рецепторы может активировать проканцерогенный сигнальный путь фосфатидилинозитол-3 киназы (PI3K), усиливая транскрипцию целевых генов и экспрессию гипоксиииндуцируемого фактора, индуцируемого гипоксией, – 1-альфа (HIF-1 α) [6]. Среда, адаптированная к гипоксии с активацией ангиогенеза, имеет решающее значение для роста опухолевых клеток, инвазии и метастазирования.

Различные экспериментальные модели на грызунах интенсивно используются для исследования как гипотиреоза [7], так и гипертиреоза [8, 9]. Аутоиммунный гипертиреоз моделируют путем инъекции аденовируса или плазмиды, связанных с рецептором тиреотропного гормона. Неаутоиммунные формы гипертиреоза в основном вызываются добавками искусственного тироксина, который вводится с питьевой водой в виде растворенного левотироксина или путем внутрибрюшинных инъекций [10]. Показано, что у мышей линии C57BL/6NTac, которым внутрибрюшинно вводили левотироксин в дозе 1 мкг/г массы тела в течение шести недель, наблюдался гипертиреоз [11]. Примечательно, что

внутрибрюшинные инъекции левотироксина не следует делать с интервалом более 48 часов. В противном случае может возникнуть транзиторный гипотиреоз, который может быть связан с ингибированием гипофизарно-тиреоидной оси [11]. Тем не менее, гипертиреоз, вызванный экзогенным тироксином, является временным, а не постоянным, и его нельзя отделить от непрерывного приема гормонов щитовидной железы. Протоколы индукции гипертиреоза у мышей сильно различаются и в основном включают краткосрочное введение тиреоидных гормонов.

Важным аспектом моделирования опухолевого процесса и тиреоидной дисфункции является использование животных обоего пола, так как известны половые особенности тиреоидного гомеостаза и насыщенности ткани опухоли тиреоидными гормонами в динамике экспериментального опухолевого процесса [12]. Кроме этого, Эндокринное общество подчеркивает важность такой переменной, как пол животного, и необходимость учитывать его в фундаментальной науке и в клинических исследованиях [13].

Цели исследования: создание экспериментальной модели роста карциномы легких Льюиса (LLC) на фоне гипертиреоза и оценка влияния этой патологии на развитие злокачественной опухоли у мышей обоего пола.

Материал и методы исследования. Экспериментальную модель развития злокачественной опухоли в условиях гипертиреоза создавали, используя самок (n=20) и самцов (n=20) мышей линии C57BL/6, полученных из ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА» (филиал «Андреевка», Московская область). Для моделирования состояния гипертиреоза животным внутрибрюшинно вводили лиотиронин натрия (Тиромель, Турция), в дозе 20 мкг на 100 г массы мыши в 0,5 мл физиологического раствора ежедневно 1 раз в сутки в течение всего эксперимента. В сыворотке крови животных определяли содержание тиреотропного гормона (ТТГ) и общих форм тиреоидных гормонов: трийодтиронина и тироксина – радиоиммунным методом с помощью стандартных наборов (Immunotech, Чехия). При получении стойкого гипертиреоза в течение 3 дней от начала введения (увеличение уровня трийодтиронина в сыворотке $5,0 \pm 2,2$ нмоль/л против $1,74 \pm 0,17$ нмоль/л в интактной группе) животным по стандартной методике перевивали LLC в дозе 2 млн клеток в 0,5 мл физиологического раствора (основная группа, n=24). Для этого, соблюдая все условия асептики, фиксировали мышь спиной кверху, предварительно сбрав шерсть и обработав кожу 5%-ным спиртовым раствором йода, и вводили опухолевую взвесь подкожно в обработанную кожную складку. При извлечении иглы место введения плотно прижимали ватным тампоном, смоченным в 70%-ном спирте с небольшим добавлением йода, на 1 минуту, чтобы исключить вытекание вводимой взвеси. Все манипуляции с животными производили в стерильном боксе. Инструменты, посуду, руки дезинфицировали общепринятым способом.

Контролем служили мыши обоего пола с подкожной перевивкой LLC (n=16) в той же дозе и объеме, что и у животных из основной группы, но без введения экзогенного трийодтиронина. Животных декапитировали в предтерминальном состоянии. Работу осуществляли в соответствии с директивой 2010/63/ЕИ и приказом Минздрава России от 19 июня 2003 г. № 267 «Об утверждении правил лабораторной практики». Дизайн экспериментального исследования был одобрен комиссией по биоэтике ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России (Протокол № 2/212 от 19.01.2023 г.).

Статистическую обработку полученных результатов проводили в программе STATISTICA 10.0 (StatSoft Inc., США). Проверку ряда на нормальность распределения оценивали с помощью критерия Шапиро–Уилка. Значимость различий средних независимых выборок оценивали с помощью параметрического критерия Стьюдента при равенстве дисперсий и непараметрического критерия Манна–Уитни, когда дисперсии были не равны, при количестве сравниваемых групп не более двух. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение. Результаты изучения содержания гормонов щитовидной железы в сыворотке крови экспериментальных животных представлены в таблице 1.

Таблица 1

Уровень гормонов щитовидной железы в сыворотке крови мышей обоего пола с LLC

Гормоны Группы	ТТГ (мМЕ/л)	Т4 (нмоль/л)	Т3 (нмоль/л)
самки			
Опухоль LLC (контроль)	0,063±0,003	47,1±3,2	1,70±0,09
Экзогенный Т3 + LLC (основная группа)	0,003±0,000*	58,9±4,1*	2,67±0,03*
самцы			
Опухоль LLC (контроль)	0,090±0,001	42,5±2,5	1,4±0,07
Экзогенный Т3 + LLC	0,053±0,005*	59,3±1,7*	2,83±0,03*

(основная группа)			
-------------------	--	--	--

Примечание: Исследование проведено на момент эвтаназии. * – статистически значимые различия по сравнению с группой животных с опухолью LLC и эутиреозом соответствующего пола, $p < 0,05$. Т4 – тироксин, Т3 – трийодтиронин, ТТГ – тиреотропный гормон, LLC – карцинома легкого Льюиса.

У самок мышей с LLC, получавших экзогенный трийодтиронин, установлено повышение в крови уровня тироксина в 1,3 раза ($p < 0,05$), трийодтиронина в 1,6 раза ($p < 0,05$) и снижение ТТГ в 21,0 раза по сравнению с показателями у мышей с ростом опухолей на фоне эутиреоза (табл. 1). У самцов мышей с LLC, получавших экзогенный трийодтиронин, установлено повышение уровня тироксина в 1,4 раза ($p < 0,05$), трийодтиронина в 2,0 раза и снижение ТТГ в 1,7 раза ($p < 0,05$) по сравнению с показателями у животных только с опухолью (табл. 1). Животные с гипертиреозом на фоне повышенного потребления еды теряли в весе, зарегистрировано ухудшение внешнего вида кожи и волосяного покрова. Шерсть была тусклая, собиралась клочьями, отмечалось ее повышенное выпадение (рис. 1, 2).



Рис. 1. Слева самец с LLC на фоне гипертиреоза, справа самец с LLC на фоне эутиреоза

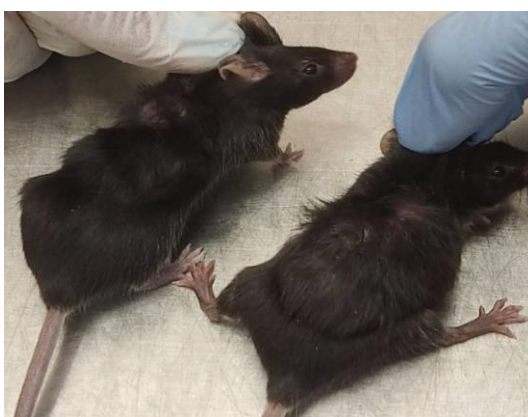


Рис. 2. Слева самка с LLC на фоне эутиреоза, справа самка с LLC на фоне гипертиреоза

Особенности роста опухолей у мышей LLC обоего пола на фоне гипертиреоза по сравнению с ростом опухолей на фоне эутиреоза представлены в таблице 2.

Таблица 2

Особенности злокачественного процесса у мышей обоего пола с LLC

Экспериментальные группы	Самцы		Самки	
	Опухоль LLC (контроль)	Экзогенный Т3 + LLC (основная группа)	Опухоль LLC (контроль)	Экзогенный Т3 + LLC (основная группа)
Показатель	на 4-е сутки		на 3-и сутки	
	У 6 из 8 (у 75%)	У 12 из 12 (у 100%)	У 7 из 8 (у 88%)	У 11 из 12 (у 92%)
Внешние некрозы	на 13-е сутки		на 18-е сутки	
	у всех мышей в виде кровавой корки сверху, площадь большая	у всех мышей в виде проплешин на опухолях (сбоку, где узкая часть)	у 4 из 8	у 10 из 12
Форма опухолей	округлая	подковообразная	округлая	уплощенная
Продолжительность жизни мышей	34,9±0,5	27,7±0,2*	32,8±0,1	27,2±0,4*
Метастазы в легких (на момент эвтаназии)	единичные	множественные	умеренное количество	множественные

Примечание: * – статистически значимые различия по сравнению с показателями у животных контрольной группы (с LLC), $p < 0,05$. Т3 – трийодтиронин, LLC – карцинома легкого Льюиса.

Результаты наблюдения показали более активный рост подкожных опухолевых узлов у самок контрольной группы (рост опухоли на фоне эутиреоза) на начальном этапе – 5-е сутки от момента перевивки: объем опухолей у самок превышал объем опухолей у самцов в 10,5 раза (табл. 3). Однако начиная уже с 7-х суток и до 28-х суток включительно объем подкожных опухолей у самцов контрольной группы становился больше, чем у самок: на 7-е сутки в 2,0 раза, на 11-е сутки в 10,8 раза, на 14-е сутки в 5,5 раза, на 18-е сутки в 4,7 раза, на 21-е сутки в 3,6 раза, на 25-е сутки в 2,6 раза, на 28-е сутки в 1,5 раза ($p < 0,05$) (табл. 3). Динамика объема опухоли в основной группе (рост опухоли на фоне гипертиреоза) свидетельствовала об активации злокачественного процесса под влиянием гипертиреоза на всех этапах исследования и у самцов, и у самок мышей. На всех этапах злокачественного роста у мышей обоего пола с LLC и избытком трийодтиронина объем опухолей был статистически значимо больше: у самцов – на 5-е сутки в 3,9 раза, на 7-е сутки в 1,4 раза, на 11-е сутки в 1,5 раза, на 14-е сутки в 1,4 раза, на 18-е и 21-е сутки в 1,3 раза, на 25-е сутки в 2,1 раза, на 28-е сутки в

1,7 раза; у самок – на 7-е сутки в 1,1 раза, на 11-е сутки в 3,6 раза, на 14-е сутки в 2,1 раза, на 18-е и 21-е сутки в 2,2 раза, на 25-е сутки в 2,4 раза, на 28-е сутки в 1,7 раза (табл. 3). Следовательно, в период с 11-е по 21-е сутки после перевивки у самок с гипертиреозом наблюдалось более быстрое увеличение объема опухолей по сравнению с контролем, чем у самцов. Возможно, причина этой особенности связана с бóльшими объемами опухолей у самцов. Некрозы кожи над опухолями визуализировались у всех самцов основной и контрольной группы уже через 2 недели от момента перевивки опухолевого материала, у самок – на 5 дней позже и не у всех животных: у 50% самок контрольной группы и у 83% самок основной группы (табл. 2).

Таблица 3

Динамика объема подкожных опухолевых узлов (см³) у мышей обоего пола с LLC

Экспериментальные группы	Самцы		Самки	
	Опухоль LLC (контроль)	Экзогенный ТЗ + LLC (основная группа)	Опухоль LLC (контроль)	Экзогенный ТЗ + LLC (основная группа)
Сутки после перевивки опухоли				
5-е сутки	0,02±0,007	0,09±0,05*	0,21±0,08	0,15±0,05
7-е сутки	0,30±0,07	0,42±0,11*	0,15±0,06	0,19±0,03*
11-е сутки	3,35±0,60	5,10±0,30*	0,31±0,08	1,13±0,25*
14-е сутки	4,60±0,66	6,26±0,30*	0,83±0,19	1,70±0,39*
18-е сутки	4,97±0,51	6,51±0,50*	1,05±0,25	2,26±0,36*
21-е сутки	9,37±1,09	12,42±0,57*	2,58±1,10	5,69±0,60*
25-е сутки	6,74±0,62	13,88±0,42*	2,57±0,42	6,24±0,61*
28-е сутки	9,50±1,68	15,87±0,34*	6,44±1,09	10,91±0,95*
32-е сутки	11,48±0,54	–	9,23±0,71	–

Примечание * – статистически значимые различия по сравнению с эутиреодными животными соответствующего пола, p<0,05

Заключение. Созданная экспериментальная модель влияния гипертиреоза на развитие злокачественной опухоли – карциномы легкого Льюиса у мышей линии C57Bl/6 обоего пола – вызывает стимуляцию роста подкожных опухолей, усиление метастазирования в легкие и уменьшение продолжительности жизни животных, то есть увеличение злокачественного потенциала опухолей. Разработанная модель дает возможность изучать патогенетические механизмы развития злокачественной опухоли на фоне гипертиреоза как коморбидной патологии, а также проводить поиск эффективных воздействий на опухоль. Причем у самок

течение злокачественного процесса на фоне гипертиреоза имеет отличные от самцов особенности, что требует дальнейших исследований.

Список литературы

1. de Lange P., Cioffi F., Senese R., Chiellini G. Editorial: Thyroid hormone and metabolites: central versus peripheral effects, volume II // *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2023. Vol. 14. P. 1241233. DOI: 10.3389/fendo.2023.1241233.
2. Yuan S., Kar S., Withayathil M., Carter P., Mason A.M., Burgess S., Larsson S.C. Causal associations of thyroid function and dysfunction with breast cancer overall and thyroid cancer: a randomized trial. according to Mendel with two samples // *Int. J. Cancer*. 2020. Vol. 147. Is. 7. P. 1895–1903. DOI: 10.1002/ijc.32988].
3. Petranovich Ovcaricek P., Verburg F.A., Hoffman M., Iakovu I., Mihailovic J., Vracimis A., Luster M., Giovanella L. Increased thyroid hormone levels and cancer // *Eur. J. Nucl Med. Mol Imag.* 2021. Vol. 48. Is. 3. P. 808-821. DOI: 10.1007/ s00259-020-05018-z 5.
4. Xu F., Chen Z. Causal associations of hyperthyroidism with prostate cancer, colon cancer, and leukemia: a Mendelian randomization study // *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2023. Vol. 14. P. 1162224. DOI: 10.3389/fendo.2023.1162224.
5. Khan Sr., Chaker L., Ruiter R., Aerts J.J., Hoffman A., Degan A., Franco O.H., Stricker B.H.C., Peeters R.P. Thyroid function and cancer risk: the Rotterdam study // *J. Clin. Endocrinol Metab.* 2016. Vol. 101. Is. 12. P. 5030-5036. DOI: 10.1210/jc.2016-2104.
6. Meller L.C., Dumitrescu A.M., Walker R.L., Meltzer P.S., Refetoff S. Thyroid hormone-responsive genes in cultured human fibroblasts // *J. Clin. Endocrinol Metab.* 2005. Vol. 90. Is. 2. P. 936–943. DOI:10.1210/jc.2004-1768.
7. Франциянц Е.М., Бандовкина В.А., Каплиева И.В., Сурикова Е.И., Нескубина И.В., Погорелова Ю.А., Трепитаки Л.К., Черярина Н.Д., Немашкалова Л.А., Аракелова А.Ю. Изменение патофизиологии роста опухоли и функциональной активности гипоталамо-гипофизарнотиреоидной оси у крыс обоего пола с карциномой Герена на фоне гипотиреоза // *Южно-Российский онкологический журнал*. 2022. Т. 3. № 4. С. 26-39. DOI: 10.37748/2686-9039-2022-3-4-3.
8. Eckstein A., Philipp S., Goertz G., Banga J.P., Berchner-Pfannschmidt U. Lessons From Mouse Models of Graves' Disease // *Endocrine*. 2020. Vol. 68. Is. 2. P. 265-270. DOI: 10.1007/s12020-020-02311-7.

9. Zhang M., Jiang W., Lu G., Wang R., Lv Z., Li D. Insight Into Mouse Models of Hyperthyroidism // *Frontiers in endocrinology*. 2022. Vol. 13. P. 929750. DOI: 10.3389/fendo.2022.929750.
10. Sheng C.X., Zhang C.J., Li Y.Z., Sun Y.M. Effect of β -Casomorphin-7 on Myocardial Hypertrophy in Hyperthyroidism-Induced Cardiomyopathy // *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2020. Vol. 24. Is. 11. P. 6380–6389. DOI: 10.26355/eurrev_202006_21536.
11. Engels K., Rakov H., Zwanziger D., Hönes G.S., Rehders M., Brix K., Köhrle J., Möller L.C., Führer D. Efficacy of Protocols for Induction of Chronic Hyperthyroidism in Male and Female Mice // *Endocrine*. 2016. Vol. 54. Is 1. P. 47–54. DOI: 10.1007/s12020-016-1020-8.
12. Кит О.И., Франциянц Е.М., Бандовкина В.А., Черярина Н.Д. Половые различия функционирования щитовидной железы в динамике роста перевивной меланомы B16/F10 у мышей // *Российский онкологический журнал*. 2016. Т. 21. № 5. С. 253-258. DOI: 10.18821/1028-9984-2016-21-5-253-258.
13. Hammes S.R. Editorial: Sex matters in preclinical research // *Mol. Endocrinol*. 2014. Vol. 28. Is. 8. P. 1209–1210. DOI: 10.1210/me.2014-1209.