

ОПУХОЛЕВАЯ ПРОГРЕССИЯ ГЛИОБЛАСТОМЫ C6 ПРИ ИЗМЕНЕННОМ ТИРЕОИДНОМ СТАТУСЕ

© Дмитрий Евгеньевич Фисенко¹, Ярослав Вячеславович Козар¹, Расул Мурадисович Раджабов¹, Сергей Николаевич Прошин¹, Руслан Иванович Глушаков²

¹Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова. 195067, Санкт-Петербург, Пискаревский проспект, 47.

²Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова. 194044, Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, 6.

Контактная информация: Дмитрий Евгеньевич Фисенко — студент 4 курса факультета общей медицины Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова. E-MAIL: dmitfis@gmail.com.

РЕЗЮМЕ: цель работы заключается в исследовании влияния индуцированного медикаментозно гипотиреоза на продолжительность жизни лабораторных животных с предварительно перевитой глиобластомой. Исследование представляло собой две последовательные серии экспериментов, в которых участвовали 6 и 40 лабораторных мышей соответственно. Каждому из этих животных в боковой желудочек мозга перевивалась культура клеток глиобластомы C6. Лабораторные животные в рамках каждой серии подразделялись на две группы в зависимости от тиреоидного статуса: контрольная (эутиреоидная) группа и гипотиреоидная группа. В ходе экспериментов сравнивалась продолжительность жизни мышей контрольной и гипотиреоидной групп. По итогам данных установлена взаимосвязь тиреоидного статуса организма и уровня опухолевой прогрессии глиобластомы C6. В первой экспериментальной группе, состоявшей из 6 мышей, средняя продолжительность жизни в сутках составила $9,0 \pm 1,0$ дней для контрольной подгруппы, $19,0 \pm 2,0$ дней для подгруппы индуцированного гипотиреоза. Во второй экспериментальной группе, включавшей в себя 40 лабораторных животных, медиана выживаемости составила $8,9 \pm 0,6$ для эутиреоидной подгруппы, $18,7 \pm 1,7$ суток для подгруппы индуцированного гипотиреоза, в целом соответствуя результатам, полученным в ходе первого эксперимента. Из полученных результатов следует, что индуцированный гипотиреоз является фактором, снижающим скорость прогрессирования глиобластомы.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: тиреоидный статус, глиобластома, гипотиреоз, опухоли головного мозга.

THE NEOPLASTIC PROLIFERATION OF GLIOBLASTOMA C6 PROVIDED BY EXPERIMENTALLY CHANGED THYROID STATE

© Dmitry E. Fisenko¹, Yaroslav V. Kozar¹, Rasul M. Radjabov¹, Sergei N. Proshin¹, Ruslan I. Glushakov²

¹North-West State Medical University named after I.I. Mechnikov 195067, Russia, St. Petesburg, Piskarevskii prospect 47

²S.M. Kirov Military Medical Academy 194044, Russia, St. Petesburg, Academician Lebedev st., 6

Contact Information: Dmitry E. Fisenko — 4th year student of the Faculty of General Medicine, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov. E-mail: dmitfis@gmail.com.

ABSTRACT: The aim of the work lies in studying the effect of drug-induced hypothyroidism on the life expectancy of laboratory animals with previously transplanted glioblastoma. The study was two consecutive series of experiments in which 6 and 40 laboratory mice participated, respectively. The C6 glioblastoma cell culture was transplanted in the lateral ventricle of the brain

in each of these animals. Laboratory animals within each series were divided into two groups depending on thyroid status: control (euthyroid) group and hypothyroid group. During the experiments, the life expectancy of mice of the control and hypothyroid groups was compared. According to the data, the relationship between the thyroid status of the organism and the level of tumor progression of glioblastoma C6 was established. In the first experimental group consisting of 6 mice, the average life expectancy per day was 9.0 ± 1.0 days for the control subgroup, 19.0 ± 2 days for the hypothyroid subgroup. In the second experimental group, which included 40 laboratory animals, the median survival was 8.9 ± 0.6 for the euthyroid subgroup, 18.7 ± 1.7 days for the subgroup of induced hypothyroidism, generally consistent with the results obtained during the first experiment. Based on the results, it follows that induced hypothyroidism is a factor that reduces the rate of glioblastoma progression.

KEY WORDS: Thyroid state, glioblastoma, hypothyroidism, brain tumors.

АКТУАЛЬНОСТЬ

Глиобластома — одна из самых частых и самых агрессивных форм опухолей головного мозга, характеризующаяся массивной и диффузной инфильтрацией в окружающие неповрежденные ткани мозга, интенсивным ангиогенезом и высоким показателем опухолевой гетерогенности. Около 17% всех внутримозговых опухолей и 54% всех глиом представлены глиобластомами [9]. Глиобластома быстро приводит к летальному исходу даже при интенсивном лечении, поскольку ее течение осложняется частыми рецидивами. Заболевание манифестирует, как правило, в возрасте от 60 до 80 лет, поэтому в последнее время ввиду старения населения регистрируется большее число случаев заболеваемости глиобластомой. На данный момент глиобластома является неизлечимым заболеванием, средняя продолжительность жизни больного — от 10 до 11 месяцев при стандартном лечении, которое включает в себя хирургические операции и химиотерапию. Кроме того, пятилетняя выживаемость больных, страдающих данным заболеванием, составляет не более, чем 3–5%. Глиобластома ассоциирована с такими факторами, как генетические мутации и воздействие ионизирующего излучения и, помимо этого, с тиреоидным статусом организма [8].

Гормоны щитовидной железы являются ключевыми регуляторами биохимических процессов в биологических системах. Осуществление биологических функций гормонами щитовидной железы во многом зависит от стимулов окружающей среды. На основании воздействия данных стимулов происходит регулирование уровня метаболизма и другие адаптивные изменения гомеостаза. Тиреоидные гормоны участвуют в процессах клеточной пролиферации, дифференцировки клеток и их созревания [2]. Точкой приложения яв-

ляются рецепторы к тиреоидным гормонам четырех типов. Тип экспрессируемого клеткой рецептора зависит от органоспецифичности и стадии клеточного цикла, в которой клетка пребывает в данный момент [1]. Гормоны щитовидной железы являются эссенциальными факторами в процессах роста и развития нервной ткани, осуществлении адекватного энергетического обеспечения центральной и периферической нервной системы. Согласно недавним исследованиям, было установлено, что гормоны щитовидной железы приводят к увеличению экспрессии на поверхности клеток интегрина $\alpha v \beta 3$, в результате взаимодействия с которым происходит индукция пролиферации опухолевых клеток, ангиогенеза, а также увеличение инвазивности опухолевой ткани и метастазирование, что существенно усугубляет течение заболевания [3, 6]. Блокирование данных эффектов тиреоидных гормонов посредством введения больных глиобластомой в гипотиреоз может значительно улучшить качество жизни пациентов, поскольку приводит к торможению опухолевой прогрессии, а, следовательно, и ослаблению эффектов, вызываемых опухолью [5].

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучить влияние медикаментозно измененного тиреоидного статуса на продолжительность жизни лабораторных животных с перевитой глиобластомой.

МЕТОДИКА

Лабораторные животные.

В эксперименте использовались самки и самцы беспородных мышей весом 180–220 грамм и возрастом 40 ± 10 дней. Мыши имели свободный доступ к воде и пище, содержались

в стандартных условиях вивария (температура 20–22°C, двенадцатичасовой цикл темного и светлого времени суток). Экспериментальные действия выполнялись согласно этическим принципам обращения с лабораторными животными и одобрены Локальным этическим комитетом. Длительность карантина (акклиматизационного периода) для всех мышей составляла не менее 10–14 дней. В течение карантина проводили осмотр каждого животного (поведение и общее состояние) дважды в день: в утренние и вечерние часы. Лабораторные животные с подозрением на любое заболевание и/или имеющие изменения в поведении исключались из исследования в течение карантина. После окончания карантина лабораторные животные были рандомизированно распределены на 2 равные экспериментальные группы, контрольную и гипотиреоидную.

Модель глиобластомы С6.

Модель глиобластомы воспроизводилась с использованием клеток мышинной глиобластомы линии С6, полученных от мышей, которые длительно подвергались воздействию канцерогена. Для накопления материала клетки интравентрикулярно трансплантировались 8–9 мышам, не включенным в исследование. Инокуляцию разведенного в физиологическом растворе ликвора проводили на каждом из 46 лабораторных животных

Модель гипотиреоза

На мышах, в результате рандомизированного отбора попавших в гипотиреоидную группу, в ходе данного эксперимента была воспроизведена модель индуцированного медикаментозного гипотиреоза, а оставшиеся животные служили контрольной подгруппой для сравнения. Модель гипотиреоза была получена путём добавления пропилитиоурацила мышам в воду для питья в расчетах по 2 мг на 100 г массы тела животного 1 раз в сутки. Для индукции гипотиреоза из наиболее распространённых тиреостатиков был выбран именно пропилитиоурацил в связи с его фармакодинамическими свойствами: дополнительное ингибирование дейодиназы в периферических тканях и высокий профиль безопасности.

Стереотаксис

Стереотаксические операции осуществлялись под неингаляционной анестезией (пропофол 2% в/в). Метамизол (2мг/мл) добавлялся в воду для питья для аналгезии за 3 дня до и 3 дня после проведения стереотаксической операции. Трансплантация опухоли проводилась через трепанационное отверстие в височной кости на расстоянии 2–3 мм



Рис. 1. Выполнение трансплантации клеток глиобластомы животному.

от сагиттального шва и 2 мм каудальнее венозного шва. Кожа животных обрабатывалась спиртом и затем йодом. Отверстие проделывалось зубоорточным бором. Мыши подвергались инокуляции не менее 1×10^7 клеток опухоли, содержащихся в 0,5 мл разведенного в физиологическом растворе ликвора. Шприцом на глубину 3–4 мм в головной мозг, достигая дна правого бокового желудочка, вводились опухолевые клетки.

Оценка продолжительности жизни

День трансплантации опухоли принимался за нулевой, а день, предшествующий дню смерти, считался последним днем жизни. Аутопсия производилась в первые 12 часов после смерти животного. Статистический анализ полученных данных осуществлялся посредством персонального компьютера с помощью таких программ, как Excel, GraphPadPrism 7. Для сравнения продолжительности жизни мышей использовались средние величины со стандартной статистической ошибкой. Статистический анализ кривых выживаемости производился с вовлечением критерия Лилиефольда, а построение кривых производилось методом Каплана-Мейера. Стандартная ошибка выживаемости подсчитывалась по формуле Гринвуда. Данные признавались статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

По итогам данных, полученных в ходе 2 серий экспериментов, установлена взаимосвязь тиреоидного статуса организма и уровня опухолевой прогрессии глиобластомы С6. Продолжительность жизни перевитых лабораторных животных в зависимости от уровня тиреоидных гормонов представлена в таблицах 1 и 2 для первой и второй серии экспериментов соответственно.

В первой экспериментальной группе, состоявшей из 6 мышей, средняя продолжительность жизни в сутках составила $9,0 \pm 1,0$ дней для контрольной группы, $19,0 \pm 2,0$ дней для группы индуцированного гипотиреоза. Во второй экспериментальной группе, включавшей в себя 40 лабораторных животных, медиана выживаемости составила $8,9 \pm 0,6$ для контрольной группы, $18,7 \pm 1,7$ суток для группы индуцированного гипотиреоза, в целом соответствуя результатам, полученным в ходе первого эксперимента.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Культура клеток глиобластомы С6, использованная в исследовании, привела к развитию глиобластомы у всех лабораторных животных

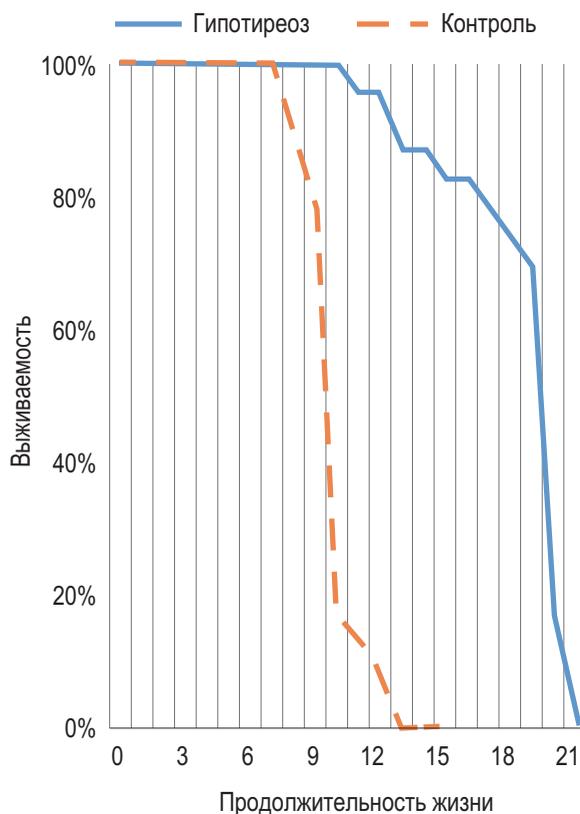


Рис. 2. Кривые выживаемости лабораторных животных гипотиреоидной и контрольной подгрупп.

Таблица 1

Влияние тиреоидного статуса на продолжительность жизни мышей с перевитой глиобластомой С6

Подгруппа	Продолжительность жизни лабораторных животных							
	Мин (сут)	Количество живых особей в группах по дням эксперимента, сутки						Макс. (сут)
		8	9	10	17	18	21	
Контрольная подгруппа	8	3	2	1	0	0	0	10
Подгруппа гипотиреоза	18	3	3	3	3	2	1	21

Таблица 2

Продолжительность жизни лабораторных мышей с различным тиреоидным статусом в рамках второй серии экспериментов

Подгруппа	Продолжительность жизни лабораторных животных											
	Мин (сут)	Количество живых особей в группах по дням эксперимента (абсолютная)										Макс (сут)
		7	8	9	10	13	15	17	19	20	21	
Контрольная подгруппа	7	20	18	16	3	0	0	0	0	0	0	10
Подгруппа гипотиреоза	14	20	20	20	20	20	19	18	17	4	1	21

(46/46), что регистрировалось по результатам аутопсии и значимой потере животных в массе тела. Данный факт наглядно демонстрирует высокую биологическую агрессивность использованной линии глиобластомы. И статистические расчеты, и экспериментальные наблюдения наглядно демонстрируют значимость влияния медикаментозно индуцированного пропилтиоурацилом гипотиреоза на продолжительность жизни лабораторных животных с глиобластомой.

Согласно результатам исследований, полученных на других моделях опухолей, гипотиреоидные состояния уменьшают агрессивность опухолевой ткани, инвазивность опухолей и ангиогенез в опухолевом очаге. Существует несколько взглядов на природу данного явления: одни авторы полагают, что такие эффекты тиреоидных гормонов, как стимуляция пролиферации опухолевых клеток, ангиогенез, миграция и метастазирование реализуются через интегрин $\alpha v \beta 3$, также повышающий экспрессию на поверхности клеточной мембраны третьего типа человеческой салидазы (NEU3). С NEU3 и её влиянием на ряд клеточных структур связано увеличение радиорезистентности опухолевой ткани и повышение эффективности систем репарации в очаге [7, 10]. Некоторые исследователи полагают, что тиреоидные гормоны влияют на опухолевый процесс через стимуляцию синтеза аквапорина 4, который, как предполагается, может выполнять роль потенциального канала для распространения опухолевых клеток [4].

Как бы то ни было, но достоверным по результатам нашего исследования является наличие прямой корреляционной связи между уровнем тиреоидных гормонов в организме лабораторного животного и степенью агрессивности глиобластомы С6.

ВЫВОДЫ

1. Уровень тиреоидных гормонов определяет прогрессирование глиобластомы и степень выраженности клинических проявлений, существенно влияет на продолжительность жизни лабораторных животных.
2. Индуцированный гипотиреоз приводит к достоверному увеличению медианы выживаемости среди лабораторных мышей с перивитой глиобластомой.

ЛИТЕРАТУРА

1. Колотов К.А., Машковцев О.В., Бейн Б.Н. Иммуногистохимические особенности глиальных опухолей

головного мозга. Медицинский альманах. 2012; 4: 66–9.

2. Усова Н.Н. Йодсодержащие тиреоидные гормоны и их влияние на нервную систему. Медицинские новости. 2012; 4: 11–5.
3. Beer A.J., Schwaiger M. PET imaging of $\alpha v \beta 3$ expression in cancer patients. *Methods Mol Biol.* 2011; 680: 183–200.
4. Costa L.E.S., Clementino-Neto J., Mendes C.B., Franzon N.H., Costa E.O., Moura-Neto V., Ximenes-da-Silva A. Evidence of aquaporin 4 regulation by thyroid hormone during mouse brain development and in cultured human glioblastoma multiforme cells. *Frontiers in Neuroscience.* 2019; 3(317): 125–32.
5. Faghhi-Jouybari M., Naderi S., Mashayekhi S., Padeganeh T. Hypothyroidism among patients with glioblastoma multiforme. *Iranian J Neurology.* 2018; 17(3): 149–51.
6. Gaertner F.C., Schwaiger M., Beer A.J. Molecular imaging of $\alpha v \beta 3$ expression in cancer patients. *Q J Nucl Med Mol Imaging.* 2010; 54(3): 309–26.
7. Gerard M., Corroyer-Dulmont A., Lesueur P., Collet S. Hypoxia Imaging and Adaptive Radiotherapy: A State-of-the-Art Approach in the Management of Glioma. *Frontiers in Neuroscience.* 2019; 12(6):117–23.
8. Hellevik A.I., Asvold B.O., Bjørø T., Romundstad P.R., Nilsen T.I., Vatten L.J. Thyroid function and cancer risk: a prospective population study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009; 18(2): 570–74.
9. Omuro A., DeAngelis L.M. Glioblastoma and other malignant gliomas: a clinical review. *JAMA.* 2013; 310(17): 1842–50.
10. Takahashi K., Proshin S., Yamaguchi K., Yamashita Y., Katakura R., Yamamoto K., Shima H., Hosono M., Miyagi T. Sialidase NEU3 defines invasive potential of human glioblastoma cells by regulating calpain-mediated proteolysis of focal adhesion proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) — General Subjects.* 2017; 1861(11, pt A): 2778–88. doi: 10.1016/j.bbagen.2017.07.023.

REFERENCES

1. Kolotov K.A., Mashkovtsev O.V., Bein B.N. Immunogistokhimicheskie osobennosti glial'nykh opukholei golovnogo mozga [Immunohistochemical nuances of brain glial tumors]. *Meditynskii al'manakh.* 2012; 4: 66–9. (In Russian).
2. Usova N.N. Iodsoderjastchie tireoidnye hormony i ikh vliyanie na nervnyu sistem [Iod-containing thyroid hormones and their influence on nervous system]. *Meditynskie novosti.* 2012; 4: 11–5. (In Russian).
3. Beer A.J., Schwaiger M. PET imaging of $\alpha v \beta 3$ expression in cancer patients. *Methods Mol Biol.* 2011; 680: 183–200.
4. Costa L.E.S., Clementino-Neto J., Mendes C.B., Franzon N.H., Costa E.O., Moura-Neto V., Ximenes-da-

- Silva A. Evidence of aquaporin 4 regulation by thyroid hormone during mouse brain development and in cultured human glioblastoma multiforme cells. *Frontiers in Neuroscience*. 2019; 3(317): 125–32.
5. Faghih-Jouybari M., Naderi S., Mashayekhi S., Pade-ganeh T. Hypothyroidism among patients with glioblastoma multiforme. *Iranian J Neurology*. 2018; 17(3): 149–51.
 6. Gaertner F.C., Schwaiger M., Beer A.J. Molecular imaging of avb3 expression in cancer patients. *Q J Nucl Med Mol Imaging*. 2010; 54(3): 309–26.
 7. Gerard M., Corroyer-Dulmont A., Lesueur P., Collet S. Hypoxia Imaging and Adaptive Radiotherapy: A State-of-the-Art Approach in the Management of Glioma. *Frontiers in Neuroscience*. 2019; 12(6): 117–23.
 8. Hellevik A.I., Asvold B.O., Bjørø T., Romundstad P.R., Nilsen T.I., Vatten L.J. Thyroid function and cancer risk: a prospective population study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009; 18(2): 570–74.
 9. Omuro A., DeAngelis L.M. Glioblastoma and other malignant gliomas: a clinical review. *JAMA*. 2013; 310(17): 1842–50.
 10. Takahashi K., Proshin S., Yamaguchi K., Yamashita Y., Katakura R., Yamamoto K., Shima H., Hosono M., Miyagi T. Sialidase NEU3 defines invasive potential of human glioblastoma cells by regulating calpain-mediated proteolysis of focal adhesion proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) — General Subjects*. 2017; 1861(11, pt A): 2778–88. DOI: 10.1016/j.bbagen.2017.07.023.