

РОЛЬ ИНТЕРФЕРИРУЮЩЕЙ РНК В РЕГУЛЯЦИИ ИММУННОГО НАДЗОРА И ПРОЛИФЕРАТИВНЫХ ПРОЦЕССОВ НА ПРИМЕРЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ РАКА ЭНДОМЕТРИЯ В УСЛОВИЯХ ПАТОЛОГИИ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Валерий Николаевич Запорожан, Анна Сергеевна Маринюк, Елена Леонидовна Холодкова,
Дмитрий Юрьевич Андронов*

Одесский национальный медицинский университет

Реферат

Цель. Оценка выраженности экспрессии маркёров пролиферации и дендритных клеток на фоне рака эндометрия при трансфекции siРНК (от англ. short interference – короткие интерферирующие молекулы рибонуклеиновой кислоты) в условиях экспериментальной патологии щитовидной железы.

Методы. Эксперименты проводили на 60 самках крыс, которые были распределены на пять групп: I – группа контроля, IIА и IIIА – животные с гипо- и гипертиреозным состоянием и перевитой карциномой Герена; IIБ и IIIБ – животные с гипо- и гипертиреозным состоянием и перевитой карциномой Герена в комплексе с трансфекционно введённой siРНК. Ортогональные размеры опухоли измеряли с 7-го дня после инокуляции опухолевой суспензии. Проводили иммуногистохимические исследования экспрессии маркёров пролиферации и дендритных клеток в опухолевой ткани после выведения животных из эксперимента.

Результаты. Было показано, что ингибирующее действие siРНК проявляется в большей степени при гипотиреозном состоянии, указывая на важную роль гормонов щитовидной железы в регуляции экспрессии генов, контролируемых клеточный цикл. Трансфекция siРНК приводит к повышению экспрессии зрелых дендритных клеток (CD83) в опухолевой ткани при гипотиреозном состоянии и повышению экспрессии незрелых дендритных клеток (CD1a) при гипертиреозном состоянии.

Вывод. Трансфекция siРНК тормозит пролиферацию опухолевых клеток в большей степени при гипотиреозе, чем при гипертиреозе.

Ключевые слова: siРНК, гипертиреоз, гипотиреоз, рак эндометрия, дендритные клетки.

THE ROLE OF INTERFERING RNA IN IMMUNE RESPONSE PROLIFERATIVE PROCESSES REGULATION IN EXPERIMENTAL MODEL OF ENDOMETRIAL CANCER ASSOCIATED WITH THYROID DISEASE

V.M. Zaporozhan, G.S. Maryniuk, O.L. Kholodkova, D.U. Andronov. Odessa National Medical University, Odessa, Ukraine. **Aim.** To assess the proliferation and dendritic cells markers expression degree at short interference RNA (siRNA) transfection in endometrial cancer associated with experimental thyroid disease. **Methods.** Experiments were performed on female rats distributed to five groups: I – control group; IIА and IIIА – animals with simulated hypo- and hyperthyroidism and transplanted Guérin's carcinoma, IIВ and IIIВ – animals with simulated hypo- and hyperthyroidism and transplanted Guérin's carcinoma in combination with siRNA transfection. Orthogonal tumor dimensions were measured starting from the 7-th day after tumor suspension inoculation. Proliferation and dendritic cells markers expression were assessed in tumor samples by immunohistochemistry after the exclusion of animals from the experiment. **Results.** siRNA inhibitory effect was more marked in animals with hypothyroidism, indicating an important role of thyroid hormones in regulating cell cycle controlling genes expression. Transfection of siRNA increased mature dendritic cells (CD83) expression in tumor tissue in animals with hypothyroidism and increased immature dendritic cells (CD1a) expression in tumor tissue in animals with hyperthyroidism. **Conclusion.** siRNA transfection inhibits the tumor cells proliferation mainly at hypothyroidism compared to hyperthyroidism. **Keywords:** siRNA, hyperthyroidism, hypothyroidism, endometrial cancer, dendritic cells.

В последние годы изучению применения коротких интерферирующих молекул рибонуклеиновой кислоты (siРНК – от англ. short interference) в лечении онкологических заболеваний уделяют большое внимание. Искусственная индукция siРНК может быть использована в терапевтических целях для выключения различных патологических генов. Тем не менее, механизмы регулирования действия siРНК изучены недостаточно [12].

Дефицит гормонов щитовидной железы (ЩЖ) приводит к снижению ангиогенеза путём блокирования экспрессии фактора роста эндотелия сосудов [4]. Тироксин способен ингибировать апоптоз [9]. Кроме

способности прямой стимуляции онкогенов, некоторые авторы называют влияние гормонов ЩЖ на субпопуляции Т-хелперов и других иммунокомпетентных клеток [5]. Есть данные о присутствии рецепторов тиреотропного гормона и гормонов ЩЖ в лимфоцитах и дендритных клетках (ДК) – специализированных антиген-презентирующих клетках, способных активизировать Т-клетки и регулировать адаптивный иммунитет [8].

Влияние тиреоидных гормонов на дифференцировку и функционирование ДК [6, 13] предполагает их возможную роль в контроле начала адаптивного Т-клеточного иммунного ответа.

При изучении патогенеза различных онкологических заболеваний большое вни-

мание уделяют механизмам пролиферации и апоптоза опухолевых клеток, ангиогенезу, противоопухолевому иммунитету, однако данных об эпигенетических модификациях опухолевого роста при дисфункции ЦЖЖ очень мало.

Целью исследования была оценка степени выраженности экспрессии маркера пролиферации Ki-67 и маркеров ДК (CD1a, CD40, CD83, CD86) в опухолевой ткани при трансфекции siРНК в условиях экспериментальной патологии ЦЖЖ.

Опыты проводили на 60 белых лабораторных крысах-самках с массой тела 180 ± 20 г, которых содержали на стандартной диете вивария. Животные были распределены на три группы: I – группа контроля (n=12), II – группа с экспериментальным гипотиреозом (n=24), III – группа с экспериментальным гипертиреозом (n=24). При этом группы II и III подразделялись на две подгруппы (А и Б). Животным групп I, IА и IIIА трансплантировали карциному Герена путём подкожной инъекции в область спины между лопатками 0,5 мл суспензии опухолевых клеток ($5-6 \times 10^6$ кл/мл), полученных от крыс-доноров (штамм опухоли был получен в Институте экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины). Животным групп IIБ и IIIБ вводили опухолевые клетки вместе с введённой методом трансфекции siРНК по такой же методике [10].

Гипотиреоидное состояние (подгруппы IIА и IIБ) у крыс моделировали путём блокирования секреции тиреоидных гормонов тиреоцитами под влиянием тиамазола (мерказолила, «Здоровье», Украина), который вводили 1 раз в сутки в дозе 5 мг на 100 г массы тела внутривенно в течение 2 нед. Гипертиреоидное состояние (подгруппы IIIА и IIIБ) моделировали путём внутривенного введения 1 раз в сутки левотироксина натрия (L-тироксина, «Берлин-Хеми», Германия) в дозе 50 мкг на 100 г массы тела в течение 2 нед.

Для получения опухолевой взвеси проводили предварительное выделение отдельных клеток опухолевой ткани путём её инкубации с коллагеназой (в концентрации 1 мкл/мл) в течение 1 ч при температуре 37 °С, после чего проводили дополнительное расщепление опухолевых клеток с помощью автоматизированной системы для механической дезагрегации тканей «BD Medimachine» (Германия). Опухолевые клетки фильтровали с помощью шприца че-

рез насадку «Steri-Dual» («3M Health Care», Германия). Подсчитывали опухолевые клетки в камере Горяева. Затем добавляли к ним среду RPMI 1640 до концентрации $5-6 \times 10^6$ кл/мл.

Отдельно готовили смесь трансфекции. В стерильную пробирку к 4 мкл реагента трансфекции «Turbofect R-0537» («Fermentas») добавляли 100 мкл среды DMEM с высоким содержанием глюкозы и перемешивали, тщательно встряхивая, после чего выдерживали разведённый реагент трансфекции при комнатной температуре 10–20 мин. К разбавленному реагенту трансфекции добавляли 1 мкл siРНК («Thermo scientific», USA), аккуратно перемешивая с помощью пипетки, и инкубировали при комнатной температуре 10–20 мин с целью формирования трансфекционных комплексов. Полученную смесь разводили 500 мкл культуральной среды RPMI 1640. Затем аспирировали питательную среду от опухолевых клеток и сразу же заменяли разведённой смесью трансфекции. Равномерно распределяли трансфецированные комплексы, осторожно покачивая тарелку.

Через 20–30 мин опухолевые клетки с введёнными методом трансфекции siРНК перевивали самкам крыс групп IIБ и IIIБ подкожным введением в область спины между лопатками.

Наблюдали за развитием опухоли у подопытных животных в течение 21 сут, после чего выводили их из эксперимента путём декапитации под лёгким хлороформным наркозом.

Иммуногистохимическим методом определяли биомаркеры ДК (CD1a, CD40, CD83, CD86) с помощью стандартных наборов «Dako» (США) и маркер пролиферации Ki-67 в опухолевой ткани, полученной от экспериментальных животных. Индекс пролиферации рассчитывали как процент позитивно окрашенных ядер опухолевых клеток в пределах пролиферативного компартамента в пяти случайно выбранных полях зрения (>500 клеток) [1, 3].

Статистическая обработка проведена с помощью программы «Statistica 6.15» («StatSoft Inc.», США) [2].

Трансфекция siРНК существенно повлияла на динамику опухолевого роста (табл. 1). Замедление роста опухоли в подгруппах с трансфекционно введённой siРНК наблюдали уже с 9-го дня эксперимента. К 12-му дню объём опухоли в группе IIБ был в 1,4 раза меньше, чем в группе IIА, а в груп-

Динамика роста опухоли (см³) в экспериментальных группах (M±m)

Группа	Дни эксперимента				
	9-й	12-й	15-й	18-й	21-й
ПА	2,38±0,15	7,76±0,37	15,82±0,55	18,77±0,61	21,39±0,41
ПБ	1,71±0,08	5,5±0,15	8,02±0,25	11,41±0,44	15,92±0,48
ША	2,6±0,13	6,22±0,25	12,92±0,45	17,35±0,39	19,22±0,74
ПБ	1,62±0,14	5,18±0,17	9,5±0,31	14,83±0,64	18,53±0,72

Примечание: ПА – экспериментальный гипотиреоз; ПБ – экспериментальный гипотиреоз с трансфекцией siРНК; ША – экспериментальный гипертиреоз; ПБ – экспериментальный гипертиреоз с трансфекцией siРНК.

пе ПБ – в 1,2 раза меньше по сравнению с ША. Наибольшее замедление роста опухоли в группах ПБ и ПБ отмечено на 15-й день эксперимента: объём опухоли в группе ПБ был в 1,9 раза меньше, чем в группе ПА, а в группе ПБ – в 1,4 раза меньше по сравнению с ША. Затем разрыв в динамике роста опухоли начал уменьшаться, и к концу эксперимента объём опухоли в группе ПБ был в 1,3 раза меньше, чем в группе ПА, в то время как разница между объёмами опухолей в подгруппах с моделированным гипертиреозом (ША и ПБ) была вообще не существенной.

Анализируя данные иммуногистохимического исследования маркёров ДК в опухолевой ткани, которую получали после выведения животных из эксперимента, можно сделать заключение, что как при гипо-, так и при гипертиреоидном состоянии характерным было снижение активности зрелых ДК (CD83, CD86) (табл. 2).

Таблица 2

Функциональное состояние антиген-презентирующих клеток в опухолевой ткани

Маркёр	Контроль	Экспериментальный гипотиреоз		Экспериментальный гипертиреоз	
		ПА	ПБ	ША	ПБ
CD1a	+/-	-	+/-	+/-	+
CD40	+	+/-	+/-	+/-	+/-
CD83	+	+/-	+	+/-	+/-
CD86	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-

Примечание: I – группа контроля; ПА – экспериментальный гипотиреоз; ПБ – экспериментальный гипотиреоз с трансфекцией siРНК; ША – экспериментальный гипертиреоз; ПБ – экспериментальный гипертиреоз с трансфекцией siРНК.

При этом популяция незрелых ДК была значительно беднее при экспериментальном гипотиреозе. После трансфекции siРНК уровень экспрессии как зрелых, так и незрелых ДК повысился, однако при ги-

потиреозе преобладали зрелые ДК (CD83), а при гипертиреозе – незрелые ДК (CD1a).

Индекс пролиферации опухолевых клеток для самок-крыс в группе I (контрольной) был меньшим по сравнению с экспериментальным гипо- и гипертиреозом без трансфекции siРНК и составлял 9,8%. После трансфекции siРНК при гипотиреоидном состоянии этот индекс уменьшился в 1,3 раза и почти не отличался от подобного показателя при гипертиреоидном состоянии. Если сравнивать индекс пролиферации опухолевых клеток для гипо- и гипертиреоза без применения трансфекции siРНК и с ней, то нами отмечено, что в группе ПА (с моделированным гипотиреозом) он составлял 14,4%, тогда как в группе ПБ этот показатель был меньше в 2,5 раза и составлял всего 5,6%. В условиях экспериментального гипертиреоза после введения siРНК индекс пролиферации почти не изменился: в группе ША он составлял 10,3%, а в ПБ – 9,6%.

Учитывая тот факт, что дефицит гормонов ЩЖ угнетает ангиогенез [4], можно было предположить, что прогрессирование опухолевого роста на фоне гипотиреоза должно быть менее выраженным, чем при гипертиреозе. Однако в случае с раком эндометрия мы получили противоположную картину. По всей видимости, здесь необходимо учитывать наличие гиперэстрогемии, которая может оказывать стимулирующее влияние на фактор роста эндотелия сосудов, активизировать пролиферацию опухолевых клеток и подавлять их апоптоз [7, 14]. Таким образом, эстрогены играют важную роль в патогенезе рака эндометрия при гипотиреозе.

Существуют данные о том, что активированный фактор роста эндотелия сосудов угнетает иммунную систему в отношении противоопухолевой защиты, а это приводит к снижению экспрессии как зрелых, так и незрелых ДК [11]. В результате проведённых

исследований нами выявлено, что как при гипо-, так и при гипертиреозе происходит снижение активности зрелых ДК (CD83, CD86) в опухолевой ткани, при этом угнетение популяции незрелых ДК (CD1a, CD40) при гипотиреозидном состоянии более выражено. На основании вышеизложенного можно сделать заключение о том, что нарушение функций ЩЖ приводит к снижению дифференцировки ДК при раке эндометрия, причём дефицит гормонов ЩЖ препятствует миграции незрелых ДК в опухолевую ткань, подавляя механизмы противоопухолевого иммунного надзора. Повышение уровня экспрессии как зрелых, так и незрелых ДК после трансфекции siРНК в опухолевую ткань на фоне гипо- и гипертиреозидного состояния можно связать с тем фактом, что siРНК способна подавлять активность фактора роста эндотелия сосудов [11].

Согласно полученным данным, применение трансфекции siРНК к концу эксперимента уменьшило рост опухоли у крыс с гипотиреозидным состоянием на 25,5%, тогда как рост опухоли при гипертиреозидном статусе уменьшился всего на 3,5%, что позволяет предположить наличие у гормонов ЩЖ способности блокировать ингибирующее влияние siРНК.

Учитывая тот факт, что в результате трансфекции siРНК в опухолевую ткань индекс пролиферации опухолевых клеток при гипотиреозе уменьшился в 2,5 раза, а степень экспрессии маркеров ДК повысилась независимо от функционального состояния ЩЖ, можно говорить об антипролиферативном и иммуностимулирующем действии siРНК при раке эндометрия, что подтверждает ещё большую перспективность применения siРНК в лечении онкологических больных.

ВЫВОДЫ

1. В условиях экспериментальной модели рака эндометрия трансфекция siРНК приводит к повышению экспрессии зрелых дендритных клеток (CD83) в опухолевой ткани при гипотиреозидном состоянии и незрелых дендритных клеток (CD1a) при гипертиреозидном состоянии.

2. Трансфекция siРНК тормозит пролиферацию опухолевых клеток в большей степени при гипотиреозе, чем при гипертиреозе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Баударбекова М.М. Экспрессия Ki-67 та PCNA при гиперпластичних станах та аденокарциномі ендометрія у жінок в перименопаузальному стані // Онкологія. — 2010. — Т. 12, №4. — С. 394.
2. Боровиков В.П. STATISTICA: искусство анализа данных на компьютере (2-е издание). — М.: Медицина, 2007. — 700 с.
3. Зак М.Ю. Клітинне оновлення у слизовій оболонці шлунка у хворих на хронічний атрофічний гастрит // Сучасна гастроентерол. — 2011. — Т. 2, №58. — С. 27-32.
4. Beruchashvili M.V., Tsagareli Z.G., Gogiasvili L.E. et al. Features of immunohistochemical markers expression in cervical epithelium under thyroid dysfunction // Georgian Med. News. — 2011. — Vol. 195. — С. 32-37.
5. Brent G.A. Mechanisms of thyroid hormone action // J. Clin. Inves. — 2012. — Vol. 122, N 9. — P. 3035-3043.
6. Dedejus M., Stasiolek M., Brzezinski J. et al. Thyroid hormones influence human dendritic cells' phenotype, function, and subsets distribution // Thyroid. — 2011. — Vol. 21, N 5. — P. 533-540.
7. George A.L., Rajoria S., Suriano R. et al. Hypoxia and estrogen are functionally equivalent in breast cancer-endothelial cell interdependence // Mol. Cancer. — 2012. — Vol. 1. — P. 80.
8. Klecha A.J., Genaro A.M., Gorelik G. et al. Integrative study of hypothalamus-pituitary-thyroid-immune system interaction: thyroid hormone-mediated modulation of lymphocyte activity through the protein kinase C signaling pathway // J. Endocrinol. — 2006. — Vol. 189, N 1. — P. 45-55.
9. Liqun Z., Cooper-Kuhn C.M., Nannmark U. et al. Stimulatory effects of thyroid hormone on brain angiogenesis *in vivo* and *in vitro* // J. Cereb. Blood Flow. Metab. — 2010. — Vol. 30, N 2. — P. 323-335.
10. McNaughton B.R., Cronican J.J., Thompson D.B., Liu D.R. Mammalian cell penetration, siRNA transfection, and DNA transfection by supercharged proteins // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2009. — Vol. 106, N 15. — P. 6111-6116.
11. Ni Y.H., Wang Z.Y., Huang X.F. et al. Effect of siRNA-mediated downregulation of VEGF in Tca8113 cells on the activity of monocyte-derived dendritic cells // Oncol. Lett. — 2012. — Vol. 3, N 4. — P. 885-892.
12. Shibata M.A., Ambati J., Shibata E. et al. Mammary cancer gene therapy targeting lymphangiogenesis: VEGF-C siRNA and soluble VEGF receptor-2, a splicing variant // Med. Mol. Morphol. — 2012. — Vol. 45, N 4. — P. 179-184.
13. Stasiolek M., Adamczewski Z., Puda B. et al. Distribution of subpopulations of dendritic cells in peripheral blood of patients treated with exogenous thyrotropin // Thyroid Res. — 2012. — Vol. 5, N 1. — P. 18.
14. Winiewicz A., Baltaziak M., Kanczuga-Koda L. et al. STAT3 and apoptosis regulators: Bak and Bcl-xL in endometrioid adenocarcinomas of different estrogenreceptor- α immunoprofile // Gynecol. Endocrinol. — 2011. — Vol. 27, N 8. — P. 536-540.