

*О.И. Кит, Е.М. Франциянц, В.А. Бандовкина, И.В. Каплиева, И.М. Котиева,  
Л.К. Треницаки, Н.Д. Черярина, Ю.С. Сидоренко*

### **Влияние хронической нейрогенной боли на функциональную активность щитовидной железы у самцов мышей с перевивной меланомой B16/F10**

ФГБУ «Научный медицинский исследовательский центр онкологии» Минздрава России,  
Ростов-на-Дону

Не подлежит сомнению важная роль тиреоидной оси в ответе организма на различные эндогенные и экзогенные факторы воздействия. Существуют разноречивые данные о влиянии опухолевого роста на функциональную активность щитовидной железы. Модифицирующее влияние хронической нейрогенной боли на биологическую агрессивность перевивной меланомы B16/F10 требует исследования основных механизмов воздействия. Целью работы было изучение влияния хронической нейрогенной боли на функциональную активность щитовидной железы в динамике роста меланомы B16/F10 у самцов мышей.

**Методы.** Группа сравнения — животные со стандартной подкожной перевивкой меланомы B16/F10; основная группа — мыши, которым меланому B16/F10 перевивали через 2 недели после создания модели хронической боли. В цитозольных фракциях щитовидной железы с помощью стандартных ИФА методов исследовали уровень общих и свободных форм тиреоидных гормонов и ТТГ.

**Результаты.** Хроническая нейрогенная боль повышает уровень свободных форм тиреоидных гормонов и общего трийодтиронина, но снижает содержание ТТГ и общего тироксина в щитовидной железе, а также снижает весовой коэффициент органа у самцов мышей с перевивной меланомой B16/F10.

**Заключение.** Полученные экспериментальные результаты свидетельствуют о том, что одной из точек приложения модифицирующего влияния хронической нейрогенной боли на течение перевивной меланомы B16/F10 у самцов мышей является активность щитовидной железы.

**Ключевые слова:** меланома B16/F10; хроническая боль; тиреоидные гормоны; щитовидная железа; мыши линии C57Bl/6

### **Введение**

Известно, что болевые воздействия разного характера вызывают изменения основных видов обмена веществ, мобилизацию адаптивных метаболических механизмов и повреждение тканей [1, 2]. Гормоны щитовидной железы нацелены на широкий спектр метаболических эффектов в развитии тканей, а также процессов модуляции и трансмиссии в центральной нервной системе [3, 4]. Гипоталамо-гипофизарно-тиреоидная ось работает в качестве гомеостатического регулятора, при различных физиологических и патологических состояниях, включая доброкачественный и злокачественный опухолевый рост [3, 5, 6]. Меланома кожи — крайне агрессивное злокачественное заболевание, характеризующееся стремительным течением, быстрым метастазированием и плохим прогнозом в случае позднего обнаружения. Рост меланомы оказывает существенное влияние на локальный и периферический синтез тиреоидных гормонов и зависит от пола животных [7, 8]. Предполагают, что клинический гипотиреоз может замедлить рост опухолей, а гипертиреоз может быть связан с распространением злокачественного процесса [9]. В частности при раке молочной железы происходит нарушение различных звеньев гипоталамо-гипофизарно-тиреоидной оси, включая сбой механизма отрицательной обратной связи и изменение порога чувствительности центральных и периферических звеньев [10]. Несмотря на то, что функции щитовидной железы обширны, очень немногие исследования сосредоточены на ее взаимосвязи с хронической болью [11].

Целью явилось изучить влияние хронической нейрогенной боли на функциональную активность щитовидной железы в динамике роста меланомы B16/F10 у самцов мышей.

## Материалы и методы

Работа выполнена на самцах мышей линии C57BL/6 (n=64) 8 недельного возраста с начальной массой 23-24 г. Животные были получены из ФГБУН Научный центр биомедицинских технологий «Андреевка» ФМБА (Московская область). В работе использовали клеточную линию мышинной меланомы B16/F10, метастазирующей в легкие. Опухолевый штамм получен из РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН (г. Москва). Животные содержались при естественном режиме освещения со свободным доступом к воде и пище. Все исследования проводились в соответствии с требованиями и условиями, изложенными в «Международных рекомендациях по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» и приказом Минздрава РФ № 267 от 19.06.03 «Об утверждении правил лабораторной практики». Животные были распределены на группы: две контрольные — интактные мыши (n=7) и мыши с воспроизведением модели хронической боли (n=7), группу сравнения — мыши со стандартной подкожной перевивкой меланомы B16/F10 (n=22) и основную группу — мыши, которым меланому B16/F10 перевивали через 2 недели после создания модели хронической боли (n=28). Мышам основной группы осуществляли перевязку седалищного нерва с 2-х сторон под ксила-золетилловым наркозом. Через 2 недели после заживления операционной раны подкожно под правую лопатку вводили 0,5 мл взвеси опухолевых клеток меланомы B16/F10 в физиологическом растворе в разведении 1:10. Животным из группы сравнения перевивали меланому B16/F10 подкожно в той же дозе и объеме, что и в основной группе, но без воспроизведения модели хронической боли. При стандартной перевивке опухоль появляется в 100% случаев, достаточно быстро растёт и на 12-16 сутки роста метастазирует преимущественно гематогенно в легкие (60-90%), реже — в печень и селезенку. Контрольными для основной группы животных служили мыши с 2-х сторонней перевязкой седалищного нерва без онкопроцесса, для группы сравнения — интактные мыши. Контрольных животных, а также мышей

из основной группы и группы сравнения через 1, 2 и 3 недели эксперимента декапитуировали на гильотине. Щитовидную железу выделяли на льду. Проводили расчет весовых коэффициентов (у.ед.) по соотношению массы органа к массе тела животного. Из тканей получали 1% цитозольные фракции, приготовленные на 0,1М калий-фосфатном буфере pH 7.4, содержащем 0,1% Твин-20 и 1% БСА, в которых с помощью наборов адаптированных для животных ИФА (Cusabio, Китай) определяли уровень: ТТГ, общего тироксина (Т4) и трийодтиронина (Т3), а также их свободных форм: FT4 и FT3. Статистическая обработка материала проводилась с помощью программы Statistica 10,0 с определением средних значений с указанием стандартной ошибки. Нормальность распределения определяли методом Шапиро-Уилку, в случае нормального распределения значимость различий средних показателей оценивалась по методу t критерия Стьюдента, в случае ненормального распределения с помощью критерия суммы рангов Вилкоксона. Существенными считали различия при p<0,05. При этом соблюдались общие рекомендации для медицинских исследований.

## Результаты исследования

Установлено, что у самцов с хронической нейрогенной болью (контроль) в щитовидной железе (табл. 1) повысился уровень свободных тироксина и трийодтиронина в 1,3 раза по сравнению с нормой, а также в 1,4 раза вырос общий трийодтиронин, но снизилось содержание общего тироксина в 1,4 раза и ТТГ в 4,5 раза (p<0,05).

При этом весовой коэффициент ЩЖ (табл. 2) под действием хронической нейрогенной боли снизился в 1,5 раза (p<0,05), но синтетическая активность, определяемая как Т4/массе ЩЖ не изменилась.

**Таблица 1. Уровень гормонов в ткани щитовидной железы самцов мышей с меланомой B16/ F10 и меланомой сочетанной с хронической болью**

	FT3 пмоль/л	FT4 пмоль/л	T <sub>3</sub> нмоль/гтк	T <sub>4</sub> нмоль/гтк	ТТГ Ммед/г тк
интактные животные					
интактная железа	1,54±0,15	3,03±0,3	0,16±0,015	1,85±0,17	0,05±0,005
контроль (боль)	2,05±0,2 <sup>1</sup>	4,05±0,4 <sup>1</sup>	0,23±0,02 <sup>1</sup>	1,3±0,12 <sup>1</sup>	0,011±0,001 <sup>1</sup>
1 неделя роста меланомы B16/F10					
группа сравнения	3,16±0,31 <sup>1</sup>	5,2±0,50 <sup>1</sup>	0,05±0,004 <sup>1</sup>	2,17±0,11	0,05±0,004
основная группа	2,5±0,24	3,3±0,27	0,20±0,02	1,3±0,12	0,011±0,001
2 неделя роста меланомы B16/F10					
группа сравнения	0,87±0,07 <sup>1,3</sup>	2,28±0,21 <sup>1,3</sup>	0,006±0,0005 <sup>1,3</sup>	0,05±0,004 <sup>1,3</sup>	0,076±0,006 <sup>1,3</sup>
основная группа	2,37±0,21	3,49±0,32	0,21±0,018	1,4±0,11	0,011±0,001
3 неделя роста меланомы B16/F10					
группа сравнения	1,03±0,1 <sup>1</sup>	4,67±0,42 <sup>1,3</sup>	0,015±0,0014 <sup>1,3</sup>	1,96±0,18 <sup>3</sup>	0,047±0,004 <sup>3</sup>
основная группа	1,56±0,14 <sup>3</sup>	4,64±0,39 <sup>3</sup>	0,19±0,015	1,2±0,11	0,013±0,001

Примечание:<sup>1</sup> – достоверные отличия по сравнению с интактной железой; <sup>2</sup>-достоверные различия по сравнению с контролем; <sup>3</sup>-достоверные отличия по сравнению с предыдущим сроком исследования p<0,05

**Таблица 2. Изменение весовых коэффициентов щитовидной железы и соотношения вырабатываемого тироксина к массе щитовидной железы у самцов мышей с меланомой B16/ F10 и меланомой сочетанной с хронической болью (у.е.х10<sup>-4</sup>)**

	Весовой коэффициент ЩЖ у.е.х10 <sup>-4</sup>	Масса ЩЖ в мг	T4/массе ЩЖ (у.е.)
интактные	10,35±0,32	24,86±0,96	0,07±0,006
контроль с болью	6,77±0,64 <sup>1</sup>	16,0±1,13 <sup>1</sup>	0,08±0,009
основная группа (B16/F10+боль)			
1 неделя	10,13±0,52 <sup>2</sup>	20,67±2,08 <sup>2</sup>	0,07±0,007
2 неделя	8,73±0,96 <sup>2</sup>	19,17±1,4 <sup>2</sup>	0,07±0,005
3 неделя	7,07±0,62	16,2±1,29	0,07±0,006
группа сравнения (B16/F10)			
1 неделя	8,58±0,88 <sup>1</sup>	21,17±2,02	0,1±0,02 <sup>1</sup>
2 неделя	9,85±0,98	24,2±1,46	0,002±0,0003 <sup>1,3</sup>
3 неделя	9,97±0,59	26,0±1,23	0,075±0,008 <sup>3</sup>

Примечание:<sup>1</sup> – достоверные отличия по сравнению с интактной железой; <sup>2</sup>-достоверные различия по сравнению с контролем; <sup>3</sup>-достоверные отличия по сравнению с предыдущим сроком исследования p<0,05.

Рост меланомы у самцов основной группы не повлиял на содержание свободных и общих форм тиреоидных гормонов, а также ТТГ в щитовидной железе, по сравнению с показателями контроля. В результате уровень ТТГ и общего тироксина в органе оставались ниже нормы, а свободные формы превышали показатели интактных животных на протяжении с 1-3 недели исследования. Изначально сниженные весовые коэффициенты ЩЖ у самцов с хронической нейрогенной болью в процессе роста меланомы достоверно повысились — через 1-2 недели в среднем в 1,4 раза, при этом, практически не отличаясь от нормы. Через 3 недели, весовой коэффициент ЩЖ снова снизился в 1,5 раза по сравнению с нормой, достоверно не отличаясь от показателей контроля. При этом синтетическая активность щитовидной железы не имела значимых отличий от показателей нормы.

У самцов в группе сравнения изменения насыщенности щитовидной железы тиреоидными гормонами в динамике роста меланомы B16/F10 оказались иными. Через 1 неделю эксперимента в органе возросло содержание свободных тиреоидных гормонов — FT3 в 2,1 раза, а FT4 в 1,7 раза, на фоне сниженного в 3,2 раза образования общего трийодтиронина из нормального уровня тироксина. При этом уровень ТТГ в щитовидной железе через 1 неделю оставался в норме. После «выхода» опухоли, через 2 недели эксперимента у животных группы сравнения выявлено падение синтеза тиреоидных гормонов щитовидной железой, выраженное снижением содержания общих форм: T4 в 37 раз, а T3 в 26,7 раза, по сравнению с показателями в интактной ткани, а также свободных форм -FT4 в 1,3 раза и FT3 в 1,8 раз, при этом в 1,5 раза возросла концентрация ТТГ. Через 3 недели эксперимента содержание тироксина в органе восстановилось до нормальных величин, на фоне нарушения дейо-

дирования с образованием трийодтиронина, уровень которого оставался в 10,7 раза ниже нормы. В группе сравнения через 3 недели роста возросло содержание FT4 в 2 раза, по сравнению с предыдущим этапом и в 1,5 раза по сравнению с нормой, содержание FT3 не отличалось от показателей на сроке 2 недели и было ниже нормы в 1,5 раза. При этом ТТГ снизилось в 1,6 раза по сравнению с предыдущим этапом, не отличаясь при этом от нормы. У самцов в группе сравнения на протяжении всего эксперимента не выявлено достоверных изменений весового коэффициента щитовидной железы, однако клетки ЩЖ через 1 неделю эксперимента синтезировали в 1,4 раза больше тироксина, но через 2 недели эксперимента, на момент выхода опухоли, орган резко снизил в 35 раз количество синтезируемого T4, о чем свидетельствует коэффициент соотношения T4/массе ЩЖ.

## Обсуждение

Существуют косвенные клинические доказательства подтверждающие гипотезу о том, что хронический стресс может влиять на проявление аутоиммунных заболеваний щитовидной железы [12, 13]. Хроническая нейрогенная боль оказывает влияние на содержание свободных форм тиреоидных гормонов и ТТГ в щитовидной железе и на изменение весового коэффициента органа у самцов мышей с перививной меланомой B16/F10. Вероятно, синтез щитовидной железой тироксина у животных снижается по причине уменьшения размеров самой железы, а увеличение уровня трийодтиронина и свободных форм тиреоидных гормонов связано с изменением активности дейодиназ и связывающих белков.

Хронический болевой синдром оказал существенное, но не однозначное влияние на функциональную активность щитовидной железы.

С одной стороны у животных установлен высокий уровень свободных форм тиреоидных гормонов и общей формы ТЗ в щитовидной железе, на фоне низкого содержания ТТГ. С другой стороны, обнаружено существенное снижение содержания основного продукта щитовидной железы — Т4, на фоне уменьшения весового коэффициента органа, при отсутствии изменения синтетической активности ткани, что может указывать на истощение и/или угнетение тиреоидной функции. Очевидно высокий уровень свободных форм Т4 и ТЗ в фолликулярной ткани щитовидной железы по принципу обратной связи регулировал содержание ТТГ, снижая его концентрацию. В результате этого синтез Т4 железой блокировался. Кроме того, возможно, высокие концентрации свободных форм Т4 и ТЗ непосредственно в щитовидной железе, а не в органах мишенях, способны стимулировать аутоиммунные процессы аналогичные тиреоидиту Хашимото.

Имеются данные о том, что высокий уровень тиреоидных гормонов сокращал выживаемость у экспериментальных животных с меланомой, тогда как относительный гипотиреоз играл защитную роль [14]. Подобный эффект гипертиреоидного влияния связывают с системным провоспалительным и проонкогенным действием тиреоидных гормонов. Предполагают, что длительный гипертиреоз может способствовать хронической воспалительной реакции, которая делает клетки более восприимчивыми к малигнизации [15].

### Заключение

Полученные экспериментальные результаты свидетельствуют о модифицирующем влиянии такого коморбидного состояния как хроническая нейрогенная боль, на течение онкологического процесса и одной из точек приложения в этом случае является влияние на тиреоидную функцию организма.

*Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.*

*Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.*

### ЛИТЕРАТУРА

1. Решетняк Д.В., Смирнова В.С., Кукушкин М.Л. Половые различия при изменении биохимических показателей крови у крыс в ответ на острую соматическую и хроническую нейрогенную боль. *Боль*. 2004,2(3):12–16. [Reshetnyak D.V., Smirnova V.S., Kukushkin M.L. Sex differences with changes in blood biochemical parameters in rats in response to acute somatic and

- chronic neurogenic pain. *J. Pain*. 2004;2(3):12–16. (In Russ)].
2. Кукушкин М.Л. Этиопатогенетические принципы лечения хронической боли. *Русский медицинский журнал*. 2007,15(10):827. [Kukushkin M.L. Etiopathogenetic principles of chronic pain management. *Rus.med. J.* 2007, 15(10): 827–832. (In Russ)].
3. Hoermann R., Midgley J.E., Larisch R., Dietrich J.W. Homeostatic control of the thyroid-pituitary axis: perspectives for diagnosis and treatment. *Front Endocrinol*. 2015,6. doi. 177.10.3389/fendo.2015.
4. Da Costa Mário Augusto Cray, Trentini Conrado Auer, Shafranski Marcelo Derbli, Pipino Osvaldo, Gomez Ricardo Zanetti, dos Santos Reis Eliza Souza. Factors associated with the development of chronic pain after a stentotomy: a study using random control. *Braz J. Cardiovasc Surg*. 2015,30(5):552–556. doi: 10.5935 / 1678-9741.20150059.
5. Goede S.L., Leow M.K., Smit J.W. et al. Hypothalamus-pituitary-thyroid feedback control: implications of mathematical modeling and consequences for thyrotropin (TSH) and free thyroxine (FT4) reference ranges. *Bull Math Biol*. 2014,76(6):1270–1287. doi: 10.1007/s11538-014-9955-5.
6. Hoermann R., Larisch R., Dietrich J.W., Midgley J.E. Derivation of a multivariate reference range for pituitary thyrotropin and thyroid hormones: diagnostic efficiency compared with conventional single-reference method. *Eur J Endocrinol*. 2016,174(6):735–743. doi: 10.1530/EJE-16-0031.
7. 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*. 2016,21(5):253–258. [Kit O.I., Frantsiyants E.M., Bandovkina V.A., Cheryarina N.D. Gender differences in the function of thyroid gland in the dynamics of the growth of transplantable B16/F10 melanoma in mice. *Russian Journal of Oncology*. 2016, 21(5):253–258. (In Russ)].
8. Франциянц Е.М., Бандовкина В.А., Каплиева И.В. и др. Влияние роста перевивной меланомы B16/F10 на функционирование гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой и тиреоидной осей организма у самцов и самок мышей. *Известия высших учебных заведений. Северо-Кавказский регион. Серия: Естественные науки*. 2017,3-2(195-2):118–124. [Frantsiyants E.M., Bandovkina V.A., Kaplieva I.V. et al. Influence of transplantable B16/F10 melanoma growth on hypothalamic-pituitary-adrenal and thyroid axes in male and female mice. *University news. North-Caucasian region. Natural sciences series*. 2017, 3-2(195-2):118–124. (In Russ)].
9. Lin H.Y., Chin Y.T., Yang Y.C. et al. Thyroid Hormone, Cancer, and Apoptosis. *Compr Physiol*. 2016,6(3):1221–1237. doi: 10.1002/cphy.c150035.
10. Козлова М.Б., Франциянц Е.М., Владимирова Л.Ю. и др. Тиреоидный и глюкокортикоидный статус у больных со злокачественной и доброкачественной патологией молочных желез. *Сибирский онкологический журнал*. 2009,4:52–56. [Kozlova M.B., Frantziyantz E.M., Vladimirova L.Yu. et al. Thyroid and glucocorticoid status of patients with benign and malignant pathology of the breast. *Siberian Journal of Oncology*. 2009,4:52–56. (In Russ)].

11. Aloisi A.M., Water S., Buonocore M. Pain and thyroid hormones. *Neurol Sci.* 2013,34(9):1501-1508. doi: 10.1007 / s10072-013-1440-7.
12. Tsatsoulis A. The role of stress in the clinical expression of thyroid autoimmunity. *Ann NY Acad Sci.* 2006,1088:382-395. doi:10.1196/annals.1366.015.
13. Chrousos G.P. Stress and disorders of the stress system. *Nat Rev Endocrinol.* 2009,5(7):374-381. doi: 10.1038/nrendo.2009.106.
14. Fabian I.D., Rosner M., Fabian I. et al. Low thyroid hormone levels improve survival in murine model for ocular melanoma. *Oncotarget.* 2015,6(13):11038-11046.
15. Глушаков Р.И., Козырко Е.В., Соболев И.В. и др. Заболевания щитовидной железы и риск возникновения нетиреоидной патологии. *Казанский медицинский журнал.* 2017,98(1):77-84. [Glushakov R.I., Kozyrko E.V., Sobolev I.V. et al. Thyroid disease and the risk of non-thyroid pathology. *Kazan Medical Journal.* 2017,98(1):77-84. (In Russ)].

Поступила в редакцию 05.06.2019 г.

*O.I. Kit, E.M. Frantsiyants, V.A. Bandovkina, I.V. Kaplieva, I.M. Kotieva, L.K. Trepitaki, Yu.S. Sidorenko*

### **Effect of chronic neurogenic pain on functional activity of thyroid gland in male mice with transplantable B16/F10 melanoma**

Rostov Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don

The important role of the thyroid axis in the body's response to various endogenous and exogenous factors is beyond doubt. The data on the effect of tumor growth on the functional activity of the thyroid gland are inconsistent. A modifying effect of chronic neurogenic pain on the biological aggressiveness of transplantable B16/F10 melanoma requires studying the main mechanisms of action. The aim of the study was to analyze the effect of chronic neurogenic pain on the functional activity of the thyroid gland in the dynamics of B16/F10 melanoma growth in male mice.

**Methods.** The comparison group included animals with standard subcutaneous transplantation of B16/F10 melanoma; the main group — mice with B16/F10 melanoma transplanted 2 weeks after the generation of the chronic neurogenic pain model. Levels of total and free forms of thyroid hormones and TSH were determined in thyroid cytosolic fractions by standard ELISA methods.

**Results.** Chronic neurogenic pain increases the levels of free forms of thyroid hormones and total triiodothyronine, but decreases the levels of TSH and total thyroxine in the thyroid, as well as the organ weight coefficient in male mice with transplanted B16/F10 melanoma.

**Conclusions.** The results demonstrated that the thyroid activity was a point of application of modifying influence of chronic neurogenic pain on the course of transplantable B16/F10 melanoma in male mice.

**Key words:** B16/F10 melanoma; chronic pain; thyroid hormones; thyroid gland; C57Bl/6 mice