

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ НАУКИ

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ПРЕПАРАТА СОЯФЛАН НА ГОРМОНАЛЬНЫЙ СТАТУС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Береснева Юлиана Викторовна

Канд. биол. наук, старший научный сотрудник ИБОХ АН Ташкент, yuliana70@mail.ru

Ибрагимов Фазыл Ахмедович

Докт. биол. наук, старший научный сотрудник ИБОХ АН РУз, Ташкент

Ассесорова Юлиана Юрьевна

Канд. биол. наук, старший научный сотрудник ИБОХ АН РУз, Ташкент

АННОТАЦИЯ

В качестве потенциальных антиканцерогенных и противоопухолевых средств умеренного воздействия привлекли к себе внимание фитоэстрогены (изофлавоноиды и лигнаны) природного происхождения. В Институте биоорганической химии АН РУз получена стандартизированная комбинация полипептидов из соевой муки с молекулярной массой 12,5-79,0 кДа, богатая изофлавонами. Препарат назван Сояфлан. **Цель.** Изучение влияния препарата Сояфлан на гормональный статус при индуцировании злокачественных новообразований молочной железы *N*-метил-*N*-нитрозомочевинной (МНМ) у экспериментальных животных. **Методы.** Эксперимент выполнен на 40 беспородных мышях – самках. Канцероген вводили животным один раз в неделю (разовая доза 0,84 мг/мышь) в течение 5 недель, путем подкожной инъекции в область молочной железы у основания левой передней лапки. Сояфлан растворяли в дистиллированной воде и вводили зондом в желудок мышам в дозе 75 мг/кг 5 раз в неделю, в течение 5 недель. **Результат.** Средний объем опухоли у животных, которым вводили Сояфлан, был на 74% меньше, чем у животных контроля. Сояфлан снижал токсическое действие МНМ на печень, увеличивал массу селезенки. Введение Сояфлан умеренно снижало концентрацию эстрадиола, лютеинизирующего и фолликулостимулирующего гормонов 11,6-25%. **Выводы.** Результаты исследования позволяют рассматривать Сояфлан как потенциальное профилактическое средство гормонозависимого рака молочной железы.

ABSTRACT

Recently, naturally occurring phytoestrogens, such as isoflavanoids and lignans, have come to the attention of researchers as prospective anticancer and antineoplastic agents. A medicinal product, Soyaflan, basically the standardized combination of polypeptides isolated from soybean flour with molecular masses ranging from 12.5 to 79.0 kDa incorporating isoflavones is available at the Institute of Bioorganic Chemistry, Uzbekistan Academy of Sciences. **Background.** The work was initiated to study effect of Soyaflan on the hormonal state of experimental animals with *N*-Nitroso-*N*-methylurea - induced mammary tumors. **Methods.** For purposes of the experiment, each of 40 outbred female mice received a single s.c. injection of *N*-nitroso-*N*-methylurea (Sigma) once a week in the mammary gland at the upper left paw at a dose of 0.84 mg/mouse for 5 weeks. Starting from the tenth day of *N*-nitroso-*N*-methylurea administration, Soyaflan was dissolved in the distilled water to be intragastrally administered to the mice by means of a catheter at a dose of 75mg/kg 5 times a week for 5 weeks.

Results. Mean tumor volume in mice administered with Soyaflan was 74% less than the one in the controls. Soyaflan was found to reduce toxic effect of *N*-Nitroso-*N*-methylurea on the liver of the animals and to increase the mass of their spleen. The agent was found to lower concentrations of sex hormones, such as, estradiol, luteinizing hormone and follicle stimulating hormone by 11.6 – 25%. **Conclusion.** Our findings allow considering Soyaflan as a promising agent in prevention of hormone-dependent mammary tumors.

Ключевые слова: соя, изофлавоны, онкология, половые гормоны

Key words: soybean, isoflavones, oncology, sex hormones

Половые гормоны (ПГ) в той или иной степени регулируют функции большинства тканей и органов, оказывая наиболее существенное влияние на клетки органов репродуктивной системы. Злокачественная трансформация этих клеток сопровождается нарушениями гормональной регуляции ключевых факторов клеточного гомеостаза: метаболического статуса, пролиферативной активности, генной экспрессии и других [6]. К настоящему времени представления о природе канцерогенного действия ПГ существенно расширились. Тем не менее,

с учетом несомненных успехов, гормональная терапия опухолей не всегда приводит к желаемым результатам. В большинстве случаев исходно гормоночувствительных опухолей постепенное прогрессирование заболевания сопровождается развитием резистентности к (анти-) гормональной терапии, т.е. формированием феномена относительной независимости клеток опухоли от гормональной стимуляции [4,9,10].

В качестве потенциальных антиканцерогенных и противоопухолевых средств умеренного воздействия привлекли к себе внимание фитоэстрогены (изофлавоноиды и лигнаны) природного происхождения. Изофлавоны сои обладают антиоксидантной активностью, способны ингибировать рост опухолевых клеток вследствие антиангиогенного и антипролиферативного действия, обладают протективными свойствами в отношении рака молочной железы и простаты [5].

В Институте биоорганической химии АН РУз получена стандартизированная комбинация полипептидов из соевой муки с молекулярной массой 12,5-79,0 кДа, богатая изофлавонами (содержание дайдзеина на грамм белка составляет в среднем 1,0-1,3 мг, генистеина – 2,0-2,45 мг). Препарат назван Сояфлан. Нами были получены результаты по противоопухолевой активности препарата Сояфлан (терапевтическая доза 75 мг/кг) сопоставимой с цитостатиком 5-фторурацилом (доза 228 мг/кг). Сояфлан, вводимый в монорегиме, вызывает торможение роста опухоли (ТРО) Саркома 180 до 71,0% по массе и до 78,2% по объему, 5-фторурацил, вводимый в монорегиме 74,2% по массе и 71,0% по объему. Комплексное введение 5-фторурацила и Сояфлан увеличило значение показателя ТРО на 22-26%; в итоге при данном режиме терапии ТРО составило 92,7% по массе и 96,9% по объему [2,3].

Цель и задачи исследования - изучение влияния препарата Сояфлан на гормональный статус при индуцировании злокачественных новообразований молочной железы N-метил-N-нитрозомочевинной (МНМ) у экспериментальных животных.

Материал и методы. Эксперимент выполнен на 40 беспородных мышках – самках, с первоначальной массой тела 18-23 г разводки вивария завода «Нихол». Животные содержались в типовом виварии на обычном рационе питания. Перед началом опыта мышьяк выдерживали с целью адаптации к условиям вивария в течение 1 недели. В каждую группу изначально было включено по 20 животных, с учетом их возможного падёжа.

Навеску канцерогена разводили водой для инъекций. Разовая доза МНМ (Sigma) составила 0,84 мг/мышь (0,2 мл раствора на мышь). Дозы канцерогена выбраны на основании данных литературы [8] и рассчитаны для мышьяк в соответствии с таблицами «Коэффициенты пересчета доз для мышьяк, крысы, обезьяны, собаки и человека» [1]. Канцероген вводили животным один раз в неделю, в течение 5 недель, путем подкожной инъекции в область молочной железы у основания левой передней лапки. Сроки введения канцерогена, исследуемого препарата и забоя, основаны на данных лите-

ратуры [8] с перерасчетом в соответствии с продолжительностью жизни беспородной лабораторной мышьяк.

Сояфлан растворяли в дистиллированной воде и вводили зондом в желудок мышьяк в дозе 75 мг/кг 5 раз в неделю, в течение 5 недель, начиная с десятого дня введения канцерогена. Используемая в эксперименте доза Сояфлан (75 мг/кг) была выбрана в соответствии с целью исследования и на основе ранее полученных результатов [2].

Контрольной группе вводили только канцероген в указанном режиме. По окончании эксперимента (112 суток от начала) животные были умерщвлены методом декапитации с последующим вскрытием и оценкой развития опухолевого процесса (регистрация наличия опухолевых узлов, измерение объема опухолевых узлов, гистологическое исследование). Гистологические исследования проводили по общепринятой методике. Все работы с лабораторными животными выполнялись в соответствии с общепринятыми этическими нормами обращения с животными.

Для оценки канцерогенеза у каждого животного выделяли опухолевый узел, проводили его измерение в трех проекциях (*a*, *b*, *c*). Объем опухоли (*V*, см³) вычисляли по формуле [7]:

$$V = a \cdot b \cdot c,$$

где: *a*, *b* и *c* – длина, ширина и высота опухолевого узла.

Затем вычисляли средний объем (*V*_{ср}, М±m) опухоли в каждой группе животных.

Для оценки влияния Сояфлан на гормональный статус при экспериментально индуцируемом канцерогенезе был исследован уровень эстрадиола, лютеинизирующего и фолликулостимулирующего гормонов (ЛГ и ФСГ) в крови животных на момент забоя. Концентрацию гормонов в сыворотке крови определяли радиоиммунным методом, используя реагенты коммерческих наборов: для эстрадиола – «Orion Diagnostica» (Финляндия), для ЛГ и ФСГ – «Immunotech» (Чехия).

Дополнительно проводили визуально-тактильную оценку цвета, макроструктуры и консистенции печени и селезенки при индуцируемом канцерогенезе РМЖ у мышьяк и воздействию Сояфлан.

Для обработки массива цифровых данных применялась стандартная компьютерная программа «Microsoft Office Excel». Различия считали достоверными при *p*<0,05.

Результаты и обсуждение. Наличие опухолевого узла было выявлено у 17 животных в контрольной группе и у 18 – в опытной. Средний объем опухоли у животных, которым вводили Сояфлан, был на 74,0% меньше, чем у животных контроля (Таблица 1).

Таблица 1.

Объем индуцированной МНМ опухоли контрольной и опытной групп

Группа	Средний объем опухоли (см ³) M±m	ТРО по объему (%)
Препарат Сояфлан	0,56±0,16*	74,0
Контроль	2,14±0,64	-

*p<0,05 по отношению к контролю

Гистологические исследования опухолевых узлов показало комплексы полиморфных атипичных клеток с полиморфными гиперхромными ядрами среди умеренно развитой стромы (Рис.).

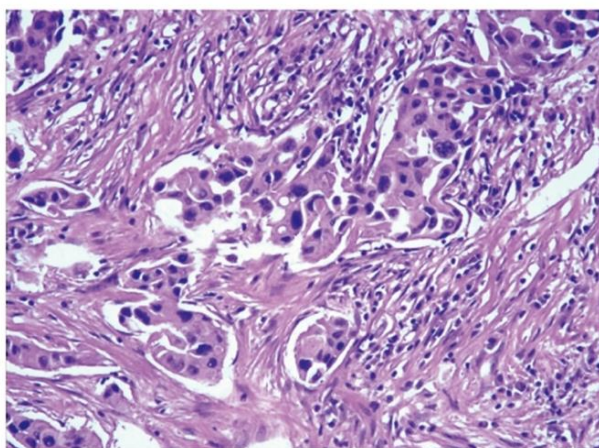


Рис. Микропрепарат. Окраска гематоксилином - эозин: x200

Изучение гормонального статуса животных при экспериментально индуцируемом канцерогенезе показало, что средний уровень эстрадиола в крови мышей при забое составил 288,89±13,69 МЕ/л, лютеинизирующего гормона – 42,0±2,13 МЕ/л, а фолликулостимулирующего гормона – 20,0±0,90 МЕ/л. Ежедневное введение соевого

белка на протяжении всего периода воздействия канцерогена снижало уровень эстрадиола на 25,0% (p<0,05) и на 22,2% (p<0,05) – уровень ЛГ. Концентрация ФСГ в крови животных под действием соевого белка также имела тенденцию к снижению (на 11,6%), однако разница с контролем в данном случае оказалась недостоверной (Таблица 2).

Таблица 2

Уровень гормонов в крови мышей при индуцировании канцерогенеза молочной железы МНМ и воздействии препарата Сояфлан

Группы	Эстрадиол	ЛГ	ФСГ
Контроль	288,89±13,69	42,0±2,13	20,0±0,90
Сояфлан	216,67±7,63*	32,67±1,23*	17,67±1,01
	p<0,05	p<0,05	p>0,05

Сравнительная оценка массы печени не выявила достоверной разницы между контрольной и

опытной группами, тогда как средняя масса селезенки в опытной группе была достоверно выше, чем в контрольной (Таблица 3).

Таблица 3

Средняя масса печени и селезенки у животных контрольной и опытной групп

Группа	Средняя масса печени M±m	Средняя масса селезенки M±m
Контроль	1,46±0,13	0,12±0,01
Сояфлан	1,26±0,07	0,15±0,01*
	p>0,05	p<0,05

Данный факт, по-видимому, объясняется повышением функциональной активности селезенки

и активацией иммунной системы вследствие воздействия Сояфлан в процессе индуцированного

канцерогенеза. Предыдущими исследованиями было доказано, что Сояфлан обладает иммуномодулирующим действием при терапии экспериментальных перевивных опухолей (Саркома 180) у животных на позднем этапе развития онкологического процесса, нормализуя ряд иммунологических показателей. Комплексное воздействие 5-фторурацила и препарата Сояфлан активирует Т-клеточный иммунный ответ, нормализует индекс иммунорегуляции, повышает количество цитотоксических натуральных киллеров – основного компонента противоопухолевого иммунологического надзора.

Макроскопический осмотр указанных органов показал, что в контрольной группе печень животных значительно варьировала по цвету и консистенции, наблюдались признаки токсического поражения и дистрофии органа. У животных, получавших Сояфлан, визуальнo-тактильные признаки печени не имели существенных различий внутри группы и были близки к норме.

Гистологические исследования печени показали, что в контрольной группе нарушение балочной структуры печени, клеточная обедненность, деградирование стромы, наличие мегакариоцитов (гигантских ядер), отсутствие пролиферации, митотический индекс (МИ) - 0. Также отмечены

некротические повреждения гепатоцитов, в области портального тракта наблюдались лимфоидные элементы, разобщение соединительной ткани междольковых перегородок, уменьшение гемокapиллярной сети, 2-ядерные клетки сосредоточены около портального тракта, неповрежденные паренхиматозные клетки без четких границ, со светлой цитоплазмой, ядра содержат глыбчатый хроматин, жиронакапливающих клеток и клеток Купфера мало (единичные).

В опытной группе балочная структура сохранена, клеточность сохранена в пределах нормы, деградирование стромы минимальное. В области портального тракта обнаружены гранулемы и узелки мелкоклеточной инфильтрации, гигантские клетки отсутствуют, выраженных цирротических явлений не наблюдается, пролиферация гепатоцитов незначительная – МИ – 0,5%.

Некротические повреждения гепатоцитов незначительные. Гемокapилляры в норме. Крупные сосуды с кровенаполнением. Клетки Купфера малочисленны располагаются между эндотелиальными клетками. Гепатоциты преимущественно 2-ядерные ядра содержат глыбчатый хроматин. Выявленные изменения свидетельствуют о развитии токсического, воспалительного процессов, с низкой пролиферативной реакцией.

Селезенка животных опытной и контрольной групп практически не имела различий по визуальнo-морфологическим признакам.

Заключение. Таким образом, проведенное исследование позволяет сделать следующие выводы: введение препарата Сояфлан при индуцировании МНМ опухоли молочной железы у мышей задерживает развитие злокачественного новообразования,

уменьшая объем опухолевого узла. Гистология печени показала, соевый белок богатый изофлавонами снижает токсическое действие МНМ. Введение Сояфлан умеренно снижает концентрацию эстрадиола, ЛГ и ФСГ, что позволяет рассматривать его как потенциальное профилактическое средство гормонозависимого РМЖ.

Список литературы

1. Арзамасцев Е.В., Гуськова Т.А., Березовская И.В., Любимов Б.И., Либерман С.С., Верстакова О.Л. Методические указания по изучению общетоксического действия фармакологических веществ // Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ/ под ред. Р.У. Хабриева / Москва: Медицина. 2005, с. 41-54.
2. Береснева Ю.В., Ибрагимов Ф.А., Ассесорова Ю.Ю. Противоопухолевая и биологическая активность 5-фторурацила и соевого белка, богатого изофлавонами на поздних сроках развития опухоли // Интер-медикал. 2014, №1, с. 5-9.
3. Beresneva Yu.V., Ibragimov F.A., Gildieva M.S. The role of biologically active components from soybeans in enhancement of the effectiveness of chemo- and radiotherapy of transplanted tumors // The Uzbek Biological Journal. 2017. №5 С. 7-10.
4. Красильников М.А., Щербakov А.М. Сигнальные пути, регулируемые эстрогенами, и их роль в опухолевой прогрессии: новые факты и направления поиска // Успехи молекулярной онкологии 2014; 1(1):18-26.
5. Ледина А.В., Прилепская В.Н. Фитоэстрогены и изофлавоноиды сои в лечении климактерического синдрома // Медицинские аспекты здоровья женщины 2013; 9 (73): 43-45
6. Малек А.М., Берштейн Л.М. МикроРНК: половые гормоны, гормональный канцерогенез, гормоночувствительность опухолевой ткани // Успехи молекулярной онкологии 2015; 2 (1): 004-012
7. Трещалина Е. М., Жукова О. С., Герасимова Г. К., Андрoнова Н.В., Гарин А.М. Методические указания по изучению противоопухолевой активности фармакологических веществ // Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ/ под ред. Р.У. Хабриева / Москва: Медицина. 2005, С. 637–651.
8. Чочиева А.Р. Исследование влияния лeтрозoла на некоторые показатели гормонально-метаболического статуса при экспериментальном раке молочной железы // Сибирский онкологический журнал. –2008. –№1 (25). С.101-102.
9. Risbridger G.P., Davis I.D., Birrell S.N. et al. Breast and prostate cancer: more similar than different. Nat Rev Cancer 2010; 10(3): 205-12.
10. Roop R.P., Ma C.X. Endocrine resistance in breast cancer: molecular pathways and rational development of targeted therapies. Future Oncol 2012; 8(3): 273-92.