

## ТИБОЛОН И ЕГО МЕТАБОЛИТЫ: ФАРМАКОЛОГИЯ, ТКАНЕВАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ И ЭФФЕКТЫ НА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ МОДЕЛЯХ ОПУХОЛЕЙ

Тиболон (действующее вещество препарата ливиал) представляет собой стероид со слабыми эстрогенными, прогестогенными и андрогенными свойствами, которые могут использоваться в качестве альтернативы обычной гормональной заместительной терапии у женщин в постменопаузе. Была проведена серия экспериментов (на крысах) для изучения влияния тиболона и его метаболитов на тканевую избирательность и на модели опухолей *in vitro* и *in vivo*. Тканевая избирательность тиболона была обнаружена в кости, где эстрогенная активность восстанавливает костную массу, и качество кости у крыс после овариэктомии, и отсутствия эстрогенной активности предотвращают пролиферацию эндометрия. Тиболон не стимулировал клеточную пролиферацию в линиях опухолевых клеток и уменьшал опухолевую нагрузку при опухолях молочных желез, вызванных ДМБА, как на модели лечения, так и на модели профилактики. Было показано, что тиболон и каждый из трех метаболитов значительно уменьшают среднюю опухолевую нагрузку после 10 недель лечения. Эти результаты показывают, что метаболиты могут вносить свой вклад в окончательный эффект тиболона в экспериментах *in vivo* и что метаболизм играет ключевую роль в проблеме избирательных тканевых эффектов тиболона. Тканеспецифическое действие тиболона может быть обусловлено различиями метаболизма в различных тканях в комбинации с типов рецепторов и их плотностью.

### ВВЕДЕНИЕ

В идеале гормональная заместительная терапия (ГЗТ) должна оказывать тканеспецифическое действие, причем эстрогенный компонент устраняет приливы посредством действия на головной мозг и предотвращает потерю костной ткани, в то время как прогестинный компонент защищает эндометрий. ГЗТ должна также оказывать положительные эффекты на сосудистую систему и влагалище. Кроме того, не должно быть неблагоприятных эффектов на метаболические пути, управляемые печенью, и, в частности, ГЗТ не должна стимулировать эндометрий или ткань молочных желез. Эстрогенная заместительная терапия не может быть описана как тканеспецифическая, поскольку гормоны доставляются через систему кровообращения, стимулируя рецепторы во всех тканях, и поэтому эстрогены должны комбинироваться с прогестогенами во избежание неблагоприятных эффектов на молочные железы и эндометрий.

Напротив, соединение тиболона представляет собой стероид со слабыми эстрогенными, прогестогенными и андрогенными свойствами, которые, как было показано, являются тканеспецифическими. Исследования показали, что тиболон является безопасной и эффективной формой ГЗТ [1]. Было показано, что тиболон подавляет уровни фолликулостимулирующего гормона и лютеинизирующего гормона у пациенток в постклимактерическом периоде

[2,3] и подавляет овуляцию у фертильных женщин [4]. Было показано, что он также предотвращает потерю костной ткани у женщин в постменопаузе в значительно большей степени, чем плацебо, уменьшал приливы, потливость и головную боль, и многие пациентки отмечали нарастающие ощущения благополучия. Тиболон не стимулирует пролиферацию эндометрия, не оказывает неблагоприятного эффекта на функцию печени или на углеводный обмен. Он оказывает положительное воздействие на сердечно-сосудистую систему. Хотя тиболон снижает уровень липопротеида высокой плотности (ЛВП), он также снижает уровень триглицеридов и липопротеидов и не оказывает неблагоприятного эффекта на факторы свертывания.

Приводится обзор серии экспериментов, в которых исследовались фармакологический профиль и тканевая специфичность тиболона и его метаболитов, а также их воздействие на модели опухолей.

### ФАРМАКОЛОГИЯ

#### Исследования *in vitro*

Тиболон имеет эстрогенные, прогестогенные и андрогенные характеристики. После введения тиболон быстро превращается в три метаболита:  $3\alpha$ -ОН и  $3\beta$ -ОН метаболиты и  $\Delta^4$ -изомерный метаболит (рис.1). Было обнаружено, что в линиях клеток MCF-7 эти метаболиты имеют различный относительный аффинитет связывания с рецепторами проге-

## ТКАНЕВАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ

### Исследование костей

Влияние тиболона на костную массу, костный метаболизм и качество кости оценивалось у крыс с использованием денситометрии и гистоморфометрии, биохимических показателей образования и резорбции кости, а также с помощью теста сгибания бедренной кости в трех точках соответственно.

На моделях у крыс в пределах 4 недель после овариэктомии наблюдается четкое уменьшение костной массы, которая может быть восстановлена с помощью лечения этинилэстрадиолом. Результаты исследований костной минеральной плотности, проведенных на бедренных костях крыс после овариэктомии, показали, что после 4 недель лечения тиболоном действовал таким же образом, как эстрадиол. У крыс без яичников тиболоном вызывал четкую, зависимую от дозы, реакцию (рис.2), подавляя резорбцию кости и поэтому сохраняя нормальные уровни костной массы. Действие эстрадиола и тиболона на кости объясняется тем, что эти соединения подавляют остеоклаз. Воздействия тиболона могут блокироваться антиэстрогенными препаратами, но не антиандрогенными или антипрогестогенными, свидетельствуя о том, что благоприятный эффект наиболее

стерона (ПР), эстрогена (ЭР) и андрогена (АР) человека. Тиболон слабо связывается со всеми этими рецепторами: цитозольный ПР 1,1% (Org 2028 = 100%), цитозольный ЭР 0,5% (эстрадиол = 100%), цитозольный АР 2,4% (ДГТ = 100%).

$\Delta^4$ -изомер связывался только с цитозольным прогестероном (10,4%) и андрогенными рецепторами (29,1%), а  $3\alpha$ -ОН метаболит и  $3\beta$ -ОН метаболит связывались только с эстрогенными рецепторами (2,5% и 1,9% соответственно). Аналогичные результаты были обнаружены, когда тиболон и его метаболиты использовались для индуцирования активности люциферазы в клетках яичников китайских хомячков, содержащих рецепторы прогестерона (ПР), эстрогена (ЭР) или андрогена (АР) (при ПР 4,6% относительно Org 2058, при ЭР 0,2% относительно эстрадиола и АР 5,6% относительно ДГТ). Тиболон вызвал слабую активность рецепторов прогестерона, андрогена и эстрогена, тогда как  $\Delta^4$ -изомер вызвал активность только рецепторов прогестерона (8,0%) и андрогена (20,3%), а  $3\alpha$ -ОН и  $3\beta$ -ОН метаболиты вызывали активность только эстрогенных рецепторов, составляющую соответственно 2,9% и 2,1%.

### Исследования *in vivo*

При количественном определении Allen-Doisy, в котором оценивается эстрогенная активность на ткани влагалища крыс, тиболон проявил 10% активности этинилэстрадиола. У кроликов едва наблюдалась прогестогенная активность, определяемая как дифференциация ткани эндометрия, что наиболее вероятно, связано с взаимодействием эстрогенных метаболитов в плане влияния на прогестогенную реакцию эндометрия у этого вида. У крыс тиболон проявил 5% андрогенной активности метилтестостерона.  $\Delta^4$ -изомер обладал гораздо более высокой эстрогенной активностью, чем тиболон, тог-

да как  $3\alpha$ -ОН и  $3\beta$ -ОН метаболиты, вероятно, быстро превращались в другие неактивные метаболиты, поскольку они обладают меньшей эстрогенной активностью *in vivo*, чем тиболон.  $\Delta^4$ -изомер при изолированном применении обладал более высокой эстрогенной активностью, чем тиболон, вероятно, вследствие образования эстрогенных метаболитов, отличных от метаболитов, образованных из тиболона, таких как 3-гидроксил  $5\alpha$ -восстановленные соединения.

$\Delta^4$ -изомер имел андрогенную активность, которая в пять раз превышала активность тиболона, тогда как  $3\alpha$ -ОН метаболит и  $3\beta$ -ОН метаболит не имели андрогенной активности, свидетельствуя о том, что их широкого превращения в  $\Delta^4$ -изомер не происходит.  $\Delta^4$ -изомер проявил более высокую активность, способствующую наступлению и сохранению беременности, чем тиболон, тогда как аналогичная активность  $3\alpha$ -ОН и  $3\beta$ -ОН метаболитов низкая. У интактных крыс ингибирующая овуляющую активность  $\Delta^4$ -изомера в пять раз превышала активность тиболона (и, должно быть, связана с эстрогенной и прогестогенной активностью этого метаболита). Как и в предшествующих испытаниях,  $3\alpha$ -ОН метаболит и  $3\beta$ -ОН метаболиты проявили небольшую или отсутствующую активность в этом эксперименте.

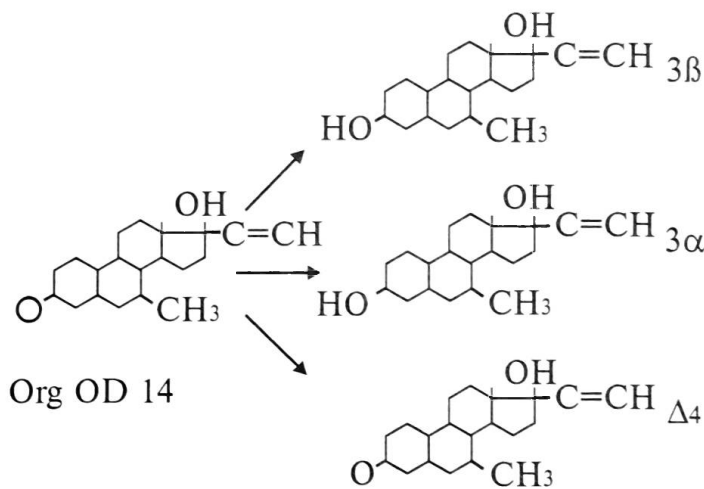


Рис.1. Химическая структура тиболона и его метаболитов

вероятно связан с эстрогенными компонентами. Положительные эффекты могут объясняться более высокой распространенностью эстрогенных метаболитов в костной ткани (или костном мозге).

Был проведен эксперимент для сравнения качества кости у интактных и овариэктомированных крыс, получавших тиболон или этинилэстрадиол. Наблюдалось уменьшение максимальной нагрузки, которое могло относиться к бедренным костям овариэктомированных крыс в сравнении с интактными крысами. Было установлено, что лечение тиболоном улучшало качество костей в той же степени, что и этинилэстрадиол у овариэктомированных крыс, и наблюдалась зависимость от дозы реакция. Воздействия тиболона на кости аналогичны воздействиям эстрогена.

#### Исследования ткани эндометрия

Активность и патоморфология эпителия эндометрия оценивались у крыс, получавших тиболон или этинилэстрадиол. Влияние лечения на пролиферацию эндометрия оценивалось у неполовозрелых крольчих в нашей собственной лаборатории, а также в тканевых культурах эндометрия человека группой Gurpide [11]. Оценка в баллах активности у крыс основывалась на высоте эпителия просвета, числе и размере желез и высоте железистого эпителия. Балльная оценка патоморфологии основывалась на присутствии метаплазии или гиперплазии и наличии и числе кист.

У неполовозрелых крольчих тиболон не вызывал пролиферацию эндометрия до такой степени, как этинилэстрадиол, вероятно, ввиду неэстрогенных эффектов  $\Delta^4$ -изомера. Аналогичные результаты были получены, когда активность и патоморфология эпителия матки интактных и подвергнутых овариэктомии крыс изучались после лечения тиболоном и этинилэстрадиолом. Патология эндометрия отчетливо на-

блюдалась при использовании этинилэстрадиола, но не тиболона. Активность эндометрия была ниже при использовании тиболона, чем при использовании этинилэстрадиола.

Инкубировали образцы культуры ткани эндометрия человека и исследовали влияние тиболона и его метаболитов на эстрадиол-17 $\beta$ -дегидрогеназу в пролиферативном эндометрии [11]. Известно, что уровни эстрадиол-17 $\beta$ -дегидрогеназы возрастают под влиянием прогестинов. И тиболон, и  $\Delta^4$ -изомер вызывали возрастание уровней эстрадиол-17 $\beta$ -дегидрогеназы, доказывая, что тиболон в эндометрии действовал как прогестонное соединение. Выраженный прогестогенный эффект тиболона в системе *in vivo* был неожиданным и свидетельствовал о том, что тиболон превращался в  $\Delta^4$ -изомер. Это было подтверждено исследованиями метаболизма с использованием меченого тритием тиболона (рис.3), которые показали, что тиболон специфически изомеризировался в  $\Delta^4$ -изомер в эндометрии человека.

## МОДЕЛИ ОПУХОЛЕЙ

### Исследования *in vitro*

Для исследования влияния тиболона на риск молочной железы в исследованиях *in vivo* изучался рост двух субклонов (А и Н) линий опухолевых клеток MCF-7 и субклонов А и S клеток T47-D [12]. В целом, влияние тиболона на клеточную пролиферацию было существенно меньше, чем влияние эстрадиола. В клетках MCF-7 (А) тиболон оказывал слабый пролиферативный эффект (1% активности эстрадиола), который не достиг максимального уровня, полученного при использовании эстрадиола, тогда как в клетках MCF-7 (Н), которые обладали меньшей реактивностью на эстроген, тиболон и эстрадиол проявили аналогичное различие реакции роста, как в субклоне А. В клетках T47-D (А) эффект тиболона составил приблизительно 1% от эффекта эстрадиола, а в клетках T47-D (S) тиболон не оказывал даже более низкого стимулирующего эффекта, но в субклоне T47-D не было показано вообще никакой стимуляции. В присутствии эстрадио-

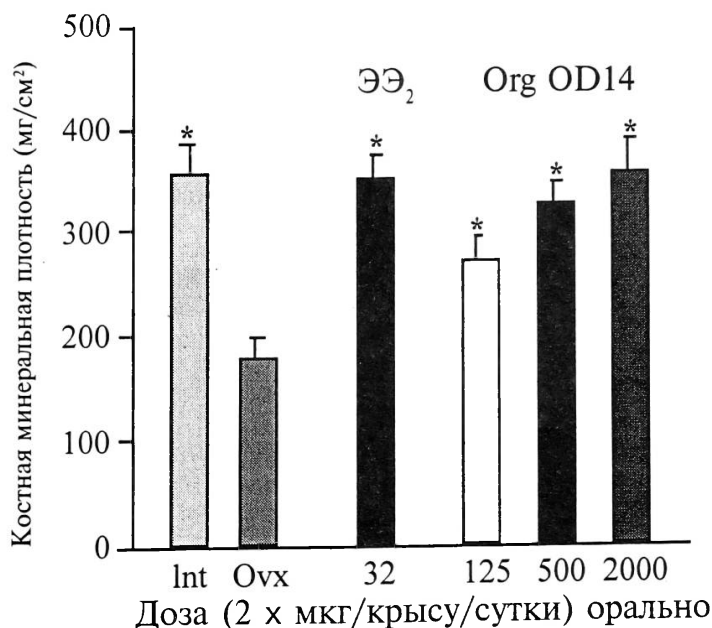


Рис.2. Влияние этинилэстрадиола (ЭЭ<sub>2</sub>) и тиболона (Org OD14) на костную минеральную плотность в бедренных костях крыс. Величины представлены в виде средних  $\pm$  стандартная ошибка средней.

\* -  $p < 0,05$ .

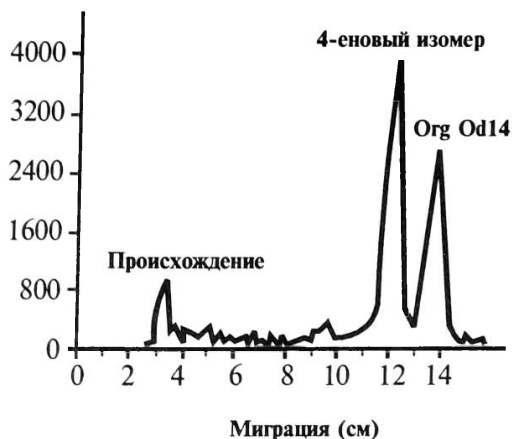


Рис. 3. Изомеризация [3H] тиболона (Org OD 14) в эндометрии человека [13].

ла тиболон оказывал подавляющее рост действие на клетки T47-D субклона S, но не субклона A.

#### Исследование *in vivo*

Известно, что пролактин и эстрогены стимулируют опухоли молочных желез, тогда как андрогены оказывают подавляющее влияние, а прогестины оказывают изменчивые воздействия. Для изучения терапевтического и предотвращающего (профилактического) лечения тиболоном и тамоксифеном в исследованиях *in vivo*, проведенных у крыс, использовались опухоли молочной железы, вызванные диметилбензатраценом (ДМБА). На терапевтической модели лечение проводилось в течение 7 недель после вызванного развития опухолей, тогда как на профилактической модели лечение назначалось непосредственно после ДМБА [12].

В сравнении с контрольными крысами, у которых опухолевая нагрузка значительно возрастала, тиболон в дозе 2 мг/кг на терапевтической модели стабилизировал опухолевую нагрузку в такой же степени, как тамоксифен в дозе 0,4 мг/кг (рис. 4). Когда совместно вводились тиболон и тамоксифен, наблюдалось несколько, но недостоверно, большее уменьшение опухолевой нагрузки. Когда тиболон вводился в дозе 0,5; 1,0 или 2 мг/кг, наблюдалась зависимость от дозы реакция, и даже самая низкая доза вызывала значительное уменьшение опухолевой нагрузки.

При профилактическом лечении наблюдалось выраженное

уменьшение опухолевой нагрузки при использовании тиболона, в сравнении с контролем (рис. 5). В профилактической модели проводилось испытание метаболитов ( $3\alpha$ -ОН метаболита,  $3\beta$ -ОН метаболита и  $\Delta^4$ -изомера), и они значительно уменьшили среднее число опухолей и среднюю опухолевую нагрузку по данным оценки объема ( $\text{мм}^3$ ) и массы (г) после 10 недель лечения. Это свидетельствует о том, что метаболиты вносят вклад в эффект тиболона.

## ВЫВОДЫ

В классической экспериментальной модели тиболон проявляет слабую эстрогенную, прогестогенную и андрогенную активность. Тканеспецифические эффекты тиболона исследовались на кости, молочной железе и эн-

дометрии. Было показано, что тиболон проявляет тканевую специфичность, которую можно частично объяснить дифференциальным местным метаболизмом. Метаболиты обладают различным связыванием с гормональными рецепторами и различной активностью, и поэтому различие местной концентрации метаболитов наряду с различной местной популяцией рецепторов (типы и уровни) могут привести к тканевой специфичности. Тиболон ведет к увеличению костной массы и качества кости у крыс после овариэктомии путем подавления резорбции костей образом, подобным эстрогену. Тиболон не вызывал патологию эндометрия у крыс и проявляет меньшее пролиферативное воздействие, чем эстрадиол, благодаря прогестагенному метаболиту  $\Delta^4$ -изомеру.

Тиболон в целом оказывал на линии опухолевых клеток (MCF-7 и T47-D) пролиферативное воздействие, составляющее только 1% эффекта эстрадиола, и отчетливо подавлял развитие и рост опухолей молочной железы, вызванных ДМБА. Тканеспецифическое действие тиболона может быть вызвано различием метаболизма в различных тканях в комбинации с присутствием типов рецепторов и их плотностью.

Перевод подготовлен агентством "Интердиалект"

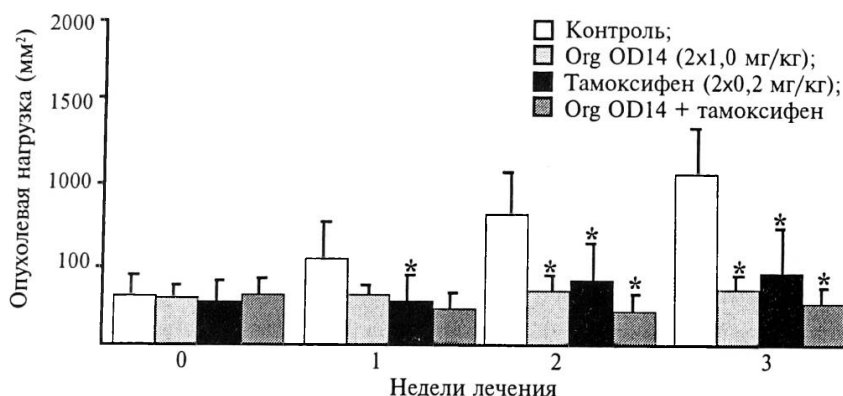


Рис. 4. Влияние тиболона (Org OD 14) и тамоксифена на вызванные ДМБА опухоли молочных желез у крыс: терапевтическая модель.

\* -  $p < 0,05$ .

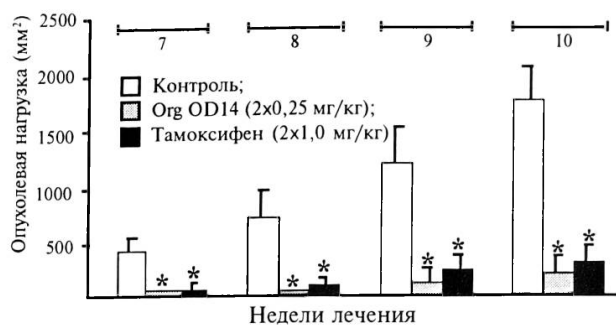


Рис.5 Влияние тиболона (Org OD14) на вызванные ДМБА опухоли молочной железы у крыс: профилактическая модель.

\* –  $P < 0,05$ .

## ЛИТЕРАТУРА

1. Tax L., Goorissen E.M. and Kicovic P.M. Clinical profile of Org OD14. *Maturitas*, 1987, Suppl. 13-13.
2. Cittadini J., BenJ. and Badano A.R. The use of a new steroid (Org OD14) in the climacteric syndrome. *Reproduction*, 1982. - №6. - P. 69-79.
3. Kicovic P.M., Cortes-Prieto J and Luisi M. Placebo-controlled crossover study of effects of Org OD 14 in menopausal women. *Reproduction*, 1982. - № 6. - P. 81-91.
4. Franchimont P., Franchi F. and Luidi M. Ovulation-inhibiting properties of Org OD14. *Reproduction*, 1982. - №6. - P. 61-67.
5. lindsay R., Hart D.M. and Kraszewski A. Prospective double-blind trial of synthetic steroid (Org OD 14) for preventing postmenopausal osteoporosis. *Br.Med.J.*, 1978. - №280. - P. 1207-1209.
6. Bjarnson N.H., Bjarnson K., Hassager C. and Christiansen C. The response in spinal bone mass to tibolone treatment is related to bone turnover in elderly women. *Bone*, 1997. - №20. - P. 151-155.
7. Neviny-Stickel J. Double-blind cross-over study with Org OD 14 and placebo in postmenopausal patients. *Arch.Gynecol.*, 1983. - №234. - P. 27-31.
8. Travoux R., Dieuland P. and Blum A. Efficacy and safety of Org OD 14 in the treatment of climacteric complaints. *Maturitas*, 1983. - №5. - P. 89-96.
9. Genazzani A.R., Petraglia F. and Facchinetti F. Effects of Org OD 14 on pituitary and peripheral beta-endorphin in castrated rats and postmenopausal women. Presented at the 4 yj International Congress of the Menopause, Orlando, USA. *Maturitas*, 1984, Suppl., 35-48.
10. Benedek-Jaszmann L.J. Long-term placebo-controlled efficacy and safety study of OrgOD 14 in climacteric women. *Maturitas*, 1987, Suppl., 25-33.
11. Markiewicz L. and Gurpide E. In vitro evaluation of estrogenic, estrogen antagonistic and progestagenic effects of a steroid drug (OrgOD14) and its metabolites on human endometrium. *J.Steroid. Biochem.*, 1990. - №35. - P.535-541.
12. Kloosterboer H.J., Schoonen W.G., Deckers G.H. and Klijn J.G. Effects of progestagens and OrgOD 14. I in vitro tumour models. *J.Steroid.Biochem.Mol.Biol.*, 1994. - №49. - P. 311-318.
13. Tang B., Markiewicz L., Kloosterboer H.J. and Gurpide T. Human sendometrial 3 beta-Hydrozysteroid dehydrogenase/ isomerase can locally reduce intrinsic estrogenic/progestagenic activity ratios of a steroidal drug (OrgOD 14). *J.Steroid.Biochem.Mol.Biol.*, 1993. - №45. - P.345-351.