

УДК 616-006.6: 57.086.835

СОВМЕСТНОЕ ДЕЙСТВИЕ ХОРИОНИЧЕСКОГО ГОНАДОТРОПИНА И ЭМБИХИНА НА КЛЕТОЧНУЮ КУЛЬТУРУ КАРЦИНОМЫ ГОРТАНИ НЕР-2

¹Косых А.А., ¹Горшков А.С., ²Полушин А.В.

¹ГОУ ВПО «Кировская государственная медицинская академия», Киров, e-mail: biolkaa@inbox.ru;

²Военный госпиталь ВВ МВД России (6/ч 3713), Киров, e-mail: kirovalex25@mail.ru

В настоящее время влияние хорионического гонадотропина (ХГч) на пролиферативную активность и морфофункциональное состояние клеток изучено недостаточно. Известно, что он способен повышать митотическую активность гепатоцитов при циррозе и резекции печени, но при этом обладает противоопухолевым действием. Но нет данных о взаимодействии гормона с другими лекарственными веществами. В работе исследован апоптоз клеток карциномы гортани Нер-2 под воздействием ХГч совместно с цитостатиком эмбихином. Установлено, что ХГч тормозит клетки Нер-2 и стимулирует апоптоз. Комбинирование ХГч с эмбихином снижает цитотоксический эффект гормона.

Ключевые слова: карцинома гортани Нер-2, МТТ-тест, апоптоз, хорионический гонадотропин

COMBINED EFFECT OF HUMAN CHORIONIC GONADOTROPIN AND EMBIHIN ON CELL CULTURE OF THROAT CARCINOMA HEP-2

¹Kosykh A.A., ¹Gorshkov A.S., ²Polushin A.V.

¹Kirov State Medical Academy, Kirov, e-mail: biolkaa@inbox.ru;

²Military hospital of Ministry of Home Affairs (3713), Kirov, e-mail: kirovalex25@mail.ru

Effects of human chorionic gonadotropin (hCG) on proliferative activity, morphological and functional condition of cells was not enough investigated at these time. It is known the fact, that hCG can increases mitotic activity of hepatocytes with liver cirrhosis and liver resection, but it has antitumor effect simultaneously. There is no data of hCG interaction with other medications. Apoptosis of the throat carcinoma Hep-2 under the influence of hCG and embihin was investigated. It was determined that hCG inhibits Hep-2 cells and stimulates apoptosis. Combination of hCG and embihin decreases cytotoxic effect of the hormone.

Keywords: throat carcinoma Hep-2, MTT-assay, apoptosis, human chorionic gonadotropin

Онкогенез – одна из неразрешенных проблем современной медицинской науки. Многие авторы [2, 3, 8] обращают внимание на значимость изучения процессов дифференцировки и механизмов контроля передачи митотического сигнала в опухолевой клетке. Наше внимание привлёк гормон эмбрионального периода хорионический гонадотропин человека (ХГч), известный как стимулятор регенерации патологически изменённых органов.

Рецепторы к ХГч имеются на клетках молочной железы, гонад и эмбриональных тканей. Определение хорионического гонадотропина информативно при таких опухолях, как хорионкарцинома, семинома и различные варианты тератом. ХГч рассматривается как маркер злокачественного процесса, прогностически значимый для больных с указанной патологией [1]. Тем не менее действие данного гормона не ограничивается внутриутробным периодом и гонадотропным влиянием. Ранее нами [4] было показано, что он способен повышать митотическую активность нормальных гепатоцитов при циррозе и резекции печени в эксперименте с 0,04 до 4,26 %. В связи с этим возник вопрос о возможной онкогенности гормона. Впоследствии выяснилось, что

данный гормон способен подавлять митогенстимулированную пролиферацию лимфоцитов, клеток промиелоидного лейкоза HL-60 *in vitro* и ряда лейкоемий *in vivo* [8]. ХГч способен подавлять рак молочной железы MCF-7 через активацию апоптоза, увеличивать чувствительность клеток MCF-7 *in vitro* к действию лучевых агентов. На основании полученных данных было предложено использовать хорионический гонадотропин в адьювантной терапии рака молочной железы. [10] Доказано, что вышеперечисленные клетки имеют на своей поверхности рецепторы к ХГч, через которые он и осуществляет свое действие.

Известно, что именно гиперактивность того или иного ростового фактора способна запустить в клетке неконтролируемый пролиферативный ответ и иммортализовать её. В предыдущих исследованиях нами было определено действие ХГч в высоких концентрациях (50, 100 и 150 МЕ/мл) на клетки Нер-2 (карцинома гортани). Данные концентрации были использованы с целью гиперстимуляции клеток. Оказалось, что ХГч в таком диапазоне не стимулирует, а подавляет культуру карциномы гортани Нер-2 и способствует дезорганизации монослоя. [7] Эпителий гортани не являет-

ся гормонзависимой тканью, как эпителий молочной железы, и не является производным гемопоэтического дифферона, как лейкоэмбриональные клетки HL-60. В литературе нет данных о наличии на клетках Her-2 рецепторов к гонадотропинам. В дальнейшем встал вопрос о действии гормона на данную клеточную линию в его физиологических концентрациях. По данным И.М. Солопаевой [8], ХГч присутствует в сыворотке здоровых небеременных женщин и мужчин. Её данные подтверждает А.А. Кишкун [1]. Таким образом, влияние ХГч на пролиферативную активность и морфофункциональное состояние клеток изучено недостаточно и исследование механизмов влияния ХГч на органы и ткани является актуальной медико-биологической задачей.

Материал и методы исследования

Для решения вышеуказанной задачи был исследован цитотоксический эффект ХГч с использованием теста с бромидом метилтиазолтетразолия (МТТ) для оценки специфической гибели клеток и тест на апоптоз. МТТ тест проводили в соответствии с рекомендациями МЗ РФ по оценке цитотоксичности новых фармакологических веществ [6]. В опытные триплеты вносили официальный препарат хорио-

нического гонадотропина (Московский эндокринный завод) и эмбихин в концентрациях 4 и 2 мкг/мл. Считывание оптической плотности лизата в лунках (ОП), которая прямо зависит от числа выживших клеток, проводили на ИФА-ридере ($\lambda = 492$ нм). В качестве препарата сравнения использовали цитостатик алкилирующего ряда эмбихин.

Для исследования апоптоза клеточный монослой в конце культивирования промывали фосфатно-солевым буфером, монослой диспергировали версеном. Далее вносили по 5 мкл смеси красителей бромистого этидия (EtBr) и акридинового оранжевого (АО) (25 мкг/мкл каждого). Подсчет числа апоптозных и некротических клеток осуществляли согласно протоколам Methods in Molecular Biology [9].

Результаты исследования и их обсуждение

Эмбихин в концентрации 4 мкг/мл вызывает снижение оптической плотности клеточного лизата в опытных лунках с $0,602 \pm 0,048$ у.е. (контроль) до $0,134 \pm 0,012$ у.е., что составило 77,7%. (рис. 1, горизонтальная сплошная линия). Снижение концентрации эмбихина до 2 мкг/мл (рис. 1, горизонтальная пунктирная линия) вызывает снижение ОП до $0,469 \pm 0,036$ у.е., что составляет 22,04% от исходных значений.

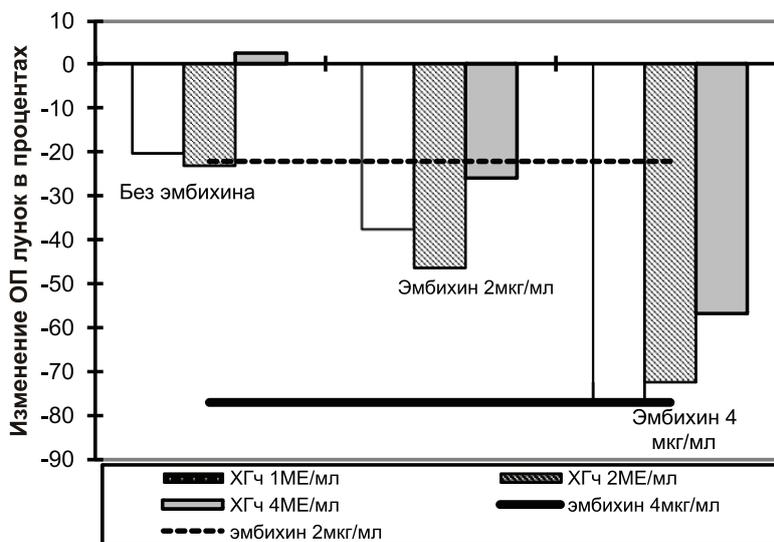


Рис. 1. Цитотоксическое действие ХГч и эмбихина на культуру Her-2

При действии ХГч в концентрациях 1 и 2 МЕ/мл наблюдалось снижение ОП лизата в лунках в пределах от 20,38 до 22,95%. Эти данные были близки к действию эмбихина в концентрации 2 мкг/мл. Следовательно, в данных концентрациях ХГч способен подавлять клетки карциномы гортани Her-2. Однако увеличение концентрации ХГч до 4МЕ/мл не усиливает его цитотоксическое действие ($p = 0,78$). В комбинации ХГч с эмбихином результат оказался обратным. При действии эмбихи-

на в дозе 4 мкг/мл все концентрации ХГч повышают выживаемость клеток, причем четко прослеживается зависимость «доза-эффект». При увеличении концентрации ХГч повышается и выживаемость клеток. При уменьшении концентрации цитостатика наполовину ХГч несколько усиливает его действие, но с возрастанием его дозы токсический эффект ослабевает. При исследовании процесса апоптоза клеточной линии Her-2 данные МТТ-теста подтвердились (рис. 2).

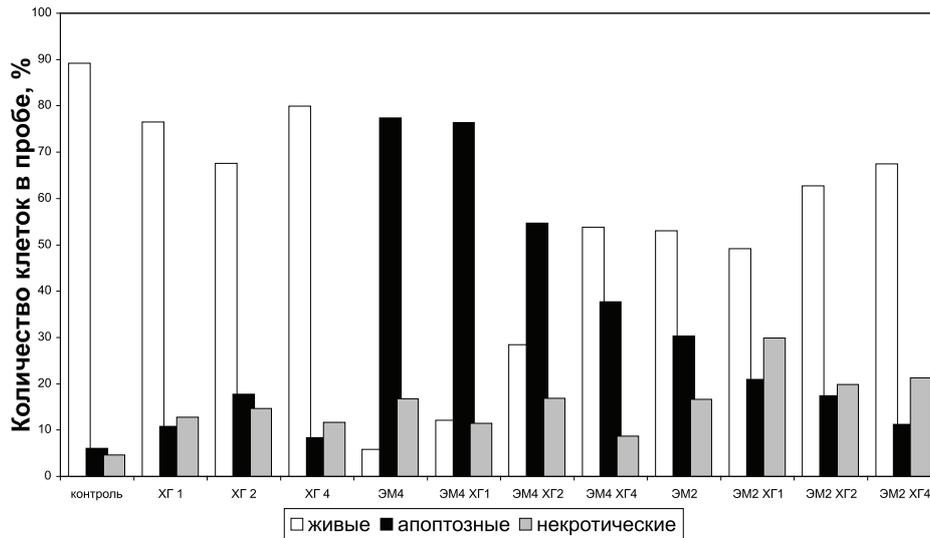


Рис. 2. Содержание живых, апоптотических и некротических клеток при действии ХГч и эмбихина

ХГч во всех исследованных концентрациях повышал число апоптотических клеток с $6,10 \pm 1,36$ до $17,73 \pm 1,44$ %. Повышение концентрации ХГч до 4 МЕ/мл вызывало снижение его проапоптотических свойств. Коэффициент корреляции концентрации гормона и количества апоптотических клеток между контрольной пробой и ХГч 2 МЕ/мл составил $r = 0,99$; при учете данных группы «ХГч 4 МЕ/мл» коэффициент корреляции снизился до $r = 0,18$. Аналогичная зависимость отмечается и в отношении доли некротических клеток.

Известно, что введение ХГч крысам с опухолевым графтом (лимфосаркома Плисса) вызывает фрагментацию хромосомной ДНК. При этом меньшие дозы хорионического гонадотропина раньше индуцируют апоптоз, что подтверждается морфологическими исследованиями, а его индукция не зависит от пути введения гормона. [8] Следовательно, хорионический гонадотропин может стимулировать апоптоз ряда опухолевых клеток различной тканевой и видовой принадлежности. Увеличение дозировки ХГч повышает его проапоптотические свойства только до определенного уровня, по достижении которого наблюдается обратный эффект.

Комбинирование гормона с цитостатиком во всех указанных дозах приводило к повышению выживаемости клеток, что также проявлялось дозозависимо (рис. 2). Коэффициент корреляции (показатель «живые клетки») для групп с содержанием эмбихина 4 мкг/мл в среде культивирования составил $r = 0,998$; аналогичный показатель для групп с содержанием эмбихина 2 мкг/мл в среде культивирования составил

$r = 0,895$. Следовательно, сам по себе хорионический гонадотропин способен подавлять клетки карциномы Нер-2, повышая число апоптотических и некротических клеток, а добавление цитостатика препятствует данному процессу. Необходимо отметить некоторый диссонанс показателей апоптотического теста и МТТ-теста. В МТТ-тесте комбинация ХГч и 2 мкг/мл эмбихина несколько понижает оптическую плотность лизата в лунках (усиление токсичности), а аналогичные дозировки в апоптотическом тесте показывают усиление противоапоптотической активности веществ. Вероятно, что помимо стимуляции апоптоза гормон замедляет метаболическую активность клеток Нер-2, что и отражается в МТТ-тесте. Как известно, механизм действия эмбихина заключается в алкилировании нуклеофильных центров молекулы ДНК, что может вызывать ковалентную необратимую сшивку двух её цепей. [5] Невозможность репарации таких повреждений заканчивается р53-зависимым апоптозом, который является энергоемким процессом. В условиях замедленного метаболизма у клетки нет возможности включить программу апоптоза, что, в конечном счете, снизит количество апоптотических клеток в пробе.

Выводы

Хорионический гонадотропин в концентрациях 1 и 2 МЕ/мл подавляет карциному гортани Нер-2 и стимулирует процессы апоптоза клеток. Увеличение концентрации ХГч в 2 раза с 2 до 4 МЕ/мл снижает цитотоксический эффект гормона. Комбинирование хорионического гонадотропина

с эмбихином понижает чувствительность клеток к цитостатику, возможно за счет снижения метаболической активности опухолевых клеток.

Список литературы

1. Кишкун А.А. Иммунологические и серологические исследования в клинической практике. – М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2006. – 536 с.
2. Копнин Б.П. Мишени действия онкогенов и опухолевых супрессоров: ключ к пониманию базовых механизмов канцерогенеза (обзор) // Биохимия. – 2000. – т. 65, №1. – С. 5–34.
3. Косых А.А., Горшков А.С., Полушин А.В. Регуляция пролиферации клеток с помощью хорионического гонадотропина человека // Фундаментальные исследования. – 2008. – № 10. – С. 74–76.
4. Косых А.А. Соединительная ткань печени в норме, при хроническом гепатите и циррозе в условиях регенерации (морфофункциональное исследование): дис. ... д-ра наук. – М., 1992.
5. Крамаренко И.И. Роль коррекционной репарации ДНК (MMR) в механизме гено- и цитотоксического действия метилнитрозомочевны в опухолевых клетках человека: дис. ... канд. биол. наук. – М., 2006. – 87 с.
6. Методические указания по изучению противоопухолевой активности фармакологических веществ / Е.М. Трещалина, О.С. Жукова, Г.К. Герасимова, Н.В. Андропова, А.М. Гарин // Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ;

под общ. ред. Р.У. Хабриева. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: Медицина, 2005. – С. 637–651.

7. Способ модуляции патологических изменений и дезорганизации в культуре клеток карциномы гортани Her-2: патент РФ № 200711862/13, 17.05.2007 / Косых А.А., Горшков А.С., Полушин А.В. // Патент России № 2349600.2009. Бюл. №8.

8. Солопаева И.М. Хорионический гонадотропин в онтогенезе и онкогенезе (По материалам двух научных открытий и одной научной гипотезы): монография. – Н. Новгород: Изд-во «Растр-НН», 2007. – 282 с.

9. Apoptosis methods and protocols // Methods in molecular biology; edited by Hugh J.M. Brady. – ISSN 1064-3745. – P. 282.

10. Enhancement of radiosensitivity of the MCF-7 breast cancer cell line with human chorionic gonadotropin / S. Pond-Tor, R.G. Rhodes, P.E. Dahlberg, J.T. Leith, J. McMichael, A.E. Dahlberg // Breast Cancer Res. – Treat. 2002 Mar. – №72(1). – P. 45–51.

Рецензенты:

Погорельский И.П., д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник 48 ЦНИИ Минобороны России, г. Киров;

Щербатюк Т.Г., д.б.н., профессор, зав. кафедрой биологии ГОУ ВПО «Нижегородская государственная медицинская академия», г. Нижний Новгород.

Работа поступила в редакцию 06.07.2011.