

УДК 616-006.6: 57.086.835

ВЛИЯНИЕ ХОРИОНИЧЕСКОГО ГОНАДОТРОПИНА НА МИТОТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ И МЕТАБОЛИЗМ КЛЕТОК РАБДОМИОСАРКОМЫ RD

¹Горшков А.С., ¹Косых А.А., ²Утемов С.В., ¹Марченков А.А.

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

²ФГБУН «Кировский НИИ гематологии и переливания крови» ФМБА России,
Киров, e-mail: utemovs@mail.ru

Хорионический гонадотропин человека (ХГч) известен как гормон беременности, обеспечивающий дифференцировку тканей плода. В последнее время открыты его новые свойства, в частности он способен подавлять развитие некоторых опухолей. В связи с этим появились работы о возможном использовании хорионического гонадотропина в схемах противоопухолевой терапии в качестве адъювантного средства. В работе представлены результаты исследования митотической активности, МТТ теста и апоптоза клеток рабдомиосаркомы RD под влиянием хорионического гонадотропина, эмбихина и их применения в комплексе в различных дозах. Показано, что ХГч ингибирует клетки RD путем угнетения митотической активности и стимуляции апоптоза. Наиболее токсичной для данной линии клеток является доза в 2 МЕ/мл хорионического гонадотропина. Комбинация ХГч и эмбихина снижает цитотоксический эффект гормона, что необходимо учитывать при составлении схем рациональной фармакотерапии опухолей.

Ключевые слова: хорионический гонадотропин, культура клеток, рабдомиосаркома RD, эмбихин, МТТ-тест, апоптоз

EFFECTS OF HUMAN CHORIONIC GONADOTROPIN ON MITOTIC ACTIVITY AND METABOLISM OF RHABDOMYOSARKOMA RD CELLS

¹Gorshkov A.S., ¹Kosykh A.A., ²Utemov S.V., ¹Marchenkov A.A.

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

²Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion, Kirov, e-mail: utemovs@mail.ru

Human chorionic gonadotropin is known as a pregnancy hormone, provide differentiation of fetal tissues. At the last time new properties of human chorionic gonadotropin were discovered, particularly it can reduce development of some tumors. In this connection there are investigations on using chorionic gonadotropin in protocols of anti-tumor therapy as adjuvant. The results of estimating of mitotic activity, MTT-assay and apoptosis of the rhabdomyosarkoma RD cells under the influence of human chorionic gonadotropin (hCG) and embihin and complex using of these is shown in the study. It was determined that hCG inhibits RD cells by reducing mitotic index and stimulating apoptosis. Combination of hCG and embihin decreases cytotoxic effect of the hormone. The most toxicity dose for the cell line is 2 IU per milliliter. It is necessary to mention in making of protocols of rational pharmacotherapy of tumors.

Keywords: cell lines, rhabdomyosarkoma RD, human chorionic gonadotropin, embihin, MTT-assay, apoptosis

В последнее время возрастает интерес к исследованию метаболической активности и других ранее неизвестных свойств некоторых биологически активных веществ и гормонов, в частности, хорионического гонадотропина человека (ХГч). Оказалось, что данный гормон способен подавлять развитие некоторых опухолей за счет торможения их пролиферативной активности, стимуляции апоптоза и ингибирования ключевых транскрипционных факторов, что проявляется значимым лечебным эффектом в эксперименте [4, 6, 7]. Применение ХГч для лечения опухолей более эффективно в комбинации с уже известными и апробированными способами лечения, такими как лучевая и химиотерапия. Однако такие разработки малочисленны и представлены в основном исследованиями, выполненными на чувствительных к ХГч клетках, таких как клетки рака молочной железы MCF-7 [6, 7]. Эти клетки имеют на своей мембране

рецептор к ХГч, через который и осуществляется биологическое действие гормона. Имеются данные, что ХГч способен действовать и на другие опухолевые клетки, не имеющие достоверного подтверждения наличия рецепторов к нему [1]. Следовательно, исследование совместного влияния ХГч и химиотерапевтических препаратов (цитостатиков) на развитие опухоли, выяснение молекулярных механизмов, лежащих в основе оказываемых эффектов такой терапии, является актуальным.

Материалы и методы исследования

Работа выполнена на культуре клеток эмбриональной рабдомиосаркомы человека (RD). Клетки выращивали в среде EMEM («Биолот», Россия) с добавлением 5% фетальной сыворотки и антибиотиков («Биолот», Россия) в пластиковых культуральных флаконах («Orange Scientific», Бельгия). Криоконсервацию и хранение линии проводили в среде жидкого азота на базе криобанка лаборатории криоконсервирования костного мозга и тканей ФГБУН КНИИГиПК

ФМБА России. Концентрация клеток для криоконсервации составляла не менее $1 \cdot 10^6$ в мл защитной среды (90% фетальной телячьей сыворотки и 10% диметилсульфоксида). Полученную клеточную суспензию разливали в криопробирки по 1 мл и подвергали замораживанию в парах жидкого азота ($-120...-145^\circ\text{C}$). В течение 4 ч клетки находились в парах жидкого азота, после чего переносились в жидкую фазу азота (-196°C). Для вывода из криоанабиоза клетки размораживали на водяной бане при температуре $37 \pm 1^\circ\text{C}$, отмывали от консерванта и рассевали по культуральным флаконам.

Влияние ХГч на линию **RD** изучали при помощи МТТ-теста, апоптозного теста и определения митотического индекса (МИ) клеток. МИ определяли при микроскопическом исследовании культур, выращенных на покровных стеклах в течение 48 часов. По окончании срока культивирования препараты фиксировали в жидкости Карнуа, окрашивали гематоксилином Вейгарта и заключали в глицерин-желатину. В полученных препаратах подсчитывали количество митозов с последующим расчетом МИ (отношение делящихся клеток к общему числу клеток, в %).

МТТ-тест ставили в формате 96-луночных планшетов [3]. Данный тест основан на способности митохондриальных дегидрогеназ конвертировать водорастворимый 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид (МТТ) в кристаллический формазан. Детекция результата осуществляется путем измерения оптической плотности лизата в лунках, а результаты прямо коррелируют с числом живых метаболически активных клеток. Лизис клеток осуществляли диметилсульфоксидом, оптическую плотность лизатов измеряли при помощи планшетного фотометра «Organon Technica Reader» при длине волны $\lambda = 492$ нм. ХГч тестировали в дозах 1, 2 и 4 МЕ/мл. В качестве контрольного цитостатического агента использовали эмбихин в концентрациях 2 и 4 мкг/мл. Серии эксперимента распределились следующим образом:

- 1) контроль, интактные клетки;
- 2) ХГч 1 МЕ/мл;

- 3) ХГч 2 МЕ/мл;
- 4) ХГч 4 МЕ/мл;
- 5) эмбихин 2 мкг/мл;
- 6) эмбихин 2 мкг/мл + ХГч 1 МЕ/мл;
- 7) эмбихин 2 мкг/мл + ХГч 2 МЕ/мл;
- 8) эмбихин 2 мкг/мл + ХГч 4 МЕ/мл;
- 9) эмбихин 4 мкг/мл;
- 10) эмбихин 4 мкг/мл + ХГч 1 МЕ/мл;
- 11) эмбихин 4 мкг/мл + ХГч 2 МЕ/мл;
- 12) эмбихин 4 мкг/мл + ХГч 4 МЕ/мл.

В такой схеме эксперимента эмбихин в дозе 4 мкг/мл создавал летальные повреждения клеток, а в дозе 2 мкг/мл – субтоксический эффект. Апоптоз оценивали в тесте с акридиновым оранжевым и бромистым этидием при помощи люминесцентной микроскопии [5]. Серии эксперимента в апоптозном тесте формировали так же, как и в МТТ-тесте. Статистическую обработку данных проводили с помощью программ MS Office Excel 2007 и Statistica 6.0. Достоверность различий оценивали по критерию Манна-Уитни.

Результаты исследования и их обсуждение

Поскольку клетки **RD** имеют эмбриональное происхождение, они могут иметь рецепторы к ХГч, но этот факт еще не доказан. Данная линия имеет высокие темпы пролиферации, клетки фибробластоподобные, контактное торможение отсутствует. Митотическая активность контрольной серии клеток высокая и составляет $37,22 \pm 1,42\%$, что согласуется с данными литературы [2]. В препаратах с внесением ХГч МИ клеточной культуры достоверно снижался (рис. 1). Так, ХГч в дозе 1, 2 и 4 МЕ/мл снизил МИ по сравнению с контрольной серией до $32,43 \pm 1,39\%$ ($p = 0,026$); $31,12 \pm 1,16\%$ ($p = 0,006$) и $30,18 \pm 1,02\%$ ($p = 0,001$) соответственно.

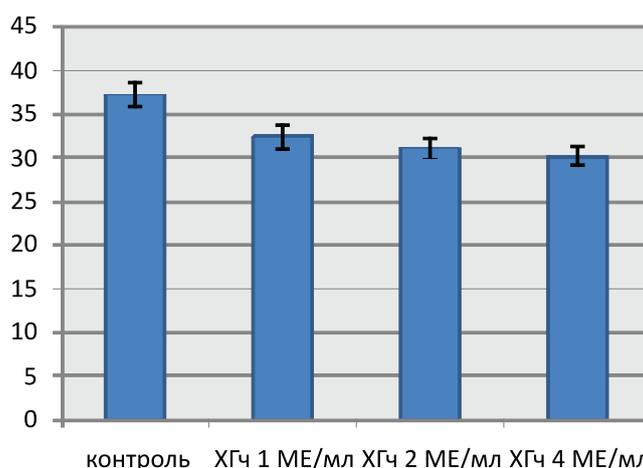


Рис. 1. Митотический индекс культуры при воздействии ХГч

Анализируя данные МТТ-теста для клеток **RD**, можно сделать вывод о том, что ХГч обладает угнетающим ($p < 0,06$ для

групп ХГч 2 и 4 МЕ/мл) действием на жизнеспособность клеток во всех испытанных концентрациях (рис. 2).

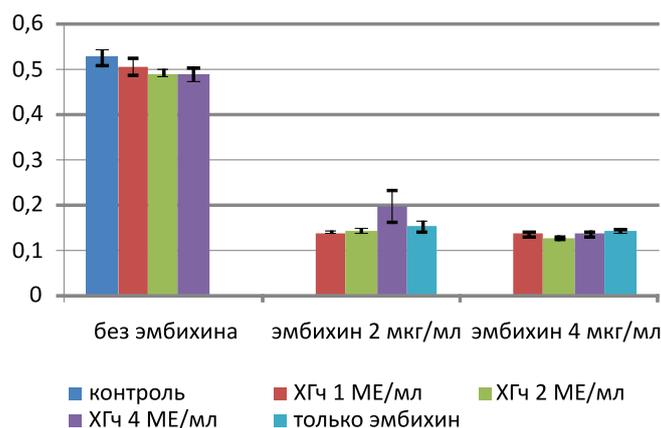


Рис. 2. Оптическая плотность лизата в лунках (МТТ-тест)

При повышении содержания ХГч оптическая плотность лизата в лунках достоверно снижается, при этом коэффициент корреляции между дозой гормона и оптической плотностью лизата составляет $r = -0,89$. При одновременном использовании с эмбихином гормон проявляет иное свойство. При комбинировании ХГч в дозе 4 МЕ/мл и эмбихина в дозе 2 мкг/мл происходит повышение оптиче-

ской плотности лизата лунок, что говорит о повышении выживаемости клеток и снижении токсического эффекта эмбихина. При использовании эмбихина в дозе 4 мкг/мл ХГч не проявляет статистически значимого цитотоксического эффекта ($p > 0,06$).

По результатам апоптозного теста ХГч подавляет рост рабдомиосаркомы **RD** за счет стимуляции апоптоза (таблица).

Процентное содержание живых, апоптозных и некротических клеток RD в пробах

Серия эксперимента	Живые клетки, %	Апоптозные клетки, %	Некротические клетки, %	Сумма нежизнеспособных клеток, %
Контроль	90,54 ± 2,05	4,16 ± 1,68	5,3 ± 1,42	9,46 ± 2,05
ХГч 1 МЕ/мл	91,44 ± 1,30	6,37 ± 1,39	2,19 ± 0,79	8,56 ± 1,30
ХГч 2 МЕ/мл	89,89 ± 2,05	7,19 ± 1,58	2,92 ± 1,19	10,11 ± 2,05
ХГч 4 МЕ/мл	92,61 ± 1,74	4,13 ± 1,07	3,26 ± 1,06	7,39 ± 1,74
ЭМ2	11,66 ± 3,25	85,3 ± 3,47	3,04 ± 1,53	88,34 ± 3,25
ЭМ2 + ХГч1 МЕ/мл	3,74 ± 1,13	96,11 ± 1,10	0,15 ± 0,15	96,26 ± 1,13
ЭМ2 + ХГч2 МЕ/мл	5,00 ± 2,01	95,00 ± 2,01	отсутствуют	95,00 ± 2,01
ЭМ2 + ХГч4 МЕ/мл	4,69 ± 0,73	95,31 ± 0,73	отсутствуют	95,31 ± 0,73
ЭМ4	1,94 ± 0,98	98,06 ± 0,98	отсутствуют	98,06 ± 0,98
ЭМ4 + ХГч1 МЕ/мл	3,60 ± 1,4	96,40 ± 1,40	отсутствуют	96,40 ± 1,40
ЭМ4 + ХГч2 МЕ/мл	6,54 ± 1,13	93,46 ± 1,13	отсутствуют	93,46 ± 1,13
ЭМ4 + ХГч4 МЕ/мл	4,49 ± 0,97	95,10 ± 0,97	отсутствуют	9,51 ± 0,97

Наибольшей проапоптотической активностью обладает ХГч в дозе 2 МЕ/мл ($7,19 \pm 1,58\%$ апоптозных клеток против $4,16 \pm 1,68\%$ в контроле и $6,37 \pm 1,39\%$ при использовании 1 МЕ/мл ХГч). При комбинировании с 2 мкг/мл эмбихина ХГч достоверно повышает содержание апоптозных клеток во всех пробах, при комбинировании с 4 мкг/мл эмбихина не оказывает статистически значимого цитотоксического эффекта ($p > 0,06$).

Таким образом, ХГч обладает угнетающим действием в отношении клеток саркомы **RD** за счет индукции апоптоза. Тем не менее увеличение содержания гормона до 4 МЕ/мл в среде культивирования не увеличивает, а снижает долю апоптозных клеток в пробе. Объяснение данному явлению можно дать с позиции оценки метаболизма кле-

точной культуры. Замедляя процессы метаболизма клеток, гормон препятствует их вступлению в апоптоз, поскольку апоптоз является энергозависимым процессом. По-видимому, действие ХГч на линию **RD** обусловлено различными мессенджерами G-белков, ответственными за различные процессы – клеточную гибель и коррекцию метаболизма. При этом в низких дозах (1 и 2 МЕ/мл) гормон стимулируют апоптоз, а в высоких (4 МЕ/мл) проявляет себя как ингибитор метаболизма клеток **RD**, за счет чего количество апоптозных клеток в пробе снижается.

Логично было бы предположить, что ХГч будет усиливать токсическое действие эмбихина, но результаты МТТ-теста свидетельствуют о повышении выживаемости

клеток в группе «эмбихин 2 мкг/мл + ХГч 4 МЕ/мл». Оптическая плотность клеточного лизата при использовании ХГч в дозах 1 МЕ/мл ($0,140 \pm 0,003$ у.е.) и 2 МЕ/мл ($0,143 \pm 0,005$ у.е.) снижается по отношению к контрольной группе ($0,152 \pm 0,012$ у.е.), а при использовании 4 МЕ/мл ХГч повышается до $0,197 \pm 0,036$ у.е. ($p > 0,06$).

Как известно, цитостатики алкилирующего ряда, к которым относится эмбихин, оказывают воздействие на генетический аппарат клетки. Их цитостатическое и противоопухолевое действие осуществляется за счет метилирования цепей ДНК, в результате чего клетка получает летальные повреждения и вступает в апоптоз. Наибольший эффект такие цитостатики имеют в отношении быстро пролиферирующих низкодифференцированных клеток, так как в процессе митотического деления геномная ДНК становится наиболее уязвимой для модификации – в состоянии дифференцировки клетки ДНК защищена комплексом гистоновых и негистоновых белков, суперспирализована, а репликация мРНК осуществляется только с небольшого количества функционально активных генов. Поэтому торможение метаболической активности клетки или «уход» пролиферирующих клеток в G_0 -фазу и дифференцировку будет сопровождаться снижением чувствительности клетки к действию цитостатиков, в том числе и алкилирующего ряда.

При повышении дозы эмбихина до 4 мкг/мл ни одна из использованных в работе доз гормона не оказывает статистически значимого эффекта. Вероятно, это связано с тем, что повышение содержания цитостатика в среде культивирования до 4 мкг/мл делает повреждения клеток более выраженными, чем при использовании 2 мкг/мл, что обуславливает невозможность проявления эффектов гормонального воздействия. Клетки RD просто не имеют метаболического потенциала для ответа на гормональное воздействие, и выраженность метаболических изменений клеток будет сравнительно низка для того, чтобы измеримым методом оценить различия в экспериментальных сериях.

Выводы

Влияние ХГч на культуру рабдомиосаркомы RD проявляется за счет реализации двух разнонаправленных одновременно существующих механизмов: индукции апоптоза и торможения метаболизма. Наибольший проапоптотический эффект проявляется при содержании 2 МЕ/мл ХГч в культуральной среде. Повышение содержания ХГч в среде до 4 МЕ/мл не ведет к повышению цитотоксического эффекта гормона. При этом комбинирование гормональной (ХГч) и цитостатической (эмбихин) терапии в отношении

клеток RD не всегда рационально, хотя по отдельности данные вещества значимо подавляют митотическую активность и метаболизм клеточной линии.

Список литературы

1. Косых А.А., Горшков А.С., Полушин А.В. Совместное действие хорионического гонадотропина и эмбихина на клеточную культуру карциномы гортани Hep-2 // *Фундаментальные исследования*. – 2011. – № 10 (часть 1). – С. 91–94.
2. Влияние солкосерила на популяционные и клеточные параметры культур Hela и RD / Ю.А. Магакян, З.А. Каралян, Е.М. Каралова, Л.О. Аброян, Л.А. Акопян, М.Г. Гаспарян, Н.Г. Джагацпанян, З.Б. Семерджян, З.Р. Тер-Погосян // *Цитология*. – 2010. – Т. 52, № 2. – С. 126–130.
3. Методические указания по изучению противоопухолевой активности фармакологических веществ / Е.М. Трещалина, О.С. Жукова, Г.К. Герасимова, Н.В. Андронова, А.М. Гарин // *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ*: под общ. ред. чл.-корр. РАМН, проф. Р.У. Хабриева. – 2-изд., перераб. и доп. – М.: Медицина, 2005. – С. 637–651.
4. Солопаева И.М. Хорионический гонадотропин в онтогенезе и онкогенезе (по материалам двух научных открытий и одной гипотезы). – Н.Новгород: Растр-НН, 2007. – 282 с. ил. 42.
5. Apoptosis methods and protocols // *Methods in molecular biology*. [edited by Hugh J. M. Brady] ISSN 1064-3745. – 2004. – P. 282.
6. 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.
7. Rao Ch.V., Li X., Manna S.K., lei Z.M., Aggarwal B.B./Human Chorionic Gonadotropin decreases proliferation and invention of breast cancer MCF-7 cells by inhibiting NF- κ B and AP-1 activation// *J. Biol. Chem.* – 2004. – Vol. 279, № 24. – P. 25503–25510.

References

1. Kosyh A.A., Gorshkov A.S., Polushin A.V. *Sovmestnoe dejstvie horionicheskogo gonadotropina i jembihina na kletochnuju kul'turu karcinomy gortani Hep-2* – Fundamental'nye issledovanija, 2011, no. 10, pp. 91–94.
2. Magakjan Ju.A., Karaljan Z.A., Karalova E.M., Abrojan L.O., Akopjan L.A., Gasparjan M.G., Dzhagacpanjan N.G., Semerdzhjan Z.B., Ter-Pogosjan Z.R. *Vlijanie solkoserila na populjacionnye i kletochnye parametry kul'tur Hela i RD* – *Citologija*, 2010 Vol. 52, no. 2, pp. 126–130.
3. *Metodicheskie ukazanija po izucheniju protivopuholevoj aktivnosti farmakologicheskikh vewestv* E.M. Trewalina, O.S. Zhukova, G.K. Gerasimova, N.V. Andronova, A.M. Garin. – *Rukovodstvo po jeksperimental'nomu (doklinicheskomu) izucheniju novyh farmakologicheskikh vewestv* [Pod obwej redakciej chl.-korr. RAMN, prof. R.U. Habrieva]. – 2-nd. edition. – Moscow, 2005. pp. 637–651.
4. *Horionicheskij gonadotropin v ontogeneze i onkogeneze (po materialam dvuh nauchnyh otkrytij i odnoj gipotezy)* [Human chorionic gonadotropin in ontogenesis and oncogenesis. Materials of two science opening and one hypothesis]. Solopaeva I.M. N. Novgorod, 2007. pp. 282.
5. *Apoptosis methods and protocols. Methods in molecular biology*. [edited by Hugh J. M. Brady] ISSN 1064-3745; 2004. pp. 282.
6. Pond-Tor S., Rhodes R.G., Dahlberg P.E., Leith J.T., McMichael J., Dahlberg A.E. *Enhancement of radiosensitivity of the MCF-7 breast cancer cell line with human chorionic gonadotropin* – *Breast Cancer Res. – Treat.* 2002 Mar. no. 72(1). pp. 45–51.
7. Rao Ch.V., Li X., Manna S.K., lei Z.M., Aggarwal B.B. *Human Chorionic Gonadotropin decreases proliferation and invention of breast cancer MCF-7 cells by inhibiting NF- κ B and AP-1 activation*. – *J. Biol. Chem.* Vol.279, no. 24, pp. 25503–25510 (2004).

Рецензенты:

Волова Л.Т., д.м.н., профессор, директор Института экспериментальной медицины и биотехнологий ГБОУ ВПО СамГМУ Минздравсоцразвития России, г. Самара;

Маракулин И.В., д.м.н., старший научный сотрудник, ведущий научный сотрудник НИЦ ФБУ 33 ЦНИИИ Минобороны России, г. Киров.

Работа поступила в редакцию 30.11.2012.