

## **Регуляция пролиферации клеток с помощью хорионического гонадотропина человека.**

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

ГОУ ВПО Кировская государственная медицинская академия Росздрава

Проблема клеточной пролиферации еще далека от разрешения, хотя в последние годы появилось достаточно много работ, показывающих роль факторов роста (PDGF, EGF, FGF, TGF-бета, интерлейкины и др.), эндогенных ингибиторов клеточной пролиферации. Проблеме регуляции восстановительных процессов посвящена монография Л.К. Романовой (1984), в которой основное внимание уделено регуляции процессов пролиферации клеток. Предполагается наличие специфических тканевых стимуляторов и ингибиторов клеточного роста. В качестве ингибиторов митотического цикла могут быть кейлоны, выделенные из многих органов, в том числе печени, лимфоцитов, тромбоцитов, макрофагов, фибробластов и др. Тем не менее, механизмы клеточной пролиферации изучены недостаточно.

В качестве стимулятора клеточного размножения используется хорионический гонадотропин человека (ХГч), синтезируемый клетками синцитотрофобласта зародыша (Midgley A.R., Pierce G, 1962) и функционирующий на протяжении всего периода онтогенеза млекопитающих. Участок  $\beta$ -субъединицы гормона, так же как и сам гормон, подавляет стимулированную митогеном пролиферацию лимфоцитов человека *in vitro*, специфически взаимодействует с рецепторами на мембране моноцитов периферической крови человека (Валуйских А.Н., Ромашкова Ю.А., Данилкович А.В. и др., 1997) и ингибирует рост промиелоидной клеточной линии HL-60 (Валуйских А.Н., Ромашкова Ю.А., Данилкович А.В. и др., 1997). В последнее время ряд авторов, исследуя свойства ХГч, отметил его способность оказывать влияние на опухолевые клетки (Солопаева И.М., 2005, Валуйских А.Н., Ромашкова Ю.А., 2005). Есть данные о том, что ХГч способствует повышению экспрессии гена p53, c-myc и bcl-x<sub>s</sub>, активируя, таким образом, программу клеточной гибели, благодаря индукции которой тормозится канцерогенез молочных желез у крыс (Srivastava P., Russo J., Russo I.H., 1997). В связи с этим И.М. Солопаева (2007) предполагает, что гены белка p53 являются ХГч-зависимыми, и снижение в опухолях этого белка может быть связано в какой-то мере с образованием в них мутантной формы сигнального белка ХГч, ответственного за дифференцировку. Ранее И.М. Солопаевой (2000) проведены исследования по влиянию ХГч на процессы регенерации печени, показавшие высокую эффективность регенерационной терапии с помощью этого гормона. Автор делает заключение о том, что ХГч инициирует и осуществляет регуляцию процессов размножения, роста и развития клетки и процессов нормализации многих патологически измененных жизненно важных реакций организма. Эта способность гормона проявляется как в

эмбриональном периоде, так и при репаративной регенерации органов у взрослых. Кроме того, автор высказывает гипотезу об «одной из возможных» причин малигнизации клеток и злокачественного роста. Предполагается, «что в истоке малигнизации клеток и формирования злокачественной опухоли может быть нарушение функции гена, ответственного за синтез ХГч, в результате которого продуцируется гормон со структурной аномалией».

Целью настоящей работы было сравнительное изучение процессов пролиферации гепатоцитов в регенерирующей печени крыс и в культуре раковых клеток Нер-2 (рак гортани) под влиянием хорионического гонадотропина человека.

Эксперименты проведены на белых беспородных крысах. Одной группе животных вводили СС1<sub>4</sub> в течение 35 суток (20 подкожных инъекций) и вызывали хронический гепатит, другая группа была интактной. Исследовали содержание общей ДНК печени и ДНК в ядрах гепатоцитов, митотический индекс гепатоцитов (МИ). Морфометрическими методами изучали число нормальных (Кнг) одноядерных (Ког) и двуядерных (Кдг) гепатоцитов.

Клеточная культура Нер-2 была выбрана на основании того, что наличие рецепторов к ХГч на мембране этих клеток не доказано. Клетки культивировали в смеси среды Игла МЕМ и 5% эмбриональной сыворотки. Клетки засеивали в концентрации 50 000 кл/флакон. Изучали влияние ХГч в концентрациях 50, 100 и 150 МЕ/мл на долю патологических митозов. Изменения оценивали по классификации Алова (1975) через 48 и 72 часа после посева. Исследовали митотический индекс и отдельно долю поликариоцитов в клеточной культуре.

Морфометрический анализ нормальной печени показал, что Кнг на тест-площади препарата в среднем равно  $8,54 \pm 0,2$  клетки, причем, более 82% - это одноядерные гепатоциты. Митозы гепатоцитов в нормальной печени встречаются, хотя и редко (среднесуточный МИ равен 0,04‰), максимум МИ отмечен в 8 часов ( $0,19 \pm 0,01$ ‰), в другие часы суток митозы были единичны. Период суточных колебаний - 24 часа. Повышению МИ предшествовало увеличение в печени содержания ДНК, рассчитанное на ядро гепатоцита.

Регуляция процессов пролиферации гепатоцитов с помощью ХГч изучалась в условиях репаративной регенерации печени после воспроизведения экспериментального хронического гепатита. Животные получали гормон в дозе 150 ЕД на крысу 1 раз в день в течение 3 дней. Уже через 3 часа после введения ХГч наблюдалось уменьшение общей ДНК печени, тенденция к нарастанию ДНК ядерной суспензии гепатоцитов. Через 4 часа после введения гормона увеличился МИ гепатоцитов до  $4,26 \pm 0,46$ ‰ (у контрольных не лечёных животных –  $0,6 \pm 0,15$ ‰). Количество ДНК на ядро гепатоцита было выше, чем у крыс гепатитного контроля на этот срок.

В результате прошедших митозов в печени наметилась отчетливая тенденция к увеличению Кнг. Через 4 часа их количество увеличилось до  $5,61 \pm 0,7$  клеток на тест-площадь препарата, а через 8 часов – до  $6,09 \pm 0,8$  клеток ( $P < 0,01$ ). Через 12 часов после введения гормона отмечен значительный рост количества ДНК в ядрах гепатоцитов, а через 16 часов – новый подъем митотической активности, который продолжался до 24 часов, но был более, чем в 2 раза ниже, чем у не лечённых животных. Тем не менее, Кнг достигло  $6,78 \pm 0,33$  клеток. Среди них было много двуядерных. Заметно вырос среднесуточный уровень Кнг, хотя среднесуточное содержание ДНК на ядро гепатоцита и МИ даже снизились. Количество дегенерирующих гепатоцитов снизилось с 43,7% при хроническом гепатите до 22,5% у леченных животных.

После введения ХГч в 2 раза снизилась абсолютная амплитуда колебаний ДНК на ядро и МИ, но почти в 2 раза увеличилась абсолютная амплитуда Кнг. Относительная амплитуда всех изученных показателей уменьшилась.

Через 24 часа после одной инъекции ХГч существенных изменений в концентрации ДНК печени не произошло. Через 48 часов повысилось содержание общей ДНК печени, в основном за счет ДНК ядерной суспензии гепатоцитов ( $P < 0,05$ ). В то же время количество ДНК на ядро клетки снизилось до нормальных значений, а МИ увеличился до  $2,21 \pm 0,3\%$ . Кнг увеличилось на 71,5%, причем, число Ког составило 95,5% (у контрольных крыс – 92,2%).

Через 72 часа после трёх инъекций ХГч содержание общей и ядерной ДНК печени увеличилось ( $P < 0,05$ ) по сравнению с не лечеными животными. Значительно повысилась ДНК клеток соединительной ткани (ДНКнпк) и составила 32,7% от общей (в контроле – 18%,  $P < 0,01$ ). В этот период отмечено высокое содержание ДНК на ядро гепатоцита, МИ равен  $0,16 \pm 0,04\%$ , а Кнг немного уменьшилось, что связано, вероятно, с гипертрофией печеночных клеток. Увеличение ДНКнпк по сравнению с не лечеными животными свидетельствует о стимуляции клеток соединительной ткани.

Таким образом, под влиянием ХГч происходит увеличение общей ДНК печени и ДНК ядер гепатоцитов в течение первых трех суток. Реакция соединительнотканых клеток на введение ХГч определяется уже в первые 3 часа, когда в них снижается содержание ДНК. Наибольший ДНК-синтезирующий эффект на гепатоциты и соединительнотканые клетки ХГч оказывает через 72 часа после первой инъекции гормона, когда пролиферативная активность гепатоцитов снижена, уменьшается Кнг на тест-площади препарата, но возрастает Кдг на 14,3% по сравнению с предыдущим сроком. Это связано, по всей вероятности, с явлениями гипертрофии клеток печени, что подтверждают данные Н.Л. Ивановой (1983). На этот срок увеличивается средний объем гепатоцита до  $1,93 \pm 0,46$  усл. ед.

(в норме –  $1,13 \pm 0,09$  усл. ед.) и возрастает плоидность клеток.

Изучение влияния ХГч на пролиферацию клеточной культуры Нер-2 показало, что все исследованные дозы ХГч существенно изменяют структуру клеточного пласта, достоверно снижают митотический индекс и повышают количество поликариоцитов (в клетках наблюдалось до 5-7 ядер). Эти эффекты проявились в зависимости от дозы гормона. При введении 50, 100 и 150 МЕ/мл ХГч снижал митозы соответственно через 48 часов культивирования на 3,6%, 26,54%, 22,9%, а через 72 часа на 8,72%, 32,18% и 40,0%. Доля поликариоцитов через 48 часов увеличивалась на 20,38% , 49,56%, 73,16%, а через 72 часа культивирования на 125,37%, 142,19% и 163,69% соответственно. Корреляция между дозой гормона и величиной митотического индекса составила -0,88 (обратная, сильная), а между дозой гормона и количеством поликариоцитов +0,99 (прямая, сильная).

ХГч в исследуемых дозировках достоверно повышал частоту патологических форм митозов. Через 48 часов при использовании концентрации ХГч в 50, 100 и 150МЕ/мл доля патологических митозов относительно контроля повысилась на 15,15%, 31,7%, 57,54%, а через 72 часа на 27,21%, 88,09%, 61,48% соответственно. При этом выявлена высокая прямая корреляционная зависимость между дозой ХГч и долей патологических митозов ( $r = 0,99$ ). Закономерно изменялся и метафазно-профазный индекс - при воздействии 50МЕ/мл ХГч через 48 часов он снижался в 2,5 раза, а через 72 часа – в 1,76 раза. Это говорит о повышении доли профаз. Учитывая, что при этом происходит снижение общего митотического индекса, это может свидетельствовать о задержке митоза в профазе, что также является патологией митоза.

Таким образом, в результате исследований показано, что ХГч в дозах 50, 100 и 150 МЕ/мл достоверно снижает митотический индекс опухолевой культуры и повышает образование поликариоцитов и патологических митозов, приводя культуру к дезорганизации *in vitro*. Эти данные свидетельствуют о противоопухолевом действии ХГч относительно рака гортани, что открывает перспективу для дальнейших исследований свойств данного гормона.

При сравнении действия ХГч на клетки печени в условиях патологии с его влиянием на клетки перевиваемой опухоли четко выявляется противоположный эффект. В первом случае ХГч оказывает выраженное стимулирующее влияние на пролиферацию гепатоцитов, обеспечивая их дифференцировку. В случае влияния на опухолевую клеточную культуру *in vitro* данный гормон оказывает торможение размножения клеток, нарушая процессы их деления, тем самым, вызывая дезорганизацию клеточной культуры. Следовательно, эффект ХГч зависит от условий его использования.