

ФАРМАКОЛОГИЯ СИСТЕМЫ КРОВИ

ВЛИЯНИЕ ФАКТОРА АКТИВАЦИИ ТРОМБОЦИТОВ НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ И СЕКРЕЦИЮ IgE КЛЕТКАМИ ЛИНИИ ЧЕЛОВЕЧЕСКОЙ МИЕЛОМЫ U-266BL

М. Е. Крашенинников, Ю. Г. Пляшкевич¹

Исследовано влияние фактора активации тромбоцитов (ФАТ) на пролиферацию клеток человеческой миеломной линии U-266BL и секрецию ими IgE. Показано, что при относительно высоких (до 10^{-8} М) концентрациях ФАТ пролиферация клеток резко заторможена, а секреторная активность повышена. При низких (до 10^{-11} М) концентрациях ФАТ скорость пролиферации клеток возрастает, а их способность секретировать IgE снижается. Установлено, что зависимость удельной секреторной активности клеток (отношение секреторной активности к количеству клеток) от концентрации ФАТ в диапазоне от 10^{-11} до 10^{-8} М имеет линейный характер, что может быть использовано для количественного определения содержания ФАТ в биологических средах.

Ключевые слова: фактор активации тромбоцитов, клеточная линия U-266BL, IgE, биотест

ВВЕДЕНИЕ

Регуляция межклеточных, межорганных и межсистемных взаимодействий, формирующих гомеостаз организма, осуществляется с участием широкого спектра биологически активных веществ, заметную роль среди которых играет фактор активации тромбоцитов (ФАТ). Это соединение, действуя в пиколярных концентрациях, принимает участие не только в регуляции активности клеток моноцитарно-макрофагальной системы и системы свертывания крови, но и в управлении иммунной и эндокринной системами организма [12, 14]. Особенности спектра биологической активности ФАТ делают это соединение удобным инструментом для моделирования острофазных (местных и системных) воспалительных реакций. Указанные обстоятельства обуславливают актуальность разработки высокочувствительного метода анализа содержания ФАТ в биологических жидкостях и средах.

В настоящее время для определения содержания ФАТ используют физико-химические [15, 16], иммуно-химические [4] и биологические [1, 2, 13] методы анализа. Физико-химические и иммуно-химические методы позволяют проводить количественный анализ ФАТ в диапазоне концентраций от 10^{-4} до 10^{-10} М. Однако их широкое применение сдерживается необходимостью проведения сложной и продолжительной пробоподготовки и использования дорогостоящей стационарной аппаратуры. Из биологических тестов наибольшее признание получил метод, основанный на измерении скорости агрегации тромбоцитов из крови доноров. Однако вследствие влияния донорского фактора на результаты измерения этот метод не счита-

ется в достаточной степени точным и воспроизводимым [2].

Целью работы является изучение характера воздействия ФАТ на пролиферационную и секреторную активность клеток линии человеческой миеломы U-266BL для оценки возможности создания высокочувствительного и воспроизводимого биотеста для количественного измерения содержания ФАТ в биологических жидкостях.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Клеточная линия U-266BL получена из Европейской коллекции клеточных культур (ECACC Cat. № 85051003) [3]. Клетки выращивали на ростовой среде Игла, модифицированной Дульбекко (Gibco, Grand Island), содержащей 0,58 г/л глутамина, 50 мкг/л гентамицина и 10 % эмбриональной сыворотки коров ("Sigma", США), при 37 °С в CO₂-инкубаторе, атмосфере с 5 % CO₂ и 95 % влажности. Суспензию клеток сливали в центрифужные пробирки, центрифугировали 10 мин при 1500 об/мин в бакет-ротаторе, надосадочную жидкость сливали, а осадок клеток ресуспендировали пипетированием в свежей ростовой среде, содержащей вместо сыворотки 0,25 % бычьего сывороточного альбумина. Требуемую концентрацию ФАТ готовили следующим образом: 1 М маточный раствор ФАТ разводили раствором Хэнкса до концентрации 0,1 М и вносили в различных концентрациях в лунки с ростовой средой 96-луночного культурального планшета. Затем клеточную суспензию раскапывали по лункам 96-луночного культурального планшета — 30 000 клеток на лунку (150 000 кл/мл), в которые перед этим добавили ФАТ в нужных концентрациях. Культуральные плаги инкубировали в течение 48 ч при комнатной температуре. Затем из половины проб отби-

¹ Лаборатория биоскрининга (зав. — Ю. А. Федотов) ООО "АСИ-НЭКС Медхим", Москва, 123182, ул. Щукинская, 6.

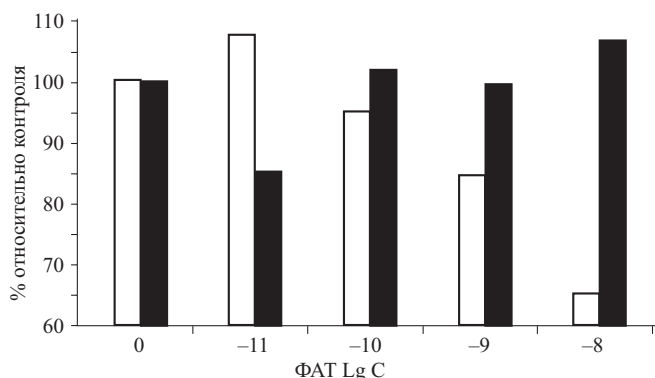


Рис. 1. Зависимость пролиферации клеток линии U-266BL, измеренная по оптической плотности гисто-энзиматических продуктов МТТ (в % относительно контроля) — светлые столбики и секреции ими IgE (в % относительно контроля) — темные от концентрации ФАТ.

рали кондиционированную среду, в которой определяли содержание секретированных иммуноглобулинов сэндвич-методом иммуноферментного анализа. К другой половине проб добавляли 50 мкл раствора 1 мг/мл 3-(4,5-диметилтиазол-2-ел)-2,5-дифенилтетразолиум бромид (МТТ) для подсчета количества клеток путем измерения дыхательной активности их митохондрий по гисто-энзиматическому методу Т. J. Mosmann [10] и А. Monks [9]. Измерение параметров проводили в 4 лунках на каждую точку.

Тест-набор для количественного измерения человеческого IgE методом иммуноферментного анализа предоставлен П. Г. Свешниковым (ВНЦМДЛ, Москва).

Статистическую обработку проводили с помощью пакета программ Microsoft Excel 97.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При изучении влияния ФАТ в диапазоне концентрации от 10^{-11} до 10^{-8} М на пролиферацию клеток линии U266BL установлено, что скорость этого процесса в целом обратно пропорциональна концентрации ФАТ в пробе, хотя зависимость и не имеет линейного характера (рис. 1). Параллельно происходит секреция клетками иммуноглобулинов класса E, которая существенно ниже контрольного уровня при 10^{-11} М ФАТ и превышает контрольные значения при 10^{-8} М ФАТ (см. рис. 1).

Расчетана удельная секреторная активность клеток (отношение значения секреторной активности, приведенного в процентном отношении к контролю, к количеству клеток, которое пропорционально оптической плотности гисто-энзиматических продуктов МТТ, также приведенному в процентном отношении к контролю). Оказалось, что зависимость удельной секреторной активности клеток от концентрации ФАТ в исследованном диапазоне носит линейный характер (рис. 2).

Из литературных данных известно, что на поверхности В-лимфобластоидных клеток, включая клетки,

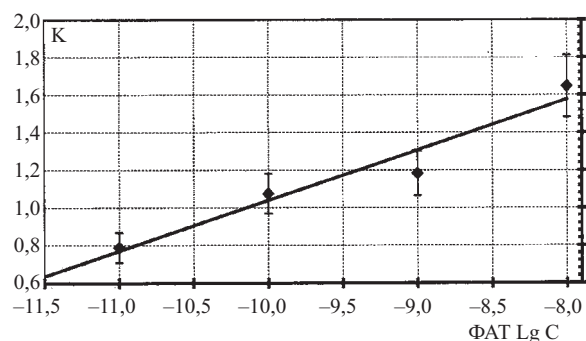


Рис. 2. Зависимость удельной секреторной активности клеток К (отношение секреторной активности к количеству клеток) от концентрации ФАТ.

трансформированные вирусом Эпштейна-Барр (EBV-трансформанты), и спонтанные лимфомы, имеются места специфического связывания ФАТ [12, 14], причем, количество рецепторов зависит от степени дифференцировки клеток [11]. Показано, что в присутствии различных концентраций ФАТ в культуральной среде способность В-лимфоцитов периферической крови к секреции иммуноглобулинов меняется [6 – 8].

Доступные человеческие В-клеточные линии в основном представляют собой EBV-трансформанты. Однако большинство этих линий либо потеряло способность к продуцированию легких цепей иммуноглобулинов, либо слабо продуцируют только одну из цепей [5]. В силу этих обстоятельств EBV-трансформанты не являются оптимальными в качестве продуцентов иммуноглобулинов, выявляемых стандартным иммуноферментным методом. Более перспективным для изучения эффектов ФАТ представляется использование стабильной EBV-несодержащей спонтанной человеческой В-лимфомы — U-266BL, продуцирующей полноценные IgE [3]. Можно ожидать, что воздействие ФАТ на клетки этой линии будет вызывать дозозависимую секрецию иммуноглобулинов, содержание которых может быть количественно измерено методом иммуноферментного анализа.

Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что ФАТ является регулятором жизнедеятельности человеческой В-лимфомы U-266BL, тормозя пролиферацию и активируя секрецию иммуноглобулинов. Базальная концентрация ФАТ обеспечивает должное для нормального состояния организма соотношение скоростей этих двух процессов. Уменьшение концентрации ФАТ ниже физиологического уровня приводит к снятию его контролирующего воздействия и сдвигу равновесия в сторону пролиферации (см. рис. 1). Напротив, резкое локальное повышение концентрации ФАТ, характерное для воспалительных процессов, приводит к выраженному сдвигу в сторону увеличения секреции иммуноглобулинов. В условиях *in vivo* это может и не сказаться на пролиферативной активности клеток. Однако в условиях эксперимента клетки инкубировались с ФАТ в “голодной среде”, при огра-

ниченности пищевых и энергетических ресурсов, что, вероятно, и обусловило реализацию жесткой обратной связи между скоростями процессов секреции и пролиферации и обеспечило линейность зависимости удельной секреторной активности клеток от концентрации ФАТ в диапазоне от 10^{-11} до 10^{-8} М.

ВЫВОДЫ

1. В зависимости от концентрации фактора активации тромбоцитов (ФАТ) способен переключать жизнедеятельность клеток линии человеческой миеломы U-266BL с состояния, при котором преобладают пролиферационные процессы (до 10^{-11} М), на состояние, характеризующееся повышенным уровнем секреции IgE (до 10^{-8} М).

2. Линейный характер зависимости удельной секреторной активности клеток от концентрации ФАТ в диапазоне от 10^{-11} до 10^{-8} М открывает принципиальную возможность разработки биотеста для количественного определения содержания ФАТ в биологических средах.

ЛИТЕРАТУРА

1. A. J. Ammit and C. O'Neill, *Human Reproduction Unit.*, **6**(6), 872 – 878 (1991).
2. A. J. Ammit and C. O'Neill, *Human Reproduction Unit.*, **26**(1), 7 – 21 (1991).

3. *European collection of animal cell cultures catalogue, 4th edition. PHLS Center for Applied Microbiology & Research Porton Down, Salisbury, SP4 OJG, UK. Scale of charges-1 / 4 / 91.*
4. K. Karasawa, N. Satoh, T. Hongo, et al., *Lipids*, **26**(12), 1126 – 1129 (1991).
5. M. Kumamoto, H. Nakamine, T. Hara, et al., *Cancer*, **74**(11), 3023 – 3028 (1994).
6. A. Kuruvilla, G. Putcha, and W. T. Shearer, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **180**(3), 1318 – 1324 (1991).
7. B. Mazer, J. Domenico, H. Sawami, and E. W. Gelfand, *J. Immunol.*, **146**(6), 1914 – 1920 (1991).
8. B. D. Mazer, H. Sawami, R. Franklin, and E. W. Gelfand, *Neth. J. Med.*, **39**(3 – 4), 244 – 253 (1991).
9. A. Monks, *Cancer Res.*, **48**, 589 – 601 (1988).
10. T. J. Mosmann, *Immunol. Meth.*, **65**, 55 – 63 (1983).
11. M. Nakamura, Z. Honda, T. Izumi, et al., *J. Biol. Chem.*, **266**(30), 20400 – 20405 (1991).
12. C. M. Nguer, O. Pellegrini, P. Galanaud, et al., *J. Immunol.*, **149**(8), 2742 – 2748 (1992).
13. M. Ou, T. Kawasaki, M. Sakon, et al., *Biochem. Int.*, **24**(5), 823 – 831 (1991).
14. J. B. Travers, J. E. Shaw, Q. Li, et al., *Life Sci.*, **49**(23), 1755 – 1760 (1991).
15. Y. Hasegawa, E. Kunow, J. Shindou, and H. Yuki., *Lipids*, **26**(12), 1117 – 1121 (1991).
16. J. A. Zirrolli, K. L. Clay, and R. C. Murphy, *Lipids*, **26**(12), 1112 – 1116 (1991).

Поступила 19.01.04

EFFECTS OF THE PLATELET ACTIVATING FACTOR ON THE PROLIFERATION AND IgE SECRETION BY U-266BL HUMAN MYELOMA CELLS

M. E. Krasheninnikov and Yu. G. Plyashkevich

Bioscreening Laboratory, ASINEX MEDCHEM Company, Shchukinskaya ul. 6, Moscow, 123182 Russia

Platelet activating factor (PAF) influences the proliferation and IgE secretion by U-266BL human myeloma (HM) cells. At a relatively high PAF concentration (up to 10^{-8} M), the rate of proliferation is significantly decreased, while the IgE secretion rate is increased. At low PAF concentrations (10^{-11} M), the HM cell proliferation rate increases, whereas their ability to IgE secretion decreases. The specific secretion activity (per cell) is a linear function in the range of PAF concentrations from 10^{-11} to 10^{-8} M. This behavior can be used for the quantitative determination of PAF in biological media.