

СРАВНЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНОЙ И НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНОЙ ФОРМ ИММУНОРЕАКТИВНОГО ПРОЛАКТИНА СЫВОРОТКИ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК NB2 ЛИМФОМЫ.

А.А.БУЛАТОВ, Т.А.ОСИПОВА, Е.Е.МАКАРОВСКАЯ

Институт экспериментальной эндокринологии Эндокринологического научного центра РАМН, Москва.
117086, ул. Дмитрия Ульянова 11

На чувствительной к лактогенным гормонам культуре клеток NB2 лимфомы крыс исследовали митогенную активность высокомолекулярного (100К) иммунореактивного пролактина, обнаруживаемого в значительном количестве в сыворотке крови некоторых женщин с гиперпролактинемией, в сравнении с активностью сывороточной низкомолекулярной (23К) формы гормона. Величина отношения содержания иммунореактивного и биологически активного пролактина в сыворотках при преобладании низкомолекулярной формы близка к 1,0, тогда как при избыточном содержании высокомолекулярной формы существенно ее превышает (1,5 — 2,3), по видимому, за счет низкой биологической активности высокомолекулярной формы. Прямое сравнение митогенных эффектов эквивалентного количества форм сывороточного иммунореактивного пролактина с высокой и низкой молекулярной массой, разделенных методом гель-фильтрации, подтвердило низкую биологическую активность высокомолекулярной формы. Моноклональные антитела против пролактина полностью подавляли митогенную активность низкомолекулярной формы и лишь частично — высокомолекулярной. Полученные данные свидетельствуют о том, что высокомолекулярная и низкомолекулярная формы иммунореактивного пролактина сыворотки крови человека различаются по биохимическим и функциональным характеристикам. Поэтому их соотношение в циркулирующей крови может существенным образом сказываться на клинических проявлениях гиперпролактинемии.

Пролактин (ПРЛ) сыворотки крови человека, традиционно определяемый радиоиммунологическим или другими иммунохимическими методами, неоднороден по молекулярной массе [1,2]. Доказано, что у большинства здоровых людей и больных с гиперпролактинемией в циркулирующей крови преобладает 23К форма иммунореактивного МРЛ (ирПРЛ), соответствующая доминирующей в гипофизе и хорошо химически охарактеризованной мономерной форме ПРЛ, молекула которого состоит из 199 аминокислотных остатков. Вместе с тем установлено, что у части лиц с повышенным уровнем ирПРЛ в крови устойчиво доминирует не низкомолекулярный (23К) ирПРЛ, а форма с высокой молекулярной массой, превышающей 100КДа (100К-ирПРЛ). Относительное содержание 100К-ирПРЛ может достигать 90% суммарного сывороточного ирПРЛ. Природа и свойства высокомолекулярной формы ирПРЛ остаются малоизученными.

Феномен “высокомолекулярного ПРЛ” или “макропролактинемии” не является редкостью и обнаруживается примерно у четверти обследованных женщин с гиперпролактинемией [3]. Показано, что умеренная, но стойкая гиперпролактинемия у женщин при значительном количественном преобладании высокомолекулярного ирПРЛ может не сопровождаться клиническими симптомами, характерными для гиперпролактинемического состояния, — галактореей, нарушением менструального цикла, бесплодием [3 — 6]. Таким образом, наличие и тяжесть проявлений гиперпролактинемии может не всегда коррелировать с уровнем ирПРЛ в крови. В свете вышеизложенного сравнительное изучение биологической активности отдельных форм ирПРЛ сыворотки крови человека представляет несомненный интерес.

Цель настоящей работы состояла в функциональной характеристике высокомолекулярного ирПРЛ, обнаруживаемого в значительном количестве в сыворотке крови некоторых женщин с гиперпролактинемией, в сравнении с сывороточной низкомолекулярной (23К) формой ирПРЛ путем изучения митогенных эффектов этих форм, разделенных методом гель-фильтрации, в культурах клеток NB2 лимфомы крыс. Эта линия клеток несет специфические лактогенные рецепторы и отвечает на ПРЛ и другие лактогенные гормоны усилением клеточной пролиферации [7,8]. Кроме того, в настоящей работе было изучено влияние на митогенную активность высокомолекулярной и низкомолекулярной форм ирПРЛ в культуре клеток NB2 лимфомы высокоспецифичных моноклональных антител против ПРЛ.

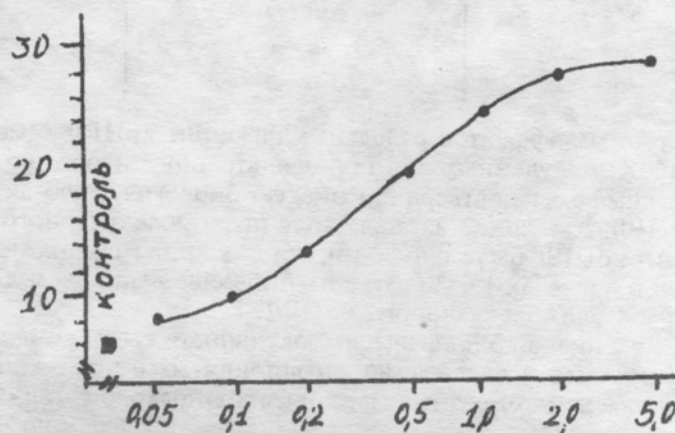
Методика. Сыворотки крови для исследования были получены из отделения нейро-эндокринологии ЭНЦ РАМН и кафедры эндокринологии Московской медицинской академии. Всего было исследовано 13 сывороток женщин репродуктивного возраста с гиперпролактинемией различной степени. У части женщин гиперпролактинемия сопровождалась типичными клиническими ее проявлениями — гипогонадизмом и галактореей различной степени. У других клинические симптомы, характерные для гиперпролактинемии, отсутствовали или были нечеткими.

Фракционирование ирПРЛ сыворотки крови по величине молекулярной массы осуществляли методом гель-фильтрации на колонке сефадекса G-100 (Pharmacia) размером 1,6 x 100 см в 0,1 М аммоний-бикарбонатном буферном растворе pH 8.4 как описано ранее [1,9]. Фракции элюата, соответствующие пикам высокомолекулярного (100K) и низкомолекулярного (23K) ирПРЛ объединяли, лиофилизировали хранили до анализа в одинаковых условиях при -30 °C.

Содержание ирПРЛ в исходных сыворотках крови и их фракциях определяли радиоиммунологическим методом с помощью реагентов, полученных в лаборатории и откалиброванных в тест-системе ВОЗ для определения ПРЛ (стандарт ПРЛ 84/500). Относительное содержание отдельных форм ирПРЛ выражали в процентах от суммарного количества гормона.

Исследование биологической активности ирПРЛ и его форм проводили в культурах клеток NB2 лимфомы крыс в условиях, близких к описанным авторами данной клеточной линии [7,8]. Суспензию клеток лимфобластической линии NB2-11C, чувствительной к лактогенным гормонам, культивировали в среде RPMI-1640 (Sigma) с 10%-ной эмбриональной телячьей сывороткой (ЭТС; Flow), 10%-ной лошадиной сывороткой (Sigma) и другими добавками согласно [7,8]. За 24 часа до опыта клетки для синхронизации пролиферации отмывали средой, лишенной ЭТС, и рассеивали в этой среде в 24-луночные планшеты по 6,0 x 10⁴. Объем клеточной суспензии в лунке составлял 1 мл. Через 24 часа в лунки вносили испытуемые образцы (каждый в трех параллельных пробах) в объеме не более 50 мкл. После 64-часовой инкубации клеток с испытуемым образцом оценивали его митогенный эффект путем подсчета числа клеток в каждой лунке при помощи камеры Горяева. Контролем служили лунки, в которые вместо испытуемых образцов добавляли такой же объем среды RPMI-1640. Количество ирПРЛ сыворотки крови или ее фракций, добавляемое в клеточную культуру, рассчитывали в нг, исходя из результатов радиоиммунологического анализа и иммунологической активности стандарта ПРЛ, равной 30 Ед/мг. В качестве стандарта использовали высокоочищенный гипофизарный ПРЛ человека, полученный в лаборатории.

Как видно на калибровочном графике (см. рисунок), митогенный эффект данного препарата ПРЛ человека в диапазоне его концентраций в среде 0,1 — 2 нг/мл проявлял четкую дозовую зависимость. Поэтому в наших опытах количество нанোগраммов ирПРЛ испытуемого образца, вносимого в культуру, находилось именно в этих пределах.



Калибровочный график зависимости скорости пролиферации клеток NB2 лимфомы крыс от содержания в среде высокоочищенного гипофизарного ПРЛ человека. По оси абсцисс — содержание ПРЛ в среде, нг/мл (логарифмическая шкала). По оси ординат — число клеток/мл среды x 10⁻⁴ после 64 часов инкубации. Каждая точка — средняя величина из трех параллельных проб.

При изучении влияния моноклональных антител к ПРЛ на митогенную активность высоко- и низкомолекулярной форм сывороточного ирПРЛ в культуре клеток NB2 лимфомы моноклональные антитела вносили в виде асцитной жидкости в конечном разведении 1:4000. Титр антител в асците составлял 1:50000. Получение и характеристика использованных моноклональных антител (F8) описаны ранее [10].

Результаты и обсуждение. Из 13 сывороток крови с повышенным содержанием ирПРЛ, исследованных в настоящей работе, 8 сывороток (№ 1-8) охарактеризовались количественным преобладанием (более 70% от уровня общего ирПРЛ) низкомолекулярной (23К) формы ирПРЛ. Пять сывороток (№ 9-13), напротив, имели в качестве главной формы высокомолекулярный ирПРЛ.

Как показали результаты изучения митогенной активности суммарного ирПРЛ (табл. 1) сывороток крови в культуре клеток NB2 лимфомы крыс, чувствительной к лактогенным гормонам, в сыворотках № 1-8 с преобладанием 23К формы количество гормона, определяемого радиоиммунологическим и биологическим методом, практически совпадало — величина отношения иммунореактивного и биологически активного ПРЛ (ирПРЛ/биоПРЛ) была близка к единице (0,8-1,1). В сыворотках же № 9-13, где методом гель-фильтрации было обнаружено преобладание высокомолекулярного ирПРЛ, биологическая активность суммарного ирПРЛ была явно пониженной — величина ирПРЛ/биоПРЛ возрастала до 1,5 — 2,3, что могло свидетельствовать о значительно меньшей биологической активности высокомолекулярной формы ирПРЛ по сравнению с низкомолекулярной.

Таблица 1

Соотношение иммунореактивного (ир) и биологически активного (био) ПРЛ в сыворотках крови больных с преобладанием низкомолекулярной (нм) или высокомолекулярной (вм) формы ирПРЛ

№ сыворотки	Общее содержание ирПРЛ, мкЕд/мл	Соотношение нм и вм форм ирПРЛ	Отношение ирПРЛ/биоПРЛ
1	2213	нм > вм	1,10
2	2983	нм > вм	0,94
3	3000	нм > вм	1,05
4	3044	нм > вм	1,14
5	6210	нм > вм	0,93
6	10065	нм > вм	1,03
7	53354	нм > вм	1,00
8	54680	нм > вм	0,83
9	1544	нм < вм	2,26
10	2110	нм < вм	1,52
11	3179	нм < вм	1,65
12	5116	нм < вм	1,69
13	104152	нм = вм	1,46

Изучение митогенных эффектов отдельных фракций ирПРЛ с молекулярной массой 23К и более 100К, полученных при гель-фильтрации сывороток № 10-12, в культурах клеток NB2 лимфомы подтвердило низкую биологическую активность высокомолекулярного ирПРЛ. Как видно из табл.2, для низкомолекулярного ирПРЛ величина отношения ирПРЛ/биоПРЛ была около 1,0, тогда как для высокомолекулярной формы она находилась в пределах 1,6-3,6, то есть была еще выше, чем для цельных сывороток с избытком высокомолекулярного ирПРЛ.

Наше заключение о низкой биологической активности высокомолекулярного ирПРЛ согласуется с результатами исследований, предпринятых в этом же направлении другими авторами с применением разных методических подходов. Так, (Farkouh и соавт.) [11] выявили существенное расхождение результатов определения ПРЛ во фракциях, полученных при гель-фильтрации сывороток крови здоровых женщин с нормопролактинемией, радиоиммунологическим и радиорецепторным методами. Высокомолекулярная фракция ирПРЛ по сравнению с низкомолекулярной проявляла меньшую способность связываться с лактогенными рецепторами печени самок крыс. (Jackson и соавт.) [5] обнаружили, что высокомолекулярный ирПРЛ, очищенный из сывороток

крови 5 женщин с идиопатической гиперпролактинемией аффинной хроматографией на колонке с иммобилизованными антителами против ПРЛ, стимулировал пролиферацию клеток NB2 лимфомы в меньшей степени, чем низкомолекулярный ирПРЛ.

Таблица 2

Сравнение биологической активности сывороточного высокомолекулярного (вм) и низкомолекулярного (нм) иммунореактивного (ир) ПРЛ в культуре клеток NB2 лимфомы

№ сыворотки	Форма ирПРЛ, внесенного в культуру	Содержание ПРЛ в среде, кг/мл		Отношение ирПРЛ/биоПРЛ
		по иммунореактивности (рПРЛ)	по биологической активности (биоПРЛ)	
10	вм	1,40	0,85	1,65
	нм	1,40	1,21	1,16
11	вм	1,30	0,50	2,60
		0,65	0,25	2,60
	нм	0,50	0,50	1,00
		0,25	0,30	0,83
12	вм	1,30	0,40	3,25
		0,65	0,18	3,61
	нм	0,50	0,45	1,11
		0,25	0,20	1,25

Таким образом, данные, полученные нами и имеющиеся в литературе, о низкой биологической активности высокомолекулярного ирПРЛ сыворотки крови подтверждают справедливость предположения (Fraser и Zhuang) [2] о том, что у женщин с умеренной гиперпролактинемией, выявляемой иммунохимическими методами, может быть "биологическая эупролактинемия", которая повреждающего воздействия на репродуктивную функцию не оказывает. Ранее нами [1,3] и другими авторами [4-6] у женщин описаны случаи умеренной гиперпролактинемии с преобладанием высокомолекулярной формы ирПРЛ, которая сочеталась с нормальным менструальным циклом, сохранением фертильности и отсутствием явных признаков галактореи. Следует отметить, что по данным клинического обследования женщины, у которых были получены сыворотки № 9-12, несмотря на стабильно повышенный уровень ирПРЛ в крови не имели заметных клинических проявлений гиперпролактинемического синдрома.

Биохимическая природа, физиологическое и патофизиологическое значение высокомолекулярного ирПРЛ сыворотки крови остаются до настоящего времени предметом дискуссии. Одно из предположений, объясняющих природу высокомолекулярного ирПРЛ, состоит в том, что основу этой фракции составляет некий специфический иммуноглобулин, способный давать иммунохимический эффект присутствия ПРЛ. Иначе говоря, здесь мы можем иметь не истинную, а лишь "кажущуюся" гиперпролактинемию. Подобный феномен, например, описан для гормона роста [12]. Показано, что в циркулирующей крови человека может присутствовать специфический иммуноглобулин, взаимодействующий с антителами против гормона роста в тест-системе его иммунохимического анализа. Установлено, что этот иммуноглобулин способен также связываться с рецепторами гормона роста адипоцитов.

Проведенное нами исследование влияния моноклональных антител на митогенную активность высоко- и низкомолекулярного ирПРЛ в культуре клеток NB2 лимфомы, с одной стороны, подтверждает их биохимическое различие, а с другой, указывает на наличие в составе высокомолекулярного ирПРЛ молекулы самого ПРЛ.

Как было показано ранее [10], используемые в настоящей работе моноклональные антитела против ПРЛ направлены к наиболее консервативному эпитопу на поверхности молекулы ПРЛ. Предварительно была подобрана такая концентрация моноклональных антител в культуральной среде, которая вызывала полное подавление стиму-

лирующего воздействия максимально эффективной дозы (2 нг) высокоочищенного препарата ПРЛ человека на пролиферацию клеток NB2 лимфомы.

Как видно из табл.3, 2 нг ирПРЛ сыворотки крови No 2, где доминировала низкомолекулярная форма ирПРЛ, вызывали такую же сильную пролиферативную реакцию клеток, как и эквивалентное количество типифизарного препарата гормона. Внесение в культуральную среду моноклональных антител против ПРЛ целиком блокировало реакцию культуры клеток как на стандартный препарат ПРЛ, так и на ирПРЛ сыворотки крови.

В специальных экспериментах (табл.3) мы сравнивали влияние моноклональных антител на митогенные эффекты в культуре клеток NB2 лимфомы высокомолекулярной и низкомолекулярной фракций ирПРЛ двух сывороток крови, одна из которых (No 5) имела в качестве главной низкомолекулярную форму, а другая (No 10) высокомолекулярную.

Таблица 3

Влияние моноклональных антител (МКА) против ПРЛ на пролиферативный эффект иммунореактивного ПРЛ (ирПРЛ) сыворотки крови и его высокомолекулярной (вм) и низкомолекулярной (нм) форм.

№ опыта	Исследуемый образец	Количество ирПРЛ, вносимого в среду, нг/мл	Число клеток/мл среды $\times 10^4$ после 64 ч. инкубации
1	Контроль		6,6
	Стандарт ПРЛ	2,0	24,1
	Стандарт ПРЛ+МКА	2,0	6,3
	Сыворотка №2	2,0	24,0
	Сыворотка №2+МКА	2,0	6,8
2	Контроль		6,2
	Стандарт ПРЛ	1,0	24,0
	Стандарт ПРЛ+МКА	1,0	6,4
	Сыворотка №5:		
	вмПРЛ	1,0	19,0
	вмПРЛ+МКА	1,0	14,0
	нмПРЛ	1,0	23,8
	нмПРЛ+МКА	1,0	6,4
3	Контроль		6,0
	Стандарт ПРЛ	1,4	26,0
	Стандарт ПРЛ+МКА	1,4	6,4
	Сыворотка №10:		
	вмПРЛ	1,4	22,0
	вмПРЛ+МКА	1,4	19,8
	нмПРЛ	1,4	25,4
	нмПРЛ+МКА	1,4	6,2

Митогенный эффект высокомолекулярной фракции ирПРЛ каждой из сывороток был заметно ниже, чем эффект эквивалентного количества низкомолекулярной фракции той же сыворотки. Установлено, что моноклональные антитела подавляли эффект низкомолекулярных фракций обеих сывороток полностью, а эффект высокомолекулярных фракций лишь частично. В последнем случае пролиферативный ответ культуры клеток сохранялся несмотря на присутствие моноклональных антител примерно на 1/3-1/2. Исходя из этих результатов, кажется вполне вероятным, что высокомолекулярная форма ирПРЛ представляет собой комплекс молекулы ПРЛ с неким связывающим белком сыворотки, возможно, иммуноглобулиновой природы, способный к частичной диссоциации. Заметим, что подобное связывание ПРЛ с иммуноглобулином обнаружено в амниотической жидкости женщин [13]. Это предположение косвенно поддерживают и полученные нами ранее результаты [3] о различиях в дофаминергической регуляции уровня высоко- и низкомолекулярной форм ирПРЛ в сыворотке

крови женщин с преобладанием высокомолекулярного гормона. Было показано, что высокомолекулярная форма ирПРЛ у таких пациентов несравненно слабее реагирует на воздействие рецепторного антагониста дофамина метоклопрамида, чем мономерная. При этом анализ динамики отдельных молекулярных форм ирПРЛ в сыворотке крови показал, что содержание мономерной формы достигает своего максимума существенно раньше, чем высокомолекулярной. Такое отставание в повышении уровня высокомолекулярной формы ирПРЛ можно объяснить тем, что ее количество может возрастать в результате дополнительного связывания мономера ПРЛ, освободившегося из гипофиза в ответ на стимулятор, с каким-то белком сыворотки, что требует некоторого дополнительного времени.

В целом данные, изложенные в настоящей работе свидетельствуют, что низкомолекулярная (23K) и высокомолекулярная (100K) формы ирПРЛ сыворотки крови человека различаются как по биохимическим, так и функциональным характеристикам. Поэтому их соотношение в циркулирующей крови может существенным образом сказываться на клинических проявлениях гиперпролактинемии. Это убеждает в необходимости применения в алгоритме диагностического поиска при гиперпролактинемии анализа не только общего уровня ирПРЛ в сыворотке крови, но и относительного содержания его низко- и высокомолекулярной форм.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, проект 94 — 04 — 13147.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Булатов А.А., Макаровская Е.Е., Дзеранова Л.К. и др. // Пробл. эндокринологии. — 1992. — № 6 — С. 13-16.
- 2 Fraser I.S., Zhuang G.L. // Obstetrical and Gynecological Survey. — 1990. — Vol. 45. — P. 515-520.
- 3 Макаровская Е.Е., Иловайская Н.А., Мартынов А.В. и др. // Пробл. эндокринологии. — 1995. — № 1. — С. 19-22.
- 4 Fraser I.S., Zhuang G.L., Jian P.Z. et al. // J. Clin. Endocrinol. Metab. — 1989. — Vol. 69. — P. 585-592.
- 5 Jakson R.D., Wortsman J., Malarkey W.B. // J. Clin. Endocrinol. Metab. — 1985. — Vol. 68. — P. 258-264.
- 6 Jakson R.D., Wortsman J., Malarkey W.B. // J. Clin. Endocrinol. Metab. — 1985. — Vol. 68. — P. 1046-1050.
- 7 Gout P.W., Noble R.L., Beer C.T. // Biochem. Cell. Biol. — 1986. — Vol. 64 — P. 659-666.
- 8 Tanaka T., Shui R.P.C., Gout P.W. et al. // J. Clin. Endocrinol. Metab. — 1980. — Vol. 51. — P. 1058-1063.
- 9 Булатов А.А., Макаровская Е.Е., Марева Е.Н., Мельниченко Г.А. // Пробл. эндокринологии. — 1995. — № 6. — С. 19-23.
- 10 Осинова Т.А., Пискунова Т.В., Булатов А.А. и др. // Биотехнология. — 1994. — № 6. — С. 31-36.
- 11 Farkouh N.H., Packer M.G., Frantz A.G. // J. Clin. Endocrinol. Metab. — 1979. — Vol. 48. — P. 1026-1032.
- 12 Campino C., Szczotka J., Michelsen H. et al. // J. Clin. Endocrinol. Metab. — 1990. — Vol. 70. — P. 601-605.
- 13 Heffner L.J., Gramates S., Yuan R.W. // Biochem. Biophys. Res. Commun. — 1989. — Vol. 155. — P. 299-305.

COMPARISON OF BIOLOGICAL ACTIVITY HIGH AND LOW-MOLECULAR FORMS OF IMMUNOREACTIVE PROLACTIN OF HUMAN BLOOD SERUM IN NB2 LYMPHOMA CELL CULTURE

A.A. Bulatov, T.A. Osipova, E.E. Makarovskaya

National Endocrine Research Center RAMS, Moscow

In experiments with NB2 rat lymphoma cells culture sensitive to lactogenic hormones the mitogenic activity of high molecular weight (>100K) immunoreactive prolactin, found in substantial quantities in serum of certain hyperprolactinemic women, as compared to the activity of serum low molecular weight (23K) form, was studied. It was established that the ratio of immunoreactive to biologically active prolactin content in serums in cases of low molecular weight form predominance is close to 1,0 whereas in case of predominant content of high molecular weight form it is substantially higher (1.5 — 2.3), apparently because of low biological activity of high molecular weight form. Direct comparison of mitogenic effects of equivalent quantities of serum immunoreactive prolactin forms with high and low molecular weight, separated by gel-filtration, confirmed low biological activity of high molecular weight form. Monoclonal antibodies to prolactin completely suppressed mitogenic activity of low molecular weight form and only partially — high molecular weight one. The data obtained indicate that high and low molecular weight forms of human serum immunoreactive prolactin differ in their biochemical and functional characteristics. Therefore their ratio in the circulating blood can substantially affect the clinical manifestations of hyperprolactinemia.