

ПРОДУКЦИЯ ИНТЕРЛЕЙКИНА-6 ПОКОЯЩИМИСЯ ГИБРИДОМНЫМИ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ ЛИНИИ EA.HY926

У.Р. Сагинбаев

аспирант, отдел биохимии,
ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины» (Санкт-Петербург, Россия)
<https://orcid.org/0000-0001-9709-1882>
E-mail: starosta-mpf@mail.ru

Актуальность. Для изучения механизмов атерогенеза широко применяются экспериментальные модели культуры клеток (из пупочной вены (*HUVEC*) и клеток линии *EA.Hy926*, представляющие собой гибридому эндотелиоцитов из пупочной вены и карциномы легкого). Степень воздействия как отдельных, так и группы цитокинов на физиологию эндотелиоцитов можно определить путем добавления адекватных концентраций медиаторов в культуру клеток. Однако для получения корректных результатов необходимо определить изначальную фоновую концентрацию цитокинов, характерную для данной культуры клеток.

Цель работы – исследование концентрации интерлейкина-6 в культуре клеток линии *EA.Hy926*.

Материал и методы. Материалом служили культуры клеток линии *EA.Hy926*, представляющие собой гибридому эндотелиоцитов из пупочной вены (*HUVEC*) и карциномы легкого (A549). В качестве метода выступил иммуноферментный анализ.

Результаты. Обнаружена концентрация ИЛ-6, превышающая более чем на порядок уровень данного цитокина в крови здорового человека.

Выводы. При оценке уровня провоспалительного цитокина в модели клеток отмечены достоверные превышения, что требует учета данного фактора при проведении экспериментальных работ.

Ключевые слова: интерлейкин-6, эндотелий, *EA.Hy926*, экспериментальная модель.

Для цитирования: Сагинбаев У.Р. Продукция интерлейкина-6 покоящимися гибридомными эндотелиальными клетками линии *EA.Hy926*. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2022;25(5):12–15. <https://doi.org/10.29296/25877313-2022-05-02>

Атеросклероз является важной медико-социальной проблемой населения. Так, ряд авторов утверждает, что профилактика атеросклероза за счет коррекции факторов риска способна продлить жизнь человека на 2–3 десятилетия [1]. Согласно современным представлениям, данное заболевание является мультифакторным, важную роль в атерогенезе играют нарушения липидного обмена, морфофункциональное состояние эндотелия и воспалительные реакции [2]. Механизмы очаговой активации трансэндотелиального транспорта липопротеинов остаются малоизученными [3]. Исследователями отмечаются возрастные морфофункциональные изменения эндотелиоцитов, сопровождающиеся иммунореактивным состоянием [4]. Известно, что вырабатываемые в бляшках цитокины оказывают влияние на функцию эндотелиальных клеток.

В настоящее время в качестве экспериментальной модели *in vitro* для изучения механизмов атерогенеза широко используются культуры клеток, образующие двумерный монослой по типу «булыжной мостовой». Довольно часто в роли

клеточной модели находят применение культуры клеток эндотелиоцитов из пупочной вены (*HUVEC*) и клеток линии *EA.Hy926*, представляющие собой гибридому эндотелиоцитов из пупочной вены и карциномы легкого (A549). Культуры клеток поддерживаются в питательных средах. Возможность и степень воздействия как отдельных, так и группы цитокинов на физиологию эндотелиоцитов можно определить путем добавления адекватных концентраций медиаторов в культуру клеток.

В то же время для получения корректных результатов необходимо определить изначальную фоновую концентрацию цитокинов в самой экспериментальной модели культуры клеток. Стоит отметить, что применяемые в опытах клетки *HUVEC* и *EA.Hy926* могут иметь некоторые отличительные аспекты по сравнению с нативными эндотелиальными клетками. Известно, что сочетание некоторых цитокинов могут сопровождаться синергическим либо антагонистическим эффектом. Между тем в настоящее время количество работ, посвященных изучению данного вопроса, недостаточно.

Особый интерес представляет исследование такого провоспалительного цитокина, как интерлейкин-6 (ИЛ-6), ввиду участия данного медиатора во многих патологических процессах.

Интерлейкин-6 относится к гликопротеидам с молекулярной массой 19–24 кДа, имеет частичную гомологию с ИЛ-12. Рецепторы для ИЛ-6 были выявлены как на лимфоидных, так и нелимфоидных клетках [5]. Одной из основных функций ИЛ-6 является регуляция процессов созревания антител, продуцирующих В-лимфоцитов и самой продукции иммуноглобулинов. При воздействии на Т-лимфоциты ИЛ-6 вызывает продукцию ими ИЛ-2. Интерлейкин-6 способен активировать процессы пролиферации и дифференцировки тромбоцитов, В-лимфоцитов, гепатоцитов [6]. Так, на экспериментальных моделях животных, получавших химиотерапию, инъекция ИЛ-6 приводила к увеличению количества тромбоцитов, размеров и плоидности мегакариоцитов. В то же время важно отметить, что концентрация данного цитокина не возрастает при тромбоцитопении, но повышается при реактивных тромбоцитозах. Количество лейкоцитов при этом имеет некоторую тенденцию к росту, кроме того, развивается гипохромная анемия, сопровождающаяся снижением содержания железа в сыворотке крови. Ряд исследований продемонстрировал, что миеломные клетки продуцируют ИЛ-6 и экспрессируют рецепторы к данному цитокину. У большинства пациентов с прогрессированием миеломной болезни уровень ИЛ-6 в крови повышен [7].

Цель исследования – изучение фоновой концентрации интерлейкина-6 в экспериментальной модели клеток линии *EA.Hy926*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В качестве материалов выступили культуры клеток линии *EA.Hy926* (опытная группа), представляющие собой гибридому эндотелиоцитов из пупочной вены (*HUVEC*) и карциномы легкого (A549). Культуры клеток поддерживались в ростовой среде *Cell Applications* в течение 3–4 суток до образования двумерного монослоя по типу «бульжной мостовой». По достижении монослойности определяли концентрацию ИЛ-6 с применением твердофазного иммуноферментного анализа (набор производства АО «Вектор-Бест», Россия). В качестве группы контроля применялись культуральные среды без клеток. При статистической обработке распределение признано отличным от нормального, что стало причиной применения непараметриче-

ских методов статистики при сравнении выборок (применялся *U*-критерий Манна–Уитни).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Посев клеток осуществляли в культуральные чашки Петри (производства *SARSTEDT*). Спустя 3–4 суток (после образования двумерного монослоя по типу «бульжной мостовой») производили отбор образцов, центрифугирование и исследование выполняли в дублях. Всего проанализировано двадцать четыре пробы (по 12 из опытной и контрольной групп).

Результаты иммуноферментного исследования признаны адекватными и подлежат учету, поскольку соблюдены требования производителя к значениям оптической плотности положительного и отрицательного контрольного образца в соответствующих лунках.

Концентрации ИЛ-6 в опытной и контрольной группах представлены в таблице. Рассчитанный *U*-критерий эмпирический меньше *U*-критерия критического, что свидетельствует о наличии статистически значимых различий между выборками.

Таблица. Концентрация интерлейкина-6 (пг/мл) в опытных и контрольных образцах

| Образец | Me (Q1; Q3) |
|--------------------|------------------------|
| Опытная группа | 85,31 (82,80; 96,83) * |
| Контрольная группа | 0,52 (0,07; 0,78) |

Примечание: * – $p < 0,01$ по сравнению с группой контроля.

Согласно данным ряда исследователей средняя концентрация ИЛ-6 в циркулирующей крови составляет примерно $1,4 \pm 0,3$ пг/мл у практически здорового лица среднего возраста [8]. Следовательно, обнаруженный фоновый уровень ИЛ-6 в культуре клеток линии *EA.Hy926* оказался более чем на порядок выше по сравнению с физиологической концентрацией медиатора *in vivo*.

Обнаруженную особенность необходимо учитывать при проведении исследований в области изучения влияния медиаторов на функцию клеток, в частности, эндотелиоцитов. Пренебрежение изначально повышенным уровнем цитокина может привести к ошибочным результатам и неверной интерпретации полученных данных.

Установлено, что ИЛ-6 относится к важнейшим медиаторам острой фазы воспаления. Данный медиатор обладает следующими эффектами: сти-

муляция мобилизации энергии, синтез белков острой фазы, стимуляция пролиферации и дифференцировки В- и Т-клеток, лейкоцитопоэза. Кроме того, ИЛ-6 играет важную роль в атерогенезе, поскольку достоверно установлено, что данный цитокин участвует в синтезе молекул адгезии, проницаемости эндотелиального слоя кровеносного сосуда, миграции и рекрутировании лейкоцитов в атеросклеротическую бляшку. Наличие перечисленных и ряда других причинно-следственных связей позволило отнести атеросклероз к преимущественно воспалительным заболеваниям.

Интерлейкин-6 играет важную роль в процессе старения организма человека. Группа исследователей-геронтологов отнесла ИЛ-6 в число цитокинов, формирующих секреторный фенотип, ассоциированный со старением (*SASP*-фенотип). Данный фенотип характеризуется повышенными концентрациями ИЛ-6, трансформирующего фактора роста β , интерлейкина-1 α , интерлейкина-8, матриксных металлопротеиназ в циркулирующей крови, а также процессами вялотекущего хронического воспаления у лиц старшей возрастной группы.

Провоспалительный цитокин синтезируется множеством клеток, включая макрофаги, фибробласты, эндотелиоциты, Т-лимфоциты, глиальные клетки, эпителиоциты и кератиноциты. Выработка ИЛ-6 стимулируется другими медиаторами ответа острой фазы интерлейкином-1, фактором некроза опухоли и рядом иных цитокинов. Следовательно, добавление в модельные среды цитокинов, стимулирующих синтез ИЛ-6, способно исказить истинную картину.

ВЫВОДЫ

Таким образом, полученные результаты демонстрируют повышенную фоновую концентрацию интерлейкина-6 в культуре клеток линии *EA.Hy926*, широко применяющегося в качестве экспериментальной модели для изучения механизмов атерогенеза. Обнаруженные данные необходимо учитывать при интерпретации результатов экспериментов для получения корректных выводов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Мишланов В.Ю., Туев А.В., Черешнев В.А. Атеросклероз: новое в патогенезе, диагностике и лечении (лейкоцитарно-липопротеиновая теория): монография. М.: РАН, 2018; 128.
2. Armitage J., Holmes M.V., Preiss D. Cholesteryl ester transfer protein inhibition for preventing cardiovascular events: JACC review topic of the week. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2019; 73: 477–487.
3. Huang L.H. Interleukin-17 drives interstitial entrapment of tissue lipoproteins in experimental psoriasis. *Cell Metabol.* 2019; 29: 475–487.
4. Шорстова О.В., Лейфер Е.В. Роль *vasa vasorum* в патогенезе атеросклероза. *Университетская медицина Урала.* 2020; 1: 43–44.
5. Stefan R.J. Interleukin-6 family cytokines. *Cold Spring Harb. Perspect Biol.* 2018; 10(2): 028415.
6. Ershler W.B. Interleukin-6: a cytokine for gerontologists. *J. Am. Geriatr. Soc.* 1993; 41(2): 176–81.
7. Pura M.C., Scheele C. Interleukin-6 myokine signaling in skeletal muscle: a double-edged sword? *FEBS J.* 2013; 280(17): 4131–48.
8. Гордеева Е.К., Каде А.Х. Коррекция цитокинового и гормонального дисбаланса при лечении стабильной стенокардии напряжения. *Кубанский научный медицинский вестник.* 2018; 25(3): 51–55.

Поступила 8 февраля 2022 г.

PRODUCTION OF INTERLEUKIN-6 BY RESTING HYBRIDOMA ENDOTHELIAL CELLS OF THE *EA.HY926* LINE

© U.R. Saginbaev, 2022

U.R. Saginbaev

Post-graduate Student, Department of Biochemistry,
Institute of Experimental Medicine (St. Petersburg, Russia)
<https://orcid.org/0000-0001-9709-1882>
E-mail: starosta-mpf@mail.ru

Relevance. To study the mechanisms of atherogenesis, experimental models of cell culture (from the umbilical vein (HUVEC) and *EA.Hy926* line cells, which are a hybrid of endotheliocytes from the umbilical vein and lung carcinoma), are widely used. The degree of effect of both individual and group cytokines on endotheliocyte physiology can be determined by adding adequate concentrations of mediators to the cell culture. However, to obtain correct results, it is necessary to determine the initial background cytokine concentration characteristic of this cell culture.

The purpose of this work was to study the concentration of interleukin 6 in the culture of *EA.Hy926* cells.

Material and methods. The material was cell cultures of the *EA.Hy926* line, which are a hybridoma of endotheliocytes from the umbilical vein (HUVEC) and lung carcinoma (A549).

Results. A concentration of IL-6 was found that exceeded by more than an order of magnitude the level of this cytokine in the blood of a healthy person.

Conclusion. Thus, when assessing the level of proinflammatory cytokine in the cell model, significant excesses were noted, which requires taking this factor into account during experimental work.

Key words: interleukin 6, endothelium, EA.Hy926, experimental model.

For citation: Saginbaev U.R. Production of interleukin-6 by resting hybridoma endothelial cells of the EA.HY926 line. Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry. 2022;25(5):12–15. <https://doi.org/10.29296/25877313-2022-05-02>

REFERENCES

1. Mishlanov V.Ju., Tuev A.V., Chereshnev V.A. Ateroskleroz: novoe v patogeneze, diagnostike i lechenii (lejkcitararno-lipoproteinovaja teorija): monografija. M.: RAN, 2018; 128.
2. Armitage J., Holmes M.V., Preiss D. Cholesteryl ester transfer protein inhibition for preventing cardiovascular events: JACC review topic of the week. J. Am. Coll. Cardiol. 2019; 73: 477–487.
3. Huang L.H. Interleukin-17 drives interstitial entrapment of tissue lipoproteins in experimental psoriasis. Cell Metabol. 2019; 29: 475–487.
4. Shorstova O.V., Lejfer E.V. Rol' vasa vasorum v patogeneze ateroskleroza. Universitetskaja medicina Urala. 2020; 1: 43–44.
5. Stefan R.J. Interleukin-6 family cytokines. Cold Spring Harb. Perspect Biol. 2018; 10(2): 028415.
6. Ershler W.B. Interleukin-6: a cytokine for gerontologists. J. Am. Geriatr. Soc. 1993; 41(2): 176–81.
7. Pura M.C., Scheele C. Interleukin-6 myokine signaling in skeletal muscle: a double-edged sword? FEBS J. 2013; 280(17): 4131–48.
8. Gordeeva E.K., Kade A.H. Korrekcija citokinovogo i gormonal'nogo disbalansa pri lechenii stabil'noj stenokardii naprjazhenija. Kubanskij nauchnyj medicinskij vestnik. 2018; 25(3): 51–55.



Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Всероссийский научно-исследовательский институт
лекарственных и ароматических растений»

приглашает к сотрудничеству
фармпроизводителей и сельхозпредприятия
для совместного продвижения наших научных разработок.
Мы предлагаем лекарственные фитопрепараты к производству
и агротехнологии лекарственных и ароматических культур
для выращивания в различных регионах России

Тел. контакта: 8(495)388-55-09; 8(495)388-61-09; 8(495)712-10-45

Fax: 8(495)712-09-18

e-mail: vilarnii.ru

www.vilarnii.ru