

10. Ho M.-K., Rand N., Murry L., Katz K., Rabin H. J. Immunol., 135, 6, 3831—3832, 1985.
11. Jhan S., Grunov R., Kiessing S. T., Bogacheva G. T., Arsenjeva E. L., Hlina A., Rochlin O. V., von Lohr R. Hybridoma, 6, 6, 679—687, 1987.
12. Jhan S., Grunov R., Porstmann T., Kiessing S. T., Steinbrenner H., Stelndl F., Muttian-vieh D., Purtiler L., Dreihardt E., Kattiger H., von Lohr R. J. Immunol. Meth., 106, 257—265, 1988.
13. Jhan S., Settmaier U., Haensel K., Kiessing S. T., Grunov R., von Baehr H. Hybridoma, 8, 5, 529—553, 1989.
14. Köhler G., Milstien C. Nature, 259, 495—497, 1975.
15. Köhler G., Roder J. C. Eur. J. Immunol., 11, 23—27, 1981.
16. Luzzati A. L., Giacomini C., Ramoni C., Frayton P. Biol. Inst. sieroter. Mil. 61, 1, 46—54, 1987.
17. Masuko Y., Sugano T., Matsumoto Y.-I., Sawada Sh., Katsuhiko T. Biochem. Biophys. Res. Commun. 135, 2, 495—500, 1987.
18. Michel D. H., Callard R. E. J. Immunol., 131, 3, 1229—1233, 1983.
19. Nakamura M., Burastero S. E., Nockins A. L., Cusall P. J. Immunol., 140, 4180—4186, 1988.
20. Ohlin H., Danielsson L., Carlson R., Borrebaeck C. A. K. Immunol., 66, 485—489, 1989.
21. Peltz G., Friedrich K., Anderson C. L., Peterlin B. H. Mol. Immunol., 25, № 3, 243—250, 1988.
22. Thiele D. L., Lipsky P. E. J. Immunol., 136, 3, 1038—1048, 1986.
23. Thompson K. M. Immunol. Today, 9, 4, 113—117, 1988.
24. Voland J. R., Gorman D. H., Fan Q., Dalton R. W. Cell. Immunol., 110, 197—208, 1987.
25. Yamaguchi H., Kataoka K., Fortunato S. R., Livingston F. O., Lloyd C. O., Ottigen H. F. Old L. J. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 86, 2116—2120, 1989.

Получено 25.XI 1991

Биол. журн. Армения № 2.(44).1991

УДК 577.8

О ВОЗДЕЙСТВИИ БРОМИСТОВОГО ЭТИДИЯ И АДРИАМИЦИНА НА ПРОДУКЦИЮ АНТИТЕЛ КЛЕТКАМИ МЫШИНОЙ В-КЛЕТОЧНОЙ ГИБРИДОМЫ

М. Б. МЕЛИКСЕДЖАН*, Т. К. ДАВТЯН**, Е. В. БЕРЕЗКИНА***,
Т. Н. ИГНАТОВА***, Ю. Т. АЛЕКСАНИАН**

*Институт физиологии им. Л. А. Орбели АН Армении

**Институт эпидемиологии, вирусологии и мед. паразитологии
им. А. Б. Александряна МЗ Армении

***Институт цитологии АН СССР, Ленинград

Показано, что бромистый этидий и адриамицин стимулируют продукцию иммуноглобулинов мышинной В-клеточной гибридомы соответственно в 6 и 10,5 раза, причем эффект проявляется только при постоянном культивировании с ядами.

Նախց է արված, որ Վերդիումը քրոմիզը և ադրիամիցինը խթանում են իմունոգլոբուլինների արտադրությունը մկանյին բջջային իբրիդոմայի կողմից ամապատասխանորեն 6 և 10,5 անգամ, ընդ որում էֆեկտը դրսևորվում է միայն երբ նախապես կուլտիվացված ժամանակ:

Сокращения: ФСБ—фосфатно-цитратный буфер, К—клетка—кондиционированная мышинная клетка; МЛн АТ—микроклональные антигены.

It was shown, that adriamycin ethidium bromide and enhance the immunoglobulin production by murine B-cell hybridoma correspondingly, 6 and 10-5 fold. This phenomenon can be detected only during permanent cultivation of the cells in presence of drugs.

Бромистый этидий—адриамицин—продукция антител—гибридомы

Механизмы действия на клетки различных цитостатиков весьма разнообразны и сводятся в основном к воздействию на процессы репликация и транскрипции ДНК (бромистый этидий, адриамицин), либо на процессы митоза (колхицин). Некоторые из этих соединений, в частности адриамицин, находят применение в химиотерапии рака, однако феномен множественной лекарственной устойчивости ограничивает их терапевтический эффект. На молекулярном уровне множественная лекарственная устойчивость заключается в сверхэкспрессии поверхностного гликопротеина P170, индуцируемого присутствием ядов, и в амплификации генов множественной лекарственной устойчивости [3]. Адриамицин, как и ряд других противоопухолевых препаратов, индуцирует дифференцировку опухолевых клеток, что показано на различных клеточных линиях [5, 11, 12]. Более того, дифференцирующий эффект клеточных ядов в нелетальных дозах наблюдается не только на опухолевых, но и на нормальных клетках иммунной системы [6, 7].

Можно ожидать, что дифференцировка противораковых эффекторных клеток может привести к дальнейшему усилению таких молекул, как цитокины и антитела [8]. Согласно данным некоторых авторов, противораковые препараты стимулируют синтез белка [14]. На примере чувствительной к ядам гибридомы показано стимулирующее действие адриамицина на синтез иммуноглобулинов и некоторых других белков [13].

В настоящей работе рассматривается влияние бромистого этидия и адриамицина на продукцию антител клетками гибридомы H₇, продуцирующей моноклональные антитела к трансферрину человека и устойчивой к бромистому этидию в концентрации 5 мкг/мл.

Материал и методика. В экспериментах использовали клетки гибридомы H₇, полученной на основе линии миеломы Sp2/0, устойчивой к бромистому этидию в концентрации 5 мкг/мл и продуцирующей мAb к трансферрину человека [1].

Клетки культивировали в среде MEM в модификации Дальбекко, содержащей 1% незаменимых аминокислот, 5 мкМ β-меркаптоэтанол, 1 мМ пирувата натрия, 40 ед/мл гентамицина и 10% эмбриональной телячьей сыворотки.

Культуры (3×10⁶ клеток) из логарифмической стадии роста культивировали в течение 72 ч в присутствии бромистого этидия в концентрации 5, 10, 15 мкг/мл, адриамицина и колхицина в концентрации 0,05 мкг/мл. В экспериментах с краткосрочной обработкой ядами инкубация длилась 2 ч, после чего клетки отмывали от ядов и в дальнейшем культивировали без них. Среда, кондиционированная клетками гибридомы (к-среда), отбиралась для анализа спустя 24, 48, 72 ч с момента инкубации. Содержание антител в к-среде определяли методом твердофазного иммуоферментного анализа.

На 96-луночные планшеты Maxi Sorp (Nunc, Denmark) наносили антиген-трансферрин человека (0,1 мкг на лунку в 20 мМ карбонатном буфере (pH 9,5) и инкубировали 16 ч при 4°. Планшеты отмывали 3 раза ФСБ, содержащим 0,05% Tween-20, и лунки наносили тестируемые к-среды (по 100 мкл на лунку) в последовательных десятикратных разведениях и инкубировали 1 ч при 37°. После инкубации план-

шеты отмывались ФСБ-лином, и в лунки вносились антитела к мышьякам иммуноглобулинам, конъюгированные с пероксидазой (Sigma), в разведении 1:4000 в ФСБ-твине и инкубировали 1 ч при 37°. Затем в отмытые лунки вносили 1%-ный раствор о-фенилендиамина в 20 мМ цитратном буфере (рН 4,5) с добавленным перекиси водорода до концентрации 0,01%. Оптическую плотность в лунках измеряли при длине волны 452 нм на спектрофотометре Titertek Multiscan (Flow Labs, UK). Из-за отсутствия стандартов титр антител определяли как те разведения к-сред, которые связывают 50% адсорбированного на планшетах антигена [2]. Определение титра антител проводили по предложенной нами формуле

$$T' = T - \lg K,$$

где T' —логарифм разведения в пересчете на 10^6 клеток; T —логарифм разведения к-сред, определенный графически; K —количество клеток в миллилитре/ 10^6 .

Результаты и обсуждение. В первой серии экспериментов мы исследовали влияние различных концентраций бромистого этидия, адриамицина и колхицина на кумулятивное содержание иммуноглобулинов в к-средах гибридомы 1F₇. Значения титров антител, определенные

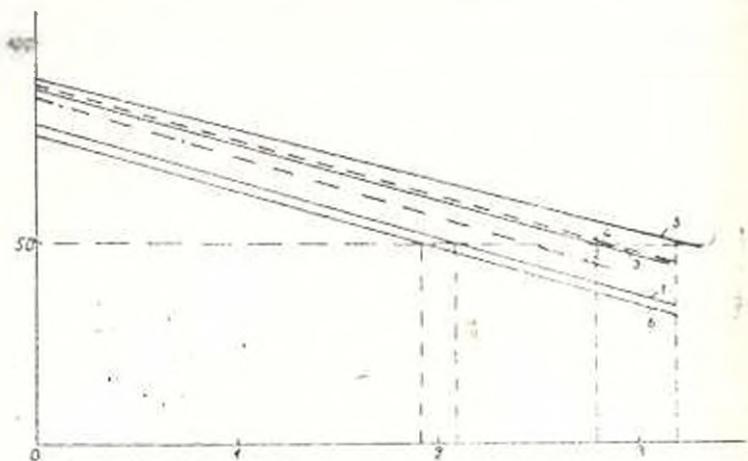


Рис. 1. Кривые титрования для мон АГ к трансферрину, продуцируемых гибридомой 1F₇. 1—контроль; 2—бромистый этидий (5 мкг/мл); 3—бромистый этидий (10 мкг/мл); 4—бромистый этидий (15 мкг/мл); 5—адриамицин (0,05 мкг/мл); 6—колхицин (0,05 мкг/мл). По оси абсцисс десятичный логарифм разведения к-среды гибридомы 1F₇, по оси ординат — значения титра антител с адсорбированным на планшетах антигеном и процентах от максимального.

графически и в пересчете на 10^6 клеток, приведены в табл. 1. Можно видеть, что колхицин практически не влияет на содержание иммуноглобулинов в к-средах гибридомы, в то время как адриамицин и бромистый этидий оказывают сильное воздействие на продукцию антител, причем эффект достигает максимума через 72 ч после обработки ядом (рис. 2). Как видно из табл. 1, бромистый этидий в концентрации 5 мкг/мл вызывает возрастание продукции антител почти вдвое, 10 и 15 мкг/мл—почти в шесть раз. В присутствии же адриамицина продукция иммуноглобулинов возрастает более чем на порядок. Более того, в экспериментах, где клетки инкубировали с ядами в течение 2 ч, а затем отмывали, эффект практически отсутствовал, что свидетельству-

ет о том, что постоянное присутствие ядов необходимо для запуска механизма стимуляции продукции антител (табл. 2)

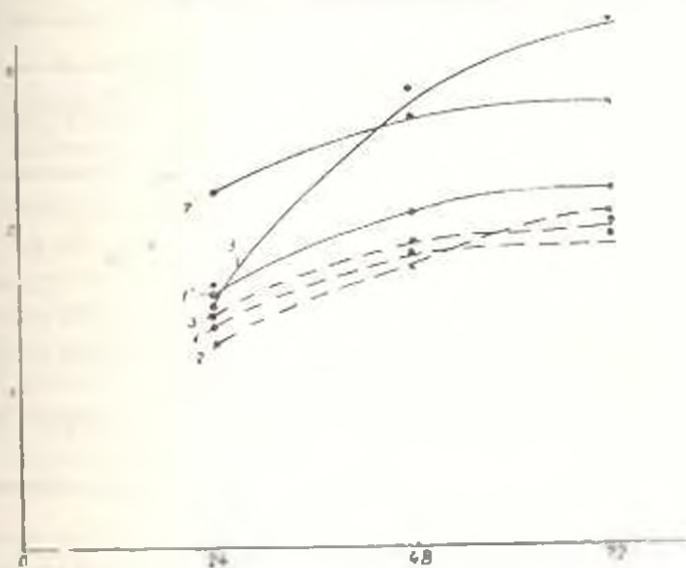


Рис. 2. Динамика содержания антител в средах гибридомы 1F7, по дням с момента инкубации. 1—контроль, 2—бромистый этидий (10 мкг/мл) 3—адриамицин (2-часовая инкубация с ядами). 1—контроль; 2—бромистый этидий (10 мкг/мл) 3—адриамицин (постоянное культивирование с ядами). По оси абсцисс—десятичный логарифм разведения среды (на 10^6 клеток); по оси ординат—часы с момента инкубации.

Ряд интересных выводов о характере влияния клеточных ядов на синтез антител для устойчивых и чувствительных клеточных линий можно сделать при сравнении наших результатов с имеющимися в литературе данными о трехкратном усилении синтеза антител клетками гибридомы UN 2 и PC 140.4, не обладающими устойчивостью к указанным ядам [8], в то время как мы наблюдали возрастание синтеза более чем на порядок.

В этом ключе представляется весьма интересным, на каком уровне осуществляется увеличение продукции иммуноглобулинов. В указанной работе наблюдали усиление именно синтеза и, соответственно, секреции иммуноглобулинов [8].

В то же время существуют указания на то, что Р-гликопротеин, экспрессирующийся в клетках, устойчивых к ядам, является одним из компонентов альтернативной системы переноса белков, в частности, витеклейкина-1 [9, 10].

В последнее время появились сообщения о том, что белки, связанные с фенотипом множественной лекарственной устойчивости, являются перепосылками белков из цитозоля в эндоплазматический ретикулум [14]. Следовательно, не исключена возможность, что в устойчивых к ядам клетках осуществляется усиление не только синтеза, но и секреция иммуноглобулинов. Это подтверждается наблюдаемым нами десятикратным возрастанием продукции антител в присутствии адриамицина у устойчивой к бромистому этидию гибридомы, в то время как на

клетках чувствительной гибридомы наблюдали лишь трехкратное увеличение продукции.

Таблица 1. Влияние бромистого этидия, адриамицина и колхицина на содержание антител в к-среде гибридомы 1F₇.

ЧЗ	Концентрация яда, мкг/мл	титр антител, определенный через 72 ч от начала инкубации	Титр антител в пересчете на 10 ⁶ клеток
Контроль		1:131±2.1	1:158 ±4.1
Колхицин	0.05	1:135±1.7	1:167 ±2.4
Бромистый этидий	5	1:269±1.8	1:346 ±3.2
Бромистый этидий	10	1:398±2.5	1:316 ±3.0
Бромистый этидий	15	1:504±4.2	1:718 ±4.3
Адриамицин	0.05	1:1258±6.7	1:1778±3.8

Таблица 2. Влияние бромистого этидия и адриамицина на содержание антител в к-средах гибридомы 1F₇ после 2-часовой обработки ядами.

Я1	Концентрация яда, мкг/мл	Титр антител (на 10 ⁶ клеток)		
		24ч	48ч	72ч
Контроль		1:19±0.5	1:52±0.8	1:121±1.9
Бромистый этидий	1)	1:25±0.4	1:59±0.6	1:118±1.8
Адриамицин	0.05	1:21±0.2	1:48±1.1	1:143±2.4

Примечание: P<0.05; каждая из указанных величин представляет собой среднюю величину трех независимых измерений в трех независимых опытах: ±—среднее квадратичное отклонение.

Таким образом, полученные нами результаты могут быть интерпретированы двояко: с одной стороны, яды стимулируют синтез иммуноглобулинов, с другой—индуцируют экспрессию Р-гликопротеина, возможно, участвующего в переносе иммуноглобулинов через мембрану.

Выяснение же механизмов обнаруженного нами феномена является целью нашей дальнейшей работы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Березкина Е. В., Ковалева З. В., Синакевич И. Г., Заводская Е. Э., Шлескин В. Л., Искатова Т. Н. Заявка на изобретение № 485 4936/13 от 26.07.90.
2. Сорокина Н. В., Гаврилова Е. Б., Дикова А. И., Егоров А. М. Иммунология, 3, 27—34, 1989.
3. Bradley G., Jiranka P. and Ling V. Biochimica et Biophysica Acta, 318, 87—121, 1983.
4. Deverson E., Gow I., Coadwell W., Monaco J., Butcher G., & Howard J. Nature 318, 738—748, 1980.
5. Ehrke M., Cohen S., & Mitich E. Immunology Rev. 65, 55—78, 1982.
6. Ehrke M., Macculin D., Ryoyama K., Cohen S., & Mitich E. Cancer Res., 46, 54—60, 1986.

7. Mace K., Mayow K., Mihich E., Ehrke M. Cancer Res. 32, 511—515, 1972
8. Mace K., Mayow K., Mihich E., Ehrke M. Cancer Res. 43, 130—136, 1983.
9. March C. Nature, 315 641—647, 1985.
10. McGrath P., Varshavsky A. Nature, 311, 49—104, 1989.
11. Schwartz E., & Sartorelli A. Cancer Res. 42, 2651—2729, 1982.
12. Schwartz E., Brown B., Sternberg F., Marsh J., & Sartorelli A. Cancer Res., 43, 2725—2729, 1983
13. Trilland J., Fourcade A., Huppert J., Fridman W. & Timpone H. Cancer Res., 5123—5129, 1991.
14. Wang J., Chervinsky D., & Rosen J. Cancer Res. 41 2745—2750 1981.

Получено 8.1 1991 г.

Биолог. журн. Армении, № 2, (44), 1991

УДК 612.017.12:551.52.17

ГИПЕРЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ЗАМЕДЛЕННОГО ТИПА II ФОРМИРОВАНИЕ АНТИТЕЛ У МЫШЕЙ ПРИ ОДНОКРАТНОМ УФ-ОБЛУЧЕНИИ

Н. Г. АКОПЯН, Л. Н. ФОНТАЛИН*

Институт экспериментальной биологии АН Армянской Республики, Ереван,
*НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи АМН СССР, Москва

Однократное УФ-облучение подавляет ГЭТ к эритроцитам барана и формирование антител к ДНФ. Для индукции супрессии необходима кожная аппликация гента на или подкожное введение антигена. УФ-облучение с последующей внутривенной иммунизацией антигеном не подавляет ГЭТ и формируются антитела.

Միանգամ ուլտրամանուշակագույն ճառագայթումը ճնշում է ԳՏԳ-ը ոչխարի էրիտրոցիտների հանդեպ և հակամարմինների մեղմորումը ԳՏԳ-ի հանդեպ: Սուպրահիա հարուցելու համար անհրաժեշտ է հաստների վերմաշկային ապրիկացիա կամ անտիգենի ենթամաշկային ներարկում: ՈՒՄ-ճառագայթումը անտիգենի հետո առ ներթակային իմունիզացիայով հանդերձ չի ճնշում ԳՏԳ-ը և հակամարմինների մեղմորումը:

The single exposure of mice to the UV radiation suppressed the induction of delayed type hypersensitivity response to sheep erythrocytes and antibody production against DNP. Epicutaneous application of antigen or subcutaneous administration of the antigens was required to induce suppression. The intravenous antigenic immunization of UV irradiated mice inhibited DTH and antibody production.

Ультрафиолетовое облучение — гиперчувствительность замедленного типа — антителообразование — супрессия.

Иммуномодулирующее действие УФ является новой моделью для исследования механизмов иммунной регуляции. Определение условий, при которых УФ-облучение проявляет иммуносупрессивную активность, вносит большой вклад в понимание механизмов его действия. При этом важное значение имеют доза и кратность облучения, способы иммунизации животных, тип используемого антигена.

Сокращения: УФ—ультрафиолетовое облучение; ГЭТ—гиперчувствительность замедленного типа; ЭБ—эритроциты барана; АОК—антителообразующие клетки; ДНФВ—диэтилфторбензол.