

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

УДК 612.017.1

Л. А. Аванесян, Т. К. Давтян, академик НАН Армении Ю. Т. Алексанян

**Синтез иммуноглобулинов лимфоцитами человека  
в культуре под влиянием адриамицина  
и его комплексов с  $Fe^{3+}$ ,  $Cu^{2+}$  и  $Co^{2+}$**

(Представлено 16/XII 1998)

Одной из актуальных проблем современной иммунологии является формирование иммунного ответа лимфоцитов в условиях индукции адаптивных реакций клеток в культуре. Иммунокомпетентные клетки, молекулярные механизмы активации, пролиферации и дифференцировки которых хорошо изучены, представляют собой удобную модель для изучения взаимоотношений адаптивного и иммунного ответов. Некоторые ДНК-повреждающие ксенобиотики, например адриамицин (АДР), вызывают индукцию адаптивного ответа клеток (<sup>1</sup>). В низких нецитотоксических концентрациях АДР способен индуцировать дифференцировку клеток различных линий (<sup>2</sup>), в том числе и В-клеток (<sup>3</sup>), а также оказывает иммуномодулирующее воздействие (<sup>4</sup>). Показано, что АДР способен стимулировать как конститутивный, так и индуцибельный синтез иммуноглобулинов (Ig) лимфоидными клетками в культуре, что, возможно, имеет адаптивное значение (<sup>5</sup>). Обратимое усиление АДР синтеза Ig требовало наличия свободных ионов железа в лимфоидных клетках, что свидетельствует об участии свободных радикалов в этих процессах.

Целью настоящей работы явилось изучение синтеза Ig лимфоцитами человека в культуре под влиянием АДР и его модифицированных форм путем комплексообразования с ионами металлов переходной валентности  $Fe^{3+}$ ,  $Cu^{2+}$  и  $Co^{2+}$ .

В качестве объектов исследования были использованы тонзиллярные лимфоциты человека, выделенные путем центрифугирования в градиенте плотности Ficoll-раque (Pharmacia). Лимфоциты ( $3,5 \cdot 10^6$ /мл) культивировали в среде RPMI-1640 (Serva), содержащей 15% эмбриональной телячьей сыворотки (Serva), 2mM L-глутамин,  $5 \cdot 10^{-5}$  M 2-меркаптоэтанола и 80 мкг/мл гентамицина. Индукцию гуморального иммунного ответа лимфоцитов проводили в течение трех или шести дней по ранее описанной методике (<sup>6</sup>). Комплексы АДР

с  $Fe^{3+}$ ,  $Cu^{2+}$  и  $Co^{2+}$  готовили в молярном соотношении АДР-металл 3:1 (7). Конечная концентрация АДР и его комплексов в среде культивирования клеток составляла 2 мкг/мл. При индукции антигенспецифического гуморального иммунного ответа и митогенной стимуляции лимфоцитов в среду инкубации добавляли 5 мкг/мл митогена лаконоса (МЛ) (Sigma). В качестве антигенов при индукции антигенспецифического иммунного ответа были использованы фиксированные формалином микроорганизмы: *Staphylococcus aureus* (штамм ИНМИА 5233), *Yersinia enterocolitica* (штамм ОЗ), *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella Flexneri* в разведении 1:200 маточной бактериальной суспензии с  $OP_{620}=0,7$ . Для выявления отдельных антителообразующих клеток (АОК) в культурах лимфоцитов использовали метод иммуноферментного анализа на нитроцеллюлозных фильтрах, покрытых антителами против IgA, IgM и IgG или бактериальными антигенами (6). Выживаемость лимфоцитов определяли с помощью 0,1% трипанового синего (Sigma).

В работе исследовалось влияние АДР, АДР- $Fe^{3+}$ , АДР- $Cu^{2+}$  и АДР- $Co^{2+}$  на синтез Ig классов А, М и G нестимулированными, МЛ-стимулированными лимфоцитами, а также на синтез антигенспецифических антител тонзиллярными лимфоцитами человека на 3-й и 6-й дни культивирования клеток.

Как показали исследования выживаемости лимфоцитов в присутствии указанных препаратов, используемая концентрация (2 мкг/мл) АДР, АДР- $Fe^{3+}$  и АДР- $Co^{2+}$  не являлась цитотоксической на 3-й день культивирования как нестимулированных, так и МЛ-стимулированных клеток. Незначительная гибель клеток отмечалась в присутствии АДР- $Cu^{2+}$  на 3-й день инкубации клеток. На 6-й день культивирования проявляется незначительный цитотоксический эффект АДР и его комплексов.

Результаты исследования влияния АДР и его комплексов на синтез IgA, IgM и IgG нестимулированными тонзиллярными лимфоцитами в культуре представлены в табл. 1.

Таблица 1

**Влияние АДР и его комплексов с  $Fe^{3+}$ ,  $Cu^{2+}$  и  $Co^{2+}$  на синтез IgA, IgM и IgG нестимулированными тонзиллярными лимфоцитами в культуре**

Условия эксперимента	Ig A		Ig A		Ig G	
	3-й день	6-й день	3-й день	6-й день	3-й день	6-й день
АДР	18±4	59,1±8,2	-	56,3±6,2	51±7,1	25,6±0,7
АДР- $Fe^{3+}$	61±9,2	52,5±7,8	-	74±3,3	51±7,4	55,15±1,5
АДР- $Cu^{2+}$	71±5	54,2±14,7	-	58,3±10,1	62,6±1,2	42,6±4,4
АДР- $Co^{2+}$	6±1	27,25±0,5	-	63,9±18,5	52,3±1,8	30,3±4,5

*Примечание.* Цифры в табл.1-3 обозначают индекс стимуляции =  $(1 - \text{число АОК в контроле} / \text{число АОК в опыте}) \times 100$ ; (-) — отсутствие стимуляции.

Как видно из табл.1, АДР и его комплексы стимулируют синтез IgA и IgG на 3-й и 6-й дни и IgM на 6-й день инкубации лимфоцитов. Отсутствие влияния АДР и его комплексов на синтез IgM на 3-й день инкубации, по-видимому, связано с длительной антигенной стимуляцией тонзиллярных лимфоцитов и небольшим количеством IgM<sup>+</sup> лимфоцитов в миндалинах *in vivo*. Максимальный стимулирующий эффект на синтез IgA и IgG на 3-й день инкубации проявлял комплекс АДР-Cu<sup>2+</sup>. Влияние АДР-Fe<sup>3+</sup> на синтез IgA и IgG было менее выраженным, однако более стабильным в динамике. В отличие от синтеза IgA значения синтеза IgG на 3-и сутки под влиянием АДР, АДР-Fe<sup>3+</sup> и АДР-Co<sup>2+</sup> оказались близки. Максимальное число АОК, синтезирующих IgM, на 6-й день инкубации обнаруживалось в присутствии АДР-Fe<sup>3+</sup>, минимальное – АДР, а АДР-Co<sup>2+</sup> и АДР-Cu<sup>2+</sup> по своему действию занимали промежуточное положение.

Таблица 2

**Влияние АДР и его комплексов с Fe<sup>3+</sup>, Cu<sup>2+</sup> и Co<sup>2+</sup> на синтез IgA, IgM и IgG МЛ-стимулированными тонзиллярными лимфоцитами в культуре**

Условия эксперимента	Ig A		Ig M		Ig G	
	3-й день	6-й день	3-й день	6-й день	3-й день	6-й день
АДР	–	78,2±1,5	57,5±1,5	46,9±7,6	50,3±2	13,6±0,2
АДР-Fe <sup>3+</sup>	30±2,2	71±2,9	33±2	39,4±2,1	29,7±6,5	55,7±5,9
АДР-Cu <sup>2+</sup>	29,7±6	65,2±8,9	25±2	57,4±9,6	23±7	28±2,9
АДР-Co <sup>2+</sup>	54,3±4,6	74,9±7	46±1,1	53±3,7	56,3±2,9	28±4,1

Как показали результаты экспериментов, представленные в табл.2, комплексы АДР с Fe<sup>3+</sup>, Cu<sup>2+</sup> и Co<sup>2+</sup> стимулировали синтез IgA, M и G на 3-й и 6-й дни инкубации лимфоцитов. Максимальный стимулирующий эффект на синтез IgA на 3-й день проявлял АДР-Co<sup>2+</sup>. АДР ингибировал синтез IgA МЛ-стимулированными лимфоцитами на 3-й день инкубации, а на 6-й день синтез IgA МЛ-стимулированными лимфоцитами значительно возрастал (примерно в равной степени), как в присутствии АДР, так и трех его комплексов. При сравнении синтеза IgA нестимулированными и МЛ-стимулированными лимфоцитами обнаруживается тенденция ингибировать синтез при совместном действии АДР, АДР-Fe<sup>3+</sup> и АДР-Cu<sup>2+</sup> и митогена на 3-й день и аддитивный эффект на 6-й день культивирования клеток. АДР-Co<sup>2+</sup> стимулировал синтез IgA в присутствии МЛ более выражено как на 3-й, так и 6-й дни инкубации. Эффект АДР-Co<sup>2+</sup> на IgG синтез МЛ-стимулированными лимфоцитами также наиболее выражен на 3-й день культивирования клеток. Действия комплексов АДР с Fe<sup>3+</sup> и Cu<sup>2+</sup> на IgG синтез были близки. На 6-й день стимуляция АДР и АДР-Co<sup>2+</sup> снижалась, а АДР-Fe<sup>3+</sup> и, в меньшей степени, АДР-Cu<sup>2+</sup>, наоборот, возрастала. При сравнении IgG синтеза МЛ-стимулированными и нестимулированными лимфоцитами выявлена максимальная стимуляция на 6-й день АДР-Fe<sup>3+</sup> синтеза IgG в обеих моделях индукции. Результаты экспери-

ментов по влиянию АДР и его комплексов на IgM синтез МЛ-стимулированными лимфоцитами показали, что на 3-й день АДР проявлял максимальный эффект. На 6-й день влияние АДР снижалось, а влияние его комплексов, наоборот, увеличивалось. Необходимо отметить, что если стимулирующие эффекты АДР и его комплексов на синтез IgM проявляются лишь на 6-й день культивирования нестимулированных лимфоцитов, то число АОК, синтезирующих IgM, при совместном действии митогена и АДР и его комплексов увеличивалось уже на 3-й день инкубации.

Результаты исследования влияния АДР и его комплексов на синтез антигенспецифических антител тонзиллярными лимфоцитами в культуре представлены в табл.3. Как видно из таблицы, тонзиллярные лимфоциты способны к образованию антигенспецифических антител в описанных условиях индукции *in vitro*.

Таблица 3

**Влияние АДР и его комплексов с  $Fe^{3+}$ ,  $Cu^{2+}$  и  $Co^{2+}$  на синтез антигенспецифических антител тонзиллярными лимфоцитами в культуре**

Условия эксперимента	S.flexneri		Y.enterocolitica		S.aureus		K.pneumoniae	
	3-й день	6-й день	3-й день	6-й день	3-й день	6-й день	3-й день	6-й день
АДР	50±1,8	41±6	40±0,9	16±1,9	37±1,4	76±2,6	30±0,34	58±0,14
АДР- $Fe^{3+}$	72,3±2	60,6±6	51±0,5	45±6,2	44±0,17	65±1,2	45±0,1	85±0,5
АДР- $Cu^{2+}$	66±0,1	54,4±5	17,5±1	49±1,5	45±1,1	63±6	16±2,2	52±0,5
АДР- $Co^{2+}$	58±0,7	46,8±6	48,4±1	12,4±1	48±1,3	65±1	49±0,59	67±0,29

АДР и его комплексы с  $Fe^{3+}$ ,  $Cu^{2+}$  и  $Co^{2+}$  стимулируют синтез антигенспецифических антител тонзиллярными лимфоцитами в культуре как на 3-й, так и на 6-й дни инкубации клеток. Стимулирующее действие этих препаратов на S.aureus растет в динамике, причем если на 3-й день исследования металлокомплексы обладали более выраженными эффектами, чем АДР, то на 6-й день, напротив, АДР действовал сильнее. Влияние комплексов АДР с  $Fe^{3+}$ ,  $Cu^{2+}$  и  $Co^{2+}$  на синтез анти-S.flexneri антител оказалось несколько сильнее, чем чистого АДР на 3-й и 6-й дни инкубации клеток. Стимулирующие эффекты АДР и его комплексов на 3-й день индукции иммунного ответа к K.pneumoniae оказались ниже, чем к S.flexneri. Стимулирующие эффекты АДР, АДР- $Fe^{3+}$  и АДР- $Co^{2+}$  возрастали в динамике при использовании в качестве антигенов S.aureus и K.pneumoniae и снижались при использовании S.flexneri и Y.enterocolitica. В то же время стимулирующие эффекты АДР- $Cu^{2+}$  возрастали в динамике при использовании в качестве антигенов S.aureus, Y.enterocolitica и K.pneumoniae и незначительно снижались при использовании S.flexneri. На 3-й день индукции максимальная стимуляция образования антигенспецифических АОК в культуре тонзиллярных лимфоцитов наблюдалась в присутствии АДР- $Fe^{3+}$  при использовании S.flexneri и Y.enterocolitica, а при использовании S.aureus и K.pneumoniae – АДР- $Co^{2+}$ . На 6-й день

индукции гуморального иммунного ответа максимальный стимулирующий эффект наблюдался в присутствии АДР-Fe<sup>3+</sup> при использовании *S.flexneri* и *K.pneumoniae*; АДР-Cu<sup>2+</sup> при использовании *Y.enterocolitica* и АДР при использовании *S.aureus*.

Таким образом, на основании проведенных экспериментов можно сделать заключение о том, что АДР и его комплексы с Fe<sup>3+</sup>, Cu<sup>2+</sup> и Co<sup>2+</sup> способны стимулировать синтез IgA, IgM и IgG нестимулированными и МЛ- и антиген-индуцированными тонзиллярными лимфоцитами в культуре. Стимуляция АДР и его комплексами продукции Ig тонзиллярными лимфоцитами не обусловлена освобождением внутриклеточных молекул Ig вследствие гибели клеток, а соответствует увеличению количества АОК в культуре. Комплексообразование АДР с металлами переходной валентности, особенно с Fe<sup>3+</sup> и Cu<sup>2+</sup>, приводит в основном к усилению эффектов АДР, что возможно является следствием увеличения свободных радикалов, а также свидетельствует о роли окислительно-восстановительного состояния молекулы АДР в его влиянии на синтез Ig. Модификации окислительно-восстановительного состояния АДР путем ее комплексообразования с металлами переходной валентности, способными служить донорами и акцепторами электронов, могут влиять на NADH оксидазу и транспорт электронов (8). Предполагается, что окислительно-восстановительное состояние хинона в молекуле оксидазы контролирует тирозин киназы (8). Адриамицин в цитотоксических дозах ингибирует электронный транспорт в чувствительных, но не устойчивых клетках. В то же время добавление солей железа восстанавливает активность NADH оксидазы и рост клеток (8). Кроме того увеличение внутриклеточного Ca<sup>2+</sup> и активности фосфолипазы D и уменьшение цАМФ, являющихся важными вторичными мессенджерами в передаче активационных сигналов, также может опосредовать стимулирующее влияние АДР и его металлокомплексов на синтез Ig (9). Устойчивость клеток к АДР может быть связана с активностью тирозин киназ или протенин киназы C (10). Действуя через вторичные мессенджеры, АДР и его комплексы могут активировать транс-факторы и их переход в ядро и тем самым стимулировать транскрипцию Ig генов (3). Таким образом, АДР и его комплексы с Fe<sup>3+</sup>, Cu<sup>2+</sup> и Co<sup>2+</sup>, индуцируя дифференцировку В лимфоцитов, способны стимулировать синтез Ig в культуре лимфоцитов человека, что, возможно, опосредовано их влиянием на пути передачи сигналов в лимфоцитах.

Институт эпидемиологии, вирусологии и медицинской паразитологии  
им. А.Б.Алексаияна Минздрава РА

**Լ. Ա. ԱՎԱՆԵՍՅԱՆ, Տ. Կ. ԴԱՎԹՅԱՆ,  
Հայաստանի ԳԱԱ ակադեմիկոս Յու. Թ. ԱԼԵԲՄԱՆՅԱՆ**

**Մարդու լիմֆոցիտների կողմից իմունոգլոբուլինների սինթեզը կուլտուրայի պայմաններում ադրիամիցինի և նրա  $Fe^{3+}$ ,  $Cu^{2+}$  և  $Co^{2+}$  միացությունների ազդեցության տակ**

*Արդի իմունոլոգիայի ակտուալ հարցերից մեկն է լիմֆոցիտների իմուն պատասխանի ինդուկցիան քիմիկատի պատասխանի զարգացման պայմաններում:*

*Հոդվածում ցույց է տրված մարդու տոնզիլյար լիմֆոցիտների կողմից իմունոգլոբուլինների սինթեզը ադրիամիցինի և նրա  $Fe^{3+}$ ,  $Cu^{2+}$  և  $Co^{2+}$  մետաղային իոնների միացությունների ազդեցության տակ: Ադրիամիցինը և նրա  $Fe^{3+}$ ,  $Cu^{2+}$  և  $Co^{2+}$  միացությունները խթանում են A, M և G դասերի իմունոգլոբուլինների սինթեզը ոչ ստիմուլյացված և միթոզեն – ստիմուլյացված լիմֆոցիտների, ինչպես նաև անտիգենսպեցիֆիկ հակամարմինների սինթեզը մարդու տոնզիլյար լիմֆոցիտների կողմից *in vitro* պայմաններում: Այդ խթանումը կարող է պայմանավորված լինել երկրորդական մեսենջերների ակտիվացումով նշված նյութերի ազդեցության տակ:*

**ЛИТЕРАТУРА – ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ**

<sup>1</sup> L.N.Hartwell, T.A.Weinert, Science. v.246, p.629-634 (1989). <sup>2</sup> R.Hoffman, S.Newlands, Cancer Chemother, Pharmacol., v.28, p.102-109 (1991). <sup>3</sup> M.B.Meliksetian, T.K.Davtyan, e.a., Cell. Biol. Intern., v.21, N2, p.69-74 (1997). <sup>4</sup> J.L.Teillaud e.a., Cancer Res., v.49 p.5123-5129 (1989). <sup>5</sup> Т.К.Давтян, М.Б.Меликсетян, Ю.Т.Алексанян и др. Цитология т.35, N4, с.54-60 (1993). <sup>6</sup> Т.К.Давтян, Ю.Т.Алексанян и др. Иммунология N5, с.33-37 (1994). <sup>7</sup> Т.К.Davtyan, A.V.Gyulkhandanyan e.a., Biophys.Biochim. Acta., v.1297, p.182-190 (1996). <sup>8</sup> F.L.Crane e.a., Mol.Aspects Med., v.15, p.1-14 (1994). <sup>9</sup> N.Mestdagh e.a., Biochem.Pharmacol., v.48, N4, p.709-716 (1994). <sup>10</sup> J.Utz e.a., Int.J. Cancer, v.57, N1, p.104-110 (1994).