

присутствии Кетамина (*in vitro*) действие 37°С обусловлено именно на устранение ингибирующего действия этого наркотического соединения на транспорт глюкозы. Не исключена возможность, что в этих реакциях существенную роль играют ионы кальция, которые контролируют функциональную активность нервных клеток.

ЛИТЕРАТУРА

1. Буватян Г. X., Оганесян А. С. ДАН СССР, 149, 449, 1963.
2. Legoux Y. J. Biochem. Biophys. Acta, 727, 367-378, 1983.
3. James D. E., Strube M., Albersdor M. Nature 333, 83-87, 1989.
4. Rattigan S., Appichy G. J., Chel 22, 100, Biochem. Biophys. Acta, 1094, 215-223, 1991.

Поступило 19. XII, 1990 г

Биолог журн. Армении, № 2.(46), 1993

УДК 612.017.1

ИНДУКЦИЯ ИММУННОГО ОТВЕТА ЧЕЛОВЕЧЕСКИХ ЛИМФОЦИТОВ В КУЛЬТУРЕ ПОД ВЛИЯНИЕМ ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

Т. К. ДАВТЯН*, М. Б. МЕЛИКСЕТЯН**, Ю. Т. АЛЕКСАНИЙ*,
Т. Н. ИГНАТОВА**, И. Н. ИВАНОВА**

*Институт эпидемиологии, вирусологии и медицинской паразитологии
им. А. Б. Алексаняна МЗ Армении, Ереван;

**Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург

Иммунный ответ — реакция организма на антиген. Антиген — вещество, вызывающее иммунный ответ.

Изучение молекулярно-клеточных механизмов индукции иммунного ответа человеческих лимфоцитов *in vitro* является чрезвычайно актуальным для выяснения механизмов регуляции иммунного ответа, продолжительности иммунологической памяти к антигенам, генетического контроля силы иммунного ответа и т. д. Эти исследования представляют также огромный интерес для решения проблемы биотехнологии получения моноклональных антител человека. Индукция гуморального иммунного ответа в культуре клеток в любом случае возможна при антигенспецифической терминальной дифференцировке В-клеток в антителообразующие плазматические клетки. Ранее было показано, что некоторые цитотоксические яды (адриамицин и бромистый этидий) стимулируют синтез и секрецию моноклональных антител В-клеточными гибридами [4, 7]. Установлено также, что адриамицин стимулирует гуморальный и клеточный иммунный ответ в низких нецитотоксических концентрациях [5, 6]. Однако молеку-

Сокращения: ЛПКЧ—лимфоциты периферической крови человека; ИГ—иммунноглобулины; БЭ—бромистый этидий; МЛ—митоген лямбдога; ДА—дифтерийный анатоксин.

лярно—клеточные механизмы действия клеточных ядов на иммунокомпетентные клетки остаются недостаточно изученными.

Задачей настоящей работы явилось изучение действия адриамицина и бромистого этидия на гуморальный иммунный ответ человеческих лимфоцитов в культуре, а также исследование механизма иммуностимулирующего действия этих клеточных ядов на В—клетки человека и В—клеточные гибридомы.

Материал и методика. В работе были использованы ЛПКЧ, полученные по ранее описанной методике [3]. Были использованы также мышечные мезенхимные клетки линии $3T_3$, $3T_3$ —5 и линия гибридных клеток $1F_7$, продуцирующих мышечные моноклональные антитела к трансферрину человека [1, 2]. ЛПКЧ культивировали в среде RPMI—1640 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки. В культуры ЛПКЧ добавляли адриамицин (0,05 мкг/мл), БЭ (1 мкг/мл), ДА (5 мкг/мл) и МЛ (1 мкг/мл). Продукцию антител определяли с помощью иммуоферментного анализа.

Для изучения взаимодействия молекул ИГ и клеточных ядов нами были сконструированы аффинные сорбенты на основе BrCN—сефароза—4В (Pharmacia) с иммобилизованными цитотоксическими препаратами. Белки, связывающиеся с аффинными сорбентами, элюировали и анализировали методами ИДС—ПААГ электрофорезом и иммуоблоттингом. Для изучения синтеза и секреции ИГ использовали метод радиационной преципитации клеточных белков, меченных ^{35}S -меткированным [7].

Результаты и обсуждение. Как показали результаты наших исследований, адриамицин и БЭ в низких нецитотоксических концентрациях стимулируют продукцию человеческих ИГ в культурах ЛПКЧ. При стимуляции поликлональной дифференцировки и пролиферации В—клеток с помощью МЛ, адриамицина и БЭ стимулируют продукцию ИГ человека класса М и анти—ДА антител класса G, при индукции специфического иммунного ответа ЛПКЧ к ДА. Продукция указанных ИГ стимулируется в 2,5—3 раза больше в присутствии клеточных ядов, чем в контрольных культурах. Продукция ИГ в антиген/митоген—стимулированных культурах ЛПКЧ наблюдается уже через 72 ч в присутствии адриамицина и БЭ, тогда как в контрольных культурах продукция антител той же интенсивности наблюдается лишь после 6—7 дней инкубации ЛПКЧ *in vitro*. Увеличение продукции указанных ИГ в присутствии клеточных ядов соответствует увеличению числа антителообразующих клеток. Увеличение количества антителообразующих клеток свидетельствует о том, что возрастание продукции ИГ в культурах ЛПКЧ, стимулированных указанными препаратами не является результатом цитотоксического действия клеточных ядов на культивируемые В—клетки человека. Необходимо отметить также, что в культурах ЛПКЧ, стимулированных лишь адриамицином, происходит активация аутореактивных В—клеток человека, синтезирующих антитела с низкой аффинностью к довольно широкому спектру антигенов. Адриамицин и БЭ стимулируют *de novo* синтез человеческих ИГ класса М в культурах ЛПКЧ, а также синтез моноклональных антител в В—клеточных гибридных и миеломных клетках. В гибридных клетках адриамицин и БЭ стимулируют синтез Н—цепей ИГ соответственно в 10 и 2,5—3 раза. Как показали

результаты наших исследований, адриамицин индуцирует фрагментацию ядерной ДНК ЛПКЧ по нуклеосомной структуре с образованием фрагментов длиной 200 п. н. в течение 6 дней инкубации клеток. Фрагментация ядерной ДНК вследствие активации эндонуклеаз является, по-видимому, результатом индукции терминальной дифференцировки клеток ЛПКЧ в культуре.

Стимуляция адриамицином и ЭБ продукции ИГ культивируемым ЛПКЧ и миедомными/гиприомными клетками, вероятно, отражает адаптивный ответ клеток, направленный на повышение выживаемости В-клеток в условиях действия неблагоприятных факторов внешней среды.

Как показали результаты анализов белков, иммобилизованных с аффинных матриц с иммобилизованными ядами, как по размерам, так и по антигенным характеристикам эти белки были идентичны соответственно ИГ человека и мышей. Связывание молекул ИГ с клеточными ядами имеет ряд особенностей: 1) этот процесс может происходить как внутри, так и вне клеток; 2) процесс связывания происходит без участия Fad и Fe-фрагментов молекул ИГ; 3) учитывая конкуренцию между растворимой и иммобилизированной БЭ за связывание с ИГ, можно полагать, что молекулы ИГ имеют сродство к БЭ; 4) связывание клеточных ядов с молекулами ИГ, возможно, происходит в области дисульфидных мостиков между H и L цепями ИГ.

Таким образом, на основании вышеизложенного можно сделать заключение о том, что под влиянием клеточных ядов формируется адаптивный ответ В-клеток, выражающийся в увеличении продукции ИГ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Березкина Е. В., Игнатова Т. Н. Госреестр № 1641884. 1989.
2. Березкина Е. В., Ковалева З. В., Синакевич Н. Г. и др. Заявка на изобретение № 485 4936/3 от 26.07.90.
3. Довгяк Т. К., Игман Б. Х., Игнатова Т. Н., Азизян Ю. Т. Биол. журн. Армении, 44, 3: 234—239. 1991.
4. Мелхисеян М. Б., Довгяк Т. К., Березкина Е. В. и др. Биол. журн. Армении, 44, 2: 120—125. 1991.
5. Ehrlich M., Cohen S., Mithch E. Immunol. Rev., 65: 55—78, 1982.
6. Ehrlich M., Macculin D., Ryoyama K. et. al. Cancer Res., 46: 54—50. 1988.
7. Telland J., Fourcile A., Harper J. et al. Cancer Res., 49, 5121—5123. 1989.

Получено 12 III. 1991 г.