

И. В. КОНСТАНТИНОВА, В. Д. ЗАЖИРЕЙ, В. Ш. ШЕЙНКЕР

ИССЛЕДОВАНИЕ ДЕЙСТВИЯ РИБОНУКЛЕАЗЫ НА СИНТЕЗ
АНТИТЕЛ ПРИ ВТОРИЧНОМ ИММУНОЛОГИЧЕСКОМ ОТВЕТЕ
IN VITRO И IN VIVO

(Представлено академиком В. В. Париным 30 IX 1970)

Ранее нами представлены данные о стимулирующем действии малых концентраций РНКазы на биосинтез антител и прочих белков, секретиремых фрагментами селезенки иммунизированного кролика *in vitro* (^{1, 2}). В этих наблюдениях описано увеличение размеров эксплантируемого фрагмента и увеличение зоны роста вокруг него. Оставалось неясным, связано ли это с усилением пролиферации лимфоидных клеток. Недавно опубликованы данные о стимулирующем действии РНКазы на пролиферацию в культурах опухолевых клеток (³).

В настоящем исследовании ставилась задача изучить зависимость феномена активации биосинтеза антител РНКазой от концентрации фермента и от фазы иммунологического ответа, установить, как при этом меняется пролиферация клеток и скорость синтеза РНК в них. Кроме того, необходимо было исключить возможность неспецифического действия РНКазы как низкомолекулярного белка и, наконец, установить возможность стимуляции антителообразования не только *in vitro*, но и при введении РНКазы *in vivo*.

Работа выполнена на 86 инбредных мышах линии BALB/c, самцах, весом 18—20 г, и 16 половозрелых кроликах шиншилла. Поставлено 480 кусочковых культур. Фрагменты селезенки животных, иммунизированных БСА (Colnbrook, Англия), культивировали во вращающихся пробирках, как это описано ранее (¹). К культуральной среде (среда Игла, содержащая 20% нормальной гомологичной сыворотки) добавляли РНКазу (Reanal, Венгрия) в конечной концентрации 0,02—0,3 или 1,0 мг/мл. В различные сроки эксперимента к культурам добавляли H^3 -уридин или H^3 -тимидин (Amersham, Англия, уд. акт. соответственно 3,4 и 5,0 С/ммоль); длительность контакта меченых предшественников с культурами — от 60 мин. до трех суток. Включение меченых уридина и тимидина оценивали автордиографически. Взвесь клеток, полученную продавливанием эксплантатов через капроновую сетку, отмывали дважды холодной средой и изготавливали мазки. Мазки обрабатывали на холоду 5% ТХУ и покрывали эмульсией типа «М» (НИКФИ). После проявления препараты окрашивали метилгрюнпиронином. Подсчитывали число гранул восстановленного серебра над клетками разных типов, меченных H^3 -уридином, и индекс метки в опытах с добавлением H^3 -тимидина.

В двух контрольных сериях опытов к части культур вместо РНКазы в среду добавляли протаминсульфат в конечной концентрации 14 или 570 мкг/мл. В части опытов из фрагментов, культивированных в присутствии H^3 -уридина, выделяли РНК фенольным методом. Для этого 30—40 эксплантатов опытных (после добавления РНКазы) или столько же контрольных (без РНКазы) быстро замораживали, размельчали в гомогенизаторе Поттера в течение 60 сек. на холоду в 0,01 М ацетатном буфере pH 5,1, содержащем 0,5% додецилсульфата натрия и 10^{-4} М Mg^{+2} [$Mg-(CH_3COO)_2$]. Гомогенат дважды депротенинизировали горячим фенолом (65°, 3 мин.), после чего водный слой пробы наносили на колонку с сефадексом Г-25. Элюцию проводили тем же ацетатным буфером.

Количество РНК определяли на спектрофотометре, радиоактивность измеряли на счетчике.

Введение РНКазы *in vivo* проведено на 86 мышах, предварительно иммунизированных Vi-антигеном, БСА или дифтерийным анатоксином. РНКазу, прогретую при 90° (30 мин.), вводили внутривенно или внутривентриально ежедневно в течение 5 дней по 1 мг; на 6 сутки делали

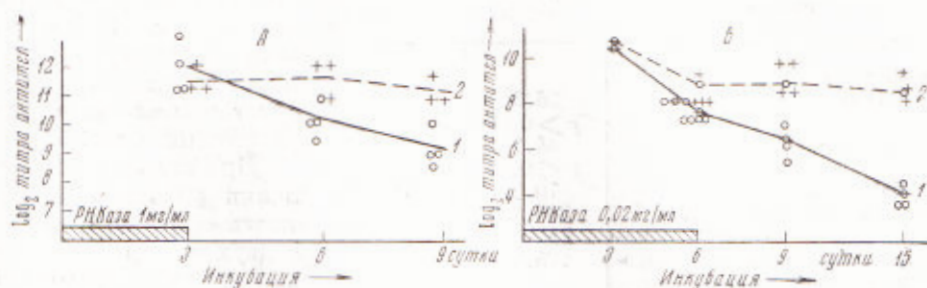


Рис. 1. Динамика $\log_2$ средних титров антител в инкубационной среде при культивировании фрагментов селезенки иммунизированного БСА кролика без фермента (1) или в присутствии РНКазы (2). А — РНКазу (1 мг/мл) добавляли на 0 день, отмыли через 3 суток; Б — РНКазу (0,02 мг/мл) добавляли на 0 и 3 день, отмыли на 6 сутки опыта

вторичное введение соответствующего антигена. Титр антител в сыворотке животных и в культуральной жидкости определяли методом Бойдена — Ставицкого; для определения антител против Vi-антигена использовали модификацию ПГА (4).

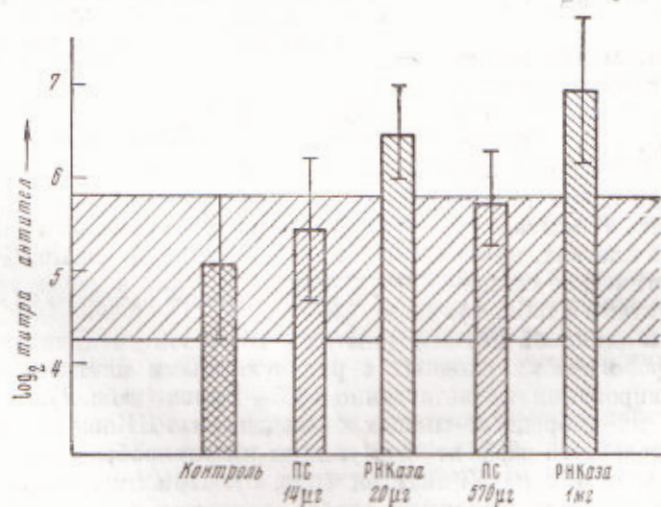


Рис. 2. Средние титры антител ($\log_2$) в инкубационной среде на 12 сутки культивирования фрагментов селезенки иммунизированного БСА кролика при добавлении РНКазы и протаминсульфата. Статистическая обработка по методу доверительных интервалов, $P < 0,05$

Результаты опытов показали, что активация процессов роста клеток и биосинтеза в культуре происходит в присутствии малых концентраций РНКазы 20 μ г/мл (рис. 1 а). При контакте эксплантатов с РНКазой в высокой концентрации (1 мг/мл) сначала наблюдалось подавление антителообразования; однако после отмыывания культур от фермента при дальнейшем культивировании отмечен статистически достоверный стимулирующий эффект (рис. 1б). Этот эффект был наиболее выражен, если селезенку для опыта брали у животных на высоте продуктивной

Таблица 1*

Среднее количество гранул серебра на меченую клетку

Клетки	РНКаза, 1 мг/мл	Без РНКазы
Лимфоциты малые	26,3 $p > 0,05$	29,3
средние	44,7 $p < 0,05$	28,7
большие	70,2	34,4
Незрелые плазматические	363,6	216,6
Крупные плазмцитоподобные	150,0	116,6
Неидентифицированные высоко- копирнофильные	175,4	400,0

* Инкубация с уридином-Н³ в течение 24 час. (В каждом опыте просчитано 1400 клеток.) Статистическая обработка — по методу Т-теста Стьюдента и критерий χ^2 .

В культурах с РНКазой автордиографически выявлен быстрый гидролиз РНК в погибающих клетках эксплантата. Так, подсчет клеток, содержащих Н³-уридин, на число погибших клеток на 9 сутки с РНКазой (20 мг/мл) составлял 9,9%, на 3 сутки с РНКазой (1 мг/мл) 7,1%, без РНКазы 15,4%.

Под влиянием РНКазы на 6 сутки достоверно увеличивалось содержание меченой РНК в средних и больших лимфоцитах. Необычной оказалась высокая скорость синтеза РНК как в опыте, так и в контроле в клетках, имеющих морфологическое сходство с плазмцитами (табл. 1).

Индекс тимидиновой метки в опытах с РНКазой увеличивается в элементах, морфологически сходных с ретикулярными клетками, на 6 и 9 сутки культивирования соответственно в 1,5—2 раза (табл. 2).

В опытах на инбредных мышах с введением РНКазы *in vivo* статистически достоверный эффект стимуляции антителообразования получен при вторичном ответе на Vi-антиген (рис. 3). При иммунизации мышей БСА стимуляция была выражена слабее, в опытах с дифтерийным анатоксином эффект не был выявлен.

Таким образом, нами получены следующие факты. РНКазы в малых концентрациях стимулировала биосинтез антител в культуре ткани и при введении животным. В опытах *in vitro* при этом наблюдалась активация биосинтеза РНК в лимфоцитах и усиление пролиферации ретикулярно-подобных клеток. Относительно большие концентрации фермента оказывали выраженное ингибирующее действие, однако позднее, после удаления фермента из культуральной жидкости, наблюдалась активация биосинтеза антител, что, по-видимому, связано с действием оставшихся следовых количеств фермента.

Как показано ранее (5), в центральных отделах фрагментов селезенки объемом около 1 мм³ при культивировании происходят выраженные некробиотические изменения клеток. РНКазы, по-видимому, проникает и в эти отделы эксплантата, так как в культурах с добавлением фермента

фазы. В опытах с добавлением вместо РНКазы в эквимолярной концентрации протаминсульфата — белка, близкого к РНКазе по молекулярному весу, найдено, что его присутствие не меняет титра антител (рис. 2).

При валовом определении удельной активности меченой РНК в двух из трех опытов не удалось отметить увеличения включения меченого уридина в РНК эксплантатов, культивировавшихся с РНКазой.

Таблица 2*

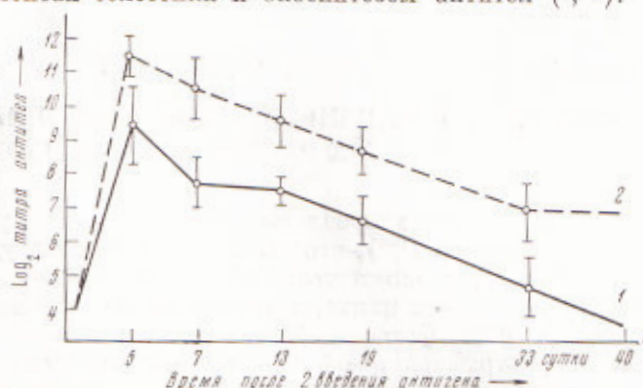
Количество ретикулярноподобных клеток, включивших Н³-тимидин среди живых клеток в различные сроки культивирования, %

Срок инкубации, сутки	РНКаза 20 мг/мл, 6 суток	РНКаза 1 мг/мл, 3 суток	Без РНКазы
6	90,9	81,5	59,0
9	53,0	80,0	39,0
12	17,5	35,0	15,3

* В каждом препарате просчитано 400 клеток.

меченая РНК в цитоплазме погибающих клеток гидролизуеться намного быстрее, чем в контроле. Можно предположить, что в результате в фрагменте создается высокая местная концентрация продуктов гидролиза РНК. Ранее нами показана прямая зависимость между синтезом РНК в культивируемых фрагментах селезенки и биосинтезом антител (¹, ²).

Рис. 3. Динамика титров антител в сыворотке мышей линии BALB/c, которым перед второй стимуляцией (Vi-антиген) в течение 5 дней ежедневно вводили физиологический раствор (1) или РНКазу (2). Статистическая обработка по методу доверительных интервалов, $P < 0,05$



В настоящей работе не было выявлено тотальное ускорение синтеза РНК в эксплантатах; не исключено, что этот результат связан с разведением метки продуктами гидролиза РНК из погибших клеток. Опыты с протаминсульфатом позволяют отклонить допущение о неспецифическом действии РНКазы, не связанном с ее ферментативной активностью.

Один из вероятных механизмов действия РНКазы может быть связан с деградацией РНК в погибающих и живых клетках и с действием продуктов ее гидролиза — моно-олигонуклеотидов. На других моделях такая возможность показана (⁶, ⁸). Остается открытым вопрос о механизме действия продуктов деградации РНК на клетки, синтезирующие антитела, что может быть связано с реутилизацией рибонуклеотидов или с регуляторным действием этих продуктов на обмен веществ в клетке. Вторая возможность доказана в опытах с активацией киназ в бактериальных клетках под влиянием полирибонуклеотидов (⁹).

Нельзя исключить также предположение о прямом активирующем действии РНКазы, проникшей в живой лимфоцит.

Следует иметь в виду возможность активирования синтеза РНК, ДНК и белка специфическими продуктами гидролиза тирозиновой и сериновой транспортных РНК цитокининами. Имеются первые сообщения об активации синтеза РНК в ФГА-бластах у человека при действии цитокина — изопентенил-аденозина (¹⁰).

Дальнейшее изучение механизма стимулирующего действия РНКазы представляется необходимым, так как это связано с важным вопросом о роли эндогенной РНКазы в регуляции скорости синтеза белка, и в том числе антител.

Институт медико-биологических проблем
Министерства здравоохранения СССР
Институт морфологии человека
Академии медицинских наук СССР
Москва

Поступило
8 VII 1970

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ И. В. Константинова, Л. В. Ванько и др., ДАН, 176, 942 (1967).
- ² I. V. Konstantinova, B. V. Fuks, L. V. Vanko, Folia biologica (Praha), 15, 71 (1969).
- ³ Ю. М. Васильев, И. М. Гельфанд и др., ДАН, 187, № 4, 913 (1960).
- ⁴ Н. А. Краскина, Н. М. Гуторова, Тр. Московск. инст. эксп. мед., 9, 180 (1962).
- ⁵ К. А. Лебедев, Л. В. Ванько, Бюлл. эксп. биол. и мед., 10, 31 (1969).
- ⁶ K. Merrit, A. S. Johnson, J. Immunol., 94, 416 (1965).
- ⁷ W. Braun, M. Nakano, Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 119, 3, 701 (1965).
- ⁸ И. Я. Учитель, Э. Л. Хасмац, Вестн. АМН СССР, 3, 23 (1964).
- ⁹ W. Firshein et al., Science, 157, № 3790, 821 (1967).
- ¹⁰ R. S. Gallo, J. Whang-Peng, S. Perry, Science, 165, 3891, 400 (1969).