

to occur in 65.12% of cows in the nearby area and in 53.15% of the cows from the distant area, while osteofluorosis appeared in 20.47% and 12.60% respectively. During the two years after the plant stopped operating there was a drop in fluorosis in the cows, particularly in the young animals. Among the young, none were affected by osteofluorosis whi-

le dentofluorosis occurred in 25.93% of the animals from the nearby region and in the more distant region only 6.67% of the young cows. The values of other health symptoms in the first stage of the study were: 50.93% in the nearby area and 15.33% in the more distant area and in the second stage 33.67% and 5.76%, respectively.

HANNA CZEKAJ, WŁODZIMIERZ ZBINIEWICZ

Przeciwciała monoklonalne

Zakład Badania Chorób Drobiu i Pracownia Patologii Komórkowej, Instytut Weterynarii,
Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

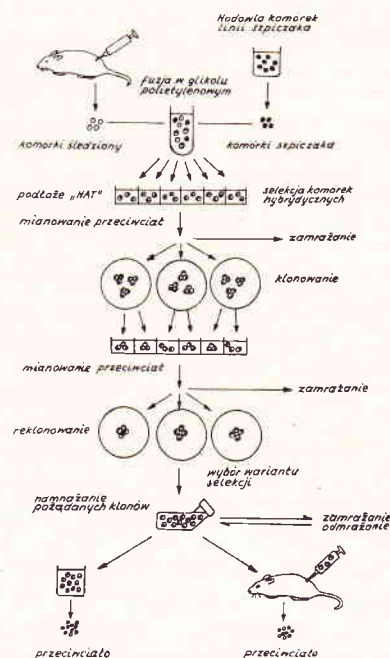
Przeciwciała otrzymywane metodą klasyczną przez uodpornianie organizmu odpowiednim antygenem, są mieszaniną immunoglobulin, z których każda skierowana jest przeciwko poszczególnym determinantom antygenowym użytego antygeny. Rozdzielenie i oczyszczenie immunoglobulin na drodze chemicznej jest procesem złożonym, który zwykle obniża aktywność immunologiczną uzyskanych przeciwciał. Otrzymane metodą klasyczną przeciwciała są zawsze niepowtarzalne.

Przeciwciała będące białkami odpornościowymi — produkowane są przez limfocyty B, zawarte w tkance limfoidalnej (głównie w śledzionie i węzłach chłonnych). Poszczególne limfocyty produkują jeden rodzaj białka jako odpowiedź na wtargnięcie do ustroju jednej cząsteczki białka antygeny. Gdyby udało się z każdej poszczególniej komórki limfocytarnej uzyskać hodowlę komórek *in vitro*, otrzymanie linii komórkowej wytwarzającej jednorodne swoiste białko odpornościowe — przeciwciała monoklonalne byłoby sprawą prostą. Limfocyty nie dają się jednak namnażać *in vitro*. Potrzebne są więc komórki łączące właściwą limfocytom B zdolność do produkcji przeciwciał ze zdolnością do namnażania się *in vitro*. Taką zdolność posiadają komórki szpiczaków. Sztuczne połączenie, czyli fuzja tych dwóch komórek prowadzi do powstania komórki-hybrydy (hybrydycznej) spełniającej powyższe wymagania.

Badania, które doprowadziły do pierwszej fuzji limfocyty z komórką szpiczaka (8) dotyczą wczesnych lat 60, kiedy to Potter rozpoczął badania nad szpiczakami u myszy. Następnie uzyskano linię komórek szpiczaka myszy, której jednak nie udało się utrzymać i wreszcie Horibata i Harris (7) wprowadzili liczną linię komórek szpiczaka myszy (m.in. linia MOPC-21 i jej pochodna BALB/c stosowana do dziś jako podstawowa). Badali wtedy mutacje wpływające na specyfikę przeciwciał, do czego szpiczak był dogodnym modelem. W 1973 r. Cotton i Milstein (3) prowadząc badania nad wyłącznością alleli (genów alternatywnych) dokonali fuzji komórek szpiczaka myszy i szczura. Stwierdzili przy tym, że komórki hybrydyczne posiadają chromosomy pocho-

dzące od obu komórek macierzystych i produkują przeciwciała właściwe dla obu. Wreszcie w 1975 r. Kohler i Milstein (8) wydzielili z linii szpiczaka MOPC-21 linię zmutowaną, nie wytwarzającą przeciwciał. Następnie przeprowadzili pierwsze klasyczne już dziś połączenie limfocyty pochodzącego ze śledziony myszy, uczulonego erytrocytami barana, z komórką linii szpiczaka otrzymując komórki hybrydyczne produkujące przeciwciała monoklonalne.

Hybrydyzację uczulonych limfocytów przeprowadza się *in vitro* (5, 17). Opis techniki przedstawia ryc. 1. Dawcą komórek śledziony służących do fuzji jest zazwyczaj mysz. Od 2 lat bywają do tego celu używane również szczury. Myszy immunizuje się według przyjętego schematu, zależnie od stosowanego antygeny. Następnie pobiera się śledzionę i węzły chłonne, rozdrabnia i przepłukuje kilkakrotnie płynem wzrostowym. Zawieszinę komórek śledziony miesza się z komórkami szpiczaka; ponieważ komórki śledziony są znacznie mniejsze niż komórki szpiczaka, dla ułatwienia ich przylegania podczas fuzji używa się więcej



Ryc. 1. Otrzymywanie przeciwciał monoklonalnych

komórek śledziony niż szpiczaka. Najczęściej stosowana jest proporcja 4:1 (19). Następnie dodaje się czynnik sprzyjający połączeniu. Do 1975 roku używany był w tym celu inaktywowany wirus *Sendai*, obecnie stosuje się glikol polietylenowy (PEG), zmieniający strukturę błon komórkowych i ułatwiający fuzję (15). Następnie komórki zawieszają się w płynie wzrostowym, rozmieszcza w zagłębieniach mikro-płytki i inkubuje w temp. 37°C. Oprócz opisanej wyżej metody klasycznej, stosowana była metoda fuzji na filtrach membranowych (1), pozwalająca na uzyskanie ściślejszego kontaktu między komórkami, przez co zwiększa się częstotliwość fuzji. Stosowana tu proporcja komórek śledziony i szpiczaka wynosi 2,5:1. Po upływie 24 godz. rozpoczyna się selekcja. Zawiesina zawiera trzy rodzaje komórek: komórki wyjściowe (limfocyty i komórki szpiczaka), które nie uległy fuzji, oraz komórki hybrydyczne. Dla oddzielenia tych ostatnich zawieszają je inkubuje się na podłożu wybiórczym, pozwalającym na przeżycie wyłącznie komórek hybrydycznych i komórek szpiczaka (limfocyty obumierają samoistnie, jako nie posiadające zdolności do namnażania się *in vitro*). Zawarta w podłożu aminopteryna jest inhibitorem syntezy puryn (adenozyno-monofosforanu — AMP i guanino-monofosforanu GMP). Komórki zawierające enzymy TK (kinaza tymidynowa) oraz HGPRT (hipoksantyna-guanina-fosforybozyl-transferaza) mają możliwość zastępczej, bądź egzogennej syntezy nukleotydów purynowych i tyminy w sytuacji, gdy normalna droga ich syntezy jest zablokowana. Dzięki obecności w podłożu tymidyny i hipoksantyny możliwa jest synteza tymino-monofosforanu TMP przez TK, oraz synteza AMP i GMP przez HGPRT. Limfocyty zawierają zarówno TK, jak i HGPRT, a więc również komórki hybrydyczne zawierają te enzymy. Nie posiadają ich natomiast komórki szpiczaka, przez co giną w wybiórczym podłożu. Przeżywają i mogą się rozwijać jedynie komórki hybrydyczne.

Podłoże selektywne dodawane jest do każdego zagłębienia mikro-płytki jednorazowo, bądź też wspomagające jego dawki dodaje się co kilka dni według ustalonego schematu. W ciągu jednego tygodnia hodowania na podłożu selektywnym obserwuje się postępujące obumieranie komórek śledziony i szpiczaka. Przeżywające komórki hybrydyczne obserwuje się w 7—14 dni po fuzji jako małe kolonie rosnące na grubej warstwie komórek obumarłych. Wtedy przystępuje się do klonowania komórek hybrydycznych. Klonowanie ma na celu wyizolowanie komórek hybrydycznych, produkujących jeden rodzaj immunoglobuliny i dających początek klonowi, u którego zdolność do produkcji tej immunoglobuliny będzie cechą stałą. Jak wiadomo immunoglobuliny składają się z dwóch łańcuchów polipeptydowych —

lekkiego i ciężkiego. Komórki hybrydyczne zawierają chromosomy obu komórek macierzystych i dzięki temu mają zdolność do produkowania dwóch rodzajów immunoglobulin, a więc dwóch łańcuchów lekkich i dwóch ciężkich. Jednocześnie jednak mają skłonność do stopniowej utraty części chromosomów, co ogranicza liczbę produkowanych łańcuchów. Zazwyczaj komórka najpierw zaprzestaje produkcji łańcucha ciężkiego (H lub G), następnie zaś łańcucha lekkiego (L lub K). Klonowane są głównie komórki HL, czasem również HK. Zastosowanie zmutowanych linii szpiczaka, wytwarzających jedynie łańcuch lekki K, bądź w ogóle nie wytwarzających immunoglobuliny bardzo przyspiesza przebieg klonowania (9, 17). O przeciwciałach monoklonalnych można mówić dopiero wówczas, gdy dana komórka, czy też klon komórek produkuje tylko jeden rodzaj immunoglobuliny — HL, HK, itd. (17).

Klonowanie przeprowadza się metodą granicznych rozcieńczeń (5). Klonowane komórki, po osiągnięciu 50% pokrycia w poszczególnych zagłębieniach mikro-płytki przenosi do nowej mikro-płytki, z wyliczeniem, aby objętość płynu wzrostowego zawierająca przypuszczalnie jedną komórkę hybrydyczną zdolną do zainicjowania klonu przypadła na 4 zagłębienia mikro-płytki (19).

W celu intensyfikacji namnażania się klonów do komórek hybrydycznych dodawane są tzw. komórki odżywcze (feeders) (2, 10). Jest to zawiesina świeżo pobranych tymocytów myszy (10), komórek śledziony (12) lub komórek otrzewnowych. Komórki odżywcze słabo przeżywają w warunkach hodowli komórek hybrydycznych, są jednak niezbędnym składnikiem podłoża.

Po uzyskaniu wzrostu przeprowadza się badania aktywności poszczególnych klonów. W tym celu stosowane są następujące metody: autoradiografia, immunoprecypitacja, elektroforeza w żelu, immunofluorescencja, odczyn cytotoksyczny, test ELISA (5, 19). Średnio 10% klonów wykazuje aktywność w wydzielaniu przeciwciał (przy czym stopień tej aktywności bywa bardzo różny). Procent ten wypada uznać za wysoki zważywszy, że tylko 1% komórek śledziony używanej do fuzji wykazują taką aktywność. Według Milsteina (17) mogą tu wchodzić w grę dwa czynniki. Po pierwsze zdolność wydzielnicza wydaje się być zwiększona poprzez fakt, że limfocyty, które w normalnych warunkach syntetyzują przeciwciała lecz ich nie wydzielają, dają początek komórkom hybrydycznym, zdolnym zarówno do syntezy, jak i do wydzielania przeciwciał (przy czym jest prawdopodobne, że mechanizm wydzielniczy, którego brak niektórym plazmocytom, pochodzi od komórki szpiczaka). Po drugie w warunkach, w jakich odbywa się fuzja, jedynie limfocyty B spośród wszystkich ko-

mórek śledzony dają początek trwałym komórkom hybrydycznym.

W celu dalszego zwiększenia procentu klonów wydzielających swoiste przeciwciała przeprowadza się powtórne klonowanie (reklonowanie). Zazwyczaj po dwukrotnym klonowaniu otrzymuje się 100% klonów komórek produkujących przeciwciała, co oznacza, że właściwości genetyczne komórek hybrydycznych ustaliły się. W ten sposób otrzymuje się stałą linię komórkową zdolną do produkcji *in vitro* z góry określonych przeciwciał, w ilości rzędu 3—5 µg przeciwciała na cm³ płynu z hodowli komórkowej (19).

Obecnie istnieje możliwość znacznego uproszczenia techniki hybrydyzacji dzięki zastosowaniu urządzenia zwanego cytofluorografem lub FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter), rozpoznającego i selekcionującego komórki w danej populacji, w zależności od natężenia fluorescencji tych komórek oraz ich wielkości (13, 29). Zasada działania FACS jest następująca: zawieszoną komórek kieruje się pod ciśnieniem do dyszy o średnicy kilkudziesięciu mikronów, poddawanej drganiom o wysokiej częstotliwości (rzędu 40 000/sek). Za każdym drganiem tworzy się kropla, która spada w pole świetlne wiązki promieni laserowych. Pod ich wpływem następuje fluorescencja komórek, natężenie której odnotowuje odpowiedni czytnik. Inny czytnik mierzy stopień rozproszenia wiązki promieni, wprost proporcjonalny do wielkości danej komórki. Układ elektroniczny analizuje oba wymienione parametry, w wyniku czego elektrody nadała odpowiedni ładunek elektryczny kroplom, które odchylają się od swojej trajektorii i wpadają do właściwego odbieralnika.

W ten sposób możliwe jest rozdzielenie poszczególnych komórek hybrydycznych i rozmieszczenie ich, po jednej, w zagłębieniach mikropłytki. Przy badaniu aktywności wydzielniczej klonów możliwe jest znakowanie antygenem fluoresceina, dzięki czemu aparat wykrywa i klonuje jedynie komórki aktywne.

W przypadku degeneracji klonu (spowodowanej obumieraniem komórek, bądź utratą zdolności wydzielniczej niektórych komórek) cytofluorograf umożliwia ponowne klonowanie, w wyniku którego komórki żywe zostają oddzielone od martwych (jedne i drugie w różnym stopniu rozpraszają wiązkę promieni lasera), a klon może być nadal pasażowany. Opisano przypadek, w którym klon zawierał jedynie jedną komórkę żywą na 3200 martwych (20). Bez użycia cytofluorografu takie rozdzielenie nie byłoby możliwe.

Niektóre klony komórek hybrydycznych zachowują zdolność do wydzielania przeciwciał przez wiele lat. Mogą one być zamrażane i przechowywane w ciekłym azocie, a w miarę potrzeby rozmrażane i pasażowane *in vitro* (5, 17) (w sposób uprzednio opisany), jak również *in vitro*. Zawieszoną komórek hybrydycz-

nych z hodowli wstrzykuje się wtedy do jamy otrzewnowej myszy. Użyta do tego celu mysz powinna posiadać ten sam antygen H (antygen zdolności tkankowej), co mysz będąca dawcą śledziony do hybrydyzacji, oraz komórka szpiczaka. Dzięki temu wstrzyknięte komórki hybrydyczne mogą się namnażać. Po 2—3 tyg. w jamie otrzewnowej powstają nowotwory, składające się z komórek hybrydycznych. Najczęściej towarzyszy temu produkcja płynu otrzewnowego w ilości 0,5—3 cm³/mysz. Zarówno ten płyn, jak i surowica myszy zawierają przeciwciała monoklonalne w ilości 5—20 mg/cm³, przy czym dodatkowe podanie pełnego adiuwantu Freund'a znacznie zwiększa poziom przeciwciał.

Analiza serologiczna surowic wykazała, że aktywność takich przeciwciał jest wielokrotnie wyższa niż surowic myszy immunizowanych metodą klasyczną, np. przy immunizacji wirusem białaczki mysiej (MuLV) aktywność przeciwciał monoklonalnych jest 75—100-krotnie wyższa niż przeciwciał uzyskanych metodą klasyczną (19).

Zastosowanie

Wprowadzenie przeciwciał monoklonalnych zostało określone jako „rewolucja w immunologii” (13). Po upływie blisko ośmiu lat termin ten nie stracił na aktualności. Przeciwciała monoklonalne znalazły zastosowanie m.in. w badaniach struktury białek, technikach diagnostycznych (RIA i ELISA), immunoterapii, bakteriologii, wirusologii, parazytologii, transplantologii, w badaniach nad diagnostyką i terapią nowotworów i w wielu innych dziedzinach, pozwalając na przełamanie barier istniejących przy dotychczasowych technikach badawczych. O wszystkich zastosowaniach nie sposób tu wspomnieć, ograniczymy się więc do podania jedynie kilku przykładów.

W immunologii za pomocą przeciwciał monoklonalnych można selektywnie oczyszczać i badać mało poznane cząsteczki, jak np. interferon (13, 17, 22), gdy chodzi o otrzymanie dużych jego ilości. Zawieszoną zawierającą interferon w ilości 0,1—1% oczyszcza się na kolumnie immunoabsorpcyjnej, zawierającej przeciwciała monoklonalne skierowane przeciwko interferonowi (źródłem ich jest surowica oczyszczona myszy, której podskórnie wstrzyknięto komórki klonu wyizolowanego w następstwie immunizacji innej myszy badaną zawieszoną). Wiąże się one wybiórczo z interferonem, który jest następnie wymywany z kolumny. Jednokrotne oczyszczenie interferonu tą metodą zwiększa jego aktywność o około 5000 razy (22).

W podobny sposób, stosując chromatografię powinowactwa, można w szeregu postępujących po sobie reakcji oczyścić nieznaną mieszaninę antygenową i oznaczać ich skład (17).

W transplantologii zastosowanie przeciwciał monoklonalnych uzyskanych dla każdego poszczególnego antygeny zgodności tkankowej może w perspektywie pozwolić na opracowanie międzynarodowej standaryzacji mianowania tkanek (16, 17).

Stwarza to także nadzieje na wprowadzenie nowych metod selekcji genetycznej zwierząt opornych na pewne choroby, np. u kur zespół antygenów zgodności tkankowej — locus B wydaje się być związany z naturalną opornością m.in. na chorobę Mareka (14, 15), przy czym jedne allele tego genu warunkują silną oporność, inne zaś słabą, bądź średnią. Otrzymanie przeciwciał monoklonalnych przeciwko poszczególnym allelom umożliwiłoby przy zastosowaniu prostego testu aglutynacji (16) szybką selekcję ptaków genetycznie najbardziej przydatnych.

W parazytologii zastosowanie przeciwciał monoklonalnych pozwala na badanie struktur antygenowych poszczególnych form rozwojowych pasożytów, co stwarza nadzieje na uzyskanie skutecznych immunopreparatów przeciw pasożytniczych. Przykładem jest uzyskanie przeciwciał monoklonalnych dla wywołujących malarię u myszy sporozoitów i merozoitów *Plasmodium yoelli*; surowica myszy, na której namnażano klony podana innej myszy chroniła ją przed zakażeniem zjadliwym *P. yoelli* (4).

Stosunkowo największe zainteresowanie budzi zastosowanie przeciwciał monoklonalnych w badaniach nad diagnostyką, a szczególnie terapią nowotworów. W ostatnich latach otrzymano przeciwciała monoklonalne przeciwko antygenom związanym z komórkami niektórych nowotworów, jak np. chłoniaka limfaktycznego (18) (otrzymane przeciwciała monoklonalne reagowało z komórkami chłoniaka, nie reagowało zaś z normalnymi komórkami limfoidalnymi tego samego pacjenta), ostrej białaczki limfoblastycznej i przewlekłej białaczki myelocytarnej (21), a także chłoniaka Burkitta (23). Wykazano także, że wstrzyknięcie dużej ilości przeciwciała monoklonalnego skierowanego przeciwko komórkom raka

określony hamowało przez kilka dni wzrost tego nowotworu u myszy (6). Krótkotrwałość efektu terapeutycznego zdaje się wskazywać na fakt, że same przeciwciała monoklonalne nie są w stanie zniszczyć szczepu komórek nowotworowych (13).

Drugi kierunek badań ma na celu wiązanie przeciwciał monoklonalnych z substancjami antynowotworowymi. Opisano m.in. technikę opłaszczania liposomów przeciwciałem monoklonalnym skierowanym przeciwko określonym komórkom. Liposomy takie kierowały się wybiórczo do tych właśnie komórek (11).

Zastosowanie przeciwciał monoklonalnych znakowanych pierwiastkami promieniotwórczymi pozwala na precyzyjną diagnostykę przerzutów nowotworowych (13).

Piśmiennictwo

1. Button G., Leguern G., Phalente L., Lin E. C. C., Mcarano L., Cazenave P. A.: *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 81, 21, 1978.
2. Coffino P., Baumal R., Laskov R., Scharff M. D.: *J. Cell. Physiol.* 79, 420, 1972.
3. Couton R. G. H., Milstein C.: *Nature* 244, 42, 1973.
4. Cox F. E. G.: *Nature* 284, 304, 1980.
5. Godning J. W.: *J. Immunol. Methods* 39, 285, 1980.
6. Herlyn D. M., Steplewski Z., Herlin M. F., Koprowski H.: *Cancer Res.* 40, 717, 1980.
7. Horibata K., Harris A. W.: *Exp. Cell. Res.* 60, 61, cyt. wg (17).
8. Köhler G., Milstein C.: *Nature* 256, 495, 1975.
9. Kearney J. F., Radbruch A., Liesegang B., Rajewski K.: *J. Immunol.* 123, 1548, 1979.
10. Lenhardt W. J., Andersson J., Couthino A., Melchers F.: *Exp. Cell. Res.* 111, 309, 1978 cyt. wg (5).
11. Leserman L. D., Barbet J., Kourilsky F., Weinstein J. N.: *Nature* 288, 602, 1980.
12. Levy R., Dilley J., Lampson L. A.: *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 81, 164, 1978.
13. Lipinski M., Herzenberg L.: *Recherche* 12, 925, 1981.
14. Longnecker B. M., Pazderka F., Gavora J. S., Spencer J. L., Ruth R. F.: *Immunogenetics* 3, 401, 1976.
15. Longnecker B. M., Pazderka F., Gavora J. S., Spencer J. L., Witter R. L., Ruth R. F.: *Adv. exp. Med. Biol.* 88, 287, 1977 cyt. wg (16).
16. Longnecker B. M., Mosmann T. R., Shiozawa C.: *Immunogenetics* 9, 137, 1979.
17. Milstein C.: *Sci. Am.* 242, 56, 1980.
18. Nadler L. M., Stashenko P., Hardy R., Schlossman S. F.: *J. Immunol.* 125, 570, 1980.
19. Nowinski R. C., Lostrom M. E., Tam M. R., Stone M. R., Burnette W. N.: *Virology* 93, 111, 1979.
20. Parks D. R., Bryan V. M. O. V. T., Herzenberg L. A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 1962, 1979, cyt. wg (13).
21. Ritz J., Pesando J. M., Notis, Mc Conarty J., Lazarus H., Schlossman S. F.: *Nature* 283, 583, 1980.
22. Secher D. S., Burke D. C.: *Nature* 285, 446, 1980.
23. Wiels J., Fellous M., Turz T.: *Doniesienie na IV Międzynar. Kongr. Immunol., Paryż 1980, cyt. wg (13).*

Adres autora: Hanna Czekał, ul. XX-Lecia PRL 6/5, 24-100 Puławy.

HODGES R. T., FRASER A. J.: Obserwacje nad stężeniem miedzi w wątrobie świń w północnej części Nowej Zelandii. (Some observations on the liver copper status of pigs in the northern part of New Zealand). *New. Z. Vet. J.* 31, 96—100, 1983 (6).

Badania przeprowadzono na 347 świń (203 od urodzenia do 5 lat — przypadki laboratoryjne, 144 w wieku 20—30 tygodni — przypadki rzeźniane). U 6,9% świń z przypadków laboratoryjnych i u 9,0% z przypadków rzeźnianych stężenie miedzi w wątrobie nie przekraczało 12 mg/kg suchej masy. Tak niski poziom miedzi w wątrobie wskazuje na niedobór tego pierwiastka w organizmie świń. Poziom miedzi poniżej 20 mg/kg suchej masy wątroby stwierdzono u 21,6% świń z przypadków laboratoryjnych i u 31,6% świń z przypadków rzeźnianych.

G.

ELLINGHAUSEN JR. H. C.: Wzrost, właściwości hodowlane i wrażliwość na leki przeciwbakteryjne *Leptospira interrogans* serovar. hardjo. (Growth, cultural characteristics, and antibacterial sensitivity of *Leptospira interrogans* serovar. hardjo). *Cornell Vet.* 73, 225—239, 1983 (3).

Leptospira interrogans serovar. hardjo dobrze rośnie na podłożach wzbogaconych 1% albuminy surowicy bydłowej, Tween 80 lub Tween 40. Witamina B12 wzmacnia wzrost *L. hardjo*. Ponadto szczepy tego zarazka izolowane od chomików wymagają do wzrostu oprócz witaminy B12 także witaminy B1. Badane szczepy były najbardziej wrażliwe na tetracykliny (1,0 ug/ml podłoża).

G.