

Российская академия медицинских наук
Сибирское отделение
ГУ Научно-исследовательский институт клинической иммунологии

**ИММУНОЛОГИЯ,
ИММУНОГЕНЕТИКА,
ИММУНОПАТОЛОГИЯ**

*Материалы 6-й отчетной конференции
ГУ НИИКИ СО РАМН*

Под редакцией:

Замдиректора ГУ НИИКИ СО РАМН по научной работе
члена-корреспондента РАМН, профессора В. И. Коненкова

*Scientific report 2003
Institute of Clinical Immunology
Siberian Branch of Russian Academy of Medical Sciences*

Новосибирск
2003

**ВЛИЯНИЕ АКТИВНОСТИ НАД(Ф)Н-ОКСИДАЗЫ
НА УРОВЕНЬ МИТОГЕН-СТИМУЛИРОВАННОЙ
ПРОЛИФЕРАЦИИ СПЛЕНОЦИТОВ МЫШИ:
ИНГИБИТОРНЫЙ АНАЛИЗ**

Перминова О. М., Вольский Н. Н.

Как известно, митогенная и антигенная стимуляция лимфоцитов сопровождается увеличением продукции супероксидного радикала

(O_2^-). Показано, что O_2^- необходим для инициации пролиферации клеток, и его удаление ингибирует реакцию лимфоцитов на пролиферативные стимулы. Одним из основных путей генерации O_2^- в клетках иммунной системы является восстановление кислорода НАД(Ф)Н-оксидазой – многокомпонентным ферментным комплексом, расположенным в плазматической мембране клеток.

Целью настоящей работы было выявление роли изменений активности НАДФН-оксидазы в регуляции величины пролиферативного ответа спленоцитов мышей (CBA×C57Bl)F₁ при их стимуляции митогеном (Кон А).

Обнаружено, что удаление O_2^- из среды инкубации с помощью $Cu(Lys)_2$ – медьсодержащего комплекса, обладающего супероксиддисмутазной активностью, – приводит к дозозависимому подавлению интенсивности пролиферации спленоцитов в ответ на оптимальную дозу Кон А. Ингибирование пролиферации на 50% достигалось при концентрации $Cu(Lys)_2$, равной 150 μ M. Это подтверждает участие O_2^- в запуске пролиферации, но не позволяет решить вопрос о том, какая ферментная система является основным источником O_2^- в этой экспериментальной ситуации.

Для выяснения этого вопроса мы использовали стандартный ингибитор НАДФН-оксидазы – дифенилениодоний (DPI). Установлено, что в концентрациях от 0,15 μ M до 1 μ M DPI дозозависимо ингибирует Кон А-стимулированную пролиферацию лимфоцитов. При этом DPI в концентрации 0,5 μ M практически полностью подавляет пролиферацию, вызванную добавлением Кон А. Этот результат доказывает определяющую роль активности НАД(Ф)Н-оксидазы в продукции O_2^- во время пролиферативного ответа клеток на митоген.

Однако, другие полученные нами результаты показывают, что участие НАД(Ф)Н-оксидазы в регуляции интенсивности пролиферации не столь однозначно: в малых концентрациях (от 0,015 μ M до 0,125 μ M) DPI на 20-40% увеличивает пролиферативный ответ спленоцитов на Кон А. Особенно заметным этот эффект становится при использовании субоптимальных концентраций Кон А, так что в присутствии 0,125 μ M DPI пик оптимального ответа на Кон А смещается в сторону меньших концентраций митогена (с 1,5-2 мкг/мл до 1 мкг/мл). Такая двухфазная зависимость интенсивности пролиферации от степени активности НАД(Ф)Н-оксидазы позволяет предположить, что роль этого фермента не ограничивается только продукцией O_2^- в количествах, необходимых для запуска пролиферативной реакции, но он также может сдерживать развитие этого процесса при чрезмерной генерации O_2^- .

INFLUENCE OF NAD(P)H OXIDASE ACTIVITY ON THE LEVEL OF THE MITOGEN-STIMULATED MURINE SPLEEN CELL PROLIFERATION: INHIBITORY ANALYSIS

Perminova O. M., Volsky N. N.

It is known, that mitogenic and antigenic stimulation of lymphocytes is associated with increased production of superoxide radical (O_2^-). It has been shown, that superoxide is required to initiation of cell proliferation and superoxide elimination leads to inhibition of lymphocyte proliferative reaction. One of the principal superoxide generation pathways in cells of immune system is reduction of molecular oxygen by NAD(P)H oxidase, multicomponent enzyme complex located in the plasma membrane.

The aim of the present study was to estimate the role of NAD(P)H oxidase activity changes in regulation of the mitogen-stimulated murine splenocyte proliferation.

It has been found that superoxide elimination from incubation medium by $Cu(Lys)_2$ (copper helate with superoxide dismutase activity) leads to inhibition of Con A-stimulated spleen cell proliferation in dose-dependent manner. Addition of $Cu(Lys)_2$ (150 μM) to spleen cell incubation medium results in the inhibition of cell proliferation by 50%. This confirms superoxide participation in proliferative response initiation but does not permit to decide the question, what kind of enzyme systems is a principal origin of oxygen radical in this experimental situation.

To solve this question we have used standard NAD(P)H oxidase inhibitor diphenylene iodonium (DPI). It has been shown that DPI (from 0,15 μM to 1 μM) suppresses Con A-stimulated lymphocyte proliferation in dose-dependent manner. At concentration 0,5 μM DPI inhibits mitogen-stimulated cell proliferation practically completely. This result evidences the decisive role of NAD(P)H oxidase activity in superoxide production during cell proliferative response upon mitogen.

However, our other results indicate that NAD(P)H oxidase participation in proliferative activity regulation is not so unequivocal. Low concentration of DPI (from 0,015 μM to 0,125 μM) increases Con A-stimulated spleen cell proliferative response by 20-40%. Particularly this effect is marked at suboptimal mitogen concentrations. In the presence of 0,125 μM DPI the proliferative response peak is switched to side of lesser mitogen concentrations (from 1,5-2 $\mu g/ml$ to 1 $\mu g/ml$). This two-phasic dependence of the cell

proliferation intensity from NAD(P)H oxidase activity permits to suppose that the role of this enzyme is not limited only by superoxide production in quantities required for initiation of proliferative reaction but the enzyme can restrain development of this process at the excessive superoxide generation too.