

КЛЕТОЧНАЯ ИММУНОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2005

УДК 612.112.94.015.1.08

О. М. Перминова, В. В. Сенюков, Н. Н. Вольский, В. А. Козлов

**РОЛЬ НАД(Ф)Н-ОКСИДАЗЫ В РЕГУЛЯЦИИ УРОВНЯ
ПРОЛИФЕРАТИВНОГО ОТВЕТА ЛИМФОЦИТОВ НА МИТОГЕН**

ГУ НИИ клинической иммунологии СО РАМН, Новосибирск

Выявлена роль изменений активности НАД(Ф)Н-оксидазы в регуляции величины пролиферативного ответа лимфоцитов на их стимуляцию митогеном. Установлено, что стандартный ингибитор НАД(Ф)Н-оксидазы дифенилениодоний дозозависимо (в концентрациях от 150 до 500 нМ) ингибирует стимулированную конканавалином А пролиферацию лимфоцитов (при концентрации 500 нМ дифенилениодоний практически полностью подавляет пролиферацию). Полученный результат доказывает определяющую роль активности НАД(Ф)Н-оксидазы в продукции O_2^- во время пролиферативного ответа клеток на митоген. Выявлено также, что при добавлении дифенилениодония в очень малых концентрациях (от 15 до 125 нМ) уровень пролиферативного ответа спленоцитов на конканавалин А повышается на 30—50%. Сделано предположение, что такое неоднозначное участие НАД(Ф)Н-оксидазы в регуляции интенсивности пролиферации может определяться соотношением в клетках разных типов активированных кислородных метаболитов, главным образом соотношением O_2^-/H_2O_2 .

The role of NAD(P)H oxidase activity changes in the level regulation of mitogen-stimulated lymphocyte proliferation has been revealed. It has been shown that Diphenylene iodonium being the standard inhibitor of NAD(P)H oxidase inhibits ConA-stimulated lymphocyte proliferation in dose-dependent manner under concentration from 150 to 500 nM. Diphenylene iodonium suppresses mitogen-stimulated cell proliferation practically completely at concentration 500 nM. This result has proved the decisive role of

NAD(P)H oxidase activity in O_2^- production during cell proliferative response to mitogen. It has also been found that Diphenylene iodonium low concentration from 15 to 125 nM increases the level of splenocyte proliferative response to ConA by 30-50%. It has been supposed that such an equivocal NAD(P)H oxidase participation in proliferative activity regulation may be defined by correlation of the different activated oxygen metabolite types in cells mainly by O_2^-/H_2O_2 ratio.

Широкий спектр биологических эффектов активированных кислородных метаболитов объясняет возрастающий интерес к их влиянию на функциональную активность клетки [2, 3, 5, 8].

Как известно, митогенная стимуляция лимфоцитов сопровождается увеличением продукции супероксидного радикала O_2^- [10, 11]. Показано, что O_2^- необходим для инициации пролиферации клеток и его удаление ингибирует реакцию лимфоцитов на пролиферативные стимулы [1, 5, 12]. Хорошо известно также, что одним из основных источников ферментативного образования активированных кислородных метаболитов в клетках является НАД(Ф)Н-оксидаза [3, 7]. Этот многокомпонентный ферментативный комплекс, локализованный в плазматической мембране, катализирует одноэлектронное восстановление молекулярного кислорода до O_2^- , который в водной среде дисмутирует с образованием перекиси водорода (H_2O_2) [6, 9].

Целью настоящей работы было выявление роли изменений активности НАД(Ф)Н-оксидазы в регуляции величины пролиферативного ответа клеток селезенки мышей на их стимуляцию митогеном.

Материалы и методы. Эксперименты выполнены на клетках селезенки мышей-самцов гибридов F_1 (СВАхС57ВL) в возрасте 3—4 мес, полученных из вивария СО РАМН. Содержание животных до и в период проведения экспериментов осуществляли в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (Страсбург, 1986).

Для оценки интенсивности клеточной пролиферации использовали функциональный ответ лимфоцитов на митоген в культуре *in vitro*. Клетки культивировали в течение 72 ч в увлажненной атмосфере, содержащей 5% CO_2 , при 37°C в пластиковых 96-луночных круглодонных планшетах "Linbro" (3 · 10⁵ клеток на лунку) в среде RPMI 1640, содержащей эмбриональную телячью сыворотку (5%), HEPES (15 мМ), L-глутамин (2 мМ), гентамицин (80 мкг/мл).

В качестве стимулятора пролиферации использовали конканавалин А — КонА ("Calbiochem") в конечных концентрациях от 0,5 до 3 мкг/мл.

С целью блокирования генерации O_2^- , необходимого для инициации пролиферации клеток, в опытные культуры одновременно с митогеном добавляли стандартный ингибитор НАД(Ф)Н-оксидазы дифенилениодониум ("Sigma") в концентрациях от 15 до 500 нМ.

Для удаления из среды инкубации O_2^- путем его дисмутации в H_2O_2 в часть лунок одновременно с митогеном добавляли $Cu(Lys)_2$ — медьсодержащий комплекс, обладающий супероксиддисмутазной активностью, в конечной концентрации 150 мкМ. Комплекс двухвалентной меди с аминокислотой лизином получали по методу [13].

Интенсивность пролиферации клеток оценивали по включению ³H-тимидина, добавленного в культуры в концентрации 0,24 мБк/мл за 18 ч до окончания эксперимента. Для этого клетки переносили на стекловолокнистые фильтры ("Flow Laboratory") и подсчитывали радиоактивность проб на жидкостно-сцинтилляционном счетчике. Результаты выражали в условных единицах (количество импульсов в 1 мин) или в процентах от исходного уровня пролиферации в контрольных культурах (без добавления ингибиторов).

Внутриклеточную продукцию H_2O_2 оценивали с помощью проточной цитометрии по методу [4], используя 2'7'-дихлорфлуоресцина диацетат, окисляющийся под действием H_2O_2 до высокофлуоресцирующего продукта. Лимфоциты были преинкубированы в течение 15 мин в термостате при 37°C в пластиковых 24-луночных планшетах "Linbro" в растворе Хенкса

(10⁶ клеток в 1 мл) с 5 мкМ 2'7'-дихлорфлуоресцина диацетата ("Sigma"). Для стимуляции продукции перекиси в часть лунок добавляли 150 мкМ $Cu(Lys)_2$. Далее проводили первый замер флуоресценции, соответствующий t_0 . Дальнейшие замеры повторяли каждые 10 мин в течение 40 мин. Скорость внутриклеточного образования H_2O_2 оценивали по скорости нарастания флуоресценции; изменение скорости образования H_2O_2 при добавлении $Cu(Lys)_2$ в среду инкубации выражали в процентах от соответствующего контроля.

Результаты и обсуждение. Предварительно нами было показано, что внесение в культуру спленоцитов хелата двухвалентной меди с лизином приводит к подавлению интенсивности пролиферативного ответа клеток на оптимальную дозу КонА. Ингибирование пролиферации на 50% достигалось при концентрации хелата меди, равной 150 мкМ. Поскольку специфической активностью хелатного комплекса является дисмутация O_2^- с образованием H_2O_2 и молекулярного кислорода и удаление, таким образом, O_2^- из среды инкубации, этот результат свидетельствует о том, что подавление пролиферативного ответа лимфоцитов на митоген обусловлено снижением концентрации O_2^- в клеточной культуре. Действительно, нами было обнаружено, что добавление 150 мкМ $Cu(Lys)_2$ в культуру лимфоцитов приводит к двукратному увеличению внутриклеточной продукции H_2O_2 (рис. 1). Это подтверждает участие O_2^- в запуске пролиферации, но не позволяет решить вопрос о том, какая ферментная система является основным источником O_2^- в данной экспериментальной ситуации.

Для выяснения этого вопроса мы использовали стандартный ингибитор НАД(Ф)Н-оксидазы дифенилениодониум. Результаты этих экспериментов представлены на рис. 2. Установлено, что концентрации от 150 до 500 нМ дозозависимо ингибируют КонА-стимулированную пролиферацию лимфоцитов. При этом дифенилениодониум в концентрации 500 нМ практически полностью подавляет

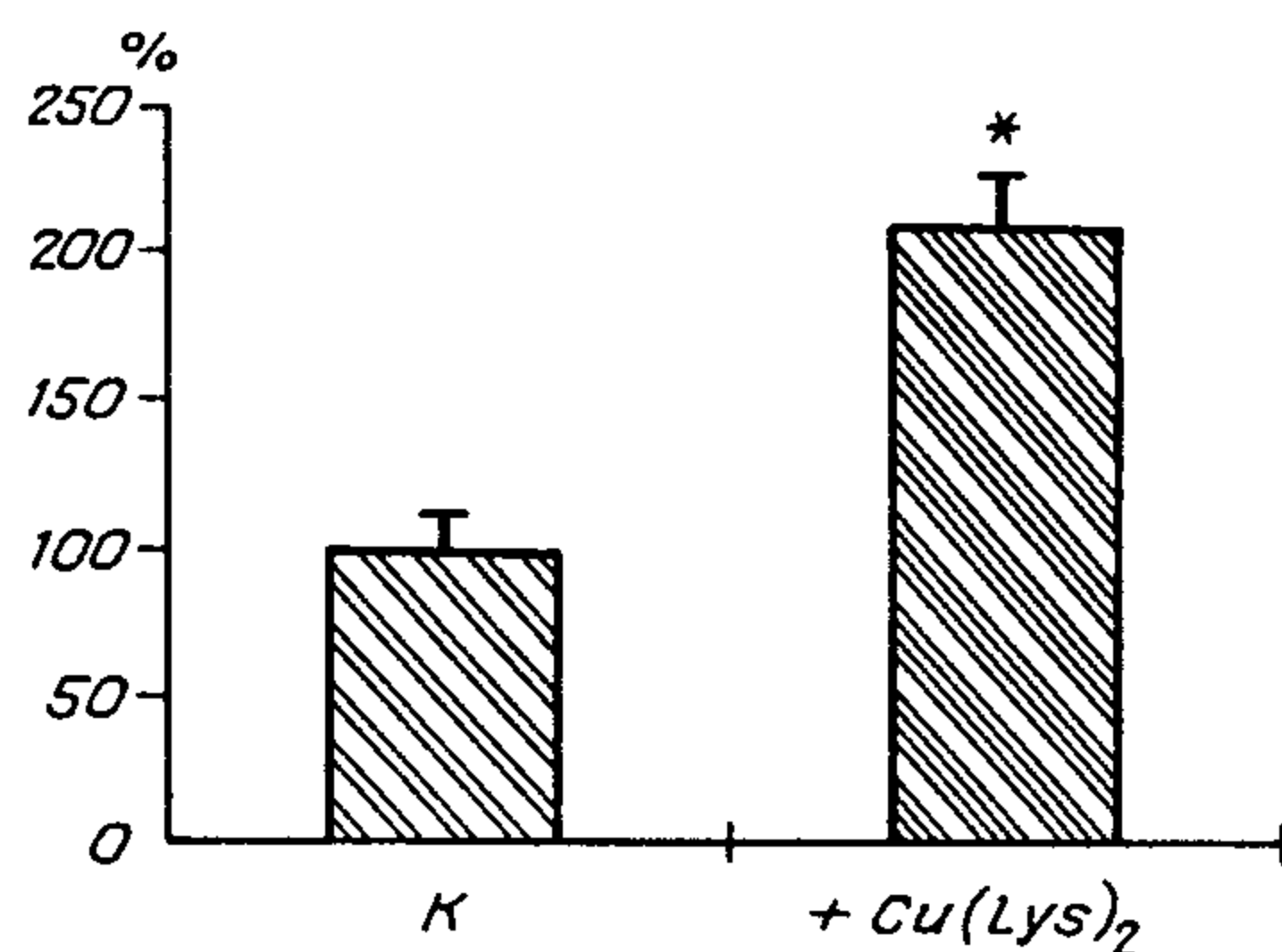


Рис. 1. Влияние хелата двухвалентной меди с супероксиддисмутазной активностью на скорость образования H_2O_2 в лимфоцитах мыши.

По оси ординат — скорость окисления DCFH (в % от контроля). К — контроль; + $Cu(Lys)_2$ — в присутствии 150 мкМ $Cu(Lys)_2$. Здесь и на рис. 2 звездочка — достоверное отличие от контроля ($p < 0,001$).

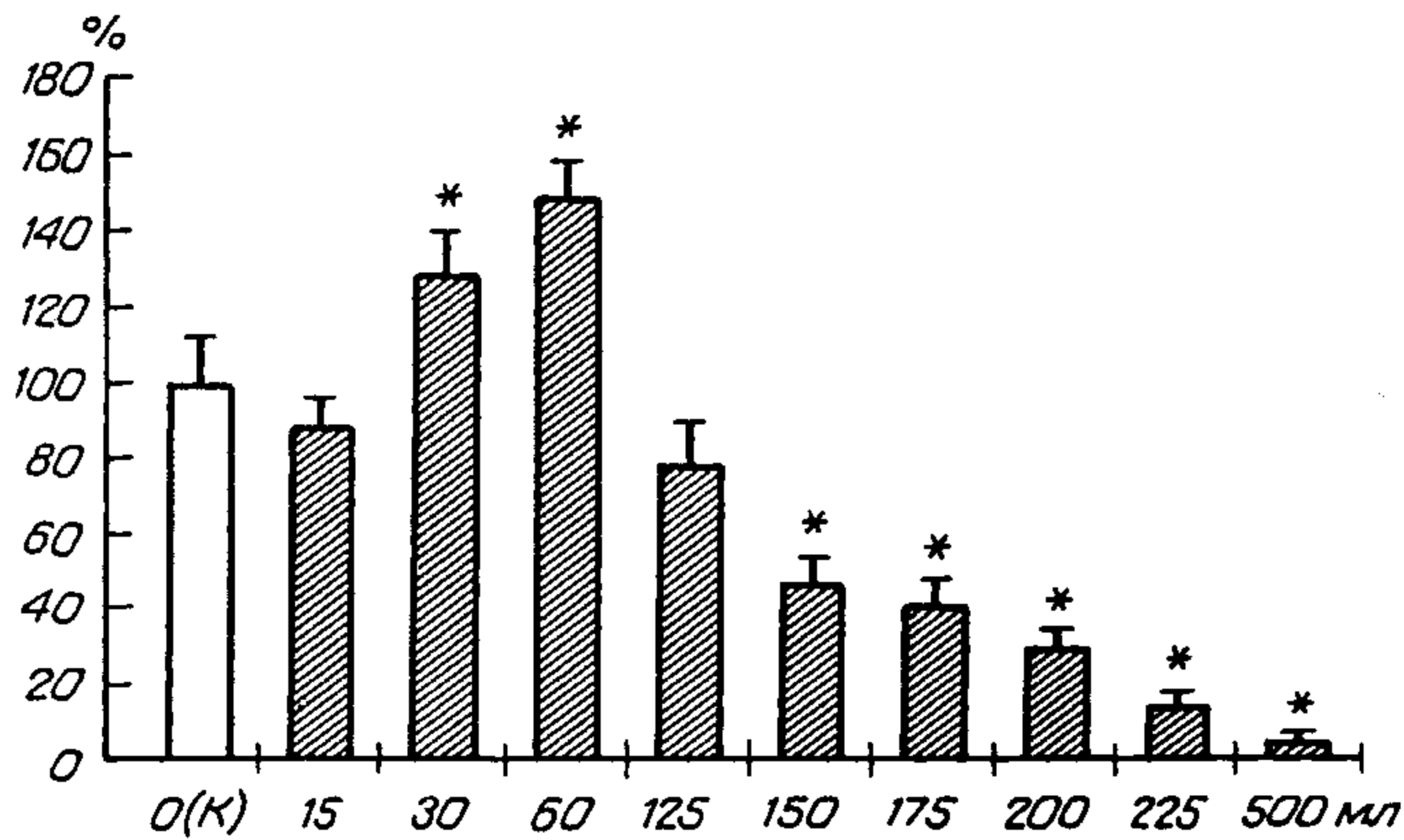


Рис. 2. Влияние различных концентраций дифенилениодония (DPI) на уровень Кона-стимулированной пролиферации спленоцитов мыши.

По оси абсцисс — концентрация DPI (в нМ), по оси ординат — уровень пролиферации (в % от контроля). К — контроль.

пролиферацию клеток, вызванную добавлением оптимальной дозы Кона. Поскольку инактивация фермента дифенилениодонием происходит через редукцию флавина НАД(Ф)Н-оксидазы с его последующей ковалентной модификацией и блокадой тем самым переноса электронов от внутриклеточного НАД(Ф)Н к молекулярному кислороду [14], 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 свидетельствуют о том, что участие НАД(Ф)Н-оксидазы в регуляции интенсивности пролиферации не столь однозначно. На рис. 2 видно, что при добавлении в культуру дифенилениодония в очень малых концентрациях (от 15 до 125 нМ) уровень пролиферативного ответа спленоцитов на Кона повышается на 30—50%. Особенно заметным этот эффект становится при использовании субоптимальных концентраций Кона (рис. 3): в присутствии 125 нМ дифенилениодония пик оптимального ответа на Кона смещается в сторону меньших концентраций митогена (с 1,5—2 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 программы клеточной пролиферации; он также может сдерживать развитие пролиферативной реакции при чрезмерной генерации O_2^- , что в значительной степени обусловлено действием H_2O_2 , которая образуется в результате дисмутации супероксидных радикалов.

Все эти данные позволяют сделать вывод о том, что вещества, обычно причисляемые к одному классу антиоксидантов (в который обычно включают и ферменты, метаболизирующие активные формы кислорода, и ингибиторы НАД(Ф)Н-оксидазы, такие

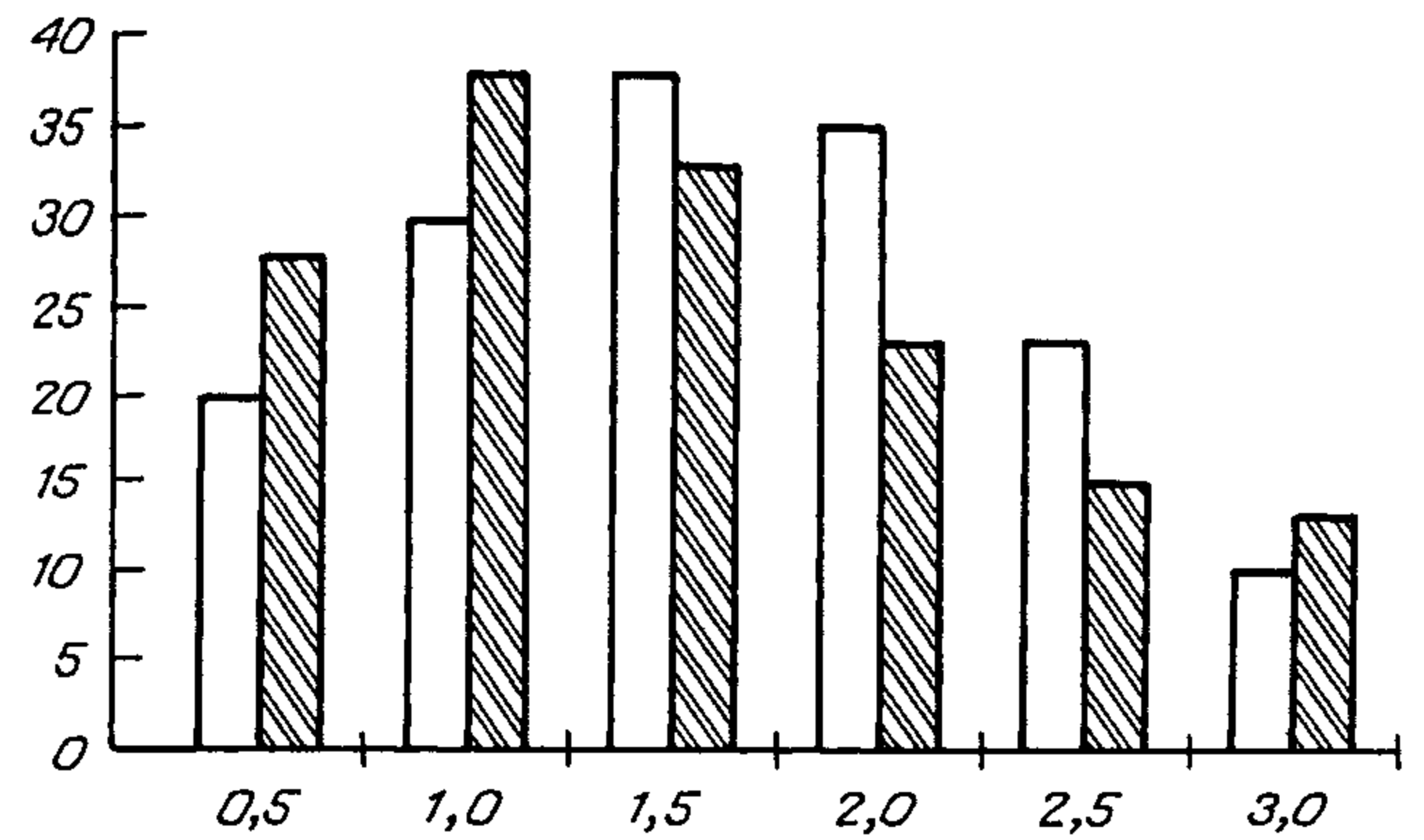


Рис. 3. Влияние дифенилениодония (DPI) на пик оптимального пролиферативного ответа спленоцитов мыши на митоген (Кона).

По оси абсцисс — концентрация Кона (в мкг/мл), по оси ординат — уровень пролиферации (в имп/мин · 10³). Светлые столбцы — в присутствии 125 нМ DPI в среде инкубации; заштрихованные столбцы — без DPI в инкубационной среде.

как супероксиддисмутаза и дифенилениодонием), способны существенно изменять функциональную активность клеток иммунной системы, в том числе реакцию лимфоцитов на пролиферативные стимулы. При этом конечный эффект таких рассматриваемых как антиоксиданты веществ может быть полярно противоположным и в различных ситуациях приводить как к стимуляции, так и к подавлению изучаемых клеточных функций. В значительной степени это может объясняться их влиянием на соотношение в клетках разных типов активированных кислородных метаболитов, главным образом на соотношение O_2^-/H_2O_2 .

ЛИТЕРАТУРА

1. Вольский Н. Н., Кашлакова Н. В., Козлов В. А. // Цитология. — 1988. — Т. 30, № 7. — С. 898—902.
2. Гамалей И. А., Клюбин И. В. // Цитология. — 1996. — Т. 38, № 12. — С. 1233—1247.
3. Зенков Н. К., Ланкин В. З., Меньщикова Е. Б. Окислительный стресс: Биохимический и патофизиологический аспекты. — М., 2001.
4. Bass D. A., Parce J. W., Dechatelet L. R. et al. // J. Immunol. — 1983. — Vol. 130, N 4. — P. 1910—1917.
5. Cadenas E. // Mol. Aspects Med. — 2004. — Vol. 25, N 1—2. — P. 17—26.
6. Chanock S. J., El Benna J., Smith R. M. et al. // J. Biol. Chem. — 1994. — Vol. 269, N 40. — P. 24519—24522.
7. Cross A. R., Jones O. T. G. // Biochim. Biophys. Acta. — 1991. — Vol. 1057, N 3. — P. 281—298.
8. Lander H. M., Milbank A. J., Tauras J. M. et al. // Nature. — 1996. — Vol. 381, N 6581. — P. 380—381.
9. Nauseef W. M. // Proc. Assoc. Am. Physicians. — 1999. — Vol. 111, N 5. — P. 373—382.
10. Ozaki Y., Iwata J., Ohashi T. // Blood. — 1984. — Vol. 64, N 14. — P. 1094—1102.
11. Romeo D., Zabucchi G., Rossi F. // Nature. New Biol. — 1973. — Vol. 243, N 3290. — P. 111—112.
12. Sauer H., Wartenberg M., Hescheler J. // Cell Physiol. Biochem. — 2001. — Vol. 11, N 1. — P. 173—186.
13. Steuev C. M., Bush J. A. // J. Biol. Chem. — 1950. — Vol. 183, N 1. — P. 139—147.
14. Tew D. G. // Biochemistry. — 1993. — Vol. 32, N 38. — P. 10209—10215.