

## ВЛИЯНИЕ СУПЕРОКСИДНОГО РАДИКАЛА НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ ЛИМФОЦИТОВ, СТИМУЛИРОВАННУЮ МИТОГЕНОМ

*Н. Н. Вольский, Н. В. Каилакова, В. А. Козлов*

*Институт клинической иммунологии СО АМН СССР, Новосибирск*

Изучено влияние супероксиддисмутазы и хелата двухвалентной меди, обладающего супероксиддисмутазной активностью, на интенсивность стимулированной конканавалином А пролиферации лимфоцитов из периферической крови человека и спленоцитов мыши. Обнаружено, что удаление супероксидного радикала из среды культивации на 40—60 % ингибирует пролиферативный ответ лимфоцитов при стимуляции митогеном. Исследована дозовая зависимость уровня ингибирования от концентрации ингибиторов в культуре клеток. Обсуждается возможное участие выделяемых макрофагами активных форм кислорода в регуляции величины пролиферативного ответа лимфоидных клеток.

В последние годы обнаружено, что многие вещества, обладающие митогенным эффектом в культуре лимфоцитов, такие как конканавалин А (Romeo et al., 1973), липополисахарид (Guthrie et al., 1984), эфиры форбола (Taniguchi, Takanaka, 1984), митоген из зародыша пшеницы (Ozaki et al., 1984), стимулируют продукцию супероксидного радикала ( $O_2^-$ ) в клетках-фагоцитах. Кроме того, хорошо известно, что митогены не вызывают пролиферации лимфоцитов в отсутствие в культуре клеток определенного количества макрофагов (Satoh et al., 1980; Resch et al., 1981).

Исходя из этих данных, мы предположили, что одновременное наличие у вышеперечисленных веществ митогенных свойств и способности вызывать продукцию  $O_2^-$  неслучайно и что выделение  $O_2^-$  стимулированными макрофагами служит необходимым условием пролиферации лимфоцитов, стимулированной митогенами. Для проверки этого предположения мы измерили уровень стимулированной конканавалином А (Кон-А) пролиферации мононуклеарных клеток из периферической крови человека и клеток селезенки мыши в присутствии фермента супероксиддисмутазы (СОД), который специфически ингибирует реакции, протекающие с участием  $O_2^-$ .

**Материал и методика.** В опытах использовали СОД из эритроцитов быка (Институт биохимии АН АрмССР, Ереван) с уд. акт. 30 000 ЕД на 1 мг белка, определенной по методу Нишикими и соавторов (Nishikimi et al., 1972), Кон-А (Farmacia, Швеция), культуральную среду RPMI 1640 (Flow Laboratory, США). Комплекс двухвалентной меди с лизинном  $Cu(Lys)_2$ , обладающий СОД-активностью, синтезировали по методу Стивенса и Буша

(Stevens, Bush, 1950). Полученный  $\text{Cu}(\text{Lys})_2$  очищали перекристаллизацией из водного раствора.

Мононуклеарные клетки из периферической крови здоровых доноров выделяли центрифугированием в градиенте плотности фиколла—верографина (плотность 1.078). Клетки культивировали 72 ч в среде 199 с добавлением антибиотиков в присутствии Кон-А (10 мкг/мл). Интенсивность пролиферации клеток измеряли в контрольных культурах (без добавления СОД), в культурах, в которые перед добавлением Кон-А вносили СОД в дозе 100 мкг/мл, и в культурах, в которые вносили такое же количество СОД, инактивированной нагреванием при 100 °С в течение 40 мин. Во всех вариантах опытов использовали по 3 идентичных культуры и результаты выражали в виде средних значений для каждого донора.

Т а б л и ц а 1

Влияние СОД на стимулированную Кон-А пролиферацию мононуклеарных клеток из периферической крови человека

Донор	Включение $^3\text{H}$ -тимидина в разных вариантах опытов, имп/мин на $10^5$ клеток, $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$		
	в контроле (без СОД)	при добавлении инактивированной СОД	при добавлении активной СОД
1	3722 ± 1997	3052 ± 114 (82) <sup>а</sup>	2539 ± 398 (68)
2	4072 ± 1315	5064 ± 1148 (124)	1761 ± 476 (43)
3	4122 ± 700	5544 ± 749 (145)	1865 ± 227 (45)
4	2087 ± 721	2960 ± 732 (142)	977 ± 106 (47)
5	1888 ± 214	1627 ± 151 (86)	847 ± 162 (45)
6	6580 ± 620	4162 ± 790 (63)	2211 ± 1132 (34)
7	7708 ± 2653	7956 ± 232 (103)	431 ± 141 (6)
8	5588 ± 600	4557 ± 355 (82)	4973 ± 575 (89)
9	5423 ± 553	6090 ± 285 (112)	4933 ± 340 (91)
10	4191 ± 212	4619 ± 561 (110)	2906 ± 231 (69)
11	2383 ± 167	2445 ± 288 (103)	1428 ± 203 (60)
12	1067 ± 55	1196 ± 111 (122)	853 ± 124 (80)
13	3264 ± 187	3007 ± 246 (92)	2061 ± 61 (63)
Среднее	4007 ± 538	4021 ± 526 (104)	2137 ± 400 (57) <sup>б</sup>

<sup>а</sup> В скобках — в процентах от значения в контроле. отличается от значения в контроле ( $P < 0.001$ ).

<sup>б</sup> Достоверно

Клетки селезенки мышей-самцов линии С57В1 (питомник АМН СССР «Столбовая») культивировали в течение 72 ч в среде RPMI 1640, содержащей НЕРЕС (20 мМ, рН 7.4), L-глутамин (2 мМ), гентамицин (50 мкг/мл) и телячью эмбриональную сыворотку (10 %). Клетки стимулировали Кон-А в концентрации 10 мкг/мл. В опытные культуры добавляли СОД или  $\text{Cu}(\text{Lys})_2$  в различных концентрациях. Результаты выражали в процентах от исходного уровня пролиферации в контрольных (без добавления ингибиторов) культурах.

Интенсивность пролиферации клеток оценивали по включению  $^3\text{H}$ -тимидина, добавленного в культуры в концентрации 0.24 МБк/мл за 18 ч до окончания опыта. Для этого клетки переносили на стекловолокнистые фильтры (Flow Laboratory, США) и подсчитывали радиоактивность проб на жидкостно-сцинтилляционном счетчике SI-30 (Interteknik, Франция). Жизнеспособность клеток через 72 ч культивирования определяли, используя краситель трипановый синий.

Достоверность различий средних значений оценивали с помощью  $t$ -критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Полученные нами результаты показывают, что пролиферация мононуклеарных клеток из периферической крови человека, стимулированная добавлением Кон-А, существенно ингибируется при внесении в культуру клеток СОД в дозе 100 мкг/мл (табл. 1). Пролиферация ингибировалась в среднем на 43 %, но степень

ингибирования в культурах клеток от разных доноров была весьма различной. В то же время в культурах, в которые было добавлено такое же количество СОД, инактивированной нагреванием, ингибирования пролиферации не обнаружено. Поскольку специфической активностью СОД являются дисмутация  $O_2^-$  с образованием  $H_2O_2$  и молекулярного кислорода и удаление, таким образом,  $O_2^-$  из среды инкубации, эти данные говорят о том, что снижение концентрации  $O_2^-$  в культуре клеток приводит к уменьшению пролиферации лимфоцитов.

Т а б л и ц а 2  
Влияние СОД на стимулированную Кон-А пролиферацию спленоцитов мыши

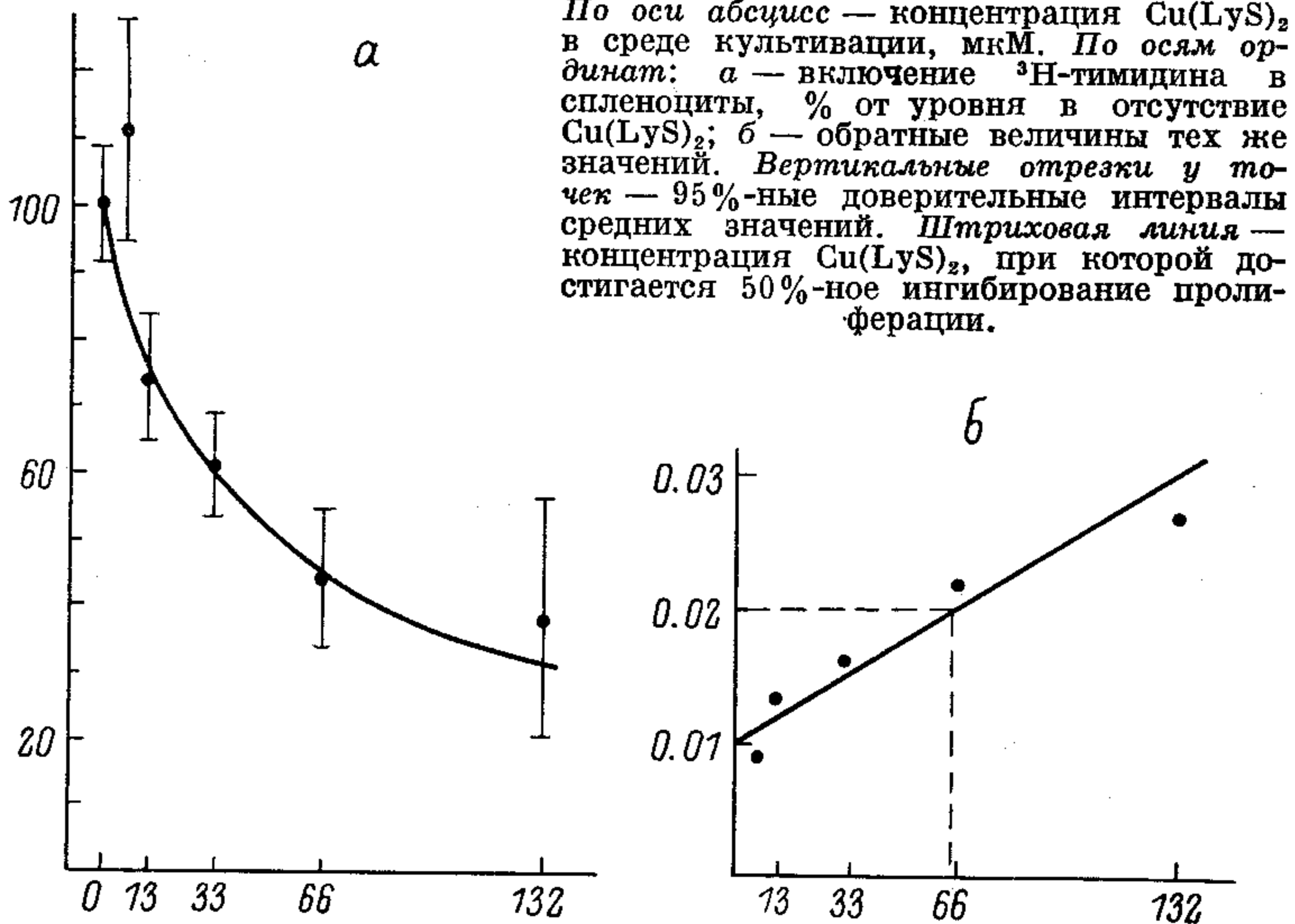
Концентрация СОД в культуре, мкг/мл	Число культур	Включение $^3H$ -тимидина в спленоциты, % от контроля, $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$
0	8	100 $\pm$ 3
0.75	4	94 $\pm$ 5
3.8	4	96 $\pm$ 1
15	7	78 $\pm$ 3 а
60	8	78 $\pm$ 3 а
300	4	81 $\pm$ 7 б
1500	8	40 $\pm$ 4 а

а, б Достоверно ниже включения  $^3H$ -тимидина в контроле (<sup>а</sup>  $P < 0.001$ , <sup>б</sup>  $P < 0.05$ ).

зательства участия  $O_2^-$  в биохимических и физиологических процессах (Joester et al., 1972; Richter et al., 1976). При добавлении  $Cu(Lys)_2$  в различных концентрациях в культуры спленоцитов, пролиферирующих под действием Кон-А, мы обнаружили,

Сходные результаты были получены и при добавлении СОД в стимулированные Кон-А культуры спленоцитов мыши. Данные табл. 2 показывают, что СОД в концентрациях 15 и 1500 мкг/мл ингибирует пролиферацию мышинных лимфоцитов на 22 и 60 % соответственно.

Подтверждением того, что эффект СОД в этой системе связан с удалением  $O_2^-$  из среды инкубации, являются и результаты опытов с  $Cu(Lys)_2$ . Известно, что хелаты двухвалентной меди с аминокислотами (в том числе и с лизином) обладают СОД-активностью и могут использоваться для доказательства



Влияние различных концентраций  $Cu(Lys)_2$  на уровень стимулированной Кон-А пролиферации спленоцитов мыши.

что этот хелат меди также ингибирует пролиферацию клеток. Степень ингибирования увеличивалась с возрастанием концентрации  $Cu(Lys)_2$  (см. рисунок, а). На графике, построенном по методу Тилера (Tyler, 1975), зависимость между уровнем пролиферации лимфоцитов и концентрацией  $Cu(Lys)_2$  выражалась прямой линией (см. рисунок, б), что позволило вычислить концентрацию ингибитора, при которой достигается 50 %-ное ингибирование пролиферации. В наших экспериментальных условиях эта величина была равна приблизительно 65 мкМ.

Исследование жизнеспособности клеток через 72 ч культивирования показало, что ни СОД, ни  $\text{Cu}(\text{Lys})_2$  не снижают жизнеспособности находящихся в культуре клеток по сравнению с контролем. Это означает, что исследованные вещества не оказывают прямого токсического действия на пролиферирующие клетки.

Экспериментально установлено, что наличие макрофагов абсолютно необходимо для пролиферации лимфоцитов, стимулированной митогенами. При увеличении количества макрофагов в культуре от 0 до 5 % уровень пролиферации возрастает пропорционально содержанию макрофагов, увеличение же количества макрофагов свыше 5 % приводит к снижению величины пролиферативного ответа на митогены, и при содержании макрофагов в культуре, равном 10—20 %, пролиферация лимфоцитов практически прекращается (Sato et al., 1980; Resch et al., 1981). Недавно было установлено, что ингибирующее влияние избытка макрофагов на пролиферацию лимфоцитов в значительной степени обусловлено действием  $\text{H}_2\text{O}_2$ , которая образуется в результате дисмутации супероксидных радикалов, выделяющихся стимулированными макрофагами (Metzger et al., 1980; Whisler, Newhouse, 1982). Наши данные показывают, что  $\text{O}_2^-$  необходим для пролиферативного ответа лимфоцитов на Кон-А, и это позволяет предположить, что образующиеся в макрофагах активные формы кислорода ( $\text{O}_2^-$  и  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) опосредуют не только ингибирующее, но и стимулирующее влияние макрофагов на пролиферацию лимфоидных клеток. Это предположение хорошо согласуется с литературными данными о том, что многие химические вещества могут стимулировать пролиферацию лимфоцитов, окисляя определенные компоненты плазматических мембран этих клеток (O'Brien, Parker, 1976).

Таким образом, экспериментально установлено, что удаление супероксидного радикала из среды культивирования с помощью СОД или  $\text{Cu}(\text{Lys})_2$  приводит к снижению уровня стимулированной Кон-А пролиферации мононуклеарных клеток из периферической крови человека и спленоцитов мыши.

#### Л и т е р а т у р а

Guthrie L. A., McPhail L. C., Henson P. M., Johnston R. B. Priming of neutrophils for enhanced release of oxygen metabolites by bacterial lipopolysaccharide. Evidence for increased activity of the superoxide-producing enzyme. — *J. Exp. Med.*, 1984, vol. 160, p. 1656—1671. — Joester K. E., Jung G., Weber U., Weser U. Superoxide dismutase activity of  $\text{Cu}^{2+}$ -amino acid chelates. — *FEBS Lett.*, 1972, vol. 25, p. 25—28. — Metzger Z., Hoffeld J. T., Oppenheim J. J. Macrophage-mediated suppression. I. Evidence for participation of both hydrogen peroxide and prostaglandins in suppression of murine lymphocyte proliferation. — *J. Immunol.*, 1980, vol. 124, p. 983—988. — Nishikimi M., Rao N. A., Yagi K. The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced PMS and molecular oxygen. — *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1972, vol. 46, p. 849—853. — O'Brien R. L., Parker J. W. Oxidation-induced lymphocyte transformation. — *Cell*, 1976, vol. 7, p. 13—20. — Ozaki Y., Iwata J., Ohashi T. Mechanism of neutrophil chemiluminescence induced by wheat germ agglutinin: partial characterization of the antigens recognized by wheat germ agglutinin. — *Blood*, 1984, vol. 64, p. 1094—1102. — Resch K., Heckmann B., Schober I., Barlin E., Gemsa D. The role of macrophages in the activation of T lymphocytes by concanavalin A. II. Macrophage independent activation. — *Europ. J. Immunol.*, 1981, vol. 11, p. 120—126. — Richter C., Azzi A., Wendel A. The effect of a tyrosine—divalent copper complex on hepatic microsomal demethylation. — *FEBS Lett.*, 1976, vol. 64, p. 332—337. — Romeo D., Zabucchi G., Rossi F. Reversible metabolic stimulation of polymorphonuclear leucocytes and macrophages by concanavalin A. — *Nature, New Biol.*, 1973, vol. 243, p. 111—112. — Sato J., Rikiishi H., Nagahashi M., Ohuchi E., Kumagai K. Mitogen responsiveness of various immune tissues: heterogeneity of accessory cells and susceptibility to suppression by macrophages. — *Cell. Immunol.*, 1980, vol. 56, p. 1—15. — Stevens C. M., Bush J. A. New syntheses of  $\alpha$ -amino- $\delta$ -guanidino-*n*-caproic acid (homoarginine) and its possible conversion in vivo into lysine. — *J. Biol. Chem.*, 1950, vol. 183, p. 139—147. — Taniguchi K., Takanaka K. Inhibitory effects of various drugs on phorbol myristate acetate and *n*-formyl methionyl leucyl phenylalanine-induced  $\text{O}_2^-$ -production in polymorphonuclear leucocytes. — *Biochem. Pharmacol.*, 1984, vol. 33, p. 3165—3169. — Tyler D. D. Polarographic assay and intracellular distribution of superoxide dismutase in rat liver. — *Biochem. J.*, 1975, vol. 147, p. 493—504. — Whisler R. L., Newhouse Y. G. Inhibition of human B lymphocyte colony responses by endogenous synthesized hydrogen peroxide and prostaglandins. — *Cell. Immunol.*, 1982, vol. 69, p. 34—45.

Поступила 8 XII 1986

# INVOLVEMENT OF SUPEROXIDE RADICAL IN MITOGEN-STIMULATED LYMPHOCYTE PROLIFERATION

*N. N. Vol'sky, N. V. Kashlakova, V. A. Kozlov*

Institute of Clinical Immunology of the Siberian Branch of the Academy of Medical Sciences of the USSR,  
Novosibirsk

Administration of superoxide dismutase or a complex of divalent copper with lysine to human and mice lymphocyte cultures was shown to prevent from the lymphocyte proliferative response to concanavalin A stimulation. The inhibition grade dependence on the inhibitor concentration in culture medium was studied. It is concluded that active oxygen forms produced by macrophages may be factors defining the value of proliferative response of lymphoid cells under mitogen stimulation.