

О.Н. Щегловитова, Н.Н. Склянкина, Н.В. Болдырева, А.А. Бабаянц, И.С. Фролова, М.Р. Капкаева

НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Российская Федерация

Интерферон человека модулирует функцию инфицированного эндотелия сосудов

Цель исследования: изучить влияние интерферонов α , β и γ на функциональную активность инфицированных вирусом простого герпеса 1-го типа клеток эндотелия сосудов человека, связанную с участием в развитии воспаления. **Материалы и методы:** в работе использовали эндотелиальные клетки, выделенные из пупочной вены. Интактные и инфицированные культуры обрабатывали интерфероном, и в динамике культивирования тестировали медиаторы в культуральной среде. **Результаты:** все исследованные интерфероны активировали продукцию интерлейкина 6. Интерфероны α и β активировали продукцию интерлейкина 8, тогда как интерферон γ ингибировал ее. Интерфероны α и γ увеличивали синтез оксида азота и уменьшали синтез эндотелина-1, тогда как интерферон β активировал продукцию эндотелина-1. **Выводы:** инфекция вирусом простого герпеса 1-го типа эндотелиальных клеток, выделенных из пупочной вены, не изменяет способность интерферона модулировать синтез провоспалительных цитокинов, оксида азота и эндотелина-1. Очевидно, в организме модуляция проявлений врожденного иммунитета под влиянием экзогенного интерферона реализуется как интактным, так и инфицированным вирусом простого герпеса 1-го типа эндотелием сосудов, а характер модуляции определяется типом интерферона.

Ключевые слова: эндотелиальные клетки, выделенные из пупочной вены, интерферон, вирус простого герпеса 1-го типа, цитокины, оксид азота, эндотелин-1.

(Вестник РАМН. 2014; 3–4: 31–35)

31

Введение

Попадание инфекционного агента в организм приводит к активации врожденного иммунитета, действие которого направлено на элиминацию патогена. Эндотелий сосудов (ЭС), наряду с иммунокомпетентными клетками, принимает участие в функционировании врожденного иммунитета, синтезирует факторы, поддерживающие противовоспалительный фенотип эндотелия [1]. На интервенцию патогена клетки ЭС вместе с лейкоцитами крови реагируют цепью событий, приводящих к развитию воспалительного процесса: активации продукции провоспалительных цитокинов, экспрессии молекул клеточной адгезии (МКА), что сопровождается повышением интенсивности рекрутирования и трансмиграции лейкоцитов через слой эндотелия в субэндотелиальное пространство и очаг воспаления [2, 3]. ЭС синтезирует множество других факторов с плейотропными свойствами, связанных с воспалительным процессом. Так, вазодилататор оксид азота

(ОА) вместе с антипатогенным также оказывает противовоспалительное действие, тогда как вазоконстриктор эндотелин-1 (ЭТ-1) обладает провоспалительным эффектом [1].

Эндотелиотропные потенции характерны для вируса простого герпеса 1-го типа (ВПГ-1), широко распространенного в человеческой популяции. ВПГ-1 обнаруживается в эндотелии кровеносных сосудов биопатов органов человека, а его нуклеиновая кислота идентифицирована в образцах нормальной и атеросклеротически измененной аорты [4, 5]. Кроме того, культивируемые клетки ЭС экспрессируют рецепторы для ВПГ-1 [2].

Для профилактики и лечения вирусных заболеваний, в т.ч. вызванных ВПГ-1, используют препараты интерферона (ИФН) [6]. Лечебный эффект ИФН связан как с антивирусной, так и с иммуномодулирующей активностью [6].

Цель исследования: изучить действие ИФН на функциональное состояние инфицированных ВПГ-1 клеток ЭС, связанное с их участием в развитии воспаления.

O.N. Scheglovitova, N.N. Sklyankina, N.V. Boldyreva, A.A. Babayants, I.S. Frolova, M.R. Kapkaeva

N.F. Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

Human Interferon Modulates Infected Vascular Endothelium Function

Background: To study impact of interferon (IFN) α , β and γ on the Herpes simplex virus type 1 (HSV-1) infected endothelial cells functional activity related with participation in the inflammation development. **Materials and methods:** In the work endothelial cells isolated from umbilical vein were used. Intact and infected cultures were treated by interferon and in the dynamics of cultivation tested mediators in the cultural medium.

Results: All investigated interferons activated the production of IL-6. IFN α , β activated the production of IL-8, while IFN γ inhibited her. IFN α and γ increased synthesis of nitrogen oxides and reduced the synthesis of endothelin-1, while IFN β activated the production of endothelin-1. **Conclusion:** Infection of endothelial cells isolated from umbilical vein with HSV-1 does not alter the ability of interferon in modulating of proinflammatory cytokines, nitric oxide and endothelin-1 synthesis. It is obvious in the body modulation manifestations of innate immunity under the influence of exogenous interferon is implemented both intact and infected with HSV-1-vascular endothelium and nature modulation is determined by the type of IFN.

Key words: endothelial cells isolated from umbilical vein, interferon, Herpes simplex virus type 1, cytokines, nitric oxide, endothelin-1.

(Vestnik Rossiiskoi Akademii Meditsinskikh Nauk — Annals of the Russian Academy of Medical Sciences. 2014; 3–4: 31–35)

Влияние рекомбинантных ИФН I (ИФН α и β) и II (ИФН γ) типа человека оценивали на культурах клеток ЭС человека, интактных и инфицированных ВПГ-1, по продукции провоспалительных цитокинов и синтезу ОА и ЭТ-1.

Материалы и методы

Материал для исследования

Эндотелиальные клетки пупочной вены человека (ЭКПВЧ) выделяли из вен пупочных канатиков, полученных от здоровых женщин после нормальных родов [7]. ЭКПВЧ культивировали в среде 199 (Gibco, США) с добавлением 10% фетальной сыворотки коров (HyClone, США), эндотелиального фактора роста, гепарина (100 мкг/мл) и гентамицина (50 мкг/мл) при 37 °С в 5% CO₂. После образования монослоя клетки ресуспендировали раствором трипсина с EDTA (Gibco, США) и засеивали с плотностью 10⁵ клеток/см² в 24-луночные планшеты. Для работы использовали культуры только первого пассажа на 4-е сут культивирования после образования монослоя.

Культуры ЭКПВЧ инфицировались ВПГ-1 (штамм R39, полученный из Банка ВОЗ) из расчета 0,0001 ТЦД₅₀ на клетку. Среда роста декантировали, и в лунки вносили по 200 мкл вирусосодержащей среды. После 1 ч адсорбции монослой отмывали от неадсорбированного вируса и продолжали культивировать в свежей среде.

Методы исследования

При постановке экспериментов использовали ИФН α 2b (Имунофарм, Россия) с активностью 3×10⁸ Ед/мл и концентрацией 0,5 мг/мл согласно международному стандарту NIBSC 95/576 (Великобритания). ИФН β -1b (Schering AG, Германия) был предоставлен фирмой-производителем, его удельная активность составила 9,6×10⁶ Ед/мл, концентрация — 0,3 мг. ИФН γ (Имунофарм, Россия): активность — 1,4×10⁷ ЕД/мл, концентрация — 1,4 мг/мл (согласно международному стандарту NIBSC Code:82/587).

Влияние ИФН (концентрации 10⁴ Ед/мл) на культуры ЭКПВЧ, инфицированные ВПГ-1, исследовали в трех модификациях. Обработка культуры ИФН составляла 24 ч, затем их инфицировали ВПГ-1 и продолжали культивировать в отсутствие ИФН. В других двух модификациях экспериментов культуры инфицировали ВПГ-1, затем сразу или через 6 ч в среду вносили ИФН, и культивирование продолжалось. Пробы культуральной среды отбирали через 24 ч после внесения вируса и хранили при -20 ° до момента тестирования. Контрольные культуры обрабатывали ИФН и одновременно с опытными образцами отбирали пробы среды.

Тестирование растворимых факторов проводили методом иммуноферментного анализа. Использовали тест-системы фирм Biosource (Австрия) — ELISA IL-1 β , ELISA IL-6, ELISA IL8/NAP, ELISA TNF α ; R&D Systems (Великобритания) — Total NO Nitrite/Nitrate Assay; IBL Biomedica Gruppe (Германия) — Endothelin-1 Assay Kit.

Статистическая обработка данных

Результаты выражали в относительных (процентное выражение) показателях. Статистическую обработку данных выполняли по методу Стьюдента и оценивали в соответствии с *t*-критерием Стьюдента.

Результаты

В динамике исследовали влияние ИФН α , β и γ на продукцию культурами ЭКПВЧ провоспалительных цитокинов (рис. 1). Все три ИФН не оказывали существенного воздействия на продукцию ИЛ 1 β , но продемонстрировали себя активными индукторами синтеза ИЛ 6. При воздействии ИФН α и β максимальные показатели ИЛ 6 в культуральной среде определялись в более ранние сроки (3 и 6 ч, соответственно), тогда как после воздействия ИФН γ максимальные показатели были наибольшими к 24 ч. Возможно, разница во времени проявления эффекта связана с более длительным внутриклеточным сигналингом после воздействия ИФН γ , что характерно и для развития антивирусного состояния под влиянием ИФН γ по сравнению с ИФН I типа [6]. Среди ИФН I типа ИФН β активировал более высокий уровень продукции ИЛ 6 в ЭКПВЧ: более 2500% продукции ИЛ 6 в клетках, не обработанных ИФН. Возможно, это связано как с более выраженной тканевой специфичностью ИФН β по сравнению с ИФН α , так и с особенностями механизмов сигналинга [7]. При воздействии ИФН α и β было отмечено увеличение продукции ИЛ 8 культурой ЭКПВЧ, тогда как ИФН γ подавлял синтез этого цитокина. Разница в действии ИФН I и II типа на продукцию культурой ЭКПВЧ ИЛ 8, по-видимому, определяется разницей в их воздействиях на все этапы процесса: от разницы в структуре рецепторов до различия в механизмах трансдукции [6]. Продукция фактора некроза опухоли (ФНО) α культурой была увеличена через 3 ч только после воздействия ИФН γ , но не ИФН α и β .

При всех использованных модификациях экспериментов ИФН снижал уровень репродукции ВПГ-1 в культурах ЭКПВЧ [8]. Также при всех модификациях экспериментов — при предобработке ИФН β или γ , применении ИФН α , β или ИФН- γ сразу или через 6 ч после инфицирования ВПГ-1, когда механизм репликации вируса уже запущен, — происходила активации синтеза ИЛ 6 (рис. 2). Необходимо отметить, что уровень продукции ИЛ 6 достоверно отличался от такового в контрольных интактных и контрольных инфицированных (но не обработанных ИФН) культурах, но достоверно не отличался от уровня продукции в контрольных культурах, культивируемых в присутствии ИФН. Отсутствие продукции ИЛ 6 при предобработке ЭКПВЧ ИФН α и последующем инфицировании ВПГ-1, очевидно, связано с тем, что результат оценивали через 48 ч от начала воздействия ИФН α , именно в то время, когда, как было показано в данной работе, действие на продукцию данного цитокина интактными культурами уже не выявлялось. Культуры ЭКПВЧ, инфицированные ВПГ-1, при воздействии ИФН α , β и γ не продуцировали ИЛ 1 β и ФНО α в количествах, значительно отличающихся от таковых при продукции интактными культурами. Возможно, это связано с тем, что ИФН α , β и γ не оказывали выраженного воздействия на продукцию данных цитокинов и интактными неинфицированными культурами ЭКПВЧ.

Только ИФН γ (но не ИФН α и β), примененный до инфицирования, оказывал модулирующее воздействие на продукцию ИЛ 8 культурами ЭКПВЧ, инфицированными ВПГ-1. Эффект ИФН γ был установлен при отдельной статистической обработке результатов, полученных на культурах спонтанно продуцирующих ИЛ 8 в высоких (254,13±18,1 пг/мл) или низких (51,62±6,67 пг/мл) концентрациях (рис. 3). Ранее нами уже была показана способность культур ЭКПВЧ спонтанно продуцировать достоверно различающиеся количества

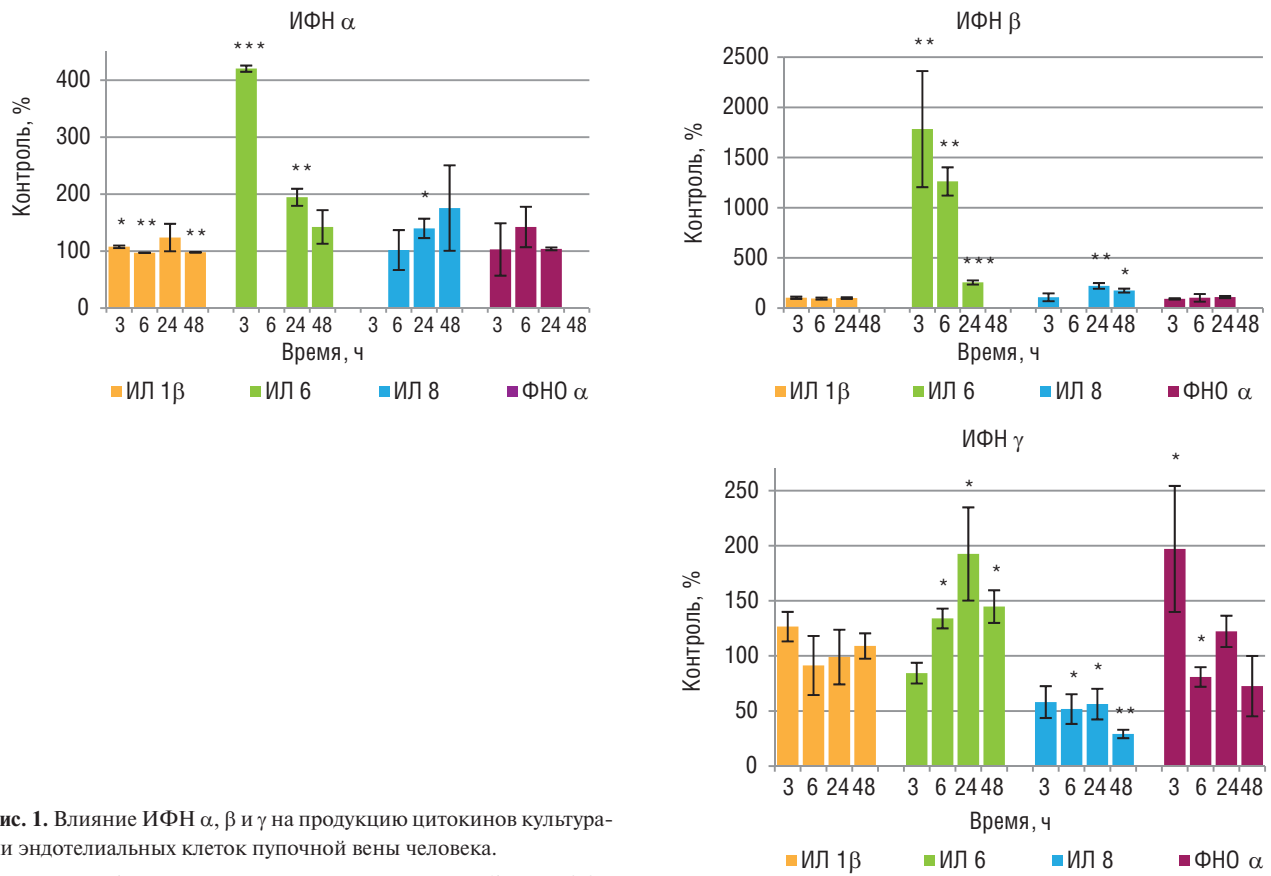


Рис. 1. Влияние ИФН α, β и γ на продукцию цитокинов культурами эндотелиальных клеток пупочной вены человека.

Примечание. * — p относительно контроля клеток (* — $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** — $p < 0,001$).

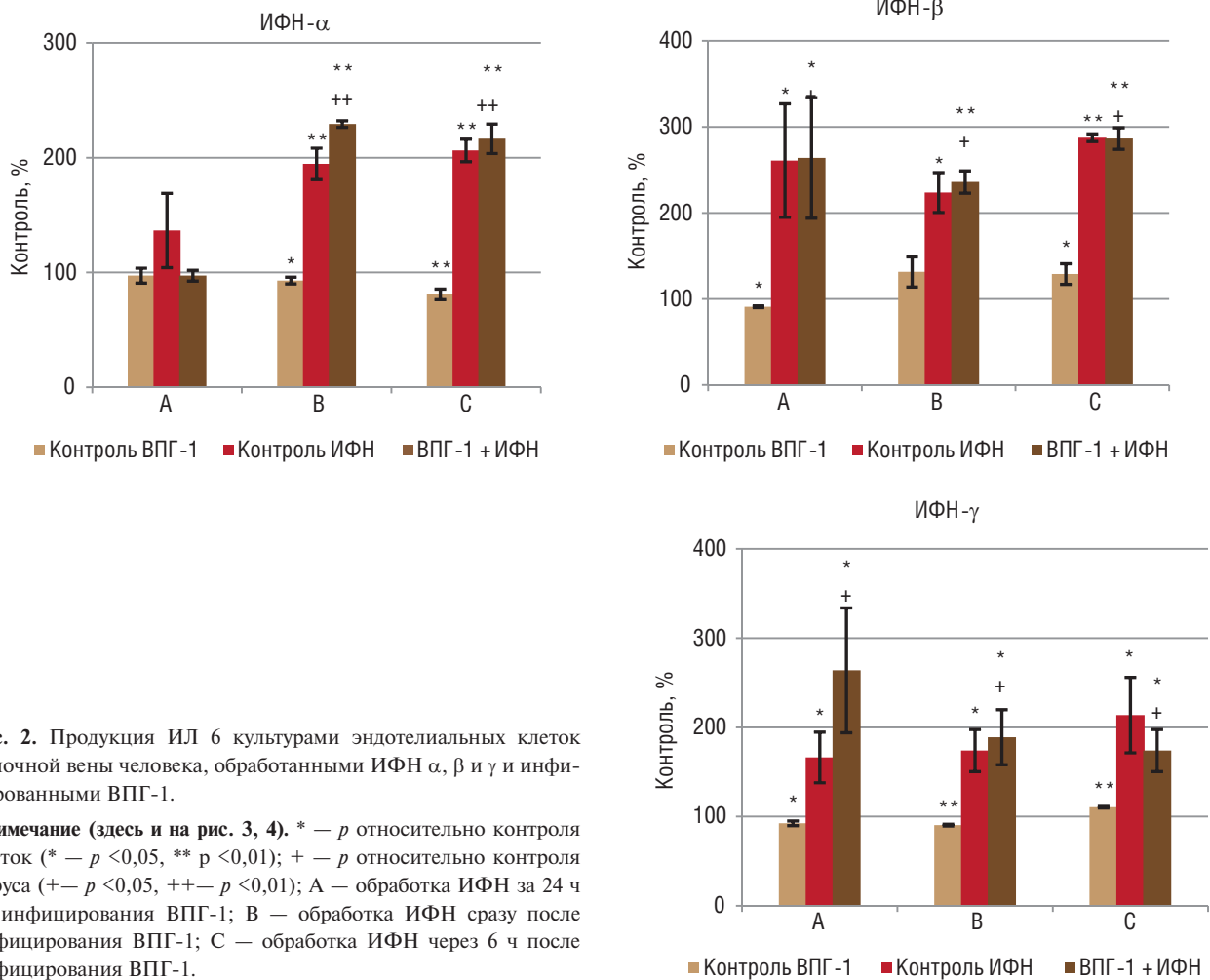


Рис. 2. Продукция ИЛ 6 культурами эндотелиальных клеток пупочной вены человека, обработанными ИФН α, β и γ и инфицированными ВПГ-1.

Примечание (здесь и на рис. 3, 4). * — p относительно контроля клеток (* — $p < 0,05$, ** $p < 0,01$); + — p относительно контроля вируса (+ — $p < 0,05$, ++ — $p < 0,01$); А — обработка ИФН за 24 ч до инфицирования ВПГ-1; В — обработка ИФН сразу после инфицирования ВПГ-1; С — обработка ИФН через 6 ч после инфицирования ВПГ-1.

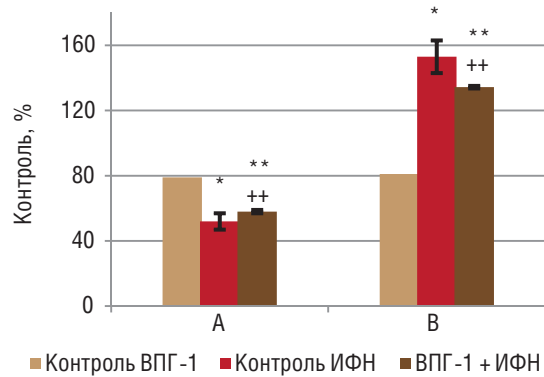


Рис. 3. Влияние ИФН γ на продукцию ИЛ 8 высоко- (А) и низко-продуцирующими (В) культурами эндотелиальных клеток пупочной вены человека, инфицированными ВПГ-1.

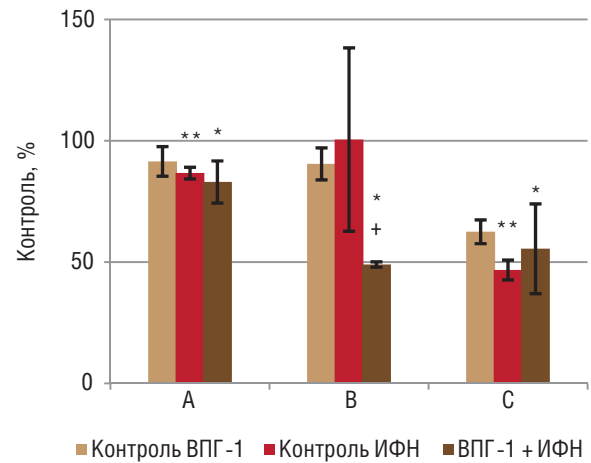


Рис. 4. Влияние ИФН γ на продукцию ЭТ-1 культурами эндотелиальных клеток пупочной вены человека, инфицированными ВПГ-1.

34

цитокинов [9]. Обработка ИФН γ высокопродуцирующих культур и последующее инфицирование ВПГ-1 приводили к ингибированию продукции ИЛ 8, тогда как следствием предобработки низкопродуцирующих инфицированных культур была активация продукции ИЛ 8. При этом в обоих случаях не обнаружено статистически значимых отличий от его продукции после действия ИФН на интактные неинфицированные культуры.

ИФН α , β и γ оказывали статистически достоверное воздействие на синтез ОА и ЭТ-1 культурами ЭКПВЧ, инфицированными ВПГ-1. ИФН α и γ активировали продукцию ОА в том случае, когда культуры были обработаны сразу после инфицирования. Активация продукции этого медиатора происходила при использовании ИФН β как до инфицирования культур, так и после него. Используемые препараты различались по влиянию на синтез ЭТ-1 инфицированными культурами. При всех модификациях обработки инфицированных культур ИФН α снижал интенсивность синтеза ЭТ-1, тогда как ИФН β активировал его продукцию. Наиболее активным ингибитором синтеза ЭТ-1 оказался ИФН γ (рис. 4). Максимально выраженное подавление продукции ЭТ-1 происходило при использовании ИФН γ сразу после инфицирования культур или через 6 ч после инфицирования.

Обсуждение

Полученные результаты свидетельствуют о том, что противовирусные препараты ИФН α , β и γ , ингибируя репродукцию ВПГ-1 в культуре ЭКПВЧ, одновременно оказывают регулирующее воздействие на продукцию инфицированным эндотелием факторов врожденного иммунитета: провоспалительных цитокинов, ОА и ЭТ-1. Очевидно, свойства всех исследованных ИФН во многом определяются активацией продукции ЭС ИЛ 6, являющегося одним из наиболее активных цитокинов-факторов врожденного иммунитета, участвующих в воспалительной реакции — реализации адаптивного иммунного ответа и, по-видимому, также в переключении врожденного ответа организма на адаптивный иммунный ответ [10]. ИЛ 8 определяет хемотаксис лейкоцитов, влияет на трансмиграцию нейтрофильных лейкоцитов через слой эндотелия сосудов и при помощи этого механизма регулирует развитие воспаления [11]. По всей вероятности,

ИФН I и II типа путем воздействия на синтез эндотелием ИЛ 8 могут активировать (ИФН α и β) или подавлять (ИФН γ) этот процесс в интактном эндотелии сосудов или же модулировать его (ИФН γ) в эндотелии сосудов, инфицированном ВПГ-1. ИФН α , β и γ регулируют функциональное состояние эндотелия также и путем воздействия на синтез ОА и ЭТ-1. Увеличение под влиянием ИФН α и γ продукции ОА и уменьшение продукции ЭТ-1 интактными и инфицированными ВПГ-1 ЭКПВЧ характеризует их противовоспалительную направленность. Активация ИФН β продукции ЭТ-1 в инфицированном эндотелии, возможно, направлена на синтез ОА, т.к. ЭТ-1 по принципу обратной связи, воздействуя на специфические рецепторы ЭК, активирует синтез ОА [1].

Активация механизмов врожденного иммунитета в ответ на попадание инфекционных патогенов реализуется на уровне клеточных рецепторов TLR, NLR и RLR [12]. В ЭК функционируют TLR1 6, TLR 9, NOD 1, NLRP 1, RIG-1 и MDA 5, из которых могут распознавать структурные белки ВПГ-1 TLR 2/TLR 2, TLR 2/TLR 1, TLR 2/TLR 6 и внутриклеточный рецептор TLR 9 [13]. Однако инфекция ВПГ-1 вызывает в культуре ЭС развитие продуктивной инфекции и запускает механизмы, сдерживающие активацию синтеза клеточных медиаторов врожденного иммунитета, тогда как чувствительность к действию экзогенного ИФН сохраняется [8, 14, 15]. Вероятно, именно этим объясняется синтез медиаторов культурами инфицированных эндотелиальных клеток на уровне их синтеза неинфицированными культурами под влиянием ИФН. При этом эффект ИФН сохраняется и при их использовании через 6 ч после инфицирования культур ВПГ-1, в то время как вирус уже проник в ядра клеток, и начался процесс его репликации [14].

Заключение

Экстраполируя полученные данные, можно предположить, что в организме модуляция проявлений врожденного иммунитета под влиянием экзогенного ИФН реализуется как интактным, так и инфицированным ВПГ-1 эндотелием сосудов, а характер модуляции определяется типом ИФН.

Работа частично поддержана грантом МНТЦ № 3505.

ЛИТЕРАТУРА

1. Biederman B.C. Vascular endothelium: checkpoint for inflammation and immunity. *New Physiol. Sci.* 2001; 16: 84–88.
2. Щегловитова О.Н., Склянкина Н.Н., Болдырева Н.В., Бабаянц А.А., Фролова И.С., Беляев Д.Л., Ершов Ф.И. Молекулы адгезии, экспрессируемые клетками сосудистого эндотелия в естественном иммунитете при вирусных инфекциях. *Вестник РАМН.* 2011; 10: 54–60.
3. Wallez Y., Huber P. Endothelial adherens and tight junction in vascular homeostasis, inflammation and angiogenesis. *Biochim. Biophys. Acta.* 2008; 3: 794–809.
4. Herzum M., Schaefer J.R., Hufnagel G., Maisch V. Cytomegalovirus and herpes simplex virus in pathogenesis and progression of native arteriosclerosis and recurrent stenosis after intervention. *Herz.* 1998; 23: 193–196.
5. Holbach L.M., Assano N., Naumann G.O. Infection of the corneal endothelium in herpes simplex keratitis. *Am. J. Ophthalmol.* 1998; 126: 592–594.
6. Pestka S. The interferons: 50 years after their discovery, there is much more to learn. *J. Biol. Chem.* 2007; 282: 20047–20051.
7. Da Silva A.J., Brickelmaier M., Majeau G.R. Comparison of gene expression patterns induced by treatment of human umbilical vein endothelial cells with IFN-alpha 2b vs. IFN-beta 1a: understanding the function relationship between distinct type 1 interferons that act through a common receptor. *Interferon Cytokine Res.* 2002; 22: 173–188.
8. Щегловитова О.Н. Склянкина Н.Н., Болдырева Н.В., Бабаянц А.А., Фролова И.С. Модуляция фенотипических проявлений культивируемыми клетками эндотелия кровеносных сосудов человека в результате инфицирования вирусом простого герпеса 1 типа (ВПГ-1). *Клеточн. технол. в биол. и медицине.* 2013; 1: 34–41.
9. Щегловитова О.Н., Склянкина Н.Н., Болдырева Н.Н. Различия в функциональной активности культивируемых клеток эндотелия кровеносных сосудов человека, полученных от разных доноров. *Цитология.* 2011; 53: 341–346.
10. Jones S. Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6. *J. Immunol.* 2005; 175: 3463–3468.
11. Mukaida N. Interleukin-8: an expanding universe beyond neutrophil chemotaxis and activation. *Int. J. Hematol.* 2000; 72: 391–398.
12. Opitz B., Eitel J., Meixenberger K., Suttrop N. Role of Toll-like receptors, NOD-like receptors and RIG-like receptors in endothelial cells and systemic infections. *Thromb Haemost.* 2009; 102: 1103–1109.
13. Gill N., Deacon P.M., Lichty B., Mossman K.L., Ashkar A.A. Induction of innate immunity against herpes simplex virus type 2 infection via local delivery of Toll-like receptor ligand correlates with beta interferon production. *J. Virol.* 2006; 80: 9943–9950.
14. Mossman K.L. Activation and inhibition of virus and interferons: the herpes virus story. *Viral Immunol.* 2002; 15: 3–15.
15. Щегловитова О.Н., Романов Ю.А., Максидина Е.В., Кабаева Н.В., Пронин А.Г. Herpes simplex type I virus infection of cultured human vascular endothelial cells: expression of cell adhesion molecules and induction of interferon and cytokine production by blood mononuclear cells. *Rus. J. Immunol.* 2001; 6: 367–376.

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Щегловитова Ольга Николаевна, доктор медицинских наук, профессор, заведующая лабораторией противовирусного иммунитета ФГБУ «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи» МЗ РФ
Адрес: 123098, Москва, ул. Гамалеи, д. 18, **тел.:** (499) 193-61-43, **e-mail:** scheglovitova@rambler.ru

Склянкина Надежда Николаевна, научный сотрудник лаборатории противовирусного иммунитета ФГБУ «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи» МЗ РФ
Адрес: 123098, Москва, ул. Гамалеи, д. 18, **тел.:** (499) 193-55-62, **e-mail:** scheglovitova@rambler.ru

Болдырева Наталья Владимировна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории противовирусного иммунитета ФГБУ «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи» МЗ РФ
Адрес: 123098, Москва, ул. Гамалеи, д. 18, **тел.:** (499) 193-55-62, **e-mail:** scheglovitova@rambler.ru

Бабаянц Алла Артемовна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории противовирусного иммунитета ФГБУ «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи» МЗ РФ
Адрес: 123098, Москва, ул. Гамалеи, д. 18, **тел.:** (499) 193-63-68, **e-mail:** scheglovitova@rambler.ru

Фролова Ирина Сергеевна, старший научный сотрудник лаборатории противовирусного иммунитета ФГБУ «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи» МЗ РФ
Адрес: 123098, Москва, ул. Гамалеи, д. 18, **тел.:** (499) 193-63-68, **e-mail:** scheglovitova@rambler.ru

Капкаева Марина Рафаиловна, младший научный сотрудник лаборатории противовирусного иммунитета ФГБУ «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи» МЗ РФ
Адрес: 123098, Москва, ул. Гамалеи, д. 18, **тел.:** (499) 193-55-62, **e-mail:** scheglovitova@rambler.ru