

УДК 616-022.7:612.112.91:578.223

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ, ЗАРАЖЕННЫХ РНК-СОДЕРЖАЩИМИ ВИРУСАМИ

И.Н. Ляпун¹, Н.Г. Плехова^{1,2}, Л.М. Сомова¹, Е.И. Дробот¹, Н.В. Крылова¹, И.Г. Максема¹¹НИИ эпидемиологии и микробиологии СО РАМН (690087 г. Владивосток, ул. Сельская, 1),²Дальневосточный федеральный университет (690091 г. Владивосток, ул. Октябрьская, 27)**Ключевые слова:** нейтрофилы, ферменты, вирус клещевого энцефалита, хантавирус.

Приведены данные по определению функциональной активности нейтрофилов, зараженных вирусом клещевого энцефалита и хантавирусом. Установлено, что вирус клещевого энцефалита оказывает более выраженное действие на кислородообразующую активность нейтрофилов, чем хантавирус. Так, в клетках инфицированных возбудителем клещевого энцефалита, обнаружена тенденция к анаэробному пути энергопродукции, что согласовалось с повышением активности лактатдегидрогеназы. При этом сниженная активность миелопероксидазы указывала на подавление защитной реакции клетки в ответ на внедрение вируса.

В защите организма от вирусных заболеваний принимают участие клеточные элементы врожденного иммунитета – моноциты/макрофаги и нейтрофилы, которые играют ключевую роль в развитии раннего противоинфекционного ответа. Иммунная функция нейтрофилов при инфекционных заболеваниях главным образом ассоциируется с фагоцитозом и продукцией цитотоксических компонентов, в том числе нитроксидных и кислородных радикальных соединений [12]. Нарушение функциональной активности нейтрофилов может развиваться вследствие нерегулируемого апоптоза [6, 9]. Известно, что это явление может инициироваться внеклеточным воздействием фактора некроза опухоли- α или FAS-лиганда либо внутриклеточным путем, например, повышенным количеством кислородных радикалов [11]. Спектр биологически активных веществ нейтрофилов включает свободные кислородные радикалы, протеиназы, бактерицидные протеины и цитокины, которые как по отдельности, так и в совокупности, оказывают влияние на регуляцию иммунного ответа организма [5].

На данный момент для нейтрофилов обозначены три основные бактерицидные системы: 1) кислородзависимая система, в состав которой входит ряд ферментов дыхательной цепи: никотинамидадениндинуклеотидфосфатоксидазный комплекс, сукцинатдегидрогеназа, лактатдегидрогеназа, цитохромоксидаза и миелопероксидазная система; 2) нитроксиобразующая система, включающая реактивные посредники азота, производные нитроксидазы; 3) система белков нейтрофильных гранул (антимикробные белки, протеазы, серинпротеиназы, металлопротеиназы) [14].

Присутствие в периферической крови достаточного количества нейтрофилов и их наличие практически во всех органах обуславливает вероятность для этих

клеток одними из первых взаимодействовать с вирусами. Ранее сообщалось о способности нейтрофилов взаимодействовать с вирусом иммунодефицита человека, вирусами гриппа и Эпштейна–Барр и была установлена индукция апоптоза нейтрофилов данными вирусами [9, 10].

Вирусы рода *Hantavirus* относятся к семейству *Bunyaviridae* и передаются в основном воздушно-пылевым путем [13]. Хантавирусы патогенны для человека, и в данный момент известны два тяжелых заболевания человека, вызываемых ими: геморрагическая лихорадка с почечным синдромом и хантавирусный легочный синдром. Вирус клещевого энцефалита относится к семейству *Flaviviridae*. Геном у представителей этого семейства образует односторонняя отрицательная молекула РНК, заключенная в нуклеокапсид с икосаэдральным типом симметрии, репродукция флавивирусов происходит в цитоплазме [3, 7].

Целью нашего исследования являлось определение влияния РНК-содержащих вирусов на функциональную активность нейтрофилов.

Материал и методы. Первичную культуру нейтрофилов морских свинок получали, вызывая внутрибрюшинное воспаление, путем введения стерильного 1 % мясopептонного бульона (5 мл). Через 18 часов перитонеальную полость промывали 10 мл холодной среды 199 с гепарином (5 ед./мл). В полученном лейкоконцентрате число клеток доводили до 4×10^6 /мл, разносили во флаконы с покровными стеклами по 1 мл и плоскодонные планшеты по 100 мкл на лунку. Для адгезии взвесь нейтрофилов оставляли в CO_2 -инкубаторе, через 40 мин монослой клеток отмывали дважды от неадгезированных элементов.

Для заражения макрофагов были использованы культуральный штамм 9990 хантавируса, выделенный на клетках Vero-6 из суспензии легких инфицированной полевой мыши, и штамм Primorye-73 вируса клещевого энцефалита дальневосточного субтипа, полученный на культуре клеток СПЭВ. В экспериментах использовали супернатантную вируссодержащую жидкость культуры клеток Vero-6 и СПЭВ, включавшую не менее 5 инфекционных единиц на нейтрофил, исходя из посадочной концентрации клеток и величины титра вируса, используемого для заражения. Затем вирусы продолжали инкубировать в среде 199, содержащей 20 % эмбриональной сыворотки коровы, 2 μM глутамина, 0,2 μM гентамицина и 100 ед./мл пенициллина. Время контакта нейтрофилов с вируссодержащей

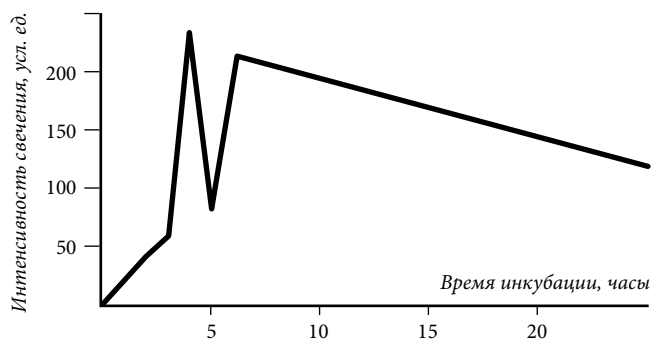


Рис. 1. Содержание антигена вируса клещевого энцефалита в нейтрофилах, спектрофотометрия с помощью лазерной сканирующей конфокальной микроскопии.

жидкостью составило от 5 до 60 мин, после чего монослой клеток дважды отмывался средой 199 для удаления внеклеточных вирусных частиц, и продолжалась инкубация в течение 15 мин, 45 мин, 1, 1,5, 2, 3, 4, 5, 8, 9, 24, 48 и 72 часа.

Предметные стекла с адгезированными на них клетками высушивали на воздухе и фиксировали в течение 30 с по собственной модификации в холодном 96° этаноле. Это позволило сохранить вирусный антиген на плазматической мембране клеток. Затем применяли стандартную постановку непрямого метода флюоресцирующих антител. Интенсивность специфического свечения оценивали в условных единицах. Для определения вирусного антигена монослой зараженных клеток обрабатывали гомологичной иммуноасцитической жидкостью к штамму Primorye-73 вируса клещевого энцефалита и к штамму ПМ-Т79-95 вируса Хантаан в разведении 1:64 и объеме 5–20 мкл. В качестве флюоресцирующей сыворотки для выявления антигена вируса использовали Zenon Labeling Kit Alexa Fluor 546 против иммуноглобулина G1 мыши (Sigma, USA).

Для выявления апоптотически измененных клеток применяли метод окрашивания клеточного осадка Hoechst 333258 (Sigma, USA). Препараты исследовали в системе LSM510META при возбуждении 556 нм, подсчитывали 100 клеток и по наличию специфического свечения определяли долю апоптотически измененных клеток, которую выражали в виде индекса апоптоза.

Определение активности аденозин-моно-5'-нуклеотидазы (АМН) проводили путем добавления к монослою клеток 20 мкл субстрата для АМН (4 мг аденозин-5-трифосфата на 1 мл трис-НСl-буфера при рН 7,8, содержавшего 87 мг NaCl, 70 мг $MgCl_2 \cdot 6H_2O$). Выявление активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ) проводили по методу Лойда в собственной модификации [4].

Активность миелопероксидазы (МПО) определяли путем добавления к монослою клеток 100 мкл раствора (4 мг о-фенилендиамина на 10 мл фосфатно-цитратного буфера с рН 5,0 и добавлением 500 мкл 0,33 % перекиси водорода). Выявление активности катионных белков проводили путем добавления к монослою клеток 50 мкл раствора зеленого прочного



Рис. 2. Изменение активности АМФ в инфицированных вирусами нейтрофилах первичной культуры.

(1 мг зеленого прочного на 1 мл метанолового трис-буфера с рН 8,0–8,2)

Количество продуктов реакции вычисляли по поглощению раствора на спектрофотометре Labsystem Multiscan RC (Финляндия) при соответствующих для определяемых субстратов длинах волн.

Результаты спектрофотометрического исследования выражали в виде индекса стимуляции, который вычислялся в процентах как отношение разности между средними показателями оптической плотности растворов, содержащих продукты реакции зараженных нейтрофилов и интактных клеток, к среднему показателю оптической плотности раствора для интактных клеток.

Результаты исследования. С помощью непрямого флюоресценции после 1 часа контакта вируса клещевого энцефалита с нейтрофилами определялось специфическое свечение цитоплазмы, преимущественно диффузного характера. Через 2 часа инкубации появлялось внутриклеточное свечение в виде глыбок, и его интенсивность достигала $42,6 \pm 5,6$ усл. ед. (рис. 1), максимальные показатели составили $234,6 \pm 15,7$ усл. ед. после 4 часов инкубации, затем они кратковременно снижались (через 5 часов) и вновь нарастали, до 24 часов наблюдения оставаясь на значительном уровне. В дальнейшем, ко 2-м суткам наблюдения, количество антигенпозитивных нейтрофилов было минимальным вследствие деградации клеток. Подобная же динамика показателей наблюдалась при исследовании нейтрофилов, инфицированных хантавирусом.

Установлено, что вирус клещевого энцефалита способен индуцировать апоптоз нейтрофилов в большей степени, чем хантавирус. Так, индекс апоптоза для нейтрофилов, инфицированных вирусом клещевого энцефалита, через 8 часов составил $48,0 \pm 5,3$ %, тогда как при заражении клеток хантавирусом этот показатель в тот же срок равнялся $35 \pm 3,1$ %.

АМН является основным ферментом пуринового катаболизма, играющим важную роль в восприятии клетками внешних сигналов. Она локализуется на наружной мембране клеток и является регулятором уровня циклического аденозинмонофосфата. Нами установлено повышение активности АМН в нейтрофилах после заражения хантавирусом в течение всего периода наблюдения (рис. 2). Показатели активности

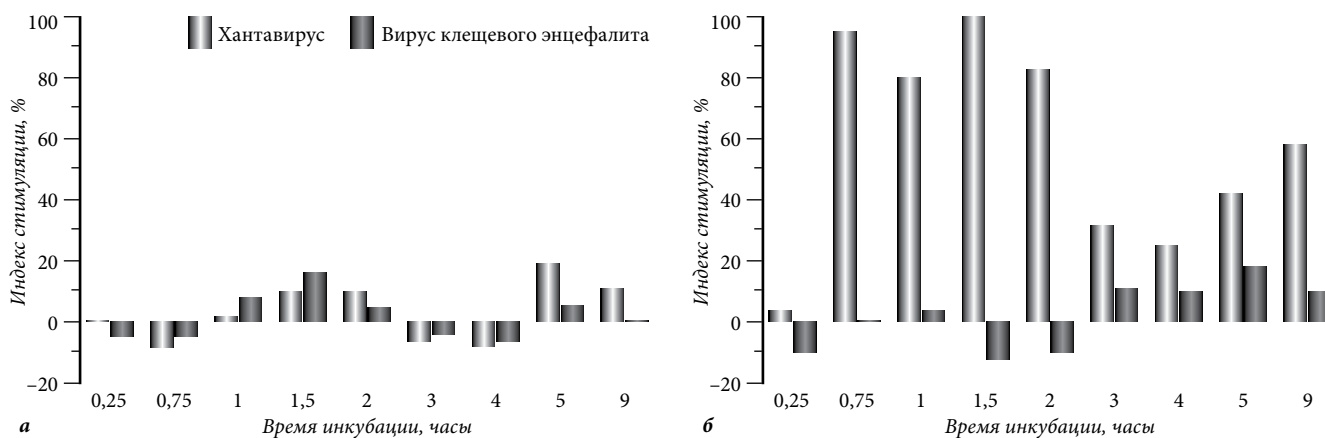


Рис. 3. Изменение активности ЛДГ (а) и МПО (б) в инфицированных вирусами нейтрофилах первичной культуры.

этого фермента составили от $1,5 \pm 0,5$ до $51,2 \pm 1,3$ % относительно контроля, который был принят за 0. В нейтрофилах, зараженных вирусом клещевого энцефалита, показатели активности АМН в начальные сроки заражения (до 1,5 часа) повышались до $40,2 \pm 0,9$ %, затем отмечалось их снижение (до $5,9 \pm 0,3$ %) до конца срока наблюдения (рис. 2). Таким образом, данные по активности АМН указывают на выраженную стимуляцию нейтрофилов при заражении их вышеуказанными вирусами. При этом стимуляция нейтрофилов, инфицированных вирусом клещевого энцефалита, происходила в начальные сроки после заражения, тогда как реакция нейтрофилов на введение хантавируса регистрировалась на 9-м часу наблюдения.

Характерной особенностью метаболизма нейтрофилов является их способность под влиянием различных факторов мгновенно генерировать кислородные радикалы. В образовании реактивных продуктов кислорода при переносе водорода от субстрата, подвергающегося окислению – «донора водорода», на другой субстрат – «акцептор водорода» принимает участие ЛДГ, которая катализирует заключительный этап гликолиза – обратную реакцию восстановления пирувата в лактат.

При заражении нейтрофилов динамика показателей активности ЛДГ носила волнообразный характер (рис. 3, а). Так, после заражения хантавирусом индекс стимуляции для ЛДГ достигал минимального значения через 45 мин и 4 часа и составлял $-8,8 \pm 0,7$ %. Максимальное значение индекса стимуляции получено через 5 часов – $19,6 \pm 0,5$ %. При заражении вирусом клещевого энцефалита в начальные сроки индекс стимуляции для ЛДГ снижался до $-4,5 \pm 0,3$ % (45 мин), затем повышался до $16,5 \pm 0,8$ % (1,5 часа), повторное его понижение отмечалось через 4 часа ($-6,5 \pm 1,2$ %) с последующим повышением до конца срока наблюдения ($9,5 \pm 0,9$ %).

МПО – это гемопротейн, присутствующий в азурофильных гранулах нейтрофилов, выходящий при активации клетки в фаголизосоме. Этот фермент принимает участие в преобразовании супероксидного аниона в следующий мощный окислительный компонент – гипохлорную кислоту, осуществляя таким образом защиту клетки от избыточного количества реактивных посредников кислорода [14].

При заражении нейтрофилов хантавирусом активность МПО имела высокие значения на протяжении всего срока наблюдения (рис. 3, б). Так, в начальные сроки заражения (45 мин – 2 часа) отмечен максимальный индекс стимуляции ($100,0 \pm 2,3$ %), через 4 часа он снижался (до $25,6 \pm 0,2$ %), а через 9 часов – вновь увеличивался (до $58,4 \pm 0,7$ %). При инфицировании же вирусом клещевого энцефалита показатели активности МПО имели низкие значения на протяжении всего срока наблюдения, незначительно повышаясь к его концу.

Катионные белки относятся к специфическим маркерам нейтрофилов, и выявление их активности при патологических состояниях дает представление об активации кислороднезависимой бактерицидной системы. Нами установлено, что активность катионных белков в нейтрофилах, зараженных хантавирусом, достоверно не отличалась от контроля, тогда как при заражении вирусом клещевого энцефалита она возрастала через 1 час до $18,5 \pm 1,3$ %, а затем снижалась до $-17,9 \pm 0,2$ % к концу срока наблюдения. Эти данные указывают на первоначальную стимуляцию кислороднезависимой системы нейтрофилов в ответ на внесение вируса с последующей катионизацией.

Обсуждение полученных данных. Известно, что 5'-нуклеотидаза катализирует гидролиз преимущественно аденозинмонофосфатов и инозинмонофосфатов и может также катализировать гидролиз дезоксирибонуклеозидмонофосфатов. Причем при вирусных инфекциях нуклеозидтрифосфаты, которые синтезируются при участии 5'-нуклеотидаз, служат строительными блоками для вирусной РНК или функционируют в качестве коферментов. Поэтому в случае повышения общей синтетической активности клетки выявляется повышение внутриклеточного содержания 5'-нуклеотидаз [2]. На наш взгляд, зарегистрированное повышение внутриклеточного содержания АМН в зараженных нейтрофилах можно связать с выработкой нуклеозидтрифосфатаз и нуклеотидаз, используемых при синтезе вирусных компонентов. Обнаруженные временные различия максимальной активности этого фермента вполне объяснимы с учетом того, что патологический процесс при клещевом энцефалите развивается быстрее, чем при хантавирусной инфекции.

Нарушение передачи электронов по электронно-транспортной цепи митохондрий и клеточных мембран при стимуляции нейтрофила приводит к появлению активных метаболитов кислорода, которые нестабильны и реактивны [4]. Их действие улавливается теми мишенями, которые находятся в непосредственной близости. К таким мишеням относят различные соли тетразолия, используемые в качестве субстратов для определения активности ферментов. При анализе активности ЛДГ нами установлена более ранняя стимуляция нейтрофилов в ответ на введение вируса клещевого энцефалита. Это свидетельствует в пользу того, что вирус клещевого энцефалита оказывает более выраженное действие на кислородобразующую активность нейтрофилов, чем хантавирус. Нейтрофилы относятся к клеткам с преимущественно аэробным типом обмена, тем не менее повышение в них активности ЛДГ связывают с изменениями интенсивности гликолиза [1]. Так, образование богатых энергией фосфорных соединений путем анаэробного гликолиза свидетельствует об интенсификации энергообеспечения нейтрофилов. Этот путь окисления может быть расценен как компенсаторный механизм адаптивной реакции этих клеток на воздействие стимула. Обнаруженную в начальные сроки после заражения клещевым энцефалитом повышенную активность ЛДГ в нейтрофилах, на наш взгляд, следует расценивать как увеличение энергетического потенциала клетки, который является проявлением ее адаптивной реакции на внедрение возбудителя. На наличие относительной стабильности энергетического гомеостаза нейтрофилов, вероятно, указывали данные о внутриклеточном содержании ЛДГ после заражения клеток хантавирусом, т.к. повышенная активность этого фермента выявлялась в конце срока наблюдения.

Известно, что до 90% потребленного нейтрофилами кислорода идет на образование супероксидного радикала, а затем перекиси водорода [8]. Для ликвидации превышающего количества вредных окислителей клеточных компонентов, к которым относят активные метаболиты кислорода, в фагоцитах существует ряд ферментных систем-антиокислителей. К числу таковых принадлежит МПО, субстратом для которой является перекись водорода. Выявленная в начальные сроки контакта повышенная активность МПО в зараженных хантавирусом нейтрофилах отражает их защитную реакцию на внедрение данного инфекта. В то же время в нейтрофилах, инфицированных вирусом клещевого энцефалита, активация данного фермента не наблюдалась.

Таким образом, полученные результаты показывают, что вирус клещевого энцефалита оказывает более выраженное действие на кислородобразующую активность нейтрофилов, чем хантавирус. При этом в клетках обнаружена тенденция к анаэробному пути энергопродукции, что согласуется с повышением активности ЛДГ. Малая же активность МПО в нейтрофилах, инфицированных вирусом клещевого энцефалита, указывает на подавление защитной реакции клетки на внедрение этого возбудителя. Как показано

в настоящем исследовании, в конечном итоге это приводит к гибели нейтрофилов путем апоптоза.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (государственный контракт № 16.740.11.0182).

References

- Zenkov N.K., Menwikova E.B. Activated oxygen metabolites in biological systems, *Uspehi sovremennoj biologii*. М., 1993. Vol. 113, No. 3. P. 286–296.
- Kolman Ja., Rem K.-G. Visual biochemistry. М: Mir, 2000. 469 p.
- Pletnev A.G. The structure, organization and detection of genome-borne encephalitis virus: abstrakts. М., 1990. 304 p.
- Plehova N.G., Somova L.M., Drobot E.I. et al. The change in the metabolic activity of macrophages under the influence of tick-borne encephalitis, *Biohimija*. 2007. Vol. 72, No. 2. P. 236–246.
- Shepelev A.P., Kornienko I.V., Shestopalov A.V. et al. The free radical oxidation role in the infectious diseases pathogenesis, *Voprosy medicinskoj himii*. 2000. No. 2. P. 12–26.
- Arruda M.A., Barja-Fidalgo C. NADPH-oxidase activity: in the crossroad of neutrophil life and death, *Frontiers in Bioscience*. 2009. Vol.14. P. 4546–4556.
- Brinton M.A., Dispoto J.H. Sequence and secondary structure analysis of the 5'-terminal region of flavivirus genome RNA, *Virology*. 1988. Vol. 162. P. 290–299.
- Cross A.R., Jones O.T.G. Enzymic mechanisms of superoxide production, *Biochim. Biophys. Acta*. 1991. Vol. 1057. P. 281–298.
- Elbim C., Monceaux V., Mueller Y.M. et al. Early Divergence in Neutrophil Apoptosis between Pathogenic and Nonpathogenic Simian Immunodeficiency Virus Infections of Nonhuman Primates, *J. Immunol*. 2008. Vol. 181. P. 8613–8623.
- Engelich G., White M., Hartshorn K.L. Role of the respiratory burst in co-operative reduction in neutrophil survival by influenza A virus and *Escherichia coli*, *J. Med. Microbiol*. 2002. Vol. 51. P. 484–490.
- Fuchs T.A., Abed U., Goosmann C. et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps, *J. Cell. Biol*. 2007. Vol. 176, No. 2. P. 231–241.
- Kennedy A.D., DeLeo F.R. Neutrophil apoptosis and the resolution of infection, *Immunol. Res*. 2009. Vol. 43. P. 25–61.
- Schmaljohn C., Schmaljohn A., Dalrymple J. Hantaan virus M RNA: Coding strategy, nucleotide sequence, and gene order, *Virology*. 1987. Vol. 157. P. 31–39.
- Witko-Sarsat V., Rieu P., Descamps-Latscha L., et al. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects, *Laboratory Invest*. 2000. Vol. 80. P. 617–653.

Поступила в редакцию 18.04.2011.

FUNCTIONAL ACTIVITY OF NEUTROPHILS INFECTED BY RNA VIRUSES

I.N. Lyapun^{1,2}, N.G. Plekhova^{1,2}, L.M. Somova¹, E.I. Drobot¹, N.V. Kryilova¹, I.G. Maksema¹

¹Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Siberian Branch of Russian Academy of Medical Sciences (1 Selskaya St. Vladivostok 690087 Russian Federation), ²Far Eastern Federal University (27 Ok-tyabrskaya St. Vladivostok 690091 Russian Federation)

Summary – The paper comprises the findings related to the functional capacity of neutrophils infected by tick-borne encephalitis virus and Hantavirus. The authors found that tick-borne encephalitis virus have taken more significant effect on the oxygen-generating capacity of neutrophils rather than Hantavirus. As such, in the cells infected by causative agent of the tick-borne encephalitis virus, there was a tendency to anaerobic way of energy production that corresponded to an increase of the lactate de-hydrogenase activity. Thus, the reduced capacity of myeloperoxidase showed to suppression of cell protective potency in response to virus infiltration. **Key words:** neutrophils, enzymes, tick-borne encephalitis, Hantavirus.

Pacific Medical Journal, 2011, No. 1, p. 93–96.