

# ПРОДУКЦИЯ проММП-1 КУЛЬТИВИРУЕМЫМИ КЛЕТКАМИ СОСУДИСТОГО ЭНДОТЕЛИЯ *IN VITRO* И В ОРГАНИЗМЕ ЧЕЛОВЕКА

Н.Н. Склянкина, Н.В. Болдырева, А.А. Бабаянц, И.С. Фролова,  
Д.Л. Беляев, Ю.А. Портнова, О.Н. Щегловитова

ФГБУ «НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздравсоцразвития России

**Резюме.** Матриксные металлопротеиназы (ММП) — это структурно связанные эндопептидазы, в состав активных центров которых входят ионы  $Zn^{2+}$  и  $Ca^{2+}$ . Культивируемые клетки эндотелия кровеносных сосудов человека продуцируют ММП-1, протеолитический эффект которой направлен на расщепление коллагена I и III типов и последующее ремоделирование сосудов. ММП-1 синтезируется в виде неактивного профермента проММП-1. Показано, что IFN альфа, бета и гамма тормозили продукцию культурой ЭКПВЧ профермента ММП-1, что, по-видимому, характеризует их антиангиогенное действие. Эффект иммуномодуляторов сложен для объяснения: возможно, ингибирующее действие имунофана, также так и активирующее действие циклоферона, связаны с особенностями их структур. Действие IFN альфа, бета и гамма, использованных как до инфицирования ЭКПВЧ ВПГ-1, так и после него привело к уменьшению продукции проММП-1. Видимо, антиангиогенное действие IFN сохраняется и при инфицировании культур эндотелия сосудов ВПГ-1. Разброс в содержании проММП-1 в сыворотке крови доноров составлял 1,625–11,8 нг/мл и у больных хроническими микробно-вирусными инфекциями составлял 1,22–21,16 нг/мл. Более высокие показатели проММП-1 были у больных старшей возрастной группы. Для оценки работы системы ММП *in vitro* и в организме необходимо комплексное исследование, включающее проММП-1, активную форму профермента и специфический ингибитор ММП-1.

*Ключевые слова:* проММП-1, эндотелий сосудов, ЭКПВЧ, интерферон, иммуномодуляторы.

## ProMMP-1 PRODUCTION BY CULTIVATED CELLS OF VASCULAR ENDOTHELIUM *IN VITRO* AND IN A HUMAN BODY

Skliankina N.N., Boldyreva N.V., Babayants A.A., Frolova I.S., Belyaev D.L., Portnova Yu.A., Scheglovitova O.N.

**Abstract.** Matrix metalloproteinases (MMP) are structurally related endopeptidase composed of active sites which include ions  $Zn^{2+}$  and  $Ca^{2+}$ . Cultured cells of human blood vessels produce MMP-1, proteolytic effect is aimed at splitting the collagen I and III types, and subsequent vascular remodeling. MMP-1 is synthesized as an inactive zymogen proMMP-1. It was shown that interferon alpha, beta and gamma inhibited production by culture of HUVEC proenzyme MMP-1, which seems to characterize their anti-angiogenic action. The effect of immunomodulators is more difficult to explain: perhaps inhibiting effect of immunofan and, as well as activating effect of cycloferon due to their internal structural peculiarities. The action of interferon alpha, beta and gamma, used as HUVEC before infection with HSV-1, and after it led to decrease in production proMMP-1. Apparently, the antiangiogenic effect of IFN is saved in the case of infection of cultures of vascular endothelium with HSV-1. Scatter in the content of proMMP-1 in the serum of blood donors was 1.625–11.8 ng/ml and in patients with chronic microbial-viral infections was 1.22–21.16 ng/ml. Higher rates of proMMP-1 were in older patients group. To estimate the system of MMP *in vitro*, and in the body a comprehensive study must be conducted, including proMMP-1, the active form of proenzyme and specific inhibitor of MMP-1. (*Infekc. immun.*, 2011, vol. 1, N 3, p. 271–274)

*Key words:* proMMP-1, vascular endothelium, HUVEC, interferon, immunomodulators.

поступила в редакцию 04.04.2011  
принята к печати 10.04.2011

### Адрес для переписки:

Щегловитова Ольга Николаевна,  
д.м.н., профессор, зав. лабораторией  
противовирусного иммунитета  
ФГБУ НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи  
Минздравсоцразвития России

123098, Москва, ул. Гамалеи, 18,  
ФГБУ НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи  
Минздравсоцразвития России.  
Тел.: (499) 193-61-43.  
E-mail: scheglovitova@rambler.ru

© Склянкина Н.Н. и соавт., 2011

Матриксные металлопротеиназы (ММП) — это структурно связанные эндопептидазы, в состав активных центров которых входят ионы  $Zn^{2+}$  и  $Ca^{2+}$  [11]. К настоящему времени показано существование 25 членов семейства ММП, из которых 24 обнаружены у млекопитающих [3, 13]. Способностью синтезировать ММП обладает большое число клеточных популяций организма: макрофаги, нейтрофилы, фибробласты, эндотелиальные и гладкомышечные клетки стенки сосудов, хондроциты остеобласты и другие [6, 11]. Установлено, что действие ММП включает выделение ростовых факторов из клеточных мембран и экстраклеточного матрикса (ЭКМ), отщепление рецепторов ростовых факторов от клеточной поверхности, шеддинг молекул клеточной адгезии, активацию ММП, не обладающих катаболическими функциями, и другие [5, 7, 10, 13]. Согласно с этим, установлены важные функции ММП в эмбриогенезе, ангиогенезе, морфогенезе, ремоделировании тканей. С другой стороны отмечено увеличение активности ММП при большом числе патологических процессов, связанных с воспалением, фиброзом, артритом, канцерогенезом [4, 9, 13].

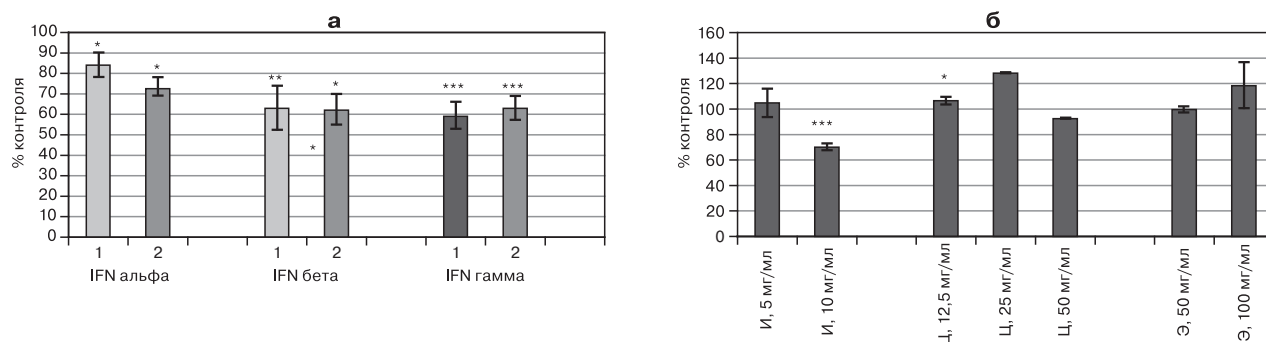
ММП оказывают воздействие на функционирование эндотелиальных клеток (ЭК) сосудистой стенки. ЭКМ, связывающий ЭК с базальной мембраной и между собой, под воздействием ММП подвергается конформационным изменениям и/или гидролизу [2], что приводит к высвобождению клеток из межклеточных контактов, их миграции, пролиферации и ангиогенезу. ЭК сами обладают способностью продуцировать ММП под влиянием ЭКМ, в результате чего на клеточной поверхности происходит образование активных мультипротеазных комплексов [6]. Одним из механизмов воздействия на патологические процессы является уменьшение патологического ангиогенеза. В частности было показано, что использование ингибиторов ММП приводило к уменьшению опухолевого ангиогенеза и деградация опухоли [8].

Культивируемые ЭК кровеносных сосудов человека продуцируют ММП-1, протеолитический эффект которой направлен на расщепление коллагена I и III типов на два фрагмента, которые подвергаются дезинтеграции под действием желатиназ [2]. ММП-1 синтезируется в виде неактивного профермента проММП-1. В данной работе исследовали влияние интерферона (IFN) и иммуномодуляторов (ИМ) на продукцию клетками эндотелия кровеносных сосудов проММП-1. В работе использовали рекомбинантные IFN альфа, бета и гамма и ИМ имунофан, циклоферон и эрбисол. Вирусная инфекция в организме приводит к развитию локального или системного воспалительного процесса. Инфицирование культуры ЭК вирусом простого герпеса 1 типа (ВПГ-1) приводит к ее провоспалительной мо-

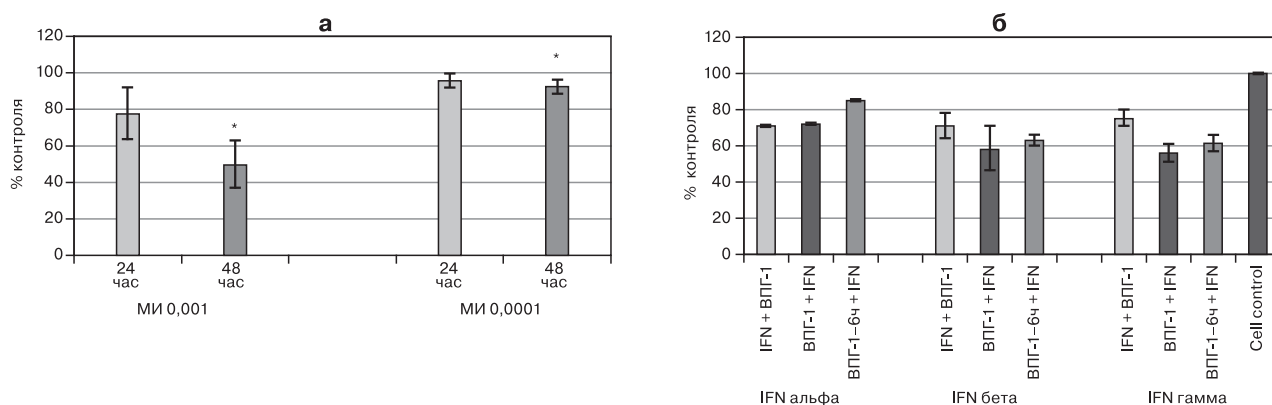
дификации [14]. Поэтому представляло интерес исследовать влияние инфекции ВПГ-1 на способность ЭК продуцировать проММП-1 и кроме этого влияние обработки IFN на способность ЭК, инфицированных ВПГ-1, продуцировать проММП-1. Кроме этого исследовали содержание проММП-1 в сыворотке крови людей, страдающих хроническими смешанными инфекциями микробно-вирусной этиологии.

Эндотелиальные клетки выделяли из вен пупочных канатиков (ЭКПВЧ), получаемых от здоровых женщин после нормальных родов, и культивировали по методу [14]. После образования монослоя клетки ресуспендировали трипсином с EDTA (Gibco), пересевали с плотностью  $10^5$  кл/см<sup>2</sup> на 24 луночные платы и использовали 3–4 дневный монослой клеток. Использовали рекомбинантные IFN альфа (IFN $\alpha$ 2b, Имунофарм, Россия), IFN бета (IFN $\beta$ -1b — Betaferon, любезно предоставленный Schering AG Германия) и IFN гамма (IFN $\gamma$ 1b, любезно предоставленный Имунофарм, Россия). Имунофан (И) — гексапептид (ООО НПП «БИО-НОКС»), эрбисол (Э) — смесь низкомолекулярных соединений с высокой биологической активностью (ООО «ЭРБИС») и циклоферон (Ц) — индуктор интерферона (НТФФ «Полисан»). ВПГ-1, штамм R39, получен из Банка ВОЗ. ЭКПВЧ инфицировали ВПГ-1 по методу [14]. При исследовании действия IFN на инфицированные ЭКПВЧ клетки обрабатывали IFN за 24 часа, сразу или через 6 часов после инфицирования ВПГ-1. Пробы культуральной среды отбирали через 24 часа. Образцы крови доноров и больных помещали в сухие пробирки, и после ретракции сгустка отсасывали сыворотки, которые до исследования хранили при  $-20^\circ\text{C}$ . Содержание ММП-1 в образцах тестировали методом иммуноферментного анализа с использованием тест-системы R&D Systems в соответствии с инструкцией. IFN тестировали на однодневном монослое культуры диплоидных фибробластов человека по торможению развития цитопатического действия 100 доз вируса энцефаломиокардита мышей. Результаты обрабатывали статистически по методу Стьюдента.

ЭКПВЧ спонтанно продуцировали проММП-1, ее накопление в культуральной среде к 24 часам составляло 85,6–112 нг/мл и к 48 часам составляло 105–139 нг/мл. Количество проММП-1 в культуральной среде ЭКПВЧ после воздействий выражали как процент относительно показателя количества проММП-1 в культуральной среде контрольных культур. После культивирования ЭКПВЧ с IFN альфа, бета или гамма ( $1 \times 10^5$  ед/мл и  $1 \times 10^4$  ед/мл) в течение 24 часов содержание проММП-1 в культуральной среде достоверно уменьшилось (рис. 1а). Эффект IFN гамма был более выражен. Следовательно, IFN альфа, бета и гамма тормозили продукцию культурой ЭКПВЧ профермента ММП-1, что,



**Рисунок 1.** Продукция проММП-1 культурой ЭКПВЧ после 24 часов культивирования с а) IFN альфа, IFN бета и IFN гамма. 1 — концентрация IFN  $1 \times 10^5$  ЕД/мл, 2 — концентрация IFN  $1 \times 10^4$  ЕД/мл; б) ИМ



**Рисунок 2.** Продукция проММП-1 ЭКПВЧ, инфицированными ВПП-1 (а), обработанными IFN альфа, IFN бета и IFN гамма в течение 24 часов до инфицирования и сразу или через 6 часов после инфицирования ВПП-1 (б)

по-видимому, и характеризует их антиангиогенное действие. Ранее сообщалось, что антиангиогенное действие IFN может быть связано также с его антипролиферативным действием [12].

Иммуномодулятор И в концентрации 10 мг/мл уменьшал продукцию проММП-1 в ЭКПВЧ, тогда как Ц в концентрации 12,5 мг/мл, активировал продукцию проММП-1. Эрбисол не оказал воздействия на продукцию проММП-1 ЭКПВЧ (рис. 16). Неясно, насколько связан этот результат с активацией ИМ продукции IFN. Иммуномодуляторы в культуре ЭКПВЧ при данной схеме эксперимента индуцировали продукцию IFN в сравнимых количествах: действие И в использованных концентрациях приводило к продукции  $21 \pm 3$  ед/мл и  $32,57,5$  ед/мл, действие Э —  $84 \pm 33,5$  ед/мл и  $62 \pm 17$  ед/мл и действие Ц —  $24 \pm 7$  ед/мл. Возможно, ингибирующее действие И, также так и активирующее действие Ц связаны с особенностями действия самих ИМ.

Через 48 часов после вирусного инфицирования продукция проММП-1 ЭКПВЧ снизилась и составляла  $49,82 \pm 13$  ТЦД<sub>50</sub>/мл для МИ 0,001 и  $92,4 \pm 3,7$  ТЦД<sub>50</sub>/мл для МИ 0,0001 (рис. 2а). Этот эффект мог быть связан с цитопатическим действием вируса. Поэтому в следующих экспериментах инфекция ВПП-1 составляла 24 часа. Интерферон в концентрации  $1 \times 10^5$  ЕД/мл вно-

силы за 24 часа до инфицирования клеток (МИ 0,0001 ТЦД<sub>50</sub>/клетку), а так же сразу или через 6 часов после инфицирования (рис. 2б). Действие IFN альфа, бета и гамма, использованных до инфицирования ЭКПВЧ ВПП-1 или после него, защищало клетки от цитопатического действия вируса и приводило к уменьшению продукции проММП-1. По-видимому, антиангиогенное действие IFN сохраняется и при инфицировании культур эндотелия сосудов ВПП-1.

Поскольку действие ММП связано с ремоделированием сосудов при хроническом воспалении исследовали содержание проММП-1 в сыворотке крови больных с хроническими смешанными инфекциями микробно-вирусной этиологии (в анамнезе: ВПП-1, хламидии и микоплазмы) (табл.). Разброс в содержании проММП-1 у доноров составлял  $1,625-11,8$  нг/мл и у больных —  $1,22-21,16$  нг/мл. Необходимо отметить, что у больных старшей возрастной группы отмечался иммунодефицит: снижение продукции IFN по сравнению с соответствующими показателями у доноров. Содержание проММП-1 в старшей возрастной группе было статистически достоверно выше, чем в молодой возрастной группе ( $11,4 \pm 3,517$  и  $1,97 \pm 0,4$  нг/мл,  $p = 0,033$ ).

Проследили изменение содержания проММП-1 в сыворотке крови трех больных при

**ТАБЛИЦА. СОДЕРЖАНИЕ IFN АЛЬФА, IFN ГАММА И проММП-1 В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ДОНОРОВ И БОЛЬНЫХ СМЕШАНЫМИ ИНФЕКЦИЯМИ**

Группы	Возраст	IFN альфа (ед/мл)	IFN гамма (ед/мл)	ПроММП-1 (нг/мл)
I больные (n = 4)	60,0±1,3	220±38,29	16,0±2,8	11,4±3,517
II больные (n = 3)	24,6±7,9 p I-II = 0,003	253,3±66,7	21,3±5,3	1,97±0,4 p II-I = 0,033
III доноры (n = 60)	32,3±6,8	330,66±9,6 p III-I = 0,005	32,9±0,97 p III-I = 0,001 p III-II = 0,012	5,467±1,16 (n = 10)

лечении антимикробными препаратами вместе с интерфероном альфа (Реаферон) и иммуномодуляторами И и Ц. У больной А. содержание проММП-1 до лечения составляло 11,13 нг/мл, через 2 месяца в процессе лечения ее содержание снизилось до 6,2 нг/мл и еще через 1 месяц после окончания лечения составляло 2,74 нг/мл. У больных Б. и С. количество проММП-1 в сыворотке крови до лечения составляло 1,22 и 1,96 нг/мл соответственно, тогда как после лечения — 1,635 и 2,225 нг/мл соответственно. Можно предположить, что комплексная терапия антимикробными препаратами, IFN и ИМ привели в организме больной А. к уменьшению воспаления и, как результат, к уменьшению количества проММП-1. При этом количество проММП-1 до лечения было на относительно высоком уровне. У больных Б. и С. после комплексной терапии практически не произошло изменения содержания в сыворотке крови проММП-1, однако изначально до лечения оно было на низком уровне.

Нельзя сказать однозначно, с чем связан большой разброс и близкие значения в содержании проММП-1 в крови доноров и больных хроническими заболеваниями. ММП секретируются клетками в виде неактивных ферментов — проММП. Физиологическими активаторами ММП, которые инициируют отщепление пропептида, являются плазмин и активатор плазминогена урокиназного типа [9]. Регуляция активности ММП осуществляется специфическими тканевыми ингибиторами ММП [15]. Поэтому для оценки работы системы ММП *in vitro* и в организме необходимо комплексное исследование, включающее проММП-1, активную форму профермента и специфический ингибитор ММП-1.

*Работа была частично поддержана грантом МНТЦ № 3505.*

## Список литературы

1. Соловьева Н.И. Матриксные металлопротеиназы: регуляция активности и роль в процессе онкогенеза // *Вопр. мед. химии.* — 2000. — № 5. — С. 30–31.
2. Bellon G., Martiny L., Robiner A. Matrix metalloproteinases and matrikines in angiogenesis // *Crit. Rev. Oncol. Haemathol.* — 2004. — Vol. 49, N 3. — P. 203–220.
3. Birkedal-Hansen H., Moore W.G., Bodden M.K., Windsor L.J., Birkedal-Hansen B., DeCarlo A., Engler J.A. Matrix metalloproteinases: review // *Crit. Rev. Oral. Biol. Med.* — 1993. — Vol. 4, N 2. — P. 197–250.
4. De Wever O., Derycke L., Hendrix A., De Meerleer G., Godeau F., Depypere H., Bracke M. Soluble cadherins as cancer biomarkers // *Clin. Exp. Metastasis.* — 2007. — Vol. 24, N 8. — P. 685–697.
5. Egeblad M., Werb Z. New function for the matrix metalloproteinases in cancer progression // *Nat. Rev. Cancer.* — 2002. — N 2. — P. 161–174.
6. Haas T.L. Endothelial cell regulation of matrix metalloproteinases // *Can. J. Physiol. Pharmacol.* — 2005. — Vol. 83, N 1. — P. 1–7.
7. Hayashida K., Bartlett A.H., Chen Y., Park P.W. Molecular and cellular mechanisms of ectodomain shedding // *Anat. Rec.* — 2010. — Vol. 293, N 6. — P. 925–937.
8. Heissig B., Hattori K., Friedrich M., Rafii S., Werb Z. Angiogenesis: vascular remodeling of the extracellular matrix involves metalloproteinases // *Curr. Opin. Haemathol.* — 2003. — Vol. 10, N 2. — P. 136–141.
9. Malemud C.J. Matrix metalloproteinases (mmps) in health and disease: overview // *Front Biosci.* — 2006. — N 11. — P. 1696–1701.
10. Mott J.D., Werb Z. Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases // *Curr. Opin. Cell Biol.* — 2004. — Vol. 16, N 5. — P. 558–564.
11. Nagase H., Woessner J.F. Matrix metalloproteinases // *J. Biol. Chem.* — 1999. — Vol. 274, N 31. — P. 21491–21494.
12. Ozato K., Taylor P., Kubota T. The interferon regulatory factor family in host defense: mechanism of action // *J. Biol. Chem.* — 2007. — Vol. 282, N 28. — P. 20065–20069.
13. Parks W.S., Wilson C.L., Lopez-Boado Y.S. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity // *Natl. Rev. Immunol.* — 2004. — Vol. 4, N 8. — P. 617–629.
14. Scheglovitova O.N., Romanov Yu.A., Maksianina E.V., Kabaeva N.V., Pronin A.G. 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 // *Russian J. Immunol.* — 2001. — N 6. — P. 367–376.
15. Woessner J. MMPs and TIMPs — an historical perspective // *Mol. Biotechnol.* — 2002. — Vol. 22, N 1. — P. 33–49.