

## СПОСОБНОСТЬ ВИРУСОВ ГРИППА ТИПА А И ИХ ПОВЕРХНОСТНЫХ БЕЛКОВ СТИМУЛИРОВАТЬ АПОПТОЗ И НЕКРОЗ КЛЕТОК ЭНДОТЕЛИЯ IN VITRO

© А. А. Азаренко,<sup>1</sup> А. Р. Прочуханова,<sup>1</sup> В. В. Зенин,<sup>2</sup> О. Г. Люблинская,<sup>2</sup>  
Н. М. Козлова,<sup>1</sup> И. Н. Жилинская<sup>1, \*</sup>

<sup>1</sup>Институт гриппа Минздрава РФ и <sup>2</sup>Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;  
\* электронный адрес: irina@influenza.spb.ru

Показано, что современные эпидемические штаммы вирусов гриппа типа А подтипов H5N1, H3N2 и H1N1pdm способны вызывать апоптоз клеток эндотелия *in vitro*. Как сами исследуемые вирусы, так и их поверхностные белки гемагглютинин и нейраминидаза вызывают активацию каспазы-3 через 0.5 ч после воздействия на клетки. Кроме того, вирусы гриппа и нейраминидаза (в концентрации 10 мкг/мл) приводят к появлению фосфатидилсерина на клеточной мембране в течение 2—8 ч после воздействия. В работе обсуждаются особенности апоптотической гибели клетки во время репродукции вируса, а также при воздействии вирусных белков.

Ключевые слова: вирус гриппа, гемагглютинин, нейраминидаза, апоптоз, каспаза-3.

В настоящее время исследованию эндотелиальных клеток сосудов уделяется повышенное внимание, поскольку они отвечают за обеспечение жизнедеятельности всего организма. Существенная роль эндотелиальных клеток в регуляции сосудистого тонуса, гемостаза, иммунных процессов, в функционировании многих органов привела к принципиально новому пониманию патогенеза многих сердечно-сосудистых, почечных, легочных и других заболеваний (Лупинская и др., 2008). Эндотелиоциты выполняют важнейшую тканевую барьерную функцию и в связи с этим являются мишенью для большинства патогенов, в том числе и для вируса гриппа (Chen et al., 2008; Sakao et al., 2005). Воздействие бактериальных или вирусных патогенов часто приводит к развитию программируемой клеточной гибели — апоптоза.

Как показывает анализ литературы, вирус гриппа индуцирует развитие апоптоза в клетках организма человека и экспериментальных животных, а также в клеточных культурах различного происхождения. Апоптоз, вызванный вирусом гриппа, был описан для клеток альвеолярного эпителия, лимфоцитов селезенки и легочных лейкоцитов у пациентов, умерших от инфекции вируса гриппа подтипа H5N1 (Uprasertkul et al., 2007; Gu et al., 2007). Данный вирус также вызывал апоптоз в дендритных клетках легких и лимфоузлах макак (Baskin et al., 2009) и в эндотелиальных клетках сосудов цыплят (Ito et al., 2002). Другие подтипы вируса гриппа вызывали апоптоз в различных первичных и перевиваемых клеточных культурах, таких как лимфоциты, бронхиолярные эпителиальные клетки, макрофаги и миелоидные дендритные клетки (Takizawa, Nakanishi, 2010). Однако данные о развитии апоптоза в эндотелиальных клетках человека, инфицированных вирусом гриппа, отсутствуют. Тем не менее этот вопрос представляет большой интерес, в связи с тем что во время пандемии гриппа 2009—2010 гг. часто выявлялись тяжелые осложнения в виде тромбоза

моррагических пневмоний и энцефалопатий, одной из основных причин которых было повреждение эндотелия вирусами (Черняев и др., 2010).

Ранее нами было показано, что вирус гриппа и его поверхностные белки способны модулировать гемостаз (Жилинская и др., 2011). Оказалось, что вирус гриппа может репродуцироваться в эндотелии как *in vitro*, так и *in vivo*, вызывая нарушения морфологии клеток эндотелия (Жилинская и др., 2012). Можно предположить, что именно репродукция вируса в эндотелиальных клетках служит причиной нарушения процесса гемостаза, приводящего к развитию диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови (сочетание гипер- и гипokoагуляции, приводящее к полиорганной недостаточности) — опасного осложнения гриппозной инфекции.

Целью настоящей работы было исследование способности вирусов гриппа типа А и их поверхностных белков — гемагглютинина и нейраминидазы — вызывать программируемую клеточную смерть в эндотелиальных клетках линии EAhy926. Об апоптотической гибели клетки судили по активации каспазы-3 и появлению фосфатидилсерина на внешней стороне плазматической мембраны клеток, выявляемому с помощью аннексина V.

### Материал и методика

Эндотелиальные клетки линии EAhy926 были любезно предоставлены д-ром Cora-Jean S. Edgell (Университет Северная Каролина, США). Линия воспроизводит основные фенотипические и функциональные характеристики эндотелиальных клеток макрососудов человека (Edgell et al., 1983). Продукция клетками EAhy926 тканевого активатора плазминогена и фактора фон Виллибранда является доказательством того, что клетки со-

храняют свойства эндотелиоцитов. Мы проводили регулярный контроль активности тканевого активатора плазминогена в клетках EAhy926 по методу Кудряшова и сотрудников (1974). Клетки культивировали в среде DMEM (Биолот, Россия), содержащей 10 % сыворотки эмбрионов коров (Sigma, США), НАТ (гипоксантин, аминоптерин и тимидин) (Sigma, США), 4 мМ L-глутамина и 100 мкг/мг гентамицина (Биолот, Россия). Пересев производили дважды в неделю. Монослой клеток дезинтегрировали 0.02 %-ным раствором этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) (Биолот, Россия).

Использовали 3 штамма вирусов гриппа типа А: 1) эпидемический штамм вируса гриппа человека А/Брисбейн/10/2007 (H3N2); 2) реассортантный штамм вируса гриппа птиц А/курица/Курган/5/05 NS1-81/5:3 (H5N1); 3) пандемический штамм А/Санкт-Петербург/2/2009 (H1N1pdm). Все вирусы получены из Лаборатории эволюционной изменчивости вирусов гриппа НИИ гриппа Минздрава РФ. Инфекционную активность вирусов гриппа определяли титрованием вирусосодержащего материала в 1-суточной культуре EAhy926 с коэффициентом 10 и рассчитывали по общепринятому методу (Reed, Muench, 1934). Инфекционную активность вирусов оценивали по ТЦД<sub>50</sub> (тканевая цитопатическая доза, вызывающая 50 %-ную гибель клеток при инфицировании их вирусом) и по реакции гемагглютинации с куриными эритроцитами через 72 ч после заражения.

Белки вируса — гемагглютинин и нейраминидазу — выделяли из сконцентрированного и очищенного вируса гриппа по описанному ранее методу (Жилинская и др., 2011). Контроль чистоты выделенного материала осуществляли при помощи электрофореза в полиакриламидном геле по методу Лэммли (Жилинская и др., 2011) с последующим анализом полос гелей на денситометре GS-800 (Bio-Rad Laboratories, США).

Для иммуногистоцитохимического определения активности каспазы-3-суточный монослой клеток EAhy926 выращивали на предметных стеклах, предварительно покрытых полилизинном. Затем клетки либо заражали вирусами по общепринятой методике (Жилинская и др., 2012), либо обрабатывали поверхностными белками вирусов в разной концентрации и в течение разного времени. Зараженные клетки, обработанные белками, и контрольные (без заражения и обработки) фиксировали на предметных стеклах смесью ацетона и этанола (1 : 1) в течение 0.5 ч, после чего обрабатывали с помощью набора моноклональных антител для выявления каспазы-3 (Novocastra, Англия). Для определения сайтов связывания первых антител использовали вторые антитела, меченные пероксидазой (Novolink, Англия). В качестве субстрата для визуализации пероксидазной активности применяли диаминобензидин (ДАБ), который в присутствии пероксидазы при окислении образует нерастворимые продукты коричневого цвета. Ядра клеток контрастировали гематоксилином Майера, окрашивающим клеточное ядро в голубой цвет.

Для оценки апоптоза эндотелиальные клетки (2500 тыс.) вносили в лунки 6-луночного планшета (Sarstedt, Австрия). 1-суточный монослой клеток либо заражали вирусами, либо обрабатывали поверхностными белками вирусов в разной концентрации и в течение разного времени (2, 4, 6, 8 и 10 ч), после чего дезинтегрировали монослой в 0.02 %-ном растворе ЭДТА (Биолот, Россия) и переносили клеточную суспензию в микропробирки. Для выявления фракции апоптотических клеток использовали комбинированную окраску иодистым пропидием (PI) и

аннексином V (AnV), конъюгированным с FITC (Annexin V kit 1, BD Biosciences, США). Окрашивали согласно инструкции фирмы-производителя. Анализ образцов проводили с помощью проточной цитометрии на приборе Epics XL (Becton Coulter, США), оснащенный аргоновым лазером с длиной волны 488 нм. Каждый эксперимент повторяли трижды. Количество апоптотических клеток определяли как долю клеток, окрашенных аннексином V, но не окрашенных иодистым пропидием (фракция AnV<sup>+</sup>PI<sup>-</sup>), выраженную в % от общего количества анализируемых клеток.

Жизнеспособность клеток оценивали методом проточной цитометрии с использованием PI, который окрашивает ДНК погибших клеток, но не проникает в живые клетки. Долю погибших и живых клеток определяли, используя двухпараметрическую гистограмму, отображающую PI-окраску клеток в зависимости от прямого светорассеяния.

Статистическую обработку результатов действия на клетки вирусов и нейраминидазы проводили, используя дисперсионный анализ. Различия считали достоверными при  $P < 0.01$  (Мерков, Поляков, 1974). В экспериментах с гемагглютинином результаты оценивали, используя критерий U Манна—Уитни. Различия считали достоверными при  $P < 0.05$  (Гланц, 1999).

## Результаты

Активация каспазы-3 выявлялась на ранней стадии заражения — через 0.5—1.5 ч после воздействия вируса и не зависела от подтипа вируса (рис. 1, а, б). Сравнительный анализ активации каспазы-3 поверхностными белками вирусов показал, что при тех же сроках воздействия, как и в случае самих вирусов (0.5—1.5 ч), минимальная концентрация нейраминидазы, вызывавшая активацию каспазы-3, была в 10 раз меньше, чем гемагглютинина (0.1 и 1 мкг/мл соответственно).

Вирусы гриппа подтипов H5N1, H3N2 и H1N1pdm вызывали появление фосфатидилсерина на поверхности клеток эндотелия через 2—4 ч после начала заражения; доля апоптотических клеток (AnV<sup>+</sup>PI<sup>-</sup>) через 6 ч достигала максимальной величины — 6 % от общего количества клеток для вируса гриппа подтипа H5N1 (рис. 2, б) (против 0.3 % в контроле). Аналогичные результаты были получены для вируса гриппа H3N2 (данные не показаны). Что касается вирусов гриппа подтипа H1N1pdm, максимальное количество (6 %) апоптотических клеток (AnV<sup>+</sup>PI<sup>-</sup>) регистрировали через 4 ч после инфицирования их вирусом (данные не показаны). Через 10 ч после инфицирования клеток вирусами количество аннексин-положительных клеток снижалось до уровня контроля.

Необходимо отметить, что при увеличении времени воздействия вирусов на клетки EAhy926, при отсутствии фракции клеток (AnV<sup>+</sup>PI<sup>-</sup>), наблюдали массовую гибель эндотелиальных клеток через 12—24 ч после заражения вирусами (рис. 2, в). Так, через 12 ч после заражения доля погибших клеток составляла 30 % для H3N2 и H5N1 и 40 % для H1N1pdm. По мере возрастания сроков репродукции вирусов (18, 24 и 48 ч) доля погибших клеток возрастала и через 48 ч составляла 60 % для H3N2 и 85 % для H5N1 и H1N1pdm (рис. 2, в).

Нейраминидаза вируса гриппа подтипа H3N2 вызывала появление фосфатидилсерина уже через 4 ч после воздействия в концентрации 10 мкг/мл (рис. 3, б). Максимальное количество апоптотических клеток (AnV<sup>+</sup>PI<sup>-</sup>) ре-



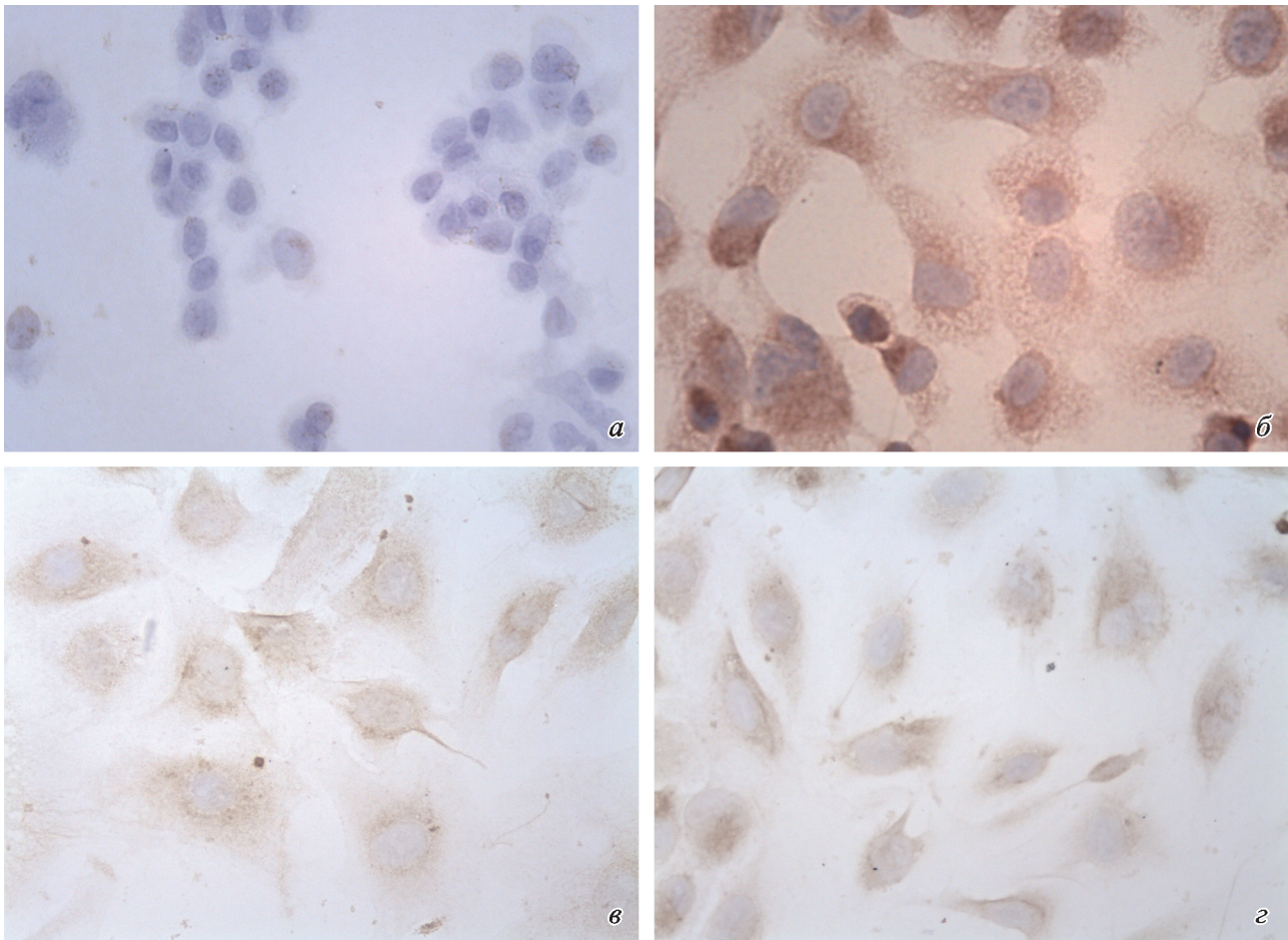


Рис. 1. Иммуногистохимическое определение активности каспазы-3 в культуре клеток EAh926 в контроле (а) и после инфицирования вирусом А/Курган/5/05/NS1-81/5:3(H5N1) в заражающей дозе 0.01ТЦД<sub>50</sub>/кл (б), воздействия гемагглютинина (1 мкг/мл) вируса гриппа А/Санкт-Петербург/2/2009 (H1N1pdm) (с) или нейраминидазы (0.1 мкг/мл) вируса гриппа А/Brisbane/10/2007 (H3N2). Длительность действия агента 0.5 ч. Коричневое окрашивание диаминобензидином визуализирует активность каспазы-3. Ядра клеток окрашены гематоксилином Майера в голубой цвет. Об. 40×.

гистрировали через 6 ч после воздействия (рис. 3, а, б). Через 8 ч доля таких клеток составляла 4.8 %, а через 10 ч соответствовала контрольному значению (рис. 3, б). Аналогичные результаты (не показаны) были получены для нейраминидазы вируса гриппа подтипа H5N1.

Гемагглютинин вируса гриппа А/Санкт-Петербург/2/2009(H1N1pdm) вызывал гибель эндотелиальных клеток через 6—8 ч после воздействия при концентрации 50 мкг/мл, но гибель клеток носила, по всей видимости, не апоптотический характер, так как выхода фосфатидилсерина на поверхность мембраны не наблюдали (рис. 4, а, квадрат АВ2). Необходимо отметить, что из 3 исследованных гемагглютининов токсичность для клеток эндотелия была выявлена только у гемагглютинина вируса гриппа подтипа H1N1pdm. В случае вирусов H3N2 и H5N1 токсического действия их гемагглютининов на эндотелиальные клетки не наблюдали, а доля погибших клеток соответствовала контрольной (рис. 4, б).

### Обсуждение

Проведенные нами исследования показали, что все 3 вируса гриппа и их поверхностные белки (гемагглютинин и нейраминидаза) активировали каспазу-3 в эндоте-

лиальных клетках. В настоящее время каспаза-3 рассматривается не только как маркер апоптоза, но и как белок, участвующий в регуляции клеточного цикла и продукции цитокинов (Фильченков, 2003). Кроме того, показано, что активация каспазы-3 является необходимым условием для эффективной репродукции некоторых вирусов, так как ее ингибирование не увеличивает, а, наоборот, снижает продукцию вируса (Wurzer et al., 2003; Brydon et al., 2005; Galuzzi et al., 2008). Таким образом, активация каспазы-3 необходима как для развития апоптоза, так и для обеспечения успешной репродукции вируса.

Данные проточной цитометрии позволили нам определить количество клеток, находящихся в состоянии апоптоза. Так, при воздействии исследуемых вирусов доля апоптотических эндотелиальных клеток составляла 6 %. Доля аннексин V-положительных клеток в случае действия вирусов и нейраминидазы была приблизительно такой же и одинаковой (около 6 %). Для сравнения заметим, что в культуре клеток МДСК (пермиссивной культуре клеток для вируса гриппа), инфицированных вирусом гриппа подтипа H3N2, через 10 ч после заражения доля апоптотических клеток достигала 60 % (Seo et al., 2001). Разница в ответе на заражение этих двух клеточных культур, возможно, объясняется особенностями их физиологии. У эндотелиальных клеток в норме как в

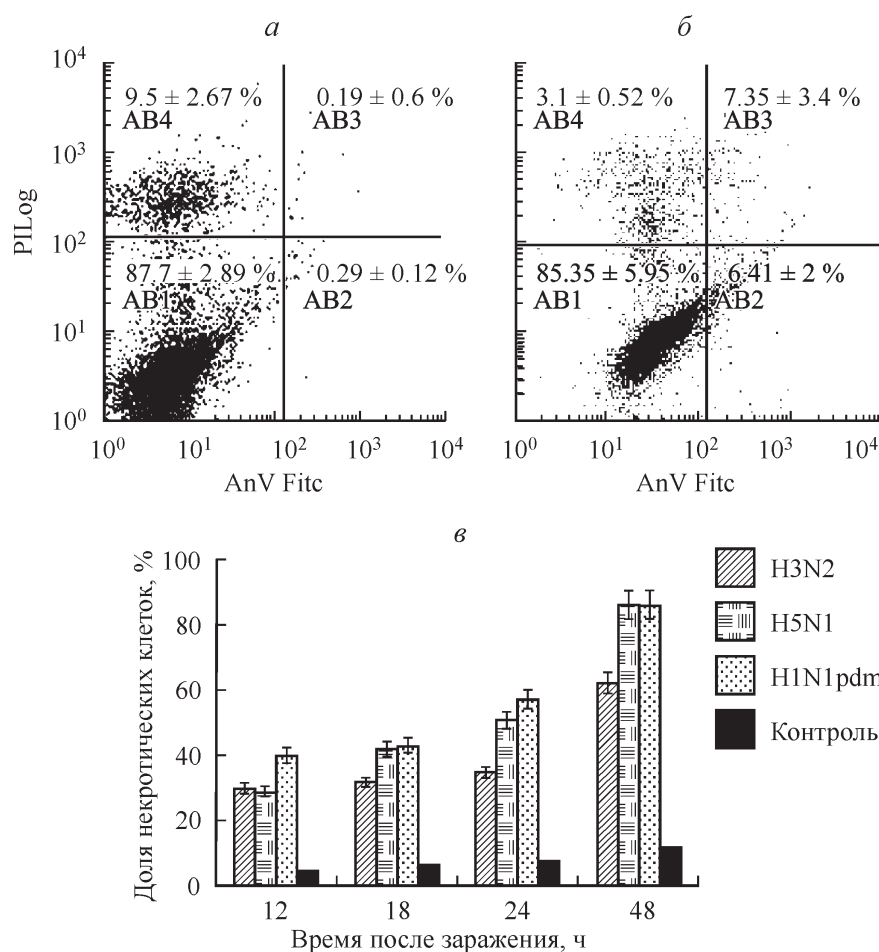


Рис. 2. Гистограммы, отражающие развитие процесса апоптоза (а, б) и общую гибель клеток (в) в культуре EAhy926 при инфицировании вирусом.

а — двухпараметрическая гистограмма, отражающая интенсивность флуоресценции клеток, меченных иодистым пропидием (PI) и аннексином V (AnV), конъюгированные с FITC в контрольной культуре; количество апоптотических клеток (%) соответствует доле (AnV<sup>+</sup>PI<sup>+</sup>)-клеток в *квадрате* AB2; б — то же через 6 ч культивирования с вирусом H5N1 (заражающая доза 0.01ТЦД<sub>50</sub>/кл); в — зависимость доли погибших (PI<sup>+</sup>) клеток (%) от времени заражения вирусом в дозе 0.01ТЦД<sub>50</sub>/кл по результатам трех независимых экспериментов, представлены средние значения ( $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$ ),  $P < 0.01$ .

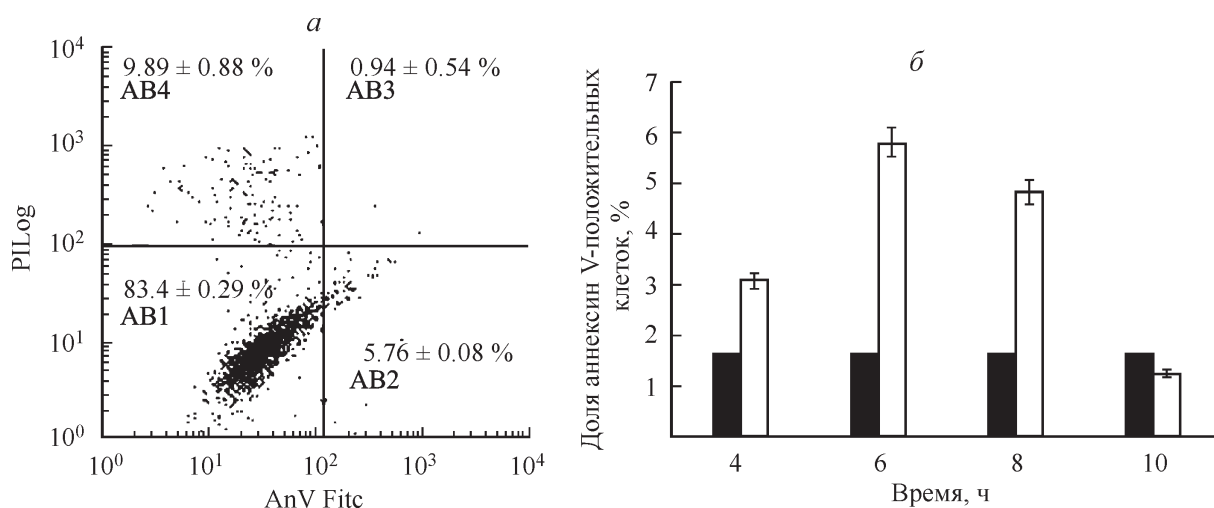


Рис. 3. Апоптоз в культуре клеток EAhy926 при воздействии нейраминидазы (10 мкг/мл) вируса гриппа A/Brisbane/10/2007 (H3N2).

а — доля апоптотических клеток (фракция AnV<sup>+</sup>PI<sup>+</sup>, *квадрат* AB2), выраженная в % от общего количества клеток, через 6 ч после воздействия; б — доля клеток AnV<sup>+</sup>PI<sup>+</sup> в контроле (*черные столбцы*) и после действия нейраминидазы (*светлые столбцы*) в зависимости от времени. Представлены средние значения  $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$  из трех независимых экспериментов,  $P < 0.01$ .

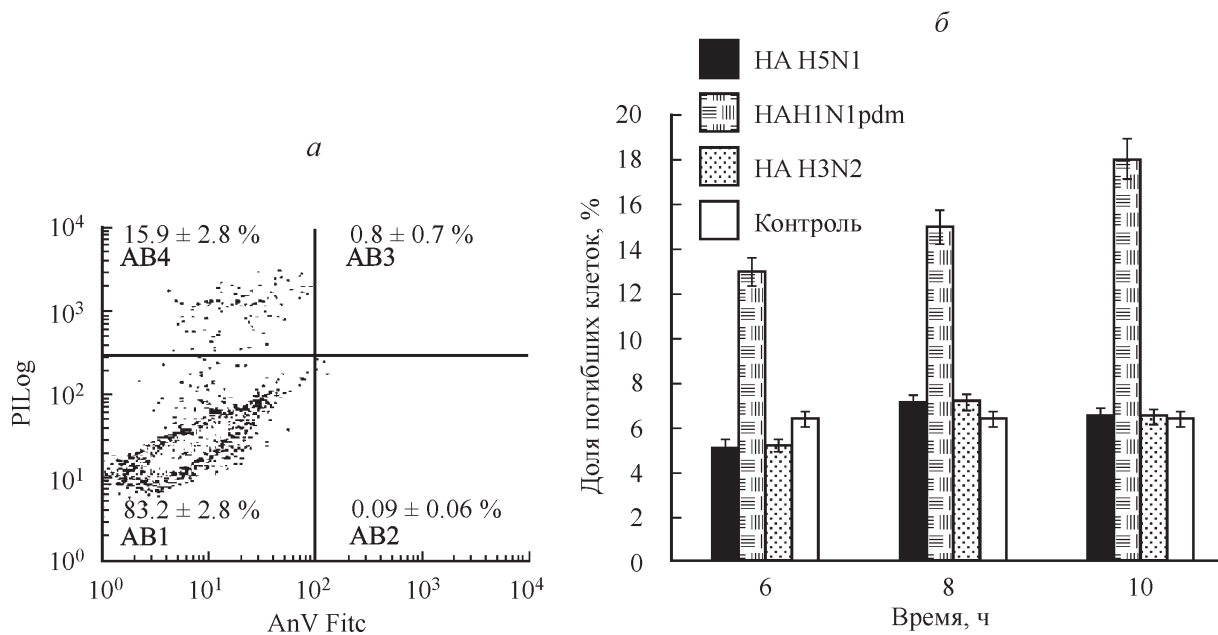


Рис. 4. Гибель клеток EAhy926 при воздействии гемагглютинина (HA, 50 мкг/мл) разных вирусов гриппа.

*а* — гистограмма, отражающая отсутствие апоптотической фракции клеток (фракция AnV<sup>+</sup>PI<sup>-</sup>, квадрат AB2) через 6 ч после воздействия HA вируса гриппа А/Санкт-Петербург/2/2009 (H1N1pdm); *б* — доля погибших (PI<sup>+</sup>) клеток (%), через 6—10 ч после воздействия HA трех вирусов в сравнении с контрольными клетками. Представлены средние значения  $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$  из трех экспериментов ( $P < 0.05$ ).

организме, так и в культуре доля апоптотических клеток очень мала (0.1 %) (Stefanec, 2000, 2004), поэтому возрастание этой доли до 6 % при инфицировании вирусами гриппа и при воздействии нейраминидаз указывает на их серьезные повреждения.

Интересно отметить большую способность гемагглютинина вируса А/Санкт-Петербург/2/2009(H1N1pdm) повреждать клетки эндотелия. Это, по-видимому, можно объяснить тем, что в структуре гемагглютинина этого вируса есть аминокислотные последовательности, мимикрирующие аминокислотные последовательности токсина скорпиона (Киселев, 2011).

Как указывалось выше, гемагглютинин вызывает активацию каспазы-3, но не стимулирует выхода фосфатидилсерина на поверхность мембраны клеток эндотелия. Количество аннексин V-положительных клеток при воздействии гемагглютинина соответствовало контролю. Можно предположить, что активация гемагглютинином каспазы-3 является необходимым условием успешной репродукции вируса, так как имеются данные о том, что активация каспазы-3 приводит к увеличению скорости транспорта рибонуклеопротеина вируса гриппа из ядра в цитоплазму клеток (Richard, Tulasne, 2012).

Помимо апоптоза, который мы наблюдали на ранних сроках заражения (2—8 ч), вирусы гриппа вызвали значительную гибель клеток на поздних сроках заражения (12—48 ч). Можно предположить, что гибель клеток шла по некротическому пути, однако для окончательного вывода о механизме клеточной гибели необходимы дополнительные исследования. Некроз в настоящее время (Манских, 2007) рассматривается как итог апоптоза в ситуации энергодифицита клетки и (или) результат действия сверхфизиологических индукторов. Можно предположить, что нарастание продукции вирусных частиц и является таким индуктором. Так, через 12 ч после заражения при отсутствии аннексин V-положительных клеток резко возрастала доля погибших клеток (до 40 %). При

увеличении времени репродукции вирусов до 24 и 48 ч доля погибших клеток составляла 60 и 80 % соответственно (рис. 2, в). Большое количество клеток, погибших в результате некроза, можно объяснить тем, что апоптоз клеток в организме заканчивается фагоцитозом апоптотических тел, а в условиях клеточной культуры развивается процесс некроза (Nyky et al., 2010).

Таким образом, полученные результаты позволяют утверждать, что исследуемые вирусы гриппа подтипов H3N2, H5N1, H1N1 и их поверхностные белки оказывают повреждающее действие на эндотелиальные клетки кровеносных сосудов человека. Эти данные согласуются с клинической картиной при гриппозной инфекции и должны учитываться при разработке схем лечения гриппа, так как, согласно современным данным, даже небольшая доля апоптотических эндотелиоцитов может являться маркером поражения кровеносных сосудов (Петрищев и др., 2008).

#### Список литературы

- Гланц С. 1999. Медико-биологическая статистика. М. 462 с.
- Жилинская И. Н., Азаренок А. А., Ильинская Е. В., Прочуханова А. Р., Воробьев С. Л., Сорокин Е. В., Царева Т. Р. 2012. Репродукция вируса гриппа в клетках эндотелия кровеносных сосудов человека. *Вопр. вирусол.* 2 : 20—23.
- Жилинская И. Н., Ляпина Л. А., Оберган Т. Ю., Решетникова О. Ю., Шалдэжян А. А., Азаренок А. А., Васин А. В., Киселев О. И. 2011. Активация фибринолиза белками вирусов гриппа человека и птиц. *Тромбоз, гемостаз и реология.* 4(48) : 70—78.
- Киселев О. И. 2011. Геном пандемического вируса гриппа А/H1N1v — 2009. СПб.; М.: Димитрейд график групп. 164 с.
- Кудряшов Б. А., Ляпина Л. А., Баскова И. П. 1974. Усовершенствование метода определения неферментативной фибринолитической активности плазмы крови и некоторых ее фракций. *Вестн. МГУ. Сер.биол.* 5 : 40—46.



- Лушинская З. А., Зарифьян А. Г., Гурович Т. Ц., Шлейфер С. Г. 2008. Эндотелий: функция и дисфункция. Бишкек: КРСУ. 373 с.
- Манских В. Н. 2007. Пути гибели клетки и их биологическое значение. Цитология. 49(11) : 909—915.
- Мерков А. М., Поляков Л. Е. 1974. Санитарная статистика (пособие для врачей). М.: Медицина. 384 с.
- Петрищев Н. Н., Васина Л. В., Луговая А. В. 2008. Содержание растворимых маркеров апоптоза и циркулирующих аннексин V-связанных апоптотических клеток в крови больных острым коронарным синдромом. Вестн. С.-Петербург. ун-та. 11(1) : 14—23.
- Фильченков А. А. 2003. Каспазы: регуляторы апоптоза и других клеточных функций. Биохимия 49(4) : 453—466.
- Черняев А. Л., Заиратьянц О. В. 2010. Патологическая анатомия гриппа А/Н1N1. Арх. патол. 3 : 70—76.
- Baskin C. R., Bielefeldt-Ohmann H., Tumpey T. M., Sabourin P. J., Long J. P., Garcia-Sastre A., Tolnay A. E., Albrecht R., Pyles J. A., Olson P. H., Aicher L. D., Rosenzweig E. R., Murali-Krishna K., Clark E. A., Kotur M. S., Fornek J. L., Proll S., Palermo R. E., Sabourin C. L., Katze M. G. 2009. Early and sustained innate immune response defines pathology and death in nonhuman primates infected by highly pathogenic influenza virus. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 106 : 3455—3460.
- Brydon E. W. A., Morris S., Sweet C. 2005. Role of apoptosis and cytokines in influenza virus morbidity. FEMS Microbiol. Rev. 29 : 837—850.
- Chen P., Easton A. 2008. Apoptotic phenotype alters the capacity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) to induce human vascular endothelial activation. J. Vasc. Res. 45 : 111—122.
- Edgell C. J., McDonald C. C., Graham J. B. 1983. Permanent cell line expressing human factor VIII — related antigen established by hybridization. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 80 : 3734—3737.
- Galluzzi L., Brenner C., Morselli E., Touat Z., Kroemer G. 2008. Viral control of mitochondrial apoptosis. PLoS Pathog. 4 (5) : 1—16.
- Gu J., Xie Z., Gao Z., Liu J., Korteweg C., Ye J., Lau L. T., Lu J., Gao Z., Zhang B., McNutt M. A., Lu M., Anderson V. M., Gong E., Yu A. C., Lipkin W. I. 2007. H5N1 infection of the respiratory tract and beyond: a molecular pathology study. Lancet. 370 : 1137—1145.
- Ito T., Kobayashi Y., Morita T., Horimoto T., Kawaoka Y. 2002. Virulent influenza A viruses induce apoptosis in chickens. Virus Res., 84 : 27—35.
- Nykky J., Tuusa J., Kirjavainen S., Vuento M., Gilbert L. 2010. Cell death mechanisms in a CPV infection. Int. J. Nanomed. 5 : 417—428.
- Richard A., Tulasne D. 2012. Caspase cleavage of viral proteases, another way for viruses to make the best apoptosis. Cell Death and Disease. 3 : e277.
- Sakao S., Taraseviciene-Stewart A., Lee J., Wood K., Cool C. D., Voelkel N. 2005. Initial apoptosis is followed by increased proliferation of apoptosis-resistant endothelial cells. FASEB J. 19 : 1178—1180.
- Seo Sh., Golubeva O., Webby R., Webster R. G. 2001. Characterization of a porcine lung epithelial. Cell J. Virol. 75 : 9517—9525.
- Stefanec T. 2000. Endothelial apoptosis. Could it have a role in the pathogenesis and treatment of disease? Chest. 117 : 841—854.
- Takizawa T., Nakanishi Y. 2010. Role and pathological significance of apoptosis induced by influenza. Open Antimicrob. Agents J. 2 : 22—25.
- Uprasertkul M., Kitphati R., Puthavathana P., Kriwong R., Kongchanagul A., Ungchusak K., Angkasekwinai S., Chokephai-bulkit K., Srisook K., Vanprapar N., Auewarakul P. 2007. Apoptosis and pathogenesis of avian influenza A (H5N1) virus in humans. Emerg. Infect. Dis. 13 : 708—712.
- Wurzer W. J., Planz O., Ehrhardt C., Giner M., Silberzahn T., Pleschka S., Ludwig S. 2003. Role of caspase 3 in influenza virus propagation. EMBO J. 22 : 2717—2728.

Поступила 5 XI 2012

#### ABILITY OF THE INFLUENZA VIRUSES AND THEIR ENVELOPE PROTEINS TO STIMULATES ENDOTHELIAL CELLS APOPTOSIS *IN VITRO*

A. A. Azarenok,<sup>1</sup> A. R. Prochuhanova,<sup>1</sup> V. V. Zenin,<sup>2</sup> O. G. Lyublinskaya,<sup>2</sup>  
N. M. Kozlova,<sup>1</sup> I. N. Zhilinskaya<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Research Institute of Influenza and <sup>2</sup> Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;  
\* e-mail: irina@influenza.spb.ru

The ability of the modern epidemic strains of influenza virus type A (subtypes H5N1, H3N2, H1N1pdm) and their surface proteins, hemagglutinin (HA) and neuraminidase to cause the activation of the cellular protein caspase-3 and stimulate the emergence of phosphatidylserine on the membrane of human endothelial cell line EAhy926 has been studied. It was questioned how the viruses and their surface proteins that were studied cause the activation of caspase-3 after 0.5 h of exposure that recorded immunogistotsitohimicheski. The test viruses and neuraminidase (concentration 10 µg/ml) led to the appearance of phosphatidylserine on the cell membrane in a time interval of 2—8 h from the beginning of the treatment, which was recorded by flow cytometry. The death of endothelial cells when exposed to the HA (in a concentration of 50 µg/ml) and in the same time frame was not accompanied by the appearance of phosphatidylserine. The specific feature of apoptotic cell death during the reproduction of the virus are described, as well as the effects of viral proteins.

Key words: influenza virus, hemagglutinin, neuraminidase, apoptosis, caspase-3.