

## ИЗМЕНЕНИЯ ДИНАМИКИ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК ЭНДОТЕЛИЯ ЧЕЛОВЕКА, ИНФИЦИРОВАННОЙ ВИРУСОМ ГРИППА

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

<sup>1</sup>Институт гриппа Министерства здравоохранения РФ и

<sup>2</sup>Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;

\* электронный адрес: [irina@influenza.spb.ru](mailto:irina@influenza.spb.ru)

Исследовали клеточный цикл в культуре клеток эндотелия EAhy 926, инфицированной вирусом гриппа. Цитометрический анализ культуры, синхронизированной контактным торможением, показал, что под действием вируса гриппа у клеток EAhy 926 удлиняется S-фаза клеточного цикла. Этот результат проверили и подтвердили на культуре EAhy 926, зараженной вирусом и обработанной нокадазолом. По сравнению с клетками карциномы легкого A549, у которых вирус гриппа провоцирует арест фазы G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> цикла, удлинение фазы S цикла при аналогичной инфекции эндотелиальной культуры EAhy 926 свидетельствует о том, что вирус гриппа в зависимости от происхождения инфицируемой культуры по-разному влияет на динамику клеточного цикла.

Ключевые слова: культура клеток эндотелия, клеточный цикл, вирус гриппа.

Роль эндотелиоцитов в работе всех систем органов трудно переоценить. Наряду с основной функцией поддержания гемостаза и регуляции воспалительного процесса в организме клетки эндотелия составляют основу гистогематических барьеров, т. е. регулируют диффузию, активный транспорт веществ и миграцию клеток иммунной системы из кровотока в окружающие ткани и обратно, участвуют в ангиогенезе и эндокринных процессах (Петрищев, Власов, 2003; Лупинская, 2008).

Барьерная роль эндотелия делает его мишенью вирусных патогенов (Kota, 2012). Ранее нами было показано, что вирусы гриппа способны репродуцироваться в клетках эндотелия как *in vitro* так и *in vivo* и вызывать их гибель путем апоптоза или некроза (Азаренок, 2014). Согласно современным данным, развитию индуцированного вирусом апоптоза может предшествовать изменение динамики клеточного цикла, так называемый арест его в определенной фазе (Stewart et al., 1997; Fehr, Yu, 2013). Показано, например, что некоторые ДНК-содержащие вирусы (аденовирусы, вирусы папилломы человека) провоцируют входение клеток в фазу S клеточного цикла, что позволяет реплицировать большое количество вирусных геномов (Cheng et al., 2013). Репродукция РНК-содержащего вируса иммунодефицита человека характеризуется арестом инфицированных клеток в фазах G<sub>2</sub>/M цикла (Stewart et al., 1997; Li et al., 2010). Другие РНК-содержащие вирусы (SARS, вирус гриппа) способны блокировать выход клеток из фаз G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> клеточного цикла (He et al., 2010).

В последнее время активно исследуется влияние вируса гриппа на клеточный цикл. При этом работы ведутся преимущественно на культурах эпителия легких (He et al., 2010; Wei et al., 2013). Клеточный цикл в культуре

клеток эндотелия, инфицированной вирусом гриппа, не исследован.

Целью настоящей работы явилось изучение динамики клеточного цикла в культуре клеток эндотелия человека, инфицированной вирусом гриппа.

### Материал и методика

Культура клеток. Работу проводили на культуре клеток эндотелия человека EAhy 926, любезно предоставленной д-ром Эджел (Университет Северная Каролина, США). Линия воспроизводит основные фенотипические и функциональные характеристики эндотелиальных клеток макрососудов человека (Edgell et al., 1983; Азаренок и др., 2014). Клетки культивировали в среде DMEM/F-12 с Хепесом и L-глутамином, содержащей 10 % эмбриональной сыворотки коров, НАТ (гипоксантин, аминоптерин и тимидин), 100 мкг/мл гентамицина. Пересев клеток производили 2 раза в неделю. Монослой дезинтегрировали 0.02%-ным раствором ЭДТА.

Синхронизацию культуры EAhy 926 в фазах G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> клеточного цикла проводили, используя эффект контактного торможения в плотной культуре клеток, активируя пролиферацию клеток пересевом их при низкой посевной дозе около 4 · 10<sup>5</sup> клеток в чашки Петри (JETBI-OFIL, США). Обработку культуры EAhy 926 нокадазолом проводили в течение 16 ч при конечной концентрации 0.05 мкг/мл.

Заражение клеток проводили эпидемическим штаммом вируса гриппа человека А/Брисбейн/10/2007 (H3N2) путем адсорбции вируса при 37 °С в атмосфере 5 % CO<sub>2</sub> в поддерживающей среде DMEM, содержащей

2 мкг/мл трипсина. В качестве контроля культивировали незараженные клетки EAhy 926. Вирус был получен из Лаборатории эволюционной изменчивости вирусов гриппа НИИ гриппа Минздрава РФ. Инфекционную активность вируса определяли титрованием вирусосодержащего материала в 1-суточной культуре EAhy 926 с коэффициентом 10 и рассчитывали по общепринятому методу (Reed, Muench, 1938). Дозу вируса 0.001 ТЦД<sub>50/клетка</sub> выбрали на основании данных, полученных нами ранее, как не вызывающую раннего апоптоза (Азаренок, 2014). Синхронизированную в фазах G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> клеточную культуру EAhy 926 через 12 ч после активации пролиферации инкубировали в поддерживающей среде, содержащей вирус, в течение 1 ч. Затем среду с вирусом удаляли и клетки продолжали инкубировать в поддерживающей среде в течение 3 сут.

В опыте с нокодазолом через 12 ч после запуска пролиферации клеточную культуру EAhy 926 инкубировали в поддерживающей среде, содержащей вирус, в течение 1 ч. После этого среду с вирусом удаляли и клетки инкубировали в поддерживающей среде в течение 8 ч. Затем клетки делили на две части, к одной из которых добавляли нокодазол, и все клетки продолжали культивировать в поддерживающей среде еще 16 ч. В качестве контролей использовали клетки EAhy 926 без воздействия вируса с добавлением и без добавления нокодазола.

Анализ клеточного цикла. 1 раз в сутки контрольные и инфицированные клетки ресуспендировали в PBS, добавляли в суспензию сапонин (конечная концентрация 200 мкг/мл), РНКазу А (250 мкг/мл) и иодистый пропидий (50 мкг/мл), инкубировали 1 ч при комнатной температуре в темноте, после чего измеряли распределение клеток по количеству ДНК на проточном цитометре EpiXL (Beckman Coulter, США), оснащенный аргоновым лазером с длиной волны 488 нм. Анализ распределения клеток по фазам клеточного цикла проводили с использованием программных пакетов WinMDI 2.8 и ModFitLT (Verity Software House, Topsham, США). Параллельно проводили анализ роста контрольных и инфицированных клеток в камере Горяева. Все опыты и контроли выполняли в трех повторностях. Статистическую обработку результатов проводили, используя U-критерий Манна—Уитни. Различия считали достоверными при  $P < 0.05$  (Глов, 1982).

Реактивы. Среда DMEM/F-12 с Хепесом и L-глутамином (Биолот, Россия), 10%-ная эмбриональная сыворотка коров (Sigma, США), НАТ (гипоксантин, аминоптерин и тимидин) (Sigma, США), L-глутамин (Биолот, Россия), гентамицин (Биолот, Россия), ЭДТА (Биолот,

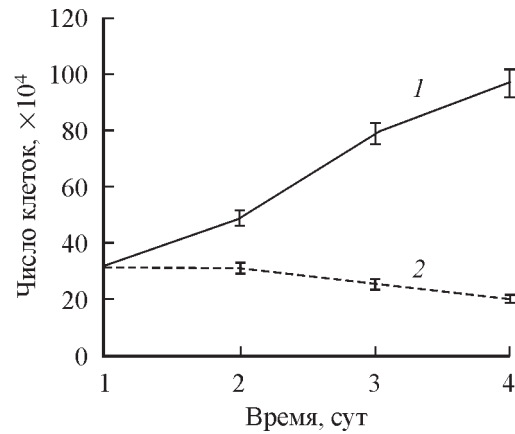


Рис. 1. Кривые роста клеток EAhy 926 в контроле (1) и при заражении вирусом гриппа (2).

Россия), нокодазол (Sigma, США), трипсин (Sigma, США), сапонин (Fluka, США), РНКазу А (Sigma, США), иодистый пропидий (Sigma, США).

## Результаты и обсуждение

В организме эндотелиальные клетки в основном находятся в фазах G<sub>0</sub> и G<sub>1</sub> клеточного цикла. В фазы S, а затем G<sub>2</sub> и M эндотелиоциты входят в условиях репаративного или онкогенного ангиогенеза, а также при патологии сосудов (Алимов, 1986; Lupinskaya и др., 2008).

Синхронизируя клетки EAhy 926 в фазах G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> с помощью контактного торможения в плотной клеточной культуре, мы моделировали состояние эндотелиоцитов в норме. Запуск пролиферации осуществляли пересевом с низкой посевной плотностью. Посевная доза подобрана нами таким образом, чтобы через 12 ч после посева клетки находились в фазах G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> клеточного цикла, а через 36 ч наблюдалась активная пролиферация.

Подсчет клеток в камере Горяева выявил различия в динамике роста между контрольными и инфицированными клетками EAhy 926 (рис. 1). Через 1 и 2 сут после заражения количество клеток в инфицированной культуре не менялось, тогда как в контроле на 2-е сут наблюдалось его увеличение. Через 3 сут после заражения количество клеток в инфицированной культуре снижалось, что говорит о гибели части клеток в результате вирусной репродукции. При этом в контрольной культуре продолжался рост (рис. 1).

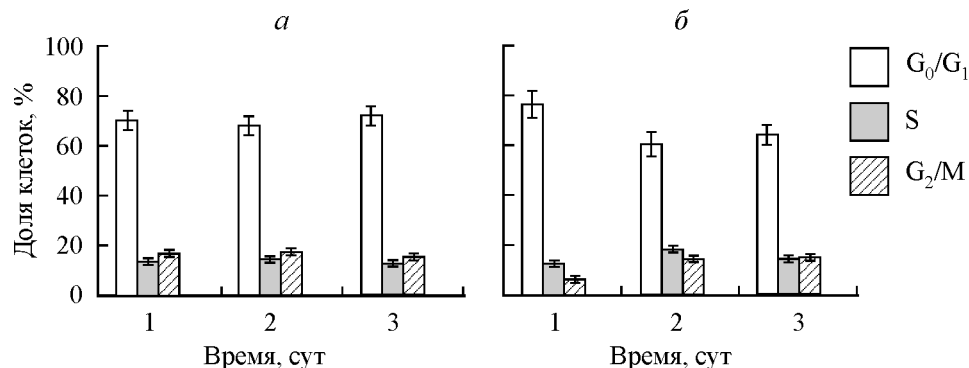


Рис. 2. Гистограмма распределения культуры EAhy 926 по фазам клеточного цикла в контроле (а) и при инфицировании вирусом гриппа (б).

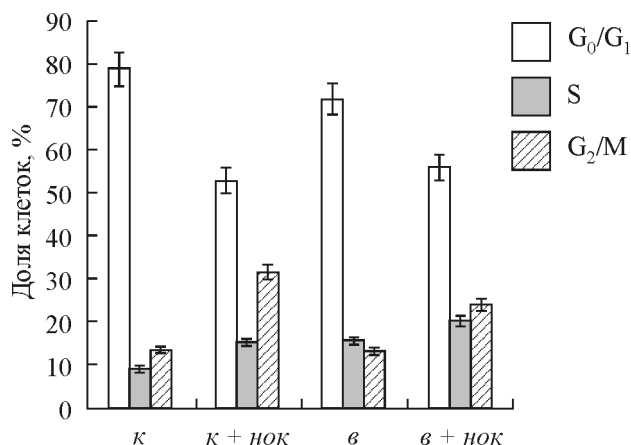


Рис. 3. Гистограмма распределения клеток культуры EAhy 926 по фазам клеточного цикла через 24 ч после заражения их вирусом гриппа с применением нокодазола.

к — контрольная культура; к+нок — контрольная культура, обработанная нокодазолом; в — культура, инфицированная вирусом; в+нок — культура, инфицированная вирусом и обработанная нокодазолом. Представлены средние значения по результатам трех независимых экспериментов,  $P < 0.05$ .

Цитометрический анализ динамики клеточного цикла клеток EAhy 926 выявил различия между контролем и опытом (рис. 2). Так, через 1 сут после заражения 78 % зараженных клеток находились в фазах G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, 16 — в фазе S, 6 % — в фазах G<sub>2</sub>/M, тогда как в контроле 71 % клеток были в фазах G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, 13 — в фазе S, 16 % — в фазе G<sub>2</sub>/M. На 2-е сут после заражения доля клеток в фазе S в зараженной культуре увеличилась до 20 %, что превышает аналогичную долю в контрольной культуре (рис. 2).

На 3-и сут после заражения количество клеток в фазе S в опыте немного уменьшилось (рис. 2). Однако на фоне общего уменьшения клеточной популяции при размножении вируса (рис. 1) эти изменения могут быть вызваны разной чувствительностью клеток, находящихся в разных фазах цикла. Сопоставление данных цитометрии с результатами анализа кривой роста позволило предположить, что при выбранной нами дозе заражения в инфицированной культуре клеток эндотелия наблюдается замедление прохождения клетками фазы S цикла. Для подтверждения этого предположения через 8 ч после заражения проводили обработку нокодазолом как контрольных клеток EAhy 926, так и инфицированных вирусом. Нокодазол, разрушая микротрубочки веретена деления клеток, синхронизировал нативную культуру EAhy 926 в фазах G<sub>2</sub>/M цикла. Если репродукция вируса в культуре замедляет или блокирует фазу S, то следовало ожидать, что добавление в культуру клеток нокодазола после воздействия на них вирусом ослабит или отменит синхронизацию культуры в фазах G<sub>2</sub>/M. Это и было показано в нашем опыте (рис. 3).

Как видно на рис. 3, через 1 сут после заражения в культуре клеток EAhy 926 под воздействием вируса наблюдается накопление клеток в фазе S. В контрольной культуре после обработки в течение 16 ч нокодазолом наблюдали увеличение количества клеток в фазах G<sub>2</sub>/M. Внесение в культуру нокодазола после заражения вирусом привело лишь к незначительному увеличению доли клеток, находящихся в фазах G<sub>2</sub>/M. Эти результаты подтверждают предположение о том, что вирус гриппа в

клетках эндотелия вызывает замедление фазы S клеточного цикла.

Полученные данные выявили ответ клеток эндотелиальной культуры EAhy 926 на репродукцию вируса гриппа — замедление фазы S клеточного цикла. Это является особенностью клеток EAhy 926, например по сравнению с клетками карциномы легкого A549, у которых вирус гриппа провоцирует арест фаз G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> цикла (He et al., 2010). Для клеток A549 показано также, что ключевую роль в аресте G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> фаз играет вирусный белок NS1 (Wei et al., 2013). Вероятно, характер влияния вирусов на клеточный цикл зависит от типа исследуемой клеточной культуры, что подтверждено для вируса Эбола (Kota et al., 2012).

Полученные результаты являются, на наш взгляд, достаточным основанием для проведения дальнейших исследований влияния вируса гриппа, а также его белков на динамику клеточного цикла в культуре клеток эндотелия.

### Список литературы

- Азаренок А. А. 2014. Роль вируса гриппа и его поверхностных белков в развитии дисфункции клеток эндотелия: Канд. дис. 183 с. (Azarenok A. A. 2014. Role of the influenza virus and the surface proteins in the development of endothelial cell dysfunction. Dissertation for the degree of candidate of biological sciences. 183 p.)
- Азаренок А. А., Ляпина Л. А., Оберган Т. Ю., Харченко Е. П., Козлова Н. М., Жилинская И. Н. 2014. Изменение активности тканевого активатора плазминогена клеток эндотелия под воздействием вируса гриппа типа А и его поверхностных белков. Тромбоз, гемостаз, реология. 1: 70—77. (Azarenok A. A., Liapina L. A., Obergan T. Y., Kharchenko E. P., Kozlova N. M., Zhilinskaya I. N. 2014. Change of activity of tissue plasminogen activator endothelial cells exposed to the influenza virus type A and its surface proteins. Thrombosis, haemostasis, rheology. 1: 70—77.)
- Алимов Г. А. 1986. Сосудистый эндотелий. Киев: Здоровья. 247 с. (Alimov G. A. 1986. Endothelium. Kiev: Zdorvya. 247 p.)
- Глотов Н. В. 1982. Биометрия: учебное пособие. Л.: Изд-во ЛГУ. 262 с. (Glotov N. V. 1982. Biometriya: a tutorial. L.: Publ. LSU. 262 p.)
- Лупинская З. А., Зарифьян А. Г., Гурович Т. Ц., Шлейфер С. Г. 2008. Эндотелий: функция и дисфункция. Бишкек: КРСУ. 373 с. (Lupinskaya Z. A., Zarifyan A. G., Gurovich T. Ts., Schleifer S. G. 2008. The endothelium: function and dysfunction. Bishkek: KRSU. 373 p.)
- Петрищев Н. Н., Власов Т. Д. 2003. Физиология патофизиология эндотелия. В кн.: Дисфункция эндотелия. Причины, механизмы, фармакологическая коррекция. СПб.: СПбГМУ. 4—38. (Petrishchev N. N., Vlasov T. D. 2003. Physiology and pathophysiology of endothelium. In: Endothelial dysfunction. Causes, mechanisms, pharmacological correction. St. Petersburg: State Medical University. 4—38.)
- Cheng X., Zhou D., Wei J., Lin J. 2013. Cell cycle arrest at G<sub>2</sub>/M and proliferation inhibition by adenovirus-expressed mitofusin-2 gene in human colorectal cancer all lines. Neoplasma. 60: 620—626.
- Edgell G. I., 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.
- Fehr A. R., Yu D. 2013. Control the host cell cycle: viral regulation of the anaphase — promoting complex. J. Virol. 87: 8818—8825.
- He Y., Xu K., Keiner B., Zhou J., Czudai V., Li T., Chen Z., Liu J., Klenk H. D., Shu Y. L., Sun B. 2010. Influenza A virus replication induces cell cycle arrest in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase. J. Virol. 84: 12 832—12 840.

Kota K. P., Benko J. G., Mudhasani R., Retterer C., Tran J. P., Bavari S., Panchal R. G. 2012. High content image based analysis identifies cell cycle inhibitors as regulators of Ebola virus infection. *Viruses*. 4 : 1865—1877.

Li G., Park H. U., Liang D., Zhao R. Y. 2010. Cell cycle G<sub>2</sub>/M arrest through on S phase-dependent mechanism by HIV-1 viral protein R. *Retrovirology*. 7 : 59—67.

Reed L. J., Muench H. 1938. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Amer. J. Hygiene*. 27 : 493—497.

Stewart S. A., Poon B., Jowert J. B., Chen I. S. 1997. Human immunodeficiency virus type1 Vpr induces apoptosis following cell cycle arrest. *J. Virol*. 71 : 5579—5592.

Поступила 10 XI 2014

#### DYNAMICS OF THE CELL CYCLE IN HUMAN ENDOTHELIAL CELL CULTURE INFECTED WITH INFLUENZA VIRUS

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

<sup>1</sup> Institute of Influenza, Ministry of Health of Russian Federation and

<sup>2</sup> Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;

\* e-mail: irina@influenza.spb.ru

Cell cycle in a culture of endothelial cells EAhy 926 infected with influenza virus was investigated. Cytometric analysis of culture, synchronized using contact inhibition, has shown that the exposure to the influenza virus in cells EAhy 926 lengthened S-phase of the cell cycle. This result has been tested and proven on culture EAhy 926 treated with nocodazole. Compared with lung carcinoma cells A549, in which influenza virus provokes the arrest of G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase of the cycle, elongation of S-phase of cycle at a similar infection of endothelial culture EAhy 926 indicates that the influenza virus differently affects the dynamics of the cell cycle according to the origin of the infected culture.

Key words: culture of endothelial cells, the cell cycle, influenza virus.