

## ВЛИЯНИЕ ВИРУСА ГРИППА А И БАКТЕРИАЛЬНОГО ЛИПОПОЛИСАХАРИДА НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ И ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ ЦИТОКИНОВ И ДРУГИХ КЛЕТОЧНЫХ ФАКТОРОВ В КЛЕТКАХ ПЕРЕВИВАЕМОЙ ЛИНИИ ЭНДОТЕЛИЯ ECV-304

© С. С. Смирнова,<sup>1,2</sup> М. М. Писарева,<sup>1</sup> Т. Д. Смирнова,<sup>1,\*</sup>  
М. А. Плотникова,<sup>1</sup> К. В. Сивак,<sup>1</sup> К. В. Воробьев<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Научно-исследовательский институт гриппа Министерства здравоохранения РФ,  
Санкт-Петербург, 197376,

<sup>2</sup> С.-Петербургский политехнический университет Петра Великого, 195251;

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

При вирусной инфекции и действии бактериальных липополисахаридов (LPS) происходит изменение состояния клеток эндотелия, что приводит к их дисфункции. Поэтому цель настоящей работы состояла в изучении влияния LPS *Escherichia coli* и вируса гриппа А на пролиферативную активность клеток эндотелия человека (ECV-304) и на экспрессию генов ряда цитокинов и клеточных факторов — *TNF $\alpha$* , *TGF $\beta$* , *IFN- $\gamma$* , *MMP-9*, *NF- $\kappa$ B*, *Rho A*, *eNOS* и *iNOS*. Обнаружено, что однократно инфицированные очень низкими дозами вируса гриппа клетки ECV-304 приобретают способность к длительной активной пролиферации (на протяжении 8 пассажей). Добавление LPS *E. coli* снижало вирусостимулированную пролиферацию клеток. Показано, что вирус гриппа и LPS могут влиять на экспрессию генов цитокинов и других клеточных факторов. При заражении клеток эндотелия вирусом гриппа А в присутствии LPS наблюдали значительное усиление экспрессии ряда генов и замену экспрессии одних генов экспрессией других. При одновременном добавлении в среду с клетками вируса и LPS экспрессия гена *MMP-9*, ингибируемая при раздельном воздействии вируса и LPS, значительно повышается в течение первых сут, как и активность гена *IFN- $\gamma$* ; ген *TNF $\alpha$*  активен только в течение 1—3 сут, тогда как экспрессия генов других факторов (*TGF $\beta$* , *eNOS*, *iNOS*, *NF- $\kappa$ B* и *Rho A*) значительно усиливалась только на 5-е сут, как и в случае добавления одного LPS. Таким образом, в присутствии вируса гриппа А и LPS происходит изменение физиологического состояния клеток эндотелия, которое в разные временные сроки (а также при разной степени инфицированности клеток вирусом) может вызываться разными клеточными факторами, возможно с вовлечением различных сигнальных путей.

Ключевые слова: клеточная линия эндотелия ECV-304, липополисахарид (LPS), вирус гриппа А, пролиферация, экспрессия цитокинов.

Принятые сокращения: ИД — инфицирующая доза, МИ — множественность инфекции, eNOS и iNOS — соответственно эндотелиальная и индуцибельная NO-синтаза, IFN- $\gamma$  — интерферон гамма, IL — интерлейкин, LPS — липополисахарид, MMP-9 — матриксная металлопротеиназа 9, NO — оксид азота, TGF $\beta$  — трансформирующий фактор роста бета, TLR — Toll-подобный рецептор, TNF $\alpha$  — фактор некроза опухоли альфа.

Вирус гриппа инфицирует клетки эпителия верхних и нижних дыхательных путей, что приводит к их повреждению, апоптозу и десквамации. При легкой степени заболевания эти повреждения обратимы, и в течение нескольких дней происходит репарация клеточного слоя (Armstrong et al., 2013). Известно, что в процессе инфекции клеток вирусом гриппа А происходит повышение продукции провоспалительных цитокинов — фактора некроза опухоли альфа (TNF $\alpha$ ), интерлейкина-6 (IL-6), интерлейкина-1 бета (IL-1 $\beta$ ) и связанного с ними транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B, что приводит к дисфункции клеток и их гибели путем апоптоза (Julkunen et al., 2001; Bernasconi et al., 2005; Schmolke et al., 2009). Вирус гриппа А вызывает также повышение уровня некоторых клеточных протеаз в клетках эндотелия, включая эктопический трипсин, который способен не только вызывать

посттрансляционное протеолитическое расщепление вирусного гемагглютинина, но и эффективно превращать предшественник матриксной металлопротеиназы 9 (про-MMP-9) в активную форму MMP-9. Индукция вирусом гриппа этих протеаз способствует деградации белков базальной мембраны, разрушению связи клеток с межклеточным матриксом, что может привести к изменению проницаемости клеток эндотелия и последующей органной недостаточности (Wang et al., 2010; Kido et al., 2012). Повышение до определенного уровня продукции TNF $\alpha$ , известного индуктора апоптоза, является защитной реакцией клетки на инфекцию вирусом гриппа (Seo, Webster, 2002). Кроме этого, TNF $\alpha$  связан с повышением продукции оксида азота (NO) и последующим апоптозом клеток, и этот процесс модулируется интерфероном гамма (IFN- $\gamma$ ) (McKinney et al., 2003). NO синтезируется с по-

мощью конститутивной эндотелиальной NO-синтазы (eNOS) и индуцибельной NO-синтазы (iNOS), экспрессия которой запускается под влиянием различных цитокинов, стрессов, бактериальных и вирусных агентов. Апоптоз в клетках, зараженных вирусом гриппа А, может индуцироваться также с помощью трансформирующего фактора роста бета (TGF $\beta$ ), при этом вирусная нейраминидаза выполняет роль активатора TGF $\beta$  (Schultz-Cherry, Hinshaw, 1996).

Воспаление и развитие дисфункции клеток эндотелия может быть вызвано циркуляцией в крови липополисахарида (LPS) — эндотоксина грамотрицательных бактерий — и носит название «синдром сепсиса». Клетки эндотелия экспрессируют два вида Toll-подобных рецепторов (TLR): преимущественно TLR-4 и на невысоком уровне TLR-2, которые регулируются как LPS и TNF $\alpha$ , так и IFN- $\gamma$ , что в свою очередь связано с повышением уровня NF- $\kappa$ B (Peters et al., 2003). LPS индуцирует продукцию провоспалительных цитокинов в основном через TLR-4 с последующим запуском внутриклеточных сигнальных путей, которые также приводят к активации и ядерной транслокации NF- $\kappa$ B (Meyer-Schwesinger et al., 2009). TNF $\alpha$  является одним из основных цитокинов, индуцируемых LPS, которые вызывают дисфункцию эндотелия не только в результате индукции апоптоза в клетках, но и через RhoA-индуцируемую активацию митоген-активируемых протеинкиназ, что приводит к повышению клеточной проницаемости (Mong et al., 2008; Meyer-Schwesinger et al., 2009).

Сравнительно недавно обнаружена способность LPS индуцировать превращение клеток эндотелия в активированные фибробласты, известные также как миофибробласты (Echeverria et al., 2013), через процесс, называемый эндотелиально-мезенхимным переходом, индукторами которого являются TGF $\beta$  1 и TGF $\beta$  2 (Van Meeteren, Dijke, 2012). TGF $\beta$  относится к семейству многофункциональных цитокинов, которые регулируют различные биологические процессы, включая дифференцировку клеток, пролиферацию и апоптоз. Влияние TGF $\beta$  на состояние клеток и их прохождение по клеточному циклу специфично и осуществляется через различные сигнальные пути (Undavia et al., 2004). TGF $\beta$  известен также как фактор, вызывающий дисфункцию эндотелиального барьера с вовлечением р38-сигнального пути и последующей активацией RhoA (Clements et al., 2005; Lu et al., 2006). Отмечена также роль TGF $\beta$  в возникновении фиброза легких и индукции апоптоза в клетках эпителия легких (Hagimoto et al., 2002).

Таким образом, изменения состояния клеток при вирусной инфекции и действии LPS, приводящие к дисфункции клеток эндотелия, на молекулярном уровне имеют много общего. Поэтому необходимо рассмотреть совместного воздействия вируса гриппа и LPS на клетки эндотелия.

Цель настоящей работы состояла в изучении влияния бактериального LPS и вируса гриппа на пролиферативную активность клеток эндотелия человека (ECV-304) и на экспрессию генов ряда цитокинов и клеточных факторов: TNF $\alpha$ , TGF $\beta$ , IFN- $\gamma$ , MMP-9, NF- $\kappa$ B, Rho A, eNOS и iNOS.

## Материал и методика

Перевиваемые клеточные линии. Спонтанно трансформированные клетки эндотелия человека (ECV-304) и клетки почки собаки (MDCK) получены из Коллекции клеточных культур научно-исследовательско-

го института гриппа Министерства здравоохранения РФ (Санкт-Петербург). Клетки культивировали в среде альфа-МЕМ, содержащей 2 % бычьей эмбриональной сыворотки без антибиотиков. Пересев клеток проводили на 6—7-е сут с кратностью 1 : 3—1 : 5, используя для отторжения клеток раствор Версена с химопсином.

Использовали вирусы гриппа А/Перт/16/11 (H3N2) и А/Санкт-Петербург/06/14 (H1N1pdm09), поддерживаемые на куриных эмбрионах. За одну инфицирующую дозу (ИД) в 1 мл принимали последнее десятикратное разведение вируса, титруемого на клетках MDCK. Посевная концентрация клеток ECV-304 составляла  $12 \cdot 10^5$  кл./мл, при этом множественность инфекции (МИ — величина, равная отношению заражающей дозы к количеству зараженных клеток) составила 0.004 при дозе заражения вирусом 1000 ИД и 0.000004 при дозе заражения 1 ИД.

Использовали LPS, полученный из *Escherichia coli* (Sigma-Aldrich, США), в конечной концентрации 100 нг/мл.

Заражение 1-суточного монослоя клеток ECV-304, выращенных в культуральных флаконах (50 мл, Nunc, Дания), проводили внесением 0.5 мл заранее оттитрованной вирусосодержащей жидкости по методике, описанной ранее (Даниленко и др., 2016). Заражение клеток проводили в трех вариантах: 1) только вирус (А/Перт/16/11 (H3N2)), 2) только LPS, 3) вирус и LPS одновременно. Контролем служили клетки, не содержащие вируса и LPS. В определенные сроки после воздействия (1, 3 и 5 сут) монослоем клеток снимали раствором Версена с химопсином, клетки пипетировали в среде альфа-МЕМ без сыворотки, отбирали по 0.1 мл суспензии для подсчета клеток, остальные клетки центрифугировали 10 мин при 1000 об/мин, осадок клеток замораживали при  $-20^\circ\text{C}$  для последующего определения экспрессии генов методом ПЦР в реальном времени. При изучении пролиферации клеток (выращенных во флаконах 50 мл) на протяжении длительного культивирования их заражали низкими дозами (ИД 1) вируса гриппа А/Перт/16/11 (H3N2) или А/Санкт-Петербург/06/14 (H1N1pdm), как описано выше. Далее клетки пересевали в соотношении 1 : 3 в среде, содержащей 1 % эмбриональной сыворотки, и проводили подсчет клеток на протяжении 8 пассажей.

Пролиферацию клеток определяли по подсчету клеток, не окрашенных трипановым синим, в камере Фукса—Розенталя по методике, описанной ранее (Даниленко и др., 2016). На каждую временную точку использовали по 2 пробы.

Оценка экспрессии генов цитокинов и других клеточных факторов методом ПЦР в реальном времени. РНК из исследуемых образцов выделяли с использованием комплекта реагентов АмплиПрайм РИБО-преп (ЦНИИ эпидемиологии, Россия) согласно инструкции. Для оценки экспрессии генов TNF $\alpha$ , TGF $\beta$ , IFN- $\gamma$ , MMP-9, NF- $\kappa$ B и Rho A проводили накопление кДНК на матрице РНК в реакции обратной транскрипции с помощью комплекта реагентов Реверта-Л (ЦНИИ эпидемиологии, Россия). Реакцию амплификации осуществляли в термоциклере Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия) по нескольким программам. Для MMP-9 и Rho A: денатурация при  $95^\circ\text{C}$  10 мин, 40 циклов при  $95^\circ\text{C}$  15 с, затем при  $60^\circ\text{C}$  50 с. Для TNF $\alpha$  и TGF $\beta$ : при  $95^\circ\text{C}$  5 мин, 40 циклов при  $95^\circ\text{C}$  20 с, затем при  $60^\circ\text{C}$  40 с. Для IFN- $\gamma$  и NF- $\kappa$ B: при  $95^\circ\text{C}$  5 мин, 37 циклов при  $95^\circ\text{C}$  10 с, затем при  $55^\circ\text{C}$  30 с и при  $72^\circ\text{C}$  30 с. Со-

**Последовательности праймеров и TaqMan-зондов  
для определения экспрессии генов цитокинов и других клеточных факторов**

Ген	F-праймер 5'—3'	Зонд 5'—3'	R-праймер 5'—3'
<i>eNOS</i>	TGGCTGGTACATGAGCACTGAGAT	R6G-ACAACATCCTGGAGGATGT GGCTGT-BHQ1	CACGTTGATTCCACTGCTGCCTT
<i>iNOS</i>	GCGTTACTCCACCAACAATGGCAA	FAM-AGCGGAGTGATGGCAAGC ACGACTT-BHQ1	ATAGCGGATGAGCTGAGCATTC
<i>Rho A</i>	CGGGAGCTAGCCAAGATGAAG	FAM-AGAGATATGGCAAACAGG ATTGGCG-BHQ1	GCTTGCAGAGCAGCTCTCGTA
<i>MMP-9</i>	CCTGGAGACCTGAGAACCAATC	FAM-TACCGCTATGGTTACTC GGGTGGC-BHQ1	GATTCGACTCTCCACGCATC
<i>NF-κB</i>	GCTCAGTGAGCCCATGGAAT	FAM-TCACCGGATTGAGGAGAA AC-BHQ1	TGATGCTCTTGAAGGTCTCAT ATGTC
<i>IFN-γ</i>	GCTTTTCAGCTCTGCATCGT	CY5-TGGCTGTTACTGCCAGGACC CA-BHQ2	CCGCTACATCTGAATGACCTG
<i>ACTB</i>	TCTACAATGAGCTGCGTGTGGC TCCC	CY5-CAAGGCCAACCGCGAGAA GATGACCCAGATCAT-BHQ2	AGCAACGTACATGGCTGGGGTG TTGAA

став реакционной смеси в объеме 25 мкл: 5 мкл кДНК, 10 мкл готового 2.5-кратного ПЦР-буфера (Синтол, Россия), 0.5 мкл SupTaq ДНК-полимеразы (5 ед./мкл) (Синтол, Россия), по 0.5 мкл растворов праймеров и зондов (10 пмоль/мкл).

Для определения экспрессии генов *eNOS* и *iNOS* реакцию амплификации проводили в один шаг с использованием реагентов из набора OneStep RT-PCR Kit (Qiagen, Германия). Состав реакционной смеси в объеме 25 мкл: 3 мкл РНК, 12.5 мкл готового 2-кратного OneStep RT-ПЦР-буфера, 1 мкл смеси ферментов (обратных транскриптаз и HotStarTaq ДНК-полимеразы), по 0.5 мкл растворов праймеров и зондов. Амплификацию проводили в том же термоциклере по следующей программе: реакция обратной транскрипции при 50 °С 30 мин, денатурация при 95 °С 10 мин, 37 циклов при 95 °С 15 с, затем при 58 °С 30 с.

Последовательности олигонуклеотидных праймеров и зондов для *eNOS*, *iNOS*, *MMP-9*, *NF-κB*, *Rho A* (Синтол, Россия) и *IFN-γ* (ДНК-Синтез, Россия) представлены в таблице. Праймеры и зонды для *TNFα* и *TGFβ* брали из соответствующих наборов реагентов для определения экспрессии этих генов (Синтол, Россия). В качестве внутреннего стандарта использовали праймеры к актину (*ACTB*) (ДНК-Синтез, Россия), экспрессия которого стабильна в клетках эндотелия.

Уровень экспрессии определяли 2—3 раза, конечный результат выражали в относительных единицах, показывающих изменение экспрессии генов относительно контроля на этом же сроке культивирования и рассчитанных по формуле  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , где  $C_t$  — значение порогового цикла анализируемого образца (Wong, Medrano, 2005).

Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакетов программ MS Office Excel 2007 и Statistica 6.0. Использовали U-тест Манна—Уитни для сравнения двух групп непараметрических выборок. Отличие от контроля считали достоверным при уровне значимости  $P < 0.05$ .

## Результаты

Пролиферация клеток ECV-304. В настоящей работе мы использовали бóльшую посевную концентрацию клеток (120 тыс./мл), чем ранее (Смирнова и др.,

2011, 2016; Даниленко и др., 2016), что вызвало смещение уровня максимальной вирусостимулированной пролиферации клеток при низкой дозе вируса (ИД 1) к 1-м сут, а далее происходило постепенное снижение вирусостимулированной пролиферации клеток к 5-м сут (рис. 1). LPS в концентрации 100 нг/мл усиливал пролиферацию в 1-е и на 5-е сут, но добавление LPS к клеткам, зараженным 1 ИД вируса гриппа, заметно снижало вирусостимулированную пролиферацию клеток на всех сроках наблюдения (рис. 1). Обнаружено, что клетки ECV-304, однократно инфицированные вирусом гриппа А/Перт/16/11 (H3N2) или А/Санкт-Петербург/06/14 (H1N1pdm), начиная с 3-го пассажа повышали пролиферативную активность почти в 3 раза по сравнению с контрольными клетками (небольшое снижение пролиферации клеток на 7-м пассаже вызвано пересевом зараженных клеток в соотношении 1 : 5, а не 1 : 3). Оба используемых вируса, принадлежащих к разным субтипам, оказывали одинаковый стимулирующий эффект на клетки эндотелия (рис. 2).

Экспрессия генов цитокинов и других клеточных факторов. Здесь и далее указано изменение экспрессии генов по сравнению с контролем на этом же сроке культивирования. Добавление одного LPS вызвало на ранних сроках (1—3 сут) небольшое (в 2.1—2.4 раза) повышение экспрессии только гена *TNFα*, но экспрессия его мРНК уже не обнаруживалась на 5-е сут. Экспрессия генов всех остальных исследуемых цитокинов и клеточных факторов в 1—3-и сут в присутствии LPS происходила, как правило, на уровне контроля или ниже, однако на 5-е сут экспрессия генов повышалась, и самый высокий уровень ее отмечен для мРНК *TGFβ* (в 21.3 раза выше контроля). Экспрессия мРНК *MMP-9* была повышена на 5-е сут в 2.1 раза, *IFN-γ* и *eNOS* — в 2.4 раза и *iNOS* — в 1.9 раза. Несколько выше на 5-е сут была экспрессия мРНК *NF-κB* — в 5.2 раза и *Rho A* — в 3.2 раза (рис. 3).

При инфицировании клеток только вирусом гриппа А/Перт/16/11 (H3N2) экспрессия генов *eNOS*, *iNOS*, *TGFβ*, *IFN-γ* и *NF-κB* в 1—3-и сут находилась преимущественно на уровне контроля или немного ниже. В 1-е сут отмечено увеличение экспрессии только гена *MMP-9* (в 2.4 раза) при заражении ИД 1 (рис. 3). На 3-и сут увеличилась экспрессия генов *TNFα* (в 3.6 раза при ИД 1 и

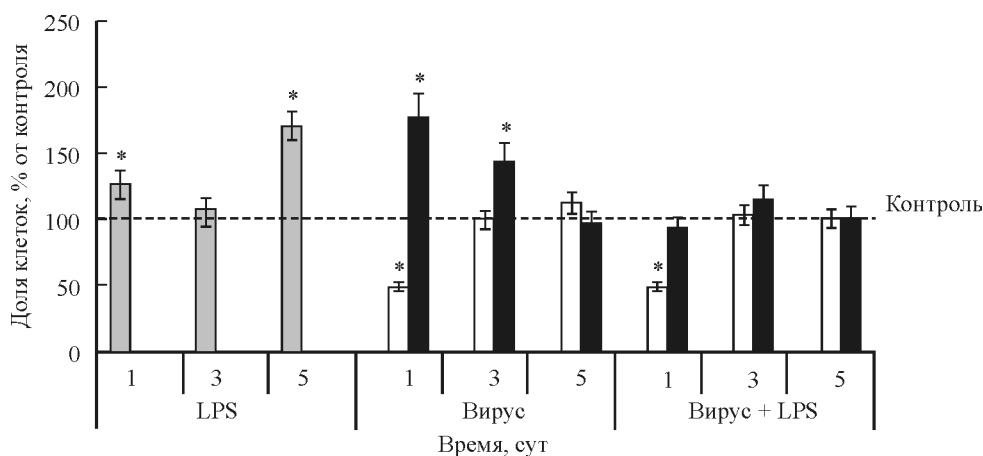


Рис. 1. Динамика пролиферации клеток ECV-304 в течение 5 сут под воздействием 100 нг/мл липополисахарида (LPS) из *Escherichia coli*, вируса гриппа А/Перт/16/11 (H3N2) и их комбинации (Вирус + LPS).

Инфицирующая доза (ИД) вируса составляла 1 (черные столбцы) и 1000 (светлые столбцы). Контроль — клетки, культивируемые в среде без воздействий. Здесь и на рис. 2, 3 звездочка показывает достоверность отличия от контроля при  $P < 0.05$ .

в 2.6 раза при ИД 1000) и *Rho A* (в 2.2 раза при ИД 1000). На 5-е сут была повышена экспрессия генов *TNF $\alpha$* , *TGF $\beta$* , *eNOS* и *iNOS* при высокой дозе вируса (ИД 1000) до 2.2, 5.9, 4.0 и 2.5 раза соответственно, а *NF- $\kappa$ B* при низкой (ИД 1) — до 3 раз. При этом в 1-е сут вирус гриппа подавлял экспрессию генов *Rho A* в 3.8 и 3.5 раза (при ИД 1 и 1000 соответственно), *TGF $\beta$*  — в 2.1 раза (при ИД 1000) и *NF- $\kappa$ B* — в 2 раза (при ИД 1). На 5-е сут при 1 ИД вируса экспрессия гена *TNF $\alpha$*  не обнаруживалась вообще (рис. 3). Обнаружено значительное снижение экспрессии мРНК *MMP-9* под воздействием только LPS (в 626 раз) или только одного вируса гриппа в высокой дозе (ИД 1000) (в 592 раза) в 1-е сут, а также на 3-и сут в 7.2 и 11.9 раза соответственно.

Одновременное присутствие в клетках ECV-304 вируса гриппа А и LPS заметно увеличивало в 1-е сут экспрессию только гена *MMP-9* при ИД 1 и 1000 (в 3.3 и 5.5 раза соответственно) и *IFN- $\gamma$*  при ИД 1000 (в 4.6 раза) (рис. 3). При этом в 1-е сут экспрессия других генов подавлялась: *TNF $\alpha$*  (в 3.4 раза при ИД 1000), *TGF $\beta$*  (в 2.4 и 3 раза), *NF- $\kappa$ B* (в 4.9 и 1.9 раза) и особенно *Rho A* (в 24 и 4.7 раза) при ИД 1 и 1000 соответственно (рис. 3). На 3-и сут экспрессия исследуемых генов в клетках, зараженных и вирусом, и LPS, наблюдалась преимущественно на уровне контроля, и только при высокой дозе заражения вирусом увеличивалась экспрессия гена *TNF $\alpha$*  (в 2 раза) и снижалась экспрессия гена *MMP-9* (в 2.4 раза). Однако на 5-е сут наблюдался значительный подъем экспрессии многих генов при ИД 1 и 1000 соответственно: *TGF $\beta$*  (в 18.4 и 17.8 раза), *NF- $\kappa$ B* (в 8.2 и 13.2 раза), *eNOS* (в 7.2 и 6 раз) и в меньшей степени *Rho A* (в 3.2 и 4.6 раза), *iNOS* (в 4.3 и 3 раза) и *MMP-9* (только при ИД 1000, в 2.5 раза) (рис. 3). Экспрессия гена *TNF $\alpha$*  на 5-е сут была либо подавлена (в 2 раза при ИД 1000), либо не обнаруживалась вообще (при ИД 1), как и в случае с заражением клеток одним вирусом или одним LPS (рис. 3). Обнаружено, что на 5-е сут происходит замена экспрессии гена *TNF $\alpha$*  на экспрессию гена *TGF $\beta$* . Обращает на себя внимание и стимулирующее влияние LPS на вирусиндуцируемую экспрессию генов большинства клеточных факторов на 5-е сут.

Корреляционный анализ показал прямую зависимость уровней экспрессии генов *TGF $\beta$*  с *eNOS*, *NF- $\kappa$ B* и

*Rho A* (коэффициенты корреляции Спирмена  $r_s$  составляют 0.51, 0.66 и 0.67 соответственно); уровень экспрессии гена *NF- $\kappa$ B* также прямо коррелировал с *iNOS* ( $r_s = 0.51$ ) и *Rho A* ( $r_s = 0.73$ ), а *eNOS* — с *iNOS* ( $r_s = 0.57$ ). Уровень экспрессии гена *MMP-9* коррелировал в прямой зависимости с *IFN- $\gamma$*  ( $r_s = 0.69$ ) и *iNOS* ( $r_s = 0.56$ ) и в обратной зависимости с *TNF $\alpha$*  ( $r_s = -0.51$ ). Таким образом, полученные нами результаты отражают изменение профиля экспрессии генов и, следовательно, состояния клеток на ранних и поздних сроках культивирования в присутствии патогенов (вируса гриппа и LPS).

## Обсуждение

Ранее мы использовали разные величины МИ, варьируя дозы заражения клеток вирусом и плотность посева клеток, и обнаружили, что это влияет на время появления вирусостимулированной пролиферации клеток эндотелиального происхождения. При очень низкой МИ (0.000001—0.00001) пролиферация повышалась в 1-е сут,

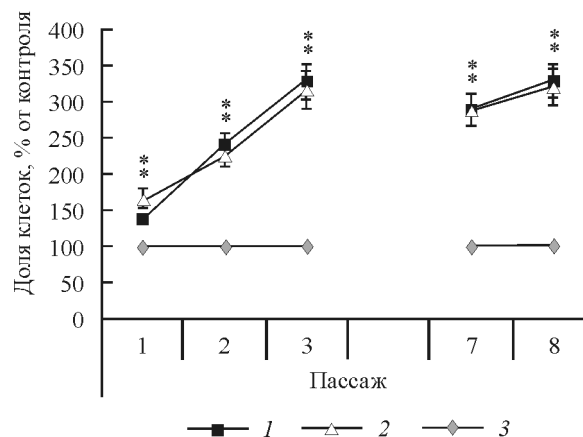


Рис. 2. Динамика пролиферации клеток ECV-304, зараженных вирусами гриппа А/Перт/16/11 (H3N2) (кривая 1) или А/Санкт-Петербург/06/14 (H1N1pdm09) (кривая 2), на протяжении 8 пассажей.

Кривая 3 — контроль.



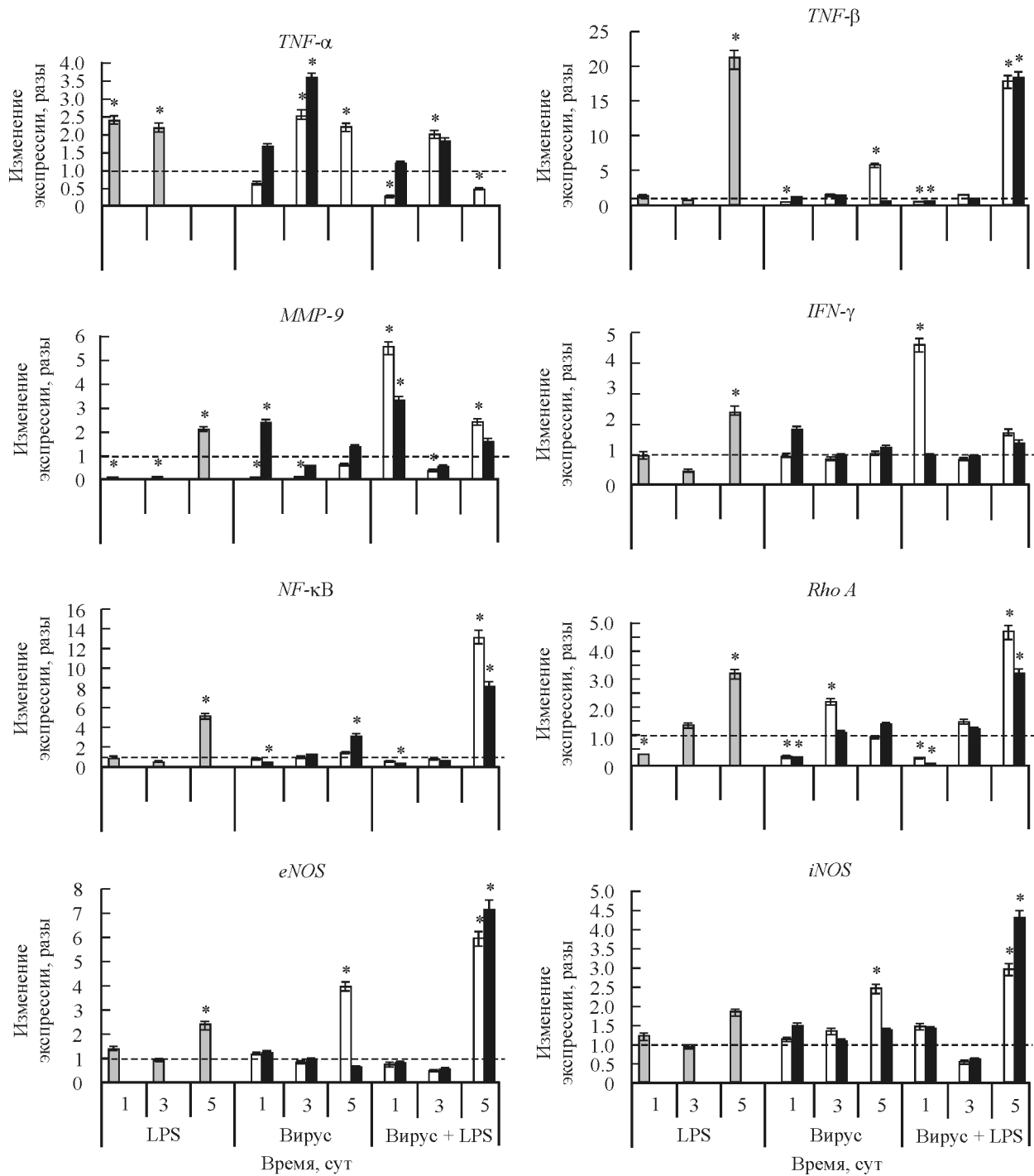


Рис. 3. Изменение экспрессии генов *TNFα*, *TGFβ*, *MMP-9*, *IFN-γ*, *NF-κB*, *Rho A*, *eNOS* и *iNOS* в клетках ECV-304 в течение 5 сут под воздействием 100 нг/мл липополисахарида (LPS) из *Escherichia coli* и вируса гриппа A/Перт/16/11 (H3N2).

ИД вируса составляла 1 (черные столбцы) и 1000 (светлые столбцы); пунктирная линия — контрольные клетки, культивируемые в среде без воздействий; контрольное значение принято за 1 (см. раздел «Материал и методика»).

а при более высокой МИ — на 3—5-е сут и на последующих пассажах (Смирнова и др., 2011, 2016; Даниленко и др., 2016). Одновременно с повышением пролиферации клеток происходило усиление апоптоза. В результате часть клеточной популяции элиминировалась, а оставшаяся часть клеток приобретала повышенную пролиферативную активность. В настоящей работе это же показано на клетках ECV-304, которые приобретали способность к длительной активной пролиферации (8 пассажей) после

заражения низкой дозой вируса гриппа А. То же показано нами на перевиваемых клетках Т-лимфоцитарного происхождения (Jurkat) после заражения низкой дозой вируса гриппа А (Смирнова и др., 2015).

В процессе культивирования клеток ECV-304, зараженных разными дозами вируса гриппа А в присутствии или в отсутствие LPS, обнаружено изменение экспрессии генов цитокинов и других факторов внутриклеточных сигнальных путей. Активность генов *TNFα*, *MMP-9* и

*IFN-γ* (больше связанных с изменением проницаемости клеток и апоптозом), более выраженная в 1—3-и сут, сменялась при последующем культивировании активностью генов *TGFβ*, *Rho A*, *NF-κB*, *eNOS* и *iNOS*, которые в большей степени связаны с повышением пролиферации и с изменением проницаемости клеток.

Наиболее яркие картины смены экспрессии одних генов на экспрессию других и значительного повышения их активности наблюдались при заражении клеток эндотелия вирусом гриппа А в присутствии LPS. В 1-е сут значительно повышалась экспрессия генов *MMP-9* (сильно подавленная при раздельном действии вируса и LPS) и *IFN-γ*, ген *TNFα* был активен только в 1—3-и сут. Активность генов всех остальных исследуемых факторов значительно повышалась только на 5-е сут, как и в случае добавления одного LPS. В это время самую высокую активность имеют гены *TGFβ* и *eNOS*, имеющие отношение к повышению пролиферации и увеличению проницаемости клеток (Lu et al., 2006; Di Lorenzo et al., 2013).

Известно, что вирус гриппа А способен влиять на клеточный цикл, вызывая его задержку на границе фаз  $G_0/G_1$ , наиболее благоприятных для полноценной вирусной репродукции (He et al., 2010). Показано, что для осуществления задержки клеточного цикла требуется участие вирусного белка NS1, который способен подавлять экспрессию и активность белка Rho A, в результате чего происходят снижение фосфорилирования белка ретинобластомы Rb и задержка прохождения клеток из фазы  $G_1$  в фазу S (Jiang et al., 2013). Вирусный неструктурный белок NS1 многофункционален и необходим для эффективной репликации вируса и проявления его вирулентности. Белок NS1 может связываться со многими клеточными белками и ингибировать экспрессию основных антивирусных и других генов клетки-хозяина (Hale et al., 2008). Можно предположить, что нарушение нормальной репродукции вируса гриппа А, наблюдаемое при культивировании вируса на непермиссивных клетках, выражается прежде всего в снижении или полном подавлении синтеза белка NS1, которое снимает блок экспрессии генов *Rho A* и других клеточных белков, участвующих в клеточном цикле, в результате чего усиливается пролиферация клеток. По нашим данным видно, что экспрессия гена *Rho A* подавлена в 1-е сут после заражения вирусом и (или) LPS, а на 5-е сут она повышается под воздействием одного LPS или LPS совместно с вирусом.

Как известно, действие клеточных факторов, экспрессию генов которых мы исследовали, в различной степени взаимосвязано друг с другом и с множеством других клеточных факторов. Мы рассмотрели влияние вируса гриппа и LPS на некоторые компоненты клеточных сигнальных путей на уровне транскрипции. Однако пока что нельзя сделать однозначный вывод об их связи с наблюдаемыми изменениями функционального состояния клеток эндотелия, поскольку активность клеточных факторов регулируется и на уровне трансляции и посттрансляционных модификаций, которые не рассматривались в настоящей работе.

Можно предположить, что изменение состояния клеток эндотелия при культивировании в присутствии вируса гриппа А и LPS в разные временные сроки (а также при разной степени инфицированности клеток вирусом) вызывается разными клеточными факторами, которые активируют различные сигнальные пути. Вирус гриппа и LPS сходным образом воздействуют на клетки, а их сочетанное влияние приводит к более выраженному ответу

клеток на эти патогенные агенты. При более продолжительном культивировании, возможно, это приведет не только к повышению пролиферации и клеточной проницаемости, но и к состоянию, вызывающему переход клеток эндотелия в фибробласто- и миофибробластоподобные, что может явиться причиной возникновения фиброзов в различных органах.

В последние годы проводится интенсивный поиск новых антивирусных препаратов и подходов для борьбы с вирусом гриппа А и его осложнениями. Применение при острых формах заболевания вирусом гриппа антивирусных препаратов с целью блокирования репликации вирусных частиц нередко малоэффективно и может приводить к возникновению вирусных частиц, устойчивых к данному препарату. Антибактериальные препараты вызывают разрушение бактерий, что приводит к появлению в кровеносном русле огромного количества бактериальных компонентов, в частности LPS. В этой связи ведутся поиски лечебных препаратов, обладающих антиоксидантной и противовоспалительной активностью, которые можно применять одновременно с антивирусными препаратами (Еропкин и др., 2007; Sgarbanti et al., 2014). Ведется поиск препаратов нового поколения, направленных на восстановление нормального функционирования клеточных сигнальных путей (Зарубаев, Смирнов, 2014). На разрабатываемой нами клеточной модели (ECV-304) проведено предварительное изучение влияния ряда лечебных препаратов, обладающих антиоксидантной, противовоспалительной и ангиопротекторной активностью, на физиологическое состояние клеток при заражении разными дозами вируса гриппа А и при добавлении LPS (Смирнова и др., 2016).

#### Список литературы

- Даниленко Д. М., Смирнова С. С., Смирнова Т. Д., Писарева М. М., Плотникова М. А., Дробинцева (Дурнова) А. О., Еропкин М. Ю. 2016. Ответ клеток перевиваемых линий карциномы легкого (A-549) и эндотелия (ECV-304) человека на заражение вирусом гриппа А при различной степени инфицированности клеток. Цитология. 58 (3) : 192—200. (Danilenko D. M., Smirnova S. S., Smirnova T. D., Pisareva M. M., Plotnikova M. A., Drobintseva (Durnova) A. O., Erokin M. Yu. 2016. Reaction of established cell lines of human lung carcinoma (A-549) and endothelium (ECV-304) to the infection with various multiplicity of influenza virus A. Tsitologiya. 58 (3) : 192—200.)
- Еропкин М. Ю., Гудкова Т. М., Коновалова Н. И., Шелканова С. М., Ягловская И. В., Еропкина Е. М., Киселев О. И. 2007. Антивирусная активность некоторых антиоксидантов/антигипоксантов и их комбинаций с ремантадином против вируса гриппа А(H3N2) человека при изучении на модели *in vitro*. Эксперим. клин. фармакол. 70 (1) : 33—37. (Erokin M. Yu., Gudkova T. M., Konovalova N. I., Shchelkanova S. M., Iaglovskaya I. B., Eropinkina E. M., Kiselev O. I. 2007. Antiviral action of some antioxidants/antihypoxants and their combinations with rimantadine against human influenza A(H3N2) virus studied on *in vitro* models. Exp. Clin. Pharmacol. 70 (1) : 33—37.)
- Зарубаев В. В., Смирнов В. С. 2014. Воздействие на клеточные мишени как средство борьбы с гриппозной инфекцией. Инфекция и иммунитет. 4 (1) : 15—26. (Zarubaev V. V., Smirnov V. S. 2014. Influence on cellular targets for treating influenza infection. Infect. Immun. 4 (1) : 15—26.)
- Смирнова Т. Д., Даниленко Д. М., Гудкова Т. М., Писарева М. М., Кадырова Р. А., Слита А. В. 2011. Влияние различных инфицирующих доз вирусов гриппа А на пролиферацию перевиваемых клеток человека. Клеточные культуры. Информ. бюл. 27 : 3—12. (Smirnova T. D., Danilenko D. M., Gudkova T. M., Pisareva M. M., Kadyrova R. A., Slita A. V. 2011. Influenza

ence of different doses of infectious influenza A viruses on proliferation of human monolayer cell cultures. *Cell Cultures. Inform. Bull.* 27 : 3—12.)

Смирнова Т. Д., Даниленко Д. М., Ильинская Е. В., Смирнова С. С., Еропкин М. Ю. 2015. Влияние заражения вирусом гриппа А при различной множественности инфекции на пролиферацию и индукцию апоптоза перевиваемых клеток лимфоцитарного и моноцитарного происхождения (Jurkat, NC-37, THP-1 и U-937). *Цитология.* 57 (7) : 526—532. (Smirnova T. D., Danilenko D. M., Ilyinskaya E. V., Smirnova S. S., Eroptkin M. Yu. 2015. Impact of various multiplicity of infection of influenza A virus on proliferation and apoptosis induction in cultured cell lines of lymphocytic and monocytic origin (Jurkat, NC-37, THP-1 and U-937). *Tsitologiya.* 57 (7) : 526—532.)

Смирнова Т. Д., Смирнова С. С., Сивак К. В., Еропкина Е. М., Еропкин М. Ю. 2016. Клеточная линия человека ECV-304 как модель для изучения влияния антиоксидантных препаратов на пролиферацию и апоптоз клеток при инфицировании вирусом гриппа А и в присутствии бактериального липополисахарида. *Клеточные культуры. Информ. бюл.* 32 : 14—28. (Smirnova T. D., Smirnova S. S., Sivak K. V., Eroptkina E. M., Eroptkin M. Yu. 2016. Human cell line ECV-304 as a model for the study of the effect of antioxidant preparations on the cellular proliferation and apoptosis under infection with influenza A virus and in the presence of bacterial lipopolysaccharide. *Cell Cultures. Inform. Bull.* 32 : 14—28.)

Armstrong S., Mubareka S., Lee W. 2013. The lung microvascular endothelium as a therapeutic in severe influenza. *Antiviral Res.* 9 : 113—118.

Bernasconi D., Amici C., La Frazia S., Ianaro A., Santoro G. 2005. The I $\kappa$ B kinase is a key factor in triggering influenza A virus-induced inflammatory cytokine production in airway epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 280 : 24 127—24 134.

Clements R., Minnear F., Singer H., Keller R., Vincent P. 2005. Rho and Rho-kinase dependent and independent signals mediate TGF- $\beta$ -induced pulmonary endothelial cytoskeletal reorganization and permeability. *Amer. J. Physiol. Lung Mol. Physiol.* 288 : L294—L306.

Di Lorenzo A., Lin M. I., Murata T., Landskroner-Eiger S., Schleicher M., Kothiya M., Iwakiri Y., Yu J., Huang P. L., Sessa W. C. 2013. eNOS-derived nitric oxide regulates endothelial barrier function through VE-cadherin and Rho GTPases. eNOS-derived nitric oxide regulates endothelial barrier function through VE-cadherin and Rho GTPases. *J. Cell Sci.* 126 : 5541—5552.

Echeverria C., Montorfano I., Sarmiento D., Becerra A., Nunez-Villena F., Figueroa X., Cabello-Verrugio C., Elorza A., Riedel C., Simon F. 2013. Lipopolysaccharide induces a fibrotic-like phenotype in endothelial cells. *J. Cell. Mol. Med.* 17 : 800—814.

Hagimoto N., Kuwano K., Inoshima I., Yoshimi M., Nakamura N., Fujita M., Maeyama T., Hara N. 2002. TGF-beta 1 as an enhancer of Fas-mediated apoptosis of lung epithelial cells. *J. Immunol.* 168 : 6470—6478.

Hale B., Randall R., Ortin J., Jackson D. 2008. The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses. *J. Gen. Virol.* 89 : 2359—2376.

He Y., Xu K., Keiner B., Zhou J., Czudai V., Li T., Chen Z., Liu J., Klenk H.-D., Shu Y., 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.

Jiang W., Wang Q., Chen Sh., Gao Sh., Song L., Lui P., Huang W. 2013. Influenza A virus NS1 induces G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> cell cycle arrest by inhibiting the expression and activity of RhoA protein. *J. Virol.* 87 : 3039—3052.

Julkunen I., Saraneva T., Pirhonen J., Ronni T., Melen K., Matikainen S. 2001. Molecular pathogenesis of influenza A virus infection and virus-induced regulation of cytokine gene expression. *Cytokine Growth Factor Rev.* 12 : 171—180.

Kido H., Okumura Y., Takahashi E., Pan H.-Y., Wang S., Yao D., Yao M., Chida J., Yano M. 2012. Role of host cellular proteases in the pathogenesis of influenza and influenza-induced multiple organ failure. *Biochim. biophys. acta.* 1824 : 186—194.

Lu Q., Harrington E., Jackson H., Morin N., Shannon Ch., Rounds Sh. 2006. Transforming growth factor- $\beta$ <sub>1</sub>-induced endothelial barrier dysfunction involves Smad2-dependent p38 activation and subsequent RhoA activation. *J. Appl. Physiol.* 101 : 375—384.

McKinney L., Galliger S., Lowy R. 2003. Active and inactive influenza virus induction of tumor necrosis factor- $\alpha$  and nitric oxide in J774.1 murine macrophages: modulation by interferon- $\gamma$  and failure to induce apoptosis. *Virus Res.* 97 : 117—126.

Meyer-Schwesinger C., Dehde S., von Ruffer C., Gatzemeier S., Klug Ph., Wenzel U., Stahl R., Thaiss F., Meyer T. 2009. Rho kinase inhibition attenuates LPS-induced renal failure in mice in part by attenuation of NF- $\kappa$ B p65 signaling. *Amer. J. Physiol. Renal Physiol.* 296 : F1088—F1099.

Mong Ph., Petruccio Ch., Kaufman H., Wang Q. 2008. Activation of Rho kinase by TNF- $\alpha$  is required for JNK activation in human pulmonary microvascular endothelial cells. *J. Immunol.* 180 : 550—558.

Peters K., Unger R., Brunner J., Kirkpatrick J. 2003. Molecular basis of endothelial dysfunction in sepsis. *Cardiovasc. Res.* 60 : 49—57.

Schmolke M., Viemann D., Roth J., Ludwig S. 2009. Essential impact of NF- $\kappa$ B signaling on the H5N1 influenza A virus-induced transcriptome. *J. Immunol.* 183 : 5180—5189.

Schultz-Cherry S., Hinshaw V. 1996. Influenza virus neuraminidase activates latent transforming growth factor  $\beta$ . *J. Virol.* 70 : 8624—8629.

Seo S., Webster R. 2002. Tumor necrosis factor alpha exerts powerful anti-influenza virus effects in lung epithelial cells. *J. Virol.* 76 : 1071—1076.

Sgarbanti R., Amatore D., Celestino I., Marcocci M.-E., Fraternali A., Ciriolo M.-R., Magnani M., Saladino R., Garaci E., Palamara A.-T., Nencioni L. 2014. Intracellular redox state as target for anti-influenza therapy: are antioxidants always effective? *Curr. Topics Med. Chem.* 14 : 2529—2541.

Undevia N., Dorscheid D., Marroquin B., Gugliotta W., Tse R., White S. 2004. Smad and p38-MAPK signaling mediates apoptotic effects of transforming growth factor- $\beta$ 1 in human airway epithelial cells. *Amer. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 287 : L515—L524.

Van Meeteren L., Dijke P. 2012. Regulation of endothelial cell plasticity by TGF- $\beta$ . *Cell Tissue Res.* 347 : 177—186.

Wang S., Le T., Kurihara N., Chida J., Cisse Y., Yano M., Kido H. 2010. Influenza virus-cytokine-protease cycle in the pathogenesis of vascular hyperpermeability in severe influenza. *J. Infect. Dis.* 202 : 991—1001.

Wong M. L., Medrano J. F. 2005. Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques.* 39 : 75—85.

Поступила 11 V 2016

INFLUENCE OF INFLUENZA A VIRUS AND BACTERIAL LIPOPOLYSACCHARIDE  
ON PROLIFERATION AND GENE EXPRESSION OF CYTOKINES AND OTHER CELLULAR  
FACTORS IN CELLS OF ESTABLISHED ENDOTHELIAL CELL LINE ECV-304

S. S. Smirnova,<sup>1,2</sup> M. M. Pisareva,<sup>1</sup> T. D. Smirnova,<sup>1</sup> \* M. A. Plotnikova,<sup>1</sup> K. V. Sivak,<sup>1</sup> K. V. Vorobiev<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Research Institute of Influenza of Ministry of Health of Russia, St. Petersburg, 197376, and

<sup>2</sup> Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, St. Petersburg, 195251;

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

Change of state of endothelial cells occurs under the action of viral infection and bacterial lipopolysaccharide (LPS) that leads to cell dysfunction. Therefore, the aim of the current study was to investigate the effect of LPS from *Escherichia coli* and influenza A virus on proliferative activity of human endothelial cells (ECV-304) and gene expression of several cytokines and cellular factors: *TNF $\alpha$* , *TGF $\beta$* , *IFN- $\gamma$* , *MMP-9*, *NF- $\kappa$ B*, *Rho A*, *eNOS* and *iNOS*. It was found that ECV-304 cells once infected with very low infectious doses of influenza virus acquire the ability to long-term active proliferation (over 8 passages). Addition of LPS *E. coli* reduced the virus-stimulated cell proliferation. It was shown that influenza virus and LPS can affect on gene expression of cytokine and other cellular factors. When endothelial cells had been infected with influenza A virus in the presence of LPS, there was a significant increase in the expression of several genes and replacement of some genes expression on the expression of other genes. Expression of *MMP-9* gene was inhibited in the case of separate exposure to the virus and LPS, but it was significantly increased during the first day under the adding of the virus and LPS together, as well as the activity of the *IFN- $\gamma$*  gene; gene of *TNF $\alpha$*  was active for only 1—3 days whereas genes expression of other factors (*TGF $\beta$* , *eNOS*, *iNOS*, *NF- $\kappa$ B* and *Rho A*) increased significantly at the 5th day as in the case of adding only LPS. Thus, the change of physiological state of endothelial cells occurs in the presence of influenza A virus and LPS and it can be caused during different time periods (as well as by varying degrees of virus infection of cells) by different cellular factors and possibly with involvement of different signaling pathways.

Key words: endothelial cell line ECV-304, lipopolysaccharide (LPS), influenza A virus, cell proliferation, expression of cytokines.

---