

ОТВЕТ КЛЕТОК ПЕРЕВИВАЕМЫХ ЛИНИЙ КАРЦИНОМЫ ЛЕГКОГО (А-549) И ЭНДОТЕЛИЯ (ЕСВ-304) ЧЕЛОВЕКА НА ЗАРАЖЕНИЕ ВИРУСОМ ГРИППА А ПРИ РАЗЛИЧНОЙ СТЕПЕНИ ИНФИЦИРОВАННОСТИ КЛЕТОК

© Д. М. Даниленко,¹ С. С. Смирнова,¹ Т. Д. Смирнова,^{1,*} М. М. Писарева,¹
М. А. Плотникова,¹ А. О. Дурнова,² М. Ю. Еропкин¹

¹ Научно-исследовательский институт гриппа Министерства здравоохранения РФ,
Санкт-Петербург, 197022, и

² Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии
и репродуктологии им. Д. О. Отта, Санкт-Петербург, 199034;

* электронный адрес: cellcultures@influenza.spb.ru

Путь, по которому пойдет инфекционный процесс, зависит как от биологических характеристик вирусов и клеток, так и от интенсивности заражения клеток вирусом, т. е. множественности инфекции. Цель работы состояла в сравнительном изучении ответа двух клеточных линий человека — карциномы легкого (А-549) и эндотелия (ЕСВ-304) — на заражение вирусом гриппа А при различной степени инфицированности клеток. На 1-м пассаже обе клеточные линии отвечали усилением пролиферации и индукцией апоптоза только на низкие дозы заражения вируса гриппа (1—10 ИД). В клетках А-549 стимулирующий эффект на низкие дозы вируса наблюдался на 1—2 сут раньше, чем в клетках ЕСВ-304. Со 2-го по 4-й пассаж повышение пролиферации наблюдали в клетках обеих линий, исходно зараженных более высокими дозами вируса (100 и 1000 ИД). Более того, ответ клеток А-549 на заражение низкими дозами вируса гриппа А подтипа Н3N2 зависел от условий поддержания вируса: усиления пролиферации клеток не наблюдалось в ответ на вирус, выращенный на куриных эмбрионах, в отличие от вируса, выращенного на клеточной культуре. Методом иммуноцитохимии показано, что в клетках А-549 на 3-и сут после заражения вирусом изменяется (зависимо от дозы заражения) внутриклеточная локализация белков p53 и циклина А, участвующих в прохождении клеточного цикла. При низкой дозе заражения вирусом в ядрах обнаруживался преимущественно циклин А (63 %), а при высокой дозе — белок p53 (54 %), что подтверждает стимуляцию клеточной пролиферации при очень низкой степени заражения клеток и задержку деления клеток при высокой степени инфицированности вирусом. Изучение репродукции вируса гриппа А в клетках А-549 и ЕСВ-304 с применением разных вирусологических методов показало низкую чувствительность этих клеток к вирусу гриппа А, что выражалось в постепенном снижении экспрессии вирусных РНК и нарушении формирования полноценных вирусных частиц в течение нескольких пассажей. Таким образом, при снижении множественности инфекции клеток А-549 и ЕСВ-304 нарушается репродукция полноценных вирусных частиц или синтез отдельных вирусных белков, что сопровождается усилением клеточной пролиферации и индукцией апоптоза. В результате сравнительного изучения двух клеточных линий (А-549 и ЕСВ-304) при заражении разными дозами вирусов гриппа А выявлены как общие закономерности, так и специфические различия, свидетельствующие о роли биологических особенностей вирусов, клеток и множественности инфекции клеток в развитии инфекционного процесса.

Ключевые слова: клеточные линии А-549 и ЕСВ-304, вирус гриппа А, пролиферация клеток, апоптоз, инфицирующая доза, экспрессия вирусной РНК.

Принятые сокращения: ДК — доля от контроля, ИА — индекс апоптоза, ИД — инфицирующая доза, МКА — моноклональные антитела, ТЦД₅₀ — титр цитопатического действия, вызывающего поражение 50 % клеток в монослое, ЦПД — цитопатическое действие, ФНО — фактор некроза опухоли, ЭС — эмбриональная сыворотка, НА — гемагглютинин, НА — нейраминидаза.

С 1977 г. в популяции людей наблюдается одновременная циркуляция вирусов гриппа подтипа А(H1N1) и А(H3N2). В 2009 г. новый пандемический вирус гриппа свиного происхождения А(H1N1)pdm09 — уникальный природный реассортант, содержащий фрагменты генома вирусов гриппа свиней, птиц и человека, — вытеснил из циркуляции вирусы сезонного гриппа подтипа А(H1N1),

и с 2010 г. наблюдается циркуляция вирусов гриппа А(H1N1)pdm09 и А(H3N2). Спорадически возникают вспышки заболеваний людей птичьим гриппом разных подтипов (H5N1, H7N1, H7N7, H7N9 и др.), который, к счастью, не сумел преодолеть межвидовой барьер и потому неспособен эффективно передаваться от человека к человеку (Киселев, 2011). В этой связи по-прежнему ак-

туальными остаются вопросы изучения трансмиссивности и тропизма вируса, что заставляет искать новые клеточные модели для изучения взаимоотношений вируса и клетки (van der Brand et al., 2010).

Помимо биологических особенностей клеток и вирусов большое значение для того, по какому пути пойдет развитие инфекционного процесса, имеет степень инфицированности клеток или организма, т. е. множественность вирусной инфекции. Ранее нами было показано, что заражение клеток низкими дозами вируса гриппа А вызывает усиление пролиферации и последующую индукцию апоптоза следующих клеточных линий человеческого происхождения: 14 перевиваемых супензионных клеточных линий гемобластозов (Смирнова и др., 2009, 2015), клеток глиобластомы (T—98) и спонтанно трансформированных клеток эндотелия (ECV-304) (Смирнова и др., 2011а), а также первичной культуры клеток эндометрия (Дурнова и др., 2012).

Цель нашей работы состояла в сравнительном изучении ответа клеточных линий человека (карциномы легкого A-549 и эндотелия ECV-304) на заражение вирусом гриппа А при различной степени инфицированности клеток. Актуальность выбора клеточных линий A-549 и ECV-304 обусловлена следующими соображениями. Основной мишенью вируса гриппа являются клетки эпителия верхних и нижних дыхательных путей, поэтому наибольшее распространение в качестве клеточной модели для изучения особенностей метаболизма клеток под воздействием вируса гриппа на молекулярном уровне получила клеточная линия карциномы легких человека A-549, представляющая собой пневмоциты 2-го порядка (Vester et al., 2009).

Другой мишенью, играющей важную роль в вирусном патогенезе, особенно при инфекции высокопатогенным вирусом птичьего гриппа, являются клетки эндотелия (Ocana-Macchi et al., 2009). Мы использовали постоянную клеточную линию эндотелия человека ECV-304, полученную в 1990 г. (Takahashi et al., 1990) из спонтанно трансформированных эндотелиоцитов пуповинной вены человека. Несмотря на сообщение о принадлежности клеток ECV-304 к клеткам карциномы мочевого пузыря человека T-24 (Brown et al., 2000), многочисленные морфологические, иммунохимические, биохимические и цитогенетические исследования показали, что клетки ECV-304 могут быть использованы в качестве эндотелиальной клеточной модели для решения ряда медико-биологических вопросов (Suda et al., 2001; Heath-Engel, Lingwood, 2003; Fujimoto et al., 2006; Ярцева, Федорцева, 2009). В вирусологических исследованиях на клетках ECV-304 изучали вирусы герпеса 1-го и 2-го типов (Chirathaworn et al., 2004; Zhang et al., 2014), краснухи (Mo et al., 2007), денге 2-го типа (Liew, Chow, 2004) и японского энцефалита (Shwetank et al., 2013). Однако мы встретили только одну работу с использованием этих клеток при изучении клеточных протеаз в патогенезе вируса гриппа (Kido et al., 2012).

В настоящей работе на протяжении нескольких пассажей нами изучены изменения пролиферации и апоптоза клеток A-549 и ECV-304 под воздействием разных доз заражения вирусами гриппа А, а также репродукция вируса: выход инфекционного вируса и его гемагглютинина (HA) из клеток и экспрессия РНК вирусных белков M1, HA и нейраминидазы (NA). Кроме этого, методом иммуноцитохимии изучена внутриклеточная локализация белков, регулирующих клеточный цикл (p53 и циклина А),

при различной степени инфицированности клеток. В результате проведенных исследований показаны как общие закономерности изменения состояния клеток A-549 и ECV-304 под воздействием вируса гриппа, так и различия.

Материал и методика

Клеточные культуры. Перевиваемые клеточные линии человека A-549 (карцинома легких) и ECV-304 (спонтанно трансформированные клетки эндотелия), а также клетки почки собаки (MDCK) получены из Коллекции клеточных культур НИИ гриппа МЗ РФ (Санкт-Петербург). Клетки культивировали в среде альфа-МЕМ, содержащей 2 % бычьей эмбриональной сыворотки (ЭС) без антибиотиков. Пересев клеток проводили на 6—7-е сут в соотношении 1 : 3—1 : 5, используя для отторжения клеток раствор версена с химопсином. Для проведения эксперимента использовали 3-суточные культуры с концентрацией $5 \cdot 10^4$ кл./мл.

Вирусы гриппа А подтипов H3N2 (A/Брисбен/10/07 и A/Перт/16/11), H1N1pdm09 (A/Санкт-Петербург/05/09 и A/Санкт-Петербург/06/14) и H2N2 (A/Сингапур/01/57) поддерживали на куриных эмбрионах. Вирус гриппа подтипа А(H3N2) A/Астрахань/06/12 поддерживали на клетках MDCK.

Титры вирусов составляли 5—6 Ig ТЦД₅₀ (титр цитопатического действия, вызывающего поражение 50 % монослоя клеток MDCK). За 1 инфицирующую дозу (ИД) в 1 мл принимали последнее десятикратное разведение титруемого вируса. Множественность инфекции (отношение величины ИД к количеству зараженных клеток) при низкой дозе заражения вирусом (1—10 ИД) соответствовала 0.00002—0.0002, при высокой дозе заражения (1000 ИД) — 0.02.

Заржение 1-суточного монослоя клеток. Выращенные на 24-луночных планшетах, проводили внесением 0.1 мл заранее оттитрованной вирусодержащей жидкости. Контакт вируса с клетками проходил при 37 °C в течение 45 мин в бессывороточной среде альфа-МЕМ с добавлением трипсина (1 мкг/мл) и антибиотиков (пенициллин/стрептомицин). Затем клетки однократно отмывали от вируса раствором той же среды и вносили ростовую среду, содержащую 1 % ЭС. При проведении эксперимента на протяжении четырех пассажей клетки выращивали в культуральных флаконах (50 мл; Nunc, Дания). 1-суточный монослой клеток заражали вирусом по методике, описанной выше (инокулят 0.5 мл). На 5—6-е сут клетки пересевали в соотношении 1 : 2. Половину клеточной супензии оставляли во флаконе для следующего пассажа, половину использовали для посева на 24-луночные планшеты (для оценки пролиферации и апоптоза), а также в пробирки для замораживания клеточного материала при -20 °C и последующего определения экспрессии вирусной РНК методом ПЦР в реальном времени. Для оценки апоптоза в лунки планшета вкладывали покровные стекла. Контролем служили культуры, которые инкубировали с интактными, не содержащими вируса жидкостями. На каждую временную точку использовали по 2 лунки, все эксперименты проводили не менее 3 раз.

Пролиферацию клеток определяли по подсчету клеток, не окрашенных трипановым синим, в камере Фукса—Розенталя. Для этого в определенные сроки клет-

ки снимали с поверхности раствором версена с химопсином и отбирали для подсчета пробы клеточных суспензий. Пролиферативную активность клеток оценивали по отношению числа зараженных клеток на определенном сроке культивирования к числу контрольных (интактных) клеток на этом же сроке культивирования. Результаты выражали в виде доли от контроля (ДК), контроль принимали за 100 %.

Апоптоз клеток оценивали по степени фрагментации ядерного хроматина. Препараты на покровных стеклах фиксировали смесью метанола с уксусной кислотой в соотношении 3 : 1, окрашивали флуоресцентным красителем Hoechst-33258 и определяли долю апоптотических клеток, просматривая не менее 300—500 клеток под люминесцентным микроскопом, используя объектив с увеличением 90× и масляную иммерсию. Результаты выражали в виде индекса апоптоза (ИА) по формуле ИА = $(b/c) \cdot 100\%$, где b — число апоптотических клеток, c — общее число просмотренных клеток. Окрашивание клеток красителем Hoechst-33258 являлось одновременно контролем за контаминацией клеток бактериями, Л-формами бактерий и микоплазмами.

Для выявления и оценки состояния вируса в культурах testируемых клеток использовали несколько методов. 1. Наличие НА вируса в культуральной жидкости определяли в реакции гемагглютинации с эритроцитами курицы или человека 0 (I) группы. 2. Для выявления внутриклеточного вируса клетки разрушали замораживанием—оттаиванием, затем полученные лизаты вносили в культуру пермиссивных клеток MDCK. Присутствие вируса в лизатах оценивали по цитопатическому действию (ЦПД) вируса в клетках MDCK. 3. Экспрессию РНК вирусных белков M1, НА и НА выявляли методом ПЦР в реальном времени с использованием коммерческих наборов производства ЦНИИ эпидемиологии (Россия) согласно инструкции. Использовали комплекты реагентов «АмплиПрайм РИБО-преп» (Россия) для экстракции РНК (ДНК) из исследуемых образцов и «Реверта-L» (Россия) для получения кДНК на матрице РНК в реакции обратной транскрип-

ции. Использовали наборы реагентов для ПЦР в реальном времени: «АмплиСенс Influenza virus A/B-FL» (Россия) для выявления РНК белка M1 вирусов гриппа А, «АмплиСенс Influenza virus A-тип-FL» (Россия) для идентификации субтипов H1N1 и H3N2 вируса гриппа А (позволяет обнаружить фрагменты генов НА (H1 и H3) и НА (N1 и N2) эпидемических штаммов вирусов), «АмплиСенс Influenza virus A/H1-swine-FL» (Россия) для выявления НА пандемического вируса гриппа А H1N1pdm. Амплификацию проводили в термоциклире Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия). Уровень экспрессии определяли как $50 - C(t)$, где $C(t)$ — значение порогового цикла анализируемого образца.

Иммуноцитохимическое исследование проводили на клетках, выращенных на покровных стеклах. На 3-и сут после заражения вирусом клетки фиксировали смесью метанола с ацетоном, использовали мышиные моноклональные антитела (МКА) к исследуемым белкам (p53 и циклину А) и другие реагенты для визуализации их экспрессии (Novocastra, Великобритания). Результаты выражали в виде количества клеток с меткой (в %) по формуле $n = (b/c) \cdot 100\%$, где n — количество клеток с меткой, b — число положительно окрашенных клеток, c — число просмотренных клеток. В каждом варианте эксперимента просматривали не менее 300—500 клеток под световым микроскопом при увеличении объектива 40×.

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

В результате сравнительной характеристики пролиферации клеток А-549 и ECV-304 обнаружена интересная особенность. Клетки

Чувствительность клеточных линий к стимулирующему действию вирусов гриппа А (аллантоинского или культурального происхождения) при низкой дозе заражения (1 ИД)

Вирусы	Доля выросших клеток, % от контроля ^a	
	клеточные линии	
	ECV-304	A-549
Вирусы субтипа H3N2		
Брисбен/10/07(аллантоинский)	182.6 ± 10.3^b	95.8 ± 4.7
Перт/16/11(аллантоинский)	149.4 ± 7.8^b	96.2 ± 3.4
Астрахань/06/12 (культуральный)	203.4 ± 14.2^b	188.4 ± 11.5^b
Вирусы субтипа H1N1pdm		
Санкт-Петербург/05/09(аллантоинский)	152.7 ± 9.3^b	176.3 ± 10.6^b
Санкт-Петербург/06/14(аллантоинский)	155.9 ± 8.4^b	165.5 ± 9.2^b
Вирусы субтипа H2N2		
Сингапур/01/57(аллантоинский)	124.9 ± 4.6^b	127.7 ± 5.1^b

Примечание. За 1 инфицирующую дозу (ИД) в 1 мл принимали последнее десятикратное разведение титруемого вируса. ^a Клетки, культивируемые в среде без вируса (контроль). ^b Достоверное отличие от контроля, $P < 0.05$ (U-критерий Манна—Уитни).

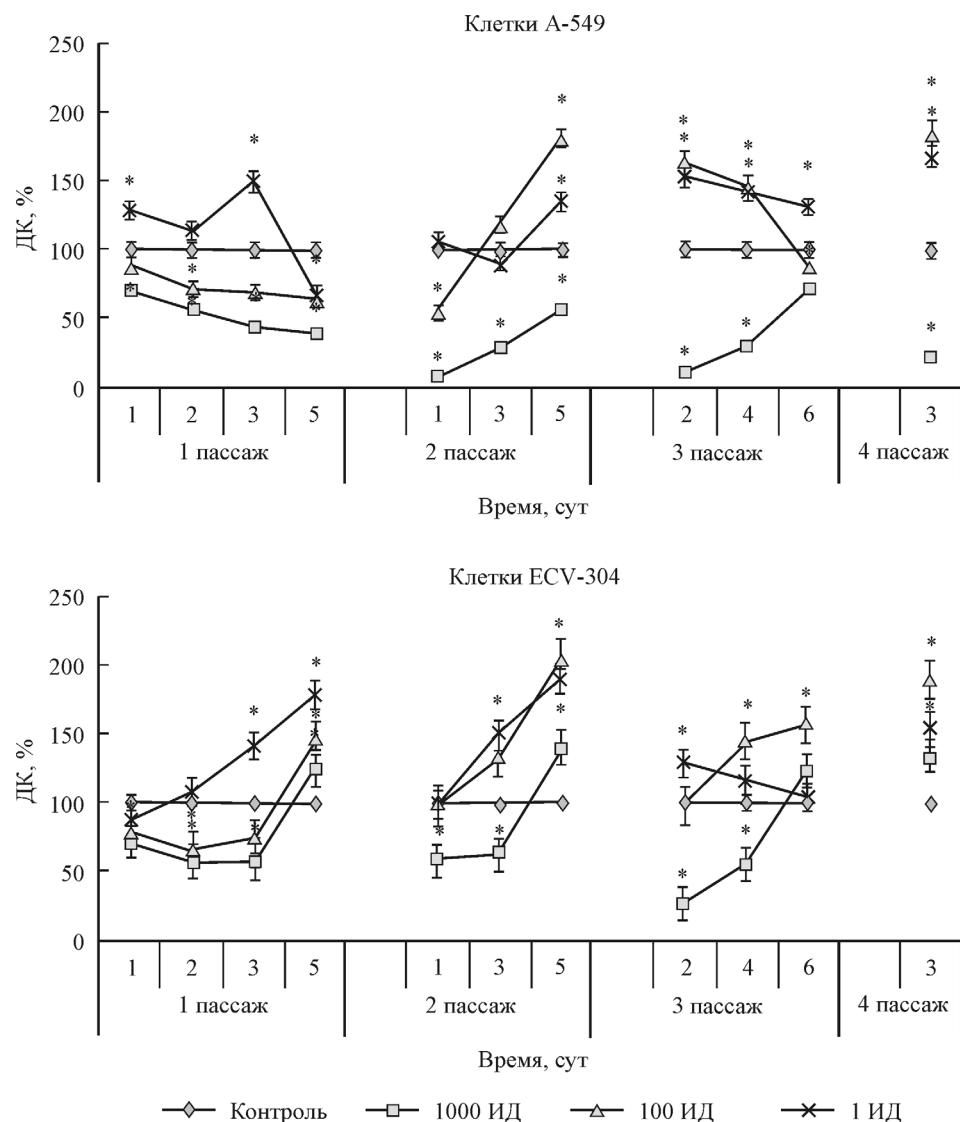


Рис. 1. Динамика пролиферации клеточных культур А-549 и ECV-304, зараженных разными дозами вируса гриппа А/Санкт-Петербург/05/09 (H1N1pdm), на протяжении четырех пассажей.

ДК — доля от контроля, ИД — инфицирующая доза, контроль — клетки, культивируемые в среде без вируса; звездочка показывает отличие от контроля при $P < 0.05$.

А-549, как и клетки ECV-304, отвечали стимуляцией пролиферации на заражение вирусами гриппа А подтипов H1N1pdm09 и H2N2 (выращенных на куриных эмбрионах), но клетки А-549 в отличие от клеток ECV-304 не реагировали на заражение аллантоисным вариантом вируса гриппа А подтипа H3N2; при заражении вирусом этого же подтипа стимуляция пролиферации происходила в случае вируса, выращенного только на клеточной культуре (см. таблицу).

В этой связи все дальнейшие исследования проводили с использованием вирусов аллантоисного происхождения — пандемического гриппа А подтипа H1N1pdm для заражения клеток А-549 и ECV-304 и эпидемического гриппа А подтипа H3N2 только для заражения клеток ECV-304. Общим ответом клеток А-549 и ECV-304 было повышение пролиферации клеток на 1-м пассаже при заражении самыми низкими дозами вируса гриппа А (1 ИД). Различия между этими клетками заключались в более раннем появлении стимулирующего эффекта в клетках А-549 — небольшом повышении пролиферации

при заражении 1 ИД вируса уже в 1-е сут, пике пролиферации на 3-и и снижении к 5-м сут (рис. 1). В клетках ECV-304 усиление пролиферации начиналось в более поздние сроки (на 3-и сут) и значительно возрастало к 5-м сут (рис. 1). При последующих пересевах клеток со 2-го пассажа стимуляция пролиферации появлялась и в клетках, зараженных более высокими дозами вируса (100 ИД в клетках А-549, 100 и 1000 ИД в клетках ECV-304). В клетках А-549, зараженных высокой дозой (1000 ИД) вируса гриппа А/Санкт-Петербург/05/09 (H1N1pdm09), наблюдалась цитодеструктивные изменения и гибель клеток к 4-му пассажу.

Сравнительная характеристика индукции апоптоза в клетках А-549 и ECV-304 при заражении разными дозами вирусов А/Санкт-Петербург/05/09 (H1N1pdm09) и А/Брисбен/10/07 (H3N2). В клетках А-549, известных своей чувствительностью к индуцирующему апоптоз действию вируса гриппа А, уже в 1-е сут уровень апоптоза был значительным (29 %) при заражении самой

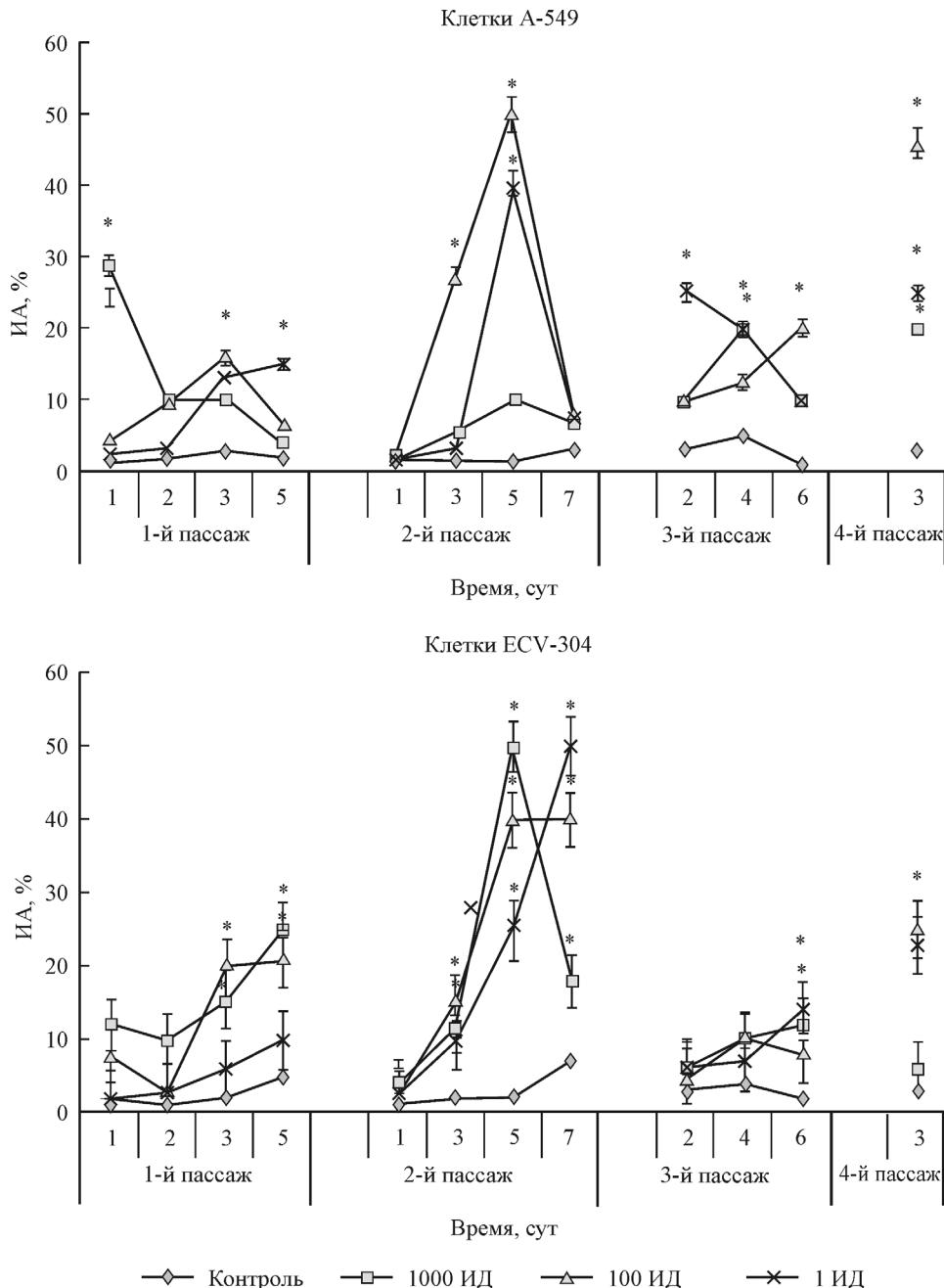


Рис. 2. Динамика апоптотической гибели клеток А-549 и ECV-304, зараженных разными дозами вируса гриппа А/Санкт-Петербург/05/09 (H1N1pdm), на протяжении четырех пассажей.

ИА — индекс апоптоза, ИД — инфицирующая доза, контроль — клетки, культивируемые в среде без вируса; звездочка показывает отличие от контроля при $P < 0.05$.

высокой дозой вируса (1000 ИД) (рис. 2). В последующие сутки культивирования апоптоз возникал при заражении клеток более низкими дозами вируса (100 и 1 ИД). Максимальный уровень апоптоза в клетках А-549 (до 40–50 %) наблюдали на 2-м пассаже к 5-м сут (100 и 1 ИД). В клетках ECV-304 апоптоз развивался медленнее, его уровень был низким в 1–2-е сут, но повышался к 3–5-м сут (до 25 %) (рис. 2). На 2-м пассаже в клетках ECV-304, как и в клетках А-549, отмечали всплеск апоптоза на 5-е сут (от 25 до 50 %) при всех дозах заражения вирусом гриппа. На 3-м пассаже в обеих культурах уровень апоптоза при всех дозах заражения снижался и вновь несколько увеличивался на 4-м пассаже.

Внутриклеточное распределение белков p53 и циклина А, связанных с прохождением клеткой фаз клеточного цикла. Эти эксперименты проводили на клетках А-549 при заражении разными дозами вируса гриппа А/Санкт-Петербург/05/09 (H1N1pdm09). При заражении клеток А-549 высокой дозой вируса (100 ИД) на 3-и сут после заражения белок p53 имел внутриядерную локализацию (показатель задержки клеточного деления) в 54 % клеток в отличие от клеток, зараженных низкой дозой вируса (1 ИД), у которых белок p53 локализован преимущественно в цитоплазме (46 %) (рис. 3). В то же время количество клеток с локализацией циклина А в ядрах (показатель активного клеточного деления) при низ-

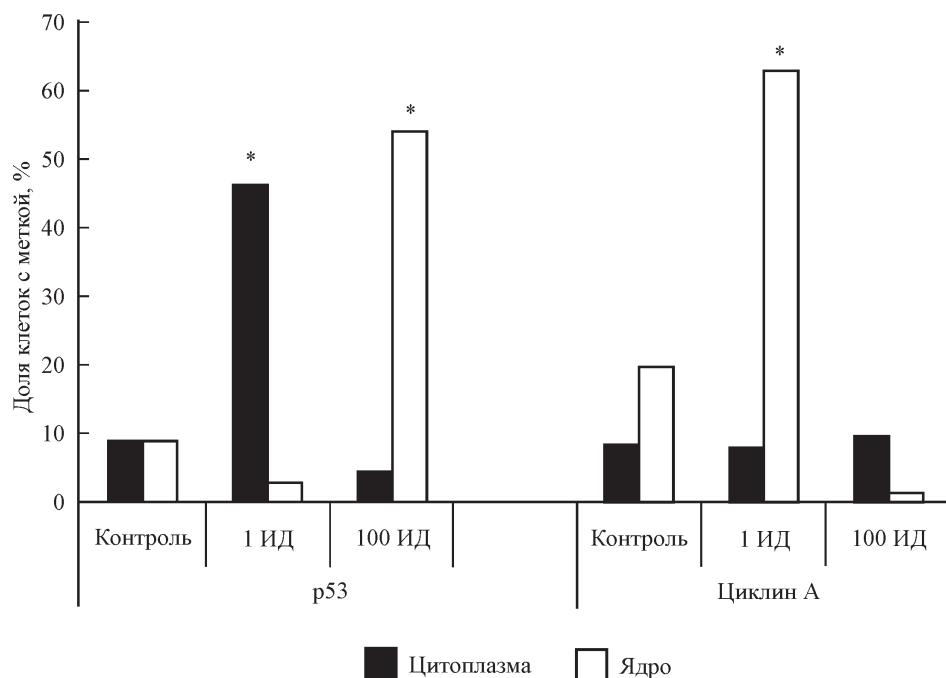


Рис. 3. Распределение белка p53 и циклина А между ядром и цитоплазмой на 3-и сут в зависимости от дозы заражения клеток А-549 вирусом гриппа А/Санкт-Петербург/05/09 (H1N1pdm).

Контроль — клетки, культивируемые в среде без вируса; звездочка показывает отличие от контроля при $P < 0.05$.

кой дозе заражения составляло 63 %, а при высокой дозе заражения вирусом снижалось до 1 % (рис. 3). Таким образом, подтверждается, что при заражении вирусом гриппа в низкой дозе большая часть клеток находится в состоянии активной пролиферации (их количество статистически выше, чем в контрольных клетках, находящихся на 3-и сут в состоянии активного роста).

Обнаружение вируса гриппа в клетках ЕСВ-304 и А-549 различными методами (реакция гемагглютинации, цитопатическое действие вируса в пермиссивных клетках МДСК, ПЦР). Изучение репродукции вирусов гриппа А обоих подтипов в клетках ЕСВ-304 и А-549 при заражении от 1000 до 1 ИД (разведения вируса с 10^{-2} до 10^{-6})

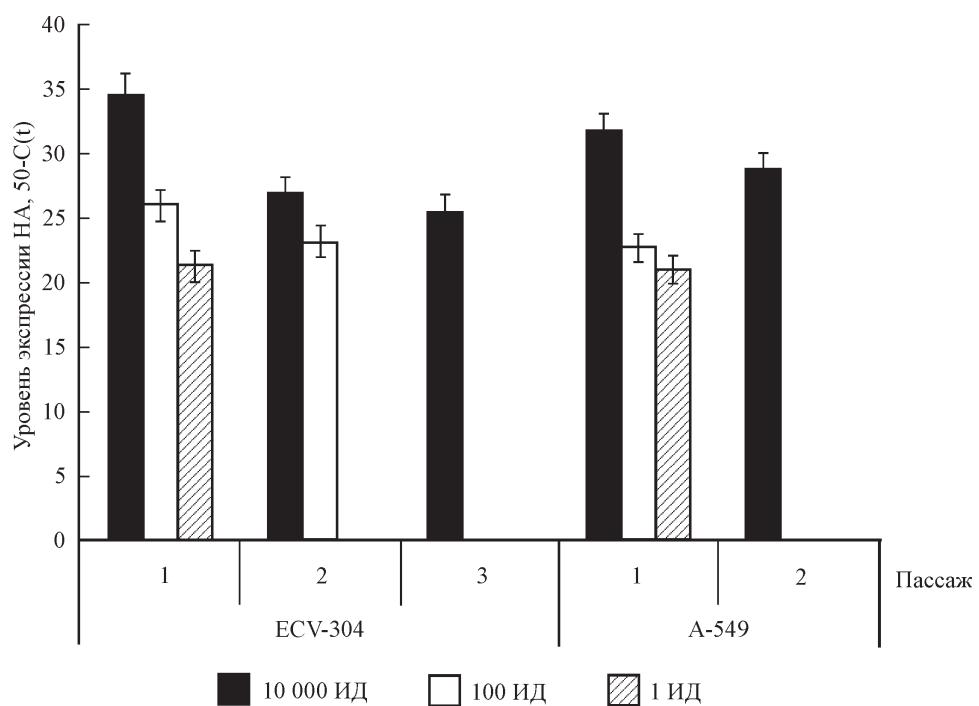


Рис. 4. Экспрессия мРНК вирусного гемагглютинина (НА) в клетках ЕСВ-304 и А-549.

C(t) — значение порогового цикла анализируемого образца.

показало невысокую пермиссивность этих клеток для вируса гриппа А (титры вирусов на этих клетках не превышали 2—3 lg ТЦД₅₀ при титрах 5—7 lg ТЦД₅₀ на пермиссивных клетках MDCK).

Изучение (с помощью реакции НА) выхода вируса гриппа из зараженных клеток ECV-304 и A-549 в культуральную жидкость показало очень низкие титры вирусного НА (не выше 1 : 2), причем только в пробах от клеток, зараженных высокой дозой вируса (1000 ИД). При более низких дозах заражения клеток (1—10 ИД) результат был отрицательный. Тестирование культуральной жидкости на присутствие инфекционного вируса (по ЦПД в пермиссивных клетках MDCK) также показало отрицательный результат. Инфекционный вирус в титре 1 lg ТЦД₅₀ обнаруживался при внесении в клетки MDCK лизатов (разрушенных замораживанием и оттаиванием) только от клеток (обоих типов), зараженных высокими дозами вируса (1000 ИД). Полученные результаты свидетельствуют о нарушении репродукции и выхода инфекционного вируса гриппа А во внеклеточное пространство из клеток ECV-304 и A-549, зараженных низкими дозами вируса.

Проведение ПЦР в реальном времени с праймерами к вирусным РНК, кодирующими белки M1, НА и НА, показало постепенное снижение экспрессии их генов в течение трех пассажей в зависимости от дозы заражения вирусом. На рис. 4 показана экспрессия РНК, кодирующей вирусный НА в клетках A-549 и ECV-304, зараженных разными дозами вируса гриппа А/Санкт-Петербург/05/09 (H1N1pdm09). При заражении низкой дозой вируса (1 ИД) РНК НА обнаруживалась только на протяжении 1-го пассажа (4—5 сут), а в клетках, зараженных более высокими дозами вируса (100 и 1000 ИД), вирусная РНК сохранялась не более трех пассажей (рис. 4).

Обсуждение

Сравнительное изучение клеток разного происхождения (эпителиальных A-549 и эндотелиальных ECV-304) показало некоторые различия их ответов на заражение вирусами гриппа А. Клетки A-549 оказались неспособны стимулировать пролиферацию при заражении вирусом гриппа А подтипа H3N2, выращенного на куриных эмбрионах. Возможно, это отражает изменения в степени гликозилирования поверхностных антигенов вируса гриппа (НА и НА), которые возникают при различных условиях культивирования вируса — в куриных эмбрионах, клетках человека или животных (Mochalova et al., 2003). НА и НА вируса гриппа являются основными детерминантами, определяющими взаимосвязь с клетками, и изменение степени гликозилирования этих белков влияет на адсорбцию вируса и его проникновение в клетку, на антигенные свойства и иммуногенность вируса, а в условиях *in vivo* — на тропизм вируса (Klenk et al., 2002). Мутационные изменения поверхностных антигенов вируса гриппа А, отражающие его адсорбционные свойства, изучают с применением различных лектинов, ингибиторов и эритроцитов различного происхождения (Lin et al., 2012). Обнаруженный нами эффект может явиться еще одной модельной системой как для изучения изменения гликозилирования поверхностных антигенов вируса гриппа А, так и для характеристики разных подтипов вируса.

Возможно, эта особенность клеток A-549 является отражением замедленного (по сравнению с клетками

MDCK) посттрансляционного процессинга вирусных гликопротеинов в эндоплазматическом ретикулуме и последующего более длительного транспорта НА и НА к клеточной мембране (Ueda et al., 2008). Интересно отметить, что аллантоинское происхождение вируса подтипа H3N2 не влияло на развитие цитодеструктивных изменений в клетках A-549, экспрессию вирусной РНК, индукцию апоптоза и синтез вирусного нуклеопротеина (Смирнова и др., 2011б).

Различия между клетками A-549 и ECV-304 наблюдались также во времени появления стимуляции пролиферации и индукции апоптоза, которые выявлялись в клетках A-549 на 1—2 сут раньше, чем в клетках ECV-304. Ранее нами были отмечены различия между клетками A-549 и ECV-304, которые заключались в очень низком уровне экспрессии фактора некроза опухоли (ФНО) в клетках A-549 по сравнению с высоким уровнем экспрессии в клетках ECV-304 (Смирнова и др., 2012). Эта особенность клеток A-549 отмечалась и другими авторами по отношению к ФНО и альфа-интерферону, экспрессия которых значительно возрастала после праймирования клеток соответствующим цитокином (Veckman et al., 2006).

Изучение репродукции вируса гриппа А в клетках A-549 и ECV-304 с применением разных вирусологических методов показало низкую чувствительность этих клеток к вирусу гриппа А, что подтверждалось как снижением синтеза полноценных вирусных частиц, так и постепенным снижением экспрессии РНК, кодирующей вирусные белки, в течение нескольких пассажей. Для полноценной репродукции вирусов гриппа А, циркулирующих в популяции людей, необходимы высокодифференцированные и поляризованные клетки, какими являются клетки верхних отделов респираторного тракта, в то время как клетки A-549 являются недостаточно поляризованными и слабо дифференцированными пневмоцитами 2-го порядка, происходящими из нижних отделов легких (Sun, Whittaker, 2007). Клетки эндотелия человека также не являются пермиссивными для вирусов гриппа человека в отличие от вирусов птичьего гриппа (Short et al., 2014), но они могут играть важную роль в патогенезе гриппозной инфекции, являясь наиболее значимым источником цитокинов в легких (Teijaro et al., 2011).

Известно, что вирус гриппа способен останавливать клеточный цикл в фазах G₀/G₁, когда создаются условия, наиболее благоприятные для вирусной репродукции (He et al., 2010). В настоящей работе мы показали влияние степени инфицированности клеток вирусом гриппа на изменение локализации (ядро—цитоплазма) белков p53 и циклина А, регулирующих прохождение фаз клеточного цикла. Аналогичные данные были получены нами ранее при заражении вирусом гриппа А клеток эндометрия человека (Дурнова и др., 2013).

Таким образом, при сравнении ответа клеток A-549 и ECV-304 на заражение вирусом гриппа А между клеточными линиями выявлены как общие черты, так и различия. Полученные результаты свидетельствуют о влиянии на развитие инфекционного процесса как биологических особенностей вирусов и клеток, так и множественности инфекций клеток вирусом.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российской научного фонда (проект 15-15-00170).

Список литературы

- Дурнова А. О., Кадырова Р. А., Даниленко Д. М., Дюков М. И., Мартынцева В. А., Смирнова Т. Д., Еропкин М. Ю., Киселев О. И. 2013. Изучение репродукции вируса гриппа А в клетках эндометрия человека. Акушерство и женские болезни. 12 (2) : 23—28. (Durnova A. O., Kadyrova R. A., Danilenko D. M., Djukov M. I., Martynseva V. A., Smirnova T. D., Eropkin M. Yu., Kiselev O. I. 2013. Study of the reproduction of influenza A virus in human endometrial cells. *Obstetrics and Gynecological Diseases.* 12 (2) : 23—28.)
- Киселев О. И. 2011. Геном пандемического вируса гриппа A/H1N1-2009. М.; СПб.: Дмитрейд График Групп. 164 с. (Kiselev O. I. 2011. Genome pandemic influenza virus A/H1N1-2009. Moscow; St. Petersburg: Dmitreyd Graph Group. 164 p.)
- Смирнова Т. Д., Гудкова Т. М., Кузнецова И. К., Рыжак Г. А. 2009. Разработка модели взаимоотношения вируса гриппа А с перевиваемыми лимфобластоидными клетками человека для изучения биологических особенностей вируса и определения активности антивирусных препаратов. Клеточные культуры. Информ. бюл. 24 : 25—34. (Smirnova T. D., Gudkova T. M., Kuznetsova I. C., Rhyzhack G. A. 2009. Development of the model of interaction of influenza A virus with human lymphoblastoid cell lines for the study of biological features of viruses and determination of activity of antivirals. *Cell Cultures. Inform. Bull.* 24 : 25—34.)
- Смирнова Т. Д., Даниленко Д. М., Гудкова Т. М., Писарева М. М., Кадырова Р. А., Слита А. В. 2011а. 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. 2011a. Influence 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., Еропкин М. Ю., Деева Э. Г., Киселев О. И. 2011б. Изучение влияния ремантадина, рибавирина и триазавирина на репродукцию вирусов гриппа А в монослойных и лимфобластоидных клеточных линиях человеческого происхождения. Антибиотики и химиотерапия. 56 (11—12) : 11—16. (Smirnova T. D., Danilenko D. M., Eropkin M. Yu., Deeva E. G., Kiselev O. I. 2011b. Influence of Rimantadine, Ribavirin and Triazavirine on influenza virus replication in human monolayer and lymphoblastoid cell lines. *Antibiotics and Chemotherapy.* 56 (11—12) : 11—16.)
- Смирнова Т. Д., Даниленко Д. М., Ильинская Е. В., Смирнова С. С., Еропкин М. Ю. 2015. Влияние заражения вирусом гриппа А при различной множественности инфекций 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., Eropkin 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, U-937). *Cytology.* 57 (7) : 526—532.)
- Смирнова Т. Д., Даниленко Д. М., Плотникова М. А., Кадырова Р. А., Слита А. В., Еропкин М. Ю. 2012. Изучение влияния разных субтипов вируса гриппа А в присутствии противовирусных препаратов на пролиферацию и индукцию фактора некроза опухоли в клеточных линиях человека А-549 и ECV-304. Клеточные культуры. Информ. бюл. 28 : 37—49. (Smirnova T. D., Danilenko D. M., Plotnikova M. A., Kadyrova R. A., Slita A. V., Eropkin M. Yu. 2012. Influence of different subtypes of influenza A virus in the presence of antiviral agents on proliferation and induction of tumor necrosis factor in human cell lines A-549 and ECV-304. *Cell Cultures. Inform. Bull.* 28 : 37—49.)
- Ярцева Н. М., Федорцева Р. Ф. 2008. Характеристика спонтанно трансформированной эндотелиальной клеточной линии человека ECV-304. I. Множественные хромосомные перестройки. Цитология. 50 (7) : 568—575. (Yartseva N. M., Fedorzeva R. F. 2008. Characteristics of the spontaneously transformed human endothelial cell line ECV304. I. Multiple chromosomal rearrangements in endothelial cells ECV304. *Cytology.* 50 (7) : 568—575.)
- Brand J., van der Stitelaar K., van Amarongen G., Rimmelzwaan G., Simon J., de Wit E., Munstre V., Bestebroer T., Fouucher R., Kuiken T., Osterhaus A. 2010. Severity of pneumonia due to new H1N1 influenza virus in ferrets is intermediate between that due seasonal H1N1 virus and highly pathogenic avian influenza H5N1 virus. *J. Infect. Dis.* 201 : 993—999.
- Brown J., Reading S., Jones S., Fitchet C., Howl J., Martin A., Longland C., Michelangeli F., Dubrova Y., Brown C. 2000. Critical evaluation of ECV304 as a human endothelial cell model defined by genetic analysis and functional responses: a comparison with the human bladder cancer derived epithelial cell lines T24/83. *Lab. Investig.* 80 : 37—45.
- Chirathaworn C., Pongpanich A., Poovorawon Y. 2004. Herpes simplex 1 induced LOX-1 expression in an endothelial cell lines ECV304. *Viral Immunol.* 17 : 308—314.
- Fujimoto A., Onodera H., Mori A., Nagayama S., Yonenaga Y., Tachibana T. 2006. Tumour plasticity and extravascular circulation in ECV304 human bladder carcinoma cells. *Anticancer Res.* 26 : 59—70.
- He Y., Xu K., Keiner B., Zhou J., Czudai V., Li T., Chen Z., Lui J., Klnk H.-D., Shu Y. L., Sun B. 2010. Influenza A virus replication induces cell cycle arrest in G₀/G₁ phase. *J. Virol.* 84 : 12 832—12 840.
- Heath-Engel H., Lindgwood C. 2003. Verotoxin sensitivity of ECV304 cells *in vitro* and *in vivo* in a xenograft tumour model: VT1 as a tumour neovascular marker. *Angiogenesis.* 6 : 129—141.
- 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.
- Klenk H.-D., Wagner R., Heuer D., Wolff T. 2002. Importance of hemagglutinin glycosylation for the biological functions of influenza virus. *Virus Res.* 82 : 73—78.
- Liew K., Chow V. 2004. Differential display RT-PCR analysis of ECV304 endothelial-like cells infected with dengue virus type 2 reveals messenger RNA expression profiles of multiple human genes involved in known and novel roles. *J. Med. Virol.* 72 : 597—609.
- Lin Y., Xiong X., Wharton S., Martin S., Coombs P., Vachieri S., Christodoulou E., Walker P., Lui J., Skehel J., Gambian S., Hay A., Daniels R., McCauley J. 2012. Evolution of the receptor binding properties of the influenza A(H3N2) hemagglutinin. *PNAS.* 109 : 21 474—21 479.
- Mo X., Ma W., Zang Y., Zhao H., Deng Y., Yuan W., Wang Y., Li Y., Zhu C., Liu M., Wu X. 2007. Microarray analyses of differentially expressed human genes and biological processes in ECV304 cells infected with rubella virus. *J. Med. Virol.* 79 : 1783—1791.
- Mochalova L., Gambaryan A., Romanova J., Tuzikov A., Chinarev A., Katinger D., Katinger H., Egorov A., Bovin N. 2003. Receptor-binding properties of modern human influenza viruses primarily isolated in Vero and MDCK cells and chicken embryonated eggs. *Virology.* 313 : 473—480.
- Ocana-Macchi M., Bel M., Guylack-Piriou L., Ruggli N., Ligner M., McCullough K., Sakoda Y., Isoda N., Matrosovich M., Summerfield A. 2009. Hemagglutinin-dependent tropism of H5N1 avian influenza virus for human endothelial cells. *J. Virol.* 83 : 12 947—12 955.
- Short K., Veldhuis Kroese E., Reperant L., Richard M., Kuijken Th. 2014. Influenza virus and endothelial cells: a specific relationship. *Microbiology.* 5 : 1—11.
- Shwetank Date O., Kim K., Manjunath R. 2013. Infection of human endothelial cells by Japanese encephalitis virus; increased expression and release of soluble HLA-E. *PLoS ONE.* 8 : e79197.
- Suda K., Rothen-Rutishauser B., Gunthert M., Wunderli-Andenspach H. 2001. Phenotypic characterization of human umbilical vein endothelial (ECV304) and urinary carcinoma (T24) cells: endothelial versus epithelial features. *In Vitro Cell Develop. Biol. Animal.* 37 : 505—514.

- Sun X., Whittaker G. 2007. Role of actin cytokeleton during influenza virus internalization into polarized epithelial cells. Cell Microbiol. 9 : 1672—1682.*
- Takahashi K., Sawasaki Y., Hata J., Mukai K., Goto T. 1990. Spontaneous transformation and immortalization of human endothelial cells. In Vitro Cell Develop. Biol. 26 : 265—274.*
- Teijaro J., Walsh K., Cahalan S., Fremgen D., Roberts E., Scott F., Martinborough E., Peach R., Oldstone M., Rosen H. 2011. Endothelial cells are central orchestrators of cytokine amplification during influenza virus infection. Cell. 146 : 980—991.*
- Ueda M., Yamate M., Du A., Daidoji T., Okuno Y., Ikuta K., Nakaya T. 2008. Maturation efficiency of viral glycoproteins in the ER impacts the production of influenza A virus. Virus Res. 136 : 91—97.*
- Veckman V., Osterland P., Fagerland R., Melen K., Matikainen S., Julkinen I. 2006. TNF- α and IFN- α enhance influenza-A-virus-induced chemokine gene expression in human A-549 lung epithelial cells. Virology. 345 : 96—104.*
- Vester D., Rapp E., Gade D., Genzel Y., Reichl U. 2009. Quantitative analysis of proteome alterations in human influenza A virus-infected mammalian lines. Proteomics. 9 : 3316—3327.*
- Zhang X., Tang Q., Xu L. 2014. Herpes simplex virus 2 infects human endothelial ECV304 cells and induces apoptosis synergistically with ox-LDL. J. Toxicol. Sci. 39 : 909—917.*

Поступила 9 X 2015

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

D. M. Danilenko,¹ S. S. Smirnova,¹ T. D. Smirnova,^{1,} M. M. Pisareva,¹ M. A. Plotnikova,¹
A. O. Durnova,² M. Y. Eropkin¹*

¹ Research Institute of Influenza of Ministry of Health of Russia, St. Petersburg, 197022, and
Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology named after D. O. Ott, St. Petersburg, 199034;
* e-mail: cellcultures@influenza.spb.ru

The fate of cells infected with influenza virus depends not only on their biological properties and characteristics of a virus but also on the intensity of infection, i. e. multiplicity of infection (moi). The aim of the current study was to compare two cultured cell lines derived from human lung epithelium (A-549) and endothelium (ECV-304) infected with various moi of influenza A virus. Both cell lines under study were shown to enhance their proliferation and the induction of apoptosis as a result of infection with the low moi (1—10 infectious doses — ID). Cells A-549 demonstrated stimulating effect of low moi viral infection at 1—2 days earlier comparing to ECV-304 cells. Both cell lines responded with the enhancement of proliferation during 4 consecutive passages on the infection with higher doses (1000 ID). It was shown that low moi had no stimulating effect on cell A-549 in case if the virus H3N2 was cultured in chicken embryos while MDCK-grown virus did stimulate cell proliferation. Immunocytochemistry permitted to detect changes in p53 and Cyclin A cellular localization which proved to be moi-dependent. Under low moi (1 ID) the intra-nuclear localization of Cyclin A was prevailing (63 %) while under high moi (100 ID) the intra-nuclear localization of p53 was observed (54 %). These findings have confirmed that the low moi stimulates cell proliferation and high moi inhibited cellular division. Overall, the current study shown low sensitivity of A-549 and ECV-304 cell lines to influenza A viruses which had been confirmed by gradual decrease of viral RNA expression as well as decreased formation of influenza virions after several cell culture passages. Thus, it can be speculated that induction of proliferation of cells in A-549 and ECV-304 lines depends on low moi and the effect was confirmed by impaired formation of virus particles or viral proteins. This study has revealed similarities and differences in the reaction of A-549 and ECV-304 cell lines to various moi of influenza A virus and the obtained results can be attributed to the biological properties of cells, viruses and infection dose.

Key words: cell lines A-549 and ECV-304, influenza A virus, cell proliferation, apoptosis, infectious dose, expression of viral RNA.