

ИЗМЕНЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ КЛЕТОК ЭНДОТЕЛИЯ ЧЕЛОВЕКА ПЕРЕВИВАЕМОЙ ЛИНИИ ECV-304 ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ ВИРУСА ГРИППА А, ЛИПОПОЛИСАХАРИДА *ESCHERICHIA COLI* И РЯДА ПРЕПАРАТОВ

© С. С. Смирнова,^{1,2,*} Т. Д. Смирнова,² К. В. Сивак,² К. В. Воробьев¹

¹ С.-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, 195251, и

² Научно-исследовательский институт гриппа Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, 197376;

* электронный адрес: sm.svetlana.s@gmail.com

Вирус гриппа А и бактериальный липополисахарид (LPS) вызывают дисфункцию сосудистого эндотелия, что может привести к тяжелым осложнениям при заболевании, таким как острая дыхательная недостаточность и поражение сердечно-сосудистой системы. В настоящей работе исследовали изменения функционального состояния клеток эндотелия человека ECV-304 при продолжительном культивировании после воздействия LPS и инфицирования низкими или высокими дозами вируса гриппа А, а также оценивали способность ряда препаратов восстанавливать функциональное состояние клеток. Изменение функционального состояния клеток оценивали по пролиферативной активности и уровню апоптоза клеток на протяжении всего срока культивирования (не менее 6 пассажей) и продукции оксида азота (NO) на 1-м пассаже. В работе приведены доказательства отличия клеток эндотелия ECV-304 от клеток карциномы мочевого пузыря T-24, основанные на их чувствительности к вирусу гриппа А. Показано, что функциональные изменения в клетках ECV-304 после заражения вирусом гриппа и (или) LPS происходят в два этапа и могут развиваться в разных направлениях в зависимости от воздействующего фактора (вируса или LPS). На 1-м этапе (на ранних пассажах) после заражения клеток низкими дозами вируса гриппа или LPS усиливаются пролиферация клеток и индукция апоптоза. На 2-м этапе (после 3-го пассажа) в клетках, подвергавшихся воздействию вируса и (или) LPS, уровень апоптоза очень низкий, но при этом клетки, зараженные только вирусом, сохраняют повышенный пролиферативный потенциал, а в клетках под воздействием LPS постепенно снижается пролиферация. Антиоксидант (восстановленный глутатион), а также противовирусные препараты (ремантадин и алпизарин) восстанавливают нормальное состояние клеток. Ингибитор Toll-подобного рецептора-4 (TLR4) LPS (TLR4-IN-C34) подавлял только LPS-стимулированную пролиферацию клеток. Таким образом, клетки ECV-304, зараженные вирусом гриппа и (или) LPS, можно использовать в качестве модели не только для углубленного изучения процессов, происходящих в клетках, но и для тестирования препаратов различной направленности.

Ключевые слова: клеточная линия эндотелия человека ECV-304, липополисахарид (LPS), вирус гриппа А, пролиферация, апоптоз, синтез оксида азота (NO).

Принятые сокращения: ИА — индекс апоптоза, ИД — инфицирующая доза, МИ — множественность инфекции, HUVEC — клетки венозного эндотелия пупочного канатика, LPS — липополисахарид, NO — оксид азота, eNOS — эндотелиальная и iNOS — индуцибельная NO-синтаза, TGFβ — трансформирующий фактор роста бета, TLR — Toll-подобный рецептор.

Патологическое состояние (в том числе острая дыхательная недостаточность) при инфекции, вызванной вирусом гриппа А, может значительно осложниться наложением вторичной бактериальной инфекции. Тяжелые формы заболевания нередко могут приводить к развитию фиброза в различных органах, причины возникновения которого недостаточно изучены (Lin et al., 2012). Повреждение альвеолярного эпителия — основной клеточной мишени вируса гриппа — приводит не только к разрушению клеток в результате апоптоза и некроза, но и к нарушению барьера как между эпителиальными клетками, так и между клетками эпителия и эндотелия (Short et al., 2014a, 2016). Вирус гриппа может проникать в клет-

ки эндотелия посредством контактирования клеток с инфицированными моноцитами и лимфоцитами, а липополисахарид (LPS) — компонент клеточной стенки грамотрицательных бактерий — из высвобождающихся в кровотоке разрушенных бактерий. В отличие от клеток эпителия клетки эндотелия не являются перmissive для вируса гриппа, и в условиях *in vivo* вирус гриппа крайне редко обнаруживают внутри клеток легочного эндотелия (Short et al., 2014b). Недавно в клетках эндотелия человека была выявлена конститутивная экспрессия интерферониндуцированного трансмембранного белка-3 (IFITM3), блокирующего ранние стадии проникновения вируса гриппа в клетку, что является одним из механиз-

мов, ограничивающих репликацию вирусов гриппа человеческого происхождения (в отличие от вирусов птичьего гриппа) в клетках эндотелия (Sun et al., 2016). Тем не менее клетки эндотелия играют значительную роль в патогенезе гриппозной инфекции у человека, являясь наиболее важным источником цитокинов в легких (Teijaro et al., 2011).

Использование первичных культур клеток эндотелия (HUVEC — клеток венозного эндотелия пупочного канатика либо HMVEC — микроваскулярных клеток эндотелия легких) в рутинных исследованиях ограничено вследствие трудоемкости получения и индивидуальных различий между полученными культурами (Склянкина и др., 2011). ECV-304 — это перевиваемая клеточная линия, полученная в процессе спонтанной трансформации из клеток HUVEC, и по своим морфологическим и биохимическим свойствам охарактеризована как клетки эндотелия (Takahashi et al., 1990). Уникальность этой клеточной линии состоит в том, что обнаружено очень близкое генетическое родство клеток ECV-304 с клетками рака мочевого пузыря T-24: при анализе коротких tandemных повторов (Short Tandem Repeat — STR) выявлено различие всего по двум локусам (Dirks et al., 1999; Brown et al., 2000). Тем не менее клетки ECV-304 обладают практически всеми критериями, подтверждающими их эндотелиальное происхождение: экспрессируют фактор фон Виллебранда, поглощают липопротеины низкой плотности, синтезируют виментин, способны образовывать подобие капилляров (tube) (Suda et al., 2001; Fujimoto et al., 2006) и экспрессируют эндотелиальную NO-синтазу (eNOS) (Гильяно и др., 2008; Смирнова и др., 2016). Обнаружены также значительные различия при сравнительном изучении хромосом клеток ECV-304 и T-24 (Ярцева, Федорцева, 2008). Клетки ECV-304 широко используются в качестве эндотелиальной модели для тестирования различных фармакологических препаратов, в частности антиангиогенной и антиатеросклеротической направленности (Majumder et al., 2009; Liu et al., 2011; Narayanaswamy et al., 2014; Salazar et al., 2016).

Ранее нами было обнаружено, что клетки ECV-304 отвечают на заражение очень низкими дозами вируса гриппа А повышением пролиферации и апоптоза на ранних пассажах, а при дальнейшем культивировании приобретают способность к стабильной повышенной пролиферации. Заражение высокими дозами вируса сопровождается на ранних сроках цитопатическим и (или) цитотоксическим действием и усилением апоптоза (Даниленко и др., 2016; Смирнова и др., 2016).

Цель данной работы состояла в продолжении изучения изменений функционального состояния клеток ECV-304 при более длительном культивировании после воздействия LPS и инфицирования не только низкими, но и высокими дозами вируса гриппа А, а также в оценке способности ряда препаратов при данных условиях восстанавливать функциональное состояние клеток. Изменение функционального состояния клеток ECV-304 оценивали по следующим критериям — пролиферативной активности и уровню апоптоза клеток на протяжении всего срока культивирования (не менее 6 пассажей). Оценивали также изменение продукции оксида азота (NO) на 1-м пассаже. Среди фармакологических препаратов были протестированы антиоксидант (восстановленный глутатион), ингибитор Toll-подобного рецептора-4 (TLR4) LPS (TLR4-IN-C34) и противовирусные препараты ремантадин и алпизарин.

Кроме того, в настоящей работе мы приводим данные (дополнительно к сведениям, описанным выше в литературе), подтверждающие отличие клеток эндотелия человека ECV-304 от клеток эпителия мочевого пузыря T-24, основанные на их чувствительности к вирусу гриппа А.

Материал и методика

Перевиваемые клеточные линии человека: клетки эндотелия (ECV-304) и клетки карциномы мочевого пузыря (T-24), а также клетки почки собаки (MDCK) получены из Коллекции клеточных культур Научно-исследовательского института гриппа Министерства здравоохранения РФ. Клетки культивировали в среде альфа-МЕМ (Биолот, Россия), содержащей 2 % бычьей эмбриональной сыворотки (Биолот, Россия) без антибиотиков.

Вирусы гриппа А/Брисбен/10/07 (H3N2) и А/Санкт-Петербург/05/09 (H1N1pdm09) поддерживали на куриных эмбрионах. Титры вирусов составляли 6—7 lg ТЦД50 (титр цитопатического действия, вызывающего поражение 50 % клеток монослоя MDCK). За одну инфицирующую дозу (ИД) в 1 мл принимали последнее десятикратное разведение вируса, титруемого на клетках MDCK. Множественность инфекции (МИ — величина, равная отношению заражающей дозы к количеству зараженных клеток) при высокой дозе заражения вирусом (ИД = 1000) составляла 0.001, при низкой дозе (ИД = 1) МИ составляла 0.000001.

В экспериментах использовали 4—5-суточную культуру клеток ECV-304 с посевной концентрацией (7—8) · 10⁴ кл./мл. Заражение 1-суточного монослоя клеток, выращенного в 24-луночных планшетах (Nunc, Дания), проводили внесением 0.1 мл заранее оттитрованной вирусосодержащей жидкости (для учета апоптоза в лунки планшета помещали покровные стекла). Контакт вируса с клетками проходил при 37 °С в течение 45 мин в бессывороточной среде альфа-МЕМ, содержащей трипсин (2 мкг/мл) и антибиотики (пенициллин со стрептомицином), затем клетки отмывали от вируса и вносили по 1 мл поддерживающей среды (того же состава, но с 1 % эмбриональной сыворотки). Десятикратные концентрации LPS *Escherichia coli* (Sigma, США) и исследуемых препаратов вносили в культуральную жидкость по 0.1 мл. Для посева клеток, инфицированных разными ИД вируса и (или) LPS, клетки выращивали в культуральных флаконах 25 см² (Nunc, Дания), для поддержания роста клеток использовали среду альфа-МЕМ, содержащую 1 % эмбриональной сыворотки.

При определении продукции NO конечные концентрации LPS составляли 2000 и 5 нг/мл, в других экспериментах — 100 нг/мл. Контролем служили интактные клетки, которые культивировали в среде, не содержащей вируса, LPS и препаратов. Результаты эксперимента учитывали на 4—5-е сут каждого пассажа клеток.

Пролиферативную активность клеток оценивали по отношению числа выросших клеток, подвергавшихся заражению вирусом гриппа и (или) воздействию LPS и (или) фармакологических препаратов, к числу контрольных (интактных) клеток на этом же сроке культивирования. Подсчет живых клеток (не окрашивающихся трипановым синим) проводили в камере Фукса—Розенталя. Результаты выражали в процентах от контроля либо по индексу пролиферации, который рассчитывали

как отношение числа выросших клеток на определенном сроке культивирования к числу исходно посеянных клеток.

Апоптоз клеток оценивали по степени фрагментации ядерного хроматина. Клетки, выращенные на покровных стеклах, фиксировали смесью метанола с уксусной кислотой в соотношении 3 : 1, окрашивали флуоресцентным красителем Hoechst-33258 (Sigma, США) и просматривали под люминесцентным микроскопом (не менее 300—500 клеток, используя объектив 90× с масляной иммерсией). Результаты выражали в виде индекса апоптоза (ИА) по формуле $ИА = (b/c) \cdot 100 \%$, где *b* — число апоптотических клеток, *c* — общее число просмотренных клеток.

Растворы реагентов готовили на бесывороточной среде альфа-МЕМ и использовали в следующих конечных концентрациях: ремантадин (Sigma, Германия) — 20 мкг/мл, алпизарин (ФГБНУ ВИЛАР, Россия) — 50 мкг/мл, восстановленный глутатион (Sigma, США) — 50 мкг/мл (163 мкмоль/л), TLR4-IN-C34 (Sigma, США) — 50 мкг/мл.

На каждую временную точку использовали по 2 лунки, все эксперименты проводили не менее трех раз.

Производство NO в культуральной жидкости измеряли с помощью реактива Грисса по описанной методике (Dietert et al., 1995). В каждую лунку 96-луночного планшета вносили по 100 мкл свежеприготовленного хромогенного реагента Грисса: смесь в равных объемах 0.1%-ного N-(1-нафтил)-этилендиамин дигидрохлорида (NED) (Sigma, США) и 1%-ного сульфаниламида (Sigma, США) на 5%-ной фосфорной кислоте. Готовили стандартные пробы нитрита натрия NaNO₂ (концентрации от 1.56 до 200 мкмоль/л) на среде альфа-МЕМ того же состава, что и для культивирования клеток. В лунки планшета вносили по 100 мкл размороженной культуральной жидкости от экспериментальных и контрольных образцов или стандартные пробы NaNO₂. Измеряли абсорбцию при 550 нм на автоматическом планшетном ридере Synergy2 (BioTek Instruments, США). По стандартным пробам NaNO₂ строили калибровочную кривую и рассчитывали по ней концентрацию NO в тестируемых образцах. Результат пересчитывали в нмоль на число выросших клеток (тысяч клеток). Конечный результат выражали в процентах относительно контрольных клеток, не содержащих вируса и LPS.

Статистический анализ выполнен с использованием U-теста Манна—Уитни для сравнения двух групп непараметрических выборок. Значимыми считали различия при $P < 0.05$.

Результаты

В начале настоящей работы было проведено сравнительное изучение чувствительности клеток эндотелия ECV-304 и рака мочевого пузыря Т-24 к заражению разными ИД двух вирусов гриппа — А/Брисбен/10/07(Н3Н2) и А/Санкт-Петербург/05/09 (Н1Н1pdm09). Результаты показали, что клетки Т-24 имеют более низкую чувствительность к антипролиферативному действию высоких доз вируса гриппа (10 000—1000 ИД), чем клетки ECV-304, а на заражение низкими (1—10 ИД) дозами вируса гриппа клетки Т-24 в отличие от клеток ECV-304 не отвечают усилением пролиферации (рис. 1, а).

Клетки ECV-304 имели типичную для эндотелиоцитов морфологию (полигональная форма клеток с выступающим центром и четко обозначенным ядром) и образовывали характерный монослой в виде «коблестонов» (рис. 1, б). На 8-е сут клетки ECV-304, выращенные на пластике, начинали отслаиваться от поверхности, а клетки, выращенные в стеклянных флаконах, после 10 сут культивирования без смены среды начинали изгибаться и образовывать кольца, которые позже превращались в подобие сосудистых канальцев (tube) (рис. 1, в). Монослой клеток Т-24 состоял из почти прозрачных клеток, имеющих форму четких многогранников, прочно держащихся на поверхности пластика или стекла (без смены среды не менее 1 мес (рис. 1, в, д)). Полученные результаты дополнительно свидетельствуют о морфологическом и функциональном различии между этими клеточными линиями.

Все дальнейшие эксперименты проведены на клетках ECV-304. Культивирование в течение 5 сут клеток ECV-304 в присутствии вируса гриппа А/Брисбен/10/07 (Н3Н2) или А/Санкт-Петербург/05/09 (Н1Н1pdm09) и (или) LPS *E. coli* показало, что в этот временной срок как вирус гриппа А (независимо от субтипового происхождения), так и LPS способны влиять на пролиферацию клеток, индукцию в них апоптоза и продукцию NO. На рис. 2 и 3 представлены результаты экспериментов с вирусом гриппа А/Санкт-Петербург/05/09 (Н1Н1pdm09). С вирусом А/Брисбен/10/07 (Н3Н2) получены аналогичные данные (не представлены). Воздействие одного LPS вызывало на 3—5-е сут повышение пролиферации клеток эндотелия в прямой дозовой зависимости от концентрации. Инфицирование клеток вирусом гриппа стимулировало пролиферацию клеток только при низкой дозе (1 ИД) вируса на 3—5-е сут. При совместном внесении вируса гриппа и LPS в высокой концентрации (2000 нг/мл) пролиферация клеток практически не изменялась по сравнению с раздельным действием LPS и вируса, но в присутствии LPS в низкой концентрации (5 нг/мл) наблюдали снижение вирусостимулированной пролиферации клеток (рис. 2, а).

Усиление апоптоза клеток ECV-304 отмечено только на 5-е сут как под воздействием LPS (ИА = 14.7 % при 5 нг/мл и 16.8 % при 2000 нг/мл), так и под воздействием вируса гриппа в низкой дозе (ИА = 10.1 %) (рис. 2, в). При одновременном присутствии вируса и LPS наблюдали кумулятивный эффект — еще большее усиление апоптоза. Наибольшее усиление апоптоза (ИА = 21.8 %) отмечено при добавлении LPS в высокой концентрации (2000 нг/мл) к клеткам, зараженным высокой дозой вируса (1000 ИД).

В культуральной жидкости обнаружено повышение продукции NO как при раздельном воздействии LPS или вируса гриппа, так и при их совместном воздействии на клетки ECV-304. Максимум продукции NO наблюдали в 1-е сут, к 3-м сут уровень NO снижался, но оставался выше контроля, а к 5-м сут уровень NO был уже ниже контроля (рис. 2, б). Вирус гриппа стимулировал продукцию NO в прямой зависимости от инфицирующей дозы, причем при добавлении к вирусу LPS данная зависимость сохранялась. Максимальную стимуляцию продукции NO наблюдали при одновременном воздействии на клетки LPS в низкой дозе (5 нг/мл) и вируса гриппа (как в высокой, так и в низкой дозах).

Полученные результаты свидетельствуют о функциональных изменениях клеток эндотелия под воздействием как вируса гриппа А, так и LPS.

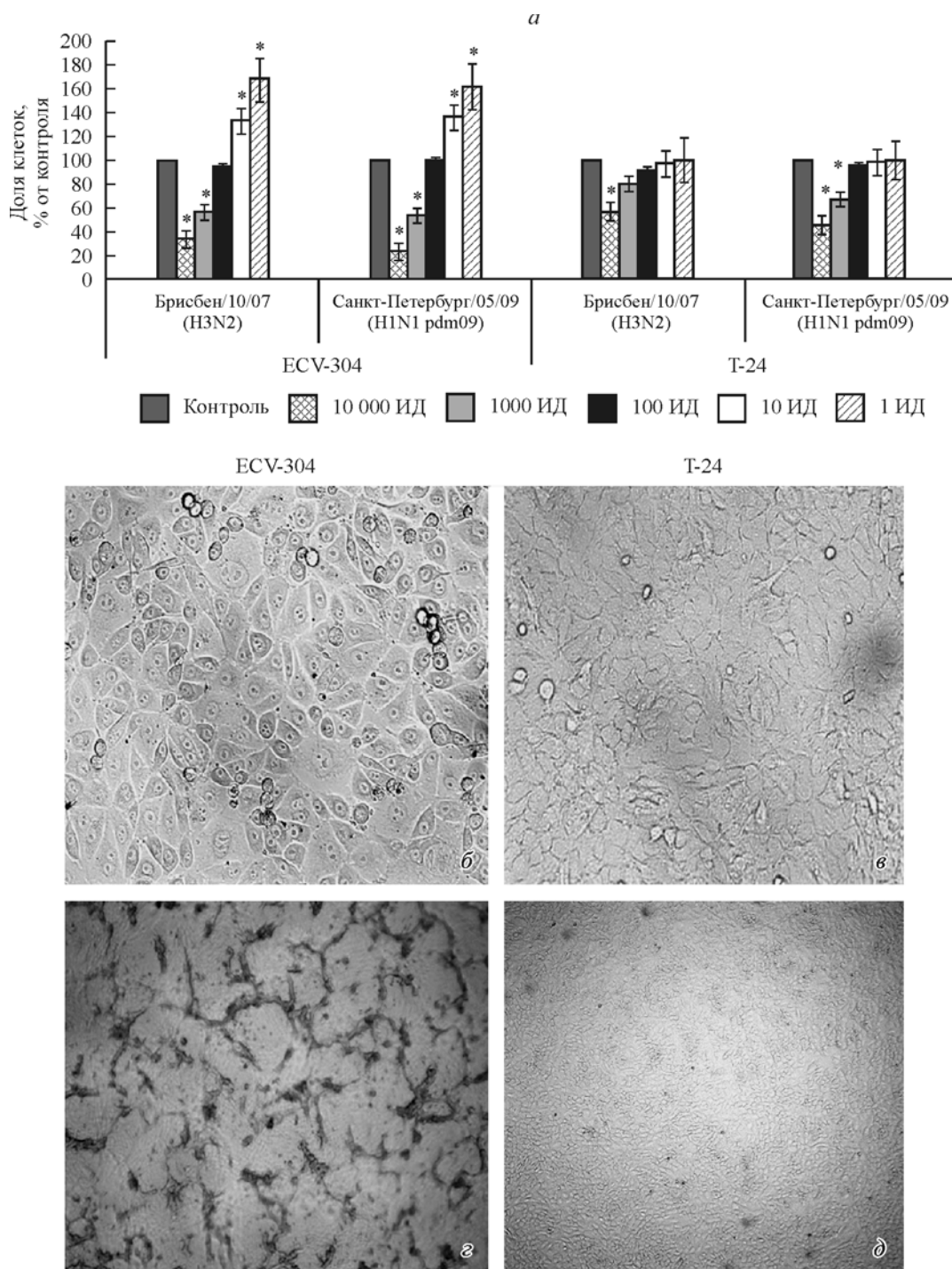


Рис. 1. Сравнение клеток ECV-304 и T-24 по пролиферации (*a*) (при заражении разными инфицирующими дозами (ИД) вирусов гриппа А) и по морфологии (*б—д*).

a — пролиферация клеток при заражении разными ИД вирусами гриппа А Брисбен/10/07 (H3N2) и Санкт-Петербург/05/09 (H1N1pdm09); *б, в* — 2 сут после посева, об. 100×; *г, д* — 14 сут культивирования без смены среды, образование тубул только в клетках ECV-304 (*г*), об. 40×. Контроль — клетки, культивируемые в среде без вируса. Здесь и далее звездочка показывает достоверность отличия от контроля при $P < 0.05$.

Длительное культивирование клеток ECV-304 на протяжении 6—10 пассажей при пониженном содержании эмбриональной сыворотки (1%), однократно подвергшихся воздействию вируса гриппа как в низкой дозе (1 ИД), так и высокой (1000 ИД) и (или) LPS (100 нг/мл), показало значительные изменения функционального состояния клеток. Вирусостимулированная про-

лиферация клеток независимо от субтипического происхождения вируса гриппа А (H3N2 или H1N1pdm) сохранялась на протяжении всего срока наблюдения. Максимальная пролиферация клеток наблюдалась со 2-го пассажа после инфицирования вирусом в низкой дозе (1 ИД). При заражении клеток высокой дозой (1000 ИД) вируса также наблюдали усиление клеточной пролиферации, но позже

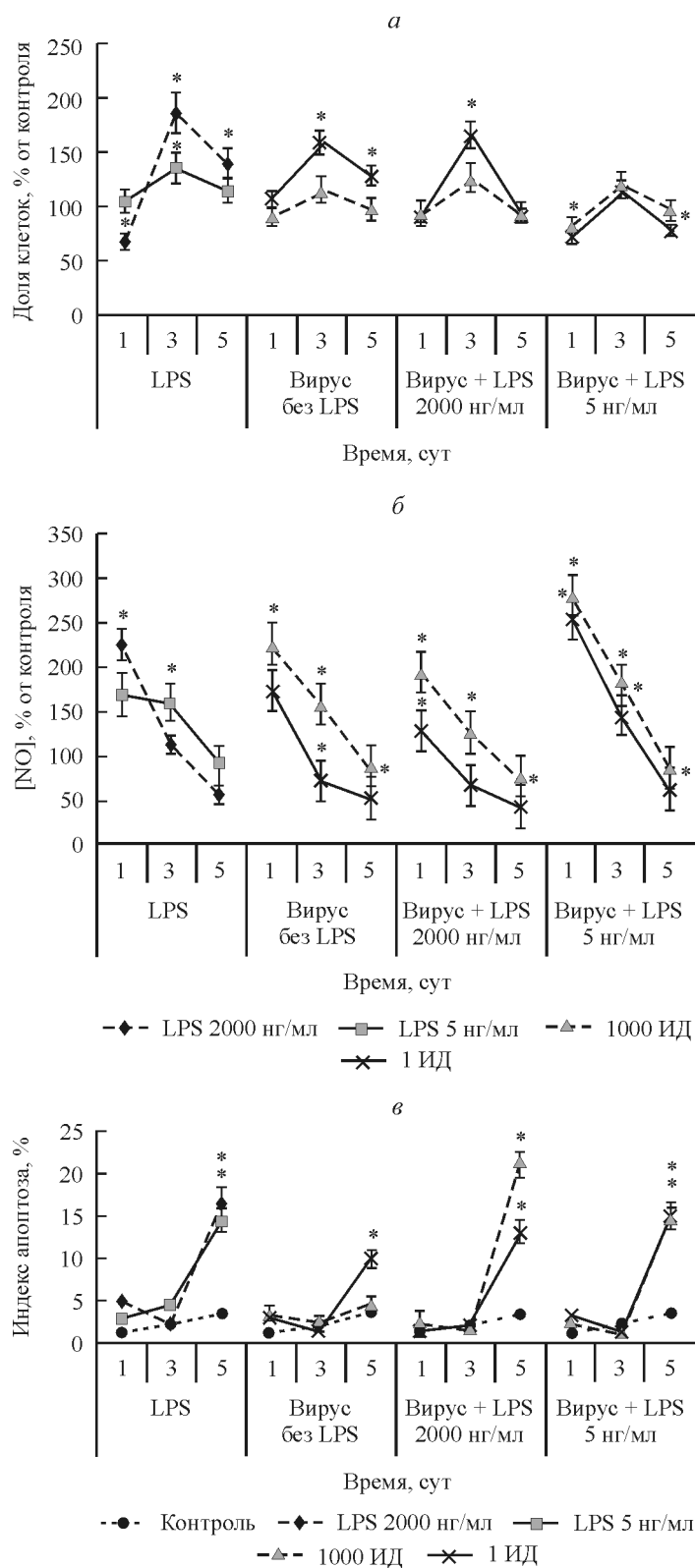


Рис. 2. Влияние вируса гриппа А/Санкт-Петербург/05/09 (H1N1pdm09) и липополисахарида (LPS) на пролиферацию (а), продукцию оксида азота NO (б) и индукцию апоптоза (в) в клетках ECV-304.

Представлены средние данные из трех экспериментов.

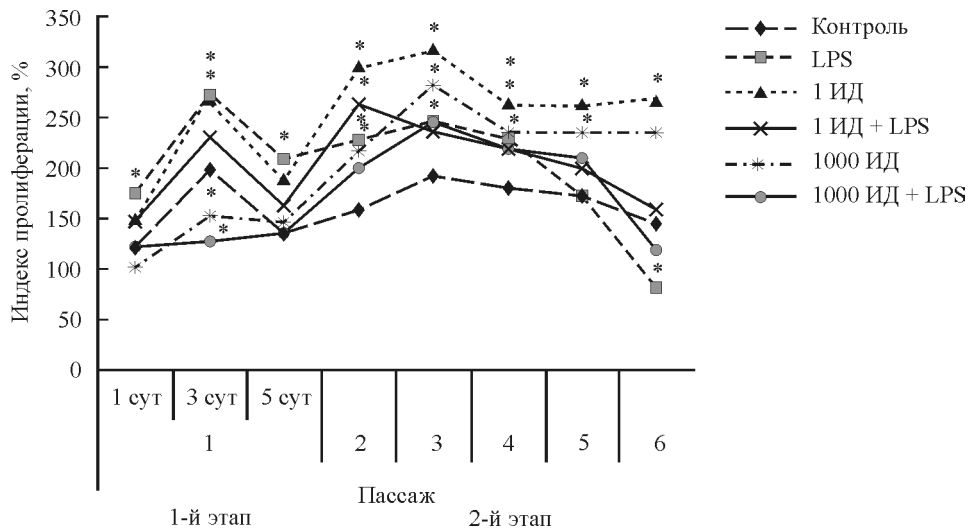


Рис. 3. Динамика пролиферации на протяжении 6 пассажей клеток ECV-304, однократно зараженных разными дозами вируса гриппа A/Санкт-Петербург/05/09 (H1N1pdm09), LPS (100 нг/мл) или вирусом совместно с LPS.

(с 3-го пассажа) и на более низком уровне. Добавление к клеткам одного LPS и LPS совместно с вирусом стимулировало клеточную пролиферацию до 4-го пассажа, а при последующем культивировании пролиферативная активность клеток, находящихся под воздействием LPS, значительно снижалась (рис. 3). На 5—6-м пассажах в присутствии LPS и в меньшей степени после заражения вирусом гриппа совместно с LPS обнаружено появление клеток фибробластоподобной морфологии (длинных и тонких клеток, игольчатой формы), которая исчезала после пересева (данные не представлены).

Влияние агентов. Оценивали влияние на пролиферацию и апоптоз клеток ECV-304, находящихся в разных функциональных состояниях после добавления вируса и LPS (1-й и 4—5-й пассажи), хорошо известного антивирусного препарата ремантадина и менее известного аллизарина, восстановленного глутатиона (антиоксиданта) и ингибитора рецептора LPS — TLR4-IN-C34. На 1-м пассаже после заражения клеток вирусом гриппа стимулированная вирусом пролиферация клеток снижалась после добавления ремантадина, аллизарина и глутатиона до уровня контроля и ниже, так же как и в экспериментах с добавлением LPS (рис. 4, а). Добавление TLR4-IN-C34 ингибировало только LPS-стимулированную пролиферацию клеток и не влияло на пролиферацию клеток, стимулированную одним вирусом гриппа. На 1-м пассаже после заражения ремантадин, аллизарин и глутатион значительно снижали уровень апоптоза, индуцированный заражением клеток вирусом, наиболее эффективное ингибирование наблюдали при добавлении восстановленного глутатиона. TLR4-IN-C34 практически в равной степени снижал апоптоз в клетках, зараженных как одним вирусом, так и вирусом совместно с LPS (рис. 4, б).

Добавление антивирусных препаратов и глутатиона к клеткам, находящимся на 4—5-м пассаже после однократного внесения вируса гриппа в низкой дозе (1 ИД) и (или) LPS, также ингибировало вирусостимулированную пролиферацию клеток эндотелия. Ингибитор TLR4-IN-C34 по-прежнему не оказывал влияния на пролиферацию клеток, стимулированную одним вирусом гриппа (рис. 4, в). Апоптоз клеток ECV-304 на этой стадии культивирования во всех вариантах эксперимента находился на очень низком уровне. Добавление ремантади-

на, аллизарина и в меньшей степени глутатиона значительно повышало уровень апоптоза во всех вариантах опыта (вирус, LPS и вирус совместно с LPS), но особенно в клетках, ранее инфицированных одним вирусом гриппа (рис. 4, г). Ингибитор TLR4-IN-C34 лишь незначительно повышал уровень апоптоза как в контрольных, так и в других вариантах экспериментальных клеток (рис. 4, г).

Обсуждение

В настоящей работе мы приводим дополнительные доказательства в пользу подтверждения отличий клеток ECV-304 от клеток T-24. В частности, это отсутствие способности клеток T-24 отвечать усилением пролиферации в ответ на заражение клеток низкими дозами вируса гриппа А. Эти результаты, а также способность клеток ECV-304 образовывать подобие сосудистых канальцев (tube) и показанная нами ранее экспрессия мРНК *eNOS* в клетках ECV-304 (Смирнова и др., 2016) дают дополнительные основания считать происхождение клеток ECV-304 эндотелиальным, благодаря чему возможно их использование в качестве модели клеток эндотелия человека.

Продолжая изучение влияния вируса гриппа на клетки эндотелия ECV-304, в данной работе оценивали изменения функционального состояния клеток на протяжении более длительного культивирования после заражения вирусом гриппа А (низкими или высокими ИД), а также после воздействия LPS. В непермиссивных клетках эндотелия человека ECV-304 происходит снижение вирусной репродукции в результате прекращения экспрессии мРНК вирусных белков, необходимых для синтеза полноценных вирусных частиц, но еще сохраняется экспрессия поверхностных вирусных белков (гемагглютинаина и нейраминидазы), которые могут быть ответственны за стимуляцию клеточной пролиферации и апоптоза (Даниленко и др., 2016). Наблюдаемые нами изменения клеток можно разделить на два этапа — 1-й этап, начинающийся на 1-м пассаже в процессе стимуляции пролиферации и апоптоза, и 2-й этап, формирующийся после 2—3-го пассажа. Запуск изменений на 1-м пассаже можно связать с увеличением экспрессии мРНК ряда цитокинов и факто-

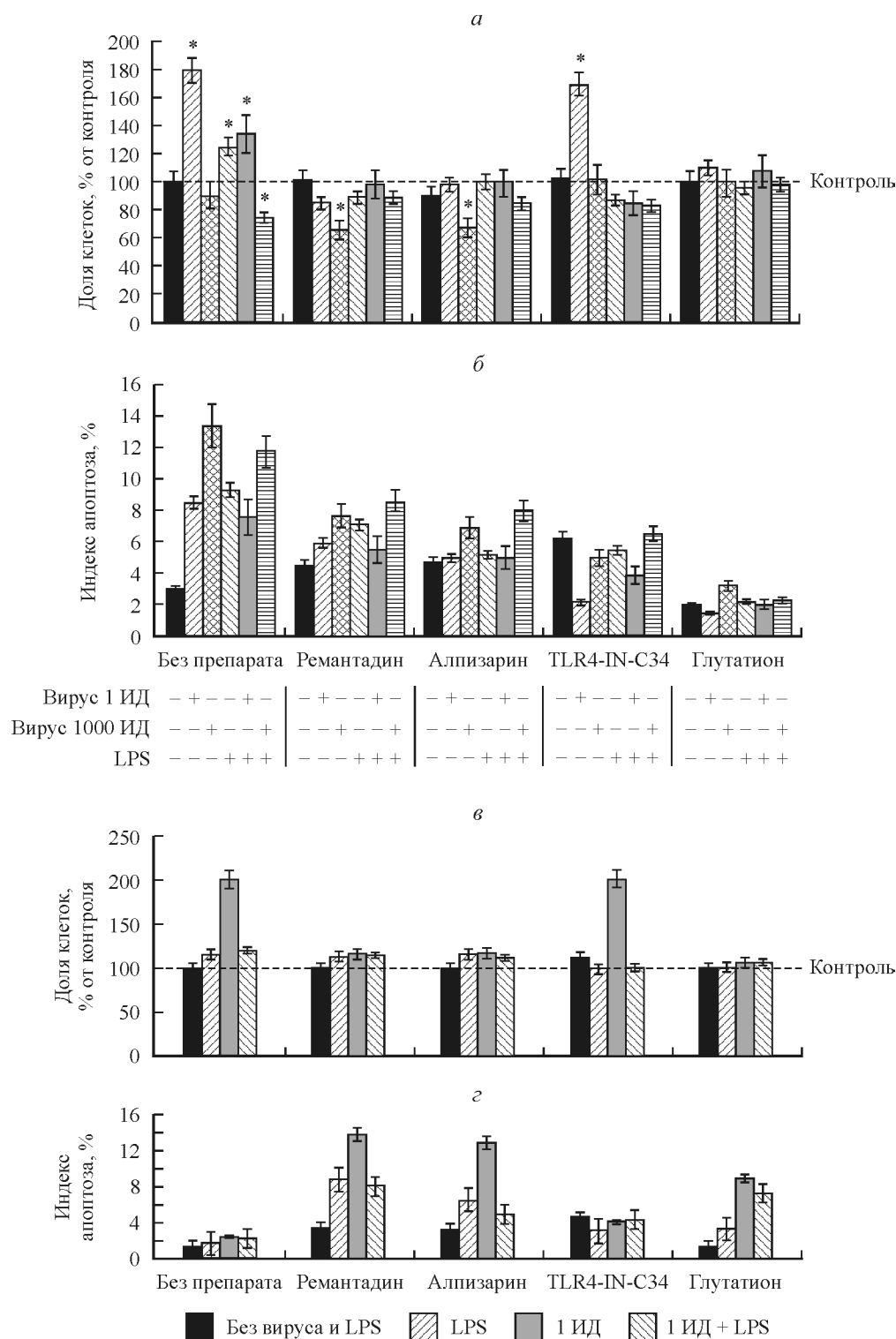


Рис. 4. Влияние ремантадина (20 мкг/мл), алпизарина (50 мкг/мл), восстановленного глутатиона (50 мкг/мл) и ингибитора TLR4-IN-C34 (50 мкг/мл) на пролиферацию (*a, в*) и апоптоз (*б, г*) клеток ECV-304 на пассажах 1 (1-й этап: *a, б*) и 5 (2-й этап: *в, г*) после заражения клеток вирусом гриппа А/Брисбен/10/07 (H3N2) отдельно или совместно с LPS (100 нг/мл).

Результаты оценивали на 4-е сут.

ров роста: трансформирующего фактора роста бета (*TGFβ*) и *eNOS* (что приводит к повышению пролиферации), а также фактора некроза опухоли альфа (*TNFα*), интерферона гамма (*IFN-γ*) и индуцибельной NO-синтазы (*iNOS*) (приводящих к усилению апоптоза) (Смирнова и др., 2016). Индукция апоптоза в клетках ECV-304 на

1-м этапе, по всей вероятности, способствует отбору клеток с повышенным пролиферативным потенциалом, но устойчивых к апоптозу, появление которых наблюдалось при дальнейшем культивировании (начиная с 3-го пассажа), т. е. на 2-м этапе функциональное состояние клеток меняется таким образом, что клетки приобретают повы-

шенный пролиферативный потенциал и уменьшение апоптотической гибели. Наиболее активно этот процесс происходил при первичном заражении клеток низкими ИД вируса по сравнению с заражением высокими ИД. Добавление LPS вносило дополнительные изменения в функциональное состояние клеток, которые заключались на 1-м этапе в менее выраженной (по сравнению с инфицированием низкими дозами вируса) стимуляции пролиферации, а при длительном культивировании — в снижении пролиферации как не инфицированных вирусом клеток, так и вирусостимулированных, а также в изменении морфологии клеток эндотелия в сторону фибробластов.

Активное участие на втором этапе функциональных изменений в клетках эндотелия может принимать TGF β , повышенная экспрессия мРНК которого отмечена нами на этом этапе (данные не представлены). TGF β взаимодействует с рецепторами ALK1 и ALK5, запускающими фосфорилирование, транслокацию в ядро и активацию транскрипционных факторов Smad. Активация сигнального пути ALK1 Smad 1/5/8 может привести к стабильной вирусостимулированной пролиферации клеток эндотелия в сторону ангиогенеза (Lin et al., 2012; van Meeteren, ten Dijke, 2012; Montorfano et al., 2014). В то же время в клетках эндотелия человека под воздействием LPS показано осуществление индукции фиброза через ALK5 Smad 2/3 сигнальный путь (Echeverria et al., 2013).

Вклад активных форм кислорода и азота в изменение функционального состояния клеток ECV-304 подтверждается в наших экспериментах повышением продукции NO на раннем этапе (1-й пассаж) после добавления вируса гриппа и (или) LPS. Клетки эндотелия синтезируют NO из L-аргинина с помощью NO-синтазы (NOS) — конститутивной eNOS и индуцибельной iNOS, экспрессия которой запускается под влиянием различных цитокинов, стрессов, бактериальных и вирусных агентов. Нарушение баланса между NO-синтазами, увеличение синтеза NO за счет iNOS приводит к нарушению координированной регуляции ангиогенеза и патологическим изменениям в сердечно-сосудистой, выделительной и других системах организма (Boueiz, Nassoun, 2009).

Ключевая роль окислительного стресса в этих процессах также подтверждается и ингибирующим влиянием антиоксиданта глутатиона на пролиферацию и апоптоз инфицированных клеток на 1-м пассаже и на пролиферацию клеток после 3-го пассажа. Интересно, что аналогичное влияние оказывают противовирусные препараты ремантадин и алпизарин. В то же время все эти препараты стимулировали апоптоз в клетках, находящихся в другом функциональном состоянии (сохранивших после 3-го пассажа повышенную пролиферативную активность, но снизивших апоптоз). Полученные результаты свидетельствуют о способности антиоксиданта глутатиона, а также противовирусных препаратов ремантадина и алпизарина восстанавливать нормальное функционирование клеток эндотелия после воздействия вируса гриппа А и (или) LPS. При этом ремантадин и алпизарин продемонстрировали не прямую противовирусную активность, а связь с другими клеточными мишенями, восстанавливающими нормальное функционирование клеток.

В последние годы проводится активный поиск пептидов, обладающих не только антибактериальной, но и противовирусной активностью (Hoffmann et al., 2014). Ингибитор рецептора TLR4 (TLR4-IN-C34), лигандом которого является LPS, обладает противовоспалительной активностью не только *in vitro*, но и *in vivo*. Механизм его действия за-

ключается в связывании с MD-2 — корцептором TLR4 (Neal et al., 2013). В наших экспериментах ингибитор TLR4-IN-C34 снижал LPS-стимулированную пролиферацию клеток и не влиял на пролиферацию клеток, стимулированную одним вирусом гриппа, но ингибировал пролиферацию клеток после добавления к вирусу LPS. В то же время ингибитор TLR4-IN-C34 был способен модулировать индукцию апоптоза не только в клетках с одним LPS, но и в клетках, зараженных одним вирусом и вирусом совместно с LPS: на 1-м пассаже наблюдали ингибирование апоптоза, а после 3-го пассажа — незначительное повышение.

Таким образом, показано, что в клетках эндотелия человека ECV-304 функциональные изменения, индуцируемые вирусом гриппа А и (или) LPS, происходят в два этапа: изменения на ранних пассажах (1—2-м) приводят в дальнейшем (начиная с 3-го пассажа) к изменениям, длительно и стабильно сохраняющимся при последующем культивировании. Причем изменения, вызываемые вирусом гриппа А и LPS, на 2-м этапе идут в различных направлениях. Клетки ECV-304 как на 1-м этапе после заражения вирусом гриппа и (или) LPS, так и на 2-м этапе можно использовать в качестве модели не только для более углубленного изучения процессов, происходящих в клетках, но и для тестирования препаратов различной направленности — противовирусных, противовоспалительных, антиангиогенных и реализующих свои эффекты в том числе через TLR4-рецепторы.

Список литературы

- Гильяно Н. Я., Семенова Е. Г., Федорцева Р. Ф., Конева Л. В. 2008. Характеристика спонтанно трансформированной эндотелиальной клеточной линии человека ECV304. II. Функциональные особенности клеток. Цитология. 50 (7) : 576—584. (Giliano N. Ya., Semenova E. G., Fedortseva R. F., Koneva L. V. 2008. Characteristics of the spontaneously transformed human endothelial cell line ECV304. II. Functional responses of the ECV304 cells. Tsitologiya. 50 (7) : 576—584.)
- 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 (А-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., Eroptkin M. Yu. 2016. Human lung carcinoma (A-549) continuing cell line and human endothelial (ECV-304) continuing cell line responses to the influenza virus at different multiplicities of infection. Cell Tissue Biol. (Tsitologiya). 10 (4) : 305—313.)
- Склянкina Н. Н., Болдырева Н. В., Щегловитова О. Н. 2011. Различия в функциональной активности культивируемых клеток эндотелия кровеносных сосудов человека, полученных от разных доноров. Цитология. 53 (4) : 341—346. (Scljankina N. N., Boldyreva N. V., Scheglovitova O. N. 2011. Differences in functional activity of cultivated human vascular endothelium received from different donors. Tsitologiya. 53 (4) : 341—346.)
- Смирнова С. С., Писарева М. М., Смирнова Т. Д., Плотникова М. А., Сивак К. В., Воробьев К. В. 2016. Влияние вируса гриппа А и бактериального липополисахарида на пролиферацию и экспрессию генов цитокинов и других клеточных факторов в клетках перевиваемой линии эндотелия ECV-304. Цитология. 58 (12) : 916—923. (Smirnova S. S., Pisareva M. M., Smirnova T. D., Plotnikova M. A., Sivak K. V., Vorobiev K. V. 2016. Effect of influenza A virus and bacterial lipopolysaccharide on proliferation and expression of cytokines and other cellular factors in

the endothelial cell line ECV-304. *Cell Tissue Biol. (Tsitologiya)*. 11 (2) : 147—154.)

Ярцева Н. М., Федорцева Р. Ф. 2008. Характеристика спонтанно трансформированной эндотелиальной клеточной линии человека ECV-304. 1. Множественные хромосомные перестройки. *Цитология*. 50 (7) : 568—575. (Yartseva N. M., Fedortseva R. F. 2008. Characteristics of the spontaneously transformed human endothelial cell line ECV-304. I. Multiple chromosomal rearrangements in endothelial cells ECV-304. *Tsitologiya*. 50 (7) : 568—575.)

Boueiz A., Hassoun P. M. 2009. Regulation of endothelial barrier function by reactive oxygen and nitrogen species. *Microvascular Res.* 77 : 26—34.

Brown J., Reading S. J., Jones S., Fitchett C. J., Howl J., Martin A., Longland C. L., 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 line T24/83. *Lab. Invest.* 80 : 37—45.

Dietert R., Hotchkiss J., Austic R., Sung Y.-J. 1995. Production of reactive nitrogen intermediates by macrophages. *Meth. Immunotoxicol.* 2 : 99—117.

Dirks W. G., Drexler H. G., MacLeod R. A. F. 1999. ECV304 (endothelial) is really T24 (bladder carcinoma): cell line cross-contamination at source. *In Vitro Cell. Develop. Biol. Anim.* 35 : 558—559.

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.

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.

Hoffmann J., Schneider C., Heinbockel L., Brandenburg K., Reamer R., Gabriel G. 2014. A new class of synthetic anti-lipopolysaccharide peptides inhibits influenza A virus replication by blocking cellular attachment. *Antiviral Res.* 104 : 23—33.

Lin F., Wang N., Zhang T.-C. 2012. The role of endothelial-mesenchymal transition in development and pathological process. *Life.* 64 : 717—723.

Liu H., Zhang C., Huang K. 2011. Lanthanum chloride suppresses oxysterol-induced ECV-304 cell apoptosis via inhibition of intracellular Ca(2+) concentration elevation, oxidative stress, and activation of ERK and NF- κ B signaling pathways. *J. Biol. Inorg. Chem.* 16 : 671—681.

Majumder S., Rajaram M., Muley A., Reddy H. S., Tamilarasan K. P., Kolluru G. K., Sinha S., Siamwala J. H., Gupta R., Ilavarasan R., Venkataraman S., Sivakumar K. C., Anishetty Sh., Kumar P. G., Chatterjee S. 2009. Thalidomide attenuates nitric oxide-driven angiogenesis by interacting with soluble guanylyl cyclase. *Br. J. Pharmacol.* 158 : 1720—1734.

Meeteren L. A., van, ten Dijke P. 2012. Regulation of endothelial cell plasticity by TGF- β . *Cell Tissue Res.* 347 : 177—186.

Montorfano I., Becerra A., Cerro R., Echeverria C., Saez E., Morales M. G., Fernandez R., Cabello-Verrugio C., Simon F. 2014. Oxidative stress mediates the conversion of endothelial cells into myofibroblasts via a TGF-b1 and TGF-b2-dependent pathway. *Lab. Invest.* 94 : 1068—1082.

Narayanaswamy R., Shymatak M., Chatterjee S., Wai L. K., Arumugam G. 2014. Inhibition of angiogenesis and nitric oxide synthase (NOS), by embelin and vilangin using *in vitro*, *in vivo*, and *in silico* studies. *Adv. Pharm. Bull.* 4 : 543—548.

Neal M. D., Jia H., Eyer B., Good M., Guerriero C. J., Sodhi C. P., Afrazi A., Prindle T. Jr., Ma C., Branca M., Ozolek J., Brodsky J. L., Wipf P., Hackam D. J. 2013. Discovery and validation of a new class of small molecule Toll-like receptor 4 (TLR4) inhibitors. *PLoS ONE.* 8 : e65779.

Salazar G., Bellocchi C., Todoerti K., Saporiti F., Piacentini L., Scorza R., Colombo G. I. 2016. Time-course gene expression data on the transcriptional effects of Aminaphtone on ECV304 endothelial cells. *Data Brief.* 8 : 836—850.

Short K. R., Kasper J., van der Aa S., Andewed A. C., Zaa-raoui-Boutahar F., Goeyenbier M., Richard M., Herold S., Becker C., Scott D. R., Limpens R. W., Koster A. J., Barcena M., Foucher R. A., Kirpatrick C. J., Kuiken T. 2016. Influenza virus damages the alveolar barrier by disrupting epithelial cell tight junctions. *Eur. Respir. J.* 47 : 954—966.

Short K. R., Veldhuis Kroeze E. J. B., Fouchier R. A. M., Kuiken Th. 2014a. Pathogenesis of influenza-induced acute respiratory distress syndrome. *Lancet Infect. Dis.* 14 : 57—69.

Short K. R., Veldhuis Kroeze E. J. B., Reperant L. A., Richard M., Kuiken Th. 2014b. Influenza virus and endothelial cells; a species specific relationship. *Front. Microbiol.* 5. 653. Doi: 10.3389/fmicb.2014.00653.

Suda K., Rothen-Rutishauser B., Gunthert M., Wunderli-Allenspach H. 2001. Phenotypic characterization of human umbilical endothelial (ECV304) and urinary carcinoma (T24) cells: endothelial versus epithelial features. *In Vitro Cell Develop. Biol. Anim.* 37 : 505—514.

Sun X., Zeng H., Kumar A., Belser J. A., Mainas T. R., Tumpey T. M. 2016. Constitutively expressed IFITM3 protein in endothelial cells poses an early infection block to human influenza viruses. *J. Virol.* 28 : 11 157—11 167.

Takahashi K., Sawasaki Y., Hata J., Mukai K., Goto T. 1990. Spontaneous transformation and immortalization of human endothelial cells. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 26 : 265—274.

Teijaro J., Walsh K., Cahalan S., Fremgen D. M., Roberts E., Scott F., Martinborough E., Peach R., Oldstone M. B. A., Rosen H. 2011. Endothelial cells are central orchestrators of cytokine amplification during influenza virus infection. *Cell.* 146 : 980—991.

Поступила 3 XI 2017

CHANGE IN THE FUNCTIONAL STATE OF CELLS OF THE HUMAN ENDOTHELIAL CELL LINE ECV-304 UNDER THE INFLUENCE OF INFLUENZA A VIRUS, LIPOPOLYSACCHARIDE FROM *ESCHERICHIA COLI* AND SOME DRUGS

S. S. Smirnova,^{1,2,*} T. D. Smirnova,² K. V. Sivak,² K. V. Vorobiev¹

¹ Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, St. Petersburg, 195251, and
² Research Institute of Influenza of Ministry of Health of Russia, St. Petersburg, 197376;
 * e-mail: sm.svetlana.s@gmail.com

Influenza A virus and bacterial lipopolysaccharide (LPS) cause dysfunction of the vascular endothelium that can lead to severe complications of the disease, such as acute respiratory failure and cardiovascular damage. Changes in the functional state of human endothelial cells ECV-304 during prolonged cultivation after exposure to LPS and infection with low or high doses on influenza A virus were investigated in the current study.

Assessment of the ability of some drugs to restore the functional state of cells was also carried out under the same conditions. Change in the functional state of cells was assessed by the proliferative activity and the level of apoptosis of cells throughout the entire cultivation period (at least 6 passages) and by the production of nitric oxide (NO) at the first passage. The difference in ECV-304 endothelial cells from T-24 bladder carcinoma cells based on their sensitivity to influenza A virus was also demonstrated in the work. It was shown that functional changes in ECV-304 cells after infection with influenza virus and (or) LPS occur in two stages and can develop in different directions, depending on the impact factor (virus or LPS). At stage 1 (early passages), after infection of cells with low doses in influenza A virus or LPS, there was an increase of cell proliferation and induction of apoptosis. At stage 2 (after the 3rd passage), a very low level of apoptosis was detected in cells exposed to virus and (or) LPS, but cells infected with only the virus retained an increased proliferative potential, and a gradual decrease of proliferation was noted in cells exposed to LPS. Antioxidant (reduced glutathione), as well as antiviral drugs (rimantadine and alpisarin), showed the ability to restore the normal state of cells. The inhibitor of Toll-like receptor-4 (TLR4) LPS (TLR4-IN-C34) suppressed only LPS-stimulated cell proliferation. Thus, ECV-304 cells infected with influenza virus and (or) LPS can be used as a model not only for in-depth study of processes taking place in cells, but also for testing a number of different drugs.

Key words: human endothelial cells ECV-304, lipopolysaccharide, influenza A virus, proliferation, apoptosis, nitric oxide synthesis.
