

И. Н. Жилинская<sup>1</sup>, А. А. Азаренок<sup>1</sup>, Е. В. Ильинская<sup>1</sup>, А. Р. Прочуханова<sup>1</sup>, С. Л. Воробьев<sup>2</sup>, Е. В. Сорокин<sup>1</sup>,  
Т. Р. Царева<sup>1</sup>

## Репродукция вируса гриппа в клетках эндотелия кровеносных сосудов человека

<sup>1</sup>НИИ гриппа СЗО РАМН, Санкт-Петербург, <sup>2</sup>ГУЗ Ленинградское областное патолого-анатомическое бюро, Санкт-Петербург

Современные эпидемические штаммы вирусов гриппа подтипов H5N1, H3N2, H1N1 способны репродуцироваться в культуре клеток эндотелия человека EAhy926 с инфекционной активностью 3,0–4,5 lg ТЦД<sub>50</sub>. Эти данные подтверждаются данными регистрации HA и NP-белков вируса гриппа в эндотелии кровеносных сосудов легких при анализе аутопсийного материала пациентов, умерших от гриппа во время эпидемии 2009–2010 гг. Полученные результаты отражают новый аспект патогенеза гриппа для разработки противовирусных препаратов и комплексной терапии.

Ключевые слова: вирус гриппа, белки, клетки эндотелия, кровеносные сосуды

### Influenza virus reproduction in the endothelial cells of human blood vessels

I. N. Zhilinskaya<sup>1</sup>, A. A. Azarenok<sup>1</sup>, E. V. Ilyinskaya<sup>1,2</sup>, A. R. Prochukhanova<sup>1</sup>, S. L. Vorobyev<sup>2</sup>,  
E. V. Sokorin<sup>1</sup>, T. R. Tsareva<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Research Institute of Influenza, North-Western Branch, Russian Academy of Medical Sciences, Saint Petersburg;

<sup>2</sup>Leningrad Regional Morbid Anatomy Bureau, Saint Petersburg

The current epidemic strains of the influenza subtypes Y5N1, H3N2, and H1N1 can be reproduced in the cultured human endothelial EAhy926 cells with an infective activity of 3.0–4.5 lg TCD<sub>50</sub>. These findings were confirmed by the analysis of the autopsy material from patients who had died from influenza during the 2009–2010 epidemic, which showed influenza virus HA and NP proteins in the pulmonary blood vascular endothelium. The results obtained reflect a new aspect of the pathogenesis of influenza, which is important for the design of antiviral agents and for the development of combination therapy.

Key words: influenza virus, proteins, endothelial cells, blood vessels

Общеизвестно, что вирус гриппа поражает не только респираторный тракт, но и другие органы, такие как кишечник, мозг, сердце и кровеносные сосуды [2, 5, 6, 11]. В последние годы получены данные о том, что ежегодные эпидемии гриппа сопровождаются подъемом сердечно-сосудистых заболеваний, в связи с чем сформулирована гипотеза, что эпидемия “испанки” в 1918–1920 гг. могла играть определенную роль в последующем росте частоты заболеваний сердца и сосудов [10]. Клинические исследования, проводимые в период 2005–2009 гг., когда летальность от гриппа была невысока и в основном приходилась на людей пожилого возраста, также показали, что фатальная гриппозная инфекция сопровождалась сердечно-сосудистой недостаточностью (50%) и дыхательной дисфункцией в связи с геморрагическим характером пневмоний, что могло быть следствием повреждений эндотелия сосудов [1, 3, 4]. Особую актуальность вопрос о повреждающем действии вируса

гриппа на эндотелий сосудов приобрел во время эпидемии “свиного” гриппа H1N1 из-за высокой летальности от геморрагических пневмоний [12].

Поскольку этот аспект патогенеза гриппозной инфекции практически не изучен, целью настоящего исследования явилась оценка способности вирусов гриппа типа А репродуцироваться в эндотелии кровеносных сосудов человека.

### Материалы и методы

Вирусы. Исследовали вирусы гриппа А/Brisbane/10/2007 (H3N2), А/Курган/5/05 NS1–81/5:3 (H5N1) и А/Санкт-Петербург/2/2009 (H1N1v). Все вирусы получены из Лаборатории этиологии НИИ гриппа СЗО РАМН.

Клеточные культуры. Репродукцию изучали на культуре клеток эндотелия человека EAhy926, любезно предоставленной д-ром Корой Джин Эйджел из Отдела патологии Университета Северной Каролины.

### Репродукция вируса гриппа А в клетках эндотелия EAhy926 и MDCK

Вирусы гриппа	Инфекционный титр вируса, lg ТЦД <sub>50</sub> /мл, через 72 ч после заражения		Титр в РГА (с 1% куриными эритроцитами)	
	EAhy926	MDCK	EAhy926	MDCK
A/Brisbane/10/2007 (H3N2)	3,50	5,23	1/128	1/1024
A/Курган/5/05/NS1-81/5:3 (H5N1)	3,48	4,55	1/64	1/128
A/Санкт-Петербург/2/2009 (H1N1v)	4,16	5,50	1/128	1/256

Контактная информация:

Жилинская Ирина Николаевна, д-р биол. наук; e-mail: irina@influenza.spb.ru

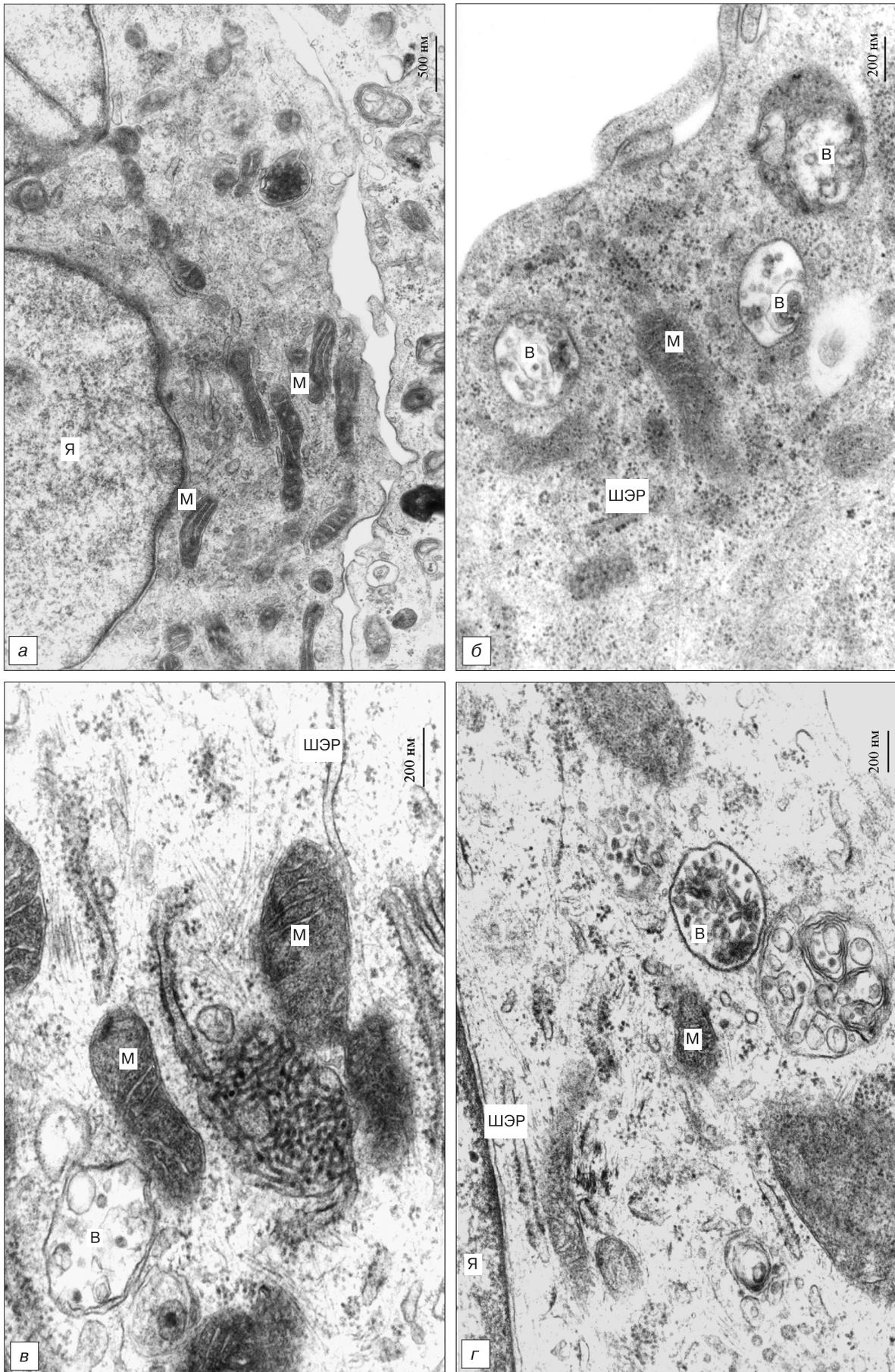


Рис. 1. Электронограмма эндотелиальных клеток EAhy926, инфицированных вирусом гриппа (через 24 ч после заражения).  
*a* – intactные клетки; *б* – клетки, инфицированные вирусом A/Brisbane/10/2007 (H3N2); *в* – клетки, инфицированные вирусом A/Курган/5/05/NS1-81/5:3 (H5N1); *г* – клетки, инфицированные вирусом A/Санкт-Петербург/2/2009 (H1N1v). Я – ядро; М – митохондрия; ШЭР – шероховатый эндоплазматический ретикулум; В – вакуоль с вирусоподобными частицами.

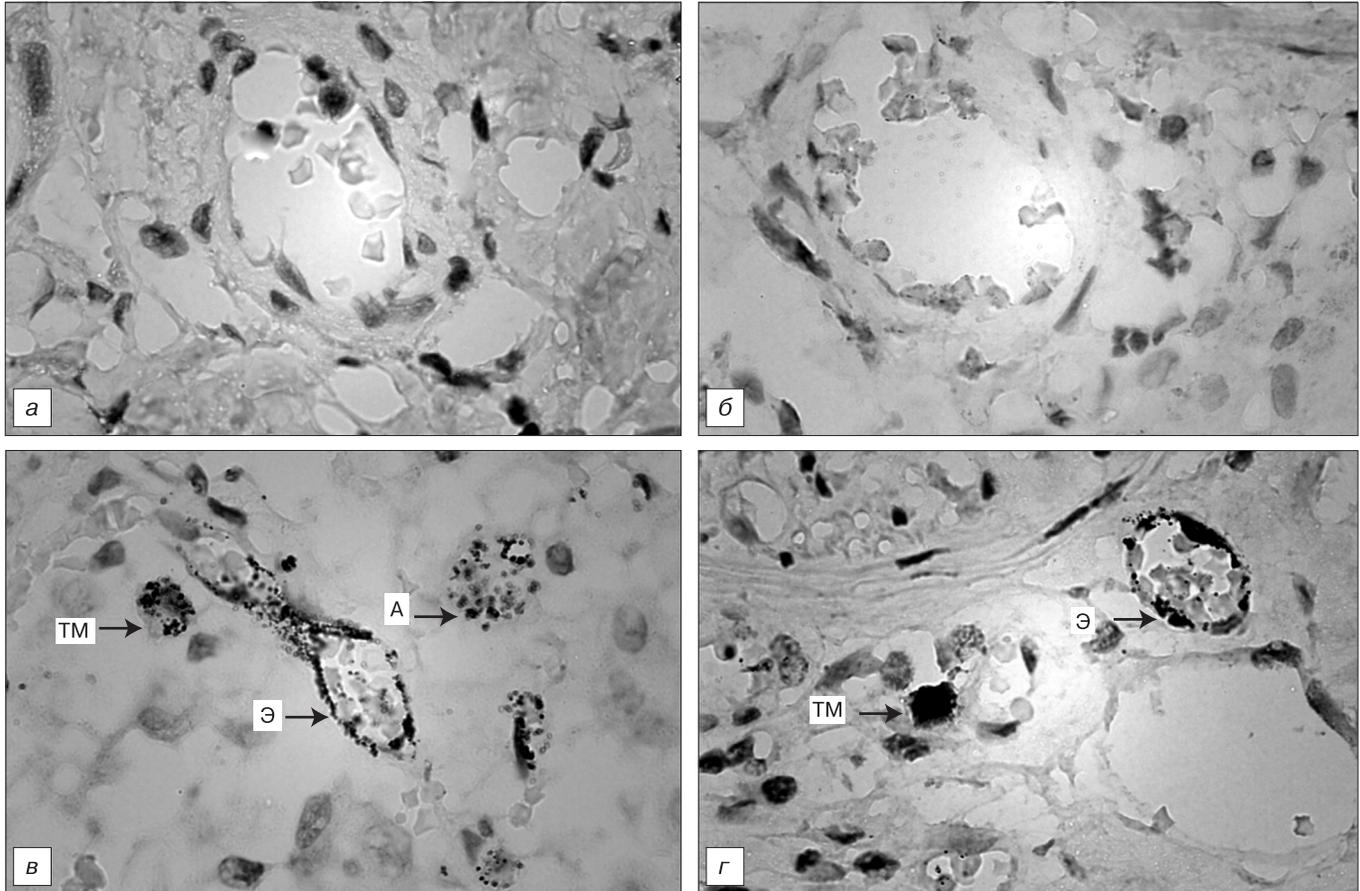


Рис. 2. Иммуногистохимический анализ локализации HA и NP вируса гриппа A(H1N1v) в аутопсийном материале легких пациентов. *a* – контроль на отсутствие реакции МКА с HA; *б* – контроль на отсутствие реакции МКА с NP; *в* – локализация HA в клетках эндотелия сосудов, альвеолярного эпителия, тканевых макрофагах; *г* – локализация NP в клетках эндотелия сосудов и тканевых макрофагах. Э → эндотелий; А → альвеолярный эпителий; ТМ → тканевой макрофаг. (Ув. 100 с иммерсией; окрашивание клеток ДАБ-хромогеном с последующей окраской гематоксилином Майера).

Клеточную линию EAhy926 поддерживали в среде DMEM/F-12 с Хепесом и L-глутамином, содержащей 10% сыворотки эмбрионов коров (“Биолот”, Санкт-Петербург). Для сравнения была взята культура клеток MDCK из коллекции клеточных культур НИИ гриппа СЗО РАМН, культивируемая по общепринятой методике. Заражение клеточного монослоя проводили путем адсорбции вируса при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> (инкубатор фирмы «SANYO», Япония) в поддерживающей среде DMEM, содержащей 2 мкг/мл трипсина TPCK. Через 1 ч после адсорбции клетки отмывали и инкубировали в той же среде в течение 72 ч.

Определение инфекционной активности вируса гриппа в культуре клеток. Инфекционную активность вирусов гриппа определяли титрованием вирусосодержащего материала в суточной культуре EAhy926 и суточной культуре MDCK с коэффициентом 10 и рассчитывали методом Рида и Менча (1938). Инфекционную активность вирусов оценивали по ТЦД<sub>50</sub> и в реакции гемагглютинации (РГА) с куриными эритроцитами общепринятым методом через 72 ч после заражения.

Электронная микроскопия. Электронно-микроскопический анализ клеточной культуры EAhy926, интактной и инфицированной вирусами гриппа А (доза заражения вирусами 100 ТЦД<sub>50</sub>/культура (10<sup>6</sup> клеток); время репродукции вируса 24 ч), был выполнен на микроскопе JEM-1011. Клетки фиксировали в 2% глутаральдегиде на 0,1 М какодилатном буфере (pH 7,4) в течение 1 ч при комнатной температуре, постфикси-

ровали в 1% четырехоксида осмия на том же буфере в аналогичных температурных условиях. Материал обезживали в этаноле восходящей концентрации и заключали в смесь эпона и аралдита. Ультратонкие срезы изготавливали на ультратоме LKB-100.

Иммуногистохимический анализ аутопсийного материала легких. Аутопсийный материал легких от пациентов, умерших во время эпидемии 2009–2010 гг., был предоставлен Ленинградским областным патолого-анатомическим бюро Санкт-Петербурга. Анализировали ткани легких методом иммуногистохимии с моноклональными антителами (МКА) к гемагглютинуину (HA) и нуклеопротеину (NP) вируса гриппа и выявляли их с помощью систему визуализации фирмы “Novolink” (Novocastra), включающей реакцию с ДАБ-хромогеном.

МКА к HA вируса гриппа H1N1v и к NP-белку вируса гриппа А были получены в лаборатории биотехнологии диагностических препаратов НИИ гриппа СЗО РАМН. В качестве контроля был использован аутопсийный материал легких от пациентов, умерших с признаками прогрессирующей легочной дисфункции и явлениями острого респираторного дистресс-синдрома, не имевших диагноза “грипп”.

### Результаты и обсуждение

Изучение репродукции вируса гриппа в культуре клеток EAhy926. Как видно из таблицы, исследуемые вирусы были способны инфицировать клеточную

культуру EAhy926. Однако инфекционный титр вируса в клетках эндотелия и титр в РГА был ниже, чем в культуре клеток MDCK, которая является перmissive культурой для вируса гриппа. Возможно, это объясняется особенностями физиологии эндотелиальных клеток. Наши данные совпадают с данными Н. Klenk [9], А. Feldmann и соавт. [8], М. Chan и соавт. [7], показавших способность вируса чумы птиц и вирусов гриппа H5N1 и H1N1, выделенных в 1997–1998 гг., репродуцироваться в клетках эндотелия куриных эмбрионов и первичной культуре клеток эндотелия легких.

Электронно-микроскопический анализ морфологии эндотелиальной клеточной культуры EAhy926. Как видно из рис. 1, б, в, г, в клетках, инфицированных исследуемыми вирусами, отмечено увеличение количества диктиосом и расширение цистерн аппарата Гольджи, а также увеличение количества шероховатого эндоплазматического ретикулума. Кроме этого, в инфицированных клетках наблюдали увеличение количества миеоидных телец и обнаруживали вакуоли с вирусоподобными частицами. Все это указывает на наличие в исследуемых клетках вирусной инфекции.

Иммуногистохимический анализ аутопсийного материала из легких пациентов, умерших во время эпидемии 2009–2010 гг. Для подтверждения возможности репродукции вируса гриппа в эндотелии был проведен иммуногистохимический анализ аутопсийного материала легких 8 пациентов, умерших во время эпидемии 2009–2010 гг. Как видно на рис. 2, в, НА вируса гриппа H1N1v локализовался на плазматической мембране и в цитоплазме клеток эндотелия мелких кровеносных сосудов, клеток альвеолярного и бронхиолярного эпителия и внутри альвеолярных и тканевых макрофагов. NP-антиген этого вируса (см. рис. 2, г) регистрировали в тех же клетках и тканях, что и НА, но NP был локализован в ядрах клеток, что отражает особенности репродукции вируса гриппа.

Все описанные выше этапы исследования показали, что вирус гриппа может полноценно репродуцироваться

в эндотелии кровеносных сосудов и вызывать повреждение его клеток. С нашей точки зрения эти результаты исследования репродукции вирусов гриппа типа А (подтипы H3N2, H5N1, H1N1v 2009 г. выделения) представляются чрезвычайно важными для изучения патогенеза гриппозной инфекции и разработки новых подходов к лечению гриппа и созданию этиотропных комплексных противовирусных препаратов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Богомолов Б. П., Молькова Т. Н., Девяткин А. В. Клинико-анатомические параллели поражения сердца при спорадическом гриппе // *Клин. мед.* – 2001. – № 9. – С. 50–53.
2. Парусов В. Н. Патологическая анатомия, патогенез и экспериментальная терапия тяжелых форм гриппа. – Л., 1981.
3. Роганова И. В. Значение нарушений тромбоцитарно-сосудистого гемостаза в патогенезе гриппа // *Инфекц. бол.* – 2009. – Т. 7, прил. 1. – С. 183–184.
4. Сергеев Н. В., Лейтес Ф. Я. Поражения сердечно-сосудистой системы при гриппе. – М., 1962.
5. Цинзерлинг А. В. Этиология и патологическая анатомия тяжелых форм ОРВИ. – Л., 1977.
6. Andreoletti L., Leveque N., Boulagnon C., Brasselet C. Viral causes of human myocarditis // *Arch. Cardiovasc. Dis.* – 2009. – Vol. 102. – P. 6–7.
7. Chan Michael C. W., Chan Rehee W. Y., Yu W. C. L. et al. Influenza H5N1 virus infection of polarized human epithelial cells and lung microvascular endothelial cells // *Respir. Res.* – 2009. – Vol. 10, N 1. – P. 102–115.
8. Feldmann A., Schafer M. K., Garten W., Klenk H. D. Targeted infection of endothelial cells by avian influenza virus A/FPV/Rostock/34(H7N1) in chicken embryos // *J. Virol.* – 2000. – Vol. 74, N 17. – P. 8018–8027.
9. Klenk H. D. Infection of endothelium by influenza viruses // *Thromb. Haemost.* – 2005. – Vol. 94, N 2. – P. 262–265.
10. Mohammad Madjid. Acute infections, vaccination and prevention of cardiovascular disease // *Can. Med. Assoc. J.* – 2008. – Vol. 179, N 8. – P. 749–750.
11. Smeeth L., Thomas S. L., Hall A. J. et al. Risk of myocardial infarction and stroke after acute infection or vaccination // *N. Engl. J. Med.* – 2004. – Vol. 351. – P. 2611–2618.
12. Soto-Abraham M. V., Soriano-Rosas J., Diaz-Quinonez A. et al. Pathological changes associated with the 2009 H1N1 virus // *N. Engl. J. Med.* – 2009. – Vol. 361. – P. 2001–2003.

Поступила 28.03.11

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2012  
УДК 615.371.012.6.076.9

А. В. Цыбульский<sup>1</sup>, А. М. Попов<sup>2</sup>, А. А. Артюков<sup>2</sup>, А. Н. Мазейка<sup>1</sup>, Э. Я. Костецкий<sup>1</sup>, Н. М. Санина<sup>1</sup>,  
О. Н. Кривошанко<sup>2</sup>

## Повышение иммуногенной активности вакцины Инфлювак при использовании адъювантных ТИ-комплексов, модифицированных этинохромом А

<sup>1</sup>Дальневосточный федеральный университет, <sup>2</sup>Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН, Владивосток

На основе гликолипидов из морских макрофитов, сапонина из голотурий и холестерина путем самосборки получены наноразмерные морфологические структуры, названные нами тубулярными иммуностимулирующими (ТИ) комплексами. Изучена возможность построения на их основе вакцинных препаратов, содержащих субъединичные антигены вируса гриппа. Зарегистрировано четкое повышение иммуногенности гемагглютинина вируса гриппа при иммунизации экспериментальных животных этим антигеном в составе ТИ-комплексов. Показана возможность усиления адъювантной активности ТИ-комплекса к гемагглютинину вируса гриппа путем добавления в состав матрицы ТИ-комплекса известного антиоксиданта этинохрома А из плоского морского ежа *Scaphechinus mirabilis*.

Ключевые слова: вакцины, ТИ-комплекс, ИСКОМ, тритерпеновые гликозиды, 1,4-нафтохиноны, липиды, адъюванты

Контактная информация:

Цыбульский Александр Васильевич, канд. мед. наук, доц.; e-mail: dvt\_biotech@mail.ru