

- virus-like particles. *Virology*. 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2012.09.014>
5. Du L., Zhou Y., Jiang S. Research and development of universal influenza vaccines. *Microb. Infect.* 2010; 12: 280–6.
 6. Iwasaki A., Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune response. *Nat. Immunol.* 2004; 5: 987–95.
 7. Fan J., Liang X., Horton M.S. et al. Preclinical study of influenza virus A M2 peptide conjugate vaccines in mice, ferrets, and rhesus monkeys. *Vaccine*. 2004; 22: 2993–3003.
 8. Feng T., Cong Y., Alexander K., Elson C.O. Regularion of toll-like receptor 5 gene expression and function on mucosal dendritic cells. *PLoS One*. 2012; 7: e35918.
 9. Filette M., Fiers W., Martens W. et al. Improved design and intranasal delivery of an M2e-based human influenza A vaccine. *Vaccine*. 2006; 24: 6597–601.
 10. Fiers W., De Filette M., El Bakkouri K. et al. M2e-based universal influenza A vaccine. *Vaccine*. 2009; 27: 6280–3.
 11. Honko A.N., Sriranganathan N., Lees C.J. et al. Flagellin is an effective adjuvant for immunization against lethal respiratory challenge with *Yersinia pestis*. *Infect. immun.* 2006; 74: 1113–20.
 12. Huleatt J.W., Jacobs A.R., Tang J. et al. Vaccination with recombinant fusion proteins incorporating Toll-like receptor ligands induces rapid cellular and humoral immunity. *Vaccine*. 2007; 25: 763–75.
 13. Huleatt J.W., Nakaar V., Desai P. et al. Potent immunogenicity and efficacy of a universal influenza vaccine candidate comprising a recombinant fusion protein linking influenza M2e to the TLR5 ligand flagellin. *Vaccine*. 2008; 26: 201–14.
 14. Jegerlehner A., Schmitz N., Storni T. et al. Influenza A vaccine based on the extracellular domain of M2: weak protection mediated via antibody-dependent NK cell activity. *J. Immunol.* 2004; 172: 5598–605.
 15. Mozdzanowska K., Feng J.Q., Eid M. et al. Induction of influenza type A virus specific resistance by immunization of mice with a synthetic multiple antigenic peptide vaccine that contains ectodomains of matrix protein 2. *Vaccine*. 2003; 21: 2616–26.
 16. Osterhaus A., Fouchier R., Rimmelzwaan G. Towards universal influenza vaccines? *Phil. Trans. R. Soc. B*. 2011; 366: 2766–73.
 17. Rudolph W., Ben-Yedidia T. Human vaccines: policy. *Hum. Vaccines*. 2011; 7: 10–1.
 18. Pumpens P., Grens E. HBV core particles as a carrier for B cell/T cell epitopes. *Intervirology*. 2001; 44: 98–114.
 19. Schotsaert M., De Filette M., Fiers W., Saelens X. Universal M2 ectodomen-based influenza A vaccines: preclinical and clinical developments. *Expert. Rev. Vaccines*. 2009; 8: 499–508.
 20. Talbot H.K., Rock M.T., Johnson C. et al. Immunopotential of trivalent influenza vaccine when given with VAX102, a recombinant influenza M2e vaccine fused to the TLR5 ligand flagellin. *PLoS One*. 2010; 5: e14442.

Поступила 15.01.13

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2013
УДК 578.832.1:578.242].083.2

А. А. Азаренок, Е. М. Еропкина, А. Р. Прочуханова, А. А. Шалджян, Н. М. Козлова, К. Н. Козелецкая, И. Н. Жилинская

Воздействие вирусов гриппа А и их поверхностных белков на метаболизм клеток эндотелия кровеносных сосудов человека

ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России, Санкт-Петербург

Современные эпидемические штаммы вирусов гриппа подтипов H5N1, H3N2, H1N1 способны снижать метаболизм клеток эндотелия в пределах от 20 до 60% (по сравнению с контролем). Степень снижения активности дегидрогеназ зависела от дозы заражения клеток вирусом и от времени его репродукции. Гемагглютинин и нейраминидаза также активно снижали метаболизм клеток в пределах от 5 до 60%, что зависело от концентрации белков и времени их воздействия на клетку. По МТТ-тесту нейраминидаза оказалась активнее гемагглютинина (при концентрации белков 50 мкг/мл).

Ключевые слова: вирус гриппа, белки, клетки эндотелия, метаболизм, активность дегидрогеназ

The Influenza Viruses and Their Surface Proteins Impact on the Metabolism of Human Blood Vessel Endothelium Cells

A. A. Azarenok, E. M. Eroпкина, A. R. Prochukhanova, A. A. Shaldzhyan, N. M. Kozlova, K. N. Kozeletskaya, I. N. Zhilinskaya

Federal State Research Institute of Influenza, Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation, St. Petersburg, Russia

The modern influenza virus subtypes H3N2, H5N1, and H1N1 reduced the metabolism of the endothelial cells within the range from 20% to 60% (compared with control). The degree of the activity of the dehydrogenase reduction depended on the dose of virus and time of virus reproduction. HA and NA also actively reduced the metabolism of the cells ranging from 5% to 60%, depending on the concentration of the proteins and time of their impact on cells. Neuraminidase was more active than hemagglutinin in the MTT test (at concentration 50 µg protein/ml).

Key words: influenza virus, proteins, endothelium cells, metabolism, activity of dehydrogenases

Общеизвестно, что поражение вирусом гриппа кровеносных сосудов, приводящее к тромбгеморрагическому синдрому, является одним из признаков тяжело протекающей гриппозной инфекции [8]. Однако этому аспекту патогенеза гриппа ранее уделялось недостаточ-

но внимания. За последнее десятилетие появился ряд данных, указывающих на взаимодействие вируса гриппа с эндотелием кровеносных сосудов, в частности на возможность репродукции вируса в клетках эндотелия с последующим развитием их дисфункции [2, 3, 11].

Контактная информация:

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

Вместе с тем не только сам вирус, но и отдельные белки могут оказывать действие на эндотелиальные клетки, вызывая нарушение их жизнедеятельности [4–7].

Цель нашей работы состояла в сравнительном исследовании влияния вирусов гриппа А и их поверхностных белков на метаболизм эндотелиальных клеток переливаемой линии EAhy926.

Материалы и методы

Вирусы. Исследовали 3 штамма вирусов гриппа: эпидемический штамм вируса гриппа человека А/Брисбен/10/2007 (H3N2); реассортантный штамм вируса гриппа птиц А/курица/Курган/5/05 NSI-81/5:3 (этот штамм получен методом обратной генетики; геном включает следующие гены: а) полимераз PB2 и PA, нуклеопротеина (NP), неструктурных белков (NS) от вируса А/PR/8/34(H1N1); полимеразы PB1 от вируса А/Техас/1/77 (H3N2); б) гемагглютинина (HA) от дикого штамма А/курица/Курган/5/05 (H5N1), модифицированного по сайту расщепления; в) нейраминидазы (NA) и мембранных белков (M) от дикого вируса птиц А/курица/Курган/02/05 (H5N1)); пандемический штамм А/Санкт-Петербург/2/2009(H1N1pdm). Все вирусы получены из лаборатории эволюционной изменчивости вирусов гриппа.

Определение инфекционной активности вируса гриппа в культуре клеток. Инфекционную активность вирусов гриппа определяли титрованием вирусосодержащего материала в суточной культуре EAhy926 с коэффициентом 10 и рассчитывали по методу Рида и Менча (1938). Инфекционную активность вирусов оценивали по TCD_{50} и в РГА с куриными эритроцитами по общепринятому методу через 72 ч после заражения.

Клеточные культуры. Репродукцию вирусов изучали на культуре клеток эндотелия человека EAhy926, любезно предоставленной д-ром Корой Джин Эйджел из Отдела патологии университета Северной Каролины. Клеточная линия EAhy926 воспроизводит основные морфологические, фенотипические и функциональные характеристики, присущие эндотелиальным клеткам сосудов [9].

Белки вируса гриппа. Гемагглютинин (HA) и нейраминидазу (NA) выделяли из концентрированного и очищенного вируса гриппа. С этой целью вирусы ресуспендировали в Na-ацетатном буфере (50 мМ

ацетата NA, 2 мМ NaCl, 0,2 мМ EDTA; pH 7,0) и разрушали 7% октилглюкозидом в течение 2 ч при 4°C. Затем материал центрифугировали при 15 000 об/мин в течение 1 ч (ротор Beckman SW50.1). К супернатанту, содержащему HA и NA, добавляли 2% водный раствор бромид цетримония (СТАВ, «Sigma») до конечной концентрации 0,1%. Образец наносили на анионообменную колонку (1 x 3 см; сорбент DEAE-Sephadex A-50; «Pharmacia Fine Chemicals»), предварительно уравновешенную стартовым буфером (50 мМ трис-HCl, 0,1% октилглюкозид; pH 7,0 (для штамма А/курица/Курган/05/2005 и тот же буфер с pH 7,5 для штамма А/Брисбен/10/2007)). NA элюировали 20 мл стартового буфера, HA – 20 мл элюирующего буфера (50 мМ трис-HCl, 0,5 М NaCl, 0,1% Triton X-100; pH 7,5). Каждую фракцию диализовали против буфера STE в течение 72 ч для удаления остатков октилглюкозида и Triton X-100. Контроль чистоты выделенного материала осуществляли при помощи электрофореза в полиакриламидном геле по методу Лэммли с последующим анализом гелей на денситометре GS-800 («Bio-Rad Laboratories»).

Метаболизм клеток эндотелия оценивали с помощью метилтетразолиевого теста (МТТ) на общую активность внутриклеточных дегидрогеназ, который широко используется для биохимической оценки выживаемости клеток в культуре [10]. Метод основан на восстановлении диметилтиазолил-дифенилбромид тетразолия митохондриальными и цитоплазматическими дегидрогеназами метаболически активных клеток.

Клетки EAhy926 вносили в 96-луночные планшеты в концентрации 32 000 кл/луночка в 100 мкл культуральной среды. На следующий день клетки либо заражали вирусами по общепринятой методике, либо обрабатывали поверхностными белками исследуемых вирусов в разной концентрации при разном времени экспозиции. После экспозиции клеток или с вирусом, или с белком культуральную среду удаляли, к клеткам добавляли раствор МТТ-реактива в бессывороточной культуральной среде в концентрации 5мг/мл и инкубировали 3 ч в CO₂-инкубаторе. Затем раствор красителя сливали и заменяли 96° спиртом на 30 мин. Далее планшеты помещали в спектрофотометр Thermofisher VarioScan и снимали показания при длине волны 540 нм.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программного обеспечения Microsoft Excel.

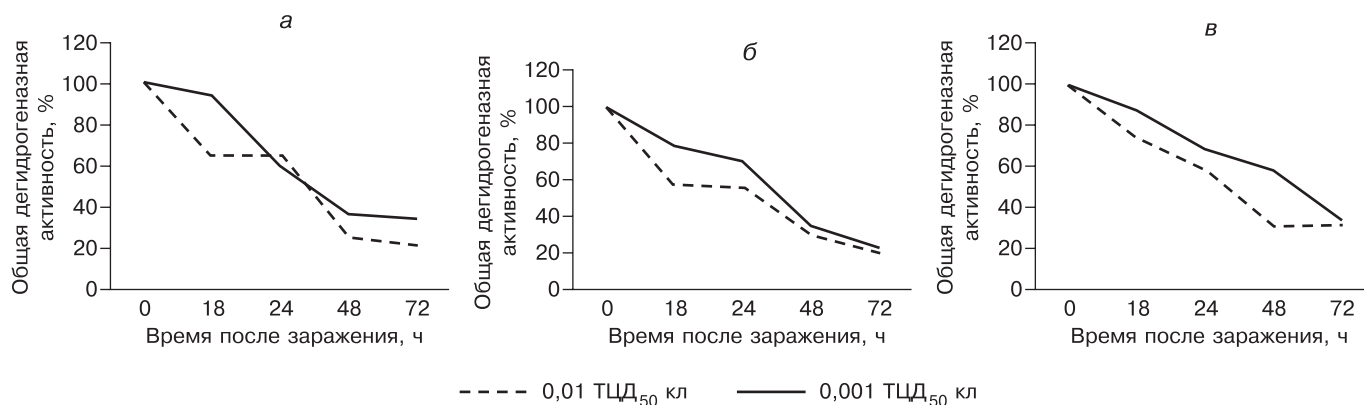


Рис. 1. Изменение общей дегидрогеназной активности в культуре клеток EAhy926 при воздействии исследуемых вирусов гриппа типа А.

а – вирус гриппа А/Брисбен/10/2007(H3N2); б – вирус гриппа А/курица/Курган/5/05 NSI-81/5:3(H5N1); в – вирус гриппа А/Санкт-Петербург/2/2009(H1N1pdm).

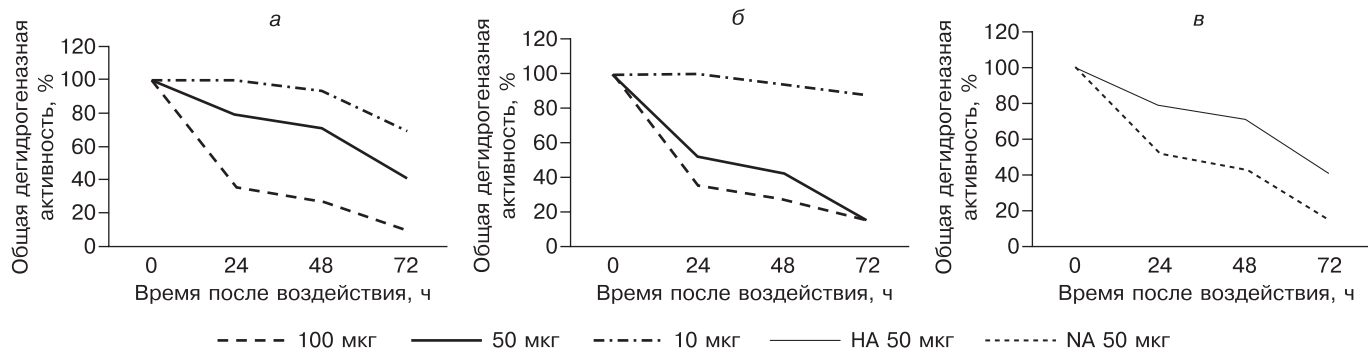


Рис. 2. Изменение общей дегидрогеназной активности в культуре клеток EAhy926 при воздействии поверхностных белков вирусов гриппа типа А.

a – Влияние НА вируса гриппа на изменение общей дегидрогеназной активности в культуре клеток EAhy926; *б* – влияние НА вируса гриппа на изменение общей дегидрогеназной активности в культуре клеток EAhy926; *в* – изменение общей дегидрогеназной активности в культуре клеток EAhy926 при воздействии НА и НА.

Достоверность различий оценивали, используя дисперсионный анализ [1].

Результаты и обсуждение

Изменение общей дегидрогеназной активности регистрировали при двух дозах заражения клеток исследуемыми вирусами. На рис. 1 видно, что снижение общей дегидрогеназной активности при заражении вирусами в дозе 0,01 ТЦД₅₀/кл значительно превосходило тот же показатель при меньшей дозе заражения 0,001 ТЦД₅₀/кл и зависело от времени репродукции вирусов. Так, через 18 ч после заражения вирусом метаболизм клеток снижался в среднем на 40% при дозе 0,01 ТЦД₅₀/кл и на 20% при дозе 0,001 ТЦД₅₀/кл. Через 48 ч после заражения метаболизм клеток снижался на 70% при дозе 0,01 ТЦД₅₀/кл и на 40% при дозе 0,001 ТЦД₅₀/кл. Существенные различия в активности воздействия трех вирусов не отмечены.

Как видно на рис. 1, кривая активности дегидрогеназ имеет две области, отражающие изменение жизнеспособности клеток: область сравнительно малого изменения жизнеспособности клеток – от 0 до 24 ч и область более резкого изменения жизнеспособности клеток – от 24 до 48 ч. Поскольку МТТ-тест оценивает активность и митохондриальных, и цитоплазматических дегидрогеназ, ингибирование их активности только через 24 ч после заражения клеток, возможно, указывает на необходимость накопления достаточного количества зрелых вирусных частиц.

Изменение общей дегидрогеназной активности в культуре клеток EAhy926 при воздействии НА и НА. Необходимо отметить, что воздействие и НА, и НА на клетки эндотелия также приводило к изменению активности клеточных дегидрогеназ. Через 1 сут после воздействия НА в концентрации 100 мкг/мл снижение общей дегидрогеназной активности составляло 60%, в концентрации 50 мкг/мл – 20%, в концентрации 10 мкг/мл снижение не выявлено (рис. 2, *a*). НА в концентрации 10 мкг/мл оказывал воздействие на клетки только через 48 ч, снижая метаболизм клеток на 5%, и через 72 ч – на 30%. Статистически значимые различия в активности НА исследуемых вирусов не обнаружены.

Воздействие НА на исследуемые клетки графически отражено на рис. 2, *б*. Через 24 ч НА в концентрации 100 мкг/мл вызывала снижение общей дегидрогеназной активности клеток на 60%, в концентрации 50 мкг/мл – на 50%. Статистически значимые различия в актив-

ности НА исследуемых вирусов не обнаружены.

Сравнение активности НА и НА в концентрации 50 мкг/мл по воздействию на метаболизм клеток эндотелия показано на рис. 2, *в*. Из рисунка видно, что через 24 ч после воздействия НА подавляла общую дегидрогеназную активность на 48%, а НА – на 21%, через 48 ч – на 57 и 29% соответственно. На основании этого можно заключить, что НА активнее снижает метаболизм эндотелиальных клеток, чем НА.

Таким образом, можно говорить о том, что как цельный вирус, так и поверхностные белки (НА и НА) достоверно снижают общую дегидрогеназную активность клеток эндотелия, которая характеризует такие важные аспекты клеточного метаболизма, как процесс клеточного дыхания и продукция АТФ, т. е. приводит к развитию гипоксии клетки. Подобная активность вируса гриппа и его поверхностных белков в отношении эндотелия кровеносных сосудов представляется нам важной для понимания механизмов патогенеза гриппозной инфекции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гланц С. Медико-биологическая статистика. М.; 1999: 37–80.
2. Киселев О. И., Жилинская И. Н., ред. Вопросы общей вирусологии. Репродукция вирусов. СПб.; 2007: 33–67.
3. Жилинская И. Н., Азаренок А. А., Ильинская Е. В., Прочуханова А. Р., Воробьев С. Л., Сорокин Е. В., Царева Т. Р. Репродукция вируса гриппа в клетках эндотелия кровеносных сосудов человека. Вопросы вирусологии. 2012; 2: 20–23.
4. Жилинская И. Н., Карелин А. А., Ляпина Л. А., Ашмарин И. П., Киселев О. И. Участие гематоглобина вируса гриппа в процессах антикоагуляции. Вопросы вирусологии. 1996; 4: 179–83.
5. Жилинская И. Н., Ляпина Л. А., Киселев О. И., Ашмарин И. П. Белки вируса гриппа модулируют гемостаз in vitro и in vivo. Известия АН. Серия биологическая. 2003; 6: 712–9.
6. Жилинская И. Н., Ляпина Л. А., Решетникова О. Ю., Киселев О. И. Роль нейраминидазы в патогенезе гриппозной инфекции. Вопросы вирусологии. 2003; 2: 26–8.
7. Киселев О. И. Геном пандемического вируса гриппа A/H1N1v-2009. СПб.; 2011: 62.
8. Черняев А. Л., Зайратьянц О. В. Патологическая анатомия гриппа A/H1N1. Архив патологии. 2010; 3: 72.
9. Edgell C. J., Haizlip J. E., Bagnell C. R. et al. Endothelium specific Weibel-Palade bodies in a continuous human cell line, EAhy926. In Vitro Cell Dev. Biol. 1990; 26 (12): 1167–72.
10. Mossman T. Rapid calorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J. Immunol. Methods. 1983; 65: 55–63.
11. Ohta A., Nishiyama Y. Mitochondria and viruses. Mitochondrion. 2011; 11 (1): 1–12.
12. Ritter et al. Metabolic effects of influenza virus infection in cultured animal cells: intra- and extracellular metabolite profiling. BMS Syst. Biol. 2010; 4: 61.

Поступила 31.05.12