



## Экспрессия эндотелиальных факторов в клетках эндотелия человека при инфекции, вызванной вирусом гриппа A(H1N1)pdm09 (*Orthomyxoviridae*; *Alphainfluenzavirus*)

© Марченко В.А.<sup>1</sup>, Барашкова С.В.<sup>2</sup>, Зелинская И.А.<sup>3</sup>, Торопова Я.Г.<sup>3</sup>, Рэмзи Э.С.<sup>1</sup>, Жилинская И.Н.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России, 197376, Санкт-Петербург, Россия;

<sup>2</sup>СПб ГБУЗ «Детский городской многопрофильный клинический центр высоких медицинских технологий им. К.А. Раухфуса», 191036, Санкт-Петербург, Россия;

<sup>3</sup>ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» Минздрава России, 197341, Санкт-Петербург, Россия

**Введение.** Вирус гриппа (ВГ) А (*Orthomyxoviridae*; *Alphainfluenzavirus*) способен вызывать дисфункцию эндотелия (ДЭ), апоптоз эндотелиоцитов, а также влиять на экспрессию эндотелиальных факторов, поддерживающих сосудистый гемостаз. В то же время воздействие этого патогена на характер экспрессии ключевых факторов эндотелия до настоящего времени неизвестно.

**Цель** исследования – выявить изменения экспрессии эндотелиальной синтазы оксида азота (NO) (eNOS) и ингибитора активатора плазминогена 1 (PAI-1, или serpin E1) в инфицированных ВГ А эндотелиоцитах. Задачи работы: изучение экспрессии указанных факторов в клетках эндотелия, инфицированных вирусом A(H1N1)pdm09; установление наличия гомологичных фрагментов в белках исследуемого патогена и эндотелиальных факторах.

**Материал и методы.** В экспериментах использовали клеточную линию эндотелия человека EA.hy926, которую инфицировали ВГ А/Санкт-Петербург/48/16 (H1N1)pdm09. Детекцию уровня экспрессии эндотелиальных факторов в динамике (6, 12, 18, 24, 48 и 72 ч) выполняли иммуноцитохимическим методом (ИЦХ) с помощью антител (АТ) к eNOS и PAI-1. Для количественной оценки полученного сигнала использовали программу Nis-Elements F3.2 («Nikon», Япония). Поиск гомологичных последовательностей в структуре вирусных белков и молекул eNOS и PAI-1 осуществляли путём компьютерного сравнения в них фрагментов длиной 12 а.о.

**Результаты и обсуждение.** Экспрессия eNOS в инфицированных клетках уменьшалась от 7,9% через 6 ч до 3,3% спустя 72 ч (контроль принят за 100%). Уровень экспрессии PAI-1 на протяжении исследования значительно варьировал: через 6 ч его показатель снижался до 49,6%, через 18 ч – возрастал до 116,3% с последующим резким падением до 18,9% спустя 24 ч. Через 48 ч и 72 ч выраженность экспрессии составляла 23,5 и 35% соответственно. В ряде белков исследуемого вируса обнаружены последовательности, гомологичные фрагментам eNOS и PAI-1.

**Заключение.** В ходе эксперимента с инфицированием клеток эндотелия ВГ А установлено, что вирус вызывает выраженное снижение экспрессии eNOS и модулирует экспрессию PAI-1. Описанное явление может быть использовано при дальнейшей разработке направлений патогенетической терапии сосудистых осложнений инфекции, вызываемой данным возбудителем.

**Ключевые слова:** клеточная линия эндотелия человека EA.hy926; вирус гриппа A(H1N1)pdm09; эндотелиальная синтаза оксида азота (eNOS); ингибитор активатора плазминогена (PAI-1); иммуноцитохимия

**Для цитирования:** Марченко В.А., Барашкова С.В., Зелинская И.А., Торопова Я.Г., Рэмзи Э.С., Жилинская И.Н. Экспрессия эндотелиальных факторов в клетках эндотелия человека при инфекции, вызванной вирусом гриппа A(H1N1)pdm09. *Вопросы вирусологии.* 2021; 66(3): 198-210. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-48>

**Для корреспонденции:** Марченко Владимир Александрович, аспирант, лаборант-исследователь лаборатории системной вирусологии, ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России, 197376, Санкт-Петербург, Россия. E-mail: [vmarcenco@mail.ru](mailto:vmarcenco@mail.ru)

**Участие авторов:** Марченко В.А. – культивирование вируса гриппа, культивирование и инфицирование клеточной культуры, статистическая обработка результатов, подбор литературных данных; Барашкова С.В. – проведение морфометрических и иммуноцитохимических исследований; Зелинская И.А. – фиксация материала для последующего иммуноцитохимического исследования; Торопова Я.Г. – поиск гомологичных последовательностей в структуре вирусных белков и белков eNOS и PAI-1; Рэмзи Э.С. – перевод англоязычных материалов; Жилинская И.Н. – написание текста статьи.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансировании в соответствии с Государственным заданием Министерства здравоохранения Российской Федерации «Роль вирусов гриппа в развитии дисфункции эндотелия кровеносных сосудов» (регистрационный номер 121042900092-6 от 29.04.2021).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 05.02.2021  
Принята к печати 11.05.2021

ORIGINAL ARTICLE

## Modulation of endothelial factors activity in human endothelial cells in influenza A(H1N1)pdm09 virus infection

Vladimir A. Marchenko<sup>1</sup>, Svetlana V. Barashkova<sup>2</sup>, Irina A. Zelinskaya<sup>3</sup>, Yana G. Toropova<sup>3</sup>, Edward S. Ramsay<sup>1</sup>, Irina N. Zhilinskaya<sup>1</sup>

<sup>1</sup>FSBI «A.A. Smorodintsev Research Institute of Influenza» of the Ministry of Health of Russia, 197376, St. Petersburg, Russia;

<sup>2</sup>SPB SBiH «K.A. Rauhfus Children's Municipal Multi-Specialty Clinical Center of High Medical Technologies», 191036, St. Petersburg, Russia;

<sup>3</sup>FSBI «Almazov National Medical Research Centre» of the Ministry of Health of Russia, 197341, St. Petersburg, Russia

**Introduction.** Influenza A virus infection can lead to endothelial dysfunction (ED), including apoptosis of endothelial cells and modulation of endothelial factor activities. Affected biochemical factors may include those playing important roles in vascular homeostasis. However, the effect of this pathogen on the expression pattern of key endothelial factors is still unknown.

The aim of this work was to study the expression of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1, serpin E1) in the EA.hy926 endothelial cells. Research objectives: to assess expression of eNOS and PAI-1 in endothelial cells infected with influenza virus A(H1N1)pdm09, and to identify homologous fragments in structure of viral proteins and endothelial factors.

**Material and methods.** Cells were infected with influenza virus A/St. Petersburg/48/16 (H1N1)pdm09 and analyzed in dynamics in 6, 12, 18, 24, 48, and 72 hrs post infection (hpi). Detection of endothelial factors expression levels was performed by immunocytochemical method (ICC) using antibodies for eNOS and PAI-1 while quantitative assessment of expression levels was carried out by program Nis-Elements F3.2 («Nikon», Japan). The search for homologous sequences between viral proteins and eNOS and PAI-1 was performed by computer comparison. Sequences were analyzed as fragments 12 amino acid residues (aar) in length.

**Results and discussion.** eNOS expression in infected cells had decreased to 7.9% by 6 hpi (control was taken as 100%) to 3.3% at 72 hpi. PAI-1 expression varied significantly over the course of the experiment: by 6 hpi it had decreased to 49.6%, and to 43.2% by 12 hpi. Later PAI-1 levels were: 116.3% (18 hpi); 18.9% (24 hpi); 23.5% (48 hpi), and 35% (72 hpi).

**Conclusion.** These results indicate that influenza A infection of endothelial cells causes a significant decrease in eNOS expression, while modulating PAI-1 one. The described phenomenon can be used in the further development of directions of pathogenetic therapy of vascular complications of infection caused by this pathogen.

**Key words:** EA.hy926 human endothelial cell line; influenza virus A(H1N1)pdm09; endothelial nitric oxide synthase (eNOS); plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1); immunocytochemistry

**For citation:** Marchenko V.A., Barashkova S.V., Zelinskaya I.A., Toropova Ya.G., Ramsay E.S., Zhilinskaya I.N. Modulation of endothelial factors activity in human endothelial cells in influenza A(H1N1)pdm09 virus infection. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2021; 66(3): 198-210 (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-48>

**For correspondence:** Vladimir A. Marchenko, Graduate Student, Research Assistant of Laboratory of Systemic Virology, FSBI «A.A. Smorodintsev Research Institute of Influenza» of the Ministry of Health of Russia, 197376, St. Petersburg, Russia. E-mail: [vmarcenco@mail.ru](mailto:vmarcenco@mail.ru)

### Information about the authors:

Marchenko V.A., <https://orcid.org/0000-0001-6870-3157>

Barashkova S.V., <https://orcid.org/0000-0002-5618-4510>

Zelinskaya I.A., <https://orcid.org/0000-0002-1971-3444>

Toropova Ya.G., <https://orcid.org/0000-0003-1629-7868>

Ramsay E.S., <https://orcid.org/0000-0001-7086-5825>

Zhilinskaya I.N., <https://orcid.org/0000-0002-0084-1323>

**Contribution:** Marchenko V.A. – cultivation of influenza virus, cultivation and infection of cell culture, statistical data analysis, literature search; Barashkova S.V. – morphometric assay, and immunocytochemical assay; Zelinskaya I.A. – tissue preparation for immunocytochemical assay; Toropova Ya.G. – searching for homologous fragments in the structure of viral proteins and eNOS and PAI-1; Ramsay E.S. – English translations; Zhilinskaya I.N. – writing of the text of the article.

**Acknowledgments.** The work was carried out with funding within the framework of State Assignment of Ministry of Health of the Russian Federation «The role of influenza viruses in the development of blood vessel endothelial dysfunction» (registry entry No. 121042900092-6 dated 04.29.2021).

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

Received 05 February 2021

Accepted 11 May 2021

## Введение

В настоящее время установленной является способность вируса гриппа (ВГ) помимо избирательно-го воздействия на эпителий респираторного тракта

поражать кровеносные сосуды и вызывать дисфункцию эндотелия (ДЭ). Это подтверждается соответствующей клинической картиной в виде носовых кровотечений, геморагий в коже и слизистых обо-

лочках, микрогематурии, развития острого респираторного дистресс-синдрома и диссеминированного внутрисосудистого свёртывания (ДВС-синдрома) [1, 2]. При гриппе повышается также риск возникновения глубокого тромбоза вен и лёгочной эмболии [3], острого коронарного синдрома [4, 5], ишемической болезни сердца [6], инфаркта миокарда [7–9] и других заболеваний кардиоваскулярной системы [10–14]. Кроме того, эпидемиологические наблюдения показали, что с окончанием эпидемии гриппа регистрируется существенная избыточная (дополнительная) смертность в группах риска у больных с хронической сердечно-сосудистой и лёгочной патологией – 870 на 100 тыс. переболевших (ВОЗ, 2008).

Однако механизмы развития при гриппозной инфекции ДЭ до сих пор неизвестны. Возникновение данного состояния связывают с нарушением таких процессов, как активация агрегации тромбоцитов, свёртывание крови, изменение проницаемости сосудистой стенки, сокращение и расслабление гладкой мускулатуры сосудов, пролиферация клеток сосудистого русла и воспалительная реакция. Все они регулируются целым рядом факторов, синтезируемых клетками эндотелия. Среди этих веществ одними из важнейших являются эндотелиальная синтаза оксида азота (eNOS), ингибитор активатора плазминогена 1 (PAI-1, или serpin E1), тканевой активатор плазминогена (tPA) и др.

Целью исследования явилось изучение характера экспрессии 2 эндотелиальных факторов – eNOS и PAI-1 при экспериментальной гриппозной инфекции в клетках эндотелия линии EA.hy926. Выбор этих соединений определён тем, что eNOS отвечает за продукцию оксида азота (NO), который имеет исключительно важное значение в поддержании гомеостаза на уровне эндотелия [15–18]. Уменьшение продукции NO, вызванное снижением экспрессии eNOS, рассматривается как следствие воспалительных процессов в кровеносных сосудах, атеросклероза, фиброза и нарушения тонуса стенки сосудов. PAI-1, являясь сериновой протеазой, синтезируемой преимущественно эндотелиальными клетками, в нормальных физиологических условиях контролирует активность урокиназного (uPA) и тканевого активаторов плазминогена, плазмина, матриксных металлопротеиназ (ММР), тем самым поддерживая тканевой гомеостаз [19]. Кроме того, он играет ключевую роль в патогенезе тромботических состояний, таких как глубокий венозный тромбоз и инфаркт миокарда [16]. Следует отметить, что исследования по изучению уровня экспрессии эндотелиальных факторов (eNOS и PAI-1) в эндотелиоцитах, инфицированных вирусом гриппа, ранее не проводились.

### Материал и методы

**Клеточная линия.** В экспериментах использовали перевиваемую клеточную линию эндотелия человека EA.hy926, любезно предоставленную д-ром Корой-Джин Эджел (Dr. Coqa-Jean Edgell) из отдела патологии Университета Северной Каролины (США).

Данный материал представляет собой гибридную линию, полученную при слиянии клеток венозного эндотелия пупочного канатика человека (HUVeC) и клеток карциномы лёгкого человека (A549). Клетки культивировали в среде DMEM с глутамином («Биолот», Россия), содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS) («Биолот»). Для предотвращения бактериальной контаминации применяли антибиотики: стрептомицин и пенициллин («Биолот»). Исследования проводили с 3-дневной культурой эндотелиальных клеток EA.hy926, что соответствовало суточному монослою. Подсчёт клеточных элементов выполняли с помощью гемоцитометра открытого типа (камера Горяева). Посевная концентрация составляла  $7,2\text{--}7,8 \times 10^4$  кл/мл.

**Вирус.** Использован ВГ А/Санкт-Петербург/48/16 (H1N1)pdm09, вызывавший вирусные геморрагические пневмонии в период эпидемии гриппа 2015–2016 гг. Вирус трижды пассировали на куриных эмбрионах, а затем определяли инфекционную активность (ИА) по ранее описанной методике [20]. Для исследуемого возбудителя значение ИА составляло  $8\text{--}9 \lg \text{ЭИД}_{50}/\text{мл}$  (ЭИД – эмбриональная инфицирующая доза).

**Инфекционная активность вируса гриппа.** Определение ИА патогена в инфицированных клетках EA.hy926 осуществляли посредством детекции NP-антигена ВГ методом иммуноферментного анализа (ИФА), используя к данному антигену конъюгированные с пероксидазой хрена моноклональные антитела (АТ), полученные из отдела биотехнологии ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России.

С указанной целью суспензию клеток со стандартной посевной концентрацией разливали в 96-луночные планшеты («Nunc», Дания). Далее следовала инкубация в поддерживающей среде (DMEM) до образования клеточного монослоя. Через 1 сут клетки инфицировали 10-кратными разведениями вируса в данной среде, для чего в каждую лунку вносили по 150 мкл вирусосодержащей жидкости. Контакт патогена с клетками поддерживали в течение 1 ч в  $\text{CO}_2$ -инкубаторе при температуре  $37^\circ\text{C}$ . Для обеспечения многоциклового репродукции ВГ в вирусосодержащую жидкость добавляли обработанный ТРСК (тозилфенилаланинхлорометилкетон) трипсин в концентрации 2 мкг/мл («Sigma», США). После инкубирования клеточные элементы отмывали от вируса и добавляли к ним по 100 мкл поддерживающей среды с трипсином. Через 5 сут поддерживающую среду удаляли и клетки фиксировали 80% холодным ацетоном в течение 20 мин при температуре  $-20^\circ\text{C}$ . Затем лунки троекратно отмывали раствором фосфатно-солевого буфера (ФСБ) (рН 7,2–7,4). Далее в них добавляли 200 мкл 5% раствора обезжиренного молока («BioRad», США) и инкубировали в термостате при  $37^\circ\text{C}$  на протяжении 1 ч. На следующем этапе из всех лунок сливали раствор обезжиренного молока и добавляли по 100 мкл конъюгата (соотношение АТ 1 : 1000). Инкубацию проводили 45 мин при температуре  $37^\circ\text{C}$ . После удаления конъюгата лунки

трижды промывали ФСБ с твином 20. С помощью субстратной смеси проявляли пероксидазную реакцию, для чего в каждую лунку добавляли по 100 мкл субстрата. Реакцию останавливали путём внесения 2 Н серной кислоты ( $H_2SO_4$ ), после чего измеряли оптическую плотность (ОП) при длине волны 450 нм. В качестве отрицательного контроля служили неинфицированные клетки EA.hy926.

Для определения гемагглютинирующей активности (ГА) вируса использовали реакцию гемагглютинации (РГА) с 0,5% взвесью куриных эритроцитов. С этой целью на 5 сут после инфицирования клеток отбирали по 50 мкл супернатанта и титровали в физиологическом растворе с добавлением 50 мкл указанной взвеси.

**Определение экспрессии эндотелиальных факторов eNOS и PAI-1.** Экспрессию эндотелиальных факторов определяли иммуноцитохимическим (ИЦХ) методом после инфицирования клеток ВГ согласно описанной методике [21]. Для этого в стерильные чашки Петри («Биолот») помещали предметные стёкла с поли-L-лизинным адгезивным покрытием («ThermoFisher Scientific», США). На каждое стекло наносили 1 мл клеточной взвеси с заранее определённой необходимой посевной концентрацией; затем проводили инкубацию клеток в течение 1 ч в  $CO_2$ -инкубаторе при температуре 37 °С. После этого в чашки Петри добавляли поддерживающую среду DMEM с антибиотиками. Через 1 сут клетки отмывали и инфицировали вирусосодержащей жидкостью. Контакт клеточных элементов с вирусом поддерживали в  $CO_2$ -инкубаторе при 37 °С на протяжении 1 ч в питательной среде DMEM, содержащей антибиотики и трипсин (2 мкг/мл), без FBS. Множественность инфекции (МИ) (multiplicity of infection, m.o.i.) для ВГ А/Санкт-Петербург/48/16 (H1N1)pdm09 при заражении эндотелиоцитов была постоянной и составляла 0,01 ТЦД<sub>50</sub>/мл (ТЦД – тканевая цитопатическая доза).

При проведении фиксации использовали раствор 4% параформальдегида; экспозиция составляла 10 мин. Далее стёкла с клетками в течение 5 мин погружали в ФСБ, а затем промывали в дистиллированной воде. Инкубацию клеток с АТ к eNOS и PAI-1 («Abcam», Великобритания) в разведениях 1 : 1000 и 1 : 500 соответственно выполняли на протяжении 1 ч при комнатной температуре (22–24 °С) во влажной камере. Детекцию уровня экспрессии эндотелиальных факторов осуществляли при помощи системы визуализации фирмы Novolink («Novocastra», США), включающей в себя реакцию с ДАВ-хромогеном (диаминобензидин). Интактные и инфицированные клетки велись и фиксировались параллельно.

С целью количественной оценки уровня экспрессии факторов эндотелия проводили морфометрические исследования, в ходе которых выполняли микрофотографирование препаратов, окрашенных иммуноцитохимически к соответствующим антигенам, на микроскопе Nikon Eclipse E20 («Nikon», Япония)

с цифровой камерой Nikon DS-Fi1 и программным обеспечением Nis-Elements F3.2 («Nikon»). Были выбраны постоянные параметры: разрешение Fast (Focus) – 1280 × 960 пикселей; захват Quality (Capture) – 2560 × 1920 пикселей; экспозиция (Exposure) 15 мс (объектив ×40); усиление (Gain) 2,80×; улучшенное контрастирование (Contrast Enhanced); дополнительно (Advanced) – Hematoxylin [23].

Для каждого эндотелиального фактора эмпирически подбирали порог регистрации сигнала в RGB-модели (модель цветопередачи, где любой цвет кодируется с помощью 3 основных: красного (red), зелёного (green) и синего (blue)) с использованием синего фильтра. Предварительно выполняли калибровку объектива Nikon E Plan 40x/0,65 WD 0,65 с использованием объект-микрометра 1 мм/100 («Nikon»). Фотосъёмку клеток производили на 5 произвольно выбранных полях зрения при увеличении ×40. Поля зрения с артефактными изменениями и дефектами окрашивания при фотосъёмке исключали. Морфометрическую обработку полученных снимков осуществляли в программе Nis-Elements BR 4.40 («Nikon») при постоянных настройках с использованием бинаризации по синему каналу в автоматическом режиме, с постоянными значениями величины порога [22].

В качестве 3 основных определяемых параметров были выбраны:

- 1) площадь заполнения – площадь с сигналом в поле зрения;
- 2) суммарная плотность – сумма отдельных величин ОП каждого пикселя в поле зрения; ОП высчитывается по формуле:

$$ОП = -\lg \frac{\text{значение интенсивности пикселя} + 0,5}{\text{максимальное значение интенсивности}} \quad (1);$$

- 3) суммарная интенсивность – сумма интенсивности всех пикселей изучаемого объекта в поле зрения; интенсивность определяется в диапазоне регистрации сигнала между минимальными и максимальными значениями для каждого исследуемого фактора (диапазон регистрации для eNOS составлял 78–185, для PAI-1 – 92–191).

**Мимикрия эндотелиальных факторов eNOS и PAI-1 в белках исследуемого вируса гриппа.** Источником первичных последовательностей белков исследуемого ВГ (как структурных, так и неструктурных), молекул eNOS и PAI-1 служили общедоступные в сети Интернет базы полногеномных данных (соответственно [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) и [www.nextprot.org](http://www.nextprot.org)). Поиск гомологичных последовательностей в белковых структурах вируса и эндотелиальных факторов осуществляли путём компьютерного сравнения в них фрагментов длиной 12 а.о., принимая родственными те из них, которые проявляли идентичность по ≥ 8 позициям.

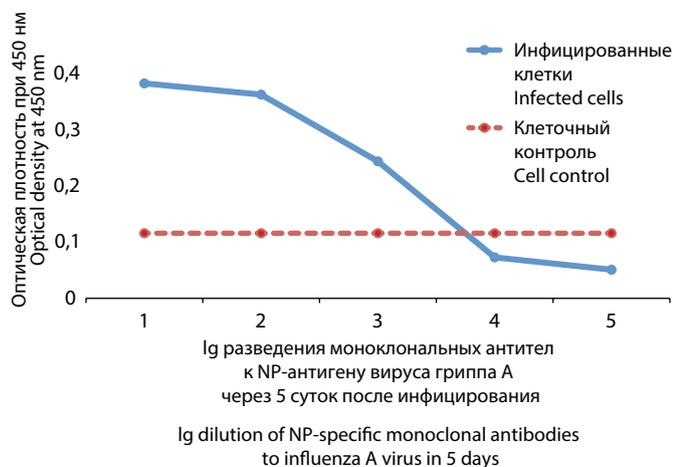
**Статистическая обработка.** Статистическую обработку данных проводили с применением параметрического теста Стьюдента или дисперсионного анализа (ANOVA) в программном обеспечении MS Office Excel 2016 и GraphPad Prism 8. Различия счи-

тали статистически значимыми для значений  $p < 0,05$ . В процессе представления полученных результатов использовали такие показатели описательной статистики, как среднеарифметическое значение и стандартное отклонение.

### Результаты

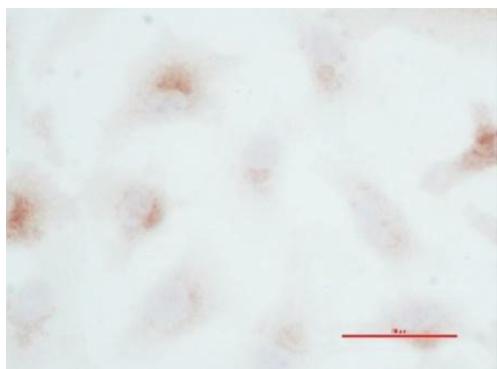
#### Инфекционная активность вируса гриппа А

На рис. 1 представлены результаты детекции NP-антигена ВГ А в супернатанте клеток через 5 сут после инфицирования исследуемым возбудителем. Как видно из рисунка, минимальная концентрация этого антигена регистрируется в разведении 3,5 lg (по сравнению с клеточным контролем), что указывает на ИА вируса, равную 3–3,5 lg ТЦД<sub>50</sub>/мл. При этом ГА патогена в супернатанте спустя 5 сут после его внесения составляла 1 : 64.



**Рис. 1.** Детекция NP-антигена вируса гриппа А в супернатанте клеток EA.hy926 с помощью моноклональных антител иммуноферментным методом.

**Fig. 1.** Detection of influenza A virus NP antigen in supernatant of infected EA.hy926 cells using type-specific monoclonal antibodies by ELISA.



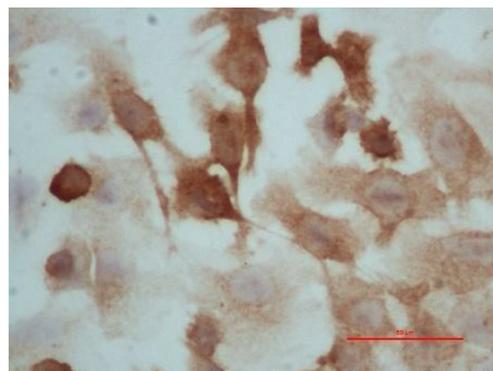
**Рис. 3.** Иммуноцитохимический анализ экспрессии eNOS в клетках эндотелия EA.hy926 через 6 часов после инфицирования исследуемым вирусом (микрофотография; окрашивание DAB-хромогеном, длина линии 50 мкм, увеличение  $\times 40$ ).

**Fig. 3.** Immunocytochemical analysis of eNOS expression in infected EA.hy926 endothelial cells by the virus under study in 6 hours post infection (microphotograph; DAB chromogen staining, the line size is 50  $\mu$ m; magnification  $\times 40$ ).

**Определение экспрессии эндотелиальных факторов.** Экспрессию эндотелиальных факторов – eNOS и PAI-1 изучали в клетках, инфицированных ВГ, в динамике – через 6, 12, 18, 24, 48 и 72 ч. Уровни экспрессии этих веществ на протяжении всего исследования значительно изменялись по сравнению с таковыми в интактных эндотелиоцитах.

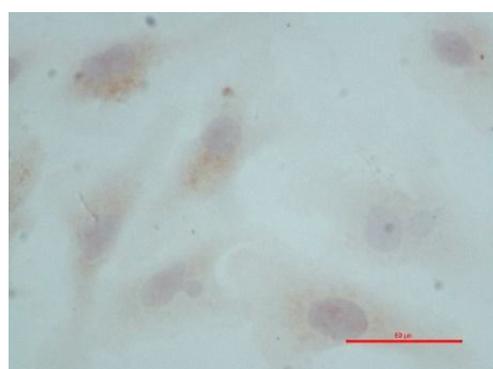
1) **Определение экспрессии eNOS.** На рис. 2 представлена экспрессия eNOS в неинфицированных клетках (контроль); на рис. 3–8 – результаты определения экспрессии этого же фактора в инфицированных вирусом эндотелиоцитах через временные промежутки 6, 12, 18, 24, 48 и 72 ч. Как можно видеть, степень экспрессии eNOS в поражённых ВГ клетках эндотелия резко снижена по сравнению с контрольным материалом.

С целью установления количественного значения выраженности экспрессии eNOS в инфицированных эндотелиоцитах определяли 3 основных параметра



**Рис. 2.** Иммуноцитохимический анализ экспрессии eNOS в неинфицированных клетках эндотелия EA.hy926 (микрофотография; окрашивание DAB-хромогеном, длина линии 50 мкм, увеличение  $\times 40$ ).

**Fig. 2.** Immunocytochemical analysis of eNOS expression in uninfected EA.hy926 endothelial cells (microphotograph; DAB chromogen staining, the line size is 50  $\mu$ m; magnification  $\times 40$ ).



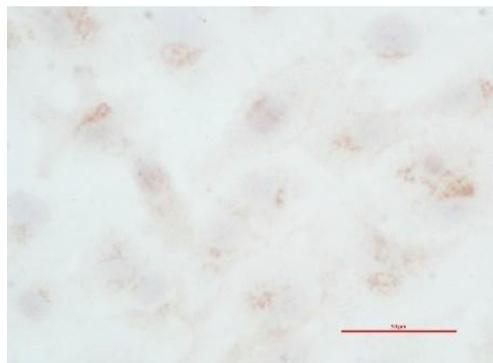
**Рис. 4.** Иммуноцитохимический анализ экспрессии eNOS в клетках эндотелия EA.hy926 через 12 часов после инфицирования исследуемым вирусом (микрофотография; окрашивание DAB-хромогеном, длина линии 50 мкм, увеличение  $\times 40$ ).

**Fig. 4.** Immunocytochemical analysis of eNOS expression in infected EA.hy926 endothelial cells by the virus under study in 12 hours post infection (microphotograph; DAB chromogen staining, the line size is 50  $\mu$ m; magnification  $\times 40$ ).

сигнала: площадь заполнения, суммарная плотность и суммарная интенсивность (см. раздел «Материал и методы») через 6, 12, 18, 24, 48 и 72 ч (табл. 1).

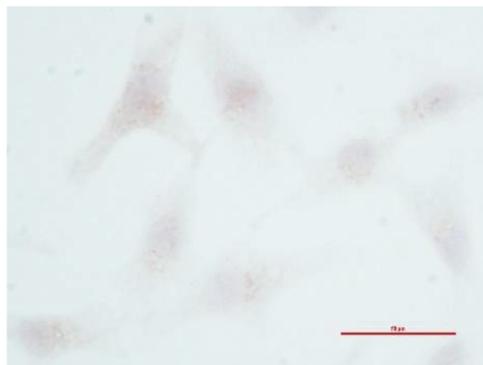
Как видно из таблицы, характер изменений сигнала по 3 параметрам в интервале 6–72 ч совпадает. На ос-

новании этого для оценки выраженности экспрессии eNOS в процессе инфицирования клеток эндотелия ВГ выбран показатель суммарной интенсивности. Динамика изменения экспрессии eNOS по этому параметру представлена на рис. 9.



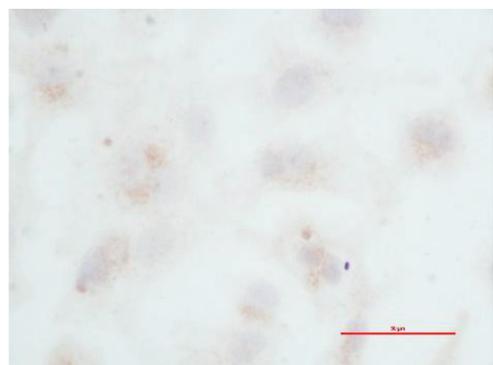
**Рис. 5.** Иммуноцитохимический анализ экспрессии eNOS в клетках эндотелия EA.hy926 через 18 часов после инфицирования исследуемым вирусом (микрофотография; окрашивание DAB-хромогеном, длина линии 50 мкм, увеличение  $\times 40$ ).

**Fig. 5.** Immunocytochemical analysis of eNOS expression in infected EA.hy926 endothelial cells by the virus under study in 18 hours post infection (microphotograph; DAB chromogen staining, the line size is 50  $\mu\text{m}$ ; magnification  $\times 40$ ).



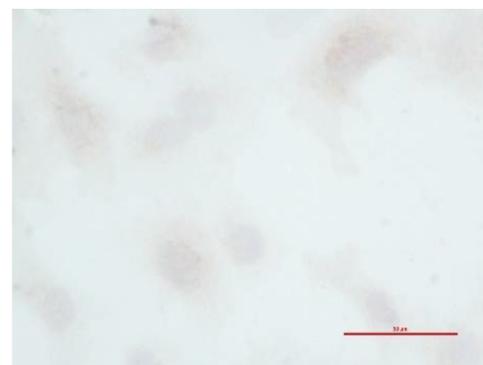
**Рис. 6.** Иммуноцитохимический анализ экспрессии eNOS в клетках эндотелия EA.hy926 через 24 часа после инфицирования исследуемым вирусом (микрофотография; окрашивание DAB-хромогеном, длина линии 50 мкм, увеличение  $\times 40$ ).

**Fig. 6.** Immunocytochemical analysis of eNOS expression in infected EA.hy926 endothelial cells by the virus under study in 24 hours post infection (microphotograph; DAB chromogen staining, the line size is 50  $\mu\text{m}$ ; magnification  $\times 40$ ).



**Рис. 7.** Иммуноцитохимический анализ экспрессии eNOS в клетках эндотелия EA.hy926 через 48 часов после инфицирования исследуемым вирусом (микрофотография; окрашивание DAB-хромогеном, длина линии 50 мкм, увеличение  $\times 40$ ).

**Fig. 7.** Immunocytochemical analysis of eNOS expression in infected EA.hy926 endothelial cells by the virus under study in 48 hours post infection (microphotograph; DAB chromogen staining, the line size is 50  $\mu\text{m}$ ; magnification  $\times 40$ ).



**Рис. 8.** Иммуноцитохимический анализ экспрессии eNOS в клетках эндотелия EA.hy926 через 72 часа после инфицирования исследуемым вирусом (микрофотография; окрашивание DAB-хромогеном, длина линии 50 мкм, увеличение  $\times 40$ ).

**Fig. 8.** Immunocytochemical analysis of eNOS expression in infected EA.hy926 endothelial cells by the virus under study in 72 hours post infection (microphotograph; DAB chromogen staining, the line size is 50  $\mu\text{m}$ ; magnification  $\times 40$ ).

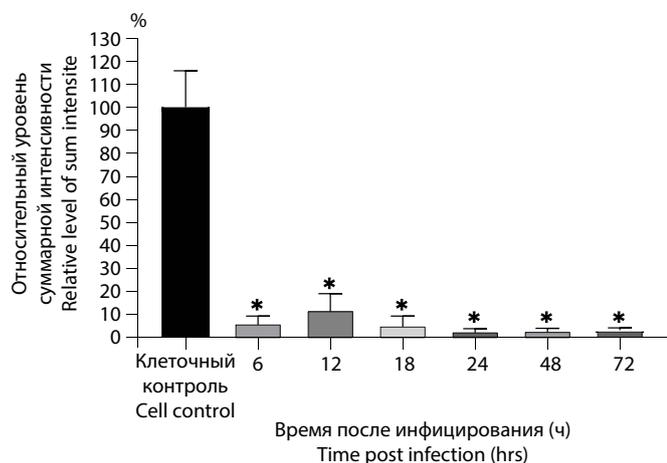
**Таблица 1. Определение уровня экспрессии eNOS в инфицированных вирусом гриппа клетках эндотелия EA.hy926 (n = 15)**

**Table 1. Determination of eNOS expression level in EA.hy926 endothelial cells infected with influenza virus (n = 15)**

Параметры сигнала, относительные значения ( $M \pm m$ , %) Signal parameter, relative values ( $M \pm m$ , %)	Время после инфицирования клеток (ч) <sup>†</sup> Time post infection (hrs) <sup>†</sup>					
	6	12	18	24	48	72
Площадь заполнения Total area	6,5 $\pm$ 1,7*	11,2 $\pm$ 2,6*	4,1 $\pm$ 1,3*	2,4 $\pm$ 0,5*	2,4 $\pm$ 0,6*	2,5 $\pm$ 0,3
Суммарная плотность Sum density	3,9 $\pm$ 1,1*	8,8 $\pm$ 2,4*	2,6 $\pm$ 0,7*	1,8 $\pm$ 0,5*	1,4 $\pm$ 0,4*	1,6 $\pm$ 0,2
Суммарная интенсивность Sum intensity	7,9 $\pm$ 2,1*	12,1 $\pm$ 2,8*	5,4 $\pm$ 1,5*	2,9 $\pm$ 0,6*	3,1 $\pm$ 0,7*	3,3 $\pm$ 0,4

**Примечание.** <sup>†</sup> – за 100% приняты параметры сигнала в неинфицированных клетках; \* –  $p < 0,05$ .

**Note.** <sup>†</sup> – signal parameters from uninfected cells designated as 100%; \* –  $p < 0.05$ .

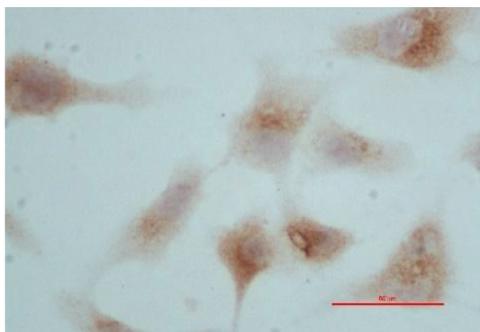


**Рис. 9.** Динамика изменения экспрессии eNOS в культуре клеток эндотелия EA.hy926 при их инфицировании клеткой вирусом гриппа А/Санкт-Петербург/48/16 (H1N1)pdm09 ( $n = 15$ ).

**Примечание.** \* –  $p < 0,05$ .

**Fig. 9.** Dynamics of eNOS expression in EA.hy926 endothelial cells infected with influenza virus A/St. Petersburg/48/16 (H1N1)pdm09 over time ( $n = 15$ ).

**Note.** \* –  $p < 0.05$ .

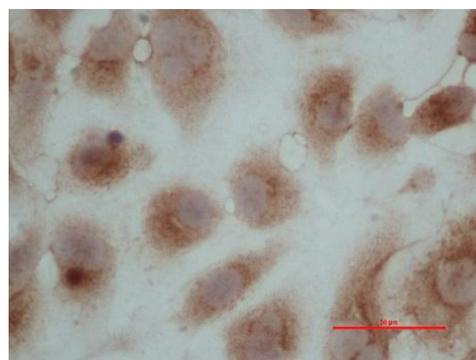


**Рис. 11.** Иммуноцитохимический анализ экспрессии PAI-1 в клетках эндотелия EA.hy926 через 6 часов после инфицирования исследуемым вирусом (микрофотография; окрашивание DAB-хромогеном, длина линии 50 мкм, увеличение  $\times 40$ ).

**Fig. 11.** Immunocytochemical analysis of PAI-1 expression in infected EA.hy926 endothelial cells by the virus under study in 6 hours post infection (microphotograph; DAB chromogen staining, the line size is 50  $\mu\text{m}$ ; magnification  $\times 40$ ).

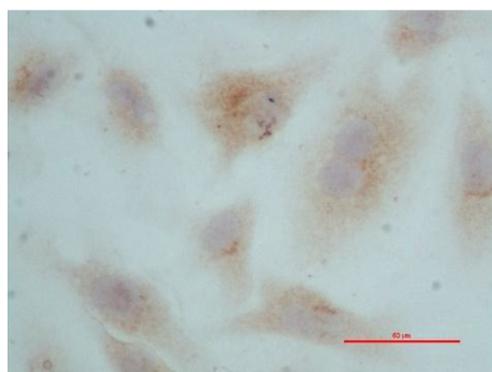
Так, экспрессия eNOS в инфицированных клетках снижалась до 7,9% уже через 6 ч (контроль принят за 100%). Через 12 ч уровень экспрессии этого фактора уменьшался до 12,1%, через 18 ч – до 5,4%, достигая спустя 24 ч своего минимума – 2,9%. Через 48 ч значение экспрессии eNOS составляло 3,1%, а спустя 72 ч – 3,3%. Таким образом, вирус гриппа А/Санкт-Петербург/48/16 (H1N1)pdm09 вызывал снижение экспрессии eNOS в клетках эндотелия человека ( $n \geq 8$  раз) на протяжении всего периода исследования.

2) **Определение экспрессии PAI-1.** Экспрессия PAI-1 в неинфицированных клетках (контроль) представлена на **рис. 10**. На **рис. 11–16** показан характер экспрессии PAI-1 в инфицированных ВГ эндотелиоцитах через 6, 12, 18, 24, 48 и 72 ч.



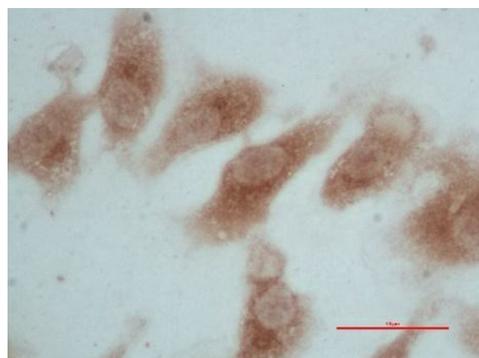
**Рис. 10.** Иммуноцитохимический анализ экспрессии PAI-1 в неинфицированных клетках эндотелия EA.hy926 (микрофотография; окрашивание DAB-хромогеном, длина линии 50 мкм, увеличение  $\times 40$ ).

**Fig. 10.** Immunocytochemical analysis of PAI-1 expression in uninfected EA.hy926 endothelial cells (microphotograph; DAB chromogen staining, the line size is 50  $\mu\text{m}$ ; magnification  $\times 40$ ).



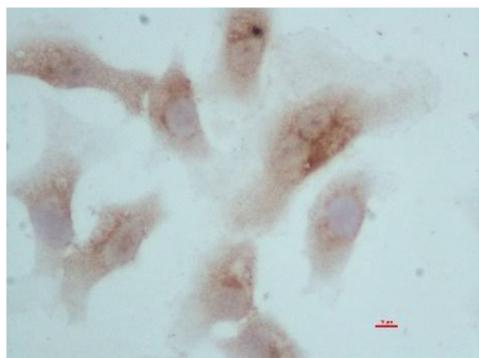
**Рис. 12.** Иммуноцитохимический анализ экспрессии PAI-1 в клетках эндотелия EA.hy926 через 12 часов после инфицирования исследуемым вирусом (микрофотография; окрашивание DAB-хромогеном, длина линии 50 мкм, увеличение  $\times 40$ ).

**Fig. 12.** Immunocytochemical analysis of PAI-1 expression in infected EA.hy926 endothelial cells in 12 hours post infection (microphotograph; DAB chromogen staining, the line size is 50  $\mu\text{m}$ ; magnification  $\times 40$ ).



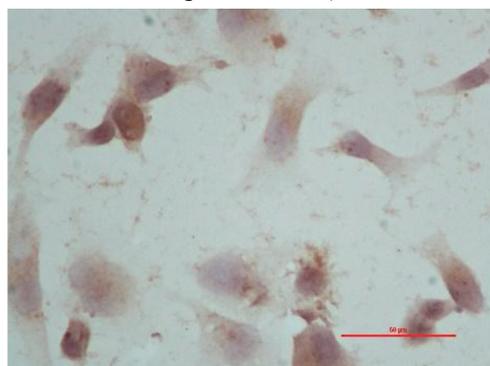
**Рис. 13.** Иммуноцитохимический анализ экспрессии PAI-1 в клетках эндотелия EA.hy926 через 18 часов после инфицирования исследуемым вирусом (микрофотография; окрашивание DAB-хромогеном, длина линии 50 мкм, увеличение  $\times 40$ ).

**Fig. 13.** Immunocytochemical analysis of PAI-1 expression in infected EA.hy926 endothelial cells in 18 hours post infection (microphotograph; DAB chromogen staining, the line size is 50  $\mu\text{m}$ ; magnification  $\times 40$ ).



**Рис. 14.** Иммуноцитохимический анализ экспрессии PAI-1 в клетках эндотелия EA.hy926 через 24 часа после инфицирования исследуемым вирусом (микрофотография; окрашивание ДАВ-хромогеном, длина линии 50 мкм, увеличение  $\times 40$ ).

**Fig. 14.** Immunocytochemical analysis of PAI-1 expression in infected EA.hy926 endothelial cells in 24 hours post infection (microphotograph; DAB chromogen staining, the line size is 50  $\mu\text{m}$ ; magnification  $\times 40$ ).



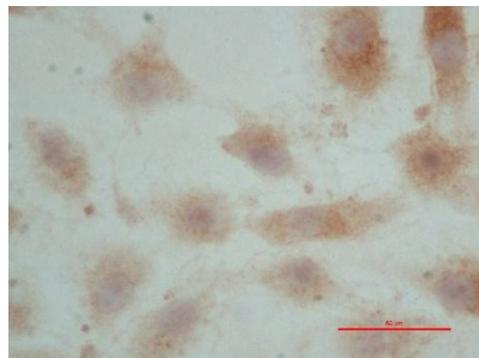
**Рис. 16.** Иммуноцитохимический анализ экспрессии PAI-1 в клетках эндотелия EA.hy926 через 72 часа после инфицирования исследуемым вирусом (микрофотография; окрашивание ДАВ-хромогеном, длина линии 50 мкм, увеличение  $\times 40$ ).

**Fig. 16.** Immunocytochemical analysis of PAI-1 expression in infected EA.hy926 endothelial cells in 72 hours post infection (microphotograph; DAB chromogen staining, the line size is 50  $\mu\text{m}$ ; magnification  $\times 40$ ).

Данные по основным параметрам сигнала в ходе оценки экспрессии PAI-1 приведены в **табл. 2**.

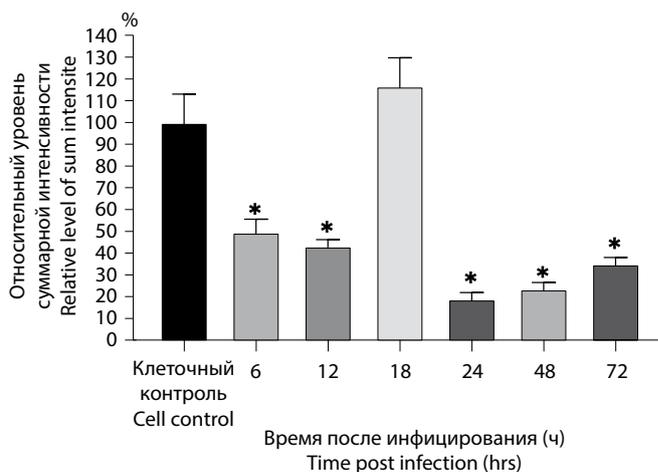
Как видно из таблицы, максимальные значения параметров сигналов в инфицированных ВГ эндотелиальных клетках зарегистрированы через 18 ч после внесения возбудителя, а минимальные – спустя 24 ч.

Аналогично определению экспрессии eNOS количественную оценку выраженности этого свойства для PAI-1 проводили по параметру суммарной интенсивности сигнала. Так, её значение в этом случае снижалось на протяжении первых 12 ч: через 6 ч экспрессия PAI-1 уменьшалась до 49,6% (контроль принят за 100%), а спустя 12 ч составляла уже 43,2%, после чего наблюдалось резкое повышение выраженности экспрессии уже через 18 ч после инфицирования клеток (116,7%). Наиболее значительное снижение зарегистрировано через 24 ч после внесения вируса – 18,9%. Указанные изменения сохранялись спустя 48 и 72 ч (23,5 и 35% соответственно) (**рис. 17**).



**Рис. 15.** Иммуноцитохимический анализ экспрессии PAI-1 в клетках эндотелия EA.hy926 через 48 часов после инфицирования исследуемым вирусом (микрофотография; окрашивание ДАВ-хромогеном, длина линии 50 мкм, увеличение  $\times 40$ ).

**Fig. 15.** Immunocytochemical analysis of PAI-1 expression in infected EA.hy926 endothelial cells in 48 hours post infection (microphotograph; DAB chromogen staining, the line size is 50  $\mu\text{m}$ ; magnification  $\times 40$ ).



**Рис. 17.** Уровень экспрессии PAI-1 в культуре клеток эндотелия EA.hy926 при их инфицировании вирусом А/Санкт-Петербург/48/16 (H1N1)pdm09 ( $n = 15$ ).

**Примечание.** \* –  $p < 0,05$ .

**Fig. 17.** Dynamics of eNOS expression in EA.hy926 endothelial cells infected with influenza A/St. Petersburg/48/16 (H1N1)pdm09 ( $n = 15$ ).

**Note.** \* –  $p < 0.05$ .

Таким образом, в эндотелиоцитах, инфицированных ВГ А/Санкт-Петербург/48/16 (H1N1)pdm09, экспрессия PAI-1 в значительной степени варьировала на протяжении всего исследуемого периода по сравнению с контролем клеток. Уровень её снижался в  $\geq 2$  раза в первые 12 ч после инфицирования клеток. Спустя 18 ч наблюдалось повышение степени экспрессии в 1,16 раза, после чего на всех последующих сроках исследования вновь определялось уменьшение данного показателя в 3–5 раз относительно контроля.

**Мимикрия эндотелиальных факторов eNOS и PAI-1 в белках исследуемого вируса гриппа.** Результаты поиска гомологичных аминокислотных последовательностей в белках исследуемых вирусов и системы гемостаза человека показали, что в структуре

**Таблица 2. Определение уровня экспрессии PAI-1 в инфицированных вирусом гриппа клетках эндотелия EA.hy926 (n = 15)**  
**Table 2. Determination of PAI-1 expression level in EA.hy926 endothelial cells infected with influenza virus (n=15)**

Параметры сигнала, относительные значения ( $M \pm m$ , %) Signal parameter, relative values ( $M \pm m$ , %)	Время после инфицирования (ч) <sup>†</sup> Time post infection (hrs) <sup>†</sup>					
	6	12	18	24	48	72
Площадь заполнения Total area	39,2 ± 3,2*	36,7 ± 5,5*	117,0 ± 9,7	17,2 ± 3,3*	21,1 ± 4,7*	33,3 ± 5,6*
Суммарная плотность Sum density	25,4 ± 2,4*	25,3 ± 4,1*	107,7 ± 8,9	13,8 ± 2,8*	18,4 ± 4,2*	30,4 ± 5,4*
Суммарная интенсивность Sum intensity	49,6 ± 5,7*	43,2 ± 4,9*	116,7 ± 8,5	18,9 ± 4,2*	23,5 ± 5,0*	35,0 ± 5,8*

**Примечание:** <sup>†</sup> – за 100% приняты параметры сигнала в неинфицированных клетках; \* –  $p < 0,05$ .

**Note:** <sup>†</sup> – signal parameters from uninfected cells designated as 100%; \* –  $p < 0.05$ .

**Таблица 3. Детерминация гомологичных фрагментов в структуре белков вируса гриппа A/Санкт-Петербург/48/16 (H1N1)pdm09 и эндотелиальных факторов eNOS и PAI-1**

**Table 3. Fragment homology between the influenza A/St. Petersburg/48/16 (H1N1)pdm09 virus and the eNOS, PAI-1 endothelial factors**

Белки вируса гриппа Influenza virus proteins	Эндотелиальные факторы Endothelial factors	
	eNOS	PAI-1
PA	–	–
PB2	K R K R D S S I L T D S Q (736–747)* :       : :       : R R K R K E S S N T D S A (627–638)**	K D E Q S I A E A I I V (389–400)*         : : :     :   K D E I S T T D A I F V (111–122)**
PB1	–	–
HA	E K N V T V T H S V N L (38–49)*         :       :   E I N V A V L H S Y Q L (401–412)**	L L V L L E N E R T L D Y (442–453)*           :         G L E L L E S E I T Y D K (278–289)**
NA	–	–
NP	–	–
M1	K E V S L S Y S T G A L (113–124)*         :           K E S S N T D S A G A L (631–642)**	K E V S L S Y S T G A L (113–124)*         :           K E V P L S A L T N I L (266–277)**
M2	–	–
NS1	–	–
NEP (NS2)	Q L L L E V E Q E I R A (104–115)*             :   :   Q R L Q E V E A E V A A (148–159)**	–

**Примечание:**

| – идентичные аминокислоты;  
: – изофункциональные аминокислоты;  
\* – аминокислотная последовательность белка вируса гриппа (порядковые номера аминокислотных остатков);  
\*\* – аминокислотная последовательность эндотелиального фактора (порядковые номера аминокислотных остатков).

**Note:**

| – identical amino acids;  
: – isofunctional amino acids;  
\* – amino acid sequence of an influenza virus protein fragment (ordinal numbers of amino acid residues);  
\*\* – amino acid sequence of a host immune system protein fragment (ordinal numbers of amino acid residues).

ряда вирусных белковых структур имеется множество последовательностей, мимикрирующих таковые эндотелиальных факторов (табл. 3).

В частности, фрагменты аминокислотной последовательности, гомологичные eNOS, обнаружены в белках PB2, HA, M1 и NEP (NS2) исследуемого ВГ. В этих же структурах, за исключением последней, обнаружены также фрагменты последовательности аминокислот, гомологичные PAI-1. Гомология данных участков, мимикрирующих эндотелиальные факторы, характеризуется высокой степенью сходства: из 12 сравниваемых аминокислотных остатков в каждом случае 7 гомологичны и по 2–4 – изофункциона-

нальны, т.е. гомологичность сравниваемых фрагментов превышает 80%.

**Обсуждение**

ВГ поражает верхний отдел респираторного тракта, приводя обычно к самолимитирующей болезни с умеренными симптомами со стороны дыхательной системы. При тяжёлых формах гриппозной инфекции возбудитель может не только инфицировать клетки респираторных путей, но и вызывать острое поражение лёгких с развитием повышенной проницаемости лёгочных капилляров, а также сосудистый коллапс. Ухудшение клинического состояния пациентов свя-

зывают с ДЭ, ведущей к отёку лёгких, гипоксемии и дыхательной недостаточности [23, 24].

Согласно современным представлениям ВГ А может способствовать возникновению ДЭ различными путями: 1) за счёт реорганизации цитоскелета, приводящей к продукции и последующему утолщению стресс-фибрилл. Эти нарушения обуславливают изменение морфологии клеток и повышают их проницаемость; 2) посредством синтеза микроРНК, индуцирующих сигнальные пути с вовлечением PKC (протеинкиназы C), Rho/ROCK, Ras/Raf/MEK/ERK, а также комплекса кальций–кальцимодулин ( $\text{Ca}^{2+}$ /CaM), что дополнительно увеличивает проницаемость клеток, вызывая их дисфункцию; 3) запуском механизма цитокинового шторма, при котором наблюдается чрезмерная продукция и секреция фактора некроза опухоли альфа (ФНО- $\alpha$ ). Резкое повышение содержания последнего ведёт к Rho-киназа-индуцированному образованию стресс-фибрилл и усиливает фосфорилирование лёгких цепей миозина, вследствие чего происходит блеббинг («вскипание мембран»); клетка приобретает округлую форму и подвергается апоптозу [25–27]. Наблюдаемая при цитокиновом шторме избыточная продукция ФНО- $\alpha$ , интерлейкинов 6 и 1 $\beta$  приводит также к повышению активности трипсина в эндотелиоцитах, что вызывает деградацию одного из белков плотных контактов (ZO-1, zonula occludens-1) и повышение проницаемости сосудистой стенки за счёт протеазного рецептора 2 (PAR-2) [28]. Совокупность указанных изменений, в свою очередь, обуславливает разрушение плотных межклеточных контактов и дальнейший рост сосудистой проницаемости; 4) модулированием экспрессии эндотелиальных факторов, таких как eNOS [23], tPA [29], PAI-1.

Изменение степени экспрессии ряда факторов, синтезируемых клетками эндотелия, вносит существенный вклад в формирование ДЭ, приводя к возникновению сердечно-сосудистой патологии [24]; при этом непосредственная роль гриппозной инфекции в данном процессе остаётся до конца не выясненной. В настоящем исследовании изучена экспрессия 2 эндотелиальных факторов: eNOS и PAI-1. Экспрессия этих молекул определялась при инфицировании клеток эндотелия EA.hy926 исследуемым ВГ через 6, 12, 18, 24, 48 и 72 ч. Оказалось, что экспрессия eNOS в инфицированных вирусом эндотелиоцитах была резко снижена на протяжении всего исследуемого периода по сравнению с клеточным контролем. Выраженность её уменьшалась до 7,9% уже через 6 ч (контроль принят за 100%). Через 12 ч уровень суммарной экспрессии снижался до 12,1%, через 18 ч до 5,4% и спустя 24 ч достигал своего минимума – 2,9%. Через 48 ч степень экспрессии eNOS была равной 3,1%, а спустя 72 ч – 3,3%.

Экспрессия PAI-1 в инфицированных ВГ клетках эндотелия значительно варьировала. Так, через 6 ч показатель её интенсивности PAI-1 уменьшился до 49,6% (контроль – 100%), а спустя 12 ч составлял 43,2%, после чего наблюдалось резкое повышение экспрессии уже через 18 ч после внесения возбудителя – 116,7%.

Наиболее выраженное снижение зарегистрировано через 24 ч после инфицирования (18,9%). Указанные изменения сохранялись спустя 48 и 72 ч: 23,5 и 35% соответственно.

Известно, что существенное уменьшение экспрессии eNOS в эндотелиоцитах ведёт к снижению синтеза NO и нарушению процессов регуляции релаксации и констрикции сосудистой стенки, что является одним из ведущих звеньев в патогенезе ДЭ кровеносных сосудов [15, 30]. Один из механизмов снижения продукции NO – разобщение eNOS с субстратом, в качестве которого выступает L-аргинин. Это приводит к тому, что молекулы данного фактора, продолжая получать электроны от восстановленного никотин/амиддинуклеотид-фосфата (NADPH), поставляют их другому субстрату – молекулярному кислороду ( $\text{O}_2$ ), в результате чего образуются высокоактивные формы кислорода (в частности, супероксиданион ( $\text{O}_2^-$ )) [31, 32]. Свободные радикалы в дальнейшем могут вызывать окислительный стресс и усиливать проявления ДЭ. В то же время снижение биодоступности NO, вырабатываемого eNOS, может компенсироваться за счёт индуцибельной синтазы оксида азота (iNOS). Экспрессия данной изоформы NO-синтазы связана с провоспалительными цитокинами и увеличивается с активацией транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B. Несмотря на данный адаптивный механизм, концентрация NO становится избыточной и возрастает с нано- до микромолярной. Избыток NO взаимодействует с  $\text{O}_2^-$ , в результате чего образуется пероксинитрит ( $\text{ONOO}^-$ ). В свою очередь, высокое содержание последнего коррелирует с гибелью эндотелиальных клеток посредством апоптоза [33–35] или некроза. NO-индуцируемое перекисное окисление липидов в данном случае может служить причиной серьёзно повреждённой сосудистой стенки, ещё больше усугубляя ДЭ [36].

PAI-1 является основным ингибитором активаторов плазминогена: тканевого (tPA) и урокиназного (uPA) [37], а также участвует в регуляции фибринолитической системы. Первым двум веществам отводится важная роль в регуляции гемостаза при гриппе. Так, полученные в ходе исследования данные о модуляции экспрессии PAI-1 в целом коррелируют с имеющимися сведениями относительно изменения экспрессии tPA в инфицированных возбудителем гриппа эндотелиоцитах человека EA.hy926: экспрессия PAI-1 через 12 ч снижалась, а tPA – возрастала и наоборот, спустя 18 ч экспрессия tPA уменьшалась, а PAI-1 – повышалась [29]. Столь выраженные изменения степени экспрессии PAI-1 и tPA в клетках эндотелия подтверждают способность ВГ A(H1N1)pdm09 вызывать ДВС-синдром. Именно сочетанное взаимодействие эндотелиальных факторов PAI-1 и tPA (снижение концентрации одного с повышением содержания другого и наоборот) служит одним из ведущих патофизиологических механизмов развития этого синдрома, наблюдаемого при сепсисе и тяжёлых вирусных инфекциях [38].

Таким образом, инфицирование ВГ клеток эндотелия приводит к нарушению экспрессии эндоте-

лиальных факторов и, следовательно, к поражению кровеносных сосудов. Одним из путей воздействия патогена на эндотелиоциты может быть молекулярная мимикрия вирусных белков и аминокислотных фрагментов молекул PAI-1 и eNOS. Сравнительный компьютерный анализ первичной последовательности PAI-1 и eNOS со структурами ВГ А/Санкт-Петербург/48/16 (H1N1)pdm09 позволил выявить в ряде его белков (PB2, HA, M1, NP (NS2)) фрагменты с высокой степенью гомологии. Можно предположить, что мимикрия вирусом факторов эндотелия может играть важную роль в дизрегуляции функций последнего, вызывая широкий спектр нарушений, связанных с проницаемостью клеточных мембран, развитием цитокинового шторма [28], изменениями процессов вазодилатации и вазоконстрикции. Гомологичные фрагменты могут высвобождаться из белковых структур вируса путём протеолиза клеточными протеазами либо вирусными же белками, обладающими подобной активностью.

Другой потенциальный механизм нарушения регуляции вирусными гомологичными фрагментами функций эндотелия может проявляться в индукции иммунного ответа к гомологичным фрагментам вирусных белков, в частности выработкой специфических АТ, способных также распознавать и, соответственно, блокировать содержащие их белковые структуры макроорганизма. Подтверждением возможности такого варианта патогенеза аутоиммунных реакций служат результаты вакцинации в период пандемии гриппа 2009–2010 гг. Проведение прививок вакциной Pandemrix («GlaxoSmithKline», Великобритания) имело следствием резкий рост частоты нарколепсии у детей и подростков в разных странах. Сопоставление характеристик разных вакцинных препаратов показало возможную связь возникновения этого заболевания с высоким содержанием в вакцине Pandemrix нуклеопротеина ВГ и образованием к нему АТ, перекрёстно реагировавших с рецептором гипокретина-2 (орексина-2). Оказалось, что рецептор гипокретина-2 имеет в своей внеклеточной петле мотив, присутствующий в составе вирусного нуклеопротеина [39].

### Заключение

Таким образом, полученные данные указывают на способность ВГ А(H1N1)pdm09 влиять на экспрессию ряда факторов эндотелия – eNOS и PAI-1, тем самым способствуя формированию ДЭ, что является чрезвычайно важным условием развития кардиоваскулярной патологии. Описанный феномен может быть использован при дальнейшей разработке патогенетической терапии сосудистых осложнений инфекции, вызываемой данным возбудителем.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Fukunaga S., Ishida C., Nakaoka A., Ito T. A case of acute kidney injury and disseminated intravascular coagulation associated with influenza B viral infection. *CEN Case Rep.* 2014; 4(1): 95–100. <https://doi.org/10.1007/s13730-014-0147-9>
2. Watanabe T., Yoshikawa H., Abe Y., Yamazaki S., Uehara Y., Abe T. Renal involvement in children with influenza A virus infection. *Pe-*

- diatr. Nephrol.* 2003; 18(6): 541–4. <https://doi.org/10.1007/s00467-003-1143-z>
3. Smeeth L., Cook C., Thomas S., Hall A.J., Hubbard R., Vallance P. Risk of deep vein thrombosis and pulmonary embolism after acute infection in a community setting. *Lancet.* 2006; 367(9516): 1075–9. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(06\)68474-2](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(06)68474-2)
4. Corrales-Medina V.F., Madjid M., Musher D.M. Role of acute infection in triggering acute coronary syndromes. *Lancet Infect. Dis.* 2010; 10(2): 83–92. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(09\)70331-7](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(09)70331-7)
5. Drexler H. Nitric oxide and coronary endothelial dysfunction in humans. *Cardiovasc. Res.* 1999; 43(3): 572–9. [https://doi.org/10.1016/s0008-6363\(99\)00152-2](https://doi.org/10.1016/s0008-6363(99)00152-2)
6. Ludwig A., Lucero-Obusan C., Schirmer P., Winston C., Holodniy M. Acute cardiac injury events  $\leq 30$  days after laboratory-confirmed influenza virus infection among U.S. veterans, 2010–2012. *BMC Cardiovasc. Disord.* 2015; 15: 109. <https://doi.org/10.1186/s12872-015-0095-0>
7. Kwong J.C., Schwartz K.L., Campitelli M.A., Chung H., Crowcroft N.S., Karnauchow T., et al. Acute myocardial infarction after laboratory-confirmed influenza infection. *N. Engl. J. Med.* 2018; 378(4): 345–53. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1702090>
8. Barnes M., Heywood A.E., Mahimbo A., Rahman B., Newall A.T., Macintyre C.R. Acute myocardial infarction and influenza: a meta-analysis of case-control studies. *Heart.* 2015; 101(21): 1738–47. <https://doi.org/10.1136/heartjnl-2015-307691>
9. Warren-Gash C., Smeeth L., Hayward A.C. Influenza as a trigger for acute myocardial infarction or death from cardiovascular disease: a systematic review. *Lancet Infect. Dis.* 2009; 9(10): 601–10. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(09\)70233-6](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(09)70233-6)
10. Fagnoul D., Pasquier P., Bodson L., Ortiz J.A., Vincent J.L., De Backer D. Myocardial dysfunction during H1N1 influenza infection. *J. Crit. Care.* 2013; 28(4): 321–7. <https://doi.org/10.1016/j.jccr.2013.01.010>
11. Tseng G.S., Hsieh C.Y., Hsu C.T., Lin J.C., Chan J.S. Myopericarditis and exertional rhabdomyolysis following an influenza A (H3N2) infection. *BMC Infect. Dis.* 2013; 13: 283. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-283>
12. Lobo M.L., Taguchi A., Gaspar H.A., Ferranti J.F., de Carvalho W.B., Delgado A.F. Fulminant myocarditis associated with the H1N1 influenza virus: case report and literature review. *Rev. Bras. Ter. Intensiva.* 2014; 26(3): 321–6. <https://doi.org/10.5935/0103-507x.20140046>
13. Lubrano V., Balzan S. Roles of LOX-1 in microvascular dysfunction. *Microvasc. Res.* 2016; 105: 132–140. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2016.02.006>
14. Kwok C.S., Aslam S., Kontopantelis E., Myint P.K., Zaman M.J., Buchan I., et al. Influenza, influenza-like symptoms and their association with cardiovascular risks: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Int. J. Clin. Pract.* 2015; 69(9): 928–37. <https://doi.org/10.1111/ijcp.12646>
15. Gliozzi M., Scicchitano M., Bosco F., Musolino V., Carresi C., Scarano F., et al. Modulation of nitric oxide synthases by oxidized LDLs: role in vascular inflammation and atherosclerosis development. *Int. J. Mol. Sci.* 2019; 20(13): 3294. <https://doi.org/10.3390/ijms20133294>
16. Sessa W.C. eNOS at a glance. *J. Cell. Sci.* 2004; 117(Pt. 12): 2427–9. <https://doi.org/10.1242/jcs.01165>
17. Naseem K.M. The role of nitric oxide in cardiovascular diseases. *Mol. Aspects. Med.* 2005; 26(1-2): 33–65. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2004.09.003>
18. Kubes P., Suzuki M., Granger D.N. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1991; 88(11): 4651–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.11.4651>
19. Ghosh A.K., Vaughan D.E. PAI-1 in tissue fibrosis. *J. Cell. Physiol.* 2012; 227(2): 493–507. <https://doi.org/10.1002/jcp.22783>
20. Марченко В.А., Барашкова С.В., Зелинская И.А., Торопова Я.Г., Сорокин Е.В., Жилинская И.Н. Моделирование гриппозной инфекции у половозрелых крыс стока Wistar. *Вопросы вирусологии.* 2020; 65(3): 159–66. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-3-159-166>
21. Burry R.W. Immunocytochemistry: a Practical Guide for Biomedical Research. New York: Springer; 2010.
22. Taylor C.R., Levenson R.M. Quantification of immunohistochemistry-issues concerning methods, utility and semiquantitative assessment II. *Histopathology.* 2006; 49(4): 411–24. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2006.02513.x>

23. Heiss C., Rodriguez-Mateos A., Kelm M. Central role of eNOS in the maintenance of endothelial homeostasis. *Antioxid. Redox Signal.* 2015; 22(14): 1230–42. <https://doi.org/10.1089/ars.2014.6158>
24. Lobo S.M., Watanabe A.S.A., Salomão M.L.M., Queiroz F., Gandolfi J.V., de Oliveira N.E., et al. Excess mortality is associated with influenza A (H1N1) in patients with severe acute respiratory illness. *J. Clin. Virol.* 2019; 116: 62–8. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2019.05.003>
25. Petrache I., Birukov K., Zaiman A.L., Crow M.T., Deng H., Wadgaonkar R., et al. Caspase dependent cleavage of myosin light chain kinase (MLCK) is involved in TNF-alpha-mediated bovine pulmonary endothelial cell apoptosis. *FASEB J.* 2003; 17(3): 407–16. <https://doi.org/10.1096/fj.02-0672com>
26. Petrache I., Crow M.T., Neuss M., Garcia J.G. Central involvement of Rho family GTPases in TNF-alpha mediated bovine pulmonary endothelial cell apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003; 306(1): 244–9. [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(03\)00945-8](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(03)00945-8)
27. Digard P., Elton D., Bishop K., Medcalf E., Weeds A., Pope B. Modulation of nuclear localization of the influenza virus nucleoprotein through interaction with actin filaments. *J. Virol.* 1999; 73(3): 2222–31. <https://doi.org/10.1128/jvi.73.3.2222-2231.1999>
28. Wang S., Le T.Q., Kurihara N., Chida J., Cisse Y., Yano M., et al. Influenza virus-cytokine-protease cycle in the pathogenesis of vascular hyperpermeability in severe influenza. *J. Infect. Dis.* 2010; 202(7): 991–1001. <https://doi.org/10.1086/656044>
29. Азаренок А.А., Ляпина Л.А., Оберган Т.Ю., Харченко Е.П., Козлова Н.М., Жилинская И.Н. Изменение активности тканевого активатора плазминогена клеток эндотелия под воздействием вируса гриппа А и его поверхностных белков. *Тромбоз, гемостаз, реология.* 2014; (1): 3–8.
30. Förstermann U., Sessa W.C. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur. Heart J.* 2012; 33(7): 829–37. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehr304>
31. Lubrano V., Balzan S. LOX-1 and ROS, inseparable factors in the process of endothelial damage. *Free Radic. Res.* 2014; 48(8): 841–8. <https://doi.org/10.3109/10715762.2014.929122>
32. Pirillo A., Norata G.D., Catapano A.L. LOX-1, OxLDL, and atherosclerosis. *Mediators Inflamm.* 2013; 2013: 152786. <https://doi.org/10.1155/2013/152786>
33. Pritchard K.A. Jr., Ackerman A.W., Gross E.R., Stepp D.W., Shi Y., Fontana J.T., et al. Heat shock protein 90 mediates the balance of nitric oxide and superoxide anion from endothelial nitric-oxide synthase. *J. Biol. Chem.* 2001; 276(21): 17621–4. <https://doi.org/10.1074/jbc.c100084200>
34. Moncada S., Palmer R.M., Higgs E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, pharmacology. *Pharm. Rev.* 1991; 43(2): 109–42.
35. Ahmad R., Rasheed Z., Ahsan H. Biochemical and cellular toxicology of peroxynitrite: implications in cell death and autoimmune phenomenon. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 2009; 31(3): 388–96. <https://doi.org/10.1080/08923970802709197>
36. Natarajan M., Konopinski R., Krishnan M., Roman L., Bera A., Hongying Z., et al. Inhibitor- $\kappa$ B kinase attenuates Hsp90-dependent endothelial nitric oxide synthase function in vascular endothelial cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2015; 308(8): 673–83. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00367.2014>
37. Yasar Yildiz S., Kuru P., Toksoy Oner E., Agirbasli M. Functional stability of plasminogen activator inhibitor-1. *Scientific World Journal.* 2014; 2014: 858293. <https://doi.org/10.1155/2014/858293>
38. Gando S., Levi M., Toh C. Disseminated intravascular coagulation. *Nat. Rev. Dis. Primers.* 2016; 2: 16037. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.37>
39. Hallberg P., Smedje H., Eriksson N., Kohnke H., Daniilidou M., Öhman I., et al. Pandemrix-induced narcolepsy is associated with genes related to immunity and neuronal survival. *EBioMedicine.* 2019; 40: 595–604. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.01.041>
3. Smeeth L., Cook C., Thomas S., Hall A.J., Hubbard R., Vallance P. Risk of deep vein thrombosis and pulmonary embolism after acute infection in a community setting. *Lancet.* 2006; 367(9516): 1075–9. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(06\)68474-2](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(06)68474-2)
4. Corrales-Medina V.F., Madjid M., Musher D.M. Role of acute infection in triggering acute coronary syndromes. *Lancet Infect. Dis.* 2010; 10(2): 83–92. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(09\)70331-7](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(09)70331-7)
5. Drexler H. Nitric oxide and coronary endothelial dysfunction in humans. *Cardiovasc. Res.* 1999; 43(3): 572–9. [https://doi.org/10.1016/s0008-6363\(99\)00152-2](https://doi.org/10.1016/s0008-6363(99)00152-2)
6. Ludwig A., Lucero-Obusan C., Schirmer P., Winston C., Holodniy M. Acute cardiac injury events  $\leq$ 30 days after laboratory-confirmed influenza virus infection among U.S. veterans, 2010–2012. *BMC Cardiovasc. Disord.* 2015; 15: 109. <https://doi.org/10.1186/s12872-015-0095-0>
7. Kwong J.C., Schwartz K.L., Campitelli M.A., Chung H., Crowcroft N.S., Karnauchow T., et al. Acute myocardial infarction after laboratory-confirmed influenza infection. *N. Engl. J. Med.* 2018; 378(4): 345–53. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1702090>
8. Barnes M., Heywood A.E., Mahimbo A., Rahman B., Newall A.T., Macintyre C.R. Acute myocardial infarction and influenza: a meta-analysis of case-control studies. *Heart.* 2015; 101(21): 1738–47. <https://doi.org/10.1136/heartjnl-2015-307691>
9. Warren-Gash C., Smeeth L., Hayward A.C. Influenza as a trigger for acute myocardial infarction or death from cardiovascular disease: a systematic review. *Lancet Infect. Dis.* 2009; 9(10): 601–10. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(09\)70233-6](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(09)70233-6)
10. Fagnoul D., Pasquier P., Bodson L., Ortiz J.A., Vincent J.L., De Backer D. Myocardial dysfunction during H1N1 influenza infection. *J. Crit. Care.* 2013; 28(4): 321–7. <https://doi.org/10.1016/j.jcrc.2013.01.010>
11. Tseng G.S., Hsieh C.Y., Hsu C.T., Lin J.C., Chan J.S. Myopericarditis and exertional rhabdomyolysis following an influenza A (H3N2) infection. *BMC Infect. Dis.* 2013; 13: 283. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-283>
12. Lobo M.L., Taguchi A., Gaspar H.A., Ferranti J.F., de Carvalho W.B., Delgado A.F. Fulminant myocarditis associated with the H1N1 influenza virus: case report and literature review. *Rev. Bras. Ter. Intensiva.* 2014; 26(3): 321–6. <https://doi.org/10.5935/0103-507x.20140046>
13. Lubrano V., Balzan S. Roles of LOX-1 in microvascular dysfunction. *Microvasc. Res.* 2016; 105: 132–140. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2016.02.006>
14. Kwok C.S., Aslam S., Kontopantelis E., Myint P.K., Zaman M.J., Buchan I., et al. Influenza, influenza-like symptoms and their association with cardiovascular risks: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Int. J. Clin. Pract.* 2015; 69(9): 928–37. <https://doi.org/10.1111/ijcp.12646>
15. Gliozzi M., Scicchitano M., Bosco F., Musolino V., Carresi C., Scarano F., et al. Modulation of nitric oxide synthases by oxidized LDLs: role in vascular inflammation and atherosclerosis development. *Int. J. Mol. Sci.* 2019; 20(13): 3294. <https://doi.org/10.3390/ijms20133294>
16. Sessa W.C. eNOS at a glance. *J. Cell. Sci.* 2004; 117(Pt. 12): 2427–9. <https://doi.org/10.1242/jcs.01165>
17. Naseem K.M. The role of nitric oxide in cardiovascular diseases. *Mol. Aspects. Med.* 2005; 26(1-2): 33–65. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2004.09.003>
18. Kubes P., Suzuki M., Granger D.N. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1991; 88(11): 4651–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.11.4651>
19. Ghosh A.K., Vaughan D.E. PAI-1 in tissue fibrosis. *J. Cell. Physiol.* 2012; 227(2): 493–507. <https://doi.org/10.1002/jcp.22783>
20. Marchenko V.A., Barashkova S.V., Zelinskaya I.A., Toropova Ya.G., Sorokin E.V., Zhilinskaya I.N. Modeling influenza virus infection in mature Wistar rats [Modelirovaniye grippoznoy infektsii u polovozrelykh kryis stoka Wistar]. *Voprosy virusologii.* 2020; 65(3): 159–66. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-3-159-166> (in Russian)
21. Burry R.W. Immunocytochemistry: a Practical Guide for Biomedical Research. New York: Springer; 2010.
22. Taylor C.R., Levenson R.M. Quantification of immunohistochemistry-issues concerning methods, utility and semiquantitative assessment II. *Histopathology.* 2006; 49(4): 411–24. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2006.02513.x>
23. Heiss C., Rodriguez-Mateos A., Kelm M. Central role of eNOS in the maintenance of endothelial homeostasis. *Antioxid. Re-*

## REFERENCES

1. Fukunaga S., Ishida C., Nakaoka A., Ito T. A case of acute kidney injury and disseminated intravascular coagulation associated with influenza B viral infection. *CEN Case Rep.* 2014; 4(1): 95–100. <https://doi.org/10.1007/s13730-014-0147-9>
2. Watanabe T., Yoshikawa H., Abe Y., Yamazaki S., Uehara Y., Abe T. Renal involvement in children with influenza A virus infection. *Pediatr. Nephrol.* 2003; 18(6): 541–4. <https://doi.org/10.1007/s00467-003-1143-z>

- dox Signal*. 2015; 22(14): 1230–42. <https://doi.org/10.1089/ars.2014.6158>
24. Lobo S.M., Watanabe A.S.A., Salomão M.L.M., Queiroz F., Gandolfi J.V., de Oliveira N.E., et al. Excess mortality is associated with influenza A (H1N1) in patients with severe acute respiratory illness. *J. Clin. Virol*. 2019; 116: 62–8. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2019.05.003>
  25. Petrache I., Birukov K., Zaiman A.L., Crow M.T., Deng H., Wadgaonkar R., et al. Caspase dependent cleavage of myosin light chain kinase (MLCK) is involved on TNF-alpha-mediated bovine pulmonary endothelial cell apoptosis. *FASEB J*. 2003; 17(3): 407–16. <https://doi.org/10.1096/fj.02-0672com>
  26. Petrache I., Crow M.T., Neuss M., Garcia J.G. Central involvement of Rho family GTPases in TNF-alpha mediated bovine pulmonary endothelial cell apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2003; 306(1): 244–9. [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(03\)00945-8](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(03)00945-8)
  27. Digard P., Elton D., Bishop K., Medcalf E., Weeds A., Pope B. Modulation of nuclear localization of the influenza virus nucleoprotein through interaction with actin filaments. *J. Virol*. 1999; 73(3): 2222–31. <https://doi.org/10.1128/jvi.73.3.2222-2231.1999>
  28. Wang S., Le T.Q., Kurihara N., Chida J., Cisse Y., Yano M., et al. Influenza virus-cytokine-protease cycle in the pathogenesis of vascular hyperpermeability in severe influenza. *J. Infect. Dis*. 2010; 202(7): 991–1001. <https://doi.org/10.1086/656044>
  29. Azarenok A.A., Lyapina L.A., Obergan T.Yu., Kharchenko E.P., Kozlova N.M., Zhilinskaya I.N. Modification in activity of tissue plasminogen activator of endothelial cells in response to influenza virus A and its surface proteins [Изменение активности тканевого активатора плазминогена клеток эндотелия под воздействием вируса гриппа А и его поверхностных белков]. *Tromboz, gemostaz, reologiya*. 2014; (1): 3–8. (in Russian)
  30. Förstermann U., Sessa W.C. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur. Heart. J*. 2012; 33(7): 829–37. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehr304>
  31. Lubrano V., Balzan S. LOX-1 and ROS, inseparable factors in the process of endothelial damage. *Free Radic. Res*. 2014; 48(8): 841–8. <https://doi.org/10.3109/10715762.2014.929122>
  32. Pirillo A., Norata G.D., Catapano A.L. LOX-1, OxLDL, and atherosclerosis. *Mediators Inflamm*. 2013; 2013: 152786. <https://doi.org/10.1155/2013/152786>
  33. Pritchard K.A. Jr., Ackerman A.W., Gross E.R., Stepp D.W., Shi Y., Fontana J.T., et al. Heat shock protein 90 mediates the balance of nitric oxide and superoxide anion from endothelial nitric-oxide synthase. *J. Biol. Chem*. 2001; 276(21): 17621–4. <https://doi.org/10.1074/jbc.c100084200>
  34. Moncada S., Palmer R.M., Higgs E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, pharmacology. *Pharm. Rev*. 1991; 43(2): 109–42.
  35. Ahmad R., Rasheed Z., Ahsan H. Biochemical and cellular toxicology of peroxynitrite: implications in cell death and autoimmune phenomenon. *Immunopharmacol. Immunotoxicol*. 2009; 31(3): 388–96. <https://doi.org/10.1080/08923970802709197>
  36. Natarajan M., Konopinski R., Krishnan M., Roman L., Bera A., Hongying Z., et al. Inhibitor- $\kappa$ B kinase attenuates Hsp90-dependent endothelial nitric oxide synthase function in vascular endothelial cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol*. 2015; 308(8): 673–83. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00367.2014>
  37. Yasar Yildiz S., Kuru P., Toksoy Oner E., Agirbasli M. Functional stability of plasminogen activator inhibitor-1. *Scientific World Journal*. 2014; 2014: 858293. <https://doi.org/10.1155/2014/858293>
  38. Gando S., Levi M., Toh C. Disseminated intravascular coagulation. *Nat. Rev. Dis. Primers*. 2016; 2: 16037. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.37>
  39. Hallberg P., Smedje H., Eriksson N., Kohnke H., Daniilidou M., Öhman I., et al. Pandemrix-induced narcolepsy is associated with genes related to immunity and neuronal survival. *EBioMedicine*. 2019; 40: 595–604. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.01.041>