

На правах рукописи

**АЗАРЕНОК
АНАСТАСИЯ АЛЕКСАНДРОВНА**

**РОЛЬ ВИРУСА ГРИППА И ЕГО ПОВЕРХНОСТНЫХ БЕЛКОВ В РАЗ-
ВИТИИ ДИСФУНКЦИИ КЛЕТОК ЭНДОТЕЛИЯ**

03.02.02. - вирусология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург - 2014

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении
«Научно-исследовательский институт гриппа» Министерства здравоохранения
Российской Федерации

Научный руководитель:

Жилинская Ирина Николаевна доктор биологических наук

Официальные оппоненты:

Исаков Валерий Александрович, доктор медицинских наук, профессор кафедры инфекционных болезней и эпидемиологии с курсом ВИЧ-медицины ГОУ ВПО «Первый СПбГМУ им. акад.И.П.Павлова» Росздрава.

Киселева Ирина Васильевна, доктор биологических наук, ФГБУ «НИИ экспериментальной медицины» СЗО РАМН, зав. лаб. вакцинных штаммов отдела вирусологии им. А.А. Смородинцева.

Ведущая организация: Федеральное бюджетное государственное учреждение «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучию человека Российской Федерации

Защита диссертации состоится _____ в ____ часов на заседании совета по защите докторских и кандидатских диссертаций Д 208.131.01 при ФГБУ «Научно-исследовательский институт вирусологии им. Д.И. Ивановского» Минздрава России (123098, Москва, ул. Гамалеи, д. 16).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «Научно-исследовательский институт вирусологии им. Д.И. Ивановского» Минздрава России (123098, Москва, ул. Гамалеи, д. 16)

Автореферат разослан « » _____

Ученый секретарь
Диссертационного совета,
доктор медицинских наук

Бурцева Елена Ивановна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Грипп представляет собой инфекцию, занимающую доминирующее положение в структуре инфекционной заболеваемости, как по числу случаев заболевания, так и по наносимому экономическому ущербу [Киселев и др., 2010; Львов и др., 2010]. Однако, несмотря на интенсивное изучение возбудителя этой инфекции с момента его открытия и до наших дней, патогенез гриппа остается предметом интереса большого числа исследователей. Это связано в первую очередь с установленным фактом, что вирус гриппа вызывает не только нарушения дыхательной системы, но и поражает нервную систему, кишечник, а также вызывает изменения в системе гемостаза [Богомолов и др., 2001; Жилинская и др., 2003;]. Механизм этих множественных нарушений при гриппе до сих пор невыяснен. Взаимосвязь гриппозной инфекции и нарушений гемостаза клиницисты отмечали еще в 60-е года прошлого века [Сергеев и др., 1962]. Подтверждением этой взаимосвязи явилась эпидемия 2009-2011 гг., во время которой наблюдались тяжелые осложнения в виде энцефалопатий и тромбогеморрагических пневмоний, ключевым моментом в развитии которых явилось повреждение эндотелия кровеносных сосудов вирусом гриппа [Цинзерлинг и др., 2011; Горфинкель и др., 2011]. Кроме того, эпидемиологические данные также указывают на то, что имеется корреляция между ежегодными эпидемиями гриппа и ростом числа больных, страдающих сердечно-сосудистыми заболеваниями [Богомолов и др., 2001; Carrat et al., 2006; Wong et al., 2006]. Так как среди причин развития сердечно-сосудистых заболеваний дисфункция эндотелия занимает одно из первых мест [Петрищев, 2003], то можно предполагать, что в случае подтверждения способности вируса гриппа поражать эндотелий кровеносных сосудов человека, гриппозная инфекция может представлять угрозу возникновения сердечно-сосудистой патологии. Поэтому, представляло интерес выяснить, влияет ли гриппозная инфекция на развитие дисфункции эндотелия.

Эндотелий кровеносных сосудов в настоящее время рассматривается не просто как барьер между кровью и окружающими тканями, но как диффузный эндокринный орган, пронизывающий все системы организма [Furchgott_1999; Гомазков 2000; Lupinская и др., 2008]. Основной функцией эндотелия является поддержание гемостаза, то есть непрерывного тока крови, но кроме этого клетки эндотелия участвуют в процес-

сах воспаления, ангиогенеза и т.д. В связи с этим эндотелий оказывается мишенью для большинства патогенов, как бактериальных, так и вирусных.

Большое число исследований посвящено воздействию на эндотелиальные клетки таких вирусов, как вирус иммунодефицита, цитомегаловирус, вирусы-возбудители геморрагических лихорадок [Bibas et al., 2011; Popovic et al., 2012; Brown et al., 2011]. На этом фоне количество работ, посвященных влиянию вируса гриппа и его белков на клетки эндотелия, крайне незначительно и проведение подобных исследований при изучении патогенеза гриппозной инфекции представляется актуальным [Klenk et al., 2005]. Фундаментальные исследования по изучению механизмов взаимодействия вируса гриппа с клетками эндотелия в России не проводятся. Имеется ряд сообщений о патоморфологических исследованиях клеток эндотелия при гриппозной инфекции [Цинзерлинг, 1977; Горфинкель и др., 2011], а также клинические исследования, касающиеся терапии ДВС-синдрома и геморрагических пневмоний при гриппе [Роганова, 2009]. Монографий на данную тему, а также защищенных кандидатских и докторских диссертаций не имеется. В основе работы лежат данные, полученные доктором биологических наук Жилинской И.Н. (сотрудником ФГБУ НИИ гриппа МЗ РФ) – докторская диссертация «Роль вирусных белков в патогенезе гриппозной инфекции», 2003 год.

Цель и задачи исследования. Целью работы было показать возможность репродукции вируса гриппа в клетках эндотелия сосудов человека и выявить роль вируса гриппа и его поверхностных белков – гемагглютинина и нейраминидазы – в развитии дисфункции эндотелиальных клеток.

Для достижения поставленной цели планировалось решить следующие задачи:

- 1). Выявить особенности репродукции эпидемически актуальных штаммов вируса гриппа человека и птиц в культуре клеток эндотелия человека EAhy926.
- 2). Оценить воздействие эпидемически актуальных штаммов вируса гриппа и его поверхностных белков на дыхательную активность митохондрий эндотелиальных клеток.
- 3) Выяснить воздействие эпидемически актуальных штаммов вируса гриппа и его поверхностных белков на апоптоз клеток эндотелия.

4) Изучить влияние эпидемически актуальных штаммов вируса гриппа и его поверхностных белков на выживаемость клеток эндотелия.

5) Оценить развитие дисфункции эндотелия под воздействием эпидемически актуальных штаммов вируса гриппа и его поверхностных белков по активности человеческого тканевого активатора плазминогена.

Научная новизна работы. Доказано, что вирус гриппа способен репродуцироваться в клетках эндотелия человека *in vitro* (на модели клеточной культуры EAhy926). На модели клеточной культуры репродукция вируса гриппа была зарегистрирована вирусологическим, молекулярно-биологическим и электронно-микроскопическим методами, а также была подтверждена при изучении аутопсийного материала легких, мозга и сердца.

Впервые показано развитие дисфункции эндотелия под воздействием вируса гриппа и его поверхностных белков с использованием нескольких критериев: по развитию апоптоза, по угнетению метаболизма клеток эндотелия, по активации тканевого активатора плазминогена.

Развитие апоптоза было подтверждено данными по активации каспазы-3 и регистрации аннексин V положительных апоптотических клеток. Впервые было показано, что вирус гриппа типа А вызывает активацию каспазы-3 в эндотелиальных клетках через 30 минут после их инфицирования. Аналогичные данные получены и для поверхностных белков исследуемых вирусов – гемагглютинина и нейраминидазы. Исследуемые штаммы вируса гриппа и их поверхностный белок нейраминидаза вызывали развитие апоптоза на ранних сроках воздействия (4-8 часов), что регистрировалось по появлению аннексин V положительных клеток (6% от общего числа клеток). При изучении воздействия другого поверхностного белка – гемагглютинина – было показано, что, несмотря на активацию каспазы-3, гемагглютинин вируса гриппа вызывает гибель эндотелиальных клеток только по некротическому пути.

Показано угнетение метаболизма клеток эндотелия как цельным вирусом гриппа типа А, так и его поверхностными белками, что регистрировалось по изменению активности внутриклеточных дегидрогеназ.

Выявлена активация процесса фибринолиза (увеличение активности тканевого активатора плазминогена) под влиянием вируса гриппа и его поверхностных белков в клетках эндотелия человека *in vitro* (на модели клеточной культуры EAhy926) и *in vivo* (в эуглобулиновой фракции крови крыс). Можно предположить, что механизмом активации процесса фибринолиза может служить мимикрия аминокислотных последовательностей тканевого активатора плазминогена в структуре гемагглютинина и нейраминидазы.

Теоретическая и практическая значимость работы. Возможность репродукции вируса гриппа типа А в клетках эндотелия человека как *in vitro*, так и *in vivo* имеет большое значение для практической медицины, так как открывает новый аспект патогенеза гриппозной инфекции. Показано, что репродукция вируса гриппа приводит к изменению морфологии клеток эндотелия, к угнетению метаболизма, развитию апоптоза и активации тканевого активатора плазминогена. Все перечисленные критерии указывают на то, что гриппозная инфекция приводит к прямому повреждению эндотелиальных клеток, которое выражается в развитии дисфункции. Все эти данные согласуются с клинической картиной при гриппозной инфекции.

Таким образом, впервые показана важная роль клеток эндотелия в патогенезе гриппозной инфекции. Полученные данные указывают на необходимость комплексной терапии при гриппе, а также открывают новые подходы в разработке противогриппозных препаратов. Кроме того, становится очевидным, что развитие дисфункции эндотелия при гриппозной инфекции может привести к развитию сердечно-сосудистой патологии в виду ежегодных эпидемий гриппа.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту:

1. Вирус гриппа типа А способен репродуцироваться в клетках эндотелия кровеносной системы человека.
2. Вирус гриппа типа А и его поверхностные белки вызывают дисфункцию эндотелиальных клеток, которая выражается:
 - а) в развитии апоптоза.
 - б) в угнетении метаболизма эндотелиальных клеток;

в) в активации процесса фибринолиза путем увеличения активности тканевого активатора плазминогена.

3. Поверхностные белки вируса гриппа типа А – гемагглютинин и нейраминидаза – также вызывают развитие дисфункции эндотелия по тем же параметрам, что и цельный вирус гриппа.

Личный вклад автора. Автором выполнен основной объем работ по всем разделам диссертации: изучению репродукции вирусов гриппа, выявлению активности каспазы-3, исследованию дыхательной активности и апоптоза, изучению активности активатора плазминогена в клетках эндотелия. Автором проведен анализ использованной литературы и полученных данных; подготовлены материалы по основным публикациям; сформулированы выводы диссертации.

Внедрение результатов работы. Все исследования входили в плановую научную тематику лаборатории молекулярной вирусологии и генной инженерии ФГБУ НИИ гриппа МЗ РФ.

Материалы исследования используются в учебном процессе в курсе тематического усовершенствования, сертификационном курсе и курсе профессиональной переподготовки по специальности «Вирусология» на базе кафедры медицинской микробиологии ГБОУ СЗГМУ им.И.И.Мечникова.

Апробация работы. Материалы диссертационной работы представлены на Международной конференции «Развитие научных исследований и надзор за инфекционными заболеваниями» Санкт-Петербург 2010г.; Четвертой научно-практической конференции «Актуальные вопросы инфекционной патологии» Санкт-Петербург 2010г.; Всероссийской научно-практической конференции по медицинской микробиологии и клинической микологии(XV Кашкинские чтения) Санкт-Петербург 2012 г.; Юбилейной научно-практической конференции «Грипп: эпидемиология, вирусология и лечение» Санкт-Петербург, 2012г.; Всероссийской научно-практической конференции по медицинской микробиологии и клинической микологии(XVI Кашкинские чтения) Санкт-Петербург 2013 г.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 13 работ, из них - 6 статей в журналах, рекомендованных ВАК.

Структура и объем диссертации. Объем работы составляет 183 страницы машинописного текста, включая 6 таблиц и 31 рисунок. Список литературы из 328 наименований, из них 49 отечественных и 279 зарубежных.

Основные результаты, изложенные в диссертации, получены в соавторстве с Жилинской И.Н., Прочухановой А.Р., Ильинской Е.В., Сироткиным А.Н., Козловой Н.М., Еропкиной Е.М., Царевой Т.Р. и Сорокиным Е.В. - сотрудниками ФГБУ НИИ гриппа РАМН МЗ РФ; Ляпиной Л. А. и Оберган Т.Ю. – сотрудниками кафедры защитных систем крови МГУ, Москва; Харченко Е.П. - сотрудником Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М.Сеченова РАН; Люблинской О.Г. и Зениным – сотрудниками Института цитологии РАН.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Вирусы. Исследовали три штамма вируса гриппа: 1) Эпидемический штамм вируса гриппа человека А/Брисбейн/10/2007 (H3N2);

2) реассортантный штамм вируса гриппа птиц А/кураца/Курган/5/05 NS1-81/5:3(H5N1). Этот штамм получен методом обратной генетики в лаборатории молекулярной вирусологии и геной инженерии НИИ гриппа; геном включает следующие гены: а) полимеразы PB2 и PA, нуклеопротеин (NP), неструктурные белки (NS) – от вируса А/PR/8/34(H1N1); полимеразы PB1 – от вируса А/Техас/1/77 (H3N2); б) гемагглютинин (HA) от дикого штамма А/кураца/Курган/5/05 (H5N1), модифицированный по сайту расщепления; в) нейраминидаза (NA) и мембранные белки (M) - от дикого вируса птиц А/кураца/Курган/02/05 (H5N1);

3) Пандемический штамм А/Санкт-Петербург/2/2009(H1N1) pdm 09. Все вирусы получены из лаборатории эволюционной изменчивости вирусов гриппа.

Клеточные культуры. Репродукция вируса гриппа изучалась на культуре клеток эндотелия человека EAhy926, любезно предоставленной д-ром Корой Джин Эйджел из Отдела патологии университета Северной Каролины. 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, культивируемая по общепринятой методике. Заражение клеточного монослоя проводили путем адсорбции вируса при 37° С в атмосфере 5% CO₂ (инкубатор фирмы SANYO, Япония) в поддерживающей среде DMEM, содержащей 2 мкг/мл трипсина ТРСК («Sigma»). Через час после адсорбции клетки отмывали и инкубировали в той же среде в течении 72 часов.

Инфекционную активность вируса гриппа в культуре клеток определяли титрованием вирусосодержащего материала в суточной культуре EAhy926 и суточной культуре MDCK с коэффициентом разведения 10 и рассчитывали по методу Reed & Muench (1938). Инфекционную активность вирусов оценивали по ТЦД₅₀ и в РГА с куринными эритроцитами по общепринятому методу через 72 часа после заражения.

Полимеразная цепная реакция. *Выделение вирусной РНК* проводили с использованием наборов для выделения нуклеиновых кислот РИБО-сорб ЦНИИ эпидемиологии, Москва, РФ (модификация метода Boom R. et al., 1990), согласно инструкции производителя. *Синтез кДНК* проводился с использованием двух праймеров: универсального для всех сегментов вируса гриппа А - 12-членного праймера, комплементарного 5'-концу вирионной РНК(IAUPF), и универсального для всех сегментов вируса гриппа А - 13-членного праймера комплементарного 5'-концу матричной РНК(IAUPR). ПЦР проводили на амплификаторе Rotor Gene 6000. Анализ данных проводили прямым сравнением значений Ct.

Электронно-микроскопический анализ клеточной культуры EAhy926, интактной и инфицированной вирусом гриппа А (доза заражения вирусом 0,01 ТЦД₅₀/кл, время репродукции вируса 24 часа), был выполнен на микроскопе JEM-1011. Клетки фиксировали в 2% глютаральдегиде на 0,1М какодилатном буфере (рН 7,4) в течение часа при комнатной температуре, постфиксировали в 1% четырехокиси осмия на том же буфере в аналогичных температурных условиях. Материал обезвоживали в этаноле восходящей концентрации и заключали в смесь эпона и аралдита. Ультратонкие срезы изготавливали на ультратоме LKB-100.

Иммуногистохимический анализ аутопсийного материала легких, мозга и сердца от пациентов, умерших в эпидемию 2009-2010гг., был предоставлен Ленинградским областным патологоанатомическим бюро г. Санкт-Петербурга. Анализиро-

вали ткани легких методом иммуногистохимии с моноклональными антителами (МКА) к гемагглютнину (НА) и нуклеопротеину (NP) вируса гриппа и выявляли их с помощью системы визуализации фирмы Novolink (Novocastra), включающей в себя реакцию с ДАБ-хромогеном.

МКА к НА вируса гриппа H1N1pdm09 и к NP белку вируса гриппа А были получены в лаборатории биотехнологии диагностических препаратов НИИ гриппа. В качестве контроля был использован аутопсийный материал от пациентов, умерших с признаками прогрессирующей легочной дисфункции и явлениями острого респираторного дистресс-синдрома, не имевших диагноза «грипп».

Выделение белков вируса гриппа. Гемагглютинин (НА) и нейраминидазу (NA) выделяли из сконцентрированного и очищенного вируса гриппа. С этой целью вирусы ресуспендировали в Na-ацетатном буфере (50 mM ацетат Na, 2 mM NaCl, 0,2 mM EDTA; pH 7,0) и разрушали 7% октилглюкозидом в течение 2 ч при 4°C. Затем материал центрифугировали при 15000 об/мин в течение 1 ч (ротатор Beckman SW50.1). К супернатанту, содержащему НА и NA, добавляли 2 %-ный водный раствор бромида цетримония (СТАВ, Sigma) до конечной концентрации 0.1%. Образец наносили на анионообменную колонку (1x3 см; сорбент DEAE-Sephadex A-50; Pharmacia Fine Chemicals), предварительно уравновешенную стартовым буфером (50 mM Tris-HCl, 0.1% октилглюкозид; pH 7 для штамма А/курица/Курган/05/2005 и тот же буфер pH 7.5 для штамма А/Брисбейн/10/2007). NA элюировали 20 мл стартового буфера, НА - 20 мл элюирующего буфера (50 mM Tris-HCl, 0.5M 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 осуществлялся при помощи электрофореза в полиакриламидном геле по методу Лэммли с последующим анализом гелей на денситометре GS-800 (Bio-Rad Laboratories).

МТТ-тест. Метаболизм клеток эндотелия оценивали с помощью МТТ-теста на общую активность внутриклеточных дегидрогеназ, который широко используется для биохимической оценки выживаемости клеток в культуре [Mossman T.,1983]. Метод основан на восстановлении диметилтиазолил-дифенилбромид тетразолия митохондриальными и цитоплазматическими дегидрогеназами метаболически активных клеток.

Клетки EAhy926 вносили в 96 луночные планшеты в концентрации 32000кл/лунку в 100 мкл культуральной среды. На следующий день клетки либо заражали вирусами по общепринятой методике, либо обрабатывали поверхностными белками исследуемых вирусов в разной концентрации и с разным временем 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 часа в CO₂-инкубаторе. Затем раствор красителя сливали и заменяли на 96⁰ спирт на 30 минут. Далее планшеты помещали в спектрофотометр Thermofisher VarioScan и снимали показания при длине волны 540 нм.

Иммуногистохимическое определение активности каспазы-3. Суточный монослой клеток EAhy926 был выращен на предметных стеклах, предварительно покрытых полилизинном. Затем клетки либо заражали вирусами по общепринятой методике, либо обрабатывали поверхностными белками исследуемых вирусов в разной концентрации и с разным временем экспозиции. Зараженные и контрольные клетки на предметных стеклах фиксировали смесью ацетон:этанол (1:1), после чего их обрабатывали с помощью набора для выявления МКА к каспазе-3 (фирма Novocastra). Визуализацию первичных антител проводили вторичными антителами, конъюгированными с полимером, сцепленным с пероксидазой (фирма Novolink). Далее следовала окраска ДАБ хромогеном и подкрашивание ядер гематоксилином Майера.

Оценка процессов апоптоза методом проточной цитометрии. 2 500 000 эндотелиальных клеток вносили в лунки 6-ти луночного планшета (Sarstedt, Австрия). Суточный монослой клеток либо заражали вирусами по общепринятой методике, либо обрабатывали поверхностными белками исследуемых вирусов в разной концентрации и с разным временем экспозиции, после чего производили дезинтеграцию монослоя в 0,02% растворе ЭДТА (Биолот, РФ) и переносили клеточную суспензию в микропробирки. Для определения количества клеток в состоянии и апоптоза использовали FITC Annexin V kit 1 (BD Biosciences, США). Аннексин V позволяет выявить экспрессию фосфатидилсерина на наружной поверхности мембраны и, таким образом, отделить нормальные жизнеспособные клетки от апоптотических. Эндотелиальные клетки окрашивали аннексином V согласно инструкции производителя. Анализ образцов произ-

водили с помощью проточной цитометрии на приборе Epics XL (Bectan Coulter, США), снабженном аргоновым лазером с длиной волны 488 нм. Опыт производили в трех повторностях, количество клеток в состоянии некроза и апоптоза выражали в процентах от общего количества анализируемых клеток.

Активность активатора плазминогена (t-РА) определяли по методу Кудряшова и сотр.(1974). Активность t-РА *in vitro* определяли в суточном монослое клеток EAhy926, которые либо заражали вирусами по общепринятой методике, либо обрабатывали поверхностными белками исследуемых вирусов в разной концентрации и с разным временем экспозиции. Зараженные и контрольные клетки замораживали при -20°C . После оттаивания суспензию наносили на стандартные фибриновые пластины (непрогретые и прогретые при 86°C в течение 30 мин). Далее пластины инкубировали при 37°C в течение 20-24 ч и регистрировали результаты по разнице площадей зон лизиса на непрогретых и прогретых пластинах. Разница площадей зон лизиса характеризует величину активности t-РА. Активность t-РА *in vivo* определяли в эуглобулиновой фракции плазмы крови белых беспородных крыс на стандартных фибриновых пластинах.

Поиск мимикрических последовательностей аминокислот в структуре вирусных белков и t-РА осуществляли с помощью компьютерных программ.

Статистическую обработку данных проводили с применением программного обеспечения Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЕ

Репродукция исследуемых штаммов вируса гриппа типа А в эндотелиальных клетках.

Инфекционная активность вируса гриппа типа А в культуре клеток

EAhy926 Для оценки возможности репродукции вируса гриппа типа А (подтипов H3N2 H5N1 и H1N1pdm 09), культуру клеток эндотелия инфицировали вирусами в дозах 0,01 ТЦД₅₀/кл, 0,001 ТЦД₅₀/кл и 0,0001 ТЦД₅₀/кл. Инфекционную активность вирусов оценивали по ТЦД_{50/мл} и в реакции гемагглютинации (РГА) с куриными эритроцитами (таблица 1).

Как видно из таблицы 1, все исследуемые вирусы были способны репродуцироваться в клеточной культуре EAhy926. Так, через 24 часа после заражения, инфекционная активность вирусов А/Брисбейн/10/2007(Н3N2) и

Таблица 1

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

Вирусы гриппа	Инфекционный титр вируса (lg ТЦД ₅₀ /мл).						Титр в РГА (1% куриные эритроциты).					
	EAhy926			MDCK			EAhy926			MDCK		
Время, после заражения (ч).	24	48	72	24	48	72	24	48	72	24	48	72
А/Брисбейн/10/2007 (Н3N2)	2,3	3,4	3,50	4,12	5,0	5,2	1/32	1/64	1/128	1/256	1/1024	1/1024
А/Курган/5/05/NS1-81/5:3 (Н5N1)	2,4	3,4	3,48	4,03	4,23	4,55	1/16	1/64	1/64	1/64	1/128	1/128
А/Санкт-Петербург/2/2009 (Н1N1) pdm 09	3,5	4,0	4,16	4,8	5,3	5,5	1/32	1/128	1/128	1/64	1/128	1/256

А/Курган/5/05/NS1-81/5:3 (Н5N1) составляла 2,3 и 2,4 lg ТЦД₅₀/мл соответственно. Инфекционный титр вируса А/Санкт-Петербург/2/2009 (Н1N1) pdm 09 был несколько выше – 3,5 lg ТЦД₅₀/мл. Титр вирусов в культуральной жидкости в РГА составлял 1/16 для вируса А/Курган/5/05/NS1-81/5 :3 (Н5N1) и 1/32 для вирусов А/Брисбейн/10/2007(Н3N2) и А/Санкт-Петербург/2/2009 (Н1N1)pdm 09.

Через 48 часов после инфицирования клеток исследуемыми вирусами, их инфекционная активность возрастала на 0,5-1,0 lg ТЦД₅₀/мл. Гемагглютинирующая активность вирусов также возрастала до 1/64-1/128. Культивирование вирусов гриппа в клетках эндотелия в течение 72 часов приводило к увеличению инфекционной активности вируса, приблизительно на 1 lg ТЦД₅₀/мл, по сравнению с культивированием вируса в течение 24 часов и, приблизительно, на 0,5 lg ТЦД₅₀/мл – в течении 48 часов.

Необходимо отметить, что инфекционный титр вируса в клетках эндотелия и титр их в РГА был ниже, чем в культуре клеток MDCK, которая является перmissive культурой для вируса гриппа (таблица 1). Так инфекционная активность всех трех исследуемых вирусов в клетках EAhy926 была на 1,5 – 2 lg ТЦД₅₀/мл ниже, чем в

клетках MDCK, а их гемагглютинирующая активность в 2 – 4 раза меньше чем в MDCK. Возможно, это объясняется особенностями физиологии эндотелиальных клеток.

Выявление РНК, исследуемых вирусов, в культуре клеток EAhy926. Для подтверждения возможности репродукции исследуемых вирусов в эндотелиальных клетках линии EAhy926 была проведена ОТ-ПЦР. Эндотелиальные клетки были инфицированы исследуемыми вирусами (заражающая доза 0,01 ТЦД₅₀/кл), и через 24 часа после заражения были разрушены замораживанием и оттаиванием. Постановка ПЦР в реальном времени подтвердила наличие синтеза и вирусной РНК (вРНК), и матричной РНК (мРНК) в эндотелиальных клетках, инфицированных вирусом гриппа человека и птиц.

Выявление вирусных частиц исследуемых штаммов вируса гриппа, в культуре клеток EAhy926 электронно – микроскопическим методом. Был также проведен электронно-микроскопический анализ культуральной среды инфицированных клеток. Культуральная среда отбиралась через 24 часа после инфицирования культуры клеток исследуемыми вирусами (заражающая доза 0,01 ТЦД₅₀/кл). На электронограмме были получены снимки полноценных вирусных частиц вируса гриппа А/Санкт-Петербург/2/2009 (H1N1) pdm09. Аналогичная картина была характерна для вирусов А/Брисбейн/10/2007(H3N2) и А/Курган/5/05/NS1-81/5:3 (H5N1).

Иммуногистохимическое исследование аутопсийного материала от больных, умерших в эпидемию гриппа 2009-2010 гг. Репродукция вируса гриппа типа А в клетках эндотелия кровеносных сосудов человека *in vivo* была зарегистрирована при исследовании аутопсийного материала легких, пациентов, умерших в эпидемию 2009-2010 гг. Исследование проводили иммуногистохимически с помощью МКА к гемагглютнину(НА) и нуклеопротеину(NP) вируса гриппа типа А.

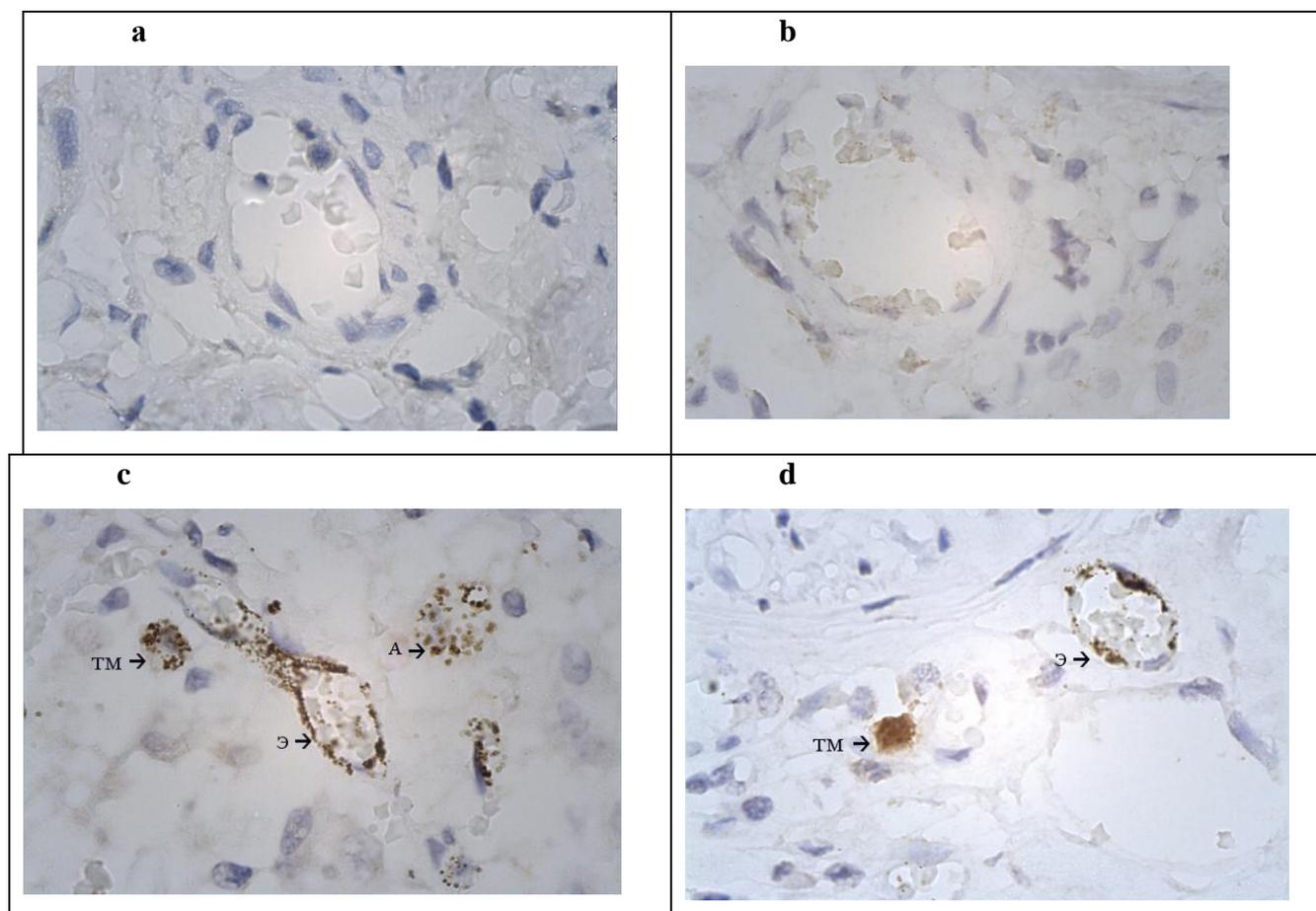


Рисунок 1. Иммуногистохимический анализ локализации HA и NP вируса гриппа А (H1N1) pdm 09 в аутопсийном материале легких пациентов.

а, б – интактные клетки; с – локализация HA в клетках: эндотелия сосудов, альвеолярного эпителия, тканевых макрофагах ;d – локализация NP в клетках эндотелия сосудов и в тканевых макрофагах. Обозначения: Э-эндотелий; А-альвеолярный эпителий; ТМ-тканевой макрофаг. Увеличение 100X с иммерсией; окрашивание клеток ДАБ-хромогеном с последующей окраской гематоксилином Майера.

Как видно из рисунка 1(с), был выявлен HA вируса гриппа H1N1 pdm 09, который локализовался на плазматической мембране и в цитоплазме клеток эндотелия мелких кровеносных сосудов, клеток альвеолярного и бронхиолярного эпителия и внутри альвеолярных и тканевых макрофагов. Это видно по коричневому окрашиванию ДАБ-хромогена, которое отсутствует в интактных клетках. NP антиген этого вируса регистрировался в тех же клетках и тканях, что и HA, но был локализован в ядрах клеток, что отражает особенности репродукции вируса гриппа (рис.1d).

Таким образом, данные полученные вирусологическим, молекулярно-биологическим, электронно-микроскопическим и иммуногистохимическим методами, указывают на то, что исследуемые штаммы вируса гриппа типа А репродуцируются в

клетках эндотелия человека как *in vitro*, так и *in vivo*. В связи с этим представляло интерес оценить возможные последствия репродукции вируса гриппа в клетках эндотелия.

Дисфункция клеток эндотелия при воздействии исследуемых вирусов гриппа и их поверхностных белков

Электронно-микроскопический анализ морфологии клеточной культуры эндотелия, инфицированной вирусом гриппа типа А. При электронно-микроскопическом анализе морфологии клеток, инфицированных исследуемыми штаммами вируса гриппа, отмечалось увеличение количества диктиосом и расширение цистерн аппарата Гольджи, а также увеличение количества цистерн шероховатого эндоплазматического ретикулума. Кроме этого, в инфицированных клетках регистрировалось увеличение количества миелоидных телец. Все это указывает на изменение морфологии эндотелиальных клеток зараженных вирусом гриппа.

Изменение дыхательной активности клеток эндотелия при воздействии исследуемых вирусов гриппа. Дыхательную активность клеток эндотелия изучали по активности дегидрогеназ (митохондриальных и цитоплазматических) с помощью МТТ-теста. С этой целью клетки инфицировали вирусом гриппа и измеряли суммарную дегидрогеназную активность (ДГА) в период от 0 до 72 часов, при двух дозах заражения - 0,01 ТЦД₅₀/кл и 0,001 ТЦД₅₀/кл.

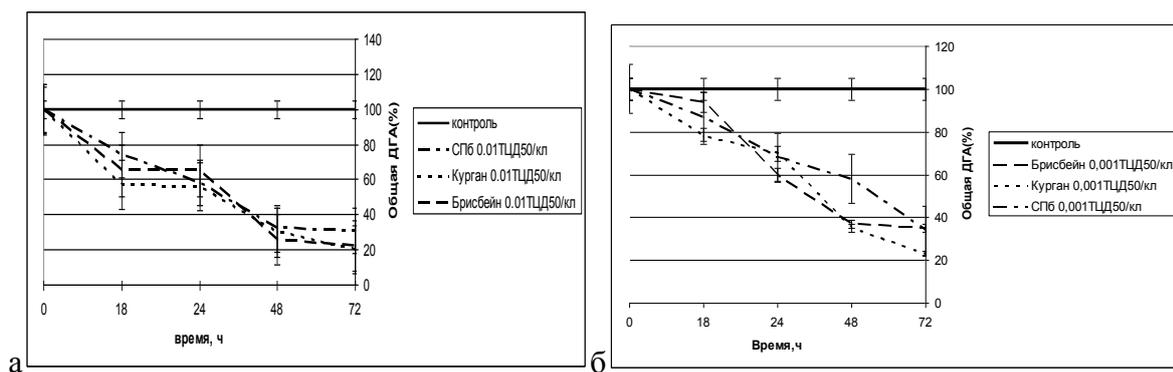


Рисунок 2. Изменение общей дегидрогеназной активности в культуре клеток EAh926 при воздействии исследуемых вирусов гриппа типа А:

а – Доза заражения вирусами 0,01 ТЦД₅₀/кл; б - Доза заражения вирусами 0,001 ТЦД₅₀/кл
 Брисбейн – вирус гриппа А/Брисбейн/10/2007 (H3N2); Курган – вирус гриппа А/курица/Курган/5/05 NS1-81/5:3(H5N1); СПб – вирус гриппа А/Санкт-Петербург/2/2009 (H1N1)pdm 09; p<0,05

Из рисунка 2 видно, что снижение общей ДГА при заражении вирусом в дозе 0,01 ТЦД₅₀/кл значительно превосходило тот же показатель при меньшей дозе зараже-

ния 0,001ТЦД₅₀/кл и зависело от времени репродукции вируса. Так, через 18 часов после заражения, метаболизм клеток снижался, в среднем, на 40% при дозе 0,01ТЦД₅₀/кл и на 20% при дозе 0,001ТЦД₅₀/кл. Через 48 часов метаболизм клеток снижался на 70% при дозе 0,01ТЦД₅₀/кл и на 40% при дозе 0,001ТЦД₅₀/кл. Существенных различий в активности воздействия трех исследуемых штаммов вируса гриппа типа А не отмечено.

Изменение дыхательной активности клеток эндотелия при воздействии нейраминидазы и гемагглютинина. Для изучения дыхательной активности дегидрогеназ клетки под воздействием поверхностных белков вируса гриппа клетки обрабатывали гемагглютинином и нейраминидазой в концентрациях 10 – 100 мкг/мл в течение от 0 до 72 часов. На рисунке 3 представлены данные о воздействии гемагглютинина на вируса гриппа А/Брисбейн/10/2007(Н3N2) на клетки культуры EAhy926.

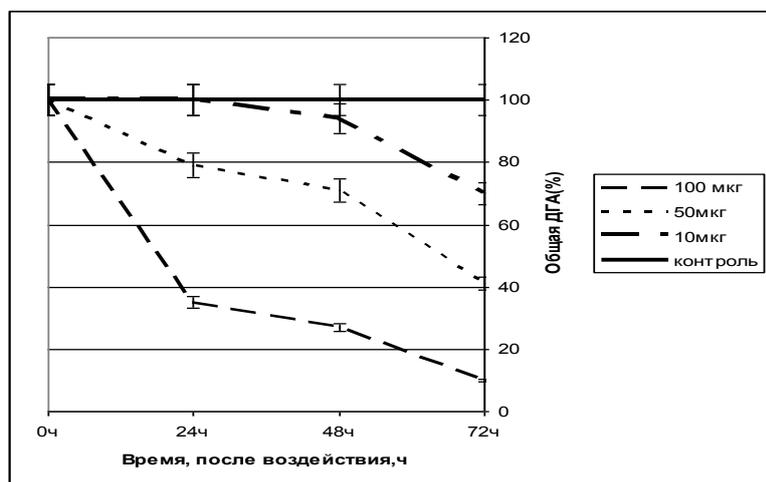


Рисунок 3. Влияние НА вируса гриппа А/Брисбейн/10/2007 (Н3N2);на изменение общей дегидрогеназной активности в культуре клеток EAhy926. $p < 0,05$

Как видно из рисунка 3, через сутки после воздействия НА в концентрации 100 мкг/мл снижение общей ДГА составляло 60%, в концентрации 50 мкг/мл -20%, в концентрации 10 мкг/мл - не выявлено. НА в концентрации 10 мкг/мл оказывал воздействие на клетки только через 48 часов, снижая метаболизм клеток на 5%, и через 72 часа - на 30%. Статистически значимых отличий в активности гемагглютинина исследуемых штаммов вируса не обнаружено.

Воздействие НА на исследуемые клетки графически отражено на рисунке 4. Через 24 часа НА в концентрации 100 мкг/мл вызывала снижение общей ДГА клеток на

60%, в концентрации 50 мкг/мл - на 50% (рис.4). Статистически значимых отличий в активности NA исследуемых штаммов вируса гриппа не обнаружено.

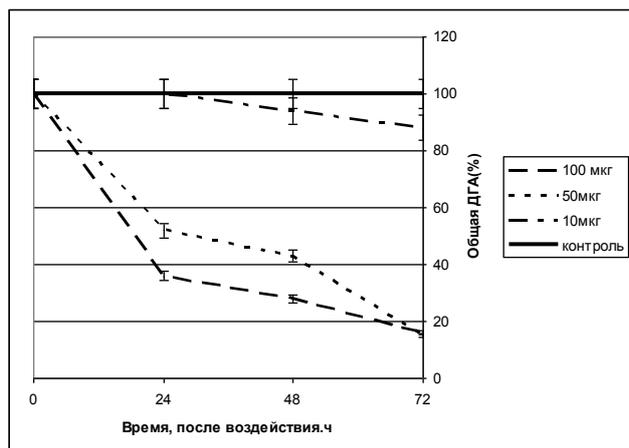


Рисунок 4. Влияние нейраминидазы вируса гриппа А/Брисбейн/10/2007 (H3N2) на изменение общей дегидрогеназной активности в культуре клеток EAhy926. $p < 0,05$

Таким образом, можно говорить о том, что как цельный вирус, так и поверхностные белки (НА и NA) достоверно снижают общую дегидрогеназную активность клеток эндотелия, которая характеризует такие важные аспекты клеточного метаболизма, как процесс клеточного дыхания и продукция АТФ, то есть приводит к развитию гипоксии клетки.

Апоптоз клеток эндотелия под воздействием вирусов гриппа и их поверхностных белков. Апоптоз эндотелиоцитов – ключевой момент в развитии дисфункции эндотелия. В качестве маркеров апоптоза нами были выбраны активация каспазы-3 (регистрировали иммуноцитохимически) и экспозиция фосфатидилсерина с внутреннего слоя мембраны клеток в наружный (регистрировали с помощью проточной цитометрии).

Изучение активации каспазы-3 в клетках эндотелия под воздействием вируса гриппа и его поверхностных белков. Активация каспазы-3 была выявлена на ранней стадии заражения -0,5 – 1,5 часа после воздействия вируса и не зависела от заражающей дозы (0,01 ТЦД₅₀/кл, 0,001 ТЦД₅₀/кл,) и подтипа вируса. Исследуемые штаммы вируса гриппа активировали каспазу-3 уже через 30 минут после инфицирования клеток.

Поверхностные белки вирусов гриппа также активировали каспазу-3 через 30 минут после воздействия их на клетки эндотелия. Сравнительный анализ активации

каспазы-3 белками показал, что при тех же сроках воздействия (0,5 – 1,5 часа) минимальная концентрация НА, вызывавшая активацию, была в 10 раз меньше, чем концентрация НА (0.1 мкг/мл и 1 мкг/мл соответственно).

Исследование апоптоза и эндотелиальных клеток под воздействием исследуемых вирусов гриппа. Эндотелиальные клетки инфицировали исследуемыми вирусами гриппа в дозе 0,01ТЦД₅₀/кл и анализировали с помощью проточной цитометрии. Как видно из рисунка 5 б (правый нижний квадрат), количество аннексин V положительных клеток к 6 часам достигало 6,41% - для вируса гриппа H5N1 по сравнению с контролем (Рис.5 а), 4,8% - для H1N1pdm 09 и H3N2, а затем снижалось и к 10 часам достигало уровня контроля (Рис.5 в).

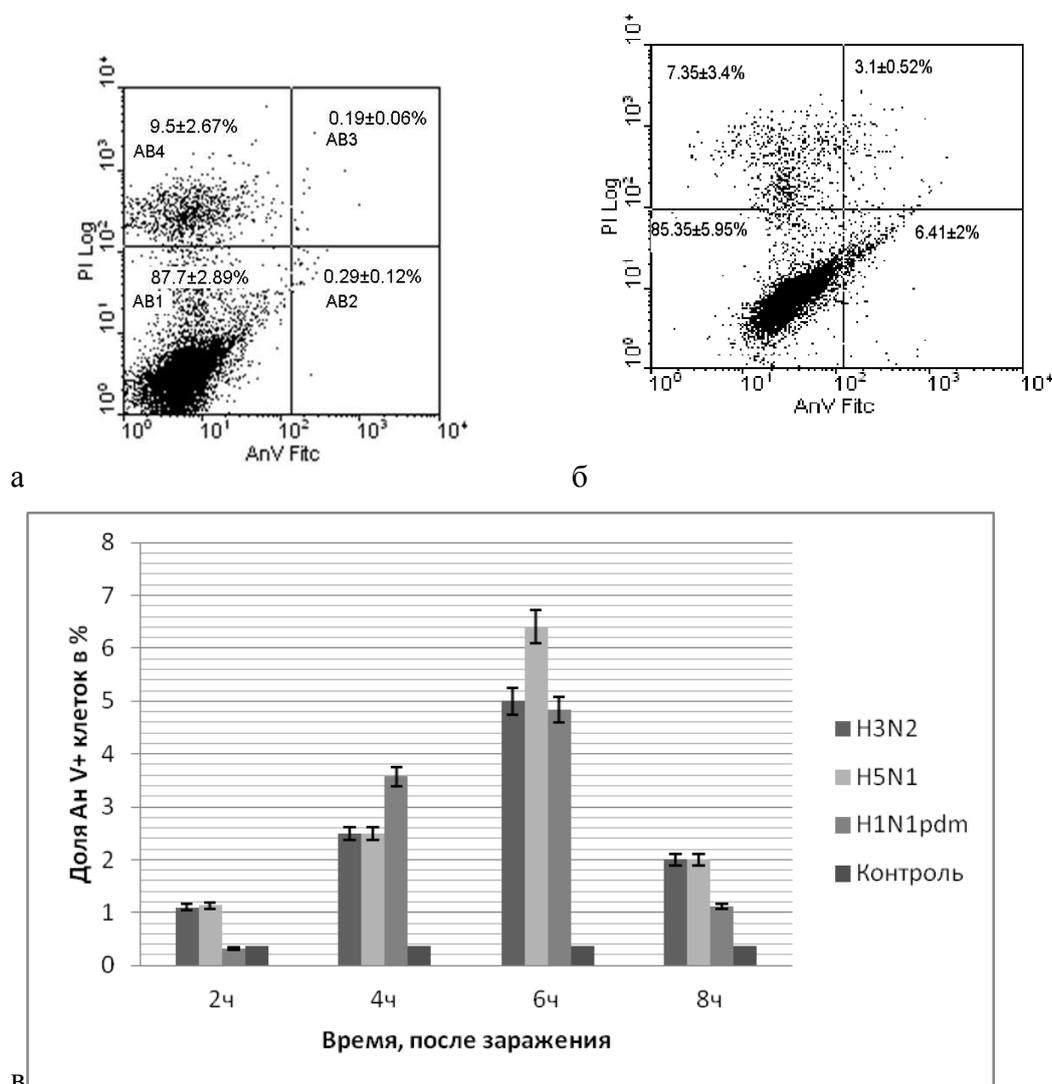


Рисунок 5. Интенсивность апоптоза в культуре клеток EAh926 после инфицирования исследуемыми штаммами вируса гриппа типа А.

а – доля клеток (% от общего количества анализируемых клеток) в состоянии апоптоза в контроле;
 б – после 6 часов культивирования с вирусом гриппа А/Курган/5/05/NS1-81/5:3 (H5N1), заражающая

доза 0,01ТЦД₅₀/кл; в - гистограмма, отражающая количество аннексин V положительных клеток в зависимости от времени воздействия вируса; по результатам 3-х независимых экспериментов представлены средние значения (M±s); p<0.01

Исследование апоптоза эндотелиальных клеток под воздействием нейраминидазы вируса гриппа. Все NA исследуемых штаммов вируса гриппа в концентрации, равной 10 мкг/мл, вызывали экспозицию фосфатидилсерина через 4-8 часов после воздействия (Рис.6).

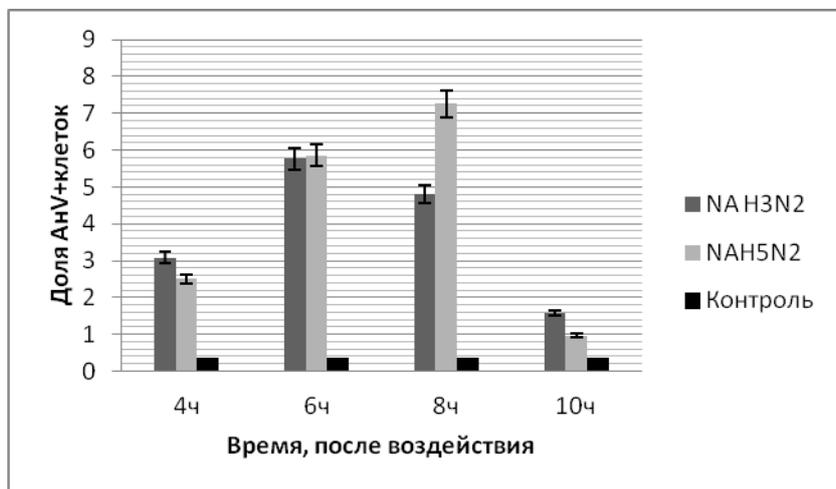
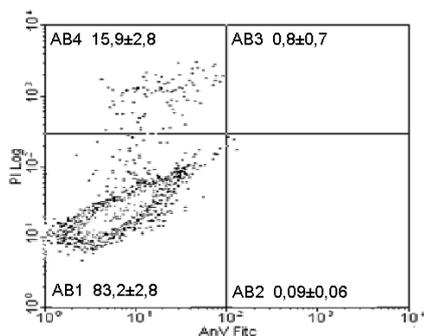


Рисунок 6. Изменение количества аннексин V положительных клеток в зависимости от времени воздействия NA исследуемых штаммов вируса в концентрации 10мкг/мл.

По горизонтали – время воздействия белка, по вертикали – среднее значение количества аннексин V положительных клеток (в %); представлены средние значения (M±s) по результатам 3-х независимых экспериментов, p<0.01

Исследование апоптоза эндотелиальных клеток под воздействием гемагглютинирина вируса гриппа. Количество аннексин V положительных клеток при воздействии гемагглютинирина исследуемых штаммов вируса гриппа на разных сроках воздействия (4,6,8,10 часов) и с использованием различных концентраций гемагглютинирина (50 мкг/мл, 25 мкг/мл) не превышало таковое в контроле (Рис.7 б) Как видно из рисунка 7 а НА вируса А/Санкт-Петербург/2/2009 (H1N1)pdm 09 в концентрации 50 мкг/мл через 6 часов после воздействия не вызывал появления аннексин V положительных клеток (Рис.7 а, квадрат АВ2).Аналогичная картина регистрировалась для НА вирусов подтипов H5N1 и H3N2.

а



б

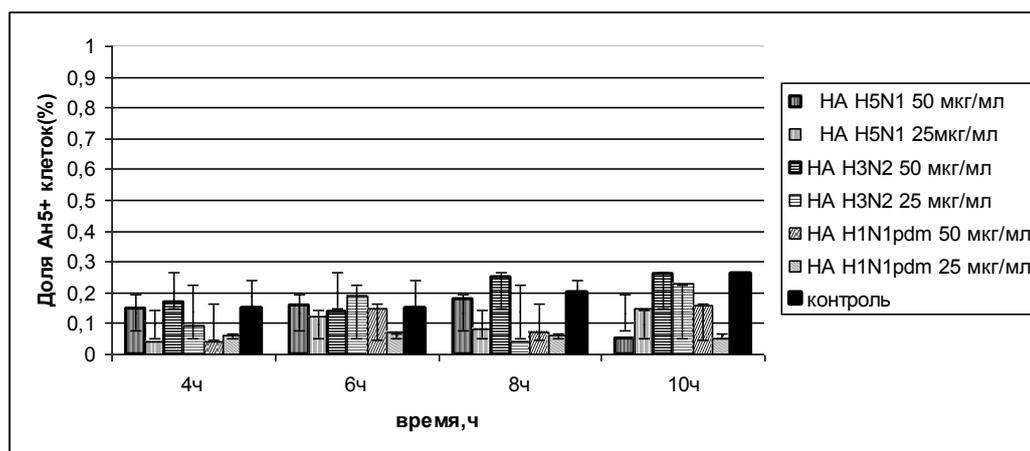


Рисунок 7. Количество аннексин V положительных клеток в зависимости от времени воздействия НА исследуемых штаммов вируса гриппа типа А.

а – гистограмма распределения клеток через 6 часов после воздействия НА вируса гриппа А/Санкт-Петербург/2/2009 (H1N1)pdm 09; б - Количество аннексин V положительных клеток в зависимости от времени воздействия НА исследуемых штаммов вируса в концентрации 50мкг/мл и 25мкг/мл: по горизонтали – время воздействия белка, по вертикали – среднее значение количества аннексин V положительных клеток (в %); представлены средние значения ($M \pm s$) по результатам 3-х независимых экспериментов, $p < 0.01$

Таким образом, только исследуемые штаммы вируса гриппа и их нейраминидаза стимулировали апоптоз эндотелиальных клеток.

Оценка активности тканевого активатора плазминогена под влиянием исследуемых вирусов гриппа типа А и их поверхностных белков Повышение активности тканевого активатора плазминогена (t-РА) имеет большое диагностическое значение, как индикатор развития дисфункции эндотелиальных клеток, так как в норме активатор плазминогена накапливается в эндотелии и выделяется только при активации или повреждении этих клеток.

Активность тканевого активатора плазминогена в эндотелиальных клетках под влиянием исследуемых штаммов вируса гриппа типа А оценивали в суточном

монослой клеток эндотелия EAhy926 через 12, 18, 24 и 48 часов после заражения вирусами гриппа подтипов H5N1, H3N2 и H1N1pdm 09.

Как видно из рисунка 8, вирусы подтипов H5N1 и H1N1pdm 09 стимулировали повышение активности t-PA через 12 часов после заражения - 20 мм² для H5N1 и 14 мм² для H1N1pdm 09 соответственно по сравнению с контролем (10 мм²).

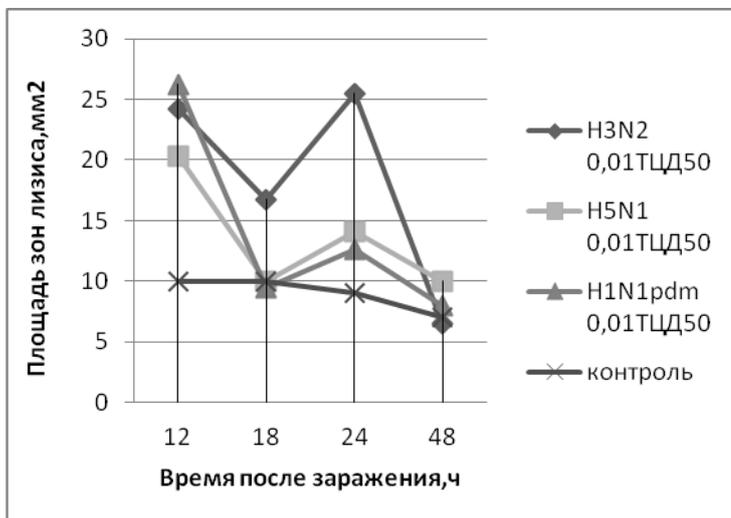


Рисунок 8. Изменение активности t-PA в культуре клеток EAhy926 инфицированных исследуемыми штаммами вируса гриппа типа А (заражающая доза 0,01ТЦД_{50/кл}); p<0,05.

Затем, через 18 часов после заражения клеток вирусом, активность t-PA снижалась до контрольных величин, а к 24 часам снова наблюдался подъем активности t-PA – 15 мм² для H5N1 и 14 мм² для H1N1pdm 09, к 48 часам активность t-PA снижалась до уровня контроля. Несколько иная картина наблюдалась для вируса гриппа подтипа H3N2 (Рис.8). Характер временных изменений активности t-PA оставался тем же, что и для двух других исследуемых штаммов, но значения активности t-PA через 18 и 24 часа, после заражения вирусом, были значительно больше – 17 и 26 мм² соответственно.

Активность тканевого активатора плазминогена в эндотелиальных клетках линии EAhy926 под влиянием гемагглютинаина исследуемых штаммов вируса гриппа типа А Результаты воздействия гемагглютинаина исследуемых штаммов вируса гриппа на активность t-PA представлены на рисунке 9.

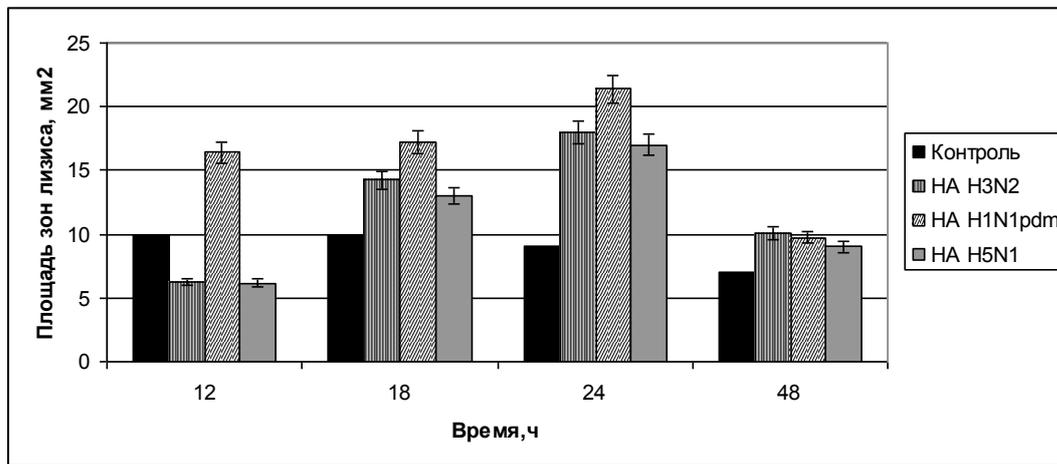


Рисунок 9.Изменение активности t-PA под влиянием HA вируса гриппа типа А в культуре клеток EAhy926;концентрация гемагглютинаина 5 мкг/мл; $p < 0,05$.

HA вируса гриппа А/Брисбейн/10/2007 (H3N2) и А/курица/Курган/5/05 NS1-81/5:3(H5N1) вызывал увеличение активности t-PA только через 18 часов после воздействия – 14 и 13 мм² соответственно по сравнению с контролем(10мм²), к 24 часам активность t-PA возрастала до величин – 18 и 17 мм², а затем снижалась к 48 часам до уровня контроля (Рис.9). HA вируса гриппа А/Санкт-Петербург/2/2009(H1N1)pdm 09 при воздействии на культуру EAhy926 через 12 часов вызывал повышение активности t-PA до значения 17мм²; к 24 часам активность t-PA достигала максимальных значений - 22 мм², к 48 часам активность t-PA при воздействии HA снижалась до контрольных величин (Рис.9).

Активности тканевого активатора плазминогена под влиянием гемагглютинаина исследуемых штаммов вируса гриппа типа А *in vivo* Активность t-PA под влиянием гемагглютинаина исследуемых вирусов изучали *in vivo*, вводя HA в дозе 50 мкг/кг массы тела белым беспородным лабораторным крысам и регистрируя результаты через 10 минут (Рис.10).

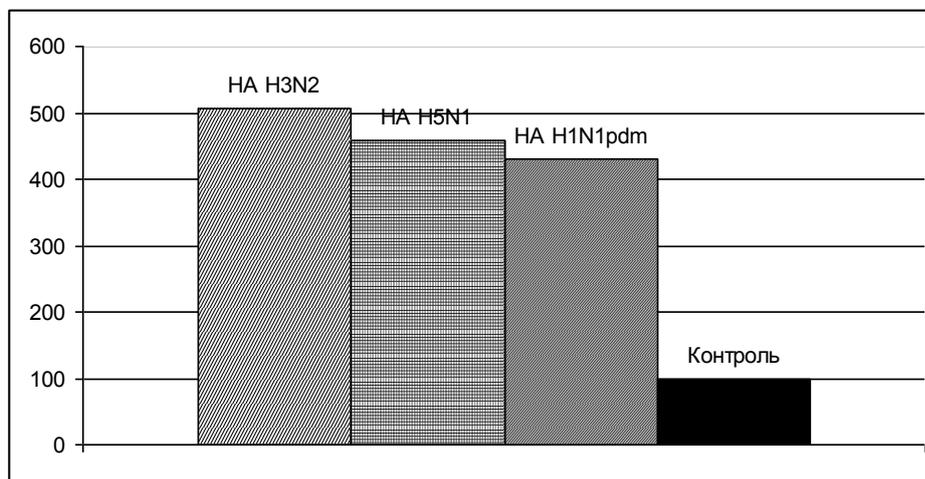


Рисунок 10.Изменение активности t-PA под влиянием гемагглютининов (HA) вирусов гриппа типа A *in vivo* в эглобулиновой фракции крови крыс через 10 минут после внутривенного введения HA в дозе 50мкг/кг массы тела (контроль принят за 100%); $p < 0,01$.

Как видно из рисунка 10 HA вируса A/Санкт-Петербург/2/2009 (H1N1)pdm 09 при внутривенном введении повышал активность t-PA в 4 раза по сравнению с контролем, HA вируса A/курица/Курган/5/05 NS1-81/5:3(H5N1) - в 4,5 раза, а HA вируса A/Брисбейн/10/2007 (H3N2) - в 5 раз по сравнению с контролем.

Активность тканевого активатора плазминогена в эндотелиальных клетках линии EAhy926 под влиянием нейраминидаз штаммов A/Брисбейн/10/2007 (H3N2) и A/курица/Курган/5/05 NS1-81/5:3 (H5N1) Изменения активности t-PA при воздействии нейраминидазы вируса гриппа подтипов H3N2 и H5N1 представлены на рисунке 11.

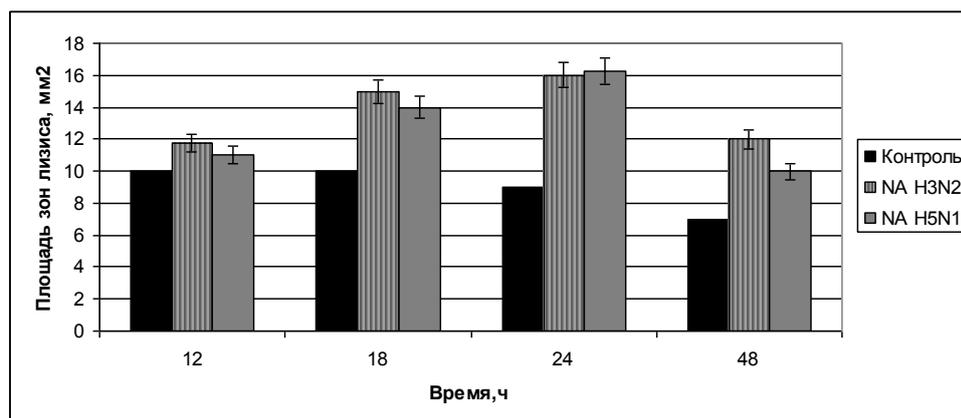


Рисунок 11 Изменение активности t-PA под влиянием нейраминидазы(NA) вируса гриппа типа A подтипов H3N2 и H5N1 в культуре клеток EAhy926.Концентрация нейраминидазы 5 мкг/мл, $p < 0,05$.

Увеличение активности t-PA регистрировалось через 12 часов после воздействия NA вируса гриппа A/Брисбейн/10/2007 (H3N2) на клеточную культу-

ру(12мм²).Наибольшие значения активности t-PA приходились на 18 и 24 часа после воздействия (15 и 16мм² соответственно по сравнению с контролем), к 48 часам уровень активности t-PA снижался до 12 мм² (Рис.11).

Для NA вируса гриппа А/курица/Курган/5/05 NS1-81/5:3 (H5N1) получены сходные данные. Так, через 12 часов после воздействия активность t-PA достигала величины 11 мм², к 18 часам - 14 мм². Максимальное значение активности t-PA после воздействия NA – 16,25 мм². К 48 часам следовало снижение активности t-PA до уровня контроля (Рис.11).

Активности тканевого активатора плазминогена под влиянием нейраминидазы исследуемых штаммов вируса гриппа типа А *in vivo*

Активность t-PA под влиянием NA вируса гриппа подтипа H3N2 изучали *in vivo*, вводя NA в дозе 50 мкг/кг массы тела белым беспородным лабораторным крысам и регистрируя результаты через 10 минут. Изменения активности t-PA представлены на рисунке 12.

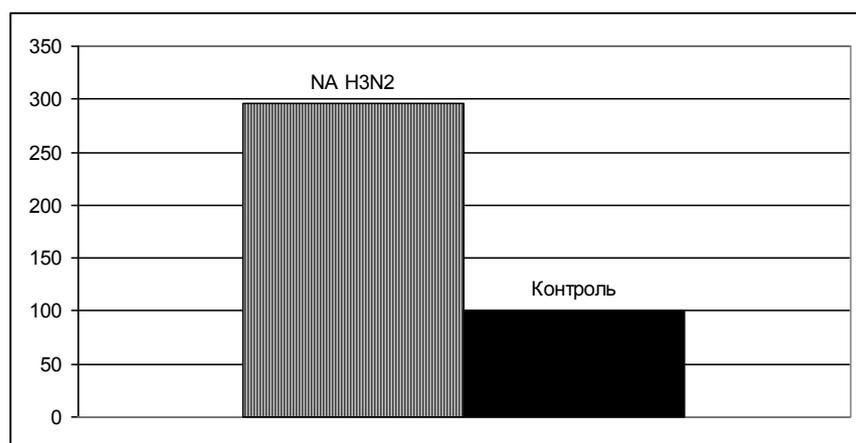


Рисунок 12 Изменение активности t-PA под влиянием нейраминидазы(NA) вируса гриппа типа А подтипа H3N2 *in vivo* в эуглобулиновой фракции крови крыс через 10 минут после внутривенного введения NA в дозе 50мкг/кг массы тела (контроль принят за 100%); p<0,01.

Нейраминидаза вируса гриппа А/Брисбейн/10/2007 (H3N2), введенная внутривенно в кровь крыс, через 10 минут после введения вызывала подъем активности t-PA, превышающее контрольные значения в 3 раза (Рис.12).

Таким образом, как сами исследуемые вирусы, так и их поверхностные белки стимулировали активность тканевого активатора плазминогена как в культуре клеток, так и *in vivo*.

Сравнение последовательностей аминокислот тканевого активатора плазминогена и поверхностных белков вирусов гриппа подтипов H5N1, H3N2 и H1N1pdm 09. В структуре всех исследованных белков вируса гриппа обнаружены последовательности аминокислот, мимикрирующие последовательности аминокислот тканевого активатора плазминогена. Так, гемагглютинин вируса гриппа А/Санкт-Петербург/2/2009(H1N1)pdm 09 имеет четыре аминокислотные последовательности (65-75 ак; 150-158 ак; 338-347 ак; 338-346 ак) сходных с аминокислотной последовательностью активатора плазминогена, обозначаемой как «крингл 2» и четыре аминокислотные последовательности (119-129 ак; 343-353 ак; 539-547 ак; 503-512 ак) сходных с аминокислотной последовательностью активатора плазминогена, обозначаемой как домен «трипсин – подобная сериновая протеаза» - пептидаза S1. При этом процент идентичных аминокислот был достаточно значимым – от 45 до 63%, процент взаимозаменяемых аминокислот составлял от 18 до 36%. Эти данные аналогичны данным, полученным нами ранее, при сравнении первичной структуры гемагглютининов вируса гриппа H5N1 и H3N2 с последовательностью аминокислот тканевого активатора плазминогена [Жилинская и др., 1996].

Аналогичную картину наблюдали и при сравнении мимикрических последовательностей в структуре нейраминидазы. Нейраминидаза вируса гриппа H1N1pdm 09 имеет три аминокислотные последовательности (324-337 ак; 355-372 ак; 360-372 ак) сходные с аминокислотной последовательностью t-РА, обозначаемой как «пептидаза S1», четыре последовательности (248-263 ак; 229-237 ак; 250-258 ак; 280-288 ак) сходные с аминокислотной последовательностью t-РА, обозначаемой как «крингл 2» и участок аминокислотной последовательности 228-237 ак сходный по первичной структуре с участком активатора плазминогена, соответствующим эпидермальному фактору роста (ЭФР-домен). Эти данные аналогичны данным полученным нами ранее по сравнению первичных структур нейраминидаз вирусов гриппа H5N1 и H3N2 с последовательностью аминокислот тканевого активатора плазминогена [Жилинская и др., 1996].

ВЫВОДЫ

1). Установлено, что все три исследованные штамма вируса гриппа типа А, подтипов H3N2, H5N1 и H1N1pdm 09, репродуцируются в культуре клеток эндотелия кровенос-

ных сосудов человека. *In vivo*, репродукция вируса гриппа была подтверждена по наличию антигенов (НА и NP) в эндотелии аутопсийного материала легких, сердца и мозга больных, умерших в эпидемию 2009-2010гг.

2) Исследованные штаммы вируса гриппа типа А, подтипов H3N2, H5N1 и H1N1pdm 09, вызывают угнетение метаболизма клеток эндотелия до 40% в первые сутки после инфицирования клеток и до 70% на вторые сутки. Воздействие поверхностных белков исследованных штаммов вируса гриппа А, (НА и NA) также приводит к снижению метаболизма клеток эндотелия. Наиболее активным белком в этом тесте является NA, которая подавляет метаболизм клеток, в среднем, на 50%, тогда как НА - на 20%.

3) Вирус гриппа типа А стимулирует активацию каспазы-3 в культуре клеток эндотелия EAhy926 на ранней стадии их инфицирования вирусом. НА и NA также стимулируют активацию каспазы-3 в клетках эндотелия. При этом NA активирует каспазу-3 в концентрации в 10 раз меньшей, чем НА.

4) Вирус гриппа типа А стимулирует появление фосфатидилсерина на поверхности клеток эндотелия EAhy926, через 2-4 часа после заражения, что выражается в появлении ранне - апоптотических аннексин V положительных клеток в количестве 6% от общего количества клеток. NA вызывала появление аннексин V положительных клеток в количестве 6%. НА вируса гриппа не вызывал появление аннексин V положительных клеток.

5) Вирус гриппа типа А вызывает двухкратное повышение активности тканевого активатора плазминогена человека (t-PA), по сравнению с контролем, в культуре эндотелиальных клеток EAhy926. НА и NA вируса гриппа также стимулируют увеличение активности t-PA *in vitro* и *in vivo*.

6) В структуре НА и NA имеются аминокислотные последовательности сходные с аминокислотными последовательностями тканевого активатора плазминогена человека – ключевого регуляторного белка гемостаза.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ

1. Жилинская И.Н., Ляпина Л.А., Оберган Т.Ю., Решетникова О.Ю., Шалджян А.А., Азаренок А.А., Васин А.В., Киселев О.И. Активация фибринолиза белками вирусов гриппа человека и птиц.// «Тромбоз, гемостаз, реология». – 2011. - №4(48) - С.70-77. Издание ВАК

2. 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. - т.57 №2 – С.20-23. Издание ВАК
3. Прочуханова А.Р., **Азаренок А.А.**, Жилинская И.Н. Детекция вируса гриппа А (H1N1v) в культуре клеток эндотелия и аутопсийном материале легких, сердца и головного мозга.// Материалы конференции «Молекулярная диагностика 2010» Москва - 2010 - С.206-207. Издание ВАК
4. **Азаренок А.А.**, Еропкина Е.М., Прочуханова А.Р., Шалджян А.А., Козлова Н.М., Жилинская И.Н., Козелецкая К.Н. Воздействие вирусов гриппа А и их поверхностных белков на метаболизм клеток эндотелия кровеносных сосудов человека.//«Вопросы вирусологии» - 2013 - №3 – С.25-27. Издание ВАК.
5. **Азаренок А.А.** Прочуханова А.Р., Зенин В.В., Люблинская О.Г., Жилинская И.Н. Способность вирусов гриппа и их поверхностных белков стимулировать апоптоз и некроз клеток эндотелия.// «Цитология». – 2013 - №6(55) – С.430-435. Издание ВАК
6. **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 типа А и его поверхностных белков.// «Тромбоз, гемостаз, реология» - 2014 - №1 - С.70-77. Издание ВАК
7. **Азаренок А.А.**, Прочуханова А.Р., Даниленко Д.М., Жилинская И.Н. Репродукция вируса гриппа А (H1N1v) в клетках эндотелия кровеносных сосудов.//Материалы международной конференции «Развитие научных исследований и надзор за инфекционными заболеваниями» Санкт-Петербург - 2010г - С.44
8. Жилинская И.Н., Ляпина Л.А., Смирнова Т.Д., **Азаренок А.А.** Белок PB1 – F2 вируса гриппа птиц H5N1 обладает фибринолитической активностью. //Материалы 1 Ежегодного Всероссийского конгресса по инфекционным болезням. - 2009 - т.7, приложение 1, - С.69
9. Цинзерлинг В.А., Воробьев С.Л., Зарубаев В.В., Беляевская С.В., Эсауленко Е.В., Григорьева И.В., Дедов В.А., Грудинин М.П., Бузицкая Ж.В., Елпаева Е.А., Прочуханова А.Р., **Азаренок А.А.**, Жилинская И.Н. Патогенетические аспекты гриппа в период эпидемии, вызванной вирусом H1N1v в 2009 – 2010 г.// «Архив патологии». - 2011 - №6(13) - С.21-25
10. Grudin M., Komissarov A., Pisareva M., Stukova M., Buzitskaya J., Elpaeva E., Slita A., Romanovskaya – Romanko E., **Azarenok A.**, Prochkhanova A., Kiselev O. Pandemic influenza in Russia: detection and molecular characterization of the H1N1v virus. //Influenza and Other Respiratory Viruses, - 5 (Suppl.1), 395-415.

11. **Азаренок А.А.**, Прочуханова А.Р., Ильинская Е.В., Зенин В.В., Люблинская О.Г., Еропкина Е.М., Жилинская И.Н. Новый аспект патогенеза гриппозной инфекции. Тезисы. // «Проблемы медицинской микологии» - 2012 - №2(14) - С. 64
12. Люблинская О.Г., **Азаренок А.А.**, Прочуханова А.Р., Козлова Н.М., Жилинская И.Н., Исследование проницаемости мембран клеток эндотелия под воздействием вируса гриппа А. // «Грипп: эпидемиология, профилактика и лечение» сборник статей и тезисов. СПб - 2011г. - С.71
13. **Азаренок А.А.**, Еропкина Е.М., Козлова Н.М., Жилинская И.Н. Подавление дыхательной активности митохондрий под влиянием вируса гриппа типа А. // «Грипп: эпидемиология, профилактика и лечение» сборник статей и тезисов. СПб – 2011г - С.71

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает искреннюю и глубокую благодарность своему научному руководителю доктору биологических наук Жилинской Ирине Николаевне и всему коллективу лаборатории молекулярной вирусологии и генной инженерии в особенности Прочухановой А.Р. за практическую помощь на всех этапах работы. Автор выражает огромную признательность сотрудникам НИИ гриппа: Грудинину М.Г., Писаревой М.М., Шалдьяну А.А., Ильинской Е.В., Козловой Н.М., Еропкиной Е.М., Даниленко Д.М., Слите А.В., Смирновой Т. Д., Литвинчук Л.Ф., а также сотрудникам МГУ - Ляпиной Л.А. и Оберган Т.Ю., сотрудникам ЦИН РАН – Зенину В.В. и Люблинской О.Г., сотруднику Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М.Сеченова РАН – Харченко Е.П.