

ФГБУ Научно-исследовательский институт гриппа МЗ РФ

На правах рукописи

Азаренок Анастасия Александровна

РОЛЬ ВИРУСА ГРИППА И ЕГО ПОВЕРХНОСТНЫХ БЕЛКОВ В РАЗВИТИИ ДИСФУНКЦИИ КЛЕТОК ЭНДОТЕЛИЯ

03.02.02 – вирусология

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель – доктор биологических наук Жилинская И.Н.

Санкт-Петербург
2014

СОДЕРЖАНИЕ

		№ стр
.	ВВЕДЕНИЕ	7
	ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	12
Глава 1.	Структура вируса гриппа	13
1.1	Гемагглютинин	13
1.2	Нейраминидаза	19
1.3	Мембранный белок М2	22
1.4	Мембранный белок М1	24
1.5	Нуклеопротеин	27
1.6	РНК-зависимая-РНК-полимераза	29
1.6.1	Белок РВ1	29
1.6.2	Белок РА	32
1.6.3	Белок РВ2	34
1.7	Неструктурные белки NS1 и NS2 (NEF)	37
1.7.1	Неструктурный белок NS1	37
1.7.2	Неструктурный белок NS2 (NEF)	40
Глава 2	Структурно-функциональные свойства эндотелия кровеносных сосудов человека	42
2.1	Анатомо-физиологическая характеристика	42
2.2	Роль эндотелия в раннем воспалительном ответе	44
2.2.1	Адгезионные молекулы	45
2.2.2	Вазодилататоры	47
2.2.3	Вазоконстрикторы	51
2.2.4	Сосудистый эндотелий и система фибринолиза	53
Глава 3.	Дисфункция эндотелия	55

3.1	Изменение секреторной активности эндотелия	56
3.2	Апоптоз эндотелиальных клеток	57
3.3	Взаимосвязь процессов апоптоза, гемостаза и воспаления	59
3.4	Вирусные инфекции и эндотелий	61
3.4.1	ДНК-содержащие вирусы	61
3.4.2	РНК-содержащие вирусы	63
	МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	70
1.1	Вирусы	70
1.2	Клеточные культуры	71
1.2.1	Культура эндотелиальных клеток человека линии EAhy926	71
1.2.2	Культура клеток MDCK	72
1.3	Методы оценки репродукции вируса гриппа типа А	72
1.3.1	Определение инфекционной активности вируса гриппа	72
1.3.2	Полимеразная цепная реакция	73
1.3.3	Электронная микроскопия	74
1.4	Иммуногистохимический анализ аутопсийного материала	74
1.5	Выделение поверхностные белков исследуемых вирусов гриппа типа А	75
1.6	Оценка метаболизма эндотелиальных клеток линии EAhy926 с помощью МТТ-теста	76
1.7	Определение активности каспазы-3 иммуноцитохимическим методом	77
1.8	Оценка жизнеспособности эндотелиальных клеток линии EAhy926	78
1.9	Выявление раннеапоптотических эндотелиальных клеток линии EAhy926	78
1.10	Определение активности тканевого активатора плазминогена	79

1.10.1	Определение активности тканевого активатора плазминогена в эндотелиальных клетках линии EAhy926	79
1.10.2	Определение активности тканевого активатора плазминогена <i>in vivo</i>	80
1.11	Компьютерный поиск сходных аминокислотных последовательностей в белках человека и вирусе гриппа	80
1.12	Статистическая обработка полученных данных	82
	РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	83
Глава 1.	Репродукция вируса гриппа типа А в эндотелиальных клетках	83
1.1	Инфекционная активность исследуемых штаммов вируса гриппа в культуре клеток EAhy926	83
1.2	Выявление РНК, исследуемых штаммов вируса, в культуре клеток EAhy926 с помощью ПЦР	85
1.3	Выявление вирусных частиц исследуемых штаммов вируса, в культуре клеток EAhy926 электронно-микроскопическим методом	87
1.4	Иммуногистохимическое исследование аутопсийного материала от больных, умерших в эпидемию гриппа 2009-2010 гг.	88
1.4.1	Иммуногистохимический анализ аутопсийного материала легких	88
1.4.2	Иммуногистохимический анализ аутопсийного материала мозга	90
1.4.3	Иммуногистохимический анализ аутопсийного материала сердца	91
Глава 2.	Дисфункция клеток эндотелия при воздействии исследуемых вирусов гриппа и их поверхностных белков	93
2.1	Электронно-микроскопический анализ морфологии клеточной культуры эндотелия, инфицированной вирусом гриппа	94
2.2	Изменение метаболизма эндотелиальных клеток линии EAhy926 при воздействии исследуемых штаммов вируса гриппа типа А и его поверхностных белков	97

2.2.1	Изменение метаболизма эндотелиальных клеток линии EAhy926 при воздействии исследуемых штаммов вируса гриппа типа А	97
2.2.2	Изменение метаболизма клеток эндотелия при воздействии гемагглютинаина исследуемых штаммов вируса гриппа	99
2.2.3	Изменение метаболизма клеток эндотелия при воздействии нейраминидазы вируса гриппа А/Брисбейн/10/2007 (H3N2) и А/кураца/Курган/5/05 NS1-81/5:3(H5N1)	102
2.3	Апоптоз клеток эндотелия под воздействием вируса гриппа типа А и его поверхностных белков	104
2.3.1	Активация каспазы-3 в клетках эндотелия под воздействием исследуемых штаммов вируса гриппа и его поверхностных белков	104
2.3.1.1	Активация каспазы-3 в клетках эндотелия под воздействием исследуемых штаммов вируса гриппа	105
2.3.1.2	Активация каспазы-3 в клетках эндотелия под воздействием поверхностных белков исследуемых штаммов вируса гриппа	107
2.3.2	Оценка жизнеспособности эндотелиальных клеток линии EAhy926 под воздействием вируса гриппа типа А и его поверхностных белков	108
2.3.2.1	Оценка жизнеспособности эндотелиальных клеток линии EAhy926 под воздействием исследуемых штаммов вируса гриппа типа А.	108
2.3.2.2	Оценка жизнеспособности эндотелиальных клеток линии EAhy926 под воздействием гемагглютинаина исследуемых штаммов вируса гриппа	110
2.3.2.3	Оценка жизнеспособности эндотелиальных клеток линии EAhy926 при воздействии нейраминидазы исследуемых штаммов вируса гриппа	111
2.3.3	Выявление аннексин V положительных клеток в культуре клеток эндотелия EAhy926 под воздействием вируса гриппа типа А и его поверхностных белков	114
2.3.3.1	Выявление аннексин V положительных клеток при инфицировании клеток EAhy926 исследуемыми штаммами вируса гриппа	114
2.3.3.2	Выявление аннексин V положительных клеток при воздействии на клетки EAhy926 нейраминидазы вируса гриппа типа А подтипов H3N2 и H5N1	116

2.3.3.4	Выявление аннексин V положительных клеток при воздействии на клетки EAhy926 гемагглютинаина исследуемых штаммов вируса гриппа	117
2.4	Оценка активности тканевого активатора плазминогена под влиянием вируса гриппа типа А и его поверхностных белков	120
2.4.1	Оценка активности тканевого активатора плазминогена в эндотелиальных клетках линии EAhy926 под влиянием исследуемых штаммов вируса гриппа типа А	120
2.4.2	Оценка активности t-РА в эндотелиальных клетках EAhy926 под влиянием гемагглютинаина исследуемых штаммов вируса гриппа	121
2.4.3	Оценка активности t-РА под влиянием гемагглютинаина исследуемых штаммов вируса гриппа <i>in vivo</i>	122
2.4.4	Оценка активности t-РА в эндотелиальных клетках EAhy926 под влиянием нейраминидазы вирусов А/Брисбейн/10/2007 (H3N2) и А/курица/Курган/5/05 NS1-81/5:3 (H5N1)	123
2.4.5	Оценка активности t-РА под влиянием нейраминидазы вируса А/Брисбейн/10/2007 (H3N2) <i>in vivo</i>	124
2.5	Сравнение последовательностей аминокислот тканевого активатора плазминогена и поверхностных белков вирусов гриппа подтипов H5N1, H3N2 и H1N1pdm 09.	125
	ОБСУЖДЕНИЕ	134
	ВЫВОДЫ	146
	БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК	148

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. Грипп представляет собой инфекцию, занимающую доминирующее положение в структуре инфекционной заболеваемости, как по числу случаев заболевания, так и по наносимому экономическому ущербу. 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 [3, 11]. 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 [39]. 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 [7, 26]. Кроме того, эпидемиологические данные также указывают на то, что имеется корреляция между ежегодными эпидемиями гриппа и ростом числа больных, страдающих сердечно-сосудистыми заболеваниями [168; 3; 143; 162; 89; 310]. Так как среди причин развития сердечно-сосудистых заболеваний дисфункция эндотелия занимает одно из первых мест, 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 [6]. Основной функцией эндотелия является поддержание гемостаза, то есть непрерывного тока крови, но кроме этого клетки эндотелия участвуют в процессах воспаления, ангиогенеза

и т.д. [128; 6; 27]. 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 [212;154]. 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. 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 [32, 7, 26], 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 эритроцитарной фракции крови крыс). Можно предположить, что механизмом активации процесса фибринолиза может служить мимикрия аминокислотных последовательностей тканевого активатора плазминогена в структуре гемагглютинаина 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.

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 печатных 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.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Согласно современным данным, большинство вирусов способны поражать клетки эндотелия кровеносных сосудов хозяина. К ним относятся как ДНК-, так и РНК-содержащие вирусы, такие как герпесвирусы, вирусы гепатита В и С, вирус Денге, вирус Эбола, HIV, вирус кори и др. [212;154]. Эндотелиальный тропизм вирусов является чрезвычайно важным аспектом патогенеза вирусных инфекций, т.к. эндотелий играет ключевую роль в нормальном функционировании организма хозяина.

В настоящее время сформулированы основные функции эндотелия, такие как: 1) выполняет роль железы внутренней секреции, не имеющей себе равных ни по размеру, ни по функции; 2) секретирует в норме одни биологически активные вещества, а при дисфункции – другие; 3) способен преобразовывать биологически активные вещества, синтезируемые разными органами (печенью, почками) и находящиеся в крови; 4) регулирует гемостаз; 5) выполняет иммунные функции, представляя антигены иммунокомпетентным клеткам; 6) активно участвует в развитии воспалительной реакции[128; 6; 27]. Все это позволяет отнести эндотелий к органам внутренней секреции, участвующим в регуляции многочисленных биологических процессов. Нарушение функций эндотелия приводит к развитию целого ряда заболеваний, и, в первую очередь, повреждению сердечно-сосудистой системы. Именно поэтому изучению механизмов дисфункции эндотелия посвящены многочисленные исследования по патогенезу различного рода заболеваний, включая и вирусные инфекции.

Патогенез гриппа также связан с нарушениями в системе гемостаза [246; 11; 12; 180; 280; 148]. Однако до сих пор механизм подобных нарушений неясен. Исследования дисфункции эндотелия при гриппозной инфекции становятся особенно актуальными, т.к. этот возбудитель вызывает ежегодные эпидемии и имеется четкая взаимосвязь между эпидемиями гриппа и ростом числа больных, страдаю-

щих сердечно-сосудистыми заболеваниями [168; 3; 143; 162; 89; 310]. В первую очередь рассмотрим структуру и функцию белков вируса гриппа, так как именно вирусные белки играют основную роль в регуляции целого ряда биохимических процессов клетки хозяина.

Глава 1 Структура вируса гриппа

Известно, что геном вируса гриппа кодирует 14 белков, которые можно классифицировать следующим образом:

1. Поверхностные белки – HA, NA, M2
2. Внутренние белки – M1, NP, PB1, PA, PB2, NEF
3. Неструктурные белки – NS1, NS2, PB1-F2.

1.1 Гемагглютинин

Гемагглютинин – один из самых крупных белков в вируоне гриппа, на его долю приходится от 25-35% всех белков. Этот белок выполняет функции, крайне важные для развития инфекционного процесса: взаимодействует со специфическим для вируса гриппа клеточным рецептором - сиаловой кислотой [299], участвует в проникновении вируса в клетку, путем слияния вирусной мембраны с клеточной и слияния вирусной мембраны с эндосомальной в процессе «раздевания» вируса [278]; наконец, именно против гемагглютинина направлены антитела, нейтрализующие инфекционность вируса гриппа [254, 315].

Структура гемагглютинаина привлекала внимание многих исследователей, поэтому он был одним из первых наиболее изученных белков.

Поверхностный шип гемагглютинаина представляет собой тример, состоящий из идентичных субъединиц, обозначаемых как НАО (молекулярная масса 75 кДа). Каждая из субъединиц состоит из двух полипептидов – НА1 (тяжелая цепь гемагглютинаина) с молекулярной массой 55 кДа и НА2 (легкая цепь гемагглютинаина) – молекулярная масса – 20 кДа [12; 22]. Расщепление молекулы НАО на тяжелую и легкую цепи необходимо как для проникновения вируса в клетку [112], так и для формирования инфекционной частицы на последнем этапе репродукции вируса [78].

Согласно литературным данным, вся молекула НАО состоит из 567 аминокислотных остатков [308; 276]. N-конец НАО представлен высококонсервативной последовательностью, которая называется сигнальным пептидом, и состоит из 16-18 аминокислотных остатков [169]. Сигнальный пептид участвует в процессе переноса белка к месту сборки, а затем удаляется.

Тяжелая цепь гемагглютинаина – НА1 – состоит из 328 аминокислотных остатков и содержит ряд функционально важных областей. Во-первых, это рецепторный «карман», который по разным источникам включает в себя аминокислотные остатки в 98, 153, 183, 190, 194 положениях (тирозин, триптофан, гистидин, глютамин и лейцин) [308], и аминокислотные последовательности 134-138 и 224-228 [308]. По современным представлениям рецепторный «карман» – мишень для нейтрализующих антител, которые встраиваются в рецепторный «карман», мимикрируя сиаловые кислоты [276].

Во-вторых, в НА1 находятся основные антигенные детерминанты. Анализ изменений гемагглютинаина выявил 5 антигенных сайтов. Они обозначаются как: Sa (аминокислотные остатки в положении 128-129, 156-160, 162-167); Sb (аминокислотные остатки в положении 187-198); Ca1 (аминокислотные остатки в положении 169-173, 206-208, 238-240); Ca2 (аминокислотные остатки в положении 140-145, 224-225) и Сb (74-79). При этом буквой С обозначены общие для всех антигенные сайты, а буквой S – штаммоспецифические [276]. Некоторые авторы счи-

тают, что аминокислотные остатки с 116 по 261 можно считать рецептор-связывающим сайтом в окружении антигенных сайтов [276].

Кроме упомянутых областей, в HA1 выделяют гистидин в положении 18 и 38. Эти сайты высококонсервативны, чувствительны к pH и важны для конформационной перестройки гемагглютинина [172; 276].

Вслед за молекулой HA1 идет молекула HA2, отделенная от HA1 областью аминокислот, называемых сайтом расщепления. От состава и последовательности аминокислотных остатков в пептиде слияния зависит активность взаимодействия HA с клеточными мембранами. Расщепление HA клеточными протеазами по аргинину или лизину является необходимым условием инфекционности вируса, распространения вируса в зараженном организме, тропизма к тканям и вирусной патогенности. Существуют различия в специфике эндопротеаз клетки-хозяина (сериновые или фуриновые), которые распознают различные мотивы последовательностей в сайте расщепления [255, 278]. Так сериновые протеазы «узнают» в основном последовательности одноосновных аминокислот в сайтах расщепления HA вирусов гриппа млекопитающих и непатогенных вирусов птичьего гриппа. Считается, что ограниченное определенными типами клеток, распространение этих протеаз приводит к локализованным инфекциям [255, 278]. Фуриновые протеазы, распространенные повсеместно, «узнают» сайт расщепления, состоящий из многоосновных аминокислот. Такой сайт расщепления характерен для высокопатогенных вирусов гриппа птиц, вызывающих генерализованные инфекции [255, 279].

За сайтом расщепления располагается высококонсервативная область HA2 – так называемый пептид слияния. Структура пептида слияния детально охарактеризована [112]. Последовательность из 23 аминокислот состоит из нескольких остатков гидрофобных аминокислот и остатков глицина, перемежающихся по всей последовательности. Гидрофобность и спиральная структура пептида слияния считаются важным условием при взаимодействии HA с мембраной эндосомы [112].

Далее за петидом слияния идет последовательность аминокислот, которая называется heptad repeat region и состоит из повторения семи аминокислот следующим образом: гидрофобная, полярная, полярная, гидрофобная, изменяемая, полярная, изменяемая. Такая структура этих областей (55-77 ак и 100-112 ак) обеспечивает конформационные изменения молекулы гемагглютиниона в эндосоме [92].

У С-конца молекулы НА2 находится трансмембранный домен – последовательность из 28 аминокислот, который заякоривает гемагглютинин в липидной мембране вируса, за трансмембранным доменом следует последовательность из 10 аминокислот так называемого цитоплазматического «хвоста» [276], который играет существенную роль при сборке вирусных частиц и упаковке вирусного генома [323, 324].

Оставшиеся после расщепления субъединицы НА1 и НА2 соединены между собой дисульфидными связями, которые играют большую роль в стабилизации конформации НА [161]. Расположение этих связей показано на рисунке 1.

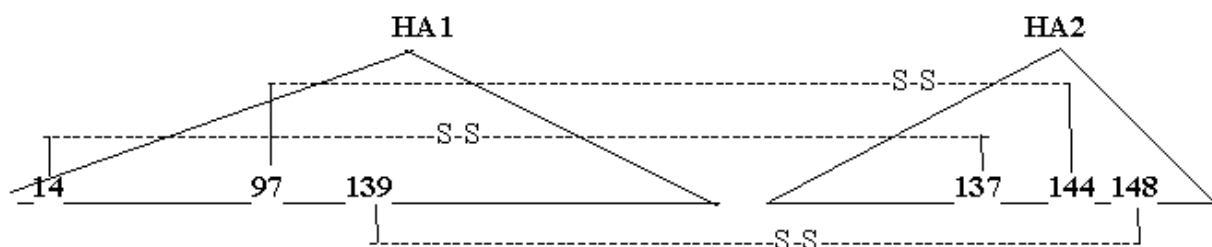


Рисунок 1. Положение дисульфидных связей в субъединицах молекулы НА (НА1 и НА2). Как видно из рисунка 1 дисульфидные связи, соединяют аминокислотные остатки 14, 97 и 139 молекулы НА1 с 137, 144 и 148 аминокислотными остатками НА2.

Кроме того, есть три дисульфидные связи внутри молекулы НА1 и четыре дисульфидные связи внутри молекулы НА2 [161]. Сравнение гемагглютининов различных подтипов вируса гриппа показало сходство в положении дисульфидных связей. Различия наблюдались только в порядке связывания аминокислотных остатков между собой.

В молекуле НА обнаружены углеводы, так что фактически он представляет собой гликопротеин [261; 65; 178]. Гликозилирование гемагглютинина влияет на связывание с рецепторами и антигенные свойства вируса [261]. Кроме того, углеводы участвуют во внутриклеточном транспорте НА к месту сборки вирусных частиц и вносят значительный вклад в стабилизацию его структуры [65; 178]. В молекуле НА может обнаруживаться от 3 до 9 углеводных цепей, которые в основном сосредоточены в НА1 [261]. Положение мест прикрепления углеводов может меняться у разных подтипов и штаммов, за исключением 154 аминокислотного остатка в НА2. Эта связь оказалось консервативной для всех исследованных штаммов [169]. Локализация углеводных цепей определяет выбор ферментов для «упаковки» вновь синтезированного НА в эндоплазматическом ретикулуме [78].

Такова структура мономера гемагглютинина. Биологической активностью НА обладает только в виде тримера [276]. Пространственная структура тримера весьма сложна. Каждый мономер, содержащий сцепленные субъединицы НА1 и НА2, образует структуру, состоящую из стержня, на верхнем конце которого находится большая глобулярная часть, на нижнем – малая глобулярная часть. Тяжелая цепь НА1 идет по стержню и восемь раз меняет направление, а затем образует большую глобулу. Легкая цепь НА2 располагается в пределах стержня и далее образует маленькую глобулу [276]. Три углеводные цепи расположены в большой глобуле и до четырех - в области стержня. Рецептор-связывающий сайт и антигенные детерминанты локализованы в области большой глобулы [178].

Оказалось, что НА выполняет важные функции не только в процессе репродукции вируса, но и в регуляции ряда других биохимических процессов в клетке, необходимых для обеспечения успешной репродукции. Так, получены данные о том, что в структуре НА вируса гриппа А/Калифорния/обнаружена последовательность токсина скорпиона [22]. Эти же последовательности обнаружены в НА вирусов подтипов H3N2 и H5N1.

Кроме того, в структуре НА обнаружены последовательности аминокислотных остатков сходных с последовательностью ряда областей тканевого активато-

ра плазминогена – крингл 1, крингл 2 и «пептидазаS1». Крингл1 отвечает за связь с фибрином; крингл 2 отвечает за связь с аннексином 2 (рецептором активатора плазминогена); «пептидазаS1» отвечает за расщепление плазминогена. Карта функционально важных областей гемагглютиниона вируса гриппа представлена на рисунке 2.

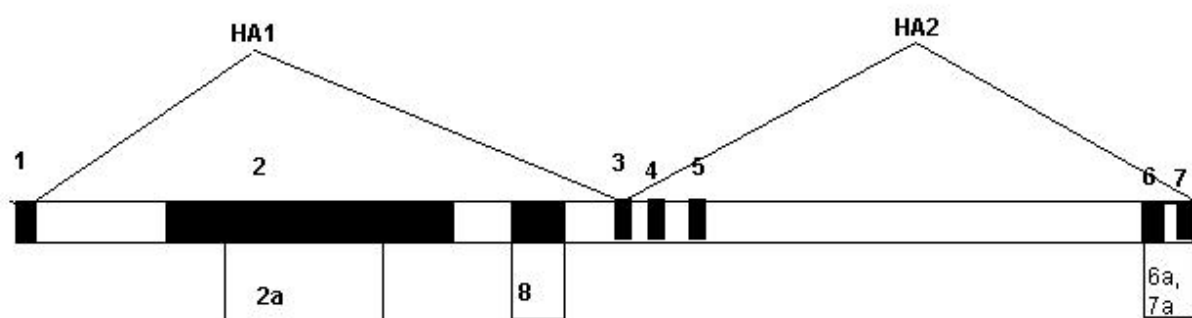


Рисунок 2. Карта функционально-значимых участков белка гемагглютиниона (НА) вируса гриппа типа А (H3N2).

1 – Сигнальный пептид (1-18 ак).

2 – Рецептор-связывающий сайт в окружении антигенных сайтов(116-261ак.)

3 – Сайт расщепления (328-335 ак).

4 – Пептид слияния (328-346 ак)

5 – Heptad repeat region (55-77 ак, 100-112 ак)

6 – Трансмембранный домен (513-556 ак).

7 – Цитоплазматический «хвост» (556-567ак).

2а – Последовательность аминокислотных остатков, мимикрирующие Крингл1 (113-153 ак) (область t-РА, отвечающую за связь с фибрином).

7а, 8 – Последовательности аминокислотных остатков, мимикрирующие Крингл2 (274-310 ак и 554-562 ак.) (область t-РА, отвечающую за связь с аннексином II - рецептором активатора плазминогена).

6а – Последовательности аминокислотных остатков, мимикрирующие Пептидазу S1 (515-554 ак.).

1.2 Нейраминидаза

Второй поверхностный белок вируса гриппа – нейраминидаза(NA).

Нейраминидаза принадлежит к семейству сиалидаз – гликогидролитических ферментов, которые отщепляют сиаловые кислоты от олигосахаридных цепей. Все сиалидазы имеют высококонсервативные области аминокислотных остатков у N-конца и в каталитической области [135].

Нейраминидаза вируса гриппа состоит из 469 аминокислот [202]. Она ориентирована в вирусной мембране N-концом в отличие от HA [293].

N-конец нейраминидазы состоит из крошечного цитоплазматического «хвоста» (1-6 ак.) за которым следует трансмембранный домен (7-34 ак.) [211, 184, 293]. Оба эти домена представлены гидрофобными остатками аминокислот. Трансмембранный домен считается ответственным за транслокацию NA [202], кроме того считается, что и трансмембранный, и цитоплазматический домены принимают участие в морфогенезе вирусных частиц [63].

Далее идет область, которую обозначают как неструктурный регион или «стебель»(stalk-motif) [202], который представлен аминокислотными остатками с 35 по 82 и «заякоривается» на вирусной мембране [326]. Эта область содержит остатки полярных аминокислот и участвует в посттрансляционных модификациях [184, 326]. Сравнение между разными штаммами вируса гриппа показало, что неструктурный регион нейраминидазы – крайне вариабельная область и даже существует предположение, что длина «стебля» нейраминидазы может коррелировать с вирулентностью [326]. Кроме этого эта область содержит остатки цистеина, которые участвуют в образовании дисульфидных связей, стабилизирующих структуру нейраминидазы [302].

Активный центр нейраминидазы представлен областью аминокислотных остатков с 118 по 425 и отвечает за связь с сиаловыми кислотами [137]. Активный сайт нейраминидазы высококонсервативен и одинаков для гриппа типа А и В [137].

C-конец молекулы не содержит гидрофобных областей и играет важную роль в сборке вирусных частиц, упаковке вирусного генома и транспорте вновь синтезированных молекул к клеточной поверхности [62].

Доказано, что нейраминидаза имеет сайты связывания кальция, что важно для ферментативной активности НА в момент выхода вновь синтезированных вирионов [137].

Шип нейраминидазы на поверхности вириона представлен тетрамером с молекулярной массой 200-250 кДа, каждый мономер с молекулярной массой 50-60 кДа. Нейраминидаза, также как и НА, – гликопротеин, содержащий 20 % углеводов в виде глюкозамина [201]. Трехмерная структура нейраминидазы может быть представлена в виде стебля с глобулярной головкой. Стебель формируют аминокислотные остатки с 35 по 82, головку образует остальная часть молекулы. Внутри головки полипептидная цепь делает несколько витков. Каталитический центр НА расположен на поверхности головки каждой из субъединиц, поэтому тетрамер имеет четыре активных центра. В головке расположены также все сайты гликозилирования нейраминидазы [201]. Известно, что изменение или миграция сайтов гликозилирования может приводить к следующим последствиям: более эффективно маскировать антигенные сайты; эффективнее защищать сайты ферментативного расщепления нейраминидазы; стабилизировать полимерную структуру; регулировать связь с рецептором и каталитическую активность [286].

Некоторые авторы [282] считают, что нейраминидазы имеют вторичный сайт связывания сиаловых кислот, который не является консервативным, а зависит от происхождения вируса. У вируса птиц этот сайт представлен аминокислотными остатками с 366 по 373, у вируса человека N2 и N1 – с 399 по 403 и с 430 по 433 – соответственно [282].

На сегодняшний день известны следующие функции нейраминидазы: 1) НА удаляет сиаловую кислоту от НА, так как без этого НА не сможет освободиться от поверхности клетки и участвовать в следующей стадии репродукции вируса [226; 135].

2) NA способствует освобождению вирусных частиц от поверхности клетки [288].

3). Нейраминидаза обладает плазминоген-связывающей активностью, которая приводит к превращению плазминогена в плазмин и затем к расщеплению NA плазмином. Считается, что данная функция нейраминидазы отвечает за увеличение вирулентности вируса гриппа [140, 185].

4). Появились данные о том, что нейраминидаза способствует выживанию клетки во время репродукции вируса путем активизации сигнального пути, связанного с молекулой адгезии С6. Взаимодействие NA/С6 приводит к фосфорилированию протеинкиназы (Ас) и антиапоптотического белка Bcl-2, что влияет на выживаемость клеток, пролиферацию, миграцию, дифференциацию и апоптоз [133].

5). Показано, что нейраминидаза вируса гриппа типа А тормозит суперинфекцию другими вирусами, например ретровирусами [159].

Относительно функциональных доменов NA, участвующих не только в проникновении и сборке вириона, но и в регуляции ряда других биохимических процессов в клетке известно очень мало. Так, в структуре нейраминидазы вируса гриппа А/Брисбейн/10/2007(Н3N2) нами выявлено 5 областей аминокислотных последовательностей, сходных с активатором плазминогена: две области(116-155 ак и 198-215 ак) мимикрируют домен крингл 1, по одной области – домен фибронектина (217-235 ак), домен крингл 2 (185-192 ак) и домен пептидаза S1 (71-98 ак) [14]. Карта функционально- значимых областей представлена на рис.3.

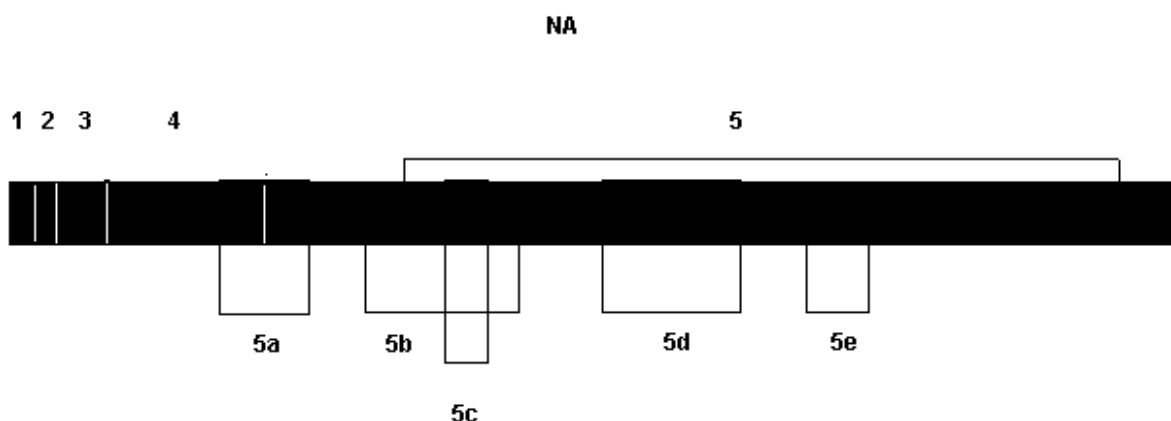


Рисунок 3. Карта функционально-значимых участков белка нейраминидазы (NA) вируса гриппа А/Брисбейн/10/2007(Н3N2).

1 – Сигнальный пептид.

2 – N-концевой цитоплазматический хвост (1-6 ак.).

3 – Трансмембранный домен (7-34 ак.).

4 – Неструктурный регион (35-82 ак), который включает в себя трипсин-чувствительные сайты в положениях 57 и 63.

5 – Аминокислотная последовательность, отвечающая за связь с сиаловыми кислотами (118-425ак).

5a – Аминокислотные остатки (71-98ак), мимикрирующие пептидазу S1

5b, 5d – Аминокислотные остатки (116-155 ак и 198-215 ак), мимикрирующие Крингл1.

5c – Аминокислотные остатки (185-192 ак), мимикрирующие Крингл 2.

5e – Аминокислотные остатки (217-235 ак), мимикрирующие домен фибронектина.

1.3 Мембранный белок M2

Третий поверхностный белок вируса гриппа – мембранный белок M2 представляет собой тетрамер [236; 237]. Основная функция белка M2 – формирование ионного канала, сквозь который осуществляется транспорт протонов, что необходимо для эффективной репродукции вируса [304; 284].

M2 белок состоит из 97 аминокислотных остатков, среди которых можно выделить следующие функциональные области: N-концевой домен или эктодомен (24 ак.), трансмембранный домен (19 ак.) и цитоплазматический домен (54 ак.) [165].

Основная функция эктодомена и трансмембранного домена – образование ионного канала, регулирующего рН среды в процессе раздевания вируса в эндосомах, а также в аппарате Гольджи – месте синтеза НА [287]. Канал сформирован четырьмя параллельными мономерами, которые связаны дисульфидными связями, стабилизирующими его структуру. Выявлены также два сайта – His 37 и Trp41 – которые определяют селективность канала и его однонаправленность [235].

На начальных стадиях инфекции транспорт протонов внутрь вириона приводит к образованию кислой среды, в результате чего происходит диссоциация M1 белка и РНП, конформационные изменения НА, слияние эндосомальной мембраны с вирусной и выход вирусного РНП в цитоплазму [237]. Предполагается, что на поздних стадиях инфекции ионный канал M2 поддерживает основной рН во время синтеза НА в аппарате Гольджи инфицированной клетки, предотвращая изменения конформации НА [284; 153].

Цитоплазматический домен белка M2 играет важную роль не только в создании ионного канала [165; 163], но и в процессе упаковки вирионной РНК, отпочковывании вириона, в определении морфологии вирусной частицы [90; 204]. Аминокислотные замены в цитоплазматическом «хвосте» могут приводить к неполному включению РНК в вирион и отпочковыванию дефектных вирусов. Данные дефекты могут приводить к прерыванию связи между M1 и M2 белками [204; 97].

В цитоплазматическом «хвосте» белка M2 находятся также сайты расщепления каспазами, которые обладают двойной чувствительностью как к цистеиновым протеазам (каспазам), так и к серингранзимам типа В (белкам участвующим в воспалительных процессах). Предполагается, что наличие этих сайтов влияет на вирулентность и патогенность вируса гриппа [324].

Данные, полученные о влиянии белка M2 на программируемую клеточную гибель неоднозначны. С одной стороны, M2 блокирует один из видов программируемой клеточной гибели – аутофагию, препятствуя слиянию аутофагосом с лизосомами клетки [130]. С другой стороны, трансмембранный домен белка M2 участвует в образовании пор в митохондриях, что приводит к развитию апоптоза по митохондриальному пути [160]. Кроме того, белок M2 способен к взаимодействию с белком теплового шока Hsp 40, который регулирует процесс апоптоза, связываясь с белком p58 – ингибитором протеинкиназы R. Комплекс белка M2, белка теплового шока 40 и белка p58 (M2/Hsp40/p58) приводит к фосфорилированию протеинкиназы R и в конечном итоге к гибели клетки [146]. На рисунке 4 приведена карта функционально-значимых областей белка M2.



Рисунок 4. Карта функциональных областей белка M2.

- 1 – Эктодомен (24 ак.).
- 2 – Трансмембранный домен (19 ак.).
- 3 – Цитоплазматический «хвост» (54 ак.).

1.4 Мембранный белок M1

Внутренняя поверхность липидного слоя мембраны вириона выстлана мембранным белком M1. На долю белка M1 приходится 40% всей массы вириона. Молекулярная масса белка составляет 25 кДа.

Основные функции белка M1 следующие: 1). Сохранение целостности вириона в связи с его способностью связываться как с липидной мембраной и цито-

плазматическими «хвостами» оболочечных гликопротеинов, так и с вирионной РНК [53], 2). Белок М1 определяет морфологию вириона; 3). Участвует в процессе репродукции вируса, его сборки и отпочковывания [245; 77].

М1 - белок состоит из 252 аминокислотных остатков [87]. В белке М1 выделяют следующие области: N-концевой домен (1-87 ак), средний домен (87-165ак) и С-концевой домен (165-252ак) [87].

В N- домене белка М1 аминокислотный остаток в положении 41 отвечает за формирование нитевидных частиц вируса гриппа [69].

В среднем домене находится сигнал ядерной локализации (NLS) (аминокислотные остатки 101-105), который отвечает за транспорт вновь синтезированного белка М1 из цитоплазмы в ядро [316; 306; 264].

На границе среднего домена и С-концевого находится последовательность аминокислотных остатков, получившая название Zn-фингер мотива [224]. Zn-фингер мотив (последовательность аминокислот содержащая цистеин и гистидин, является Zn связывающей и имеется у всех белков, взаимодействующих с РНК или ДНК) отвечает за связь только с одноцепочечной вирусной РНК [316; 66].

Белок М1 также играет важную роль в нуклеоцитоплазматическом транспорте вирусной РНК [199; 83]. Для осуществления этого транспорта формируется комплекс белка М1 с вирусной РНК и белком NS2 (NEP/NS2-vRNP-M1). NS2 связывается с вирусной РНК с помощью сигнала ядерного экспорта, содержащегося в его N- конце. М1 белок связывается с триптофаном в положении 78 белка NS2 с помощью сигнала ядерной локализации (101-105 ак) [228; 221; 51; 76].

Показано также, что сигнал ядерной локализации белка М1 содержит области взаимодействия и с NS1 белком вируса гриппа, а в средней части М1 белка находятся области аминокислотных остатков, которые ингибируют транскрипцию и сайт фосфорилирования Ser-161 [119; 66; 267].

На поздних стадиях инфекции белок М1 экспортируется из ядра. Связывание М1 и вРНК в цитоплазме блокирует возвращение вРНК в ядро, что важно для эффективной сборки вируса [83;58].

Аминокислотные остатки в положениях 41, 95, 102 отвечают за формирование нитевидных частиц вируса гриппа и, таким образом, оказываются определяющими для морфологии вириона [251; 118; 86; 69].

В С-концевом домене белка М1 также обнаружены аминокислотные остатки в положениях 204 и 218, которые влияют на морфологию вириона [Kristy et al., 2012].

Помимо выполнения функций, обеспечивающих успешную репродукцию вируса, белок М1 оказывает проапоптотическое действие на клетку. Сам белок М1 не вызывает апоптоз, но может выступать в роли сигнальной молекулы. Так, М1 связывается с Hsp70 (белком теплового шока), что приводит к уменьшению взаимодействия между Hsp70 и Araf-1 (сигнальным белком апоптотических путей) и, в конечном счете, к клеточной гибели. За это взаимодействие отвечает область аминокислотных остатков 128-165 белка М1, которая называется субстрат-связывающим доменом [149].

Также показано, что белок М1 вызывает депрессию в поведении крыс и воздействует на гемостаз, подавляя активность тканевого активатора плазминогена [13]. На рисунке 5 приведена карта функционально-значимых областей белка М1.

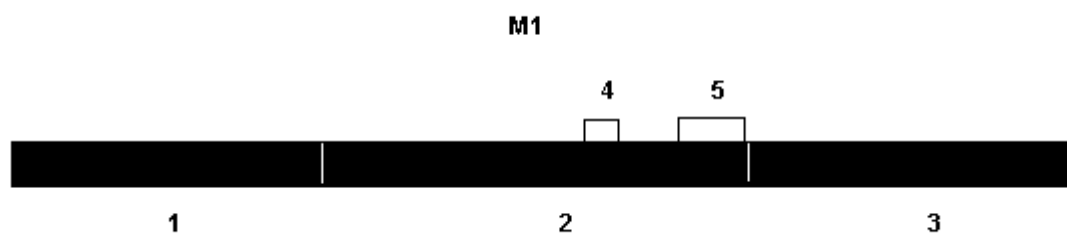


Рисунок 5. Карта функционально-значимых участков белка М1 вируса гриппа типа А.

- 1 – N-концевой домен(1-87 ак).
- 2 – Средний домен(middle domen)(87-165ак).
- 3 – С-концевой домен (165-252ак).
- 4 – Сигнала ядерной локализации(NLS) (101-105 ак).
- 5 – Субстрат связывающий домен(128-165 ак).

1.5 Нуклеопротеин

Нуклеопротеин (NP) –внутренний белок вириона, взаимодействующий с белком M1, РНК и белками-полимеразами. Он составляет 17-20% от всей массы белков вириона и имеет молекулярную массу 60 кДа. Каждый фрагмент вирусной РНК связан с многочисленными копиями белка NP и тремя полимеразными субъединицами (РА, РВ1 и РВ2) [239;223].

Контакт NP с РНК осуществляется, по-видимому, за счет электростатического взаимодействия, при этом каждый мономер белка NP взаимодействует с 24 нуклеотидными остатками РНК. РНК-связывающая активность NP требуется для транскрипции вирусного генома [213]. РНК-связывающий домен представляет собой последовательность аминокислотных остатков с 130 по 155 ак [223; 76]. Кроме связывания с РНК, NP также связывается с полимеразами. В этом взаимодействии участвуют аминокислотные остатки в положениях 150, 204, 207, 208 [222].

Оказалось также, что во взаимодействии NP-РНК участвуют клеточные белки, в частности белок 48кДа (обозначаемый как RAF-2p48). Этот клеточный белок взаимодействует только со свободным NP с образованием комплекса, который диссоциирует при добавлении свободной РНК, то есть способствует образованию комплекса NP-РНК [76].

Помимо этой функции, NP обеспечивает транспорт вирионной РНК как в ядро клетки, так и из ядра к месту сборки вириона [76]. Транспортные функции NP осуществляются благодаря наличию в структуре этого белка специфических аминокислотных последовательностей, получивших название последовательностей ядерной локализации [111; 312].

За импорт вирусной РНК в ядро клетки отвечают следующие аминокислотные последовательности в NP: монопартирный сигнал ядерной локализации (NLS1) – с 3 по 13 аминокислотный остаток на N-конце молекулы, бипартирный сигнал ядерной локализации (NLS2) (аминокислотные остатки с 189 по 216) и, на-

конец, сигнал ядерной аккумуляции (NAS) (аминокислотные остатки с 327 по 345). N-конец NP высококонсервативен только у вируса гриппа типа А, а бипартитный сигнал ядерной локализации высококонсервативен у всех ортомиксовирусов [305; 111; 312].

На поздних стадиях инфекции вирусная РНК экспортируется из ядра в комплексе с белками М1 и NS2 [76; 319]. NP также принимает участие в транспорте с помощью последовательностей, получивших название сигнала ядерного экспорта – NES. Это короткие гидрофобные аминокислотные последовательности, которые направляют белок в цитоплазму через ядерные поры. Таких последовательностей три: NES1 – аминокислотные остатки с 24 по 49; NES2 – аминокислотные остатки с 183 по 197; NES3 – аминокислотные остатки с 248 по 274 [319].

NP, также как и белок М2, имеет последовательность аминокислотных остатков, расщепляемых каспазами (сайты 16 и 497) [324].

Помимо участия NP в репродукции вируса гриппа имеются данные о том, что NP выступает в качестве регуляторного белка в процессе апоптоза. Так, показано, что из-за образования комплекса белка NP и белка теплового шока Hsp40(NP/ Hsp40) происходит разрушение комплекса Hsp40/p58, что приводит к блокированию p 58 фосфорилирования протеинкиназы R, тем самым уменьшая продукцию IFN-γ и блокируя апоптоз [265].

С другой стороны, NP вызывает активацию клеточного белка p53, основная функция которого, - регуляция клеточного цикла и запуск процесса апоптоза. Это белок с коротким периодом полураспада, его протеолиз осуществляется с помощью другого клеточного белка - Mdm2. NP создает комплекс с p53, ухудшая Mdm2/p53 взаимодействие, увеличивает активацию p53 и его период полураспада, что в конечном итоге ведет к развитию апоптоза [301].

Интересно отметить, что кроме влияния на продукцию IFN-γ, NP вызывает увеличение экспрессии индуцибельной NO-синтазы [303]. На рис.6 приведена карта функционально-значимых областей белка NP.

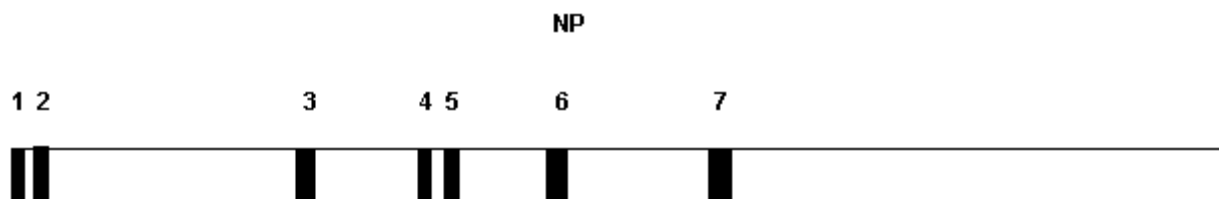


Рисунок 6. Карта функционально-значимых участков белка М1 вируса гриппа типа А.

- 1 – Монопартитный сигнал ядерной локализации (3-13 ак) - NLS1 (nuclear localization signal)
- 2 – Сигнал ядерного экспорта (24-49 ак) - NES1 (nuclear export signal)
- 3 – РНК-связывающий домен (130-155 ак)
- 4 – Сигнал ядерного экспорта (183-197 ак) - NES2
- 5 – Бипартитный сигнал ядерной локализации (198-216 ак) - NLS2
- 6 – Сигнал ядерного экспорта (248-274 ак) - NES3
- 7 – Сигнал ядерной аккумуляции (327-345 ак) – NAS (nuclear accumulation signal).

1.6 РНК-зависимая-РНК-полимераза

В тесном контакте с NP и РНК находится РНК-зависимая-РНК-полимераза, которая является мультифункциональным комплексом и состоит из пяти белков: PB1, PB1-F2, N40, PB2 и PA. Белки PB, PB2 и PA взаимодействуют с двумя концами каждого фрагмента вирусной РНК. Кроме этого, комплекс PB1 и PB2 взаимодействует с NP. Рассмотрим структуру и функцию каждого из этих белков.

1.6.1 Белок PB1

Белок PB1 имеет молекулярную массу 96 кДа и выполняет следующие функции:

- 1). Осуществляет катализ РНК-зависимого-РНК-синтеза [175].

2). Является основной субъединицей для сборки вирусных полимераз. Именно РВ1 взаимодействует и с РА, и с РВ2, но контакта РВ2 с РА не обнаружено. После синтеза полимеразных белков в цитоплазме клетки РВ1 в комплексе с РА транспортируется в ядро отдельно от РВ2 и комплекс РВ1/РА/РВ2 собирается уже в зараженной клетке [189].

3). Проявляет эндонуклеазную активность, отщепляя кэп-фрагмент от точной пре мРНК [147].

Белок РВ1 представляет собой последовательность из 757 аминокислотных остатков в котором выделяют следующие функциональные области:

N-концевая область аминокислотных остатков (1-48ак) отвечает за взаимодействие с белком РА [76].

Что касается данных о расположении функциональных областей белка РВ1, отвечающих за связь с вирионной и клеточной РНК, то они различаются у разных исследователей. Так, Voulo и сотр. [2007] выделяют область аминокислотных остатков РВ1, отвечающую за взаимодействие с вирионной и клеточной РНК (1-139 ак), область отвечающую за взаимодействие с клеточной РНК (267-493ак) и область, отвечающую за взаимодействие только с вирионной РНК (496-757ак) [76]. По данным Jung и сотр. [2006] обнаружено две консервативные последовательности аминокислотных остатков (233-249 ак и 269-281 ак), отвечающие за связь с вирионной РНК [170].

Помимо этих функциональных областей, в структуре РВ1 имеется сигнал ядерной локализации, который представлен областью аминокислотных остатков с187 по 216 и отвечает за транспорт из цитоплазмы в ядро. Ближе к С-концу белка РВ1 находится домен, отвечающий за взаимодействие с белком РВ2 (506-659 ак) [76].

Также получены данные о том, что несколько сайтов (669, 670 и 672 ак) ответственны за праймер-зависимый синтез вирионной мРНК. Мутации в этих положениях приводят к подавлению способности полимеразы катализировать синтез мРНК, вызывая уменьшение связывания промотора вирионной РНК и кэпирова-

ние мРНК [175]. Функционально-значимые области белка PB1 представлены на рис 7.

В последние годы в структуре гена PB1 были обнаружены две новые рамки считывания, которые кодируют два белка PB1-F2 и N40.

PB1-F2 – одиннадцатый белок вируса гриппа – был открыт больше десяти лет назад. Различные исследования показали, что PB1-F2 оказывает плеiotропный эффект – может индуцировать апоптоз в инфицированных клетках, способствовать воспалению и регулировать патогенность вируса, путем взаимодействия с PB1 [183]. PB1-F2 имеет различную длину у разных штаммов (приблизительно 87ак), различную клеточную локализацию и функции, то есть отвечает за штамм-специфическую патогенность [96]. Показано, что PB1-F2 вирусов H1N1 имеет сигнал митохондриальной локализации, расположенный в области С-конца (62-82 ак), и вызывает апоптоз по митохондриальному сигнальному пути. PB1-F2 вирусов дикого типа H5N1 в митохондриях не локализуется и апоптоз не вызывает [96]. У пандемических вирусов H1N1-09 данный белок не синтезируется, так как рамка считывания трижды пересекается стоп-кодонами. Этот генетический признак считается основным отличием современного пандемического вируса H1N1pdm 09 от вируса H1N1-1918 года, вызвавшего эпидемию «испанки». Также имеются данные о том, что белок PB1-F2 обладает высоким уровнем экспрессии в макрофагах, приводя к развитию апоптоза этих клеток, и тем самым способствуя утяжелению клинической картины при гриппе [108].

Белок N40 открыт в 2009 году [308]. Функции его неизвестны. Белок N40 является фрагментом белка PB1, лишенным 39 аминокислотных остатков с N-конца. Известно, что удаление рамки считывания белка PB1-F2 приводит к стимуляции синтеза N40 и что взаимное влияние трех рамок считывания важно для эффективной репродукции вируса. Оба белка и PB1-F2, и N40 являются неструктурными белками вируса гриппа. На рисунке 7 приведена карта функционально-значимых областей белков PB1, PB1-F2 и N40.

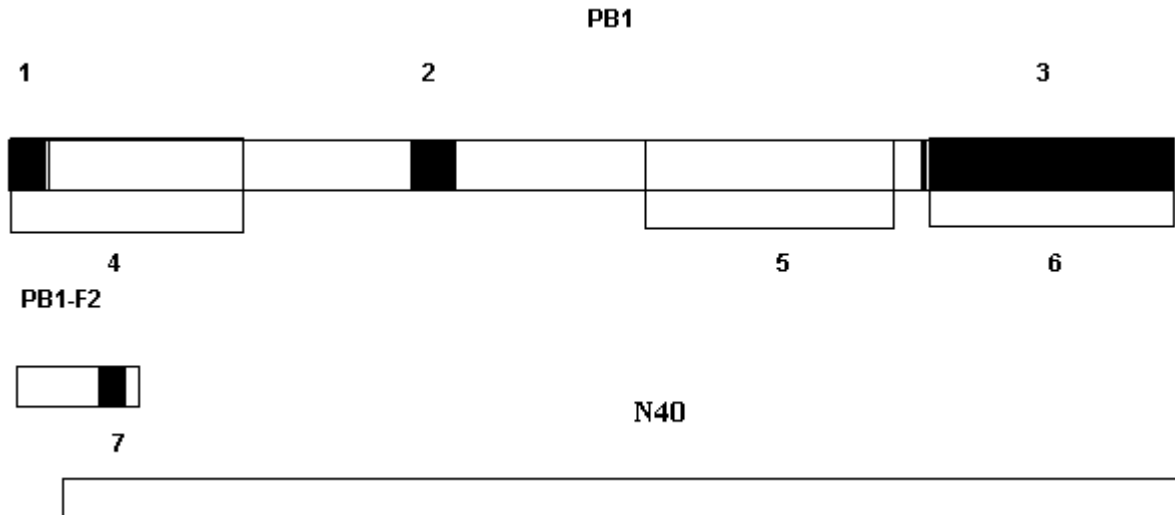


Рисунок 7. Карта функционально-значимых областей белков PB1, PB1-F2 и N40.

- 1 – N-концевой домен, отвечающий за взаимодействие с белком PA (1-48 ак).
- 2 – Сигнал ядерной локализации (187-216 ак).
- 3 – С-концевой домен, отвечающий за взаимодействие с белком PB2 (506-659 ак).
- 4 – Домен, отвечающий за взаимодействие с вирионной и клеточной мРНК (1-139 ак).
- 5 – Домен, отвечающий за взаимодействие с клеточной мРНК (267-493 ак).
- 6 – Домен, отвечающий за взаимодействие с вирионной мРНК (496-757 ак).
- 7 – Домен белка PB1-F2, отвечающий за митохондриальную локализацию (69-82 ак).

1.6.2 Белок PA

Белок PA имеет молекулярную массу 85 кДа и выполняет следующие функции:

1. Индуцирует протеолитические процессы, приводящие к снижению уровня накопления собственного белка и коэкспрессируемых белков [152, 147].
2. Возможно участвует в эндонуклеазном расщеплении клеточных пре мРНК – первом шаге вирусной транскрипции [115].

Белок PA представляет собой последовательность из 716 аминокислотных остатков в котором выделяют следующие функциональные области:

N-конец молекулы PA – последовательность с 1 по 256 аминокислотный остаток – отвечает за протеолитическую активность PA [147]. Там же, в N-конце, имеются последовательности ядерной локализации – аминокислотные остатки с 124 по 139 и с 186 по 247 [76]. Как было сказано выше, PA может транспортироваться в ядро только в комплексе с PB1. Интересно, что этот комплекс – PA/PB1 – вызывает конформационные изменения в PA, которые могут быть необходимы для его ядерной транслокации [195]. Последовательность аминокислотных остатков с 1 по 209 отвечает за эндонуклеазную активность белка PA. Активный центр фермента содержит остатки гистидина и кластер из трех кислых аминокислот, консервативный для всех вирусов гриппа, который связывает два иона марганца, благодаря чему PA можно отнести к металлсвязывающим эндонуклеазам [115].

Кроме N-конца молекулы PA, отвечающего за протеолитическую активность фермента, выделяют еще сайт в положении 624, отвечающий за серин-протеазную активность [147]. Далее, у C-конца молекулы PA находится домен с 668 по 716 аминокислотный остаток, отвечающий за связь с PB1 [76]. Отмечают, что мутации в C-конце молекулы PA оказывают влияние на ядерную локализацию белка, синтез вирусной РНК и упаковку вирусного генома. Возможно, что за это отвечает последовательность аминокислотных остатков с 497 по 518 [190].

В настоящее время выявлены два новых белка, кодируемые тем же геном, что и белок PA. Эти белки представляют собой белок PA, усеченный по N-концу. Их назвали PA-155 и PA-182 соответственно. Данные белки не обладают полимеразной активностью при совместной экспрессии с PB1 и PB2, но их отсутствие у мутантных вирусов приводит к более медленной репродукции в культуре клеток, что позволяет предположить, что данные белки обладают важными свойствами в процессе репродукции вируса [218].

Ниже приведена карта функционально значимых областей белка PA.

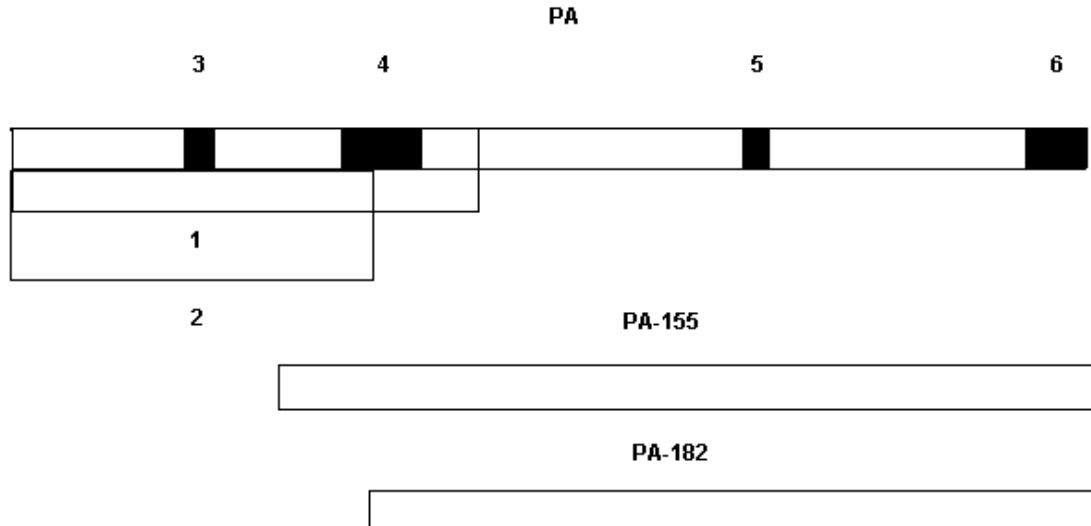


Рисунок 8. Карта функционально-значимых областей белков PA, PA-155, PA-182.

- 1 – Последовательность аминокислотных остатков с 1 по 257, отвечающая за протеолитическую активность белка.
- 2 – Последовательность аминокислотных остатков с 1 по 209, отвечающая за эндонуклеазную активность белка.
- 3,4 – Последовательности аминокислотных остатков с 124 по 139 и с 186 по 247 соответственно, представляющие сигнал ядерной локализации.
- 5 – Последовательность аминокислотных остатков с 497 по 518, отвечающая за упаковку вирусного генома.
- 6 – Последовательность аминокислотных остатков с 668 по 716, отвечающая за взаимодействие с PB1.

1.6.3 Белок PB2

Белок PB2 имеет молекулярную массу 87 кДа и выполняет следующие функции:

1. Отщепление кэп-фрагментов от хозяйских мРНК, которые используются в качестве праймеров для вирусной транскрипции [76; 141].

2. Взаимодействует с митохондриальными белками. Это взаимодействие блокирует экспрессию IFN- β , тем самым подавляя противовирусный иммунный ответ клетки-хозяина [141].

Белок PB2 представляет собой последовательность из 759 аминокислотных остатков в которой выделяют следующие функциональные области, которые расположены достаточно симметрично. У N-конца и у C-конца молекулы белка PB2 находятся домены, отвечающие за связь с белком PB1 – последовательность аминокислотных остатков с 1 по 124 и с 577 по 759, соответственно. Домены отвечающие за связь с белком NP, так же находятся у двух концов молекулы PB2 – последовательности аминокислотных остатков с 1 по 269 и с 580 по 683 [76].

В структуре белка PB2 имеются также две последовательности аминокислотных остатков, которые участвуют в связывании хозяйских кэп-фрагментов мРНК. Одна последовательность находится на N-конце молекулы PB2 (242-282 ак), вторая – на C-конце (538-577 ак) [76; 141]. Показано, что эти последовательности содержат значительное количество триптофановых остатков, которые важны для взаимодействия с кэп-структурой. Для транспорта из цитоплазмы в ядро имеются сигналы ядерной локализации, которые представлены последовательностями аминокислотных остатков с 449 по 495 и с 736 по 739 [76; 195].

Хотя большее количество белка PB2 в инфицированных клетках локализуется в ядре, где образует комплекс с PB1 и PA, PB2 белок был также обнаружен в митохондриях [88]. Предполагалось, что PB2 может способствовать сохранению функций митохондрий во время гриппозной инфекции [88]. В настоящее время показано, что PB2 с помощью сигнала митохондриальной локализации (1-120 ак) взаимодействует с митохондриальным противовирусным сигнальным белком MAVS (также называемый VISA) [263; 319] и подавляет опосредованную этим белком экспрессию IFN- β . Белки PB2 вируса гриппа различаются по способности взаимодействовать с митохондриями. Локализация PB2 в митохондриях характерно только для вирусов гриппа человека. Показано, что разница в митохондри-

альной локализации белка PB2 не влияет на репродукцию вирусов гриппа в культуре клеток, но «немитохондриальные» белки PB2 индуцируют более высокий уровень IFN- β , по сравнению с «митохондриальными» [141].

Также показано, что PB2 играет важную роль в регулировании температурного оптимума для активности РНК-зависимой РНК-полимеразы, возможно из-за влияния на функциональную стабильность полимеразного комплекса [79].

Ниже представлена карта функционально-значимых областей белка PB2

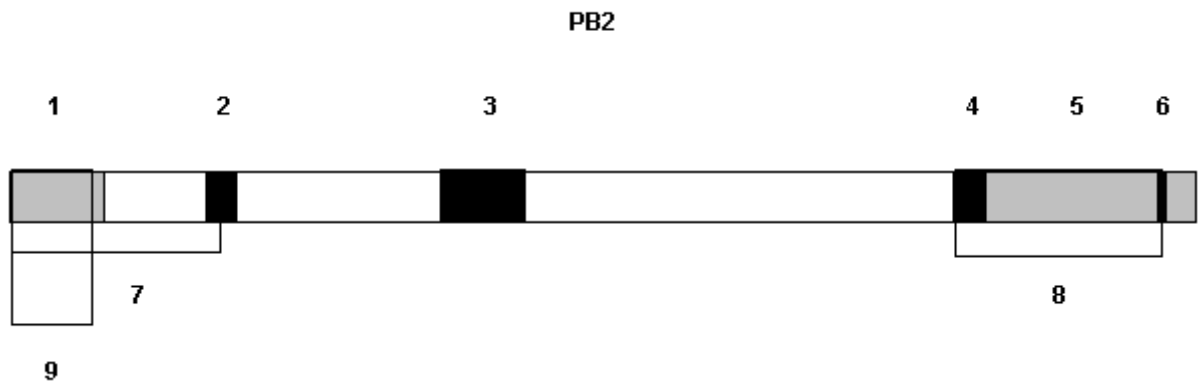


Рисунок 9. Карта функционально-значимых областей белка PB2.

1, 5 – Последовательности аминокислотных остатков (1-124 ак и 577-759 ак), отвечающие за взаимодействие с PB1.

2, 4 – Последовательности аминокислотных остатков (242-282 ак и 538-577 ак), отвечающие за кэп-связывание.

3, 6 – Последовательности аминокислотных остатков (449-495 ак и 736-739 ак), представляющие собой сигнал ядерной локализации.

7, 8 – Последовательности аминокислотных остатков (1-269ак и 580-683ак), отвечающие за взаимодействие с белком NP.

9 – Последовательность аминокислотных остатков (1-120 ак), представляющая собой сигнал митохондриальной локализации.

Необходимо отметить, что клеточные факторы, ассоциированные с вирусной полимеразой, играют важную роль в процессе транскрипции и репликации вирусного генома [75; 272]. Показано, что клеточный белок протеинкиназа С фосфорилирует PB1 и NS1. Это взаимодействие определяет активность полимеразного комплекса и эффективность вирусной репликации [196]. Также, для обеспечения функций полимеразного комплекса, необходимо взаимодействие белка

PВ2 с белком теплового шока Hsp60, митохондриальным белком p32 и с цитозольным шаперон-содержащим белком ССТ [125]. Показано также, что клеточный белок импортин α положительно регулирует активность полимеразного комплекса вирусов гриппа человека, но не вируса гриппа птиц, участвуя в ядерном транспорте белков полимеразного комплекса [157].

1.7 Неструктурные белки NS1 и NS2 (NEF)

Восьмой фрагмент вирионной РНК содержит информацию о структурном белке NS2 и неструктурном белке NS1. Предполагают, что восьмой фрагмент имеет еще одну рамку считывания, но белок не идентифицирован [Clifford et al., 2009]. Рассмотрим подробно структуру и функцию каждого из них.

1.7.1 Неструктурный белок NS1

Белок NS1 состоит из 230-237 аминокислотных остатков (в зависимости от штамма вируса) с молекулярной массой 26 кДа [230]. В структуре этого белка содержится два крупных функциональных домена: N-концевой домен (важнейшей частью которого является РНК-связывающий домен), представленный последовательностью аминокислотных остатков с 1 по 73 [101] и С-концевой «эффекторный» домен, представленный последовательностью аминокислотных остатков с 74 по 230, который отвечает за взаимодействие с клеточными белками и стабилизацию РНК-связывающего домена [300]. Помимо этих доменов, идентифицированы следующие функционально-важные участки:

1) последовательность аминокислотных остатков с 5 по 49 называется РНК-связывающим доменом, причем это связывание возможно только при димеризации белка NS1 [101; 317]. NS1 связывается со следующими типами РНК: вирусной геномной РНК, вирусной мРНК, малой ядерной клеточной РНК и двухцепочечной клеточной РНК [198]. Взаимодействие NS1 белка с малой ядерной РНК указывает на регуляторную роль этого белка в процессе сплайсинга мРНК М1 и мРНК NS1 [131].

2) NS1 в основном локализуется в ядре, но некоторые его количества могут находиться и в цитоплазме [206]. Домены, представленные аминокислотными остатками 35, 38 и 41 (высококонсервативный монопартирный сигнал NLS1), а также с 219 по 232 (бипартирный сигнал NLS2) необходимы для транспорта NS1 в ядро [144; 150]. В этом процессе участвует клеточный белок импортин α [206]. В ядре NS1 взаимодействует с другим клеточным белком – нуклеолином – мультифункциональным ядерным белком [219]. За локализацию NS1 в ядре отвечает также сайт фосфорилирования, представленный остатком серина в положении 195 [131; 73].

3) Домен, представленный аминокислотными остатками с 138 по 147, представляет собой сигнал ядерного экспорта (NES), который обуславливает цитоплазматическую локализацию NS1 [188; 150].

4) NS1 имеет домен, представленный аминокислотной последовательностью 123-144, который связывает клеточный противовирусный белок hGBP1 [327], принадлежащий к семейству гуанилатсвязывающих (GBP) интерферонзависимых белков. NS1 блокирует продукцию интерферонов α и β , а также провоспалительных цитокинов путем взаимодействия с клеточным белком RIG-1 (внутриклеточный рецептор опознавания паттерна, который распознает 5' трифосфорилированные РНК). В частности, он препятствует убиквитинированию этого белка, что влечет за собой блокаду сигнальных путей, отвечающих за продукцию интерферонов и провоспалительных цитокинов [208; 242].

5) Домен 81-113 отвечает за взаимодействие с клеточным фактором – eIF4GI, что приводит к преобладанию процесса трансляции вирусных белков

[Aragon et al., 2000]. NS1 также блокирует функцию двух клеточных белков: 2'-5' олигоденилат синтетазы (OAS) и протеинкиназы R [209, 210]. Оба эти белка являются ингибиторами процессов транскрипции / трансляции вирусных РНК [132].

6) NS1 ингибирует процессинг клеточных мРНК, тем самым давая преимущество вирусным РНК. Домены белка, представленные аминокислотными остатками 103-106 и 144-148, взаимодействуют с клеточными факторами полиаденилирования (CPSF, PAB2), что приводит к ингибированию полиаденилирования клеточных мРНК и прекращению их транспорта из ядра в цитоплазму [150].

7) Так называемые SH (Sarc homology) домены белка NS1 (последовательности аминокислотных остатков 89-93, 164-167, 212-216) взаимодействуют с регуляторной субъединицей p85 фосфатидил-3-инозитолкиназного пути (NS1), что необходимо для эффективной репродукции вируса и ингибции апоптоза [166].

8) С-концевой PDZ-связывающего мотив (233-237 ак) может также осуществлять активацию и дизрегуляцию фосфатидил-3-инозитолкиназного пути, путем связывания с клеточными белками, содержащими PDZ-домены. PDZ-домены обычно находятся в клеточных цитоплазматических и мембранассоциированных белках, которые участвуют в различных клеточных процессах, имеющих значение и для вирусной инфекции. NS1 связывается с PDZ белками (Dlg 1, MAGL-1, 2, 3, Scribble) – членами семейства мембранассоциированных гуанилинкиназ, которые отвечают за поляризацию клетки и процессы межклеточного взаимодействия [136]. Взаимодействие NS1 с Dlg 1 приводит также к активации фосфатидил-3-инозитолкиназного пути, а взаимодействие с другим белком – Scribble, изменяет клеточную локализацию этого белка, а также защищает инфицированные вирусом гриппа клетки от апоптоза [166; 136].

1.7.2 Неструктурный белок NS2(NEF)

Белок NS2 – небольшой белок, состоящий из 112 аминокислотных остатков, выполняет следующие функции:

1. NS2 стимулирует синтез вирусной комплементарной РНК, что приводит к увеличению количества вирионной РНК [250; 231].

2. NS2 действует как белок-посредник в экспорте вирусного РНП из ядра, для упаковки в вирионы на периферии клетки. Ядерный экспорт РНП осуществляется путем взаимодействия NS2 с клеточным белком ядерного экспорта CRM1 (chromosom region maintenance) и вирусным M1 белком, который связан с вирусным рибонуклеопротеином. Характерной особенностью белка CRM1 является его лейцин - богатая аминокислотная последовательность на N-конце молекулы. Аналогичная последовательность (12-21 ак) находится и на N-конце молекулы NS2 [221; 164]. На сегодняшний день обнаружен еще один лейцин - богатый сигнал ядерного экспорта (NES2), который также отвечает за связь с клеточным белком CRM1 и является высококонсервативным для всех вирусов гриппа [160]. Как и в случае с белками M1 и NP, в выполнении транспортных функций существенную роль играет то, что NS2 фосфорилирован по высококонсервативному, серин- богатому мотиву, представленному аминокислотными остатками с 23 по 25 [159].

3. NS2 также активирует клеточную АТФ-азу, которая обеспечивает процесс отпочковывания вируса [139].

Ниже представлена карта функционально- значимых участков белков NS1 и NS2.

Глава 2 СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ЭНДОТЕЛИЯ КРОВЕНОСНЫХ СОСУДОВ ЧЕЛОВЕКА

2.1 Анатомо-физиологическая характеристика

Эндотелий сосудов в течение продолжительного времени считался защитным слоем, мембраной между кровью и внутренними оболочками стенки сосуда. В настоящее время эндотелий рассматривается не просто как внутренняя выстилка сосудов, а диффузный эндокринный орган, пронизывающий все системы организма [128; 6; 27].

Эндотелий сосудов – монослой тонких плоских клеток, обладающих очень высокой метаболической и секреторной активностью [34]. Эндотелиальные клетки покрыты мукополисахаридной пленкой, гликокаликсом, имеющей двоякую функцию: предохраняет клетки от повреждения и препятствует адгезии тромбоцитов. Структура и свойства эндотелиальных клеток специфичны для определенных тканей и соответствуют их функциям [205; 34].

Различают следующие виды эндотелия: непрерывный, фенестрированный и прерывистый. Непрерывный эндотелий, называемый еще соматическим, наиболее характерен для капилляров скелетных мышц и гематоэнцефалического барьера. Фенестрированный эндотелий назван так потому, что включает в себя фенестры, истонченные участки, облегчающие транспорт между кровью и тканью. Данный вид эндотелия характерен для эндокринных желез, ворсинок кишечника и капилляров почечных клубочков. Прерывистый эндотелий, характеризующийся наличием щелей между клетками и прерывистой базальной мембраной, находится в костном мозге [205; 34; 27].

Сосудистые эндотелиальные клетки представляют собой уплощенные полигональные клетки длиной 25 – 50 мкм и шириной 10 – 15 мкм, которые образуют одноклеточный слой на внутренней стороне кровеносных сосудов, причём длинная ось клеток ориентирована в направлении кровотока. Эндотелиальные клетки

содержат обычные цитоплазматические органеллы, включая толстые и тонкие филаменты, состоящие из актина и миозина [6; 34; 27].

Специфическими органеллами, характерными для эндотелиальных клеток являются тельца Вейбеля-Паладе – палочковидные структуры, основной функцией которых является аккумуляция фактора фон Виллебранда [1;296;30;]. Некоторые исследователи считают, что в этих тельцах также находится тканевый активатор плазминогена [227]

Мембрана эндотелиальных клеток богата рецепторами чувствительными ко многим биологическим веществам, синтезируемым местно и циркулирующим в крови (ацетилхолин, брадикинин, катехоламин, вазопрессин, гистамин) [258; 233]. Особенно важное место в функционировании клеток эндотелия занимают его *механорецепторы*, способные комплексно воспринимать основные гемодинамические характеристики: изменения объема крови, движущейся с определенной скоростью под определенным давлением. Эти изменения гемодинамических характеристик получили название – напряжение сдвига [45].

Эндотелий обладает рецепторами, воспринимающими колебания уровня различных гормонов, метаболитов, сдвиги pH и изменения внутренней среды организма [233]. Его общая масса в организме составляет от 1600 г до 1900 г (больше веса печени). Доказано, что эндотелий обладает сосудодвигательной, анти-тромбоцитарной, антикоагулянтной, тромболитической, противовоспалительной, антиоксидантной и антипролиферативной активностью [6, 27, 24, 21].

В процессе ангиогенеза эндотелий регулирует рост и пролиферацию субэндотелиальных клеточных и неклеточных структур. Эндотелий выполняет важную секреторную функцию путем высвобождения эндотелиальных релаксирующих и констрикторных факторов [6, 27, 24]. В физиологическом состоянии эндотелий способен поддерживать равновесие между этими двумя антагонистическими процессами, регулируя местный кровоток и состояние гемостаза, соответственно уровню обмена веществ данного органа [27; 24].

Согласно многочисленным исследованиям эндотелий оказывает большое влияние на состояние общего кровотока, что выражается в обеспечении и поддержании нормальных констант общей гемодинамики [5; 27]

Секреторная активность эндотелия отличается тем, что он способен не только продуцировать большое количество биологически активных веществ (БАВ), но и преобразовывать некоторые БАВ, синтезированные другими органами (печенью, почками и др.), а также находящиеся в крови [34].

Кроме этого, эндотелий выполняет иммунные функции, представляя антигены иммунокомпетентным клеткам, секретируя интерлейкин-1 (стимулятор Т-лимфоцитов) [229] и синтезируя биологически активные вещества, которые влияют на программированную гибель клетки (апоптоз) [18; 35].

Повреждение стенки сосуда и особенно его внутренней части, эндотелия, является важным этапом процесса гемостаза [17] и развития ранней воспалительной реакции [43].

2.2 Роль эндотелия в раннем воспалительном ответе

Очевидно, что эндотелий кровеносных сосудов – мишень для большинства патогенов, как бактериальных, так и вирусных. Ранний защитный воспалительный ответ призван препятствовать внедрению и распространению возбудителя, по возможности быстро удаляя его из организма. Ранний воспалительный ответ начинается с привлечения лейкоцитов из кровяного русла в очаг инфекции с последующей их активацией для удаления возбудителя. Мобилизация лейкоцитов в очаг инфекции стимулируется провоспалительными цитокинами (фактор некроза опухоли, интерлейкин-1), а опосредуется адгезионными молекулами на поверхности лейкоцитов и эндотелиальных клеток, а также молекулами хемокинов и их рецепторами [43; 34].

2.2.1 Адгезионные молекулы

Необходимо отметить, что в физиологических условиях эндотелиальные клетки не экспрессируют молекулы адгезии. Адгезия лейкоцитов происходит в две стадии:

1. Стадия роллинга (прокатывания лейкоцитов вдоль эндотелия)
2. Стадия плотной адгезии (остановка лейкоцитов).

Эти стадии связаны с адгезивными молекулами, последовательность и время экспрессии которых на лейкоцитах и эндотелии различно. Начальную стадию обеспечивает **P-селектин**, экспрессия которого происходит в течение очень короткого времени при воздействии на эндотелий тромбина, гистамина, компонентов системы комплемента и некоторых других стимулов. P-селектин представляет собой гликопротеин, который хранится в тельцах Вейбеля-Паладе эндотелиальных клеток [43; 34].

Далее на поверхности эндотелиальных клеток, появляются молекулы **E-селектина**. Их экспрессия индуцируется провоспалительными цитокинами – TNF- α и IL-1 через 4-6 часов. E-селектин также представляет собой гликопротеин и является первой индуцибельной адгезионной молекулой, выявленной на эндотелиальных клетках. Под действием P- и E-селектинов происходит роллинг лейкоцитов, при этом P-селектин обеспечивает начальную стадию – быстрый роллинг лейкоцитов, скорость которого начинает замедляться при экспрессии E-селектина.

Несколько позднее, через 8-9 часов после стимуляции, на поверхности эндотелиальных клеток появляются молекулы межклеточной адгезии, входящие в суперсемейство иммуноглобулинов, **ICAM-1** и **VCAM-1**. Экспрессия этих молекул происходит под воздействием провоспалительных цитокинов (TNF- α и IL-1) и приводит к прочному прилипанию циркулирующих лейкоцитов к эндотелиальным клеткам [43; 34].

Эндотелиальные клетки также экспрессируют **VE-кадгерин**, который играет важную роль в функционировании эндотелия, контролируя образование межклеточных адгезивных соединений.

Эндотелиальные клетки сами являются продуцентами цитокинов. В различных патологических процессах показано участие следующих цитокинов: IL-1, MCP-1, IL-6, IL-8. Продукция и секреция цитокинов наблюдается в ответ на активацию эндотелиальных клеток. Цитокины, продуцируемые эндотелиальными клетками представлены в таблице 1[43].

Таблица 1.

Цитокины, продуцируемые эндотелиальными клетками.

Функции цитокинов	Семейства цитокинов			
	Факторы роста	Интерлейкины	Хемокины	
			CXCL	CCL
Регуляция гемопоеза	GM-CSF, G-CSF, M-CSF	IL-5		
Регуляция экспрессии адгезионных молекул		IL-1, IL-4	IL-8	RANTES
Регуляция хемотаксиса лейкоцитов	GM-CSF		IL-8, GRO- α	MCP-1, MCP-2, RANTES
Регуляция синтеза острофазных белков		IL-1, IL-6		
Регуляция иммунного ответа		IL-1, IL-5, IL-6, IL-15	IL-8	RANTES
Регуляция тонуса сосудов	CSF – ET-1	IL-1 – NO		

Регуляция свертывания крови		IL-1		
Регуляция ангиогенеза	GM-CSF, G-CSF, PDGF	IL-1, IL-8, IL-4, IL-13, IL-6 - VEGF	IL-8, GRO- α , IP-10	

Индукторами активации эндотелиальных клеток могут выступать различные факторы, в том числе и вирусные инфекции, что подтверждается развитием такого явления как цитокиновый шторм при тяжелой инфекции вируса гриппа.

2.2.2 Вазодилататоры

Активированные под влиянием провоспалительных цитокинов, эндотелиальные клетки продуцируют молекулы **вазодилататоров**, под действием которых усиливается местный кровоток, повышается проницаемость сосудов для молекул фибриногена, который, покидая сосуды, превращается в фибрин, что способствует ограничению очага инфекции.

Оксид азота. Одним из основных сосудорасширяющих веществ, вырабатываемых эндотелием, является оксид азота (NO) [28; 9]. На продукцию оксида азота влияют такие биологически активные вещества, как ацетилхолин, кинины, серотонин, тромбоксан и др., а также воздействие на механорецепторы эндотелиоцитов [34; 27]. Под влиянием NO происходит активация фермента гуанилатциклазы. Это приводит к увеличению образования цГМФ (циклический гуанозинмонофосфат) и удалению внутриклеточного кальция, так как гуанилатциклаза регулирует содержание калия и кальция в гладких мышцах сосудов и тромбоцитах, воздействуя на кальций-зависимые калиевые каналы [38]. Это приводит к наруше-

нию сократительных функций белков, гиперполяризации клеточной мембраны и расслаблению мышц.

Кроме сосудорасширяющих, оксид азота выполняет целый ряд других важных функций: модулирует высвобождение вазоактивных медиаторов, ингибирует адгезию лейкоцитов, подавляет экспрессию провоспалительных генов, адгезию и агрегацию тромбоцитов, ингибирует миграцию и пролиферацию гладкомышечных клеток и таким образом участвует в ремоделировании сосудов [27; 24].

Основным источником оксида азота в организме является эндотелий сосудов, но образование NO происходит и во многих других клетках и органах, в частности, в мышцах сосудов, тромбоцитах, макрофагах, нейтрофилах, купфферовских клетках печени, многих нейронах, глиальных клетках [28; 9; 27].

Оксид азота образуется из L-аргинина под действием кальций/кальмодулин-зависимой изоформы фермента NO-синтазы при участии ряда кофакторов [27; 21;].

В настоящее время принято деление изомеров синтаз (NOS) на три группы:

- нейрональная синтаза – NOS, или nNOS, первоначально обнаружена в нейронах центральной и периферической нервной системы,
- индуцибельная синтаза NOS-2, или iNOS, как считалось раньше, не экспрессируется постоянно, ее синтез может быть индуцирован во многих клетках организма; находится она в активированных макрофагах, в купферовских клетках печени;
- эндотелиальная синтаза NOS-3, или eNOS, обнаружена в клетках сосудистого эндотелия.

Функции и локализация изомеров синтаз в организме относительно специфичны, что определяется как функцией органа, так и общим состоянием организма [34; 27].

Простациклин (простагландин Pgl₂) – продукт метаболизма арахидоновой кислоты – обладает сосудорасширяющими, антиагрегантными и цитопротекторными свойствами. Синтезируется преимущественно в эндотелиоцитах и клетках стенок сосудов. Механизм клеточного действия простациклина связан с повыше-

нием уровня цАМФ в гладкомышечных клетках и тромбоцитах, путем активации аденилатциклазы, и выражается в релаксации сосудов и препятствии активации тромбоцитов [16]. Участие простаглицлина в вазодилатации в норме, по-видимому, минимально, основной эффект связан с ингибированием агрегации тромбоцитов.

При блокировании действия оксида азота и простаглицлина расширение сосудов вызывает **эндотелиальный фактор гиперполяризации (ЭФГП)** [24]. Химическая природа этого вещества не установлена. ЭФГП вызывает открытие калиевых каналов (вероятно кальцийзависимых) в гладких мышцах, что вызывает расслабление сосудов. Считается, что наибольшее значение ЭФГП имеет в поддержании сосудистого тонуса на уровне микроциркуляторного русла [24].

Описаны еще два фактора, вызывающие расширение сосудов, и продуцируемые эндотелием. Это **адrenomедулин** – сосудорасширяющий пептид, впервые выделенный из клеток феохромоцитомы [16]. Эндотелиальные клетки секретируют этот пептид, который увеличивает продукцию цАМФ в результате активации аденилатциклазы, что приводит к расширению сосудов [20]. **Натрийдиуретический пептид С типа (НПС)**, который образуется в основном в эндотелии сосудов, некоторых клетках крови и участвует в локальной регуляции сосудистого тонуса [16]. НПС вызывает релаксацию сосудов и угнетает пролиферацию гладкомышечных клеток. Его действие опосредовано активацией гуанилатциклазы и увеличением содержания цГМФ [34; 27].

Система протеина С (PrC), включающая в себя тромбомодулин, протеин С, протеин S, тромбин (как активатор PrC) и ингибитор PrC, хорошо известна как естественный физиологический антикоагулянт. Тромбомодулин – эндотелиальный фактор, ключевое звено нормальной функции эндотелия, определяющее направление и скорость процессов гемостаза, синтезируется эндотелием в физиологических условиях, выполняя функцию рецептора тромбина [113; 20; 27].

Связывая тромбин, тромбомодулин резко меняет его свойства: тромбин теряет способность усиливать процессы коагуляции, превращать фибриноген в фибрин, но приобретает способность активировать плазменные факторы, т.е. из

активного коагулянта тромбин превращается в антикоагулянт [27]. Вместе с протеином S активированный протеин C расщепляет факторы Va и VIIIa, итогом чего является угнетение свертывания крови. Кроме того, система протеина C инактивирует ингибитор тканевого активатора плазминогена [27]. По динамике уровня протеина C во время окклюзии можно определить степень антикоагулянтной защиты эндотелия [24].

α_2 -макроглобулин – белок, входящий в систему естественных антикоагулянтов, который обладает способностью связывать активированные компоненты системы свертывания крови [1].

Сильные антикоагулянтные свойства проявляет комплекс **гепарина и антитромбина III**.

Антитромбин III – сериновая протеаза, постоянно циркулирующая в крови. Синтезируется печенью и эндотелиальными клетками. Антитромбин III повышает активность калликреина, тем самым увеличивая синтез оксида азота, снижает концентрацию фибриногена и увеличивает растворимость кровяных сгустков (возрастает неферментативный фибринолиз), а также повышает литические свойства комплекса плазминоген-плазмин [25; 49].

Гепарин является кофактором антитромбина III. Комплекс гепарин – антитромбин III (называемый антитромбин II) фиксируется на поверхности эндотелиальных клеток, сильно повышая их тромборезистентность. Этот комплекс проявляет очень сильные антикоагулянтные свойства, ингибирует активность тромбоцитов и тромбина, блокирует активированные плазменные факторы (VIIIa, IXa, Va, VIIa), связывает фибринолитические ферменты [27]. Гепарин вырабатывается тучными клетками, расположенными вокруг капилляров и базофилами, циркулирующими в крови. Особенно много гепарина синтезируется в печени и в легких [34; 27].

2.2.3 Вазоконстрикторы

Эндотелины. Считается, что наиболее сильными сосудосуживающими веществами, **вазоконстрикторами**, являются эндотелины [33], которые были обнаружены K. Nickey et al. [1987] при культивации эндотелиальных клеток в гипоксической среде. Семейство эндотелиинов состоит, по крайней мере, из трех сходных по структуре пептидов: эндотелина-1, эндотелина-2 и эндотелина-3, при этом только первый тип синтезируется эндотелиальными клетками. Эндотелины, как и остальные биологически активные вещества, секретируемые эндотелием, действуют паракринно на рецепторы гладких мышц сосудов и паракринно-аутокринно – на рецепторы эндотелия сосудов. Обнаружены А, В и С эндотелиальные рецепторы. Все они являются гликопротеидами, различаются по месту расположения, по характеру реакции с определенными изомерами эндотелиинов [34; 27; 255].

В физиологических концентрациях эндотелин-1 действует на эндотелиальные рецепторы, вызывая высвобождение релаксирующих факторов, а в более высоких – активирует рецепторы на гладкомышечных клетках, стимулируя стойкое сужение сосудов [24]. При связывании эндотелина с рецепторами происходит высвобождение ионов кальция, который связывается с кальмодулином и активирует процессы клеточного сокращения [47]. Из других эффектов эндотелина следует отметить его способность вызывать экспрессию адгезивных молекул, тем самым способствуя тромбообразованию [247; 277].

Эндотелий также синтезирует **ангиотензинпревращающий фермент** (АПФ), под действием которого из малоактивного вещества ангиотензина-I образуется ангиотензин-II. Ангиотензин-II вызывает очень сильное (в 50 раз сильнее адреналина), генерализованное сужение сосудов. АПФ является цинкметаллопептидазой, принимает участие и в метаболизме других БАВ: разрушает брадикинин и другие кинины до неактивных пептидов. В плазме крови ангиотензинпревращающий фермент находится в небольшом количестве. Активность АПФ наиболее

высокая в эндотелии крупных и мелких коронарных артериях и артериолах; в капиллярах АПФ значительно меньше. В венах АПФ почти отсутствует [10].

Ангиотензин-II (АТ-II) в физиологических условиях и в физиологических дозах участвует в создании сосудистого тонуса, необходимого для поддержания нормального артериального давления и достаточного кровотока в жизненно важных органах (головном мозге, сердце, почках, печени), оказывает влияние на свертывающую систему крови (применение ингибитора АПФ снижает активность тканевого активатора плазминогена, играя важную роль в регуляции эндогенного фибринолиза, а также участвует в регуляции водно-солевого равновесия, стимулируя выделение альдостерона [10].

Тромбоксан А₂ (ТхА₂) – очень активный вазоконстриктор, синтезируется эндотелием, гладкими мышцами сосудов, тромбоцитами. Образуется из арахидоновой кислоты под действием циклооксигеназы-1. Под действием циклооксигеназы арахидоновая кислота превращается в простагландин G₂, а затем в простагландин H₂. В зависимости от состояния эндотелия будет синтезироваться либо простациклин, либо тромбоксан – биологически активные вещества с противоположным механизмом действия [17; 34; 27].

Фактор фон Виллебранда – крупный белок, представляющий собой гетерогенную популяцию гликопротеиновых мультимеров, синтезируется в мегакариоцитах и в эндотелии, выделяется в плазму крови, адсорбируется тромбоцитами, где и сосредоточен в гранулах. Фактор фон Виллебранда связывается, в основном, с рецепторами тромбоцитов (Ib, IIb-IIIa, являющихся гликопротеинами), способствуя адгезии тромбоцитов к поврежденному участку стенки сосуда [34; 27]. Кроме того, содержит центры связывания с коллагеном базальной мембраны подэндотелия, образует комплекс с фVIII, предохраняя его от протеолиза. В физиологических условиях фактор фон Виллебранда укрепляет стенки сосудов, при уменьшении его содержания в крови наблюдается кровоточивость [17]. Уровень фактора фон Виллебранда может увеличиваться при повреждении эндотелия, адренергической стимуляции, активации воспалительных реакций и увеличении напряжения сдвига [24].

2.2.4 Сосудистый эндотелий и система фибринолиза

Эндотелий сосудов обеспечивает не только функционирование противосвертывающей системы крови, но и является местом образования ряда компонентов, участвующих в активации системы фибринолиза по внешнему пути. Внешний путь активации фибринолиза осуществляется следующими компонентами:

- Профермент плазминоген, который превращается в плазмин путем органического протеолиза;
- Тканевой и урокиназный активаторы плазминогена (t-РА, u-РА);
- Ингибиторы тканевого и урокиназного активаторов плазминогена (РАI-1, РАI-2), которые или быстро нейтрализуют плазмин, или препятствуют активации плазминогена [145; 124; 249].

Тканевой активатор плазминогена (t-РА) постоянно секретируется эндотелиоцитами. Он относится к семейству сериновых протеаз и представляет собой полипептид состоящий из 527 аминокислот. Домен, представленный остатками аминокислот 276 – 527, характерен для сериновых протеаз и включает в себя каталитический сайт (His 322, Asp 371, Ser 478). Данный сайт в активаторе плазминогена отвечает за его связь с фибрином, фибринспецифическую активацию плазминогена, быстрое расщепление *in vivo* и связь с клеточными рецепторами [17; 249]. На поверхности эндотелиальных клеток присутствуют рецепторы как к тканевому активатору плазминогена, так и к самому плазминогену [99].

Процесс лизиса фибринового сгустка происходит в две фазы. В первую очередь тканевой активатор плазминогена активирует плазминоген на интактной фибриновой поверхности. Затем фибрин частично разрушается плазмином и подвергается дополнительному связыванию плазминогеном и возможно t-РА [145; 124; 249].

Эндотелиальные клетки способны регулировать фибринолиз, путем регуляции экспрессии рецепторов плазминогена – увеличение количества рецепторов приводит к увеличению активации плазминогена тканевым активатором [31].

Урокиназный активатор плазминогена продуцируется главным образом почками и фибробластами [215; 17].

Эндотелиальные клетки также синтезируют **ингибиторы активатора плазминогена** первого и второго типов (второй обнаруживается только во время беременности). Ингибитор активатора плазминогена первого типа (РАI-1) регулирует процесс превращения плазминогена в плазмин под влиянием тканевого активатора плазминогена и урокиназы. РАI-1 – одноцепочечный гликопротеин, состоящий из 379 аминокислот и принадлежащий к семейству серпинов (ингибиторы сериновых протеаз). Активный РАI-1 спонтанно превращается в неактивную «латентную» форму, но может быть стабилизирован связыванием с S-протеином или витронектином [91]. В настоящее время изучению ингибитора активатора плазминогена уделяется большое внимание, так как он играет роль в регуляции клеточной смерти [68] и в сосудистом ремоделировании [122; 116].

При нормальном физиологическом состоянии организма эндотелию свойственно сохранять определенный уровень фибринолитической активности крови, обеспечиваемый t-РА. Депрессия фибринолитической системы – одно из важнейших условий образования тромбов в сосудистом русле [31; 17; 91].

Глава 3 ДИСФУНКЦИЯ ЭНДОТЕЛИЯ

Одна из причин возникновения сердечно-сосудистых заболеваний – дисфункция эндотелия кровеносных сосудов. По современным представлениям дисфункция эндотелия – это дисбаланс между системами локальной регуляции гомеостаза и сосудистого тонуса, а также между анти - и прокоагулянтными медиаторами, факторами роста и их ингибиторами [24].

Таблица 2

Маркеры эндотелия, изменение концентрации которых в крови является признаком эндотелиальной дисфункции [из книги «Дисфункция эндотелия, причины, механизмы, фармакологическая коррекция»].

Показатель	Степень специфичности.
Десквамированные эндотелиальные клетки	Очень высокая
Е-селектин	Очень высокая
ICAM-1	Очень высокая
VCAM-2	Очень высокая
Тромбомодулин	Очень высокая
Рецепторы к протеину С	Очень высокая
Аннексин II	Очень высокая
Простациклин	Очень высокая
Тканевой активатор плазминогена t-PA	Очень высокая.
P-селектин	Высокая
Фактор фон Виллебранда (vWF)	Высокая
Ингибитор тканевого фактора (TFPI)	Высокая
Протеин S	Высокая
Оксид азота(NO)	Высокая
Нитриты и нитраты	Средняя
Тканевой фактор(TF)	Средняя

VEGF	Средняя
u-PA	Средняя
Ангиотензин II	Средняя
Экто-АДФаза	Низкая

Существуют методики определения всех известных веществ, образующихся в эндотелии, но, как видно из таблицы, не все показатели имеют одинаковую диагностическую ценность, так как многие вещества образуются не только в эндотелии, но и в других клетках [34].

3.1 Изменение секреторной активности эндотелия

Дисфункция эндотелия в результате действия разнообразных повреждающих факторов проявляется, прежде всего, в изменении секреторной активности эндотелиальных клеток. Происходит изменение синтеза активных веществ, уменьшающих кровоснабжение органов. Так происходит уменьшение синтеза простациклина и одновременно увеличение синтеза тромбоксана, являющегося его антагонистом; уменьшается концентрация протеина С, что приводит к повреждению эндотелия и, соответственно, еще большему уменьшению его концентрации; синтез оксида азота может меняться как в сторону уменьшения, так и в сторону его гиперсекреции; резко возрастает синтез и выделение эндотелинов, которые повреждают эндотелиальные клетки; происходит гиперактивация ренин-ангиотензин альдостероновой системы и увеличение синтеза ангиотензина II [24; 7; 27]. Эти изменения в совокупности приводят к изменению ионного состава клеток, ускорению адгезии и агрегации тромбоцитов, повышению тонуса гладких мышц сосудов и усилению их сокращения [27]. Многие исследователи полагают,

что несогласованная стимуляция эндотелиальных клеток и их неконтролируемый ответ характерны для таких патологических процессов как атеросклероз, заболевания сосудов трансплантата, артериальная гипертензия, застойная сердечная недостаточность, сепсис и воспалительные синдромы. Все эти заболевания включают в себя повреждения эндотелия, которые могут привести к его активации, дисфункции и апоптозу [257; 293; 171].

3.2 Апоптоз эндотелиальных клеток

Апоптоз эндотелиоцитов является одним из ключевых моментов в развитии дисфункции эндотелия. Апоптоз эндотелия можно рассматривать как форму повреждения, при которой увеличивается проницаемость сосудистой стенки для цитокинов, факторов роста, липидов, увеличивается адгезия лейкоцитов, а также активируется система коагуляции и снижается выработка оксида азота [67]. Клинические наблюдения, проводимые в этой области, свидетельствуют о том, что появление десквамированных (апоптотических) эндотелиоцитов является признаком развития инфаркта миокарда, стенокардии, ишемических нарушений мозгового кровообращения [35; 36]. Так, у больных, перенесших ишемический инсульт, количество десквамированных эндотелиоцитов превышало норму в два раза.

Апоптоз – программируемая клеточная гибель – процесс предназначенный для удаления из организма поврежденных клеток, клеток «ненужных» по программе морфогенеза и индивидуального развития организма [40; 48]. Интерес к апоптозу предопределен тем, что апоптоз – важнейший обязательный механизм онтогенеза, морфогенеза, антираковой защиты организма – в ряде случаев может усиливать тяжелые поражения организма [40; 23]. Согласно рекомендации номенклатурной комиссии по клеточной смерти этот вид клеточной смерти отлича-

ется от других (некроза, аутофагии, митотической катастрофы и др.) характерным набором морфологических признаков: изменением мембраны апоптотических клеток (переход фосфатидилсерина с внутреннею слоя мембраны в наружный), дегидратационное сжатие клетки, утрата межклеточных контактов, блеббинг, разрушение цитоскелета, конденсацию хроматина, фрагментацию ядра и деградацию ДНК [74; 48; 23]. Важной особенностью апоптоза, отличающей его от некроза является то, что деградирующая клетка сохраняет целостность мембраны до конечных стадий процесса и, в связи с этим, отсутствует воспалительная реакция соседних клеток [29; 48]. Апоптоз в норме заканчивается фагоцитозом макрофагами или окружающими паренхиматозными и стромальными клетками образовавшихся апоптотических телец без последствий для окружающих тканей в виде воспаления и иммунного ответа [40; 29].

Сигнальные пути при апоптозе. Апоптоз может быть вызван как внешними, так и внутренними сигналами, к важнейшим из которых относится повреждение ДНК [283; 103]. В этом многостадийном процессе существенную роль играют каспазы – семейство эволюционно консервативных протеаз [41]. В нормальном состоянии каспазы присутствуют в клетке в неактивной форме, как проэнзимы. Различают два вида каспаз – «инициирующие» и «эффекторные» [173]. К первым относят каспазы-8, 9, 10 и 12, которые после активации действуют на «эффекторные» каспазы- 3, 6, 7 и 14 [41]. Мишени эффекторных каспаз многообразны: например для каспазы-3 это могут быть фрагментация ДНК, гельзолин, PARP-полимераза или РАК-киназа [48]. Важно отметить, что после активации «эффекторных» каспаз апоптоз становится необратимым процессом.

Каспазный каскад может быть активирован по рецепторному или же по митохондриальному пути. Рецепторный путь запуска каспазного каскада начинается с активации одного из расположенных на клеточной мембране рецепторов, воспринимающих внешний сигнал: Fas/CD95, TNF, DR-4 и т. п. [174].

В случае митохондриального запуска каспазного каскада ключевым звеном является изменение состояния митохондрий, при котором снижается мембранный потенциал на внутренней мембране, в ней образуются гигантские поры, матрикс

набухает, разрывается наружная мембрана, из митохондрий выходит ряд белков, в частности цитохром с [80; 23]. Последний в комбинации с фактором Араф-1 (apoptotic protease-activating factor-1) и прокаспазой-9 образует апоптосомный комплекс, в котором прокаспаза превращается в каспазу-9 [80]. Далее каспаза-9 активирует каспазу-3 и таким образом рецепторный и митохондриальный пути сходятся на стадии активации эффекторной каспазы [48]. На наружной мембране митохондрий локализованы большая часть белков семейства Bcl-2, в состав которого входят промоторы (Bax, Bid, Bik) и ингибиторы (собственно Bcl-2 и Bcl-X) апоптоза. От соотношения этих белков зависит, состоится апоптоз или нет [80; 48; 23].

Открытие каспазозависимого пути апоптоза является важным этапом в развитии представлений о сигнальных апоптозных каскадах. AIF (apoptosis inducing factor) – митохондриальный флавопротеин, который перемещается от митохондрий к ядру, где вызывает конденсацию хроматина на периферии ядра и разрыв ДНК с образованием крупных фрагментов [283].

3.3 Взаимосвязь процессов апоптоза, гемостаза и воспаления

Изменение плазматической мембраны клетки является одним из самых ранних событий апоптоза. Потеря сиаловой кислоты на гликопротеинах и гликолипидах, появление рецептора витронектина и переход фосфатидилсерина (PS) с внутреннего на наружный слой мембраны – наиболее ранние апоптотические изменения, которые делают клетку «привлекательной» для макрофагов [40]. Но эти изменения имеют и другое значение для организма. Так транслокация фосфатидилсерина свидетельствует не только о том, что в клетке начался процесс апоптоза и она готова к фагоцитозу другими клетками, но и о том, что она начала проявлять провоспалительные и прокоагулянтные свойства [285] В нормальных, жиз-

неспособных клетках фосфатидилсерин находится с внутренней стороны плазматической мембраны, исключение составляют активированные тромбоциты и лейкоциты [289]. Транслокация PS приводит к тому, что он связывается белком аннексином V, в присутствии ионов кальция. Аннексин V, как и другие аннексины не выделяется из нормальных клеток: источником внеклеточного аннексина являются клетки апоптотические и разрушенные [243]. Связывание аннексина V с фосфатидилсерином является, следовательно, защитным механизмом, который препятствует развитию воспаления и прокоагулянтной активности апоптотических клеток [35]. Если же связывание сразу не происходит, то данный участок мембраны с PS приобретает свойства устойчивого отдельного пузырька – микровезикулы [19]. При этом в состав микровезикул включаются многие цитоплазматические и мембранные белки, в частности тканевой фактор [18]. Микровезикулы связываются с плазменными факторами свертывания, что приводит к активации этих факторов [186; 102] и далее возможно как развитие тромбоза [186], так и развитие ДВС-синдрома [18].

Диссеминированное внутрисосудистое свертывание – ДВС, спутник почти любого тяжелого заболевания. Под влиянием различных факторов происходит внутрисосудистое микротромбообразование (отложение тромбоцитарных, фибриновых, смешанных тромбов) в системе микроциркуляции. При этом состоянии происходит активация фибринообразования, агрегации тромбоцитов и фибринолиза [2; 42]. Поэтому на высоте диссеминированного внутрисосудистого свертывания отмечаются следующие основные признаки:

- падение числа тромбоцитов как результат их агрегации и потребления;
- истощение стимуляторов этих процессов;
- гипофибриногенемия и накопление продуктов биотрансформации фибриногена.

В условиях внутрисосудистого свертывания активация фибринолиза вначале носит характер адекватной реакции, защищающей от закупорки капилляров. Однако она может приобретать и чрезмерный характер, приводя не только к лизису нестабилизированного фибрина, но и к протеолитическому расщеплению

плазменных факторов и кровяных пластинок. Активация фибринолиза еще больше повышает уровень свертывающих и лизирующих факторов крови, так как при растворении сгустков освобождаются адсорбированные на них тромбин, плазминоген и плазмин, образуется антиплазмин VI. Все эти вещества инактивируются только частично, поэтому происходит их накопление, они становятся стимуляторами превращения оставшегося фибриногена в фибрин и его лизиса. Различают острый (шок), подострый (при тяжелой пневмонии, сепсисе) и хронический ДВС-синдромы [2; 42].

Таким образом, дисфункция эндотелия, являющаяся компонентом, а в некоторых случаях и первопричиной различных заболеваний, развивается под действием различных повреждающих факторов. Одним из таких повреждающих факторов является воздействие на эндотелий вирусов и бактерий.

3.4 Вирусные инфекции и эндотелий

Согласно современным данным большинство ДНК- и РНК-содержащих вирусов способны поражать клетки эндотелия кровеносных сосудов хозяина.

3.4.1 ДНК-содержащие вирусы

Вирусы герпеса и эндотелий. В семействе вирусов герпеса наиболее изучено воздействие человеческого *цитомегаловируса (HCMV)* на эндотелиальные клетки.

Показано, что эндотелиальные клетки поддерживают репродукцию HCMV, тем самым способствуя его распространению в организме [50, 244]. Согласно данным электронной просвечивающей микроскопии были обнаружены зрелые HCMV частицы в циркулирующих эндотелиальных клетках, а также в эндотелиальных клетках капилляров и венул, что дало основание предполагать, что цитомегаловирус вызывает десквамацию эндотелия [268, 269]. Стимулируя ангиогенез, цитомегаловирус обеспечивает собственную репродукцию [244]. Уникальность взаимодействия цитомегаловирус-эндотелий состоит еще и в том, что для проникновения вируса в эти клетки требуется совершенно особенный набор белков, кодируемый геном UL-131-128 [232; 256].

Цитомегаловирусная инфекция приводит к дисфункции эндотелия и активирует провоспалительные сигнальные пути: фосфатидил-инозитол-3-киназный и NFκB [238]. Кроме того, цитомегаловирусная инфекция приводит к экспрессии рецептора тромбоцитарного фактора роста, а также к увеличению продукции фактора фон Виллебранда и тромбина, что несет в себе риск развития тромбоза и тромбинопосредованной клеточной активации [241; 238]. Так, показано, что экспериментальная HCMV инфекция у крыс приводила к повреждению эндотелиальных клеток аорты [120].

Имеются данные о том, что персистирующая инфекция HCMV – 4 в эндотелиальных клетках островков Лангерганса, приводит к повышению экспрессии адгезионных молекул ICAM и VCAM и увеличению продукции провоспалительных цитокинов IL - 1β, IL – 6, хемокинов, IL – 8, а также IFN – α [321].

Антитела, направленные против HCMV, модулируют экспрессию генов, кодирующих молекулы, участвующие в активации и апоптозе эндотелиальных клеток, в частности, молекулы белка теплового шока Hsp60 [194].

Данные о влиянии *вируса простого герпеса (ВПГ-1)* на эндотелиальные клетки и гемостаз противоречивы. С одной стороны, согласно данным Вок и сотр.,(1993), инфекция ВПГ-1 в культуре эндотелия вызывает уменьшение уровня PAI-1, что может стимулировать антикоагулянтный фенотип в естественных условиях. С другой стороны, инфекция ВПГ-1 *in vitro* вызывала экспрессию моле-

кул адгезии (Р-селектина) и тканевого фактора. Уровни же тромбомодулина, простациклина и тканевого активатора плазминогена уменьшались, что говорит об изменении фенотипа с антикоагулянтного на прокоагулянтный [294; 176; 290].

Вирус герпеса-8 является возбудителем саркомы Капоши. Как оказалось, он способен инфицировать клеточную культуру эндотелиальных клеток микрососудов человека, вызывая как литическую, так и латентную инфекции [84].

Вирусы папилломы человека 16 и 18 типов и эндотелий. Как известно, вирусы папилломы человека размножаются в кератиноцитах и вызывают их неконтролируемый рост, приводящий к развитию онкологических заболеваний. Но, кроме этого, они способны стимулировать пролиферацию и миграцию эндотелиальных клеток микрососудов человека, тем самым способствуя ангиогенезу, необходимому для образования опухоли [98]. Так, белки Е6 и Е7 вируса папилломы человека 16 типа усиливают экспрессию двух ангиогенных индукторов VEGF и IL-8 в культуре первичных кератиноцитов [192; 298]. То же самое относится к белку Е6 вируса папилломы человека 18 типа, который способствует опухолевому ангиогенезу путем индукции VEGF транскрипции р-53 независимым образом [106].

Вирус гепатита В и эндотелий. Показано, что в эндотелии сосудов больных гепатитом В были обнаружены НВсАg и НВsАg, а также промежуточные формы ДНК [200]. Согласно данным Rong и сотр. (2007) вирус гепатита В успешно репродуцируется в культуре эндотелиальных клеток.

3.4.2 РНК-содержащие вирусы

Вирус иммунодефицита (HIV) и эндотелий. Большое количество исследований посвящено взаимодействию вируса HIV и эндотелиальных клеток, так как давно отмечено, что у ВИЧ-инфицированных пациентов отмечаются нарушения

эндотелий-зависимой вазодилатации, что приводит к дисфункции эндотелия и развитию сердечно-сосудистых заболеваний [261; 271]. Так, показано, что ВИЧ-инфекция связана с десятикратным увеличением риска венозного тромбоза по сравнению с неинфицированным населением того же возраста [70].

Экспериментальные исследования на трансгенных крысах подтверждают, что вирус HIV вызывает нарушения вазодилатации, связанные с уменьшением концентрации оксида азота, причем это уменьшение никак не связано с эндотелиальной NO-синтазой [181]. И экспериментальные, и клинические исследования отмечают взаимосвязь между вирусной нагрузкой и нарушениями эндотелий-зависимой вазодилатации [271; 127]. Кроме того, при ВИЧ-инфекции обнаруживаются циркулирующие маркеры повреждения эндотелия, такие как растворимые молекулы адгезии (ICAM, E-селектин) и прокоагулянтные белки (фактор фон Виллебранда и PAI-1) [158; 127].

Активация эндотелия при ВИЧ может происходить как прямо, так и опосредованно. Некоторые эндотелиальные клетки (клетки пупочной вены, стромы костного мозга и микрососудов) перmissive для вируса HIV [117]. Поступление вируса HIV в них может происходить через CD4 рецептор, либо через галактозил – церамидовый рецептор [279].

В случае опосредованного влияния на эндотелий воздействуют цитокины, вырабатываемые в ответ на заражение вирусом мононуклеаров и клеток адвентиции. Отмечают также усиление пролиферации и апоптоза эндотелиальных клеток в ответ на воздействие вируса HIV [Chi et al., 2000].

Не только сам вирус HIV, но и его белки gp120, gp140 и Tat могут активировать эндотелий напрямую [279; 109; 207; 177; 110]. Показано, что белок Tat вируса HIV оказывает плеiotропный эффект на сосудистый эндотелий [311]. При воздействии Tat белка на эндотелиальные клетки гемато - энцефалического барьера отмечалось увеличение продукции оксида азота, повышение уровня как eNOS, так и iNOS [61]. Кроме того, Tat белок вызывал апоптоз эндотелиальных клеток и увеличение их проницаемости [184], а также экспрессию адгезивных молекул (ICAM, E-селектин) и протромботических веществ (фактора фон Виллебранда,

ингибитора активатора плазминогена) [158; 127]. Предполагают, что Tat белок может действовать в качестве активатора транскрипции ключевых воспалительных молекул, путем активации сигнального пути NFκB или сигнального пути MAP-киназ [109; 311].

Оболочечный белок gp120, так же как и Tat белок, вызывает экспрессию адгезивных молекул (ICAM, E-селектин) и протромботических веществ. Показано, что gp120 оказывает цитотоксическое действие на культуру эндотелиальных клеток микрососудов мозга [177]. Другой оболочечный белок вируса HIV – gp140 – взаимодействует с рецептором CXCR4 в культуре эндотелиальных клеток микрососудов мозга человека, активируя эти клетки [207].

Вирусы – возбудители геморрагических лихорадок и эндотелий. Возбудители геморрагических лихорадок относятся к РНК-содержащим вирусам следующих семейств: тогавирусы (лихорадка Денге, кьясанурская лесная болезнь, омская геморрагическая лихорадка), буньявирусы (лихорадки долины рифт и Крым-Конго), аренавирусы (лихорадки Ласса, Аргентинская, Боливийская, Венесуэльская и Бразильская), филовирусы (лихорадки Марбург и Эбола) и флавивирусы (желтая лихорадка и омская геморрагическая лихорадка). Общим для этих вирусов является выраженный тропизм к эндотелиальным клеткам. Репродукция возбудителя в эндотелиальных клетках по данным электронной микроскопии сопровождается их набуханием и вакуолизацией, а затем отслаиванием от базальной мембраны и появлением в кровотоке десквамированных эндотелиоцитов.

Патогенез геморрагических состояний при геморрагических лихорадках отражает комплекс процессов:

- Разрегулирование компонентов систем, обеспечивающих гемостаз
- Анатомо-физиологическое обнажение стенок кровеносных сосудов
- Повышение проницаемости сосуда из-за нарушения его целостности
- Отставание иммунологически важных защитных реакций
- Формирование ДВС-симптоматики различной степени выраженности [37].

Рассмотрим особенности патогенеза наиболее изученных вирусов - возбудителей геморрагических лихорадок.

Вирус Денге и эндотелий. Известно, что вирус Денге вызывает высокопродуктивную инфекцию в эндотелиальных клетках, что играет центральную роль в патогенезе этого возбудителя [59]. Гистологические повреждения эндотелиальных клеток обычно ограничиваются отеком и увеличением межклеточных расстояний [81]. Инфекция вируса Денге для эндотелиальных клеток сопровождается появлением циркулирующих эндотелиоцитов и эндотелиальных маркеров ICAM и VCAM в кровяном русле, а также увеличением фактора фон Виллебранда, тканевого фактора (TF) и ингибитора активатора плазминогена (PAI) во время первой лихорадочной фазы заболевания [273]. Во время токсической фазы увеличивалось количество растворимого тромбомодулина (sTM), активатора плазминогена тканевого типа (t-PA) и ингибитора активатора плазминогена (PAI-1). Таким образом, наблюдалось повреждение эндотелиальных клеток и выход прокоагулянтных компонентов, активация коагуляционного каскада, приводящая к генерации тромбина, усиление фибринолитических факторов и истощение природных коагулянтов [64].

Существует предположение, что нарушение эндотелия опосредовано иммунопатологическими реакциями, а не только цитопатическим действием вируса, так как при заболевании происходит выброс провоспалительных цитокинов и химических медиаторов, которые повышают проницаемость эндотелия и, в конечном итоге, приводят к утечке плазмы [187].

Не только сам вирус Денге, но и его белки могут воздействовать на эндотелиоциты. Так, оболочечный белок вируса Денге может связываться с Fc - рецепторами, ICAM3, CD-14, HSP70/90, GRP78 [167; 138; 191; 114]. NS1 протеин вируса Денге преимущественно связывается с эндотелиальными клетками через специфические гликоаминогликаны (гепаран сульфат и хондроитин E) [60]. Показано также, что белки вируса Денге (E и NS1) имеют области аминокислотных остатков, гомологичные различным молекулярным факторам (факторам X, XI, VII). Предполагают, что молекулярная мимикрия между белками вируса Денге и моле-

кулами свертывания может вызывать перекрестную реактивность антител, которые препятствуют активации коагуляции [191]. Кроме того, антитела против NS1-белка вируса Денге могут выступать в роли аутоантител и вызывать апоптоз эндотелиальных клеток [318].

Вирусы Марбург и Эбола и эндотелий. Эндотелиальные клетки считаются вторичными клетками-мишенями при заболеваниях вирусами Эбола и Марбург. Первичная репродукция этих вирусов происходит в моноцитах/макрофагах и дендритных клетках. Цитокины, продуцируемые инфицированными вирусом моноцитами/макрофагами, – TNF- α и IFN- γ – провоцируют активацию эндотелия, вызывают фосфорилирование молекулы адгезии PECAM-1 и изменения кадгерин / катенинового комплекса сосудистого эндотелия, что приводит к увеличению сосудистой проницаемости и развитию шока [71; 52].

Кроме того, трансмембранный (VP40) и растворимый (sGP) гликопротеины вируса Эбола рассматриваются в качестве основных вирусных патогенных детерминант, способствующих повреждению сосудов [297; 309].

Эндотелиальные клетки восприимчивы к инфекциям большого числа вирусов, использующих в качестве рецепторов $\beta 1$ и $\beta 3$ интегрины, которые экспрессируются на поверхности эндотелиальных клеток. Так, *вирус лихорадки Западного Нила* использует $\alpha \nu \beta 3$ интегрин для входа вируса в клетку [104]. *Хантавирус* взаимодействует с этим же интегрином, увеличивая сосудистую проницаемость, путем воздействия на VEGF [134].

Парамиксовирусы и эндотелий. Получены данные о том, что *вирус кори* поражает эндотелиальные клетки кожи, мозга и других органов при острой и персистирующей инфекции, репродуцируется в них, используя для проникновения рецепторы CD 46 и CD150 [55; 193]. По другим данным, вирус кори может использовать для проникновения в эндотелиальные клетки рецептор $\alpha \nu \beta 3$ [151]. Заражение культуры эндотелиальных клеток вирусом кори показало повышение синтеза тканевого фактора и, следовательно, усиление прокоагулянтных свойств эндотелиоцитов. Данное изменение фенотипа может иметь отношение к тромботической васкулопатии, связанной с коревой инфекцией в естественных условиях [203].

Также известно, что в основе патогенеза высокопатогенного *вируса Нипах* (группа парамиксовирусов) лежит повреждение эндотелиальных клеток микрососудов. Этот вирус обычно вызывает васкулит, который характеризуется некрозом эндотелиоцитов и воспалительной инфильтрацией [197], но тропизм вируса Нипах к различным частям эндотелия различен. Вирус проникает в эндотелиальные клетки путем адсорбции на рецепторах ephrin (EB2) и ephrin (EB3), находящихся в основном в эндотелии сосудов головного мозга [121].

Вирус гепатита С и эндотелий. Вирус гепатита С (HCV) обнаруживали в аутопсийном материале эндотелия капилляров мозга. Клеточные линии (hBMES, hCMES/D3 – эндотелий сосудов мозга) поддерживали репродукцию вируса гепатита С. Рецепторами, с помощью которых HCV поступал в клетку, были CD81 и клаудин-1 [126].

Энтеровирусы и эндотелий. Многочисленные исследования показывают, что энтеровирусы, например *вирус Коксаки В*, могут модулировать сосудистый эндотелий в основном на уровне микрососудов. Инфекция Коксаки В в культуре эндотелиальных клеток приводила к экспрессии молекул адгезии ICAM-1 и VCAM-1 и увеличению количества провоспалительных цитокинов (IL-6, IL-8 и TNF- α) [320].

Вирус гриппа и эндотелий. Известно, что геморрагические реакции характерны и для гриппа. Еще в 50-х годах клиницисты отмечали такие клинические реакции при гриппе, как кровотечения, ДВС-синдром, геморрагические пневмонии. Последние особенно часто регистрировались в эпидемию гриппа H1N1 2009 – 2010гг.

Наблюдения клиницистов и экспериментальные данные о нарушениях процессов фибринолиза вирусами гриппа и их белками указывают на возможно важную роль эндотелия в патогенезе гриппа. Так, имеются данные о способности отдельных белков вируса гриппа модулировать гемостаз в условиях *in vitro* и *in vivo*, повышая активность активатора плазминогена [11, 12].

В эндотелиальных клетках артериол кур, зараженных высокопатогенным птичьим вирусом гриппа, были обнаружены сформированные фибриновые тром-

бы, в которых регистрировались вирусные антигены. Гематологический анализ периферической крови показал, что коагулопатии начинались на ранней стадии инфекции, когда вирусные антигены были обнаружены только в эндотелиальных клетках и в моноцитах/макрофагах [234; 216]. В более поздних исследованиях дисфункция эндотелия птиц, инфицированных вирусом H5N1, характеризовалась дессиминированным внутрисосудистым свертыванием крови (ДВС-синдром) [266].

В последние годы получены данные о детекции РНК и белков вируса гриппа в сердце и аорте мышей через 7 дней после инфицирования их гриппом [148]. Кроме этого, авторы отмечали нарушение морфологии эндотелия кровеносных сосудов, а в клетках эндотелия наблюдали изменение экспрессии ряда генов. Важно отметить, что все эти изменения регистрировались в отсутствии виремии. Получены важные данные о том, что энцефалопатия, наблюдаемая при гриппе, является следствием повреждения эндотелия сосудов мозга. Эти исследования были проведены с высокопатогенным птичьим вирусом H7N1 [94]. При этом оказалось, что эндотелиальные клетки сосудов мозга экспрессируют рецепторы Sial2,3Gal и Sial2,6Gal, то есть те рецепторы, которые необходимы для адсорбции вируса гриппа [94].

Исследования последних лет показали, что вирус гриппа (особенно H5N1) активирует преимущественно NFκB сигнальный путь, отвечающий за экспрессию провоспалительных цитокинов в эндотелиальных клетках, приводя к извращению иммунного ответа – «цитокиновому шторму» [291]. С другой стороны, оказалось, что стимуляция рецепторов 1 типа сфингозин – 1 фосфата на эндотелиальных клетках уменьшает цитокиновый шторм, миграцию дендритных клеток, антиген специфическую пролиферацию Т-клеток, защищая легочную ткань, но при этом, не влияя на продукцию самого вируса и вирус нейтрализующих антител [286].

Таким образом, экспериментальные данные подтверждают эпидемиологические и клинические наблюдения о способности вируса гриппа вызывать поражения кровеносных сосудов. Однако механизм подобных нарушений до сих пор неясен, поэтому эндотелиальные клетки должны стать объектом интенсивного исследования патогенеза гриппозной инфекции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

1.1 Вирусы

В качестве модельных вирусов были использованы три штамма вирусов гриппа типа А человека и птиц:

- 1) Эпидемический штамм вируса гриппа человека А/Брисбейн/10/2007 (H3N2);
- 2) реассортантный штамм вируса гриппа птиц А/курица/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/курица/Курган/5/05 (H5N1), модифицированный по сайту расщепления; в) нейраминидаза (NA) и мембранные белки (M) – от дикого вируса птиц А/курица/Курган/02/05 (H5N1);
- 3) Пандемический штамм А/Санкт-Петербург/2/2009(H1N1)pdm.

Все вирусы получены из лаборатории эволюционной изменчивости вирусов гриппа ФГБУ НИИ гриппа РАМН МЗ РФ. Наличие вируса в исследуемом материале оценивали по реакции гемагглютинирующей активности (РГА) и инфекционной активности по общепринятому методу.

1.2 Клеточные культуры.

1.2.1 Культура эндотелиальных клеток человека линии EAhy926

Изучение репродукции вируса гриппа типа А в клетках эндотелия и оценка последствий этой репродукции на функцию клеток проводилось в культуре клеток эндотелия человека EAhy926 любезно предоставленной д-ром Корой Джин Эйджел (Отдел патологии университета Северной Каролины, США). Культура была получена путем гибридизации первичной линии эндотелиальных клеток HUVEC с линией клеток аденокарциномы легкого человека А-549. Клетки линии EAhy926 воспроизводят основные морфологические, фенотипические и функциональные характеристики, присущие эндотелиальным клеткам макрососудов. Клеточная линия обладает развитым механизмом контактного торможения и не требует добавки ростовых факторов при культивировании. Клетки спонтанно экспрессируют фактор фон Виллебранда, t-РА, РАI-1, тканевой фактор.

Клеточную линию EAhy926 поддерживали в среде DMEM/F-12 с Хепесом и L-глутамином, содержащей 10% сыворотки эмбрионов коров («Биолот», Санкт-Петербург), 100 Ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина («Биолот», Санкт-Петербург) и добавку НАТ («Вектон», СПб). Культивировали клетки при 37⁰С во влажной атмосфере с 5% содержанием СО₂. Линия EAhy926 является адгезионной культурой, требующей пересева 1 раз в 3-4 дня. Пересев осуществляли по общепринятой методике, вызывая дезинтеграцию монослоя 5-10-минутной экспозицией в растворе Версена («Биолот», Санкт-Петербург). В работе использовали пластиковые флаконы (Sarstedt, Австрия) и плоскодонные планшеты для культивирования клеток (Nunc, Дания). Отсутствие контаминаций (в том числе микоплазмой) контролировали.

1.2.2 Культура клеток MDCK

Культура клеток MDCK была получена из коллекции клеточных культур НИИ гриппа. Среда для культивирования клеток (среда роста): DMEM («Биолот», Санкт-Петербург), содержащая 7% сыворотки крупного рогатого скота («Биолот», Санкт-Петербург) пенициллин/стрептомицин 100Ед/мл, гентамицин 10мг/мл («Биолот», Санкт-Петербург). Среда для выделения вируса: DMEM («Биолот», Санкт-Петербург), содержащая Трипсин – ТРСК («Биолот», Санкт-Петербург) в конечной концентрации 2 мкг/мл. Раствор для дезинтеграции монослоя: 4% раствор Версена («Биолот», Санкт-Петербург).

1.3 Методы оценки репродукции вируса гриппа типа А

1.3.1 Определение инфекционной активности вируса гриппа

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 («Биолот», Санкт-Петербург). Через час после адсорбции клетки отмывали поддерживающей средой DMEM, содержащей 2 мкг/мл трипсина ТРСК и инкубировали в той же среде в течение 72 часов.

Инфекционную активность вирусов гриппа определяли титрованием вирус-содержащего материала в суточной культуре EAhy926 с коэффициентом разведения 10 и рассчитывали по общепринятому методу Reed & Muench(1934). Инфекционную активность вирусов оценивали по ТЦД₅₀ (тканевая цитопатическая доза,

вызывающая 50% гибель клеток при инфицировании их вирусом) и в реакции гемагглютинации с куриными эритроцитами через 72 часа после заражения.

Репродукцию вирусов гриппа человека и птиц оценивали по наличию вирусной и матричной РНК вируса гриппа А в разрушенных клетках клеточной культуры EAhy926 с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени и электронно-микроскопического анализа.

1.3.2 Полимеразная цепная реакция

1. *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).

2. *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). Обратную транскрипцию проводили в реакционной смеси следующего состава: по 1mM каждого из дезоксинуклеозидтрифосфатов, 3 mM MgCl₂ ("Sigma"), 50 mM Трис-НСl (рН 8,3 при +25°C), 50 mM КСl, 10 mM дитиотрейтола DTT ("Serva") и 2,5М синтетической затравки (олиго d(N)6) либо для вирусов гриппа типа А - по 0,05М универсальных олигонуклеотидных праймеров (5'AGCAAAAGCAGG3', 5'AGTAGAAACAAGG3'), 1U/l ингибитора РНКаз ("Promega") при +37°C 1 час с M-MuV обратной транскриптазой ("Promega"), конечная концентрация 2,5 U/l.

3. ПЦР проводили в присутствии 0,2 mM каждого из дезоксинуклеозидтрифосфатов, 2,5 mM MgCl₂, 30 mM Трис-НСl (рН 8,5 при +25C), 16 mM (NH₄)₂SO₄, 0,1% Nonidet P40 ("Sigma"), по 0,40 М олигонуклеотидных праймеров и 2,5 Ед. Taq ДНК-полимеразы (ФГУН ЦНИИЭ Роспотребсоюза, Россия) на амплификато-

ре Rotor Gene 6000. Термальный профиль ПЦР: 4 мин 95°C; 1 мин 95°C, 1 мин 45°C, 3 мин 72°C - 40 циклов; 5 мин 72°C. Анализ данных проводили прямым сравнением значений C(t).

1.3.3 Электронная микроскопия.

Электронно-микроскопический анализ клеточной культуры EAhy926, интактной и инфицированной вирусами гриппа А (доза заражения вирусом 0,01 ТЦД₅₀ /кл; время репродукции вируса 24 часа), был выполнен на микроскопе JEM-1011. Клетки фиксировали в 2% глутаральдегиде на 0,1М какодилатном буфере (рН 7,4) в течение часа при комнатной температуре, постфиксировали в 1% растворе четырехоксида 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.

1.4 Иммуногистохимический анализ аутопсийного материала

Аутопсийный материал от пациентов, умерших в эпидемию 2009-2010 гг., был предоставлен Ленинградским областным патологоанатомическим бюро г. Санкт-Петербурга. Анализировали ткани методом иммуногистохимии с моноклональными антителами (МКА) к гемагглютанину (НА) и нуклеопротеину (NP) вируса гриппа и выявляли белки вируса гриппа с помощью системы визуализации

фирмы Novolink (Novocastra), включающей в себя реакцию с ДАБ-хромогеном, согласно инструкции производителя.

МКА к НА вируса гриппа H1N1pdm 09 и к NP белку вируса гриппа А были получены в лаборатории биотехнологии диагностических препаратов НИИ гриппа. В качестве отрицательного контроля был использован аутопсийный материал от пациентов, умерших с признаками прогрессирующей легочной дисфункции и явлениями острого респираторного дистресс-синдрома, не имевших диагноза «грипп».

1.5 Выделение поверхностные белков исследуемых штаммов вируса гриппа типа А

Получение поверхностных белков вируса гриппа типа А H1N1pdm 09 осуществляли следующим образом. На первом этапе производили очистку и концентрацию вирусосодержащей аллантаоисной жидкости проводили по следующей схеме:

1. Осветление вирусосодержащей аллантаоисной жидкости (g 1320, +4⁰C, центрифуга К-70, ГДР).
2. Дифференциальное центрифугирование (34000 об/мин, 45 мин, +4⁰C, центрифуга L8, ротор 45 ti, Beckman, США) с последующим ресуспендированием в Na-ацетатном буфере (50 mM ацетат Na, 2 mM NaCl, 0,2 mM EDTA; pH 7,0).
3. Обработка материала фреоном-113 с последующим центрифугированием (2400 g, 15 мин, +4⁰C, центрифуга К-23, ГДР).

Сконцентрированный и очищенный вирус разрушали 7% октилглюкозидом в течение 2 ч при +4⁰C. Материал центрифугировали при 15000 об/мин в течение 1 ч (ротор Beckman SW50.1). К супернатанту, содержащему НА и NA, добавляли 2 %-ный водный раствор бромиды 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). На 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).

Поверхностные белки (гемагглютинин и нейраминидаза) вирусов гриппа типа А/Брисбейн/10/2007 (H3N2) и А/курица/Курган/5/05 NS1-81/5:3 (H5N1) были получены и любезно предоставлены д.б.н. И.Н.Жилинской.

1.6 Оценка метаболизма эндотелиальных клеток линии EAhy926 с помощью МТТ-теста

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

Клетки EAhy926 вносили в 96-луночные планшеты в концентрации 32000 кл/лунку в 100 мкл культуральной среды. На следующий день клетки либо заражали вирусами по общепринятой методике, либо обрабатывали поверхностными белками исследуемых штаммов вируса в разной концентрации и с разным временем экспозиции. После экспозиции клеток или с вирусом, или с белком культу-

ральную среду удаляли, к клеткам добавляли раствор МТТ-реактива (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, ICN, США) в бессывороточной культуральной среде в концентрации 5 мг/мл и инкубировали 3 часа в CO₂ - инкубаторе. Затем раствор красителя удаляли и заменяли на 96⁰ спирт на 30 минут. Далее планшет помещали в спектрофотометр Thermofisher VarioScan и снимали показания при длине волны 540 нм.

1.7 Определение активности каспазы-3 иммуноцитохимическим методом

Для иммуноцитохимического определения активности каспазы-3 суточный монослой клеток EAhy926 выращивали на предметных стеклах, предварительно покрытых полилизинном. Затем клетки либо заражали вирусами по общепринятой методике [Жилинская и др., 2012], либо обрабатывали поверхностными белками исследуемых вирусов в разной концентрации и с разным временем экспозиции. Зараженные клетки и клетки без заражения и обработки белками фиксировали смесью ацетон:этанол (1:1) в течение 0,5 часа, после чего их обрабатывали с помощью набора моноклональных антител для выявления каспазы-3 (фирма Novocastra, Англия). Визуализацию первичных антител проводили вторичными антителами, конъюгированными с полимером, сцепленным с пероксидазой (фирма Novolink, Англия). Далее следовала окраска диаминобензидином (ДАБ хромогеном), который полимеризуется с образованием коричневого окрашивания и хорошо контрастирует с клеточным ядром, докрашенным гематоксилином Майера (голубое окрашивание).

1.8 Оценка жизнеспособности эндотелиальных клеток линии EAhy926

Определенное количество эндотелиальных клеток (2 500 000) 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. Жизнеспособность клеток оценивали методом проточной цитометрии на приборе Epics XL (Becton Coulter, США), снабженный аргоновым лазером с длиной волны 488 нм, с использованием пропидия иодида (PI), в концентрации, окрашивающего ДНК погибших клеток и не проникающего в живые клетки. Оценку количества погибших и живых клеток в образцах проводили, используя двухпараметрическую гистограмму, отображающую PI-окраску клеток в зависимости от прямого светорассеяния.

1.9 Выявление ранне-апоптотических эндотелиальных клеток линии EAhy926

Для оценки процесса апоптоза 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% рас-

творе ЭДТА (Биолот, РФ) и переносили клеточную суспензию в микропробирки. Для определения количества клеток в состоянии апоптоза использовали аннексин V, конъюгированный с FITC (Annexin V kit 1, BD Biosciences, США). Эндотелиальные клетки окрашивали аннексином V согласно инструкции производителя. Анализ образцов производили с помощью проточной цитометрии на приборе Erics XL (Beckman Coulter, США), снабженном аргоновым лазером с длиной волны 488 нм. Опыт производили в трех повторностях, количество клеток в состоянии апоптоза выражали в процентах от общего количества анализируемых клеток.

1.10 Определение активности тканевого активатора плазминогена

1.10.1 Определение активности тканевого активатора плазминогена в эндотелиальных клетках линии EAhy926

Активность тканевого активатора плазминогена (t-PA) *in vitro* определяли по методу Кудряшова и сотр.(1974). Суточный монослой клеток EAhy926 выращивали в культуральных пробирках. 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 замораживали при -20°C . После оттаивания суспензию наносили на стандартные фибриновые пластины (прогретые и непрогретые 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 тканевого активатора плазминогена.

1.10.2 Определение активности тканевого активатора плазминогена *in vivo*

Активность активатора плазминогена (t-PA) *in vivo* определяли по общепринятому методу в эуглобулиновой фракции плазмы крови крыс. Гемагглютинин и нейраминидазу в дозе 50 мкг/кг тела вводили белым беспородным лабораторным крысам весом 200г (10 мкг белка в объеме 0,3мл) и через 10 мин брали кровь из яремной вены (vena jugularis) с консервантом 3,8% NaCl. Получали бедную тромбоцитами плазму крови центрифугированием крови при 3000 об/мин в течение 10 мин. Активность тканевого активатора плазминогена определяли на стандартных (стабилизированных) фибриновых пластинах (по разнице зон лизиса на прогретых при 86⁰С в течении 30 мин и непрогретых пластинах).

1.11 Компьютерный поиск сходных аминокислотных последовательностей в белках человека и вируса гриппа

Поиск сходных последовательностей между белками и регуляторными пептидами человека и белками вируса гриппа проводили с помощью компьютерного анализа. Компьютерный поиск подобий в первичной структуре белков опирается на « систему весов», характеризующую допустимость замены одной аминокислоты на другую (в том числе и на саму себя), ибо подобие фрагментов последовательностей означает соответствие аминокислот одного фрагмента аминокислотам другого в порядке их следования; подобие тем выше, чем больше сумма весов замен. Содержательно высокий вес замены означает сохранение в каком-то смысле свойств заменяемой аминокислоты.

Существует несколько подходов к построению матрицы весов: 1)единичная матрица; 2)матрица, основанная на генетическом коде; 3)структурно-генетическая

матрица;4) матрица Дэйхоффа. В настоящей работе использовали матрицу Дэйхоффа, видоизмененную Стаденом, пользующуюся наибольшей популярностью. При последовательном продвижении пептида вдоль белка выделяли такие участки, для которых минимальна вероятность случайно получить соответствующее этим участкам подобие (сумму весов на замены), то есть протяженность соответствующих участков сходства не обусловлена случайными причинами. Реализовав этот алгоритм, можно точно указать границы участков сходства, а также вероятность получения такого сходства по случайным причинам (вероятность указывается в единицах среднеквадратичного отклонения стандартного нормального распределения). Программы, основанные на этом алгоритме доступны в Интернете на сайте <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. В точном указании границ участков наибольшего сходства состоит основное преимущество этого алгоритма в сравнении с традиционным алгоритмом поиска локальных сходств просмотром окна с фиксированной длиной.

В алгоритме поиска локальных сходств белков для просмотра использовано окно размером (длина сравниваемых фрагментов белков) в 13 аминокислот и применен более строгий критерий родства [44]. Длина окна просмотра была predeterminedена иммунологическим контекстом: 13 аминокислот - наименьшая длина иммуоэпитопов для главного комплекса гистосовместимости типа II. Сравнимые фрагменты считались родственными, если в их последовательностях содержалось не менее 7 идентичных позиций аминокислот, что позволяло изначально исключить фрагменты с низким родством и тем самым селективировать наиболее близко родственные последовательности. В последних дополнительно отмечались также позиции неидентичных изофункциональных аминокислот. Источником белков служили доступные по Интернету базы данных белков (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov> и <http://platform.gisaid.org>).

1.12 Статистическая обработка данных

Статистическую обработку данных проводили с применением программного обеспечения Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Глава 1 Репродукция вируса гриппа типа А в эндотелиальных клетках

1.1 Инфекционная активность исследуемых вирусов гриппа в культуре клеток EAhy926

Для оценки возможности репродукции вируса гриппа типа А (подтипов H3N2 H5N1 и H1N1pdm 09), культуру клеток эндотелия инфицировали 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 с куриными эритроцитами (таблица 3).

Как видно из таблицы 3, все исследуемые вирусы были способны репродуцироваться в клеточной культуре EAhy926. Так, через 24 часа после заражения, инфекционная активность вирусов А/Брисбейн/10/2007 (H3N2) и А/Курган/5/05/NS1-81/5:3 (H5N1) составляла 2,3 и 2,4 lg ТЦД₅₀/мл соответственно. Инфекционный титр вируса А/Санкт-Петербург/2/2009 (H1N1) pdm 09 был несколько выше – 3,5 lg ТЦД₅₀/мл. Титр вирусов в культуральной жидкости в реакции гемагглютинации составлял 1/16 для вируса А/Курган/5/05/NS1-81/5:3 (H5N1) и 1/32 для вирусов А/Брисбейн/10/2007(H3N2) и А/Санкт-Петербург/2/2009 (H1N1) pdm 09.

Через 48 часов после инфицирования клеток исследуемыми вирусами, их инфекционная активность возрасла на 0,5 – 1,0 lg ТЦД₅₀/мл. Гемагглютинирующая активность вирусов также возрасла до 1/64 – 1/128.

Таблица 3

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 (H3N2)	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 (H5N1)	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 (H1N1) 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

Культивирование вируса гриппа в клетках эндотелия в течение 72 часов приводило к увеличению инфекционной активности вируса, приблизительно на 1,0 lg ТЦД₅₀/мл, по сравнению с культивированием вируса в течение 24 часов и, приблизительно, на 0,5 lg ТЦД₅₀/мл – в течение 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 3). 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.

С целью уточнения оптимальных условий заражения линии EAhy926 исследуемыми вирусами гриппа, была проведена серия опытов с использованием в поддерживающей среде трипсина в концентрации 2 мкг/мл и без него. Репродукцию оценивали в РГА с куриными эритроцитами, для сравнения была взята культура клеток MDCK (Таблица 4). Как видно из таблицы 4, при отсутствии в под-

держивающей среде клеток EAhy926 трипсина, репродукция вирусов гриппа наблюдалась, но была значительно ниже, чем в присутствии трипсина. Та же зависимость наблюдалась и для культуры MDCK. Так, гемагглютинирующая активность вирусов без использования в поддерживающей среде трипсина составляла 1/4 – 1/8 для обеих клеточных культур, а с использованием трипсина возрастала в 4 – 5 раз для культуры клеток EAhy926 и в 6 – 8 раз для культуры клеток MDCK соответственно.

Таблица 4.

Сравнение репродукции вируса гриппа А в клетках эндотелия EAhy926 и в MDCK с использованием в поддерживающей среде трипсина и без него.

Вирусы гриппа	Титр в РГА (1% куриные эритроциты). Через 72 часа после заражения без трипсина.		Титр в РГА (1% куриные эритроциты). Через 72 часа после заражения с трипсином.	
	EAhy926	MDCK	EAhy926	MDCK
А/Брисбейн/10/2007 (H3N2)	1/4	1/8	1/128	1/1024
А/Курган/5/05/NS1-81/5:3 (H5N1)	1/4	1/8	1/64	1/128
А/Санкт-Петербург/2/2009 (H1N1) pdm 09	1/4	1/4	1/128	1/256

На основании полученных данных все дальнейшие опыты мы проводили с использованием в поддерживающей среде трипсина в концентрации 2 мкг/мл.

1.2 Выявление РНК, исследуемых вирусов, в культуре клеток EAhy926

Для оценки репродукции исследуемых вирусов в эндотелиальных клетках линии EAhy926 была проведена ОТ-ПЦР. Эндотелиальные клетки инфицировали исследуемыми вирусами (заражающая доза 0,01ТЦД₅₀/кл), и через 24 часа после заражения были разрушены замораживанием и оттаиванием. Результаты ПЦР представлены в таблице 5.

Таблица 5.

Результаты ОТ – ПЦР.

№	Имя	Тип	СТ	Сред. Ct
22	Brisbane1	Образец	5,25	
23	Spb1	Образец	6,15	7,54
24	Kurgan1	Образец	4,83	
25	KK1	Образец	neg	neg
26	KK2	Образец	neg	neg
48	Brisbane1	Образец	8,51	
49	Spb1	Образец	8,94	
50	Kurgan1	Образец	6,76	
51	KK1	Образец	neg	
52	KK2	Образец	neg	
22-26	Forward	Группа		15,20
48-52	Reverse	Группа		15,10

Обозначения: Brisbane1 – вирус гриппа А/Брисбейн/10/2007(Н3N2); Spb1 – вирус гриппа А/Санкт-Петербург/2/2009 (Н1N1) pdm 09; Kurgan1 - А/Курган/5/05/NS1-81/5 :3 (Н5N1);KK1 и KK2 – незараженные клетки, служившие контролем.22-26 – выявление вирионной РНК в исследуемом материале;48-52 – выявление матричной вирионной РНК в исследуемом материале.

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. Как видно из таблицы 5 в эндотелиальных клетках, зараженных вирусом гриппа А/Брисбейн/10/2007 (Н3N2), при анализе с праймером на мРНК значение Ct составляло 8,51. Для двух других вирусов А/Курган/5/05/NS1-81/5:3 (Н5N1) и А/Санкт-Петербург/2/2009 (Н1N1) pdm 09 были получены аналогичные данные. Ct – пороговое значение цикла, которое обратно пропорционально логарифму начального количества копий. Эти данные

соответствуют 4-5 циклам репродукции вируса гриппа типа А, через 24 часа после заражения клеток EAhy926. Наличие синтеза как вирусной РНК (вРНК), так и матричной РНК (мРНК) свидетельствует о полноценной вирусной репродукции.

1.3 Выявление вирусных частиц исследуемых вирусов, в культуре клеток EAhy926 электронно-микроскопическим методом

Для подтверждения возможности репродукции исследуемых вирусов в эндотелиальных клетках линии EAhy926 был проведен электронно - микроскопический анализ культуральной среды инфицированных клеток. Вирусосодержащую жидкость отбирали через 24 часа после инфицирования культуры клеток исследуемыми вирусами (заражающая доза 0,01 ТЦД₅₀/кл).

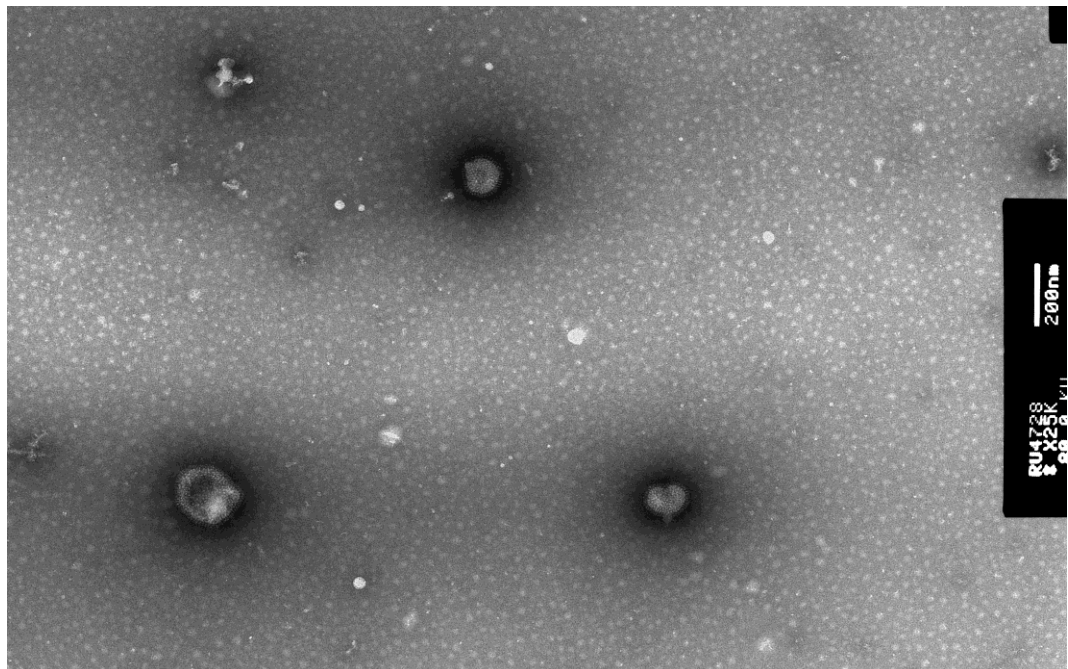


Рисунок 11. Электронограмма вирионов, через 24 часа после инфицирования клеток EAhy926 вирусом А/Санкт-Петербург/2/2009 (H1N1) pdm 09.

На рисунке 11 можно видеть полноценные вирусные частицы вируса гриппа А/Санкт-Петербург/2/2009 (H1N1) pdm 09. Аналогичная картина была характерна для штаммов А/Брисбейн/10/2007(H3N2) и А/Курган/5/05/NS1-81/5:3 (H5N1).

1.4 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, сердца и мозга пациентов, умерших в эпидемию 2009-2010 гг. Исследование проводили иммуногистохимически с помощью моноклональных антител к гемагглютнину (НА) и нуклеопротеину (NP) вируса гриппа. Была использована концентрация МКА 1:10000, так как при такой концентрации было наиболее четкое отличие в окрашивании клеток контроля и опыта.

1.4.1 Иммуногистохимический анализ аутопсийного материала легких

Результаты исследования представлены на рисунке 12.

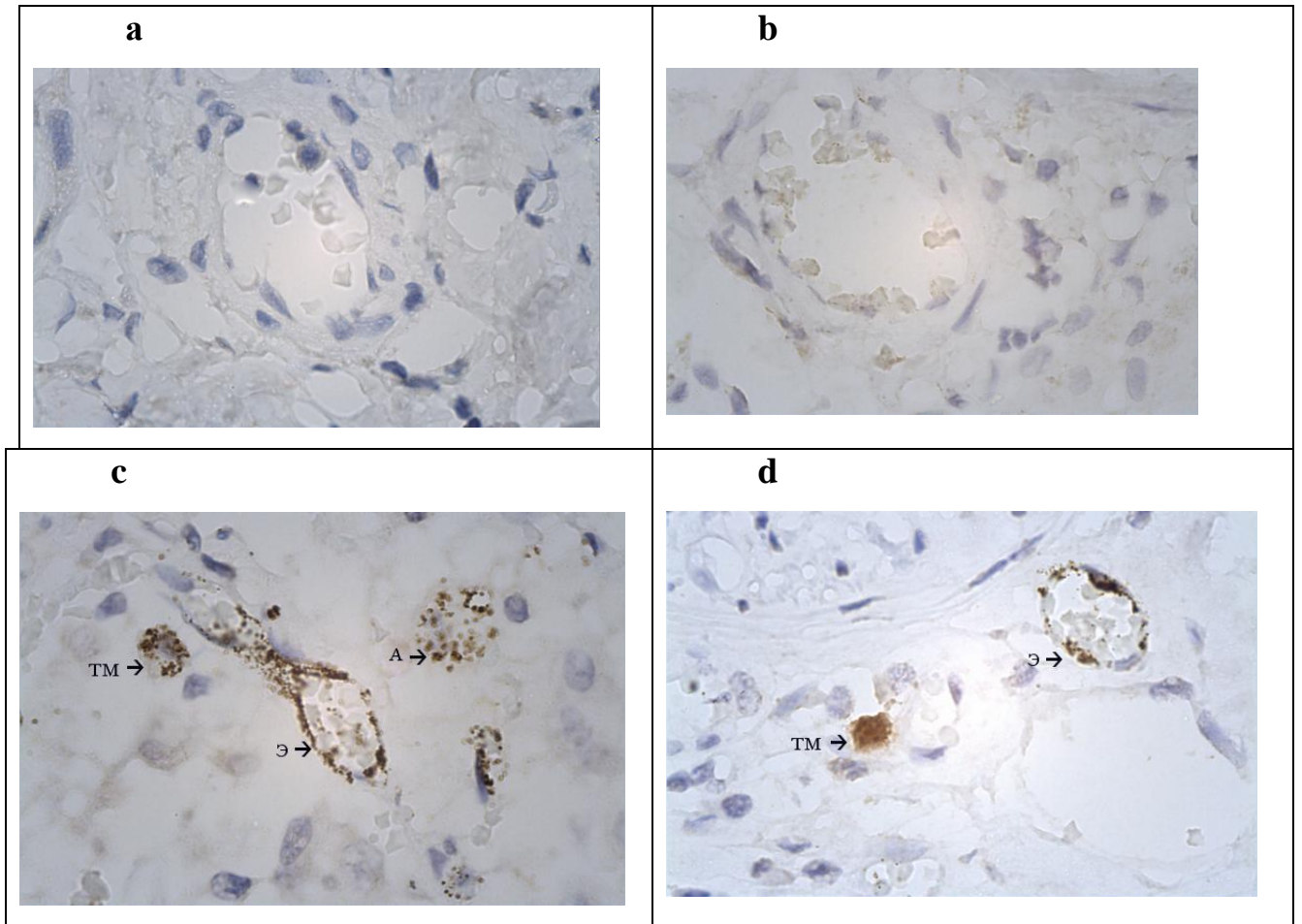


Рисунок 12. Иммуногистохимический анализ локализации HA и NP вируса гриппа А (H1N1) pdm 09 в аутопсийном материале легких пациентов.

а, b – 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).

Для выявления репродукции вируса гриппа в эндотелии кровеносных сосудов был проведен иммуногистохимический анализ аутопсийного материала легких восьми пациентов, умерших в эпидемию 2009-2010гг. Как видно на рисунке 12 (с), HA вируса гриппа H1N1 pdm 09 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 отсутству-

ет в интактных клетках. NP антиген этого вируса (рис.12d) регистрировали в тех же клетках и тканях, что и HA, но NP был локализован в ядрах клеток, что отражает особенности репродукции вируса гриппа.

1.4.2 Иммуногистохимический анализ аутопсийного материала мозга

Исследование аутопсийного материала из мозга пациентов, умерших в эпидемию 2009-2010 гг., проводили с помощью только моноклональных антител к гемагглютнину (HA) вируса гриппа. Результаты исследований представлены на рисунке 13.

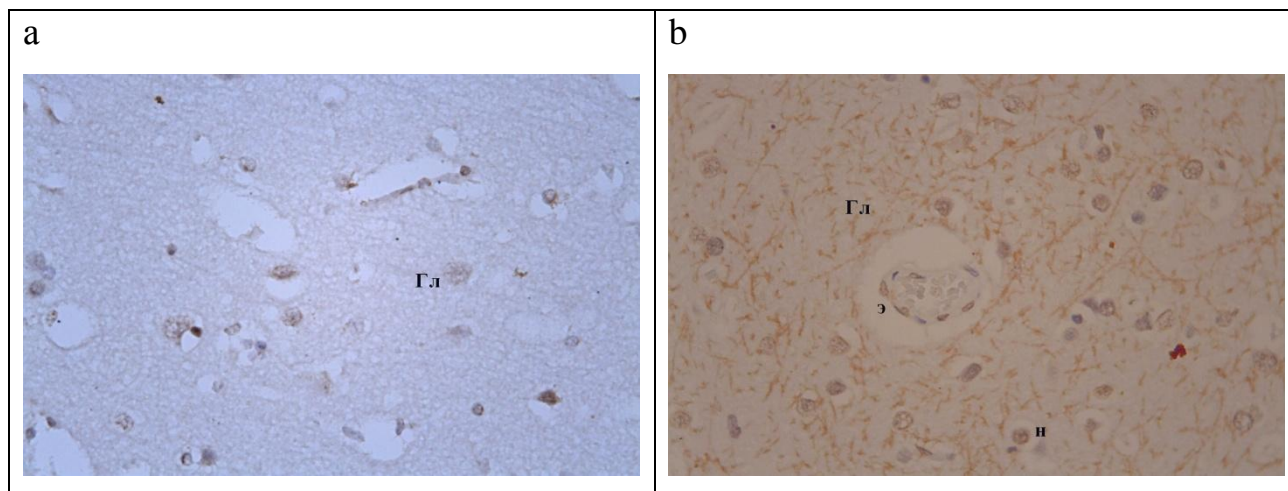


Рисунок 13. Иммуногистохимический анализ локализации HA вируса гриппа А (H1N1) pdm 09 в аутопсийном материале мозга пациентов.

а – интактные клетки; б – локализация HA в клетках: эндотелия сосудов и клетках глии. Обозначения: Гл – глиальные клетки; Н - нейрон; Э -эндотелий.

(Увеличение 40X; окрашивание клеток ДАБ-хромогеном с последующей окраской гематоксилином Майера).

Как видно из рис.13 (b) гемагглютинин вируса гриппа H1N1 pdm 09 был локализован на плазматической мембране и в цитоплазме клеток эндотелия мелких кровеносных сосудов, глиальных клеток мозга и в нейронах.

1.4.3 Иммуногистохимический анализ аутопсийного материала сердца

Исследование аутопсийного материала сердец пациентов, умерших в эпидемию 2009-2010 гг., проводили с помощью моноклональных антител к гемагглютнину(НА) и нуклеопротеину(NP) вируса гриппа. Результаты исследований представлены на рисунке 14.

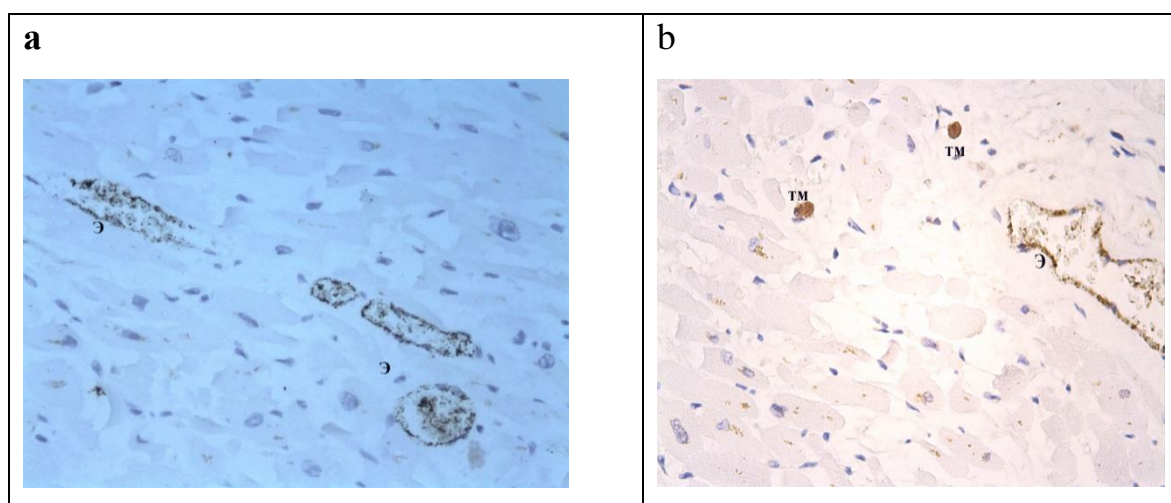


Рисунок 14. Иммуногистохимический анализ локализации НА и NP вируса гриппа А (H1N1) pdm 09 в аутопсийном материале сердец пациентов.

а – локализация НА в сердце; б – локализация NP в сердце. Обозначения: Э - эндотелий; ТМ - тканевой макрофаг.

(Увеличение 40X; окрашивание клеток ДАБ-хромогеном с последующей окраской гематоксилином Майера).

Как видно на рисунке 5а, НА вируса гриппа H1N1 pdm был локализован на плазматической мембране и в цитоплазме клеток эндотелия мелких кровеносных сосудов. NP антиген этого же вируса (рис.5 б) регистрировали в эндотелии мелких кровеносных сосудов и тканевых макрофагах, но NP был локализован в ядрах клеток, что, как мы уже отмечали, отражает особенности репродукции вируса гриппа. Наличие антигенов – НА и NP – вируса гриппа в кардиомиоцитах не обнаружено.

Таким образом, данные полученные вирусологическим, молекулярно – биологическим, электронно - микроскопическим и иммуногистохимическим методом, указывают на то, что исследуемые вирусы 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.

Глава 2 Дисфункция клеток эндотелия при воздействии вируса гриппа типа А и его поверхностных белков

Эндотелиальная дисфункция – универсальный дефект сосудистой стенки, возникающий как ответ на действие разнообразных повреждающих факторов. В настоящее время под дисфункцией эндотелия понимают дисбаланс между медиаторами, обеспечивающими в норме оптимальное течение всех эндотелийзависимых процессов. В качестве критериев оценки дисфункции были использованы: изменения морфологии эндотелиоцитов, угнетение их метаболизма, развитие апоптоза и активация тканевого активатора плазминогена.

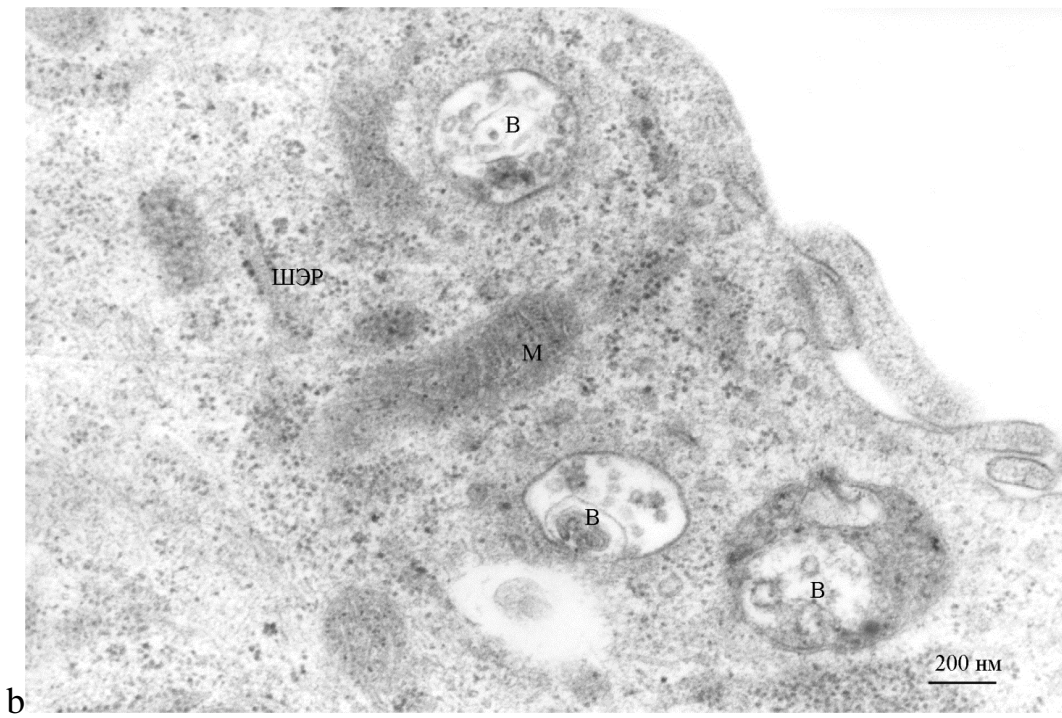
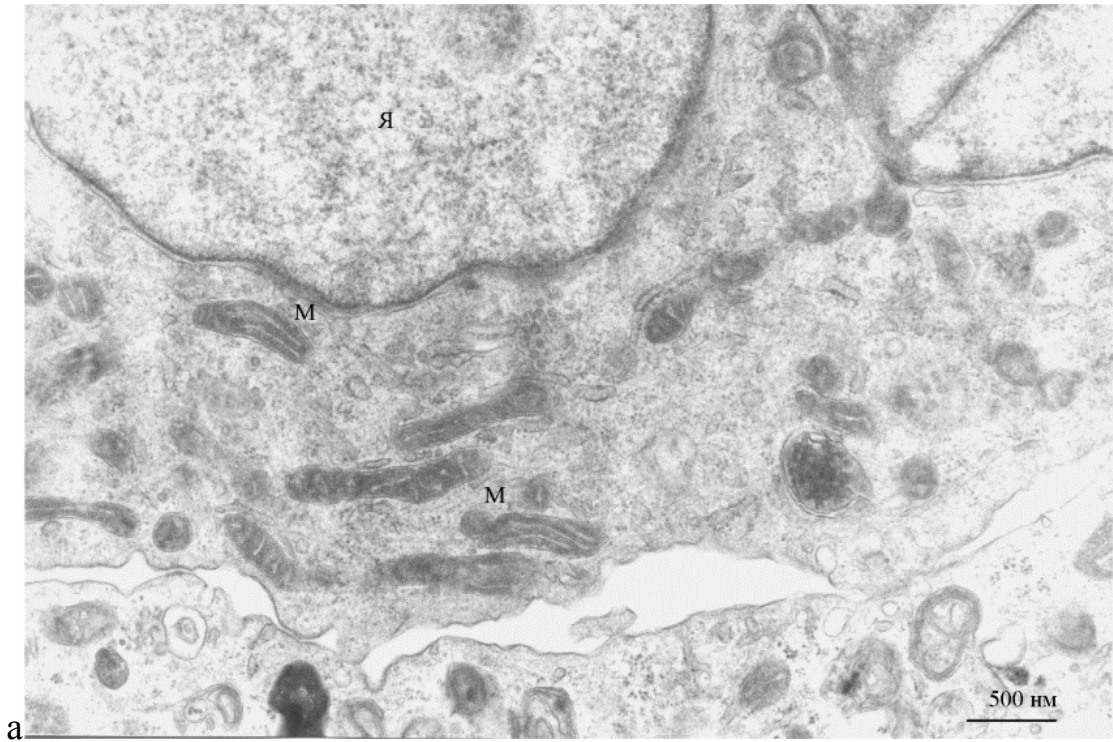
Поскольку весь репродуктивный цикл вируса гриппа осуществляется с использованием метаболических и генетических ресурсов клетки – хозяина логично рассматривать патогенез гриппа в первую очередь на клеточном уровне (по изменению морфологии и метаболизма).

Развитие апоптоза и активация тканевого активатора плазминогена являются высокоспецифичными критериями и широко применяются для изучения дисфункции эндотелия в клинической практике.

2. 1 Электронно-микроскопический анализ морфологии клеточной культуры эндотелия, инфицированной вирусом гриппа

Электронно-микроскопический анализ эндотелиальных клеток проводился через 24 часа после их заражения исследуемыми вирусами в дозе 0,01 ТЦД₅₀/кл. Данные электронно-микроскопического анализа клеток эндотелия, интактных и зараженных исследуемыми вирусами, приведены на рисунке 15.

Как видно из рисунка 15b в эндотелиальных клетках, инфицированных вирусом А/Брисбейн/10/2007 (H3N2) было отмечено увеличение количества цистерн шероховатого эндоплазматического ретикулума и увеличение количества вакуолей по сравнению с интактными клетками, служившими контролем (Рис. 15a). Изменения морфологии клеток, инфицированных вирусом А/Санкт-Петербург/2/2009 (H1N1) pdm 09 (Рис. 15d) были аналогичны таковым при инфицировании вирусом А/Брисбейн/10/2007 (H3N2). На рисунке 15 c, который показывает изменения морфологии эндотелиальных клеток, инфицированных вирусом А/Курган/5/05/NS1-81/5:3(H5N1) кроме вышеупомянутых изменений морфологии можно видеть увеличение количества миеоидных телец и увеличение количества диктиосом и расширение цистерн аппарата Гольджи.



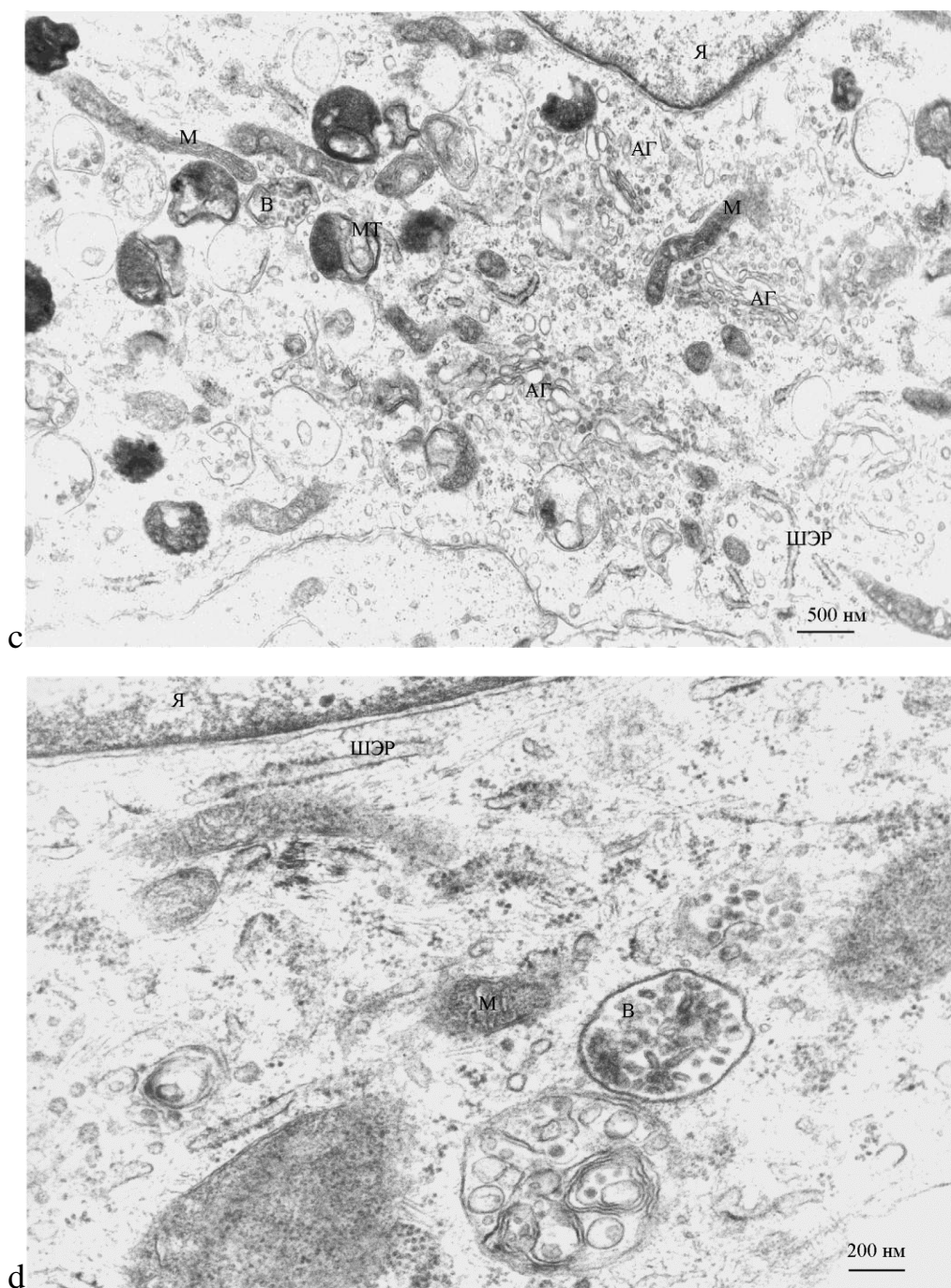


Рисунок 15. Электронограмма эндотелиальных клеток EAh926, инфицированных вирусом гриппа (через 24 часа после заражения):

а – интактные клетки; б – клетки, инфицированные вирусом А/Брисбейн/10/2007 (H3N2); с – клетки, инфицированные вирусом А/Курган/5/05/NS1-81/5:3 (H5N1); д – клетки, инфицированные вирусом А/Санкт-Петербург/2/2009 (H1N1) pdm 09. Обозначения: Я – ядро; М – митохондрия; ШЭР – шероховатый эндоплазматический ретикулум; В – вакуоль; МТ – миелиодные тельца; АГ – аппарат Гольджи.

2.2 Изменение метаболизма эндотелиальных клеток EAhy926 при воздействии исследуемых штаммов вируса гриппа типа А и его поверхностных белков

Изменение метаболизма клеток эндотелия оценивали по суммарной активности митохондриальных и цитоплазматических дегидрогеназ с помощью МТТ-теста (см. раздел 3.6). Общая дегидрогеназная активность характеризует такие важные аспекты клеточного метаболизма как процесс клеточного дыхания и продукция АТФ.

2.2.1 Изменение метаболизма эндотелиальных клеток EAhy926 при воздействии исследуемых штаммов вируса гриппа

Клетки EAhy926 инфицировали вирусом гриппа и измеряли общую дегидрогеназную активность в период от 0 до 72 часов, при двух дозах заражения – 0,01ТЦД₅₀/кл и 0,001ТЦД₅₀/кл. В качестве контроля были взяты клетки неинфицированной культуры, общая дегидрогеназная активность которых была принята за 100 %. Результаты исследований представлены на рисунке 16.

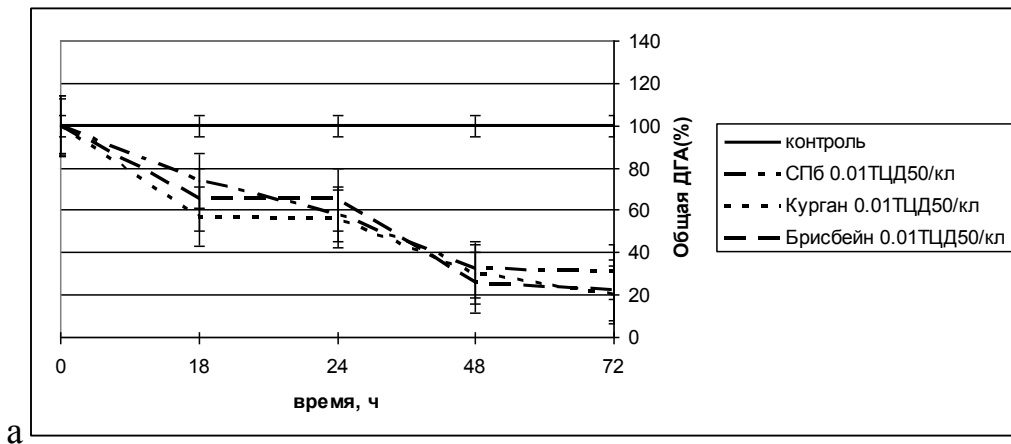
Из рисунка 16а видно, что снижение общей дегидрогеназной активности при заражении вирусами в дозе 0,01 ТЦД₅₀/кл значительно превосходило тот же показатель при меньшей дозе заражения 0,001 ТЦД₅₀/кл (Рис.16в) и зависело от времени репродукции вирусов. Так, через 18 часов после заражения вирусом А/кураца/Курган/5/05 NS1-81/5:3, метаболизм клеток снижался на 42 % при дозе 0,01 ТЦД₅₀/кл и на 24 % при дозе 0,001 ТЦД₅₀/кл. Дальнейшее снижение общей дегидрогеназной активности наблюдалось через 36 часов после заражения и со-

ставляло к 48 часам 60 % при дозе 0,01 ТЦД₅₀/кл и 46 % при дозе 0,001 ТЦД₅₀/кл, соответственно.

Кривая изменения общей дегидрогеназной активности клеток при инфицировании вирусом А/Брисбейн/10/2007 (H3N2) аналогична таковой для вируса А/курица/Курган/5/05 NS1-81/5:3 (H5N1), при дозе заражения 0,01 ТЦД₅₀/кл. Так, через 18 часов после заражения клеток вирусом А/Брисбейн/10/2007 метаболизм снижался на 35 %, а к 48 часам на 53 %. При заражении вирусом в дозе 0,001 ТЦД₅₀/кл угнетение метаболизма до 18 часов было незначительно – 8 %, затем нарастало и к 48 часам составляло 48 % (Рис.16а).

Кривая изменения общей дегидрогеназной активности клеток после инфицирования их вирусом А/Санкт-Петербург/2/2009 (H1N1) pdm 09 имеет более пологий характер. Через 24 часа после заражения этим вирусом, метаболизм снижался на 24 % при заражении вирусом в дозе 0,01 ТЦД₅₀/кл и 10 % – в дозе 0,001 ТЦД₅₀/кл, соответственно. Дальнейшее угнетение метаболизма клеток к 48 часам при заражении вирусами в дозе 0,01 ТЦД₅₀/кл составляло 54 %, а в дозе 0,001 ТЦД₅₀/кл – 38 % (Рис.16а, б).

Характер воздействия исследованных вирусов на метаболизм клеток эндотелия аналогичен, статистически значимых отличий не обнаружено.



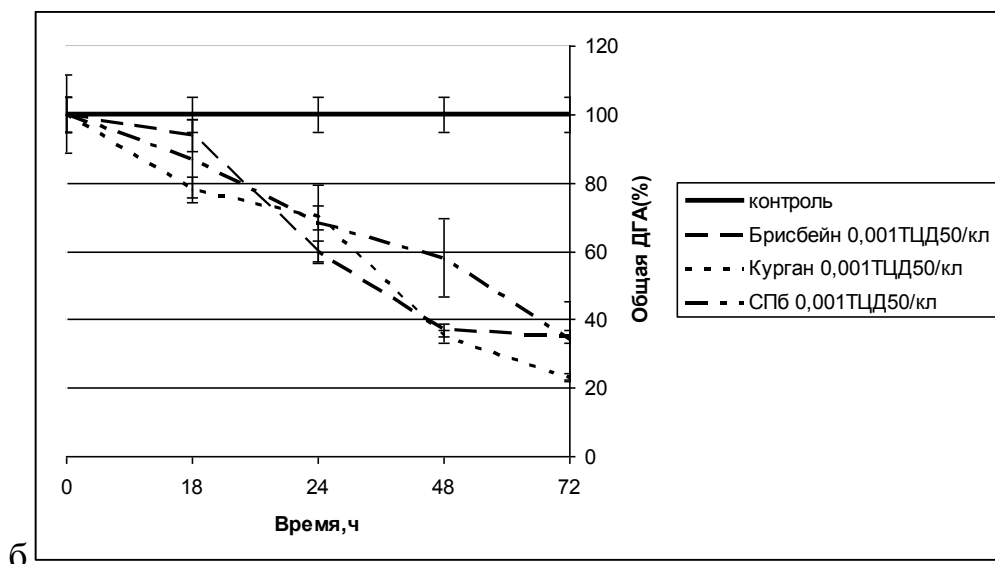


Рисунок 16. Изменение общей дегидрогеназной активности в культуре клеток EAh926 при воздействии исследуемых штаммов вируса гриппа типа А:

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/кураца/Курган/5/05 NS1-81/5:3 (H5N1); СПб – вирус гриппа А/Санкт-Петербург/2/2009(H1N1) pdm 09, $p < 0.01$.

2.2.2 Изменение метаболизма клеток эндотелия при воздействии гемагглютиниона исследуемых штаммов вируса гриппа

Для изучения активности клеточных дегидрогеназ под воздействием поверхностных белков вируса гриппа, клетки обрабатывали гемагглютинином в концентрациях 10 – 100 мкг/мл в течении от 0 до 72 часов.

На рисунке 17а представлены данные о воздействии гемагглютиниона вируса гриппа А/Брисбейн/10/2007(H3N2) на клетки эндотелия по сравнению с контролем. При обработке клеток НА взятым в наибольшей концентрации – 100мкг/мл – угнетение метаболизма клеток к 24 часам составило 30 % (Рис.17а, нижняя кривая), к 48 часам – 70 %, а к 72 часам 80 %, что означает практически полную гибель клеток. НА в концентрации 50 мкг/мл, также вызывал угнетение метаболиз-

ма. Так, через 24 часа после воздействия НА угнетение метаболизма клеток составило 10 %, через 48 часов – 25 %, а через 72 часа – 42 %. НА в концентрации 10 мкг/мл (Рис.17а, верхняя кривая) не оказывал существенного влияния на метаболизм клеток. Снижение общей дегидрогеназной активности составило 5 % через 48 часов после воздействия и 20 % через 72 часа, соответственно.

НА двух других исследуемых вирусов показали аналогичную зависимость угнетения метаболизма клеток эндотелия от концентрации белка. Так, НА вирусов А/курица/Курган/5/05 NS1-81/5:3 (H5N1) и А/Санкт-Петербург/2/2009(H1N1) pdm 09, взятые в концентрации 100 мкг/мл (Рис.17б и 17в, нижние кривые), вызывали угнетение метаболизма, которое к 24 часам составило 32 и 30 % соответственно, к 48 часам 65 и 60 % и к 72 часам – 80 % для обоих гемагглютининов.

НА вируса А/Санкт-Петербург/2/2009(H1N1) pdm 09, взятый в концентрации 50 мкг/мл (Рис.17б, средняя кривая) показал снижение общей дегидрогеназой активности клеток на 10 % к 24 часам, на 20 % к 48 часам и на 40 % к 72 часам после воздействия. Тот же гемагглютинин в концентрации 10 мкг/мл оказывал воздействие на клетки только после 48 часов, снижая метаболизм клеток на 5 % и через 72 часа – на 15 %.

Воздействие на клетки гемагглютининов вируса А/Санкт-Петербург/2/2009 (H1N1) pdm 09, взятого в концентрациях 50 мкг/мл и 10 мкг/мл (Рис.17в), полностью аналогично таковому у вируса А/курица/Курган/5/05 NS1-81/5:3 (H5N1).

Статистически значимых отличий в активности гемагглютининов исследуемых штаммов не обнаружено.

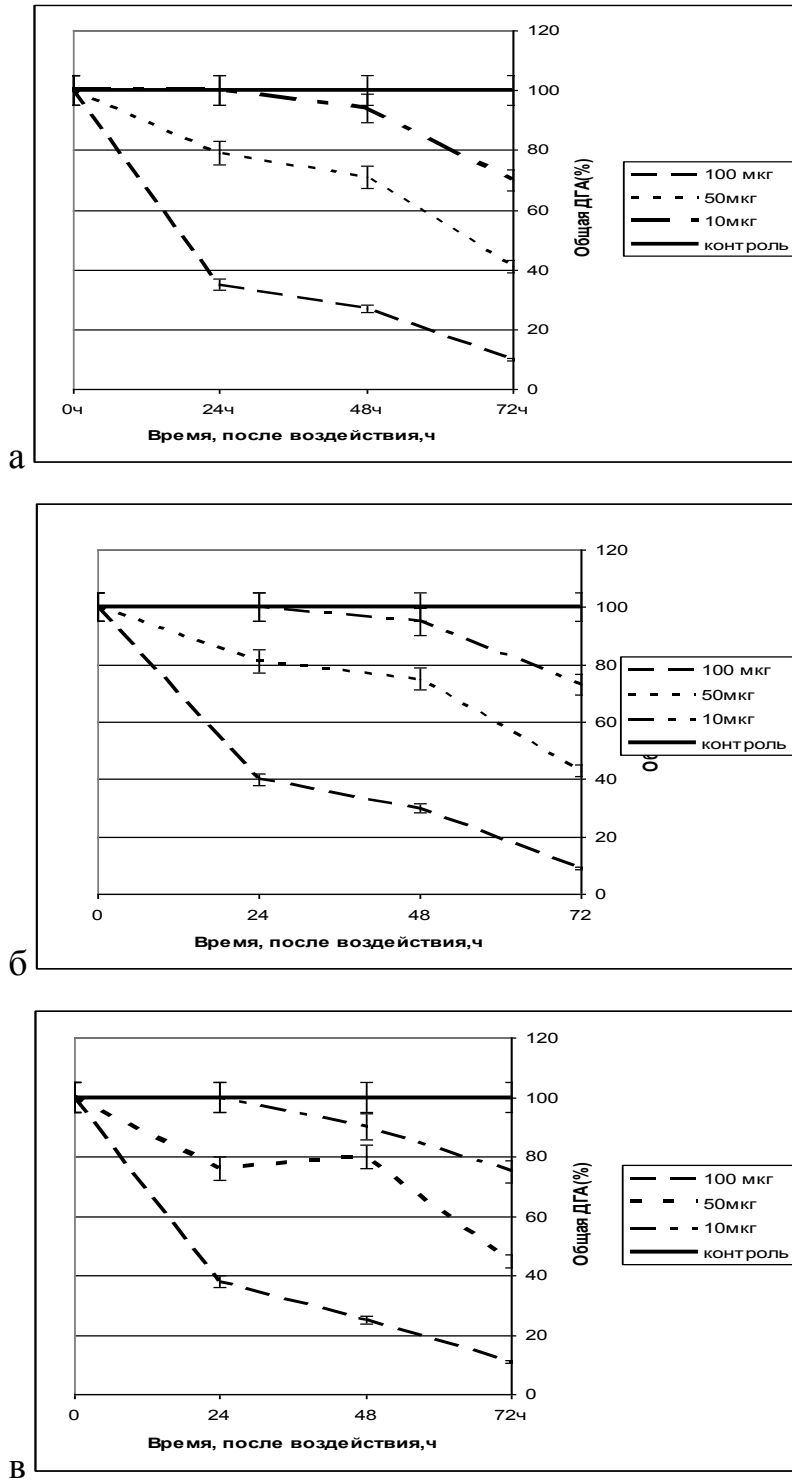


Рисунок 17. Влияние гемагглютинина вируса гриппа на изменение общей дегидрогеназной активности в культуре клеток EAhy926: а– вируса гриппа А/Брисбейн/10/2007 (H3N2); б – вируса гриппа А/курица/Курган/5/05 NS1-81/5:3 (H5N1); в– вируса гриппа А/Санкт-Петербург/2/2009(H1N1) pdm 09, $p < 0.01$.

2.2.3 Изменение метаболизма клеток эндотелия при воздействии нейраминидазы вирусов гриппа А/Брисбейн/10/2007 (H3N2) и А/кураца/Курган/5/05 NS1-81/5:3 (H5N1)

Для изучения активности клеточных дегидрогеназ под воздействием нейраминидаз разных штаммов вируса гриппа клетки обрабатывали нейраминидазой в концентрациях 10 – 100 мкг/мл в течение от 0 до 72 часов. Воздействие нейраминидаз на исследуемые клетки графически отражено на рисунке 18.

На рисунке 18а представлены данные о воздействии NA вируса гриппа А/Брисбейн/10/2007 (H3N2) на клетки эндотелия по сравнению с контролем. При обработке клеток нейраминидазой, взятой в наибольшей концентрации – 100мкг/мл, угнетение метаболизма клеток к 24 часам составило 30 % (Рис.18а, нижняя кривая), к 48 часам – 70 %, а к 72 часам – 80 %, что означает практически полную гибель клеток. NA в концентрации 50 мкг/мл, показала более мягкое угнетение метаболизма. Так, через 24 часа оно составило 20 %, через 48 часов – 50 %, а через 72 часа – 70 %. Концентрация NA – 10 мкг/мл (Рис.18а, верхняя кривая – не оказала существенного влияния на метаболизм клеток. Снижение общей дегидрогеназной активности составило 5 % через 48 часов после воздействия и 20 % через 72 часа соответственно.

При воздействии NA А/кураца/Курган/5/05 NS1-81/5:3 (H5N1) (Рис.18б, нижняя кривая) на клетки, NA, взятая в концентрации – 100 мкг/мл – показала данные, полностью аналогичные нейраминидазе вируса гриппа А/Брисбейн/10/2007 (H3N2). Нейраминидаза вируса А/кураца/Курган/5/05 NS1-81/5:3 (H5N1) в концентрации 50 мкг/мл (Рис.18б, средняя кривая) вызывала угнетение метаболизма через 24 часа после воздействия на 22 %, через 48 часов на 55 % и через 72 часа на 58 % . Нейраминидаза вируса А/кураца/Курган/5/05 NS1-81/5:3 (H5N1) в концентрации 10 мкг/мл вызывала угнетение метаболизма клеток на 5 % только после 48 часов и на 10 % после 72 часов после воздействия. Стати-

стически значимых отличий в активности нейраминидаз исследуемых вирусов не обнаружено.

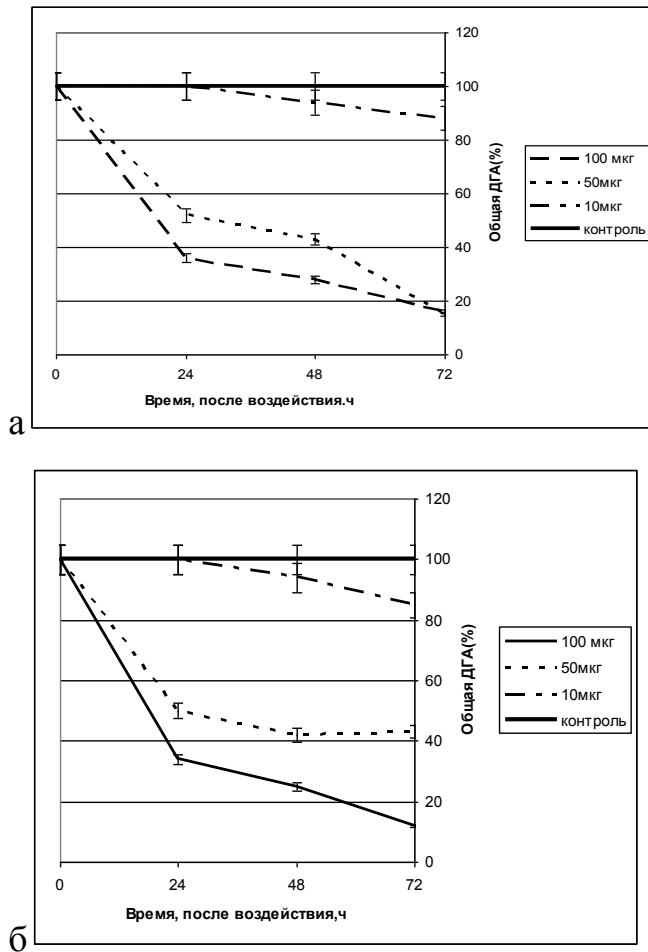


Рисунок 18. Влияние нейраминидаз вирусов гриппа А/Брисбейн/10/2007 (H3N2) и А/курица/Курган/5/05 NS1-81/5:3 (H5N1) на общую дегидрогеназную активность в культуре клеток EAh926: а – NA вируса гриппа А/Брисбейн/10/2007 (H3N2); б – NA вируса гриппа А/курица/Курган/5/05 NS1-81/5:3(H5N1); $p < 0.01$

Таким образом, можно говорить о том, что как цельный вирус, так и его 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, приводят к развитию гипоксии клетки.

2.3 Апоптоз клеток эндотелия под воздействием вируса гриппа типа А и его поверхностных белков

Апоптоз эндотелиоцитов – ключевой момент в развитии дисфункции эндотелия. Особенностью эндотелиальных клеток является малая склонность к апоптозу (менее 0,1 %) как в организме, так и в культуре клеток. Ввиду этого появление даже небольшого числа десквамированных (апоптотических) эндотелиоцитов в кровяном русле, клиницисты [Петрищев и др., 2003] рассматривают как признак, свидетельствующий о серьезном поражении сосудов.

В качестве маркеров апоптоза нами были выбраны 1) активация каспазы-3 (регистрировали иммуноцитохимически) и 2) экспозиция фосфатидилсерина с внутреннего слоя мембраны клеток в наружный (регистрировали с помощью точной цитометрии).

2.3.1 Активация каспазы-3 в клетках эндотелия под воздействием исследуемых штаммов вируса гриппа и его поверхностных белков

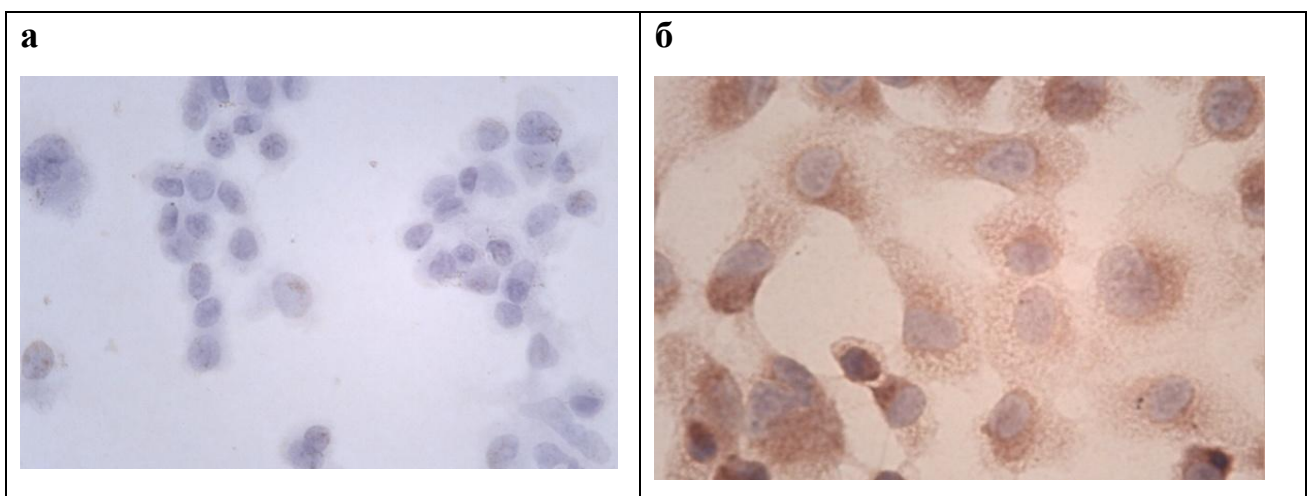
Апоптоз – многостадийный процесс, в котором существенную роль играют каспазы – семейство эволюционно консервативных протеаз [41]. В нормальном состоянии каспазы присутствуют в клетке в неактивной форме, как проэнзимы. Различают два вида каспаз – «инициирующие» и «эффекторные» [173]. К первым относят каспазы-8, 9, 10 и 12, которые, после активации действуют на «эффекторные» каспазы- 3,6,7 и 14 [41]. В качестве маркера апоптоза нами была выбрана активация каспазы-3, так как ее активация может происходить как по рецепторному,

так и по митохондриальному пути апоптоза. Важно отметить и то, что после активации «эффекторных» каспаз апоптоз становится необратимым процессом.

2.3.1.1 Активация каспазы-3 в клетках эндотелия под воздействием исследуемых штаммов вируса гриппа

Для иммуноцитохимического определения активности каспазы-3 суточный монослой клеток EAhy926 выращивали на предметных стеклах, предварительно покрытых полилизинном. Затем клетки либо заражали вирусами по общепринятой методике (см раздел 3.7), либо обрабатывали поверхностными белками исследуемых вирусов в разной концентрации и с разным временем экспозиции.

Активация каспазы-3 была выявлена через 0,5 – 1,5 часа после инфицирования клеток вирусом на ранней стадии заражения -0,5 – 1,5 часа и не зависела от заражающей дозы (0,01 ТЦД₅₀/кл, 0,001 ТЦД₅₀/кл,) и подтипа вируса (Рис.19).



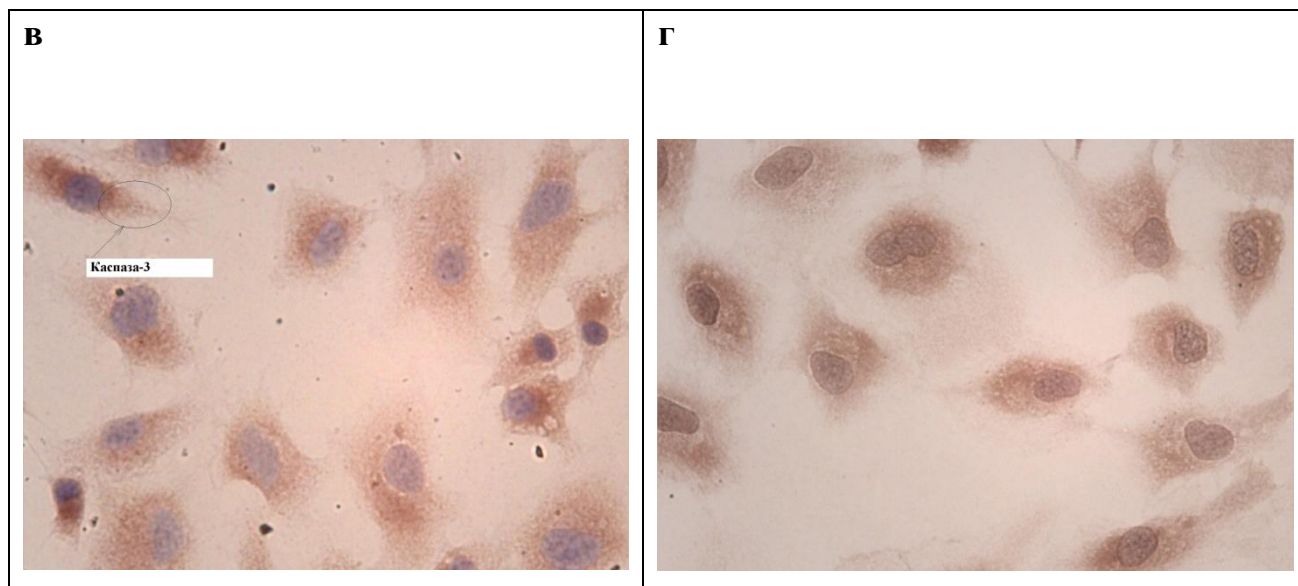


Рисунок 19. Иммуноцитохимическое определение активности каспазы-3 в культуре клеток EAh926, через 1 час после воздействия исследуемых штаммов: **а** – интактные клетки; **б** – клетки инфицированные вирусом А/Курган/5/05/NS1-81/5:3 (H5N1) заражающая доза 0,01 ТЦД₅₀/кл; **в** – клетки инфицированные вирусом А/Брисбейн/10/2007 (H3N2) заражающая доза 0,001 ТЦД₅₀/кл; **г** – клетки инфицированные вирусом А/Санкт-Петербург/2/2009 (H1N1) pdm 09 заражающая доза 0,001 ТЦД₅₀/кл (Увеличение 40X; окрашивание клеток ДАБ-хромогеном с последующей окраской гематоксилином Майера).

Как видно из рисунка 19б вирус А/Курган/5/05/NS1-81/5:3 (H5N1) в заражающей дозе 0,01 ТЦД₅₀/кл активирует каспазу-3 через 30 минут после инфицирования клеток на что указывает появление специфической коричневой окраски клеток по сравнению с контролем. Специфическое коричневое окрашивание локализовано в цитоплазме вблизи ядра.

На рисунках 19в и 19г можно видеть активацию каспазы-3, также через 0,5 часа, вирусами А/Брисбейн/10/2007 (H3N2) и А/Санкт-Петербург/2/2009 (H1N1) pdm 09 соответственно.

Необходимо отметить, что при заражающей дозе 0,0001 ТЦД₅₀/кл активации каспазы-3 не наблюдалось, также, как и не наблюдалось репродукции вируса.

2.3.1.2 Активация каспазы-3 в клетках эндотелия, под воздействием поверхностных белков исследуемых штаммов вируса гриппа

Для изучения воздействия поверхностных белков вируса гриппа на активацию каспазы-3 клетки были обработаны белками разной концентрации (0,1 мкг/мл, 1 мкг/мл, 5 мкг/мл и 10 мкг/мл) и с разным временем экспозиции. Из рисунка 20 (а,б) видно, что поверхностные белки вирусов гриппа активировали каспазу-3 уже через 30 минут после воздействия их на клетки эндотелия.

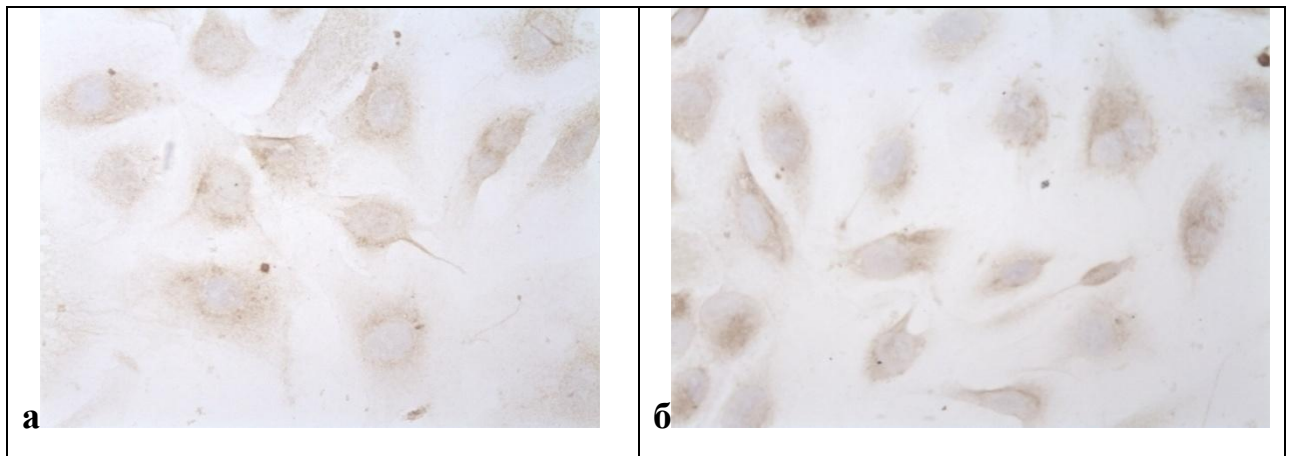


Рисунок 20 Иммуноцитохимическое определение активности каспазы-3 в культуре клеток EAh926, через 30 мин после воздействия поверхностных белков вируса гриппа.

а – клетки после воздействия гемагглютинина вируса гриппа А/Санкт-Петербург/2/2009 (H1N1) pdm 09v концентрации 1 мкг/мл; **б** – клетки после воздействия нейраминидазы вируса гриппа А/Брисбейн/10/2007 (H3N2) в концентрации 0,1 мкг/мл. (Увеличение 40X; окрашивание клеток ДАБ-хромогеном с последующей окраской гематоксилином Майера).

На рисунке 20а можно видеть, что гемагглютинин вируса гриппа А/Санкт-Петербург/2/2009 (H1N1) pdm 09 вызывал активацию каспазы-3 в минимальной концентрации 1 мкг/мл, что видно по появлению коричневого окрашивания в цитоплазме клеток. На вирусов А/Курган/5/05/NS1-81/5:3 (H5N1) и А/Брисбейн/10/2007 (H3N2) показали аналогичные результаты.

Минимальная концентрация нейраминидазы вируса гриппа А/Брисбейн/10/2007 (H3N2), вызывавшая активацию каспазы-3, была в 10 раз

меньшей – 0,1 мкг/мл, по сравнению с гемагглютинином (Рис.20б). Нейраминидаза вируса А/Курган/5/05/NS1-81/5:3(H5N1) показала аналогичные результаты.

Таким образом, проведенные нами исследования показали, что все три исследуемые штаммы вируса гриппа и их поверхностные белки, гемагглютинин и нейраминидаза, вызывали активацию каспазы-3 в эндотелиальных клетках на ранних сроках воздействия.

2.3.2 Оценка жизнеспособности эндотелиальных клеток линии EAhy926 под воздействием вируса гриппа типа А и его поверхностных белков

Жизнеспособность клеток оценивали методом проточной цитометрии с использованием иодида пропидия (PI), окрашивающего ДНК погибших клеток и не проникающего в живые клетки (см. раздел 3.8). Оценку количества погибших и живых клеток в образцах проводили, используя двухпараметрическую гистограмму, отображающую PI-окраску клеток в зависимости от прямого светорассеяния.

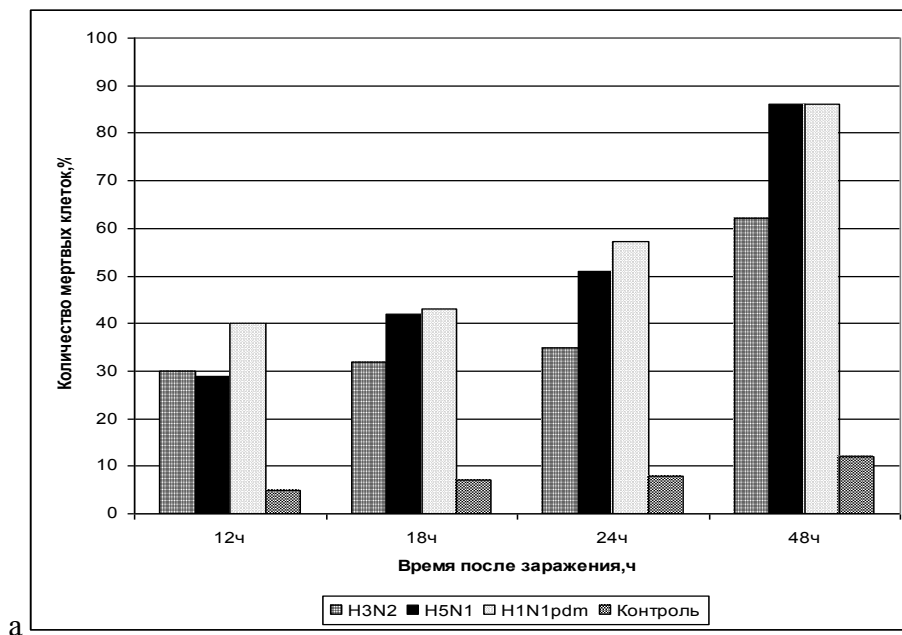
2.3.2.1 Оценка жизнеспособности эндотелиальных клеток линии EAhy926 под воздействием исследуемых штаммов вируса гриппа

Жизнеспособность эндотелиальных клеток линии EAhy926 при воздействии исследуемых штаммов представлена на рисунке 21. Как видно из рисунка 21а, через 12 часов после заражения клеток вирусом, доля погибших клеток для вируса

гриппа А/Брисбейн/10/2007 (H3N2) составляла 30 %, через 18 часов – 32 % и через 24 часа – 35 %. К 48 часам после заражения клеток вирусом, доля погибших клеток увеличилась до 62 %.

Вирус гриппа А/курица/Курган/5/05 NS1-81/5:3 (H5N1) оказывал аналогичное воздействие на эндотелиальные клетки. Так, через 12 часов после заражения вирусом, доля погибших клеток составляла 28 %, а затем по мере возрастания сроков репродукции (18, 24, 48 часов), доля погибших клеток также возрастала – 42 %, 52 % и 85 %, соответственно (Рис.21а).

Как видно из рисунка 21а характер гибели клеток при воздействии вируса гриппа А/Санкт-Петербург/2/2009(H1N1) pdm 09 несколько отличался от двух предыдущих. Так доля погибших клеток к 12 часам после заражения составляла 40 %, больше чем у двух предыдущих вирусов, и затем, по мере возрастания сроков репродукции (18, 24 часа) пропорционально увеличивалась – 44 % и 58 %, соответственно. К 48 часам после заражения, доля погибших клеток составляла 85 % (Рис.21а). Гистограмма, приведенная на рисунке 21б, показывает распределение инфицированных клеток, характерное для всех трех, исследованных вирусов.



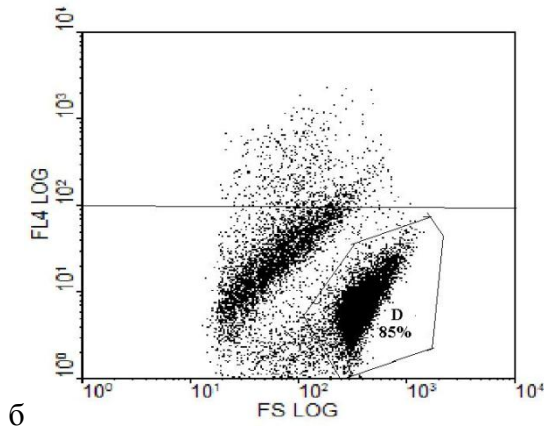


Рисунок 21. Угнетение жизнеспособности клеток EAhy926 на поздних сроках заражения. а - гистограмма, отражающая увеличение доли мертвых клеток EAhy926, на поздних сроках заражения вирусами в дозе 0,01ТЦД50/кл; по результатам 3-х независимых экспериментов представлены средние значения ($M \pm s$); $p < 0.01$; б - двухпараметрическая гистограмма, отображающая PI-окраску клеток в зависимости от прямого светорассеяния, D-область – клетки культуры EAhy926, погибшие через 48 часов после инфицирования вирусом.

2.3.2.2 Оценка жизнеспособности эндотелиальных клеток линии EAhy926 под воздействием гемагглютинина исследуемых штаммов вируса гриппа

Для изучения воздействия НА исследуемых штаммов была выбрана концентрация 50 мкг/мл, так как при этой концентрации (на основании МТТ - исследования) наиболее четко прослеживалась разница между контролем и опытом. Результаты воздействия гемагглютинина на культуру эндотелиальных клеток представлены на рисунке 22.

Как видно из рисунка 22, НА вируса гриппа А/Санкт-Петербург/2/2009 (H1N1) pdm 09 вызывал значительную гибель эндотелиальных клеток на всех сроках воздействия – 6 – 24 часа – в концентрации 50 мкг/мл. На ранних сроках воздействия (6, 8, 10 часов) доля погибших клеток постепенно увеличивалась (14,

15, 18 %) и к 24 часам составляла 24%. Необходимо отметить, что из трех исследованных НА, подобное воздействие на клетки эндотелия была выявлено только для НА вируса гриппа подтипа H1N1 pdm 09.

Гемагглютинины подтипов H3N2 и H5N1 вызывали гибель эндотелиальных клеток только через 24 часа после воздействия (14 и 13 % соответственно), на меньших сроках, 6 – 10 часов, количество погибших клеток соответствовало контролю.

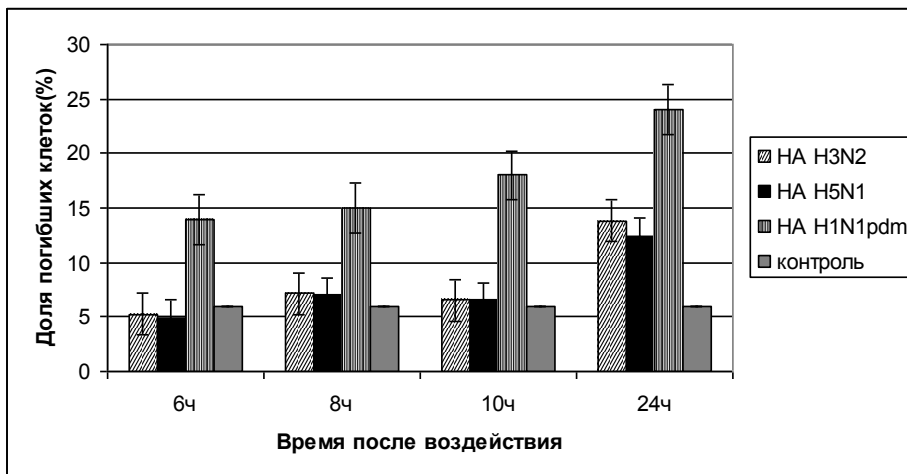


Рисунок 22. Гистограмма, отражающая интенсивность гибели клеток в культуре EAhy926, через 6 – 24 часа после воздействия НА трех исследуемых штаммов в концентрации 50мкг/мл, $p < 0.05$

2.3.2.3 Оценка жизнеспособности эндотелиальных клеток линии EAhy926 под воздействием нейраминидазы исследуемых штаммов вируса гриппа

Для изучения воздействия нейраминидазы исследуемых штаммов вируса на жизнеспособность эндотелиальных клеток, клетки были обработаны НА в концентрациях 1мкг/мл, 10 мкг/мл и 50 мкг/мл в течение 24 часов (Рис.23).

Как видно из рисунка 23, через 24 часа после воздействия нейраминидазы вируса гриппа А/Брисбейн/10/2007 (H3N2) в концентрации 50 мкг/мл доля погибших клеток составляла 79%, в концентрации 10 мкг/мл – 32 % соответственно. Концентрация 1 мкг/мл нейраминидазы вируса гриппа А/Брисбейн/10/2007

(H3N2) не оказывала воздействия на жизнеспособность клеток. Для NA вируса гриппа А/курица/Курган/5/05 NS1-81/5:3 (H5N1) получены аналогичные данные.

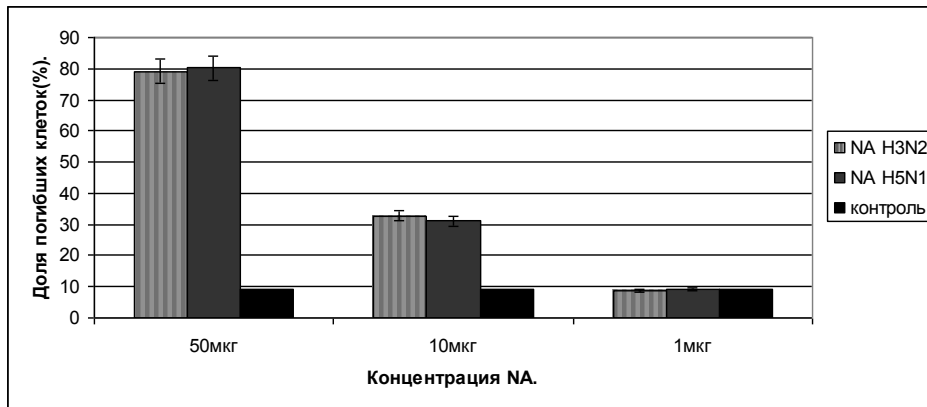


Рисунок 23. Гистограмма, отражающая зависимость интенсивности гибели клеток в культуре EAhy926 через 24 часа после воздействия NA вируса гриппа подтипов H3N2 и H5N1 взятых в различных концентрациях, $p < 0.05$

При обработке NA в концентрации 10 мкг/мл эндотелиальных клеток EAhy926 с разным временем экспозиции, от 4 до 24 часов, получены следующие результаты (Рис.24). Как видно из рисунка 24 на ранних сроках воздействия (4, 6, 8 часов) нейраминидазы вируса А/Брисбейн/10/2007 (H3N2) на клетки, количество погибших клеток соответствовало контролю, к 10 часам после воздействия количество погибших клеток увеличивалось до 13 % и к 24 часам составляло 32%.

На ранних сроках воздействия (4, 6 часов) NA вируса А/курица/Курган/5/05 NS1-81/5:3 (H5N1) количество погибших клеток соответствовало контролю, возрастание доли погибших клеток отмечалось, начиная с 8 часов после воздействия NA на клетки – 12 %, а к 10 часам увеличивалась до 15 % и к 24 часам до 30 %.

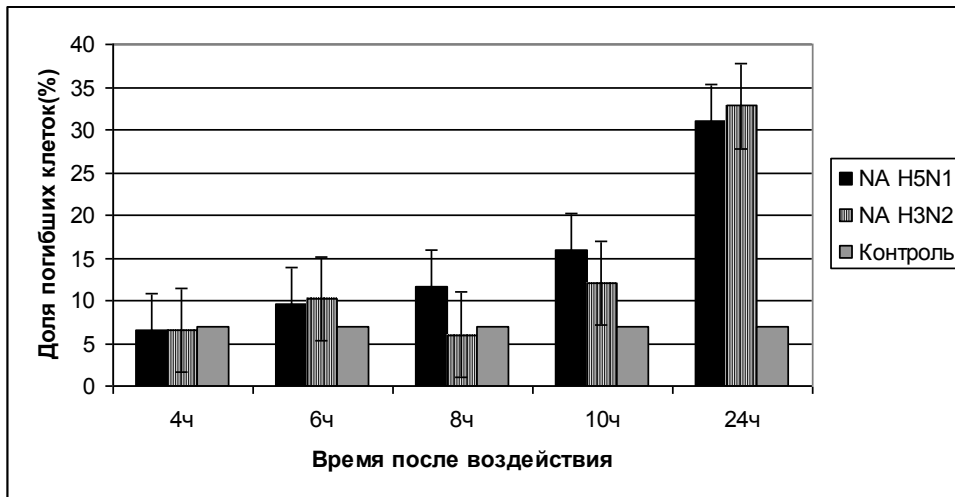


Рисунок 24. Гистограмма, отражающая интенсивность гибели клеток в культуре EAhy926 через 4 – 24 часа после воздействия NA вирусов H3N2 и H5N1 в концентрации 10мкг/мл, $p < 0.05$

Таким образом, можно сказать, что все три исследуемые вирусы гриппа типа А, вызывали интенсивную гибель эндотелиальных клеток через 12 часов после заражения. Среди поверхностных антигенов эффект был дифференцирован. Нейраминидазы вызывала статистически значимую гибель клеток только после 24 часов после воздействия, что же касается гемагглютининов, то гибель клеток вызывал только гемагглютинин вируса А/Санкт-Петербург/2/2009(H1N1) pdm 09.

2.3.3 Выявление аннексин V положительных клеток в культуре клеток эндотелия EAhy926 под воздействием вируса гриппа типа А и его поверхностных белков

Как было сказано выше, вторым критерием оценки апоптоза была выбрана транслокация фосфатидилсерина (PS) с внутреннего слоя мембраны в наружный в случае развития апоптоза. Фосфатидилсерин на наружном слое мембраны связывался с аннексином V, меченым красителем FITC. Далее такие клетки (обозначаемые как аннексин V положительные) регистрировали с помощью проточной цитометрии (см. раздел 3.9).

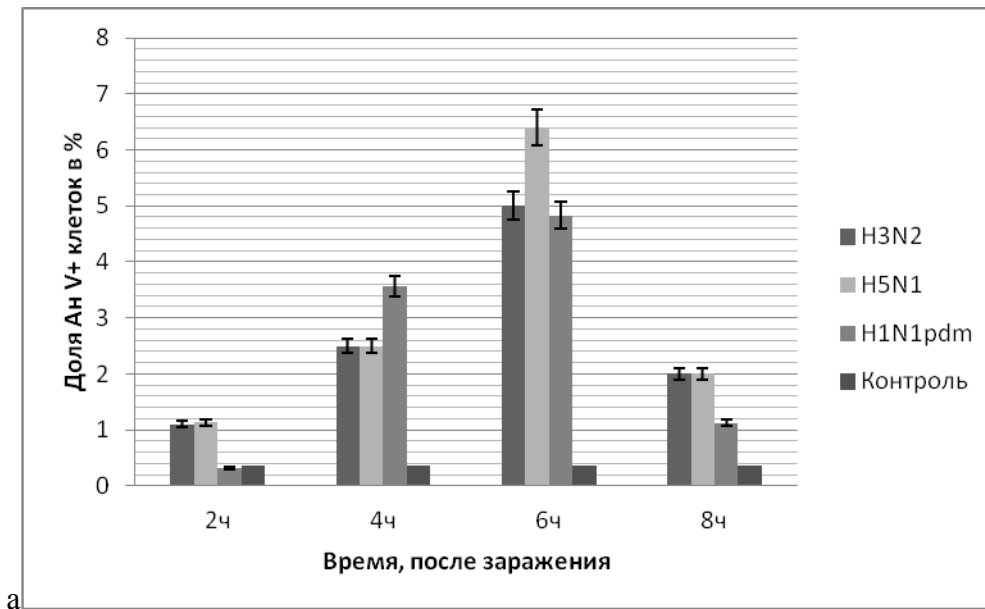
2.3.3.1 Выявление аннексин V положительных клеток при инфицировании клеток EAhy926 исследуемыми штаммами вируса гриппа

Все исследуемые штаммы стимулировали развитие апоптоза клеток эндотелия. Как видно из рисунка 25д вирусы гриппа типа А подтипов H5N1, H3N2 и H1N1 pdm 09 стимулировали появление фосфатидилсерина на поверхности клеток эндотелия, начиная с 2 – 4 часов после заражения. Так, вирус А/Курган/5/05/NS1-81/5:3 (H5N1) вызывал появление апоптотических аннексин V положительных клеток уже через 4 часа после заражения, когда их количество достигало 2,5 % от общего количества клеток, в то время как в контрольных клетках – 0,29 %. К 6 часам после заражения количество апоптотических клеток достигало максимальной величины – 6,41 % от общего количества клеток (Рис.25б, д), а затем, к 8 часам после заражения, снижалось до 2 % (Рис.25д).

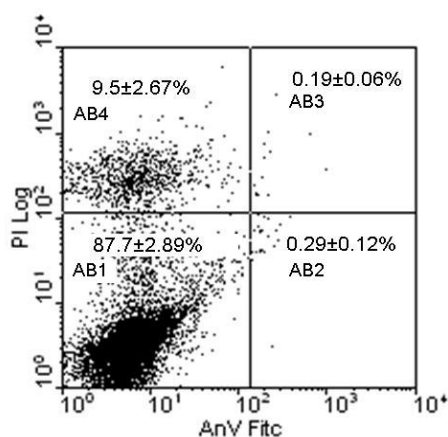
Аналогичные данные были получены при исследовании вируса гриппа А/Брисбейн/10/2007 (H3N2) (Рис.25г, д). Количество апоптотических клеток через 4 часа после заражения составляло 2,5 %. Максимальное количество апоптотиче-

ских клеток было выявлено также через 6 часов после заражения – 5%, а затем, к 8 часам после заражения, снижалось до 2 %.

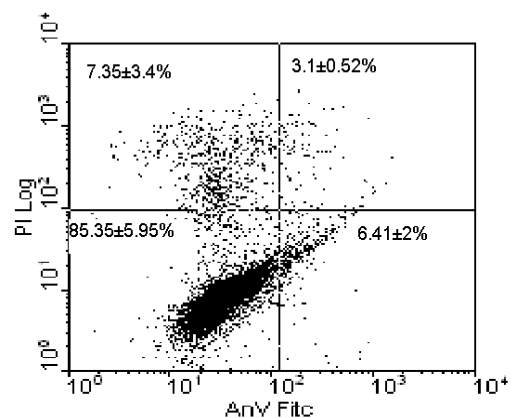
Что касается вируса гриппа А/Санкт-Петербург/2/2009 (H1N1) pdm 09, количество аннексин V положительных клеток через 4 часа после инфицирования их вирусом достигало 3,57 % (больше чем у двух других вирусов) (Рис.25в, д). К 6 часам после инфицирования доля аннексин V положительных клеток возрастала до 4,83 %, а затем снижалась до 1 % к 8 часам после заражения (Рис.25д). Через 10 часов после инфицирования клеток исследуемыми штаммами количество аннексин V положительных клеток снижалось до уровня контроля.



а



б



в

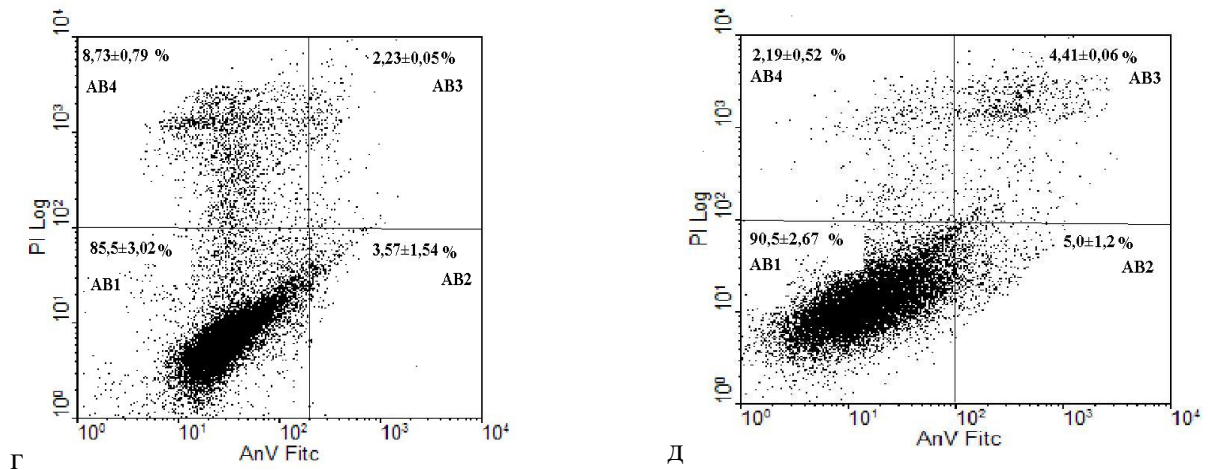


Рисунок 25. Гистограммы, отражающие интенсивность апоптоза в культуре клеток EAhy926 после инфицирования исследуемыми штаммами вируса гриппа типа А:

а – гистограмма, отражающая количество аннексин V положительных клеток в зависимости от времени воздействия вируса; по результатам 3-х независимых экспериментов представлены средние значения ($M \pm s$); $p < 0.01$

б – доля клеток (% от общего количества анализируемых клеток) в состоянии апоптоза в контроле;

в – после 6 часов культивирования с вирусом гриппа А/Курган/5/05/NS1-81/5:3(H5N1), заражающая доза 0,01ТЦД₅₀/кл;

г – после 4 часов культивирования с вирусом А/Санкт-Петербург/2/2009 (H1N1) pdm 09, заражающая доза 0,01ТЦД₅₀/кл ;

д – после 6 часов культивирования с вирусом гриппа А/Брисбейн/10/2007 (H3N2), заражающая доза 0,01ТЦД₅₀/кл;

2.3.3.2 Выявление аннексин V положительных клеток при воздействии на клетки EAhy926 нейраминидазы вируса гриппа типа А подтипов H3N2 и H5N1

Для изучения стимуляции апоптоза эндотелиальных клеток под воздействием NA вируса гриппа, клетки обрабатывали NA в концентрации 10 мкг/мл в течение 10 часов. Нейраминидазы исследуемых штаммов вызывали появление фосфатидилсерина уже через 4 часа после воздействия. Так, NA вируса гриппа А/Брисбейн/10/2007 (H3N2) вызывала появление апоптотических клеток уже через 4 часа после воздействия в количестве 3,08 %, по сравнению с контролем

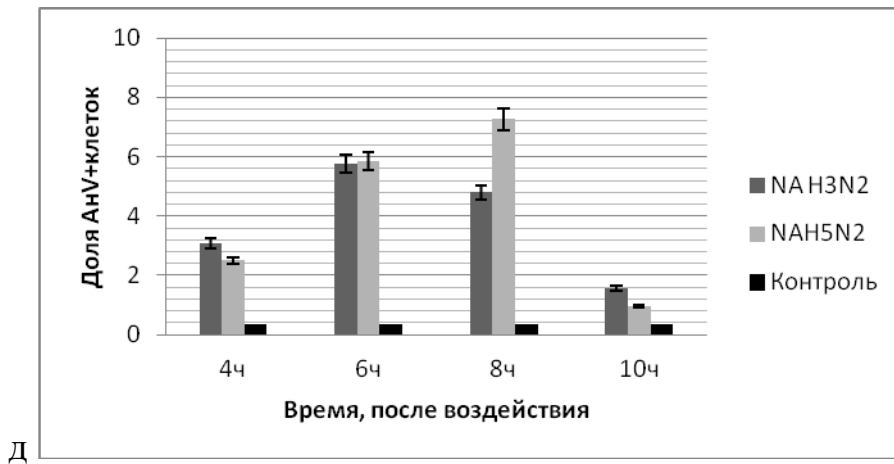
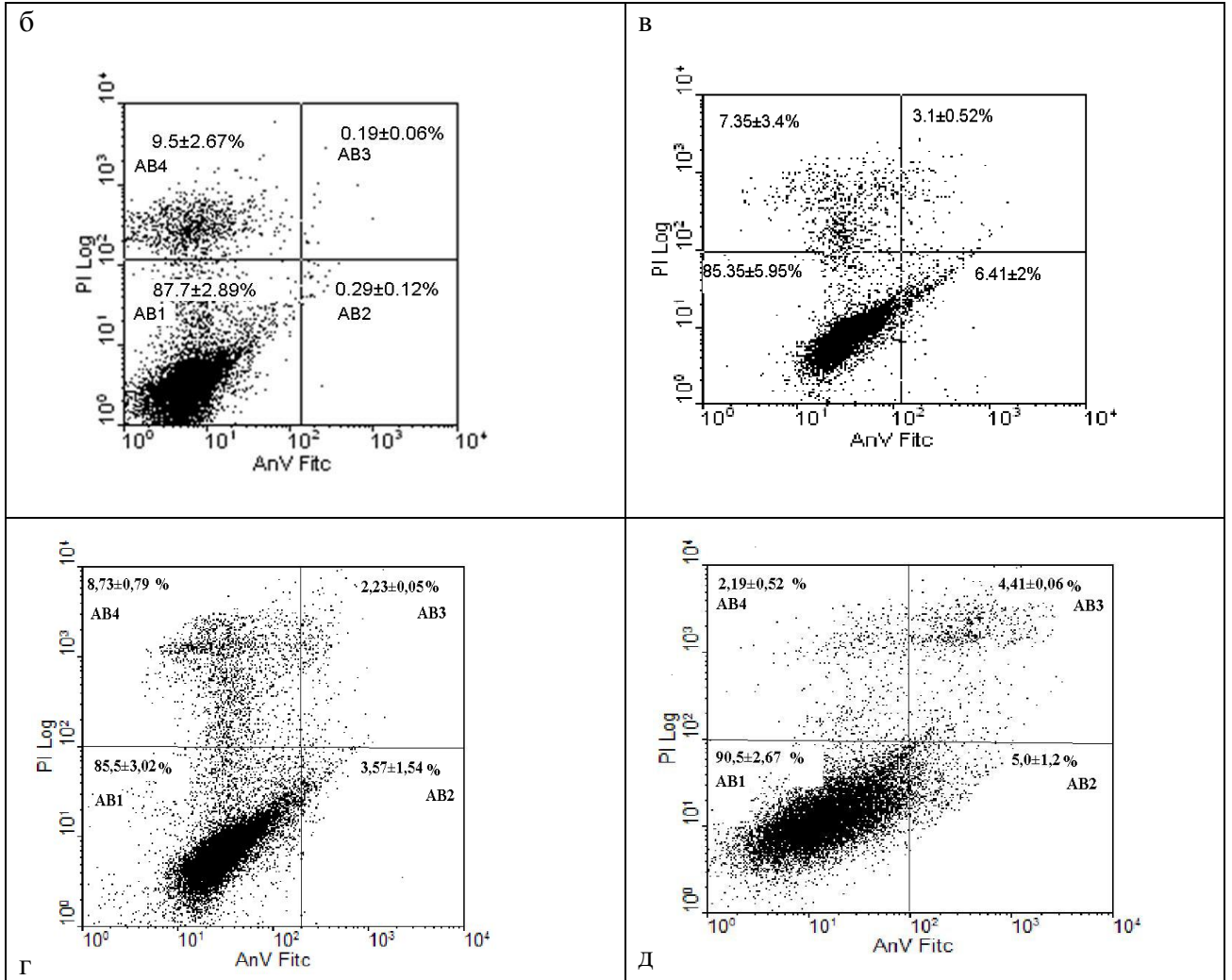
(Рис.26д). Затем к 6 часам после воздействия доля апоптотических клеток достигала максимума – 5,76 % (Рис.26 б, квадрат АВ2). После 8 часов воздействия НА, доля аннексин V положительных клеток составляла 4,8 %, а через 10 часов соответствовала контролю (Рис.26д).

Данные, которые были получены для нейраминидазы вируса гриппа А/курица/Курган/5/05 NS1-81/5:3 (H5N1) несколько отличаются. Появление PS на клеточной мембране регистрировалось через 4 часа (доля апоптотических клеток составляла 2,5 %). Далее к 6 часам количество аннексин V положительных клеток увеличивалось до 5,85 % (Рис.26в, квадрат АВ2), и к 8 часам достигало максимума – 7,26 %. К 10 часам после воздействия количество апоптотических клеток снижалось до уровня контроля (Рис.26д).

2.3.3.4 Выявление аннексин V положительных клеток при воздействии на клетки EAhy926 гемагглютинином исследуемых штаммов вируса гриппа

Изучение стимуляции апоптоза гемагглютинином исследуемых штаммов показало, что, НА не вызывает выхода фосфатидилсерина на поверхность мембраны клеток эндотелия.

Количество аннексин V положительных клеток при воздействии гемагглютинином трех исследуемых штаммов на разных сроках воздействия (4, 6, 8, 10 часов) и с использованием различных концентраций гемагглютинином (50 мкг/мл, 25 мкг/мл) не превышало таковое в контроле. Как видно из рисунка 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.26г, квадрат АВ2).



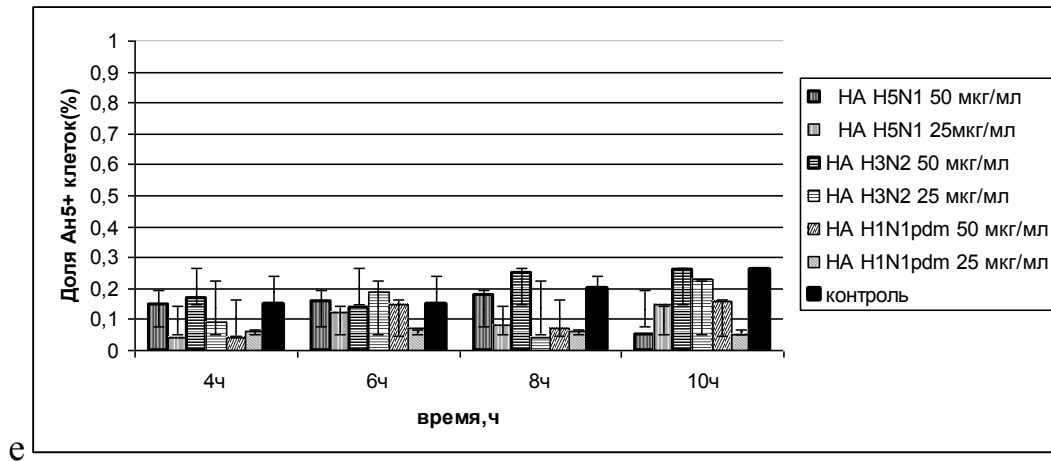


Рисунок 26. Гистограмма, отражающая увеличение количества аннексин V положительных клеток при воздействии поверхностных белков исследуемых штаммов вируса гриппа:

а – доля клеток (% от общего количества анализируемых клеток) в состоянии апоптоза в контроле ;

б – доля клеток в состоянии апоптоза после 6 часов воздействия NA вируса гриппа А/Брисбейн/10/2007 (H3N2) в концентрации 10мкг/мл;

в – доля клеток в состоянии апоптоза после 6 часов воздействия NA вируса гриппа А/Курган/5/05/NS1-81/5:3 (H5N1) в концентрации 10мкг/мл;

г – гистограмма распределения клеток через 6 часов после воздействия NA вируса гриппа А/Санкт-Петербург/2/2009 (H1N1) pdm 09;

д – изменение количества аннексин V положительных клеток в зависимости от времени воздействия NA исследуемых вирусов в концентрации 10мкг/мл;

е – количество аннексин V положительных клеток в зависимости от времени воздействия NA исследуемых штаммов 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, можно сказать, что современные эпидемические штаммы вируса гриппа типа А подтипов H5N1, H3N2, H1N1 pdm 09 способны вызывать апоптоз клеток эндотелия *in vitro*. Установлено, что как сами исследуемые штаммы, так и их поверхностные белки – гемагглютинин и нейраминидаза – вызывают активацию каспазы-3 через 0,5 часа после воздействия. Кроме того, продемонстрировано, что вирус гриппа типа А и нейраминидаза (в концентрации 10мкг/мл) стимулируют появление фосфатидилсерина на клеточной мембране в течение 2 – 8 часов от начала воздействия.

2.4 Оценка активности тканевого активатора плазминогена под влиянием вируса гриппа типа А и его поверхностных белков

Повышение активности тканевого активатора плазминогена (t-PA) 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. По данным клиницистов, t-PA занимает первое место по диагностической ценности эндотелиальной дисфункции и обеспечивает наибольшую точность прогноза [15].

Активность тканевого активатора плазминогена *in vitro* определяли по методу Кудряшова и сотр. [1974] (см.3.9.1), нанося исследуемый материал на фибриновые пластины и определяя активность t-PA по разнице зон лизиса прогретой и непрогретой фибриновой пластины.

2.4.1 Оценка активности тканевого активатора плазминогена в эндотелиальных клетках EAhy926 под влиянием исследуемых штаммов вируса гриппа

Активность тканевого активатора плазминогена (t-PA) оценивали в суточном монослое клеток эндотелия EAhy926 через 12, 18, 24 и 48 часов после заражения вирусами гриппа подтипов H5N1, H3N2 и H1N1 pdm 09. Как видно из рисунка 27, вирусы гриппа подтипов H5N1 и H1N1 pdm 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.

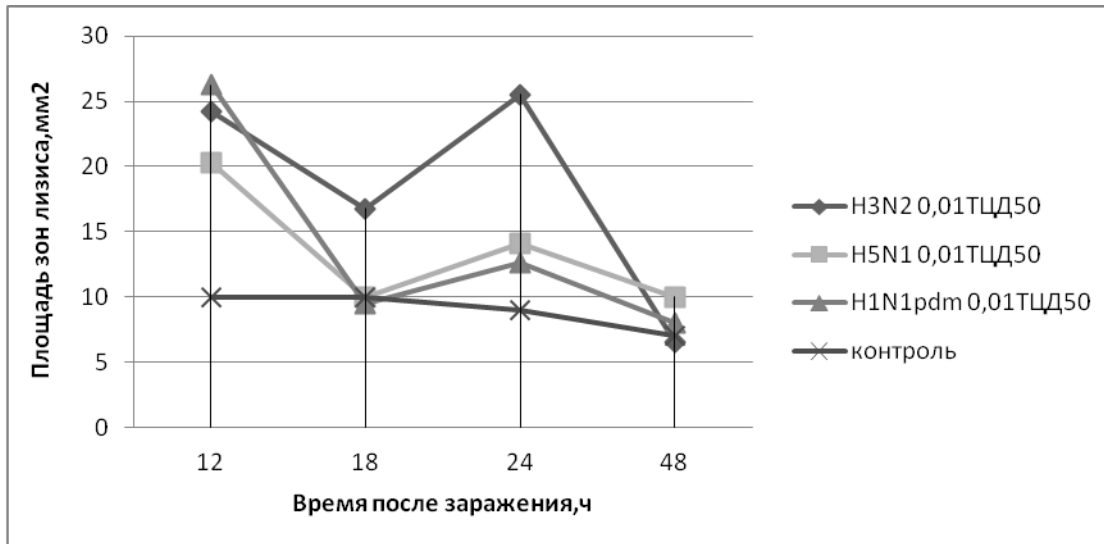


Рисунок 27. Изменение активности t-PA в культуре клеток EAhy926 инфицированных исследуемыми штаммами вируса гриппа типа А (заражающая доза 0,01ТЦД₅₀); $p < 0,05$.

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 H1N1 pdm 09, который к 48 часам снизился до уровня контроля.

Несколько иная картина наблюдалась для вируса гриппа подтипа H3N2 (Рис.27). 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.

2.4.2 Оценка активности t-PA в эндотелиальных клетках EAhy926 под влиянием гемагглютинина исследуемых штаммов вируса гриппа

Результаты воздействия HA исследуемых штаммов на активность t-PA представлены на рисунке 28. HA вируса гриппа А/Брисбейн/10/2007 (H3N2) и А/кураца/Курган/5/05 NS1-81/5:3 (H5N1) вызывали увеличение активности t-PA только через 18 часов после воздействия – 14 и 13 мм², соответственно, по срав-

нению с контролем, к 24 часам активность t-PA возросла до величин – 18 и 17 мм², а затем снижалась к 48 часам до уровня контроля (Рис.28).

НА вируса гриппа А/Санкт-Петербург/2/2009(Н1N1) pdm 09 при воздействии на культуру эндотелиальных клеток 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 снижалась до контрольных величин (Рис.28).

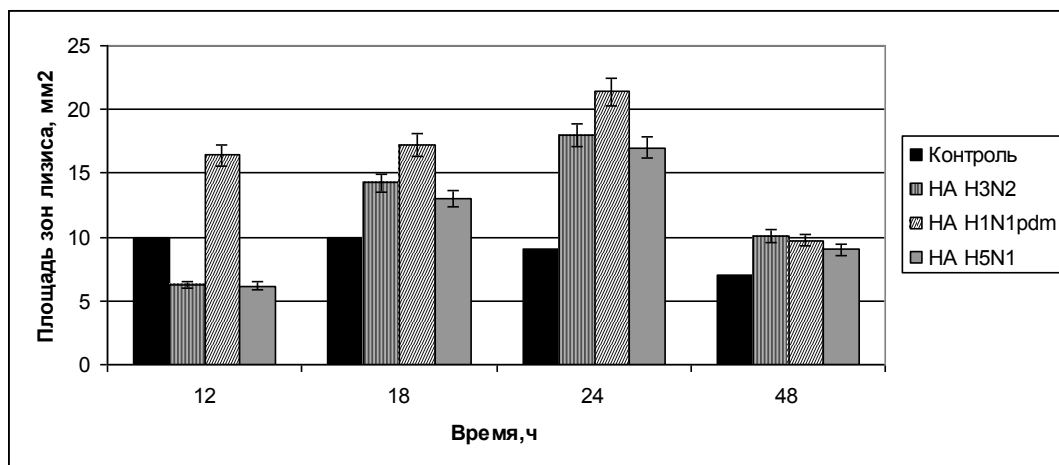


Рисунок 28.Изменение активности t-PA под влиянием НА исследуемых штаммов вируса гриппа типа А в культуре клеток EAhy926;концентрация гемагглютинаина 5 мкг/мл; p<0,05.

2.4.3 Оценка активности t-PA под влиянием гемагглютинаина исследуемых штаммов вируса гриппа *in vivo*

Активность t-PA под влиянием гемагглютинаина исследуемых штаммов изучали *in vivo*, вводя НА в дозе 50 мкг/кг массы тела белым лабораторным беспородным крысам и регистрируя результаты через 10 минут (Рис.29).

Как видно из рисунка 29 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.

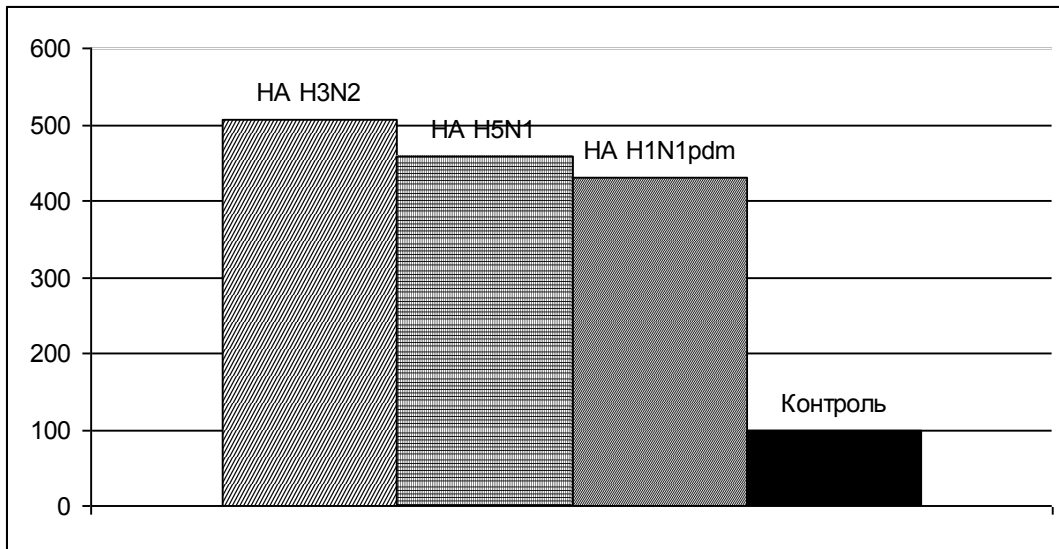


Рисунок 29.Изменение активности t-PA под влиянием HA исследуемых штаммов вируса гриппа типа A *in vivo* в эглобулиновой фракции крови крыс через 10 минут после внутривенного введения HA в дозе 50мкг/кг массы тела (контроль принят за 100%); $p < 0,01$.

2.4.4 Оценка активности t-PA в эндотелиальных клетках EAhy926 под влиянием нейраминидазы вирусов 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 30.

Увеличение активности t-PA регистрировалось через 12 часов после воздействия NA вируса гриппа A/Брисбейн/10/2007 (H3N2) на клеточную культуру (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.30).

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 – 16,25мм². К 48 часам следовало снижение активности t-PA до уровня контроля (Рис.30).

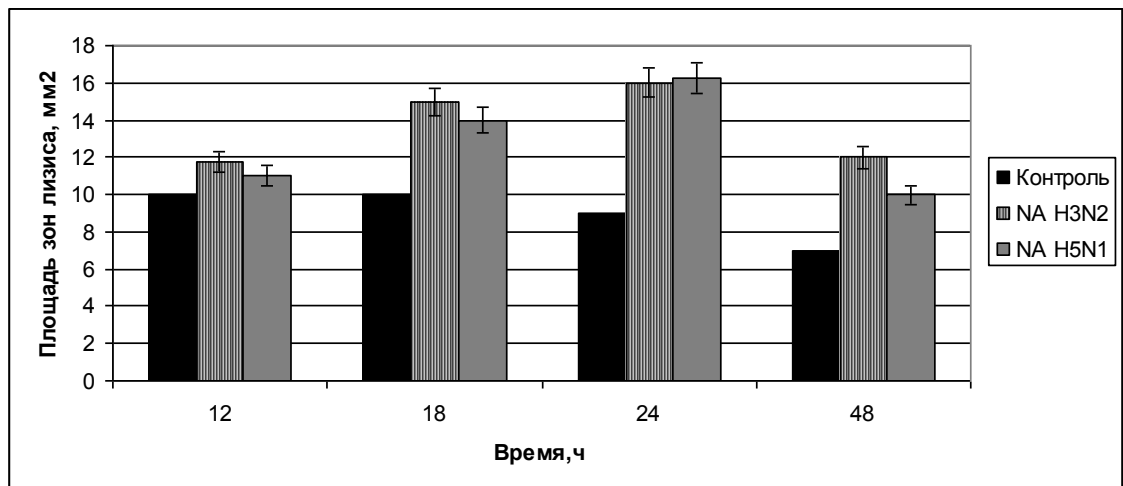


Рисунок 30 Изменение активности t-PA под влиянием нейраминидазы(NA) вируса гриппа типа А подтипов H3N2 и H5N1 в культуре клеток EAhy926. Концентрация нейраминидазы 5 мкг/мл, $p < 0,05$.

2.4.5 Оценка активности t-PA под влиянием нейраминидазы вируса А/Брисбейн/10/2007 (H3N2) *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 31.

Нейраминидаза вируса гриппа А/Брисбейн/10/2007 (H3N2), введенная внутривенно в кровь крыс, через 10 минут после введения вызывала подъем активности t-PA, превышающий контрольные значения в 3 раза (Рис.31).

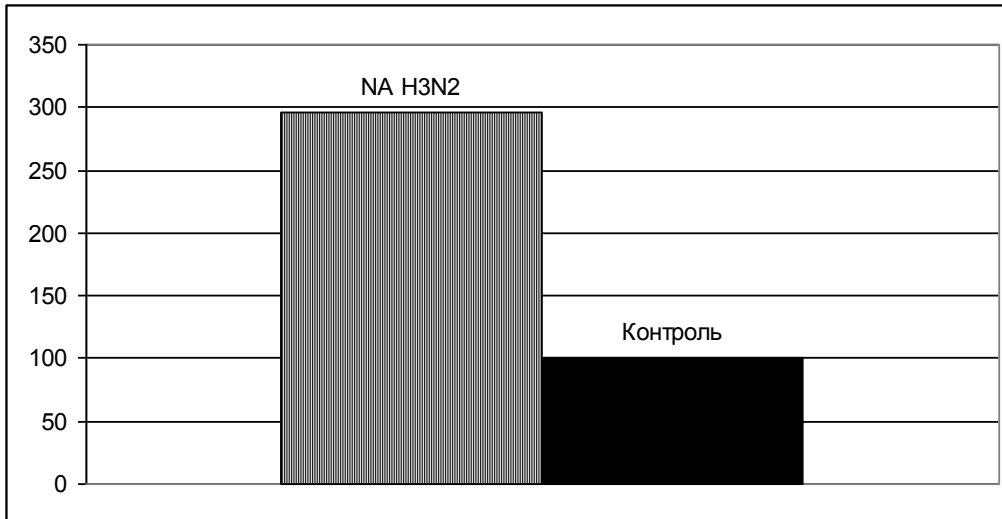


Рисунок 31 Изменение активности t-PA под влиянием нейраминидазы(NA) вируса гриппа типа А подтипа H3N2 *in vivo* в эритроцитарной фракции крови крыс через 10 минут после внутривенного введения NA в дозе 50мкг/кг массы тела (контроль принят за 100%); $p < 0,01$.

Таким образом, вирус гриппа типа А (подтипы H5N1, H3N2, H1N1 pdm 09) обладает способностью стимулировать увеличение активности тканевого активатора плазминогена в культуре клеток эндотелия человека EAhy926. Поверхностные белки – гемагглютинин и нейраминидаза – также стимулируют увеличение активности тканевого активатора плазминогена как в культуре клеток, так и *in vivo*.

2.5 Сравнение последовательностей аминокислот тканевого активатора плазминогена и поверхностных белков вируса гриппа подтипов H5N1, H3N2 и H1N1 pdm 09

Результаты этого раздела исследований представлены в таблице 3. Как можно видеть, в структуре всех исследованных белков вируса гриппа обнаружены последовательности аминокислот (ак), мимикрирующие последовательности аминокислот тканевого активатора плазминогена. Так, NA 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 t-PA, обозначаемой как «крингл 2» и четыре аминокислотные последовательности (119 – 129 ак; 343 – 353 ак; 539 – 547; 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 вирусов 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. NA вируса гриппа H1N1pdm 09 имеет три аминокислотные последовательности (324 – 337 ак; 355 – 372 ак; 360-372 ак) сходные с аминокислотной последовательностью t-PA, обозначаемой как «пептидаза S1», четыре последовательности (248 – 263 ак; 229 – 237 ак; 250 – 258 ак; 280 – 288 ак) сходные с аминокислотной последовательностью t-PA, обозначаемой как «крингл2» 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 NA вируса гриппа подтипов H5N1 и H3N2 с последовательностью аминокислот тканевого активатора плазминогена [Жилинская и др., 1996].

Таблица 6

Мимикрические последовательности аминокислот тканевого активатора плазминогена человека (t-PA) в структуре белков вирусов гриппа типа А, подтипов H5N1, H3N2 и H1N1 pdm 09.

Вирусные белки	Вирус гриппа А/курица/Курган/5/05 NS1-81/5:3 (H5N1)				
	Фрагмент аминокислот в структуре вирусных белков	Активатор плазминогена		Процент идентичных аминокислот	Процент взаимозаменяемых аминокислот
		Фрагмент аминокислот	Функциональные домены		
HA	122-156	123-164	Крингл 1	30	45
	238-246	62-70	Фибронектин 1 типа	40	54
	388-405	539-560	Пептидаза S1	40	54
NA	191-266	48-132	Фибронектин 1 типа и крингл 1	25	39
Вирус гриппа А/Брисбейн/10/2007 (H3N2)					
HA	113-153	190-228	Кринг 1	24	41
	274-303	191-221	Крингл 1	35	51
	297-376	267-337	Крингл 2	23	41
	295-310	146-161	Крингл 1	37	50
	515-541	339-359	Пептидаза S1	33	40
	518-531	542-556	Пептидаза S1	46	60
	545-554	525-534	Пептидаза S1	40	60
	554-562	207-215	Крингл 2	55	66
NA	71-98	423-450	Пептидаза S1	16	60
	116-155	156-189	Крингл 1	27	45
	185-192	273-280	Крингл 2	60	62
	198-215	152-169	Крингл 1	38	61

	217-235	55-74	Фибронектин 1 типа	40	60
Вирус гриппа А/Санкт – Петербург/2/2009(H1N1) pdm 09					
HA	65 – 75	257 – 267	Крингл 2	54	36
	119 – 129	409 – 419	Пептидаза S1	45	18
	150 – 158	250 – 261	Крингл 2	45	27
	338 – 347	253 – 262	Крингл 2	54	27
	338 – 346	293 – 301	Крингл 2	54	27
	343 – 353	312 – 322	Пептидаза S1	63	36
	539 – 547	423 – 431	Пептидаза S1	54	36
	503 - 512	457 - 465	Пептидаза S1	45	27
NA	248 – 263	301 – 316	Пептидаза S1	37	31
	324 – 337	488 – 501	Пептидаза S1	43	29
	355 – 372	405 – 422	Пептидаза S1	33	27
	228 – 237	86 – 95	ЭФР	50	20
	229 – 237	213 – 221	Крингл 2	55	11
	250 – 258	303 – 311	Крингл 2	55	11
	280 – 288	235 – 243	Крингл 2	55	22
	360 - 372	410 - 422	Пептидаза S1	46	15

ОБСУЖДЕНИЕ

Раскрытие молекулярных основ патогенеза вируса гриппа – одна из актуальных задач современной вирусологии. Патогенез гриппа – сложный процесс, характеризующийся нарушениями не только верхних дыхательных путей, но и затрагивающий другие органы, такие как кишечник, мозг, сердце и кровеносные сосуды [46; 32;270;54]. Такая множественность нарушений при гриппе указывает на способность вируса взаимодействовать со многими системами организма хозяина.

В наших исследованиях была поставлена задача выявить возможность репродукции вируса гриппа типа А в клетках эндотелия кровеносных сосудов человека, а также выяснить возможные последствия этой репродукции.

Взаимодействие вируса гриппа и клеток эндотелия человека было выбрано по нескольким причинам. Во-первых, на взаимосвязь гриппозной инфекции и нарушений свертывания крови клиницисты указывали еще в 60 – е годы прошлого века [39]. В последние годы получены данные о том, что ежегодные эпидемии вируса гриппа сопровождаются подъемом сердечно-сосудистых заболеваний, в связи с чем была сформулирована гипотеза, что эпидемия «испанки» в 1918-1920 гг. могла играть определенную роль в последующем росте заболеваний сердца и сосудов [214]. Особую актуальность вопрос о повреждающем действии вируса гриппа на эндотелий сосудов приобрел во время эпидемии 2009-2010 гг. «свиного» гриппа H1N1 из-за высокой летальности от геморрагических пневмоний [274]. Во-вторых, доказано, что эндотелий сосудистого русла, осуществляя локальный синтез медиаторов, участвует в регуляции сосудистого тонуса, гемостаза, иммунного ответа, миграции клеток крови в сосудистую стенку, синтезе факторов воспаления и их ингибиторов, осуществляет барьерные функции. Следовательно, эндотелиальная дисфункция – универсальный дефект сосудистой стенки – является важным начальным звеном сердечно-сосудистого континуума. В силу этого изучение взаимоотношений вируса гриппа типа А и его поверхностных белков –

гемагглютинаина и нейраминидазы – с эндотелиальными клетками кровеносных сосудов человека представляет особый интерес.

В результате проведенных исследований получены данные о полноценной репродукции вируса гриппа в культуре клеток эндотелия человека EAhy926. Показано, что инфекционный титр трех исследуемых вирусов достигал значений $4,0 \lg \text{TCID}_{50}$, что несколько ниже инфекционной активности вируса на клетках MDCK. Титры вирусов по данным РГА колебались в пределах $1/64 - 1/128$. С помощью электронной микроскопии в культуральной жидкости клеток, инфицированных вирусами гриппа, обнаруживались типичные зрелые вирусные частицы. Постановка ПЦР в реальном времени подтвердила наличие синтеза и вирусной РНК (вРНК), и матричной РНК (мРНК) в этих клетках в количествах, соответствующих 4-5 циклам вирусной репродукции. Обнаружение вирусных антигенов (НА и NP), методом иммуногистоцитохимии с помощью моноклональных антител к НА и NP в эндотелии кровеносных сосудов аутопсийного материала легких у пациентов, умерших в эпидемию 2009-2010гг, подтвердило репродукцию вируса гриппа в эндотелиальных клетках.

Таким образом, нами впервые было продемонстрировано, что вирусы гриппа типа А подтипов H3N2, H5N1 и H1N1 pdm 09, выделенные от человека, способны к репродукции в культуре человеческих эндотелиальных клеток. Наши данные коррелируют с данными ряда авторов, показавших способность вирусов чумы птиц и вирусов гриппа птиц H5N1 и H7N1 1997 и 1998 гг. выделения репродуцироваться в клетках эндотелия куриных эмбрионов и в первичной культуре клеток эндотелия человека [123; 93]. Полученные данные явились основанием для проведения исследований, связанных с изучением повреждающего действия вирусов, то есть, развития дисфункции эндотелиальных клеток.

Эндотелиальная дисфункция – универсальный дефект сосудистой стенки, возникающий как ответ на действие разнообразных повреждающих факторов. В настоящее время под дисфункцией эндотелия понимают дисбаланс между медиаторами, обеспечивающими в норме оптимальное течение всех эндотелий-зависимых процессов. В качестве критериев оценки дисфункции были использо-

ваны: изменения морфологии эндотелиоцитов, угнетение их метаболизма, развитие апоптоза и активация тканевого активатора плазминогена. Выбор первых двух критериев объяснялся следующими причинами. Поскольку весь репродуктивный цикл вируса гриппа осуществляется с использованием метаболических и генетических ресурсов клетки-хозяина логично рассматривать патогенез гриппа в первую очередь на клеточном уровне по изменениям морфологии и метаболизма. Остальные критерии – развитие апоптоза и активация t-РА – являются основными маркерами развития дисфункции эндотелия.

Изменение морфологии клеток оценивали с помощью электронной микроскопии. Так, в культуре клеток эндотелия, инфицированных исследуемыми вирусами, отмечалось увеличение количества диктиосом и расширение цистерн аппарата Гольджи, а также увеличение количества шероховатого эндоплазматического ретикулума (ШЭР). Кроме этого, в инфицированных клетках регистрировалось увеличение количества миелоидных телец, что служит признаком вирусной инфекции. Увеличение же количества ШЭР и аппарата Гольджи может служить показателем активации синтетической активности эндотелия.

Изучение метаболизма эндотелиальных клеток EA.hy926, инфицированных исследуемыми вирусами, проводили с помощью МТТ-теста, показывающего активность клеточного дыхания. Показано, что через 18 часов после заражения вирусом, метаболизм клеток снижался, в среднем, на 40%, а через 48 часов после заражения на 70% по сравнению с контролем, который принимали за 100%. Интересно, что кривая активности дегидрогеназ имеет два участка: область сравнительно малого изменения жизнеспособности клеток – от 0 до 24 часов и область, где угнетение жизнеспособности резко нарастает – от 24 часов до 48. Существенных различий в активности трех вирусов не отмечено. Поскольку МТТ-тест оценивает активность и митохондриальных, и цитоплазматических дегидрогеназ, можно предположить, что более значительное ингибирование их активности только через 24 часа после заражения клеток указывает на необходимость накопления достаточного количества зрелых вирусных частиц. С другой стороны, малые изменения метаболизма клеток в первые сутки после заражения говорят о не-

большом повреждении митохондрий, позволяющем обеспечить энергией процессы апоптоза. Апоптоз, в отличие от некроза, является энергозависимым процессом и наши данные, которые будут приведены далее, подтверждают наличие апоптоза в первые сутки после заражения [80].

Мы изучали изменения в метаболизме клеток не только в процессе репродукции вирусов, но и при воздействии на эти клетки поверхностных белков исследуемых вирусов – гемагглютинина и нейраминидазы. Оказалось, что и НА, и НА в концентрации 50 мкг/мл вызывают снижение общей дегидрогеназной активности. Так, через 24 часа НА подавляла общую дегидрогеназную активность на 50 %, а НА на 20%, после 48 часов – на 60% и 30% соответственно. На основании этих результатов можно сделать вывод о том, что нейраминидаза активнее снижает метаболизм эндотелиальных клеток, чем гемагглютинин.

Таким образом, исследуемые вирусы и их поверхностные антигены активно подавляют метаболизм эндотелиальных клеток, вызывая их гипоксию.

Как указывалось выше, помимо оценки дисфункции по изменению морфологии и метаболизма, мы использовали еще два критерия – развитие апоптоза и активацию t-РА.

Апоптоз эндотелиоцитов – ключевой момент в развитии дисфункции эндотелия. Ряд авторов считает, что увеличение проницаемости эндотелия почти всегда имеет причиной апоптоз эндотелиальных клеток или ремоделирование эндотелиальных межклеточных соединений [57]. В качестве основных маркеров апоптоза нами были выбраны следующие: активация каспазы-3 (регистрировали иммуноцитохимически) и транслокация фосфатидилсерина с внутреннего слоя мембраны клеток в наружный (регистрировали с помощью проточной цитометрии).

Общеизвестно, что в многостадийном процессе апоптоза существенную роль играют каспазы – семейство эволюционно консервативных протеаз [41]. В нормальном состоянии каспазы присутствуют в клетке в неактивной форме, как проэнзимы. Различают два вида каспаз – «инициирующие» и «эффektorные» [173]. К первым относят каспазы -8, -9, -10 и -12, которые, после активации действуют на «эффektorные» каспазы -3, -6, -7 и -14 [41]. В качестве маркера апоптоза

нами была выбрана активация каспазы-3, так как ее активация может происходить как по рецепторному, так и по митохондриальному пути апоптоза. Важно отметить и то, что после активации «эффекторных» каспаз процесс апоптоза становится необратимым.

Однако функции каспазы-3 не ограничиваются лишь процессом апоптоза. Одна из ее альтернативных функций связана с продукцией цитокинов. Так, продукция лимфоцитами IL-16 связана с активацией каспазы-3. Каспазы участвуют в регуляции клеточного цикла [41]. Кроме того, показано, что активация каспазы-3 является необходимым условием для эффективной репродукции некоторых вирусов, так как ингибирование каспазы-3, которое должно было бы привести к усилению репродукции вируса, наоборот, снижает ее [313; 82; 129].

Мы провели исследования по изучению активности каспазы-3 в культуре клеток эндотелия EAhy926, инфицированной вирусами гриппа типа А, подтипов H3N2, H5N1 и H1N1 pdm 09. Активация каспазы-3 была выявлена на ранней стадии заражения – через 0,5–1,5 ч после инфицирования клеток, не зависела от заражающей дозы и подтипа вируса. Следует отметить, что активация каспазы-3 наблюдалась через 0,5 часа в клетках EAhy926 и через 1,5 часа в клетках MDCK.

При изучении влияния поверхностных белков исследуемых вирусов на клетки EA.hy926 были получены следующие результаты: и HA, и NA вызывали активацию каспазы-3 на одинаковых сроках – через 0,5 – 1,5 ч, но минимальная концентрация NA, вызывавшая активацию, была в 10 раз меньше, чем концентрация HA – 0.1 мкг/мл и 1 мкг/мл соответственно. Отсюда следует, что NA по этому критерию проявляет большую активность, чем HA.

Таким образом, активация каспазы-3 необходима как для развития апоптоза, так и для обеспечения успешной репродукции вируса.

Так как в силу своей многофункциональности каспаза-3 не может рассматриваться как единственный маркер апоптоза, мы провели исследование раннего апоптоза с помощью набора Annexin V-FITC, который позволяет регистрировать раннеапоптотические клетки по экспозиции фосфатидилсерина на их поверхности. Биохимические изменения при апоптозе включают транслокацию фосфати-

дилсерина (PS) с внутренней стороны плазматической мембраны. Локализация PS на поверхности мембраны наблюдается, начиная с ранней стадии апоптоза, до полной деградации клетки. Аннексин V с высокой аффинностью связывается с экспонированным на поверхности апоптических клеток PS и ингибирует провоспалительную и прокоагулянтную активность гибнущих клеток [34].

Исследования, проведенные с помощью проточной цитометрии, позволили получить следующие данные. Раннеапоптотические аннексин V-положительные клетки были выявлены через 2-4 часа после инфицирования их вирусами гриппа подтипов H3N2, H5N1 и H1N1 pdm 09. При этом, в присутствии вируса H5N1 доля апоптических клеток составляла 6 %, тогда как для H3N2 и H1N1 pdm 09 – 3 %. Через 10 часов после инфицирования клеток EA.hy926 вирусом количество раннеапоптотических клеток снижалось до контрольного значения – менее 1%.

Для сравнения, в культуре клеток MDCK, инфицированных вирусом гриппа типа H3N2, через 10 часов после заражения количество аннексин-положительных клеток достигало 60 % [262]. Разницу в ответе на заражение этих двух клеточных культур, по-видимому, можно объяснить физиологическими свойствами этих клеток. Особенностью эндотелиальных клеток является малая склонность к апоптозу – менее 0,1 %, как в организме, так и в культуре клеток [276]. Ввиду этого, появление даже небольшого числа десквамированных (апоптотических) эндотелиоцитов в кровяном русле клиницисты рассматривают как признак, свидетельствующий о серьезном поражении сосудов [34].

Наши данные о стимуляции апоптоза эндотелия вирусами гриппа совпадают с данными [57], которые на примере культуры клеток HUVEC, зараженной вирусом гриппа подтипа H3N1, показали возрастание количества апоптических эндотелиоцитов через 4 часа после заражения на 7 %. Надо отметить, что у больных вирусной пневмонией, вызванной гриппом, количество десквамированных эндотелиоцитов превышало норму в 3 раза, что говорит о выраженной эндотелиальной дисфункции при гриппозной пневмонии [26].

При воздействии на эндотелиальные клетки NA в концентрации 10 мкг/мл мы регистрировали экспозицию фосфатидилсерина уже через 4 часа после воз-

действия. Затем к 6 – 8 часам количество аннексин V-положительных клеток возросло до 6-7 % процентов и к 10 часам снижалось до уровня контроля.

Интересные данные были получены в отношении гемагглютиниона исследуемых вирусов. Гемагглютинин вируса гриппа А/Санкт-Петербург/2/2009 (H1N1) pdm 09 в концентрации 50 мкг/мл вызывал гибель эндотелиальных клеток на ранних сроках воздействия: 4-8 часов, но гибель клеток носила некротический характер, так как экспозиции фосфатидилсерина не наблюдалось. Необходимо отметить, что токсичность HA (H1N1) pdm 09 для клеток была в два раза больше, чем HA двух других исследованных вирусов, что, вероятно, можно объяснить наличием последовательностей схожих с последовательностями токсина скорпиона, что также отмечается другими авторами [27]. Как мы указывали выше, гибель эндотелиальных клеток при воздействии гемагглютиниона происходила не по апоптотическому, а по некротическому пути, но при этом гемагглютинин вызывал активацию каспазы-3. Однако здесь нет противоречия. Согласно последним данным, активация каспазы-3 необходима для расщепления белка NP вируса гриппа и для последующей успешной репродукции вируса [248]. Возможно, активация гемагглютинином каспазы-3 – одно из начальных звеньев этого процесса, что позволяет говорить о новой функции гемагглютиниона в репродукции вируса гриппа.

Помимо апоптоза, и вирусы, и их поверхностные белки вызывали некроз клеток эндотелия на более поздних сроках. Так, через 12 часов после инфицирования и при отсутствии аннексин V-положительных клеток, количество погибших клеток составляло 30 % для H3N2 и H5N1, и 40 % для H1N1 pdm 09. Доля погибших клеток возрастала и к 48 часам составляла 60 % для H3N2 и 85 % для H5N1 и H1N1 pdm 09. С одной стороны, некроз в настоящее время рассматривается как итог апоптоза в ситуации энергодефицита клетки и /или результат действия сверхфизиологических индукторов [29]. Можно предположить, что нарастание продукции вирусных частиц и является таким индуктором. С другой стороны, апоптоз в организме и в норме заканчивается фагоцитозом апоптотических телец, но если этого не происходит, то в условиях клеточной культуры далее развивается процесс некроза [225].

Развитие некроза через 18 – 24 часа после заражения вирусами коррелирует с изменением дыхательной активности клеток. Как было сказано выше, резкое угнетение метаболизма наблюдалось через 24 часа после заражения клеток, что совпадает с развитием некроза на поздних сроках заражения, так как некроз, в отличие от апоптоза, не является энергозависимым процессом [80].

Необходимо отметить, что транслокация фосфатидилсерина свидетельствует не только о развитии процесса апоптоза, но и о том, что эндотелиальная клетка начала проявлять провоспалительные и прокоагулянтные свойства [243]. Транслокация фосфатидилсерина приводит к тому, что он связывается белком аннексином V, который, как и другие аннексины, не выделяется из нормальных клеток; источником внеклеточного аннексина являются клетки апоптотические и разрушенные [243]. Связывание аннексина V с фосфатидилсеринем является, следовательно, защитным механизмом, который препятствует развитию воспаления и прокоагулянтной активности апоптотических клеток [35]. Если же связывание сразу не происходит, то данный участок мембраны с PS приобретает свойства устойчивого отдельного пузырька – микровезикулы [19]. При этом в состав микровезикул включаются многие цитоплазматические и мембранные белки, в частности тканевой фактор [18]. Микровезикулы связываются с плазменными факторами свертывания, что приводит к активации этих факторов и далее возможно как развитие тромбоза, так и развитие ДВС-синдрома [186; 102; 18].

В связи с этим, следующим маркером развития эндотелиальной дисфункции нами была выбрана активация тканевого активатора плазминогена.

Повышение активности тканевого активатора плазминогена 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. По данным клиницистов t-PA занимает первое место по диагностической ценности и обеспечивает наибольшую точность прогноза развития дисфункции эндотелиальных клеток [15].

Как показали результаты настоящего исследования, развитие дисфункции эндотелиальных клеток при гриппозной инфекции подтверждается и увеличением активности тканевого активатора плазминогена. Так, показано, что все три исследуемые вирусы гриппа вызывали повышение активности t-PA в два раза по сравнению с контролем через 12 часов после заражения клеток, то есть после прохождения двух циклов вирусной репродукции. Затем к 18 часам активность t-PA снижалась до контрольных величин, а к 24 часам снова наблюдался подъем активности t-PA в 1,5 раза, который снижался к 48 часам до уровня контроля.

Колебания активности t-PA, как отражение повреждающего действия вируса на гемостаз, хорошо изучены для вируса Денге, который вызывает высокопродуктивную инфекцию в эндотелиальных клетках. Так, в первую – лихорадочную – фазу заболевания в крови увеличивается активность протромботических факторов: тканевого фактора и ингибитора активатора плазминогена [273]. Вторая же – токсическая – фаза заболевания сопровождается усилением активности t-PA. Таким образом, повреждение эндотелиальных клеток начинается с выхода прокоагулянтных компонентов, приводящих к генерации тромбина, затем следует усиление фибринолитических факторов и истощение природных коагулянтов [64].

Ряд авторов обращают внимание на схожесть патологических процессов при инфекции вируса SARS-CoV и тяжелых формах гриппа подтипа H5N1. Так, [Gralinski et al, 2013] показали, что при экспериментальной инфекции вируса SARS-CoV у мышей происходит дисрегуляция урокиназного пути, что приводит к повышенному риску кровотечений и легочной патологии. То есть, урокиназа регулирует уровень летальности у мышей при коронавирусной инфекции.

Исследования влияния вируса гриппа типа А на гемостаз немногочисленны и противоречивы. С одной стороны, работы [259] показали, что экспериментальная инфекция вируса гриппа типа А в клетках HUVEC, приводила к экспрессии тромбомодулина и ингибитора активатора плазминогена. По сообщению [85] во время эпидемии 2009-2010 гг. из 119 госпитализированных с диагнозом грипп пациентов у 7 отмечались явления тромбоза. С другой стороны, [8] отмечали, что к клинико-морфологическим особенностям гриппа А/H1N1 pdm 09 относится то,

что вирус гриппа, поражая эндотелий сосудистого русла, запускает ДВС-синдром, что приводит к тромбозам на территории различных органов, в частности, особенностью течения гриппа в эпидемию 2010-2011 гг. явились частые тромбозы глубоких вен нижних конечностей с последующей тромбоэмболией в мелкие, а в отдельных случаях и в крупные ветви нижних конечностей. По данным [240] аутопсия материала легких больных, умерших в эпидемию 2009-2011 гг., показала диффузные альвеолярные повреждения с геморрагиями. Изменения в системе гемостаза были отмечены и при изучении патологии, вызванной вирусами гриппа А подтипов H3N2 и H5N1 в условиях *in vivo* на мышах: исследуемые вирусы стимулировали процесс фибринолиза, так как активировали t-PA [11].

В совокупности эти данные свидетельствуют о том, что в ответ на вторжение патогена, в данном случае вируса гриппа, происходит дизрегуляция тонкого баланса между свертывающей и фибринолитической системой крови. Поскольку начальная фаза ДВС-синдрома включает в себя микротромбообразование, а следующей стадией является фибринолиз [42], то логично предположить, что противоречивые, на первый взгляд, наблюдения охватывают разные временные стадии одного и того же процесса.

Оказалось также, что поверхностные белки исследуемых вирусов при воздействии на клетки эндотелия усиливают активность t-PA, как в культуре эндотелиальных клеток, так и в крови подопытных животных. В частности, при воздействии гемагглютинина исследуемых вирусов активность t-PA увеличивалась максимум в два раза в клеточной культуре (концентрация HA – 5 мкг/мл) и в 4 – 5 раз *in vivo* при внутривенном введении крысам (концентрация HA – 50 мкг/кг). Нейраминидаза также стимулировала повышение активности t-PA, но в меньшей степени, чем гемагглютинин – в 1,5 раза в клеточной культуре (концентрация HA – 5 мкг/мл) и в 3 раза *in vivo* (концентрация HA – 50 мкг/кг).

Для выяснения механизмов вмешательства белков вируса гриппа в процессы свертывания крови был проведен сравнительный компьютерный анализ первичной структуры HA и NA вирусов с первичной структурой t-PA. В результате сравнительного анализа структуры HA вируса гриппа типа А получены следую-

щие данные. Так, гемагглютинин вируса гриппа А/Санкт-Петербург/2/2009 (H1N1) pdm 09 имеет четыре аминокислотных фрагмента (65 – 75 ак; 150 – 158 ак; 338 – 347 ак; 338 – 346 ак) сходных с участком аминокислотной последовательности активатора плазминогена, обозначаемой как «крингл 2» и четыре фрагмента (119 – 129 ак; 343 – 353 ак; 539 – 547 ак; 503 – 512 ак) сходных с участком аминокислотной последовательности активатора плазминогена, обозначаемой как домен «трипсин-подобная сериновая протеаза» - пептидаза S1. При этом процент идентичных аминокислот достаточно велик – от 45 до 63 %, процент взаимозаменяемых аминокислот составлял от 18 до 36 %. Эти данные аналогичны данным, полученным нами ранее при сравнении первичной структуры гемагглютининов вирусов гриппа H5N1 и H3N2 с последовательностью аминокислот тканевого активатора плазминогена [11].

Сравнительный компьютерный анализ структуры NA вируса гриппа типа А подтипов H3N2 и H5N1 показал, что в структуре нейраминидазы, также как и в структуре гемагглютинина, имеются аминокислотные последовательности, мимикрирующие аминокислотные последовательности t-РА. Нейраминидаза вируса гриппа H1N1 pdm 09 имеет три аминокислотных участка (324 – 337 ак; 355 – 372 ак; 360-372 ак), сходных с участком аминокислотной последовательности t-РА, обозначаемой как «пептидаза S1», четыре последовательности (248 – 263 ак; 229 – 237 ак; 250 – 258 ак; 280 – 288 ак) сходные с участком аминокислотной последовательности t-РА, обозначаемой как «крингл 2», и участок аминокислотной последовательности (228 – 237 ак), сходный с участком активатора плазминогена, соответствующим эпидермальному фактору роста (ЭФР-домен). Эти данные аналогичны данным полученным нами ранее при сравнении первичных структур нейраминидазы вирусов гриппа H5N1 и H3N2 с последовательностью аминокислот тканевого активатора плазминогена [11].

Таким образом, были получены данные о том, что в структуре HA и NA вируса гриппа типа А имеются аминокислотные последовательности, мимикрирующие аминокислотные последовательности t-РА человека, который играет ключевую роль в регуляции процессов гемостаза.

Совокупность полученных данных позволяет констатировать участие эндотелия сосудов в патогенезе гриппа, в частности, именно эндотелиальная дисфункция является основным фактором в развитии отека легких. Поэтому понимание того, как вирус гриппа проходит эндотелиальный барьер, имеет решающее значение.

Повышенная экспрессия хемокинов и цитокинов во время гриппозной инфекции, а также активная роль самого эндотелия в цитокиновом ответе (за счет сфингозин-1 фосфат рецепторов), объясняется опосредованной активацией эндотелия и может приводить к повреждению эндотелиального барьера [57].

Наши данные позволяют говорить о том, что кроме цитокин-опосредованной активации эндотелия, вирус гриппа и его поверхностные белки могут напрямую повреждать эндотелиальные клетки. Репродукция вируса гриппа приводит к изменению активности эндотелия, вызывает изменения в экспрессии некоторых эндотелиальных белков и, в конечном счете, может приводить к повышению проницаемости и значительным сосудистым нарушениям. Все это указывает на то, что коррекция дисфункции эндотелия является необходимым звеном в лечении гриппа. Другими словами, терапия гриппозной инфекции должна быть комплексным процессом, включающим в себя не только этиотропные препараты.

И последнее, на что необходимо обратить внимание. Развитие дисфункции эндотелия при гриппозной инфекции вполне вероятно может вносить вклад в поражение сердечно-сосудистой системы. Это представляется особенно важным, так как грипп вызывает ежегодные эпидемии, а патология сердечно-сосудистой системы в первую очередь, обуславливается дисфункцией эндотелия [295].

ВЫВОДЫ

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

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

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Баркаган З.С. Тромборезистентность сосудистой стенки, атерогенез и гуморальные факторы тромбогенности/ Баркаган З.С., Еремин Г.Ф. // Тер. архив. – 1981. – Т.53. – № 9. – С.71-78.
2. Баркаган З.С. Патогенез, диагностика и принципы терапии ДВС-синдрома. // Materia Medica. – 1997. – № 1(13). – С. 5-14
3. Богомолов Б.П. Клинико-анатомические параллели поражения сердца при спорадическом гриппе./ Богомолов Б.П., Молькова Т.Н., Девятки А.В. // Клиническая медицина-2001. – №9. – С.50-53
4. Бра М. Митохондрии в программированной гибели клетки: различные механизмы гибели/ Бра М., Квинан Б., Сузин С.А. // Биохимия. – 2005. – т.70(2). – С.284-293
5. Ваизова О.Е. Роль эндотелиальных факторов в регуляции сосудистого тонуса и локального гемостаза/ Ваизова О.Е., Крейнес В.М., Евтушенко А.Я // Сибирский мед. журн. – 2000. – № 2. – С.27-37.
6. Гомазков О.А. Эндотелий – «эндокринное дерево» // Природа. – 2000. – С.50-57.
7. Гомазков О.А. Эндотелин в кардиологии: молекулярные, физиологические и патологические аспекты // Кардиология. – 2001. – № 2. – С.50-57.
8. Горфинкель В.В. Клинико-морфологические аспекты гриппа А/Н1N1 /Калифорния/04/09./Горфинкель В.В., Мильченко И.Б., Миронов И.Л., Стенько Е.А. // Материалы всероссийской научно-практической конференции «Итоги эпидемии гриппа А/Н1N1», посвященной закрытию всероссийского фестиваля науки. – Челябинск. – 2011. – С.11-12
9. Граник В. Г. Оксид азота (NO) / Граник В. Г., Григорьев Н. Б. // М. «Вузовская книга». – 2004. – 360 с.
10. Елисеева Ю. Е. Ангиотензин-превращающий фермент, его физиологическая роль // Вопросы мед. химии. – 2001. – № 1. – С. 43-54.

11. Жилинская И.Н. Участие гемагглютини́на вируса гриппа в процессах антикоагуляции / И.Н.Жилинская, А.А. Карелин , Л.А. Ляпина , И.П. Ашмарин , О.И. Киселев // *Вопр.вирусол.* – 1996. – № 4. – С. 179-183
12. Жилинская И.Н. Роль нейраминидазы в патогенезе гриппозной инфекции / И.Н. Жилинская, Л.А. Ляпина, О.Ю. Решетникова, О.И. Киселев // *Вопр. вирусол.* – 2003. – № 2. – С. 26-28
13. Жилинская И.Н., Белки вируса гриппа модулируют гемостаз *in vitro* и *in vivo* / И.Н. Жилинская, Л.А. Ляпина, О.И. Киселев, И.П. Ашмарин // *Известия АН. Сер.биол.* – 2003. – № 6. – С. 712-719
14. Жилинская И.Н. Репродукция вируса гриппа в клетках эндотелия кровеносных сосудов человека. / Жилинская И.Н., Азаренок А.А., Ильинская Е.В., Прочуханова А.Р., Воробьев С.Л., Сорокин Е.В., Царева Т.Р. // «Вопросы вирусологии». – 2012. – т.57 №2 – С.20-23.
15. Затейщиков Д.А. Полиморфизм генов NO-синтетазы и рецептора ангиотензина II 1-го типа и эндотелиальный гемостаз у больных ишемической болезнью сердца/Затейщиков Д.А., Манушкина Л.О., Кудряшова О.Ю. // *Кардиология.* — 2000. — Т. 40, № 11. — С. 28-32.
16. Затейщикова А. А. Эндотелиальная регуляция сосудистого тонуса: методы исследования и клиническое значение // *Кардиология.* — 1998. — № 9. — С. 68-80.
17. Зубаиров Д.М. Молекулярные основы свертывания крови и тромбообразования. // Казань: "Фен" – 2000. – 364 с.
18. Зубаиров Д.М. Микровезикулы в крови функции и их роль в тромбообразовании. / Зубаиров Д.М., Зубаирова Л.Д. // Москва: ГЭОТАР-Медиа. – 2009. – 168с.
19. Зубаирова Л.Д., Зубаиров Д.А. Роль клеточных микровезикул в свёртывании крови / Зубаирова Л.Д., Зубаиров Д.А. // *Забайкальский медицинский вестник.* – 2004. – № 4. С. 39-43.

20. Киричук В.Ф. Функции эндотелия сосудистой стенки. (Обзор литературы)/ Киричук В.Ф., Ребров А.П., Россошанская С.И. // Тромбоз, гемостаз, реология №2(22) – 2005. – С.23-29
21. Киричук В.Ф. Дисфункция эндотелия./ Киричук В.Ф., Глыбочко П.В., Пономарева А.И. // Саратов: Изд-во Саратовского мед. ун-та. – 2008. – 110с.
22. Киселев О.И. Геном пандемического вируса гриппа А/Н1N1v – 2009//СПб – М.: Димитрейд график групп. – 2011. – 164с.
23. Ковалева М.В. Индукция проницаемости внутренней мембраны митохондрий дрожжей. / Ковалева М.В., Суханова Е.И. // Биохимия. – 2010. – 75(3) – С.365-372
24. Кузьминова Н.В. Функциональное состояние сосудистого эндотелия у больных гипертонической болезнью. / Кузьминова Н.В., Серкова В.К. // Український терапевтичний журнал. – 2008. – №2. – С.21-27
25. Лагутина Н.Я. Антитромбин III (обзор) / Лагутина Н.Я., Федулова Г.А. // Пробл. гематол. и переливания крови. – 1982. – № 3. – С.42-51.
26. Лукьянов С.А. Содержание маркеров патологической активации эндотелия и провоспалительных цитокинов при пневмониях у больных гриппом А/Н1N1./ Лукьянов С.А., Горбунов В.В., Романова Е.Н. Говорин А.В. // Материалы всероссийской научно-практической конференции «Итоги эпидемии гриппа А/Н1N1», посвященной закрытию всероссийского фестиваля науки. – Челябинск. – 2011. – С.18-21.
27. Lupinskaya Z. A., Zarifyan A. G., Gurovich T. C., Shleifer S. G. Эндотелий: функция и дисфункция. // Бишкек: КРСУ. – 2008. – 373 с.
28. Мазур Н. А. Дисфункция эндотелия, монооксид азота и ишемическая болезнь сердца // Тер. архив. — 2003. — № 3. — С. 84-86.
29. Манских В.Н. Пути гибели клетки и их биологическое значение. // Цитология. – 2007. – №49. – С.909-915
30. Насонов Е.Л. Маркеры активации эндотелия (тромбомодулин, антиген фактора Виллебранда и ангиотензин-превращающий фермент): клиническое

- значение./ Насонов Е.Л., Баранов А.А., Шилкина Н.П. // Клиническая медицина. – 1998. – №11. – С.4-10.
31. Огстон Д. Естественные активаторы плазминогена. /В кн. Фибринолиз: Современные фундаментальные и клинические концепции. / Под ред.П.Дж. Гаффни, С. Балкув-Улютина; Пер. с англ. В.М.Кучерского. – М.:Медицина. – 1982. – С.13-28.
32. Парусов В.Н. Патологическая анатомия, патогенез и экспериментальная терапия тяжелых форм гриппа. // Л.Медицина. – 1981. – 192с.
33. Патарая С.А. Биохимия и физиология семейства эндотелинов./ Патарая С.А., Преображенский В.Д., Сидоренко Б.А. // Кардиология. – 2000. – № 6. – С.78-85.
34. Петрищев Н.Н. Дисфункция эндотелия. Причины, механизмы, фармакологическая коррекция. // СПб.: СПбГМУ. – 2003. – 184с.
35. Петрищев Н.Н. Содержание растворимых маркеров апоптоза и циркулирующих аннексинV связанных апоптических клеток в крови больных острым коронарным синдромом. / Петрищев Н.Н., Васина Л.В., Луговая А.В. // Вестник Санкт – Петербургского университета. – 2008. – 11(1) – С.14-23
36. Роганова И.В. Значение нарушений тромбоцитарно-сосудистого гемостаза в патогенезе гриппа. // Инфекционные болезни – 2009. – т.7(1). – С.183-184
37. Руководство по инфекционным болезням / (Под ред. Ю.В.Лобзина) – С-Петербург, "Фолиант" – 2000. – 932с.
38. Северина И.С. Растворимая форма гуанилатциклазы в молекулярном механизме физиологических эффектов окиси азота и в регуляции процесса агрегации тромбоцитов. // Бюл. эксперим. биол. и мед. – 1995. – № 3. – С.230-235.
39. Сергеев Н.В. Поражения сердечно-сосудистой системы при гриппе. / Сергеев Н.В., Лейтес Ф.Я. // М. – 1962. – 94с.
40. Фаллер Д.М. Молекулярная биология клетки.руководство для врачей./ Фаллер Д.М.,Шилдс Д. // М.,Бином – Пресс. – 2006 – С.134-135.

41. Фильченков А.А. Каспазы: регуляторы апоптоза и других клеточных функций. // Биохимия – 2003. – 49(4) – С.453 – 466
42. Флетчер Б. Т. Ответ антикоагулянтных путей при ДВС. // Тромбы, кровоточивость и болезни сосудов. – 2002. – № 2. – С. 12-20.
43. Фрейдлин И.С. Эндотелиальные клетки в качестве мишеней и продуцентов цитокинов./ Фрейдлин И.С.,Шейнин Ю.А. // Мед. иммунология. – 2001. – Т3№4 – С.499-514
44. Харченко Е.П. Иммуноэпитопный континуум белков и возможные его проявления. // Российский иммунолог. журнал. – 2013 – 7(16) – С.179-180.
45. Хаютин В.М. Механорецепция эндотелия артериальных сосудов и механизмы защиты от развития гипертонической болезни. // Кардиология.– 1996. – № 7. – С.27-35.
46. Цинзерлинг А.В. Этиология и патологическая анатомия тяжелых форм ОРИ. // Л.Медицина. – 1977. – 69с.
47. Шилкина Н.П. Сосудистая стенка и гемостаз. // Тромбоз, гемостаз и реология. – 2000. – № 4. – С.39-40.
48. Широкова А.В. Апоптоз. Сигнальные пути изменения ионного и водного баланса клетки.//Цитология. – 2007. – №5. – С.385-394
49. Яровая Г. А. Калликреин-кининовая система: новые факты и концепции // Вопросы мед. химии. – 2001. – № 1. – С. 20-42.
50. Adler B. Endothelial cells in human cytomegalovirus infection: one host cell out of many or a crucial target for virus spread? / Adler B, Sinzger C. // Thromb Haemost. – 2009. – 102(6) – 1057-63.
51. Akarsu H. Crystal structure of the M1 protein-binding domain of the influenza A virus nuclear export protein (NEP/NS2)./Akarsu H, Burmeister WP, Petosa C, Petit I, Müller CW, Ruigrok RW, Baudin F. // EMBO J. – 2003. – 22(18) – P.4646-55.
52. Aleksandrowicz P. Viral haemorrhagic fever and vascular alterations./ Aleksandrowicz P, Wolf K, Falzarano D, Feldmann H, Seebach J, Schnittler H. // Hamostaseologie. – 2008. – 28 (1-2) – P.77-84.

53. Ali A. Influenza virus assembly: effect of influenza virus glycoproteins on the membrane association of M1 protein./ Ali A, Avalos RT, Ponimaskin E, Nayak DP // *J Virol.* – 2000. – 74(8) – P.8709-19
54. Andreoletti L. Viral causes of human myocarditis. /Andreoletti L., Leveque N., Boulagnon C., Brasselet C. // *Arch. Cardiovasc. Dis.* – 2009. – Vol. 102.-P.6-7.
55. Andres O. CD46- and CD150-independent endothelial cell infection with wild-type measles viruses. /Andres O, Obojes K, Kim KS, ter Meulen V, Schneider-Schaulies J. // *J Gen Virol.* – 2003. – 84(Pt 5) – P.1189-97.
56. Aragon, T. Eukaryotic translation initiation factor 4GI is a cellular target for NS1 protein, a translational activator of influenza virus./ Aragon, T., de la Luna, S., Novoa, I., Carrasco, L., Ortin, J. & Nieto, A. // *Mol Cell Biol.* – 2000. – 20 – P. 6259–6268.
57. Armstrong SM. Influenza infects lung microvascular endothelium leading to microvascular leak: role of apoptosis and claudin-5. /Armstrong SM, Wang C, Tigdi J, Si X, Dumpit C, Charles S, Gamage A, Moraes TJ, Lee WL. // *PLoS One.* – 2012 – 7:e47323;
58. Avalos RT. Association of influenza virus NP and M1 proteins with cellular cytoskeletal elements in influenza virus-infected cells./ Avalos RT, Yu Z, Nayak DP // *J Virol.* – 1997. – 71(4):2947-58.
59. Avirutnan P. Dengue virus infection of human endothelial cells leads to chemokine production, complement activation, and apoptosis./ Avirutnan, P., P. Malasit, B. Seliger, S. Bhakdi, and M. Husmann // *J. Immunol.* – 1998. – 161:6338–6346.
60. Avirutnan P. Secreted NS1 of dengue virus attaches to the surface of cells via interactions with heparan sulfate and chondroitin sulfate E./ Avirutnan P, Zhang L, Punyadee N, Manuyakorn A, Puttikhunt C // *PLoS Pathog.* – 2007. – 3(11): e183.
61. Avraham HK. HIV-1 Tat-mediated effects on focal adhesion assembly and permeability in brain microvascular endothelial cells./ Avraham HK, Jiang S, Lee TH, Prakash O, Avraham S // *J Immunol.* – 2004. – 173(10) – P.6228-33.

62. Barman S. Transport of viral proteins to the apical membranes and interaction of matrix protein with glycoproteins in the assembly of influenza viruses./ Barman S, Ali A, Hui EK, Adhikary L, Nayak DP. // *Virus Res.* – 2001. – 77(1) – P.61-9.
63. Barman S. Role of transmembrane domain and cytoplasmic tail amino acid sequences of influenza A virus neuraminidase in raft association and virus budding./ Barman S, Adhikary L, Chakrabarti AK, Bernas C, Kawaoka Y, Nayak DP // *J Virol.* – 2004. – 78(10)5 – P.258-69.
64. Basu, A. Vascular endothelium: the battlefield of dengue viruses./ Basu, A., and U. C. Chaturvedi. // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* – 2008. – 53. – P.287-299.
65. Bateman AC Glycan analysis and influenza A virus infection of primary swine respiratory epithelial cells: the importance of NeuAc{alpha}2-6 glycans./ Bateman AC, Karamanska R, Busch MG, Dell A, Olsen CW, Haslam SM // *J Biol Chem.* – 2010. – 285(44) – P.34016-26.
66. Baudin F. In vitro dissection of the membrane and RNP binding activities of influenza virus M1 protein./ Baudin F, Petit I, Weissenhorn W, Ruigrok RW // *Virology.* – 2001. – 281(1) – P.102-8.
67. Bauriedel G. Apoptosis in restenosis versus stable-angina atherosclerosis: implications for the pathogenesis of restenosis./ Bauriedel G, Schluckebier S, Hutter R, Welsch U, Kandolf R, Lüderitz B, Prescott MF. // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 1998. – 18(7) –P. 1132-9.
68. Bhandary YP. Regulation of Lung Injury and Fibrosis by p53-Mediated Changes in Urokinase and Plasminogen Activator Inhibitor-1./ Bhandary YP, Shetty SK, Marudamuthu AS, Ji HL, Neuenschwander PF, Boggaram V, Morris GF, Fu J, Idell S, Shetty S. // *Am J Pathol.* – 2013. – pii: S0002-9440(13)00283-6
69. Bialas KM. Specific residues in the 2009 H1N1 swine-origin influenza matrix protein influence virion morphology and efficiency of viral spread in vitro./Bialas KM, Desmet EA, Takimoto T. // *PLoS One.* – 2012. – 7(11):e50595.

70. Bibas M. HIV-Associated Venous Thromboembolism. / Bibas M, Biava G, Antinori A. // *Mediterr J Hematol Infect Dis.* – 2011. – 3(1):e2011030.
71. Böckeler M. Breakdown of paraendothelial barrier function during Marburg virus infection is associated with early tyrosine phosphorylation of platelet endothelial cell adhesion molecule-1./ Böckeler M, Ströher U, Seebach J, Afanasieva T, Suttorp N, Feldmann H, Schnittler HJ. // *J Infect Dis.* – 2007. – 196(2) – P.337-46.
72. Bok RA. Herpes simplex virus decreases endothelial cell plasminogen activator inhibitor./ Bok RA, Jacob HS, Balla J, Juckett M, Stella T, Shatos MA, Vercellotti GM. // *Thromb Haemost.* – 1993. – 69(3) – P.253-8.
73. Bornholdt, Z. A. X-ray structure of influenza virus NS1 effector domain./ Bornholdt, Z. A. & Prasad, B. V. // *Nat Struct Mol Biol.* – 2006. – №13 – P. 559-560.
74. Bortner C. D. Caspase independent/dependent regulation of K⁺, cell shrinkage, and mitochondrial membrane potential during lymphocyte apoptosis./ Bortner C. D., Cidlowski J. A. // *J. Biol. Chem.* – 1999. – 274 – P.21 953-21 962.
75. Bortz E. Host- and strain-specific regulation of influenza virus polymerase activity by interacting cellular proteins. / Bortz E, Westera L, Maamary J, Steel J, Albrecht RA, Manicassamy B, Chase G, Martínez-Sobrido L, Schwemmle M, García-Sastre A. // *MBio.* – 2011. – 2(4). pii: e00151-11.
76. Boulo S Review Nuclear traffic of influenza virus proteins and ribonucleoprotein complexes./ Boulo S, Akarsu H, Ruigrok RW, Baudin F // *Virus Res.* – 2007. – 124 (1-2) – P.12-21.
77. Bourmakina SV The morphology and composition of influenza A virus particles are not affected by low levels of M1 and M2 proteins in infected cells./ Bourmakina SV, García-Sastre A // *J Virol.* – 2005. – 79(12) – P.7926-32.
78. Braakman I Folding of influenza hemagglutinin in the endoplasmic reticulum./ Braakman I, Hoover-Litty H, Wagner KR, Helenius A. // *J Cell Biol.* – 1991. – 114(3) – P.401-11.

79. Bradel-Tretheway BG. The human H5N1 influenza A virus polymerase complex is active in vitro over a broad range of temperatures, in contrast to the WSN complex, and this property can be attributed to the PB2 subunit. / Bradel-Tretheway BG, Kelley Z, Chakraborty-Sett S, Takimoto T, Kim B, Dewhurst S. // *J Gen Virol.* – 2008. – 89 (Pt 12) – P.2923-32.
80. Bras M. Programmed Cell Death via Mitochondria: Different Modes of Dying. / Bras M., Queenan B., Susin S. A. // *Biochemistry(Moscow)* – 2005. – 70(2) – p.284-293
81. Brown MG Dengue virus infection of mast cells triggers endothelial cell activation. / Brown MG, Hermann LL, Issekutz AC, Marshall JS, Rowter D, Al-Afif A, Anderson R. // *J Virol.* – 2011. – 85(2) – P.1145-50.
82. Brydon E.W.A. Role of apoptosis and cytokines in influenza virus morbidity. / Brydon E.W.A., Morris S., Sweet C. // *FEMS Microbiology Reviews.* – 2005. – V. 29. – P. 837-850.
83. Bui M Role of the influenza virus M1 protein in nuclear export of viral ribonucleoproteins. / Bui M, Wills EG, Helenius A, Whittaker GR // *J Virol.* – 2000 – 74(4) – P.1781-6.
84. Bull TM. Human herpesvirus-8 infection of primary pulmonary microvascular endothelial cells. / Bull TM, Meadows CA, Coldren CD, Moore M, Sotto-Santiago SM, Nana-Sinkam SP, Campbell TB, Geraci MW. // *Am J Respir Cell Mol Biol.* – 2008. – 39(6) – P.706-16.
85. Bunce PE. Pandemic H1N1 influenza infection and vascular thrombosis. / Bunce PE, High SM, Nadjafi M, Stanley K, Liles WC, Christian MD. // *Clin Infect Dis.* – 2011. – 52:e14 – 7;
86. Burleigh LM Influenza A viruses with mutations in the m1 helix six domain display a wide variety of morphological phenotypes. / Burleigh LM, Calder LJ, Skehel JJ, Steinhauer DA // *J Virol.* – 2005. – 79(2) – P.1262-70.
87. Cao S. A nuclear export signal in the matrix protein of Influenza A virus is required for efficient virus replication. / Cao S, Liu X, Yu M, Li J, Jia X, Bi Y, Sun L, Gao GF, Liu W. // *J Virol.* – 2012. – 86(9) – P.4883-91.

88. Carr S.M. Characterization of a mitochondrial-targeting signal in the PB2 protein of influenza viruses./ Carr S.M., Carnero E., Carcia-Sastre A., Brownlee G.G., Fodor E. // *Virology*. – 2006. – 344(2) – P.492-508
89. Carrat F. F virologic survey of patients admitted to a critical care unit for acute cardiorespiratory failure / F. Carrat, M. Leuez-Ville, M.Tonnellier, J.L. Baudel, J. deshayes, P. Meyer, T.Maury, J. Galimand, C.Rouzioux, G. Offenstadt // *Intensive Care Med*. – 2006. – V.32 – P.156-159
90. Castrucci MR Reverse genetics system for generation of an influenza A virus mutant containing a deletion of the carboxyl-terminal residue of M2 protein./ Castrucci MR, Kawaoka Y. // *J Virol*. – 1995. – 69(5) – P.2725-8.
91. Cesarman-Maus G Molecular mechanisms of fibrinolysis./ Cesarman-Maus G, Hajjar KA. // *Br J Haematol*. – 2005. – 129(3) –P.307-21.
92. Chambers P Heptad repeat sequences are located adjacent to hydrophobic regions in several types of virus fusion glycoproteins. /Chambers P, Pringle CR, Easton AJ. // *J Gen Virol*. – 1990. – 71 (Pt 12) – P.3075-80.
93. Chan Michael C.W. Influenza H5N1 virus infection of polarized human epithelial cells and lung microvascular endothelial cells. / Chan Michael C.W., Chan Rehee W.Y., Yu W.C.L // *Respir.Res*. – 2009. – V.10 (1) – P.102-115
94. Chaves A. J.Neuropathogenesis of a highly pathogenic avian influenza virus (H7N1) in experimentally infected chickens. / Chaves A. J.,Busquets N., Valle R., Rivas R., Vergara-Alert J.,Dolz R.,Ramis A.,Darji A., Majó N. // *Vet Res*. – 2011. – V.42. – P. 106.
95. Chen BJ The influenza virus M2 protein cytoplasmic tail interacts with the M1 protein and influences virus assembly at the site of virus budding. /Chen BJ, Leser GP, Jackson D, Lamb RA. // *J Virol*. – 2008. – V.82 (20) – P.10059-70.
96. Chen CJ Differential localization and function of PB1-F2 derived from different strains of influenza A virus. / Chen CJ, Chen GW, Wang CH, Huang CH, Wang YC, Shih SR. // *J Virol*. – 2010. – V.84 (19) – P.10051-62.

97. Chen P. and Easton A. Apoptotic phenotype alters the capacity of tumor necrosis factor – related apoptosis – inducing ligand(TRAIL) to induce human vascular endothelial activation.//*J.Vasc.Res.* – 2008. – V.45. – P.111-122
98. Chen W Human papillomavirus causes an angiogenic switch in keratinocytes which is sufficient to alter endothelial cell behavior./ Chen W, Li F, Mead L, White H, Walker J, Ingram DA, Roman A. // *Virology.* – 2007. – V.367 (1) – P.168-74.
99. Cheng X.F.Characterization of receptors interacting specially with the B-chain of tissue plasminogen activator on endothelial cells. / Cheng X.F., Pohl G., Back O. // *Fibrinolysis.* – 1996. – Vol.10. – P.167-173.
100. Chi D The effects of HIV infection on endothelial function. / Chi D, Henry J, Kelley J, Thorpe R, Smith JK, Krishnaswamy G // *Endothelium.* – 2000. – V.7 (4) – P.223-42.
101. Chien, C. Y. Biophysical characterization of the complex between double-stranded RNA and the N-terminal domain of the NS1 protein from influenza A virus: evidence for a novel RNA-binding mode. / Chien, C. Y., Xu, Y., Xiao, R., Aramini, J. M., Sahasrabudhe, P. V., Krug, R. M. & Montelione, G. T. // *Biochemistry.* – 2004. – V.43 – P.1950-1962
102. Chironi GN Endothelial microparticles in diseases. / Chironi GN, Boulanger CM, Simon A, Dignat-George F, Freyssinet JM, Tedgui A // *Cell Tissue Res.* – 2009. – V.335 (1) – P.143-51.
103. Chobrial I. M.Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. / Chobrial I. M., Witzig T. E., Adjei A. A. // *CA Cancer J. Clin.* – 2005. – V. 55 – P.178-194
104. Chu J. J. Interaction of West Nile virus with alpha v beta 3 integrin mediates virus entry into cells. / Chu, J. J., and M. L. Ng. // *J. Biol. Chem.* – 2004. – V. 279 – P.54533-54541.
105. Chua MA, Schmid S, Perez JT, Langlois RA, Tenover BR. Influenza A virus utilizes suboptimal splicing to coordinate the timing of infection. // *Cell Rep.* – 2013. – V.3 (1) – P.23-9.

106. Clere N The human papillomavirus type 18 E6 oncoprotein induces Vascular Endothelial Growth Factor 121 (VEGF121) transcription from the promoter through a p53-independent mechanism. / Clere N, Bermont L, Fauconnet S, Lascombe I, Saunier M, Vettoretti L, Plissonnier ML, Mougin C. // *Exp Cell Res.* – 2007. – V. 313(15) – P.3239-50.
107. Clifford M Evidence for a novel gene associated with human influenza A viruses. / Clifford M, Twigg J, Upton C. // *J.Virol.* – 2009. – V.6 – P.198.
108. Coleman JR. The PB1-F2 protein of Influenza A virus: increasing pathogenicity by disrupting alveolar macrophages. // *Viol J.* – 2007. – V.4 – P.9.
109. Cota-Gomez A The human immunodeficiency virus-1 Tat protein activates human umbilical vein endothelial cell E-selectin expression via an NF-kappa B-dependent mechanism. / Cota-Gomez A, Flores NC, Cruz C, Casullo A, Aw TY, Ichikawa H, Schaack J, Scheinman R, Flores SC. // *J Biol Chem.* – 2002. – V.277 (17) – P.14390-9.
110. Cota-Gomez A HIV-1 Tat increases oxidant burden in the lungs of transgenic mice. / Cota-Gomez A, Flores AC, Ling XF, Varella-Garcia M, Flores SC // *Free Radic Biol Med.* – 2011. – V.51 (9) – P.1697-707.
111. Cros JF An unconventional NLS is critical for the nuclear import of the influenza A virus nucleoprotein and ribonucleoprotein. / Cros JF, García-Sastre A, Palese P. // *Traffic.* – 2005. – V.6 (3) – P.205-13.
112. Cross KJ Composition and functions of the influenza fusion peptide. / Cross KJ, Langley WA, Russell RJ, Skehel JJ, Steinhauser DA. // *Protein Pept Lett.* – 2009. – V.16 (7) – P.766-78.
113. Cucurull E. Thrombomodulin: A new frontier in lupus research. / Cucurull E., Gharavi A.E. // *Clin. Exp. Rheumatol.* – 1997. – Vol.15. – P.1-9.
114. Dalrymple N. Productive Dengue Virus Infection of Human Endothelial Cells Is Directed by Heparan Sulfate-Containing Proteoglycan Receptor. / Dalrymple N. and Mackow E. R. // *Journal of virology.* – 2011. – V. 85(18) – P. 9478-9485

115. Dias A The cap-snatching endonuclease of influenza virus polymerase resides in the PA subunit. / Dias A, Bouvier D, Crépin T, McCarthy AA, Hart DJ, Baudin F, Cusack S, Ruigrok RW. // *Nature*. – 2009. – V.458 (7240) – P.914-8.
116. Diebold I. The 'PAI-1 paradox' in vascular remodeling. / Diebold I, Kraicun D, Bonello S, Görlach A. // *Thromb Haemost*. – 2008. – 100(6) – P.984-91.
117. Edinger AL. CD4-independent, CCR5-dependent infection of brain capillary endothelial cells by a neurovirulent simian immunodeficiency virus strain. / Edinger AL, Mankowski JL, Doranz BJ, Margulies BJ, Lee B, Rucker J, Sharron M, Hoffman TL, Berson JF, Zink MC, Hirsch VM, Clements JE, Doms RW. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 1997. – V.94 (26) – P.14742-7.
118. Elleman CJ. The M1 matrix protein controls the filamentous phenotype of influenza A virus. / Elleman CJ, Barclay WS // *Virology*. – 2004. – V.321 (1) – P.144-53.
119. Elster C. Influenza virus M1 protein binds to RNA through its nuclear localization signal. / Elster C, Larsen K, Gagnon J, Ruigrok RW, Baudin F // *J Gen Virol*. – 1997. – V.78 (Pt 7) – P.1589-96.
120. Epstein SE Insights into the role of infection in atherogenesis and in plaque rupture. / Epstein SE, Zhu J, Najafi AH, Burnett MS. // *Circulation*. – 2009. – V.119 (24) – P.3133-41.
121. Erbar S Selective receptor expression restricts Nipah virus infection of endothelial cells. / Erbar S, Diederich S, Maisner A. // *Virol J*. – 2008. – V.5 – P.142.
122. Fay WP Vascular functions of the plasminogen activation system. / Fay WP, Garg N, Sunkar M. // *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. – 2007. – V.27 (6) – P.1231-7.
123. Feldmann A. Targeted infection of endothelial cells by avian influenza virus A/FPV/Rostock/34(H7N1) in chicken embryos. / Feldmann A, Schafer M.K., Garten W., Klenk H.D. // *J.Virol*. – 2000. – Vol.74 (17). – P.8018-8027.
124. Felez J. Localization of Fibrinolytic Components on Vascular Cells // *Fibrinolysis*. – 1993. – N7. – Suppl.1. – P.13-14.

125. Fislová T. Association of the influenza virus RNA polymerase subunit PB2 with the host chaperonin CCT. / Fislová T., Thomas B., Graef K.M., Fodor E. // *J Virol.* – 2010. – V.84 (17) – P.8691-9.
126. Fletcher NF. Hepatitis C virus infects the endothelial cells of the blood-brain barrier. / Fletcher NF, Wilson GK, Murray J, Hu K, Lewis A, Reynolds GM, Stamataki Z, Meredith LW, Rowe IA, Luo G, Lopez-Ramirez MA, Baumert TF, Weksler B, Couraud PO, Kim KS, Romero IA, Jopling C, Morgello S, Balfe P, McKeating JA. // *Gastroenterology.* – 2012. – V.142 (3) – P.634-643
127. Francisci D HIV type 1 infection, and not short-term HAART, induces endothelial dysfunction. / Francisci D, Giannini S, Baldelli F, Leone M, Belfiori B, Guglielmini G, Malincarne L, Gresele P. // *AIDS.* – 2009. – V.23 (5) – P.589-96.
128. Furchgott RF. Endothelium-derived relaxing factor: discovery, early studies, and identification as nitric oxide. // *Biosci Rep.* – 1999. – V.19(4) – P.235-51
129. Galluzzi L. Viral Control of Mitochondrial Apoptosis. / Galluzzi L BrennerC., Morselli E, Touat Z, Kroemer G. // *PLoS Pathog.* – 2008. – V. 4. – P.1-16
130. Gannagé M. Matrix protein 2 of influenza A virus blocks autophagosome fusion with lysosomes. / Gannagé M, Dormann D, Albrecht R, Dengjel J, Torossi T, Rämer PC, Lee M, Strowig T, Arrey F, Conenello G, Pypaert M, Andersen J, García-Sastre A, Münz C. // *Cell Host Microbe.* – 2009. – V.6 (4) – P.367-80.
131. Garaigorta U., Genetic analysis of influenza virus NS1 gene: a temperature-sensitive mutant shows defective formation of virus particles. /Garaigorta, U., Falcon, A. M. & Ortin, J. // *J Virol.* – 2005. – V. 79 – P.15246-15257.
132. Garcia, M. A. Impact of protein kinase PKR in cell biology: from antiviral to antiproliferative action. / Garcia, M. A., Gil, J., Ventoso, I., Guerra, S., Domingo, E., Rivas, C. & Esteban, M. // *Microbiol Mol Biol Rev.* – 2006. – V.70 – P.1032–1060.

133. Gaur P. Influenza A virus neuraminidase protein enhances cell survival through interaction with carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6 (CEACAM6) protein. / Gaur P, Ranjan P, Sharma S, Patel JR, Bowzard JB, Rahman SK, Kumari R, Gangappa S, Katz JM, Cox NJ, Lal RB, Sambhara S, Lal SK. // *J Biol Chem.* – 2012. – V.287 (18) – P.15109-17.
134. Gavrilovskaya IN. Andes virus infection of lymphatic endothelial cells causes giant cell and enhanced permeability responses that are rapamycin and vascular endothelial growth factor C sensitive. / Gavrilovskaya IN, Gorbunova EE, Mackow ER. // *J Virol.* – 2012. – V.86 (16) – P.8765-72.
135. Giacomuzzi E. New insights on the sialidase protein family revealed by a phylogenetic analysis in metazoa. / Giacomuzzi E, Bresciani R, Schauer R, Monti E, Borsani G. // *PLoS One.* – 2012. – V.7 (8):e44193.
136. Golebiewski L. The avian influenza virus NS1 ESEV PDZ binding motif associates with Dlg1 and Scribble to disrupt cellular tight junctions./ Golebiewski L, Liu H, Javier RT, Rice AP. // *J Virol.* – 2011. – V.85 (20) – P.10639-48.
137. Gong J Structure and functions of influenza virus neuraminidase. / Gong J, Xu W, Zhang J. // *Curr Med Chem.* – 2007. – V.14 (1) – P.113-22.
138. Gonzalez–Gronow M. V GRP78: A Multifunctional Receptor on the Cell Surface./ Gonzalez–Gronow M., Selim M.A., Papalas J., and Pizzo S. // *Antioxidants & Redox Signaling.* – 2009. – V.11 (9) – P. 2299-2306
139. Gorai T. F1Fo-ATPase, F-type proton-translocating ATPase, at the plasma membrane is critical for efficient influenza virus budding. / Gorai T, Goto H, Noda T, Watanabe T, Kozuka-Hata H, Oyama M, Takano R, Neumann G, Watanabe S, Kawaoka Y. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2012. – V.109 (12) – P.4615-20.
140. Goto H. Plasminogen-binding activity of neuraminidase determines the pathogenicity of influenza A virus. / Goto H., Wells K., Takada A. & Kawaoka Y. // *J Virol.* – 2001. – V.75 – P. 9297–9301.
141. Graef K.M. The PB2 subunit of the influenza virus RNA polymerase affects virulence by interacting with the mitochondrial antiviral signaling protein and inhibiting expression of beta interferon. / Graef KM, Vreede FT, Lau YF,

- McCall AW, Carr SM, Subbarao K, Fodor E. // *J Virol.* – 2010. – V.84 (17) – P.8433-45.
142. Gralinski LE Mechanisms of severe acute respiratory syndrome coronavirus-induced acute lung injury. Gralinski LE, Bankhead A 3rd, Jeng S, Menachery VD, Proll S, Belisle SE, Matzke M, Webb-Robertson BJ, Luna ML, Shukla AK, Ferris MT, Bolles M, Chang J, Aicher L, Waters KM, Smith RD, Metz TO, Law GL, Katze MG, McWeeney S, Baric RS. // *MBio.* – 2013. – V.64 (4).
143. Greaves K. The prevalence of myocarditis and skeletal muscle injury during acute viral influenza infection / K. Greaves, J.S. Oxford, C.P. Price, G.H. Clarke, T. Crake // *Arch.Intern.Vtd.* – 2003. – V.163. – P.165-168
144. Greenspan, D. Two nuclear location signals in the influenza virus NS1 nonstructural protein. / Greenspan, D., Palese, P. & Krystal, M // *J Virol.* – 1988. – V.62 – P.3020-3026
145. Grulich-Heun J. The role of vascular endothelial cells in the regulation of fibrinolysis. / Grulich-Heun J., Muler-Berghans G. // *Z.Kardiol.* – 1989. – Vol.78. – Suppl N6. – P.25-29.
146. Guan Z Interaction of Hsp40 with influenza virus M2 protein: implications for PKR signaling pathway. / Guan Z, Liu D, Mi S, Zhang J, Ye Q, Wang M, Gao GF, Yan J. // *Protein Cell.* – 2010. – V.1 (10) – P.944-55.
147. Guu T.S. Mapping the domain structure of the influenza A virus polymerase acidic protein (PA) and its interaction with the basic protein 1 (PB1) subunit. / Guu TS, Dong L, Wittung-Stafshede P, Tao YJ. // *Virology.* – 2008. – 379 (1) – P.135-42.
148. Haidari M. Influenza virus directly infects, inflames, and resides in the arteries of atherosclerotic and normal mice. / Haidari M., Wyde P.R., Litovsky S., Vela D., Ali M., Casscells S.W., Madjid M. // *Atherosclerosis.* – 2010. – V.208. – P.90-6.
149. Halder UC. Cell death regulation during influenza A virus infection by matrix (M1) protein: a model of viral control over the cellular survival

- pathway./Halder UC, Bagchi P, Chattopadhyay S, Dutta D, Chawla-Sarkar M. // Cell Death Dis. – 2011. – V.2:e197.
150. Hale BG The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses./ Hale BG, Randall RE, Ortín J, Jackson D. // J Gen Virol. – 2008. – V.89 (Pt 10) – P.2359-76.
151. Hallak LK. Targeted measles virus vector displaying echistatin infects endothelial cells via alpha(v)beta3 and leads to tumor regression. / Hallak LK, Merchan JR, Storgard CM, Loftus JC, Russell SJ. // Cancer Res. – 2005. – V.65 (12) – P.5292-300.
152. Hara K. Amino acid residues in the N-terminal region of the PA subunit of influenza A virus RNA polymerase play a critical role in protein stability, endonuclease activity, cap binding, and virion RNA promoter binding. / Hara K, Schmidt FI, Crow M, Brownlee GG. // J Virol. – 2006. – V.80 (16) – P.7789-98.
153. Hoffmann HH. Modulation of influenza virus replication by alteration of sodium ion transport and protein kinase C activity. / Hoffmann HH, Palese P, Shaw ML. // Antiviral Res. – 2008. – V.80 (2) – P.124-34.
154. Huang I.C. Influenza A virus neuraminidase limits viral superinfection. / Huang IC, Li W, Sui J, Marasco W, Choe H, Farzan M. // J Virol. – 2008. – V.82 (10) – P.4834-43
155. Huang S. A second CRM1-dependent nuclear export signal in the influenza A virus NS2 protein contributes to the nuclear export of viral ribonucleoproteins. / Huang S, Chen J, Chen Q, Wang H, Yao Y, Chen J, Chen Z. // J Virol. – 2013. – V.87 (2) – P.767-78.
156. Huang Y.H. Activation of coagulation and fibrinolysis during dengue virus infection. / Y.H. Huang , C.C. Liu , S.T. Wang , H.Y. Lei , H.L. Liu , Y.S. Lin , H.L.Wu , T.M. Yeh // J Med Virol. – 2001. – V. 63. – P. 247-51.
157. Hudjetz B. Human-like PB2 627K influenza virus polymerase activity is regulated by importin- α 1 and - α 7. / Hudjetz B, Gabriel G. // PLoS Pathog. – 2012. – V.8 (1):e1002488.

158. Hürlimann D HIV infection, antiretroviral therapy, and endothelium. / Hürlimann D, Weber R, Enseleit F, Lüscher TF // *Herz.* – 2005. – V.30 (6) – P.472-80.
159. Hutchinson EC. Mapping the phosphoproteome of influenza A and B viruses by mass spectrometry. / Hutchinson EC, Denham EM, Thomas B, Trudgian DC, Hester SS, Ridlova G, York A, Turrell L, Fodor E. // *PLoS Pathog.* – 2012. – V.8 (11):e1002993
160. Ilyinskii P.O. Inhibition of influenza M2-induced cell death alleviates its negative contribution to vaccination efficiency. / Ilyinskii PO, Gambaryan AS, Meriin AB, Gabai V, Kartashov A, Thoidis G, Shneider AM. // *PLoS One.* – 2008. – V.3 (1):e1417.
161. Isin B. Functional motions of influenza virus hemagglutinin: a structure-based analytical approach. / Isin B, Doruker P, Bahar. // *Biophys J.* – 2002. – V.82 (2) – P.569-81.
162. Ison M.G. Cardiac finding during uncomplicated acute influenza in ambulatory adults / M.G. Ison., V.Campbell, C.R. Rembold, J.Dent, F.G.Hayden // *Clin. Infect. Dis.* – 2005. – V.40. – P.415-422
163. Ivanovic T. Kinetics of proton transport into influenza virions by the viral M2 channel. / Ivanovic T, Rozendaal R, Floyd DL, Popovic M, van Oijen AM, Harrison SC // *PLoS One.* – 2012. – V.7 (3):e31566.
164. Iwatsuki-Horimoto K. Generation of influenza A virus NS2 (NEP) mutants with an altered nuclear export signal sequence. / Iwatsuki-Horimoto K, Horimoto T, Fujii Y, Kawaoka Y. // *J Virol.* – 2004. – V.78 (18) – P.10149-55.
165. Iwatsuki-Horimoto K. The cytoplasmic tail of the influenza A virus M2 protein plays a role in viral assembly. / Iwatsuki-Horimoto K, Horimoto T, Noda T, Kiso M, Maeda J, Watanabe S, Muramoto Y, Fujii K, Kawaoka Y. // *J Virol.* – 2006. – V.80 (11) – P.5233-40.
166. Javier R.T. Emerging theme: cellular PDZ proteins as common targets of pathogenic viruses. / Javier RT, Rice AP. // *J Virol.* – 2011. – V.85 (22) – P.11544-56.

167. Jersmann H. P. A. Synthesis and Surface Expression of CD14 by Human Endothelial Cells. / Jersmann H. P. A. Hii C. S. T. Hodge G.L. Ferrante A. // *Infect. Immun.* – 2001. – V.69 (1) – P. 479-485
168. Jones S.R. Potential complications of influenza A infections // *West J Med.* – 1976. – V.125. – P.341-346
169. Jou W.M. Complete structure of the hemagglutinin gene from the human influenza A/Victoria/3/75 (H3N2) strain as determined from cloned DNA. / Jou WM, Verhoeyen M, Devos R, Saman E, Fang R, Huylebroeck D, Fiers W, Threlfall G, Barber C, Carey N, Emtage S. // *Cell.* – 1980. – V.19 (3) – P.683-96.
170. Jung T.E. A new promoter-binding site in the PB1 subunit of the influenza A virus polymerase. / Jung TE, Brownlee GG. // *J Gen Virol.* – 2006. – V.87 (Pt 3) – P.679-88.
171. Kahaleh B. The microvascular endothelium in scleroderma. // *Rheumatology.* – 2008. – V.47. – P.14-15
172. Kampmann T. The Role of histidine residues in low-pH-mediated viral membrane fusion. / Kampmann T, Mueller DS, Mark AE, Young PR, Kobe B. // *Structure.* – 2006. – V.14 (10) – P.1481-7.
173. Kaufmann S. H. Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. / Kaufmann S. H., Earnshaw W. C. // *Exp. Cell Res.* – 2000. – V. 256 – P. 42-49.
174. Kaufmann S. H. Programmed cell death: alive and well in the new millennium. / Kaufmann S. H., Hengartner M. O // *Trends Cell Biol.* – 2001. – V.11 – P.526-534.
175. Kerry P.S. A cluster of conserved basic amino acids near the C-terminus of the PB1 subunit of the influenza virus RNA polymerase is involved in the regulation of viral transcription. / Kerry PS, Willsher N, Fodor E. // *Virology.* – 2008. – V.373 (1) – P.202-10.
176. Key N.S. Infection of vascular endothelial cells with herpes simplex virus enhances tissue factor activity and reduces thrombomodulin expression. / Key NS, Vercellotti GM, Winkelmann JC, Moldow CF, Goodman JL, Esmon NL, Esmon CT, Jacob HS. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1990. – V.87 (18) – P.7095-9.

177. Khan N.A. Gp120-mediated cytotoxicity of human brain microvascular endothelial cells is dependent on p38 mitogen-activated protein kinase activation. / Khan NA, Di Cello F, Stins M, Kim KS. // *J Neurovirol.* – 2007. – V.13 (3) – P.242-51.
178. Kim C.S. The final conformation of the complete ectodomain of the HA2 subunit of influenza hemagglutinin can by itself drive low pH-dependent fusion. / Kim CS, Epand RF, Leikina E, Epand RM, Chernomordik LV. // *J Biol Chem.* – 2011. – V. 286 (15) – P.13226-34.
179. Kim T.A. HIV-1 Tat-mediated apoptosis in human brain microvascular endothelial cells. / Kim TA, Avraham HK, Koh YH, Jiang S, Park IW, Avraham S. // *J Immunol.* – 2003. – V.170 (5) – P.2629-37.
180. Klenk H.D. Infection of endothelium by influenza viruses // *Thromb. Haemost.* – 2005. – Vol.94 (2). – P.262-265.
181. Kline E.R. Vascular oxidative stress and nitric oxide depletion in HIV-1 transgenic rats are reversed by glutathione restoration. / Kline ER, Kleinhenz DJ, Liang B, Dikalov S, Guidot DM, Hart CM, Jones DP, Sutliff RL // *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* – 2008. – V.294 (6) – P.H2792-804.
182. Kroemer G. Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. // *J. Exp. Med.* – 2000. – 192 – P.571-580.
183. Krumbholz A. Current knowledge on PB1-F2 of influenza A viruses./ Krumbholz A, Philipps A, Oehring H, Schwarzer K, Eitner A, Wutzler P, Zell R. // *Med Microbiol Immunol.* – 2011. – V.200 (2) – P.69-75.
184. Kundu A. Transmembrane domain of influenza virus neuraminidase, a type II protein, possesses an apical sorting signal in polarized MDCK cells. / Kundu A, Avalos R, Sanderson C, Nayak D. // *J Virol.* – 1996. – V.70 – P.6508-6515.
185. Le Boudier F. Annexin II incorporated into influenza virus particles supports virus replication by converting plasminogen into plasmin. / Le Boudier F., Morello E., Rimmelzwaan G. F., Bosse F., Pechoux C., Delmas B. & Riteau B. // *J Virol.* – 2008. – V.82. – P.6820-6828.

186. Lechner D Circulating tissue factor-exposing microparticles. / Lechner D, Weltermann A. // *Thromb Res.* – 2008. – V.122 – Suppl 1 – P.S47-54.
187. Leong A.S. The pathology of dengue hemorrhagic fever. / Leong AS, Wong KT, Leong TY, Tan PH, Wannakrairot P. // *Semin Diagn Pathol.* – 2007. – V.24 (4) – P.227-36.
188. Li Y. Regulation of a nuclear export signal by an adjacent inhibitory sequence: the effector domain of the influenza virus NS1 protein. / Li, Y., Yamakita, Y. & Krug, R. M. // *Proc Natl Acad Sci U S A* – 1998. – V. 95 – P.4864-4869.
189. Liang Y. cis-Acting packaging signals in the influenza virus PB1, PB2, and PA genomic RNA segments. / Liang Y, Hong Y, Parslow TG. // *J Virol.* – 2005. – V.79 (16) – P.10348-55.
190. Liang Y. Mutational analyses of the influenza A virus polymerase subunit PA reveal distinct functions related and unrelated to RNA polymerase activity. / Liang Y, Danzy S, Dao LD, Parslow TG, Liang Y. // *PLoS One.* – 2012. – V.7 (1):e29485.
191. Liu M. The endothelial cell receptor GRP78 is required for mucormycosis pathogenesis in diabetic mice. / Liu M., Spellberg B., Phan Q.T., Fu Y., Fu Y, Lee AS, Edwards JE Jr, Filler SG, Ibrahim AS. // *J Clin Invest.* – 2010. – V.120 (6) – P.1914-24.
192. López-Ocejo O. Oncogenes and tumor angiogenesis: the HPV-16 E6 oncoprotein activates the vascular endothelial growth factor (VEGF) gene promoter in a p53 independent manner. / López-Ocejo O, Vilorio-Petit A, Bequet-Romero M, Mukhopadhyay D, Rak J, Kerbel RS. // *Oncogene.* – 2000. – V.19 (40) – P.4611-20.
193. Ludlow M. Systemic spread of measles virus: overcoming the epithelial and endothelial barriers. / Ludlow M, Allen I, Schneider-Schaulies J. // *Thromb Haemost.* – 2009. – V.102 (6) – P.1050-6.
194. Lunardi C. Endothelial cells' activation and apoptosis induced by a subset of antibodies against human cytomegalovirus: relevance to the pathogenesis of

- atherosclerosis. / Lunardi C, Dolcino M, Peterlana D, Bason C, Navone R, Tamassia N, Tinazzi E, Beri R, Corrocher R, Puccetti A. // *PLoS One*. – 2007. – V.2 (5):e473.
195. MacDonald L.A. Molecular interactions and trafficking of influenza A virus polymerase proteins analyzed by specific monoclonal antibodies. / MacDonald LA, Aggarwal S, Bussey KA, Desmet EA, Kim B, Takimoto T. // *Virology*. – 2012. – V.426 (1) – P.51-9.
196. Mahmoudian S. Influenza A virus proteins PB1 and NS1 are subject to functionally important phosphorylation by protein kinase C. / Mahmoudian S, Auerochs S, Gröne M, Marschall M. // *J Gen Virol*. – 2009. – V.90 (Pt 6) – P.1392-7.
197. Maisner A. Organ- and endotheliotropism of Nipah virus infections in vivo and in vitro. / Maisner A, Neufeld J, Weingartl H. // *Thromb Haemost*. – 2009. – V.102 (6) – P.1014-23.
198. Marc D. The RNA-binding domain of influenza virus non-structural protein-1 cooperatively binds to virus-specific RNA sequences in a structure-dependent manner. / Marc D, Barbachou S, Soubieux D. // *Nucleic Acids Res*. – 2013. – V.41 (1) – P.434-49.
199. Martin K Nuclear transport of influenza virus ribonucleoproteins: the viral matrix protein (M1) promotes export and inhibits import. / Martin K, Helenius A // *Cell*. – 1991. – V.67 (1) – P.117-30.
200. Mason A. Hepatitis B virus replication in damaged endothelial tissues of patients with extrahepatic disease. / Mason A, Theal J, Bain V, Adams E, Perrillo R // *Am J Gastroenterol*. – 2005. – V.100 (4) – P.972-6.
201. Matsuoka Y Neuraminidase stalk length and additional glycosylation of the hemagglutinin influence the virulence of influenza H5N1 viruses for mice. / Matsuoka Y, Swayne DE, Thomas C, Rameix-Welti MA, Naffakh N, Warnes C, Altholtz M, Donis R, Subbarao K. // *J Virol*. – 2009. – V.83 (9) – P.4704-8.
202. Maurer-Stroh S. Mapping the sequence mutations of the 2009 H1N1 influenza A virus neuraminidase relative to drug and antibody binding sites. /

- Maurer-Stroh S, Ma J, Lee RT, Sirota FL, Eisenhaber F. // *Biol Direct.* – 2009. – V.4 – P.18
203. Mazure G. Measles virus induction of human endothelial cell tissue factor procoagulant activity in vitro. / Mazure G, Grundy JE, Nygard G, Hudson M, Khan K, Srail K, Dhillon AP, Pounder RE, Wakefield AJ. // *J Gen Virol.* – 1994. – V.75 (Pt 11) – P.2863-71.
204. McCown M.F. Distinct domains of the influenza A virus M2 protein cytoplasmic tail mediate binding to the M1 protein and facilitate infectious virus production. / McCown MF, Pekosz A // *J Virol.* – 2006. – V.80 (16) – P.8178-89.
205. McGarthy S.A. Heterogeneity of the endothelial cell and its role in organ preference of tumour metastasis. / McGarthy S.A., Kuzu I., Gatter K.C. // *TIPS.* – 1991. – Vol.12. – P.462-465.
206. Melen K. Nuclear and nucleolar targeting of influenza A virus NS1 protein: striking differences between different virus subtypes. / Melen K., Kinnunen L., Fagerlund R., Ikonen N., Twu K. Y., Krug R. M. & Julkunen I. // *J Virol.* – 2007. – V. 81. – P.5995-6006
207. Mendu D.R. HIV-1 envelope protein gp140 binding studies to human brain microvascular endothelial cells. / Mendu DR, Katinger H, Sodroski J, Kim KS. // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2007. – V.363 (3) – P.466-71.
208. Mibayashi M. Inhibition of retinoic acid-inducible gene I-mediated induction of beta interferon by the NS1 protein of influenza A virus. / Mibayashi M, Martínez-Sobrido L, Loo YM, Cárdenas WB, Gale M Jr, García-Sastre A. // *J Virol.* – 2007. – V.81 (2) – P.514-24.
209. Min J. Y. A site on the influenza A virus NS1 protein mediates both inhibition of PKR activation and temporal regulation of viral RNA synthesis. / Min J. Y., Li S., Sen G. C. & Krug R. M. // *Virology.* – 2007. – V.363. – P.236–243.
210. Min J. Y. The primary function of RNA binding by the influenza A virus NS1 protein in infected cells: inhibiting the 2'-5' oligo (A) synthetase RNase L pathway. / Min, J. Y. & Krug, R. M. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2006. – V.103. – P.7100-7105.

211. Mitnaul L. The cytoplasmic tail of influenza A virus neuraminidase (NA) affects NA incorporation into virions, virion morphology, and virulence in mice but is not essential for virus replication. / Mitnaul L, Castrucci M, Murti K, Kawaoka Y. // *J Virol.* – 1996. – V.70 – P.873-879.
212. Mitola S. R. Bussolino Identification of Specific Molecular Structures of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Tat Relevant for Its Biological Effects on Vascular Endothelial Cells / S. Mitola. R. Soldi I. Zanon L. Barra M. I. Gutierrez B. Berkhout M. Giacca F. Bussolino // *J. of Virol.* – 2000, – V. 74. – p. 344-353.
213. Moeller A. Organization of the influenza virus replication machinery. / Moeller A, Kirchdoerfer RN, Potter CS, Carragher B, Wilson IA. // *Science.* – 2012. – V.338 (6114) – P.1631-4.
214. Mohammad Madjid, MD Acute infections, vaccination and prevention of cardiovascular disease // *CMAJ.* – 2008. – Vol. 179 (8). – P.749-750.
215. Moniwa N. Relationship of urokinase type plasminogen activator, plasminogen activator inhibitor type I and protein C in fibrinolysis of human placenta. // *Pol. J Pharmacol.* – 1996. – Vol.48 (2). – P.215-220.
216. Muramoto Y. Higly pathogenic H5N1 influenza virus causes coagulopathy in chickens / Y. Muramoto, H. Ozaki A. Takada C.H. Park Y. Sunden, T. Umemura, Y. Kawaoka, H. Matsuda, H. Kida // *Microbiol.Immunol.* – 2006. – V. 50. – P. 73-81
217. Muramoto Y. Higly pathogenic H5N1 influenza virus causes coagulopathy in chickens / Muramoto Y., Ozaki A., Takada C.H., Park Y., Sunden T., Umemura Y., Kawaoka H., Matsuda H., Kida // *Microbiol.Immunol.* – 2006. – V. 50. – P.73-81
218. Muramoto Y. Identification of novel influenza A virus proteins translated from PA mRNA. / Muramoto Y, Noda T, Kawakami E, Akkina R, Kawaoka Y // *J Virol.* – 2012. – Vol.87 (5). – P.2455-62
219. Murayama R. Influenza A virus non-structural protein 1 (NS1) interacts with cellular multifunctional protein nucleolin during infection. / Murayama R.,

- Harada Y., Shibata T., Kuroda K., Hayakawa S., Shimizu K. & Tanaka T. // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2007. – V.362 – P.880-885.
220. Neumann G. Nuclear import and export of influenza virus nucleoprotein. / Neumann G, Castrucci MR, Kawaoka Y. // *J Virol.* – 1997. – V.71 (12) – P.9690-700.
221. Neumann G. Influenza A virus NS2 protein mediates vRNP nuclear export through NES-independent interaction with hCRM1. / Neumann G, Hughes MT, Kawaoka Y // *EMBO J.* – 2000. – V.19 (24) – P.6751-8.
222. Ng A.K. Influenza polymerase activity correlates with the strength of interaction between nucleoprotein and PB2 through the host-specific residue K/E627. / Ng AK, Chan WH, Choi ST, Lam MK, Lau KF, Chan PK, Au SW, Fodor E, Shaw PC. // *PLoS One.* – 2012. – V.7 (5):e36415.
223. Noda T. Architecture of ribonucleoprotein complexes in influenza A virus particles. / Noda T., Sagara H., Yen A., Takada A., Kida H., Cheng R.H., Kawaoka Y. // *Nature.* – 2006. – V.439 (7075) – P.490-2
224. Noton S.L. Identification of the domains of the influenza A virus M1 matrix protein required for NP binding, oligomerization and incorporation into virions. / Noton SL, Medcalf E, Fisher D, Mullin AE, Elton D, Digard P // *J Gen Virol.* – 2007. – V.88 (Pt 8) – P.2280-90.
225. Nykky J. Cell death mechanisms in a CPV infection. / Nykky J., Tuusa J., Kirjavainen S., Vuento M., Gilbert L. // *International Journal of Nanomedicine.* – 2010. – V. 5. – P.417-428
226. Ohuchi M. Roles of neuraminidase in the initial stage of influenza virus infection. / Ohuchi M, Asaoka N, Sakai T, Ohuchi R. // *Microbes Infect.* – 2006. – V.8 (5) – P.1287-93.
227. Oliver J. J. Stimulated tissue plasminogen activator release as a marker of endothelial function in humans. / Oliver JJ, Webb DJ, Newby DE. // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 2005. – V.25 (12) – P.2470-9.

228. O'Neill R.E. The influenza virus NEP (NS2 protein) mediates the nuclear export of viral ribonucleoproteins. / O'Neill RE, Talon J, Palese P // *EMBO J.* – 1998. – V.17 (1) – P.288-96.
229. Paleolog E.M. Differential regulation by cytokines of constitutive and stimulated secretion of von Willebrand factor from endothelial cells. / Paleolog E.M., Crossman D.C. McVey J.H. // *Blood.* – 1990. – Vol.75. – P.688-695.
230. Palese P. Orthomyxoviridae: the viruses and their replication. / Palese, P. & Shaw M. L. // *In Fields Virology.* – 2007. – V.5. – P.1647-1689.
231. Paterson D. Emerging roles for the influenza A virus nuclear export protein (NEP). / Paterson D, Fodor E. // *PLoS Pathog.* – 2012. – V.8 (12):e1003019.
232. Patrone M. Cytomegalovirus UL131-128 products promote gB conformational transition and gB-gH interaction during entry into endothelial cells. / Patrone M, Secchi M, Bonaparte E, Milanese G, Gallina A. // *J Virol.* – 2007. – V.81 (20) – P.11479-88.
233. Pearson J.D. Normal endothelial cell function. // *Lupus.* – 2000. – 9:183-188.
234. Perkins L. E. and Swayne D. E. Pathobiology of A/chicken/Hong Kong/220/97 (H5N1) avian influenza virus in seven gallinaceous species. // *Vet. Pathol.* – 2001. – V.38. – P. 149-164.
235. Pielak R.M. Influenza M2 proton channels. / Pielak RM, Chou JJ. // *Biochim Biophys Acta.* – 2011. – V.1808 (2) – P.522-9.
236. Pinto L.H. Influenza virus M2 protein has ion channel activity. / Pinto LH, Holsinger LJ, Lamb RA. // *Cell.* – 1992. – V.69 (3) – P.517-28.
237. Pinto L.H. The M2 proton channels of influenza A and B viruses. / Pinto LH, Lamb RA. // *J Biol Chem.* – 2006. – V.281 (14) – P.8997-9000.
238. Popović M. Human cytomegalovirus infection and atherothrombosis. / Popović M, Smiljanić K, Dobutović B, Syrovets T, Simmet T, Isenović ER. // *J Thromb Thrombolysis.* – 2012. – V.33 (2) – P.160-72.

239. Portela A. The influenza virus nucleoprotein: a multifunctional RNA-binding protein pivotal to virus replication. / Portela A, Digard P. // *J Gen Virol.* – 2002 – V.83 (Pt 4) – P.723-34.
240. Prasad H.B. Retrospective analysis of necropsy findings in patients of H1N1 and their correlation to clinical features. / Prasad HB, Puranik SC, Kadam DB, Sangle SA, Borse RT, Basavraj A, Umarji PB, Mave V, Ghorpade SV, Bharadwaj R, Jamkar AV, Mishra AC. // *J Assoc Physicians India.* – 2011. – V.59 – P.498-500.
241. Rahbar A. Human cytomegalovirus infection of endothelial cells triggers platelet adhesion and aggregation. / Rahbar A. and Soderberg-Naucle´C. // *Journal Of Virology.* – 2005. – Vol. 79. – P.2211-2220
242. Randall R. E. & Goodbourn S. Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures. // *J Gen Virol.* – 2008. – V.89 – P.1-47.
243. Reutelingsperger C.P. Annexin V, the regulator of phosphatidylserine-catalyzed inflammation and coagulation during apoptosis. / Reutelingsperger CP, van Heerde WL // *Cell Mol Life Sci.* – 1997. – V.53 (6) – P.527-32.
244. Revello M.G. Human cytomegalovirus tropism for endothelial/epithelial cells: scientific background and clinical implications. / Revello MG, Gerna G. // *Rev Med Virol.* – 2010. – V.20 (3) – P.136-55.
245. Rey O. Nuclear retention of M1 protein in a temperature-sensitive mutant of influenza (A/WSN/33) virus does not affect nuclear export of viral ribonucleoproteins. / Rey O, Nayak DP // *J Virol.* – 1992. – 66 (10) – P.5815-24.
246. Reyhani F. The effect of two strains of influenza virus on cardial development in the chick embryo / F. Reyhani, I. Nazarian, J. Shakibi // *Jpn.Heart.* – 1983. – V.24. – P.507-61
247. Rich S. Endothelin Receptor Blockers in Cardiovascular Disease. / Rich S. and McLaughlin V. // *Circulation.* – 2003. – V.108 – P.2184-2190

248. Richard A. Caspase cleavage of viral proteins, another way for viruses to make the best apoptosis. / Richard A., Tulasne D., // *Cell death and disease*. – 2012. –V. 3: e277
249. Rijken D.C. New insights into the molecular mechanisms of the fibrinolytic system. / Rijken DC, Lijnen HR. // *J Thromb Haemost*. – 2009. – 7 (1) – P.4-13.
250. Robb N.C. NS2/NEP protein regulates transcription and replication of the influenza virus RNA genome. / Robb NC, Smith M, Vreede FT, Fodor E. // *J Gen Virol*. – 2009. – V.90 (Pt 6) – P.1398-407.
251. Roberts P.C. The M1 and M2 proteins of influenza A virus are important determinants in filamentous particle formation. / Roberts PC, Lamb RA, Compans RW // *Virology*. – 1998. – V.240 (1) – P.127-37.
252. Rong Q. Infection of hepatitis B virus in extrahepatic endothelial tissues mediated by endothelial progenitor cells. / Rong Q, Huang J, Su E, Li J, Li J, Zhang L, Cao K. // *Virol J*. – 2007. – V.4 – P.36.
253. Rott R. The pathogenic determinant of influenza virus. // *Vet Microbiol*. – 1992. – V.33 (1-4) – P.303-10.
254. Rott R. The pathogenic determinant of influenza virus. // *Vet Microbiol*. – 1992. – V.33 (1-4) – P.303-10.
255. Rott R. Influenza viruses, cell enzymes, and pathogenicity. / Rott R, Klenk HD, Nagai Y, Tashiro M // *Am J Respir Crit Care Med*. – 1995. – V.152 (4 Pt 2) – P.16-9.
256. Rubanyi G.M. The discovery of endothelin: the power of bioassay and the role of serendipity in the discovery of endothelium-derived vasocative substances. // *Pharmacol Res*. – 2011. – V.63 (6) – P.448-54.
257. Ryckman B.J. Characterization of the human cytomegalovirus gH/gL/UL128-131 complex that mediates entry into epithelial and endothelial cells. / Ryckman BJ, Rainish BL, Chase MC, Borton JA, Nelson JA, Jarvis MA, Johnson DC. // *J Virol*. – 2008. – V.82 (1) – P.60-70.
258. Sakao S. Initial apoptosis is followed by increased proliferation of apoptosis – resistant endothelial cells. / Sakao S. Taraseviciene-Stewart, Lee J.,

- Wood K.,Cool C. D., Voelkel N // *The Faseb Journal*. – 2005. – V. 19. – P.1178-1180
259. Schafer A.I. Vascular endothelium: In defense of blood fluidity. // *J. Clin. Invest.* – 1997. – Vol.99. – P.1143-1147.
260. Schleef R.R. Cytokine activation of vascular endothelium. Effects on tissue-type plasminogen activator and type 1 plasminogen activator inhibitor. / Schleef RR, Bevilacqua MP, Sawdey M, Gimbrone MA Jr., Loskutoff DJ. // *J Biol Chem.* – 1988. – V. 263 – P.5797-803
261. Schulze I.T. Effects of glycosylation on the properties and functions of influenza virus hemagglutinin. // *J Infect Dis.* – 1997. – V.176. – Suppl 1 – P.S24-8.
262. Schved J.F. von Willebrand factor antigen, tissue-type plasminogen activator antigen, and risk of death in human immunodeficiency virus 1-related clinical disease: independent prognostic relevance of tissue-type plasminogen activator. / Schved JF, Gris JC, Arnaud A, Martinez P, Sanchez N, Wautier JL, Sarlat C. // *J Lab Clin Med.* – 1992. – V.120 (3) – P.411-9.
263. Seo Sh. Characterization of a Porcine Lung Epithelial Cell. // Seo Sh., Goloubeva O., Webby R., Webster R.G. // *Journal Of Virology.* – 2001. – V.75. – P.9517–9525.
264. Seth R.B. Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3. / Seth RB, Sun L, Ea CK, Chen ZJ. // *Cell.* – 2005. – V.122 (5) – P.669-82
265. Sha B. Structure of a bifunctional membrane-RNA binding protein, influenza virus matrix protein M1. / Sha B, Luo M. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* – 1997. – V.4 – P.239-244.
266. Sharma K. Influenza A virus nucleoprotein exploits Hsp40 to inhibit PKR activation. Sharma K, Tripathi S, Ranjan P, Kumar P, Garten R, Deyde V, Katz JM, Cox NJ, Lal RB, Sambhara S, Lal SK. // *PLoS One.* – 2011. – V.6 (6):e20215.
267. Shestopalova L.V., Morphological changes in bird viscera in experimental infection by highly pathogenic H5N1 avian influenza virus. / Shestopalova L.V.,

- Shkurupiy V.A., Sharkova T.V., Shestopalov A.M. // Bull Exp Biol Med. – 2008. – V.146. – P.770-3.
268. Shimizu T. Crucial role of the influenza virus NS2 (NEP) C-terminal domain in M1 binding and nuclear export of vRNP./ Shimizu T, Takizawa N, Watanabe K, Nagata K, Kobayashi N // FEBS Lett. – 2011. – V.585 (1) – P.41-6.
269. Sinzger C. Fibroblasts, epithelial cells, endothelial cells and smooth muscle cells are major targets of human cytomegalovirus infection in lung and gastrointestinal tissues./Sinzger C, Grefte A, Plachter B, Gouw AS, The TH, Jahn G. // J Gen Virol. – 1995. – V.76 (Pt 4) – P.741-50
270. Sinzger C. Tropism of human cytomegalovirus for endothelial cells is determined by a post-entry step dependent on efficient translocation to the nucleus. / Sinzger C, Kahl M, Laib K, Klingel K, Rieger P, Plachter B, Jahn G. // J Gen Virol. – 2000. – V.81 (Pt 12) – P.3021-35.
271. Smeeth L. Risk of myocardial dial infarction and stroke after acute infection or vaccination / L. Smeeth , S.L.Thomas, A.J. Hall, R. Hubbard, P. Farrington, P. Vallance // N.Engl.J.Med. – 2004. – Vol.351. – P. 2611-18.
272. Solages A. Endothelial function in HIV-infected persons. / Solages A, Vita JA, Thornton DJ, Murray J, Heeren T, Craven DE, Horsburgh CR Jr. // Clin Infect Dis. – 2006. – V.42 (9) – P.1325-32.
273. Song M.S. Virulence of pandemic (H1N1) 2009 influenza A polymerase reassortant viruses. / Song MS, Pascua PN, Choi YK. // Virulence. – 2011. – V.2 (5) – P.422-6.
274. Sosothikul D. Activation of endothelial cells, coagulation and fibrinolysis in children with Dengue virus infection. / Sosothikul D., Seksarn P., Pongsewalak S., Thisyakorn U., Lusher J. // Thrombosis and Haemostasis. – 2007. – V. 97(4) – P. 627–634
275. Soto-Abraham M.V. Pathological changes associated with the 2009 H1N1 virus. / Soto-Abraham M.V., Soriano-Rosas J. // N. Engl. J.Med. – 2009. – Vol.20 – P.2001-2003

276. Sriwilaijaroen N. Molecular basis of the structure and function of H1 hemagglutinin of influenza virus. / Sriwilaijaroen N, Suzuki Y. // *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* – 2012. – V.88 (6) – P.226-49.
277. Stefanec T. Endothelial Apoptosis. Could it have a role in the pathogenesis and treatment of disease? // *Chest.* – 2000. – V. 117. – P. 841-854
278. Steiner M.K. Optimizing endothelin receptor antagonist use in the management of pulmonary arterial hypertension. / Steiner MK, Preston IR // *Vasc Health Risk Manag.* – 2008. – V.4 (5) – P.943-52
279. Steinhauer D.A. Role of hemagglutinin cleavage for the pathogenicity of influenza virus. / Steinhauer DA. // *Virology.* – 1999. – 258 (1) – P.1-20.
280. Stins M.F. Gp120 activates children's brain endothelial cells via CD4. / Stins M.F. Shen Y., Huang S.H., Gilles G., Kalra V.K., and Kim K.S. // *Journal of NeuroVirology.* – 2001. – V.7 – P.125-134
281. Sun H. The interaction between pathogens and the host coagulation system // *Physiology.* – 2006. – V. 21. – P. 281-288
282. Sun S. Prediction of biological functions on glycosylation site migrations in human influenza H1N1 viruses. / Sun S, Wang Q, Zhao F, Chen W, Li Z. // *PLoS One.* – 2012. – V.7 (2):e32119.
283. Sung J.C. Role of secondary sialic acid binding sites in influenza N1 neuraminidase. / Sung JC, Van Wynsberghe AW, Amaro RE, Li WW, McCammon JA. // *J Am Chem Soc.* – 2010 – V.132 (9) – P.2883-5.
284. Susin S. A. Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. / Susin S. A., Daugas E., Ravagnan L., Samejima K., Zamzami N., Loeffler M., Gostantini P., Ferri K. F., Irinopoulou T., Prévost M. C., Brothers G., Mak T. W., Penninger J., Earnshaw W. // *J. Exp. Med.* – 2000. – 192 – P.571-80.
285. Takeda M. Influenza a virus M2 ion channel activity is essential for efficient replication in tissue culture. / Takeda M, Pekosz A, Shuck K, Pinto LH, Lamb RA. // *J Virol.* – 2002. – V.76 (3) – P.1391-9.
286. Tedgui A. Apoptosis, a major determinant of atherothrombosis. / Tedgui A, Mallat Z. // *Arch Mal Coeur Vaiss.* – 2003. – V.96 (6) – P.671-5.

287. Teijaro J.R. Endothelial cells are central orchestrators of cytokine amplification during influenza virus infection. / Teijaro JR, Walsh KB, Cahalan S, Fremgen DM, Roberts E, Scott F, Martinborough E, Peach R, Oldstone MB, Rosen H. // *Cell*. – 2011. – V.146 (6) – P.980-91
288. Tobler K. Effect of cytoplasmic tail truncations on the activity of the M2 ion channel of influenza A virus. / K. Tobler, M.L. Kell, L.H. Pinto, and R.A. Lamb. // *J.Virol*. – 1999. – V.73 – P.9695-9701.
289. Uhlenorff J. Functional significance of the hemadsorption activity of influenza virus neuraminidase and its alteration in pandemic viruses. / Uhlenorff J, Matrosovich T, Klenk HD, Matrosovich M. // *Arch Virol*. – 2009. – V.154 (6) – P.945-57
290. van Genderen H.O. Extracellular annexin A5: functions of phosphatidylserine-binding and two-dimensional crystallization. / van Genderen HO, Kenis H, Hofstra L, Narula J, Reutelingsperger CP // *Biochim Biophys Acta*. – 2008. – V.1783 (6) – P.953-63.
291. Vercellotti G.M. Effects of viral activation of the vessel wall on inflammation and thrombosis. // *Blood Coagul Fibrinolysis*. – 1998. – V.9 – Suppl 2 – P.S3-6.
292. Viemann D. H5N1 virus activates signaling pathways in human endothelial cells resulting in a specific imbalanced inflammatory response. / Viemann D, Schmolke M, Lueken A, Boergeling Y, Friesenhagen J, Wittkowski H, Ludwig S, Roth J. // *J Immunol*. – 2011. – V.186 (1) – P.164-73.
293. *Viral Membrane Proteins: Structure, Function, and Drug Design* / Eds. Fischer W. Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York. – 2005. – P.247-258
294. Vischer U.M. von Willebrand factor, endothelial dysfunction, and cardiovascular disease. // *Journaj of Trombosis and Heamostasis*. – 2006. – V.4. – P.1186-1193
295. Visser M.R. Enhanced thrombin generation and platelet binding on herpes simplex virus-infected endothelium. / Visser MR, Tracy PB, Vercellotti GM,

- Goodman JL, White JG, Jacob HS. // Proc Natl Acad Sci U S A. – 1988. – V.85 (21) – P.8227-30.
296. Vlachopoulos C. Acute systemic inflammation induced by influenza A (H1N1) vaccination causes a deterioration in endothelial function in HIV-infected patients. / Vlachopoulos C, Xaplanteris P, Sambatakou H, Mariolis E, Bratsas A, Christoforatos E, Miliou A, Aznaouridis K, Stefanadis C. // HIV Med. – 2011. – V.12 (10) – P.594-601.
297. Wagner D.D. Von Willebrand factor and the endothelium. / Wagner D.D., Bonfanti R. // Mayo Clin. Proc. – 1991. – Vol.66. – P.621-627.
298. Wahl-Jensen V.M. Effects of Ebola virus glycoproteins on endothelial cell activation and barrier function. / Wahl-Jensen VM, Afanasieva TA, Seebach J, Ströher U, Feldmann H, Schnittler HJ. // J Virol. – 2005. – V.79 (16) – P.10442-50.
299. Walker J. Expression of human papillomavirus type 16 E7 is sufficient to significantly increase expression of angiogenic factors but is not sufficient to induce endothelial cell migration. / Walker J, Smiley LC, Ingram D, Roman A. // Virology. – 2011. – V.410 (2) – P.283-90.
300. Wang B. The role and potential of sialic acid in human nutrition. / Wang B, Brand-Miller J. // Eur J Clin Nutr. – 2003. – V.57 (11) – P.1351-69.
301. Wang X. Functional replacement of the carboxy-terminal two-thirds of the influenza A virus NS1 protein with short heterologous dimerization domains. / Wang, X., Basler, C. F., Williams, B. R., Silverman, R. H., Palese, P. & Garcia-Sastre, A. // J Virol. – 2002. – V.76. – P.12951-12962.
302. Wang X. Stabilization of p53 in influenza A virus-infected cells is associated with compromised MDM2-mediated ubiquitination of p53. / Wang X, Deng X, Yan W, Zhu Z, Shen Y, Qiu Y, Shi Z, Shao D, Wei J, Xia X, Ma Z. // J Biol Chem. – 2012. – V. 287 (22) – P.18366-75.
303. Ward C.W. Amino acid sequence of the Pronase-released heads of neuraminidase subtype N2 from the Asian strain A/Tokyo/3/67 of influenza virus. / Ward CW, Elleman TC, Azad AA // Biochem J. – 1982. – V.207 – P.91-5.

304. Wasilenko J.L. NP, PB1, and PB2 viral genes contribute to altered replication of H5N1 avian influenza viruses in chickens. / Wasilenko JL, Lee CW, Sarmiento L, Spackman E, Kapczynski DR, Suarez DL, Pantin-Jackwood MJ. // *J Virol.* – 2008. – V. 82(9) – P.4544-53.
305. Watanabe T. Influenza A virus can undergo multiple cycles of replication without M2 ion channel activity./Watanabe T, Watanabe S, Ito H, Kida H, Kawaoka Y. // *J Virol.* – 2001. – V.75 (12) – P.5656-62.
306. Weber F. A classical bipartite nuclear localization signals on Thogoto and influenza A virus nucleoproteins. / Weber F, Kochs G, Gruber S, Haller O. // *Virology.* – 1998. – 250(1) – P.9-18.
307. Whittaker G. Nuclear trafficking of influenza virus ribonucleoproteins in heterokaryons. / Whittaker G, Bui M, Helenius A // *J Virol.* – 1996. – V.70 (5) – P.2743-56.
308. Wiley D.C. The structure and function of the hemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus. / Wiley DC, Skehel JJ. // *Annu Rev Biochem.* – 1987 – V.56 – P.365-94.
309. Wise H.M. A complicated message: identification of a novel PB1-related protein translated from influenza A virus segment 2 mRNA. / Wise HM, Foeglein A, Sun J, Dalton RM, Patel S, Howard W, Anderson EC, Barclay WS, Digard P. // *J Virol.* – 2009. – V.83 (16) – P.8021-31.
310. Wolf K. The Ebola virus soluble glycoprotein (sGP) does not affect lymphocyte apoptosis and adhesion to activated endothelium. / Wolf K, Beimforde N, Falzarano D, Feldmann H, Schnittler HJ // *J Infect Dis.* – 2011. – V.204. - Suppl 3 – P.S947-52.
311. Wong C.M. Influenza-associated hospitalization in subtropical city / C.M. Wong, L. Yang L, K.P. Chan , G.M. Leung, K.H. Chan, T.H.Lam , A. Hedley, J.S.M. Peiris // *PLoS Med.* – 2006 – V.3 - el.21.
312. Wu R.F. HIV-1 Tat activates dual Nox pathways leading to independent activation of ERK and JNK MAP kinases./Wu RF, Ma Z, Myers DP, Terada LS. // *J Biol Chem.* – 2007. – V.282 (52) – P.37412-9.

313. Wu R.F. Nuclear import of influenza A viral ribonucleoprotein complexes is mediated by two nuclear localization sequences on viral nucleoprotein. / Wu RF, Ma Z, Myers DP, Terada LS. // *Virol J.* – 2007. – V4. – P.49.
314. Wurzer W.J. Role of caspase 3 in influenza virus propagation./Wurzer W.J., Planz O., Ehrhardt C., Giner M., Silberzahn T., Pleschka S., Ludwig S. // *The EMBO Journal.* – 2003. – V. 22. – P. 2717-2728
315. Xu L.G. VISA is an adapter protein required for virus-triggered IFN-beta signaling. / Xu LG, Wang YY, Han KJ, Li LY, Zhai Z, Shu HB. // *Mol Cell.* – 2005. – V.19 (6) – P.727-40.
316. Xu R. Structural basis of preexisting immunity to the 2009 H1N1 pandemic influenza virus. / Xu R, Ekiert DC, Krause JC, Hai R, Crowe JE Jr, Wilson IA. // *Science.* – 2010. – V.328 (5976) – P.357-60.
317. Ye Z. Nucleus-targeting domain of the matrix protein (M1) of influenza virus. / Ye Z, Robinson D, Wagner RR. // *J Virol.* – 1995. – V.69 (3) – P.1964-70.
318. Yin C. Conserved surface features form the double-stranded RNA binding site of non-structural protein 1 (NS1) from influenza A and B viruses. / Yin, C., Khan, J. A., Swapna, G. V., Ertekin, A., Krug, R. M., Tong, L. & Montelione, G. T. // *J Biol Chem.* – 2007. – V.282 – P.20584-20592.
319. Yin Y. Differentially Expressed Genes of Human Microvascular Endothelial Cells in Response to Anti-Dengue Virus NS1 Antibodies by Suppression Subtractive Hybridization./ Yin Y, Jiang L, Fang D, Jiang L, Zhou J. // *Viral Immunol.* – 2013. – V.26 (3) – P.185-91
320. Yu M. Identification and characterization of three novel nuclear export signals in the influenza A virus nucleoprotein. / Yu M, Liu X, Cao S, Zhao Z, Zhang K, Xie Q, Chen C, Gao S, Bi Y, Sun L, Ye X, Gao GF, Liu W. // *J Virol.* – 2012. – V.86 (9) – P.4970-80.
321. Zanone M. M. Persistent infection of human microvascular endothelial cells by coxsackie B viruses induces increased expression of adhesion molecules. / Zanone MM, Favaro E, Conaldi PG, Greening J, Bottelli A, Perin PC, Klein NJ, Peakman M, Camussi G. // *J Immunol.* – 2003. – V.171 (1) – P.438-46.

322. Zanone M. M. Human pancreatic islet endothelial cells express coxsackievirus and adenovirus receptor and are activated by coxsackie B virus infection. / Zanone, M. M., Favaro, E., Ferioli, E., Huang, G. C., Klein, N. J., Perin, P. C., Peakman, M., Conaldi, P. G., Camussi, G. // *FASEB J.* – 2007. – V.21 – P.3308-3317
323. Zhang J. Influenza virus assembly and lipid raft microdomains: a role for the cytoplasmic tails of the spike glycoproteins. / Zhang J, Pekosz A, Lamb RA. // *J Virol.* – 2000. – V.74 (10) – P.4634-44.
324. Zhang J. The cytoplasmic tails of the influenza virus spike glycoproteins are required for normal genome packaging. / Zhang J, Leser GP, Pekosz A, Lamb RA. // *Virology.* – 2000. – V.269 (2) – P.325-34.
325. Zhirnov O.P. Alterations in caspase cleavage motifs of NP and M2 proteins attenuate virulence of a highly pathogenic avian influenza virus. / Zhirnov OP, Klenk HD. // *Virology.* – 2009. – V.394 (1) – P.57-63.
326. Zhirnov O.P. Influenza virus pathogenicity is determined by caspase cleavage motifs located in the viral proteins. / Zhirnov OP, Syrtzev VV // *J Mol Genet Med.* – 2009. – V.3 (1) – P.124-32.
327. Zhou H. The special neuraminidase stalk-motif responsible for increased virulence and pathogenesis of H5N1 influenza A virus. / Zhou H, Yu Z, Hu Y, Tu J, Zou W, Peng Y, Zhu J, Li Y, Zhang A, Yu Z, Ye Z, Chen H, Jin M. // *PLoS One.* – 2009. – V.4 (7):e6277.
328. Zhu Z. Nonstructural protein 1 of influenza A virus interacts with human guanylate-binding protein 1 to antagonize antiviral activity. / Zhu Z, Shi Z, Yan W, Wei J, Shao D, Deng X, Wang S, Li B, Tong G, Ma Z. // *PLoS One.* – 2013. – V.8 (2):e55920