

25. Locke M., Heywood M., Fawell S., Mackenzie I.C. Retention of intrinsic stem cell hierarchies in carcinoma-derived cell lines. *Cancer Res.* 2005, 65: 8944-8950.
26. Miloszewska J., Gos M., Przybyszewska M., Trembacz H., Koronkiewicz M., Janik P. Mouse sarcoma L1 cell line holoclones have a stemness signature. *Cell Prolif.* 2010, 43: 229-234.
27. Rao G.H., Liu H.M., Li B.W., Hao J.J., Yang Y.L., Wang M.R., Wang X.H., Wang J., Jin H.J., Du L., Chen Q. Establishment of a human colorectal cancer cell line P6C with stem cell properties and resistance to chemotherapeutic drugs. *Acta Pharmacol. Sin.* 2013, 34: 793-804.
28. Yao J., Xie J., Li J., Wei X., Yang Y., Chen H. Establishment of subseries cell lines from tongue cancer single cell and detection of cancer stem cell markers. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi.* 2013, 31: 86-90.
29. Ralhan R., He H.C., So A.K., Tripathi S.C., Kumar M., Hasan M.R., Kaur J., Kashat L., MacMillan C., Chauhan S.S., Freeman J.L., Walfish P.G. Nuclear and cytoplasmic accumulation of Ep-ICD is frequently detected in human epithelial cancers. *PLoS One.* 2010, 5: e14130.
30. Ralhan R., Cao J., Lim T., Macmillan C., Freeman J.L., Walfish P.G. EpCAM nuclear localization identifies aggressive thyroid cancer and is a marker for poor prognosis. *BMC Cancer.* 2010, 10: 331.
31. Fong D., Moser P., Kasal A., Seeber A., Gastl G., Martowicz A., Wurm M., Mian C., Obrist P., Mazzoleni G., Spizzo G. Loss of membranous expression of the intracellular domain of EpCAM is a frequent event and predicts poor survival in patients with pancreatic cancer. *Histopathology.* 2014, 64: 683-692.
32. Fong D., Seeber A., Terracciano L., Kasal A., Mazzoleni G., Lehne F., Gastl G., Spizzo G. Expression of EpCAM(MF) and EpCAM(MT) variants in human carcinomas. *J. Clin. Pathol.* 2014, 67: 408-414.

КЛЕТОЧНАЯ ЛИНИЯ ЧЕЛОВЕКА ESCV-304 КАК МОДЕЛЬ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ВЛИЯНИЯ АНТИОКСИДАНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ И АПОПТОЗ КЛЕТОК ПРИ ИНФИЦИРОВАНИИ ВИРУСОМ ГРИППА А И В ПРИСУТСТВИИ БАКТЕРИАЛЬНОГО ЛИПОПОЛИСАХАРИДА

Т.Д. Смирнова¹, С.С. Смирнова^{1,2}, К.В. Сивак¹, Е.М. Еропкина¹, М.Ю. Еропкин¹

¹ФГБУ НИИ гриппа МЗ России, Санкт-Петербург, ²Санкт-Петербургский политехнический
университет Петра Великого, cellcultures@influenza.spb.ru

Заболевание, вызванное вирусом гриппа А, нередко носит тяжелый характер, особенно после наслоения вторичной бактериальной инфекции, при которой в кровь попадают эндотоксины бактерий, в том числе липополисахарид грамотрицательных бактерий. В связи с этим ведутся поиски новых лекарственных препаратов для лечения больных гриппом. Целью

настоящей работы явилось изучение влияния ряда лечебных препаратов, обладающих антиоксидантной, противовоспалительной и ангиопротекторной активностью на пролиферацию и апоптоз культивируемых эндотелиоцитов линии ECV-304, зараженных разными дозами вируса гриппа А и при добавлении бактериального липополисахарида. Тестировались следующие препараты: глутатион, N-ацетилцистеин, тролокс, карведилол, ресвератрол, дикумарин, нитрендипин, рутин и алпизарин. Пролиферация клеток, сниженная после заражения высокими дозами вируса, повышалась до уровня контроля после добавления глутатиона, ресвератрола, алпизарина и рутина. В меньшей степени повышали пролиферацию дикумарин и N-ацетилцистеин. В то же время повышенный уровень пролиферации клеток, наблюдаемый при заражении очень низкими дозами вируса, снижался до уровня контроля под действием практически всех тестируемых препаратов, за исключением нитрендипина. В опытах на клетках, зараженных вирусом гриппа в присутствии бактериального липополисахарида, были получены сходные результаты. Индекс апоптоза в исследуемых клетках повышался почти во всех вариантах экспериментов. Лишь три лечебных препарата – рутин, алпизарин и глутатион снижали уровень апоптоза клеток, зараженных разными дозами вируса гриппа, а также при добавлении липополисахарида. Полученные результаты свидетельствуют о том, что почти все тестируемые лекарственные средства могут нормализовать физиологическое состояние клеток, зараженных вирусом гриппа, снижая уровень их избыточной пролиферации и элиминируя поврежденные клетки путем апоптоза.

Ключевые слова: клетки эндотелия ECV-304, вирус гриппа А, липополисахарид, антиоксиданты, пролиферация, апоптоз.

Вирус гриппа А, как правило, вызывает заболевание легкой или средней тяжести, однако бывают случаи тяжелых осложнений в виде вторичных бактериальных инфекций. В результате применяемой антибактериальной терапии в кровь поступает большое количество компонентов разрушенных бактерий. Грамотрицательные бактерии и компоненты их клеточной стенки эндотоксины – липополисахариды (LPS) являются основным, но не исключительным фактором, ответственным за возникновение сепсиса, что может быть причиной легочной, почечной и сердечной недостаточности (1). Эндотоксин в дополнение с другими бактериальными молекулами запускает генерализованный иммунный ответ, как клеточный, так и гуморальный с индукцией про- и противовоспалительных медиаторов. Этими

медиаторами являются цитокины, факторы коагуляции, молекулы адгезии, миокардиальные депрессанты и др. (2).

Клетки сосудистого эндотелия одни из первых входят в контакт с циркулирующими бактериальными молекулами, распознают их с помощью Toll-like рецепторов и экспрессируют провоспалительные медиаторы и тканевой фактор. В норме клеточный иммунитет на бактериальные токсины обеспечивает защиту от инфекции, при которой биологическая активность антибактериальных медиаторов контролируется специфическими ингибиторами. При сепсисе этот баланс нарушается и гиперактивация клеточной реакции может приводить к нарушению нормального функционирования клеток и их гибели (3). В процессе сепсиса дисбаланс между продукцией активных форм кислорода/азота (ROS/RNS) и их эффективным удалением антиоксидантами приводит к нарушению проницаемости клеточных мембран, поражению и гибели клеток эндотелия в результате некроза и апоптоза (4).

Вирус гриппа, как и LPS в условиях *in vitro* может непосредственно вызывать дисфункцию сосудистого эндотелия. Но в организме подобный эффект происходит также вследствие вторичной реализации воспалительных медиаторов, таких как фактор некроза опухоли альфа (TNF α), интерлейкин-1 бета (IL-1 β), фактор роста опухоли бета (TGF β), интерфероны (IFN) и другие, продуцируемые макрофагами и иммунными клетками (5, 6). Вирус гриппа А способен индуцировать продукцию ROS/RNS, что приводит к оксидативному стрессу, продукции металлопротеиназ (MMP-9), к патологическим изменениям в клетках различных органов, в том числе и к дисфункции клеток эндотелия (7).

В процессе изучения *in vitro* взаимоотношения вируса гриппа А с клетками нами был обнаружен различный ответ клеток на вирус, который зависел от степени инфицированности клеток – множественности инфекции (МИ). В случае высокой степени инфицированности клеток вирусом гриппа клетки погибали в результате некроза или апоптоза, тогда как при очень низкой степени вирусной инфекции клетки отвечали стимуляцией пролиферации и увеличением апоптоза. Различный ответ клеток при разной степени инфицированности вирусом гриппа А позволяет моделировать состояние клеток при острой вирусной инфекции (высокая МИ) и хронической (низкая МИ). Подобная реакция на очень низкие дозы заражения вирусом гриппа А обнаружена практически у всех перевиваемых клеточных линий человека лимфоцитарного/моноцитарного происхождения и у перевиваемых клеток эпителиального (A-549) и эндотелиального (ECV-304) происхождения (8, 9). Применение при острых формах заболевания вирусом гриппа антивирусных препаратов с целью блокирования репликации

вирусных частиц нередко малоэффективно и часто приводит к возникновению вирусных частиц, устойчивых к данному препарату. Антибактериальные препараты вызывают разрушение бактерий, что приводит к появлению в плазме крови огромного количества бактериальных компонентов, в частности, LPS. В связи с этим ведутся поиски других лечебных препаратов для терапии гриппа, направленных на восстановление нормального физиологического состояния клеток и функционирования сигнальных клеточных путей.

Целью настоящей работы явилось изучение влияния ряда лечебных препаратов, обладающих антиоксидантной, противовоспалительной и ангиопротекторной активностью на пролиферацию и апоптоз культивируемых эндотелиоцитов линии ECV-304, зараженных разными дозами вируса гриппа А и при добавлении бактериального липополисахарида.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Перезиваемые клеточные линии: спонтанно трансформированные клетки эндотелия человека (ECV-304) и клетки почки собаки (MDCK) получены из Коллекции клеточных культур ФГБУ НИИ гриппа МЗ РФ. Клетки культивировали в среде альфа-МЕМ с добавлением 2 % бычьей эмбриональной сыворотки (ЭС) без антибиотиков. Пересев клеток проводили на 6–7 сут с кратностью 1:3 – 1:5, используя для отторжения клеток раствор Версена с химопсином.

Вирус гриппа субтипа H3N2 A/Брисбен/10/07 поддерживали на куриных эмбрионах. Титры вирусов составляли 5–6 lg ТЦД₅₀ (титр цитопатического действия, вызывающего поражение 50 % монослоя клеток MDCK). За одну инфицирующую дозу (ИД) в 1 мл принимали последнее десятикратное разведение титруемого вируса. Высокая доза заражения вирусом составляла 1000 ИД, низкая доза заражения – 1 ИД.

Концентрированный раствор (1 мг/мл) LPS *Escherichiacoli* (Sigma-Aldrich, США) в среде альфа-МЕМ хранили при 4⁰ С и расходовали в работе в течение 1–2 недель. Конечная концентрация LPS составляла 100 нг/мл. Краткая характеристика исследуемых препаратов и используемые концентрации приведены в табл. 1.

Оценку цитотоксичности препаратов проводили с помощью МТТ-тестирования на клетках, выращенных в 96-луночных планшетах (Nunc, Дания) (10).

Для **проведения опыта** использовали 4–5-суточную культуру клеток ECV-304 с посевной концентрацией $7-8 \times 10^4$ кл./мл. Заражение 1–суточного монослоя клеток, выращенного в 24-луночных планшетах (Nunc, Дания), осуществляли с помощью внесения 0.1 мл заранее оттитрованной вирусосодержащей жидкости (для учета апоптоза в лунки вкладывали покровные стекла). Контакт вируса с клетками проходил при 37°C в течение 45 мин в бессывороточной среде альфа-MEM с добавлением трипсина (1 мкг/мл) и антибиотиков (пенициллин/стрептомицин). Затем клетки отмывали от вируса и вносили 0.5 мл исследуемого препарата, 0.5 мл среды с добавлением 2 % ЭС и 2 мкг/мл трипсина, после чего в лунки вносили 0.1 мл LPS (конечная концентрация 100 нг/мл). Контролем служили культуры, которые инкубировали с интактными, не содержащими вируса и LPS средами. Учет опыта проводили на 4–5 сут.

Для **оценки интенсивности пролиферации** клетки в лунках без покровных стекол снимали раствором Версена с химопсином и подсчитывали в камере Фукса-Розенталя количество клеток, неокрашенных трипановым синим. Пролиферативную активность клеток оценивали по отношению числа выросших зараженных клеток к числу контрольных (интактных) клеток на этом же сроке культивирования. Результаты выражали в процентах в виде доли от контроля, который принимали за 100 %.

Апоптоз клеток оценивали по степени фрагментации ядерного хроматина. Клетки, выращенные на покровных стеклах, фиксировали смесью метанола с уксусной кислотой в соотношении 3:1 и окрашивали флуоресцентным красителем Hoechst-33258. Определяли долю апоптотических клеток, просматривая не менее 300 – 500 клеток под люминесцентным микроскопом при увеличении объектива $\times 90$, используя масляную иммерсию. Результаты выражали в виде индекса апоптоза (ИА) по формуле $\text{ИА} = (b/c) \times 100 \%$, где b – число апоптотических клеток, c – общее число просмотренных клеток. Окрашивание клеток красителем Hoechst-33258 являлось одновременно контролем за контаминацией клеток Л-формами бактерий и микоплазмами. На каждую временную точку использовали по 2 лунки, все эксперименты проводили не менее 3-х раз.

Статистический анализ выполнен с использованием теста U–Манна-Уитни для сравнения двух групп непараметрических выборок. Значимыми считали различия при $P < 0.05$.

Таблица 1.

Краткая характеристика препаратов и их конечные концентрации

Препарат и фирма изготовитель	Краткая характеристика препарата	Используемая в опытах конечная концентрация
Глутатион восстановленный (Sigma-Aldrich, США)	Трипептид, образующийся в организме из цистеина, глутаминовой кислоты и глицина. Мощный антиоксидант и детоксикант	163 мкмоль/л
N-ацетилцистеин (Sigma-Aldrich, США)	Модифицированная форма цистеина, способствует синтезу глутатиона в организме. Обладает антиоксидантной и противовоспалительной активностью	306 мкмоль/л
Тролокс (Sigma-Aldrich, США)	Водорастворимый аналог антиоксиданта витамина Е	200 мкмоль/л
Карведилол (Ф. Хоффманн-Ля Рош Лтд, Швейцария)	Альфа- и бета-адреноблокатор. Обладает мембраностабилизирующей и антиоксидантной активностью, тормозит пролиферацию и миграцию гладкомышечных клеток	123 мкмоль/л
Ресвератрол (Bath # 00301008, Чехия)	Природный стильбеновый фитоалексин. Обладает антиоксидантной, противовоспалительной, противоопухолевой, кардиопротекторной активностью	219 мкмоль/л
Умбеллиферон(дикумарин) (SERVA, Германия)	7-гидроксикумарин, скимметин. Обладает антигенотоксическим и антиаллергическим действием, спазмолитической и антимикробной активностью	310 мкмоль/л
Нитрендипин субстанция(Институт органического синтеза, OSI, Латвия)	Обладает гипотензивным, сосудорасширяющим, антиангинальным и нефропротективным действием. Антагонист кальция	139 мкмоль/л
Рутозид (рутин) (SERVA, Германия)	Гликозид флаваноида кверцитина, обладает Р-витаминной активностью. Ангиопротектор, уменьшает проницаемость и ломкость сосудов.	82 мкмоль/л
Алпизарин (мангиферин) (ФГБНУ ВИЛАР, Россия)	Противовирусный и антибактериальный препарат растительного происхождения. Обладает антиоксидантной и противовоспалительной активностью	50 мкг/мл

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проверка цитотоксичности препаратов, проведенная на клетках ECV-304, показала полное отсутствие токсичности глутатиона, N-ацетилцистеина, ресвератрола и алпизарина и небольшую токсичность дикумарина и тролокса при максимальных используемых концентрациях (6.2 и 4 ммоль/л, соответственно). Небольшая токсичность была выявлена у

препаратов рутин (205 мкмоль/л) и карведилол (615 мкмоль/л). Цитотоксичность для клеток рабочих растворов препаратов, хранящиеся при +4° С на протяжении 1.5 мес, не изменилась.

Изучение влияния препаратов на пролиферацию контрольных, не зараженных вирусом гриппа клеток ECV-304 показало, что все исследуемые препараты практически не влияли на пролиферацию. В клетках, зараженных высокой дозой вируса гриппа (1000 ИД), пролиферация снижалась на 36.7%, при этом только под воздействием глутатиона пролиферация клеток восстанавливалась полностью до уровня контроля. Под воздействием ресвератрола, алпизарина и рутина пролиферация восстанавливалась до 91.6 – 93.5% относительно контрольных незараженных клеток, в меньшей степени пролиферацию повышали дикумарин (до 82.8 %) и N-ацетилцистеин (до 77.6 %) (рис. 1).

В то же время вирус-стимулированное повышение пролиферации клеток (до 135.2 %), наблюдаемое при заражении клеток очень низкими дозами вируса (1 ИД), снижали до уровня контроля практически все препараты, за исключением нитрендипина, который достоверно не подавлял вирус-стимулированную пролиферацию (рис. 1).

Добавление LPS *E.coli* к контрольным клеткам (без вируса) незначительно повышало пролиферацию клеток (на 7 %). В то же время сниженная в присутствии высоких ИД вируса пролиферация клеток восстанавливалась до 88.8% (от уровня контроля) после добавления LPS. Однако LPS не влиял на вирусстимулированную пролиферацию клеток, вызванную низкой ИД заражения вируса (рис. 1). Ингибирующее влияние препаратов на вирус-стимулированную пролиферацию клеток, зараженных низкими дозами вируса гриппа в присутствии LPS, было практически таким же, как и в случае заражения клеток одним вирусом гриппа, т. е. ингибирующую активность проявляли все препараты, кроме нитрендипина. В то же время, в клетках, зараженных высокой ИД вируса в присутствии LPS, достоверное восстановление пролиферации происходило после добавления всех препаратов, за исключением N-ацетилцистеина и алпизарина (рис. 1).

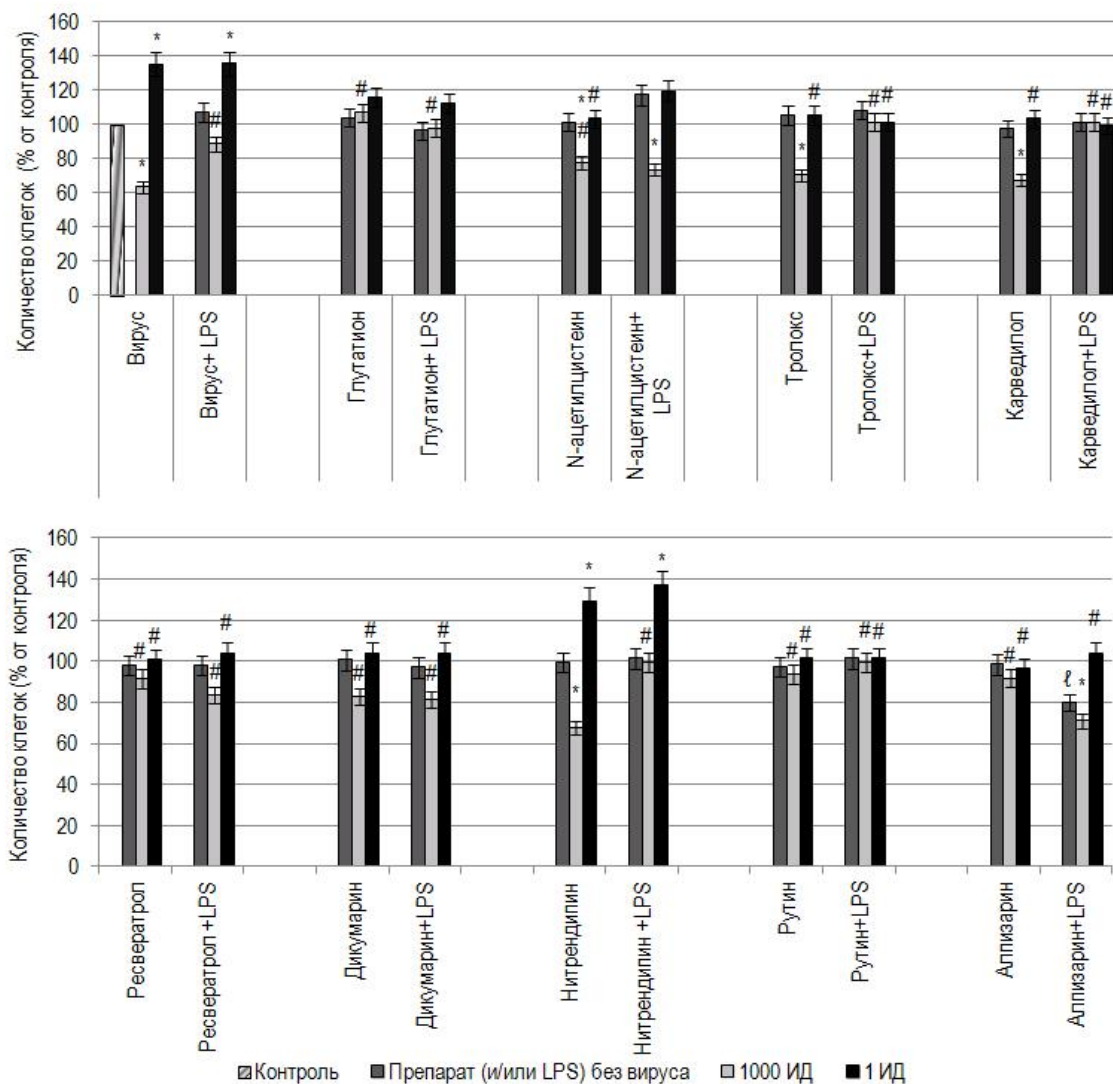


Рис. 1. Влияние исследуемых препаратов на пролиферацию клеток ECV-304, зараженных вирусом гриппа А и при добавлении LPS(* - отличие от контроля, $P < 0.05$; # - отличие от клеток, зараженных вирусом, $P < 0.05$; ℓ - отличие от клеток с LPS, $P < 0.05$).

Изучение апоптоза в клетках ECV-304 показало, что при заражении клеток высокой (1000 ИД) и низкой (1 ИД) дозами вируса уровень апоптоза повышается с 1.05 % (в контрольных, незараженных клетках) до 3.7 % и 2.9 %, соответственно. Из исследованных препаратов способность к индукции апоптоза обнаружена у тролокса, ресвератрола, карведилола, дикумарина, нитрендипина (ИА от 2.5 до 3.2 %) и очень слабая - у глутатиона (ИА 2 %); N-ацетилцистеина и алпизарин достоверно не повышали уровень апоптоза (рис. 2). Влияние препаратов на индукцию апоптоза в клетках, зараженных высокой ИД вируса гриппа А, было

следующим: уровень апоптоза значительно повышался только в присутствии N-ацетилцистеина и дикумарина (ИА 7.3 и 7.1 %, соответственно), небольшое повышение апоптоза отмечено также в присутствии тролокса, ресвератрола и нитрендипина (ИА от 4.2 до 4.6 %), в то же время апоптоз был снижен при добавлении глутатиона, рутина и алпизарина (ИА от 1.6 до 2.4 %). В случае заражения клеток низкой ИД вируса уровень апоптоза повышали препараты N-ацетилцистеин, тролокс и нитрендипин (ИА 4.0– 5.0 %), в присутствии глутатиона, ресвератрола и дикумарина уровень апоптоза был незначительно повышен (ИА от 3.4 до 3.6 %), а добавление рутина и алпизарина также снижало уровень апоптоза, как и в случае заражения клеток высокой дозой вируса (ИА 1.7 и 1.0 %, соответственно) (рис. 2).

Добавление LPS к клеткам ECV-304 в отсутствие вируса гриппа индуцировало апоптоз (ИА 3.3 %), а в зараженных вирусом клетках – снижало (ИА 3.1 % при высокой ИД и 2.4 % при низкой ИД вируса). Присутствие одного LPS совместно с препаратами тролокс, карведилол и нитрендипин повышало апоптоз клеток ECV-304 (ИА 4.6–5.3 %), а с препаратами ресвератрол, глутатион и алпизарин – снижало (ИА 0.8–2.2 %). Влияние исследуемых препаратов на апоптоз в клетках, зараженных вирусом гриппа в присутствии LPS, сохранялось, в основном, в том же виде, что и без LPS: уровень апоптоза был повышен в присутствии N-ацетилцистеина, тролокса, дикумарина и нитрендипина (ИА 5.5 – 6.35 % при высокой ИД и 3.6 – 4.5 % при низкой ИД). Снижение апоптоза наблюдалось в присутствии глутатиона, рутина и алпизарина при высокой ИД (от 0.8 до 2.3 %). При низкой ИД снижение апоптоза отмечено при добавлении алпизарина (ИА 1.8 %) и глутатиона (ИА 1.1 %) (рис. 2).

Полученные результаты, приведенные в сводной табл. 2, позволяют провести сравнение степени влияния исследуемых препаратов на пролиферацию и апоптоз клеток эндотелия при разной степени инфицированности вирусом гриппа А и в условиях сепсиса (добавление LPS). Обращает на себя внимание, что практически все препараты ингибировали повышенную пролиферацию клеток, которая наблюдалась при низкой степени инфицированности клеток вирусом гриппа А и сохранялась при добавлении LPS. Повышение пролиферации клеток при самой низкой ИД заражения вирусом может моделировать состояние клеток при хронической инфекции, когда в процессе применяемой противовирусной терапии количество вирусных частиц снижается. В результате снижения синтеза ряда вирусных белков происходит стимуляция пролиферации клеток, которая сопровождается усилением апоптоза, что может привести к повышению клеточной проницаемости и дисфункции клеток. Это состояние усиливается при наложении вторичной вирусной инфекции или при добавлении LPS. Заражение клеток

высокой ИД вируса, при которой наблюдается подавление клеточной пролиферации, может моделировать острую вирусную инфекцию. В этих условиях только несколько препаратов восстанавливали клеточную пролиферацию почти до контрольного уровня: глутатион, ресвератрол, рутин и алпизарин.

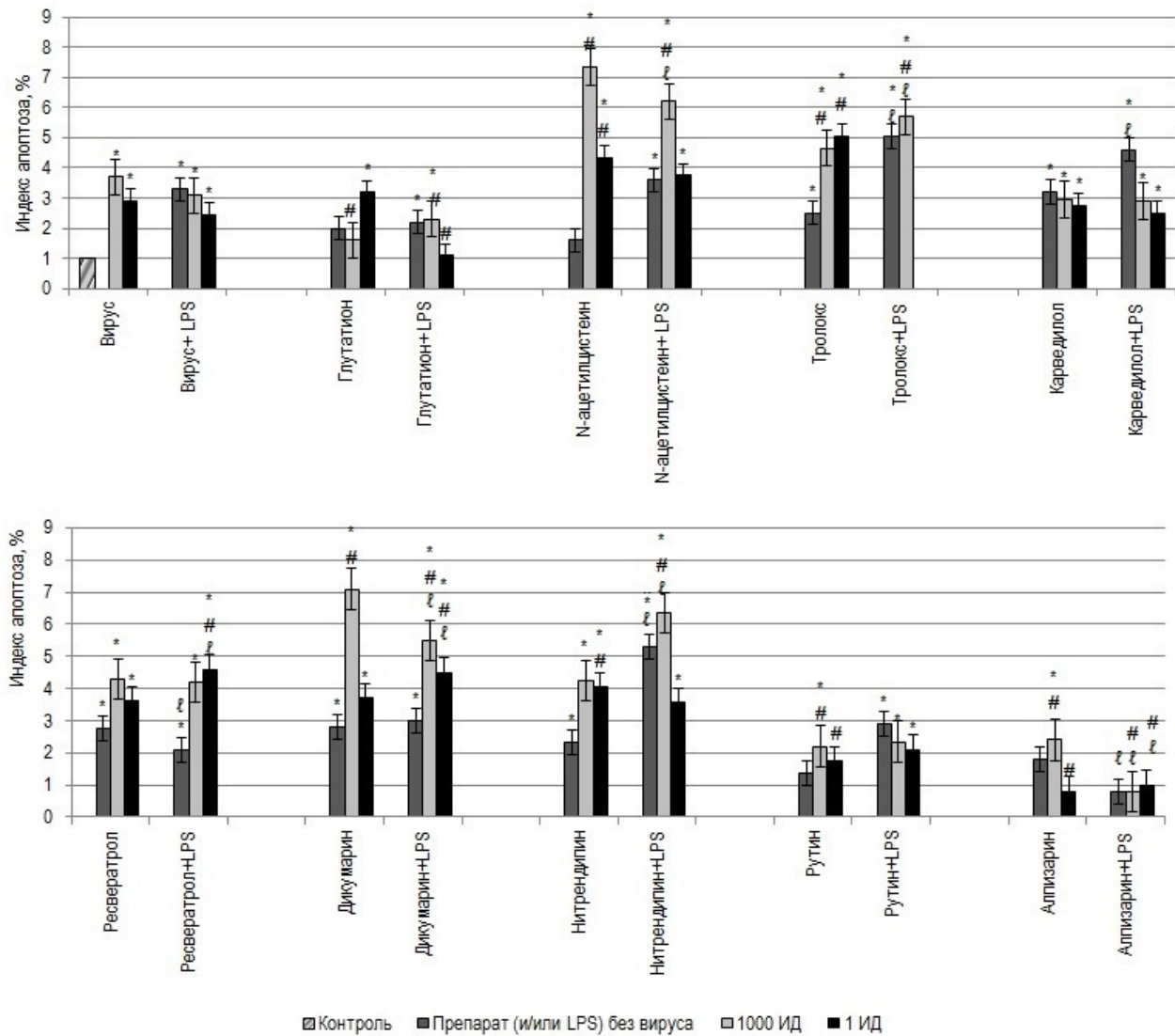


Рис. 2. Влияние исследуемых препаратов на апоптоз клеток ECV-304, зараженных вирусом гриппа и при добавлении LPS (* - отличие от контроля, $P < 0.05$; # - отличие от клеток, зараженных вирусом, $P < 0.05$; ℓ - отличие от клеток с LPS, $P < 0.05$).

Таблица 2.

Действие исследуемых препаратов на пролиферацию и апоптоз клеток.

Препарат	Пролиферация				Апоптоз					
	Вирус		LPS		Препарат без вируса	Вирус		LPS		
	Высокая ИД	Низкая ИД	Высокая ИД	Низкая ИД		Высокая ИД	Низкая ИД	LPS без вируса	Высокая ИД	Низкая ИД
Вирус или LPS Без препарата	↓ *	↑ *	↑ #	↑ *		↑ *	↑ *	↑ *	↑ *	↑ *
Глутатион восстановленный	↑ #	↓ #	↑ #	↓ #	↑	↓ #	↑ * — #	↑ *	↑ * ↓ #	↓ #
N-ацетилцистеин	↑ #	↓ #	—	—	—	↑ *, #	↑ *, #	↑ *	↑ *, #, ℓ	↑ *
Тролокс	↓ * — #	↓ #	↑ #	↓ #	↑ *	↑ *, #	↑ *, #	↑ *, ℓ	↑ *, #, ℓ	
Карведилол	↓ * — #	↓ #	↑ #	↓ #	↑ *	↑ * — #	↑ * — #	↑ *, ℓ	↑ *	↑ *
Ресвератрол	↑ #	↓ #	↑ #	↓ #	↑ *	↑ * — #	↑ * — #	↑ * ↓ ℓ	↑ *	↑ *, #, ℓ
Дикумарин	↑ #	↓ #	↑ #	↓ #	↑ *	↑ *, #	↑ * — #	↑ * — ℓ	↑ *, #, ℓ	↑ *, #, ℓ
Нитрендипин	↓ * — #	↑ *, — #	↑ #	↑ *, — #	↑ *	↑ * — #	↑ *, #	↑ *, ℓ	↑ *, #, ℓ	↑ * — #
Рутин	↑ #	↓ #	↑ #	↓ #	—	↑ * ↓ #	↓ #	↑ * — ℓ	↑ * — #, ℓ	↑ * — #, ℓ
Алпизарин	↑ #	↓ #	↓ * — #	↓ #	—	↑ * ↓ #	↓ #	↓ ℓ	↓ #, ℓ	↓ #, ℓ

Примечание: ↑ - усиление, ↓ - подавление, — нет эффекта;

* по сравнению с контролем (интактные клетки); # по сравнению с клетками, зараженными вирусом; ℓ - по сравнению с клетками с LPS.

В то же время практически все препараты (за исключением рутина, алпизарина и глутатиона) обладали способностью индуцировать апоптоз. Многие препараты (N-ацетилцистеин, тролокс, ресвератрол, дикумарин, нитрендипин) также повышали уровень апоптоза при заражении клеток вирусом и в присутствии LPS, за исключением рутина, алпизарина и глутатиона, которые снижали уровень апоптоза клеток, зараженных вирусом в высокой и низкой дозах и при добавлении LPS.

Из всех перечисленных выше препаратов противовирусная активность по отношению к вирусу гриппа А наиболее хорошо изучена у глутатиона. Вирус гриппа А снижает содержание эндогенного антиоксиданта – глутатиона в результате оксидативного стресса, при этом

чувствительность клеток к вирусу значительно повышается. Дополнительное добавление глутатиона блокирует продукцию вирусных частиц в клетках MDCK (*in vitro*) и в клетках легких и трахеи мышей (*in vivo*), снижая экспрессию вирусного матричного белка и ингибируя вирус-индуцированную активацию каспаз (11). Противовирусное действие глутатиона показано также на модели хорио-аллантоисных оболочек куриных эмбрионов и клетках MDCK, при этом тролокс и рексод подобного эффекта не обнаружили (12). Показана зависимость репродукции вируса гриппа в клетках и перmissивность клеток к вирусу от внутриклеточного redox состояния клеток хозяина: клетки, экспрессирующие антиапоптозный белок Bcl-2, содержали высокий уровень глутатиона. В подобных клетках (MDCK) была снижена экспрессия поздних вирусных белков (гемагглютинина и M1) и ядерно-цитоплазматическая транслокация вирусного нуклеопротеина (vRNP) (13). Позже эта же группа исследователей показала, что гидрофобный дериват глутатиона (GSH-C4) подавлял репликацию вируса гриппа в клеточных культурах и в летально зараженных мышах, снижая их смертность и разрушение легких. На модели клеточных культур было показано, что GSH-C4 ингибирует процесс фолдинга и созревания вирусного гемагглютинина, снижая олигомеризацию вирусного белка, в результате чего его мономер задерживается в эндоплазматическом ретикулуме, вместо продвижения к цитоплазматической мембране (14). Способность к подавлению репликации сезонных вирусов гриппа А и птичьего вируса гриппа А обнаружена также у N-ацетилцистеина. В клетках эпителиоидного происхождения (A-549) ингибирующий эффект N-ацетилцистеина на вирусную репликацию сопровождался снижением синтеза провоспалительных цитокинов и апоптоза (15). Есть также сообщение о способности ресвератрола – полифенола растительного происхождения, обладающего антиоксидантной активностью, подавлять *in vitro* и *in vivo* репликацию вируса гриппа (16).

Сравнительно недавно появились сообщения о способности клеток эндотелия в присутствии LPS приобретать признаки фибробластов в результате процесса, известного как endothelial-to-mesenchymal transition (EndMT). Превращение клеток эндотелия в фибробласты происходило в результате воспалительного процесса, образования ROS и последующей гибели большей части клеток, но даже при высокой концентрации LPS часть клеток оставалась живой и подвергалась трансформации (17). Изменения в клетках эндотелия, связанные с переходом в сторону фибробластов (повышение уровня внутриклеточного Ca^{2+} , увеличение миграции клеток), ингибировались в присутствии антиоксидантов глутатиона и N-ацетилцистеина (18, 19). Подобные изменения, вызванные LPS, сходны с обнаруженными

нами изменениями в интенсивности пролиферации и индукции апоптоза клеток эпителиального и эндотелиального происхождения после заражения низкими дозами вируса гриппа (20). Ведущую роль ROS/RNS в этом процессе подтверждает снижение вирус-стимулированной пролиферации клеток исследованными нами препаратами с антиоксидантной активностью, однако пока трудно объяснить, какие изменения происходят в популяции клеток эндотелия в случае снижения апоптоза некоторыми препаратами.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что препараты, обладающие антиоксидантной и противовоспалительной активностью, и некоторые препараты, используемые при сердечнососудистой терапии, могут нормализовать физиологическое состояние клеток, снижая их избыточную пролиферацию или элиминируя поврежденные клетки путем апоптоза. Показано, что на фоне терапии указанными лекарственными средствами процессы взаимодействия вируса гриппа А с клетками могут отличаться от таковых при обычном течении гриппозной инфекции. То есть, для изученных лекарственных препаратов была установлена вторичная фармакодинамика, не связанная с их непосредственным прямым фармакологическим действием, что открывает определенные перспективы для комплексного этио-патогенетического лечения, как самого гриппа, так и его осложнений в виде соматической патологии. В связи с этим необходимо провести дополнительные исследования для понимания процессов, происходящих на клеточном и молекулярном уровне при заражении клеток эндотелиального происхождения вирусом гриппа А, и подбора наиболее эффективных сочетаний противовирусных препаратов и цитопротекторов с антиоксидантным, противовоспалительным и/или сосудопротекторным действием.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. **Schwartz D., Mendonca M., Schwartz I., Xia Y., Satriano J., Willson C., Blantz R.** Inhibition of constitutive nitric oxide synthase (NOS) by nitric oxide generated by inducible NOS after lipopolysaccharide administration provokes renal dysfunction in rats. *J Clin. Invest.* 1997, 100: 439-448.
2. **Peters K., Unger R., Brunner J., Kirkpatrick C.** Molecular basis of endothelial dysfunction in sepsis. *Cardiovasc. Res.* 2003, 60: 49-57.
3. **Dauphinee Sh., Karsan A.** Lipopolysaccharide signaling in endothelial cells. *Lab. Invest.* 2006, 86: 9-22.
4. **Huet O., Dupic L., Harrois A., Duranteau J.** Oxidative stress and endothelial dysfunction during sepsis. *Front. Biosci. (Landmark Ed).* 2011, 16: 1986-1995.
5. **Armstrong S., Mubareka S., Lee W.** The lung microvascular endothelium as a therapeutic in severe influenza. *Antiviral. Res.* 2013, 9: 113-118.

6. **Hiyoshi M., Indalao I., Yano M., Yamane K., Takahashi E., Kido H.** Influenza A virus infection of vascular endothelial cells induces GSK-3b-mediated b-catenin degradation in adherens junctions, with a resultant increase in membrane permeability. *Arch.Virol.* 2015,160: 225-234.
7. **Lee Y., Lai C., Hsieh S., Shieh C., Huang L., Wu-Hsieh B.** Influenza A virus induction of oxidative stress and MMP-9 is associated with severe lung pathology in a mouse model. *VirusRes.* 2013, 178 (2): 411-422.
8. **Смирнова Т.Д., Гудкова Т.М., Кузнецова И.К., Рыжак Г.А.** Разработка модели взаимоотношения вируса гриппа А с перевиваемыми лимфобластоидными клетками человека для изучения биологических особенностей вируса и определения активности антивирусных препаратов. *Клеточные культуры. Информ. бюлл.* 2009, 24: 25-34.
9. **Смирнова Т.Д., Даниленко Д.М., Гудкова Т.М., Писарева М.М., Кадырова Р.А., Слита А.В.** Влияние различных инфицирующих доз вирусов гриппа А на пролиферацию перевиваемых клеток человека. *Клеточные культуры. Информ. бюлл.* 2011, 27: 3-12.
10. **Mosmann T.** Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J.Immunol. Methods.* 1983, 65 (1-2): 55-63.
11. **Cai J., Chen Y., Seth S., Furukawa S., Compans R., Jones D.** Inhibition of influenza infection by glutathione. *Free Radic. Biol. Med.* 2003, 34 (7): 928-936.
12. **Еропкин М.Ю., Гудкова Т.М., Коновалова Н.И., Щеканова С.М., Ягловская И.Б., Еропкина Е.М., Киселев О.И.** Противовирусное действие некоторых антиоксидантов /антигипоксантов, а также их комбинаций с ремантадином в отношении вирусов гриппа человека А (H3N2) на моделях in vitro. *Экспер. и клин.фармакол.* 2007, 70 (5): 33-37.
13. **Nencioni L., Iuvara A., Aquilano K., Coriolo M., Cozzolino F., Rotilio G., Garaci E., Palamara A.** Influenza A virus replication is dependent on an antioxidant pathway that involves GSH and Bcl-2. *FASEB J.* 2003, 17 (6): 758-770.
14. **Sgarbanti R., Nencioni L., Amatore D., Coluccio P., Fraternale A., Sale P., mammola C., Carpino G., Gaudio E., Magnani M., Ciriolo M., Garaci E., Palamara A.** Redox regulation of the influenza hemagglutinin maturation process: a new cell-mediated strategy for anti-influenza therapy. *Antioxid Redox Signal.* 2011, 15(3): 593-606.
15. **Geiler J., Michaelis M., Naczek P., Leutz A., Langer K., Doerr H., Cinatl J.** N-acetyl-L-cysteine (NAC) inhibits virus replication and expression of pro-inflammatory molecules in A549 cells infected with highly pathogenic H5N1 influenza A virus. *Biochem. Pharmacol.* 2010, 79(3): 413-420.
16. **Palamara A., Nencioni L., Aquilano K., De Chiarra G., Fernandez L., Cozzolino F., Ciriolo M., Garaci E.** Inhibition of influenza A virus replication by resveratrol. *J.Infect. Dis.* 2005,191:1719-1729.
17. **Echeverria C., Montorfano I., Hermosilla T., Armisen R., Velasques L., Cabello-Verrugio C., Varela D., Simon F.** Endotoxin induces fibrosis in vascular endothelial cells through a mechanism dependent on transient receptor protein melastatin 7 activity. *PLoS ONE.* 2014, 9(4). e94146: 1-11.
18. **Montorfano I., Becerra A., Cerro R., Echeverria C., Saez E., Morales M., Fernandez R., Cabello-Varrugio C., Simon F.** Oxidative stress mediates the conversion of endothelial cells into myofibroblasts via a TGF-b1 and TGF-b2-dependent pathway. *Lab. Invest.* 2014: 1-15.
19. **Sarmiento D., Montorfano I., Caceres M., Echeverria C., Fernandes R., Cabello-Verrugio C., Cerda O., Tapia P., Simon F.** Endotoxin-induced vascular endothelial cell migration is dependent on TLR4/NF-kB pathway, NAD(P)H oxidase activation, and transient receptor potential melastatin 7 calcium channel activity. *Intrn.J.Biochem. Cell Biol.* 2014, 55: 11-23.
20. **Даниленко Д.М., Смирнова С.С., Смирнова Т.Д., Писарева М.М., Плотникова М.А., Дурнова А.О., Еропкин М.Ю.** Ответ клеток перевиваемых линий карциномы легкого (А-549) и

эндотелия (ECV-304) человека на заражение вирусом гриппа А при различной степени инфицированности клеток. Цитология. 2016, 58(3): 192-200.

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ЯДРЫШКООБРАЗУЮЩИХ РАЙОНОВ МЕТАФАЗНЫХ ХРОМОСОМ КЛЕТОК ЛИНИЙ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА

В.И. Турилова, Т.К. Яковлева

ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, turilova@mail.cytspb.rssi.ru

Количество копий и активность рибосомных генов определяют структурно-функциональную организацию ядрышка (и генома в целом) и обеспечивают жизнедеятельность и жизнеспособность клеток. Дерегуляция синтеза рРНК и биогенеза рибосом нарушают клеточный гомеостаз и играют ведущую роль в возникновении и прогрессии опухолей.

Клеточные линии опухолевого происхождения представляют удобную модель для изучения различных аспектов онкогенеза, включая функциональный статус ядрышкообразующих районов хромосом (ЯОР).

Анализ функциональной активности ЯОР хромосом клеток линий множественной миеломы (ММ) человека проведен на препаратах метафазных хромосом, окрашенных нитратом серебра. Клеточные линии ММ, отличающиеся по степени дифференцировки и уровню ploидности клеток различались по числу, составу, суммарному размеру и ассоциативной способности Ag-положительных ЯОР (AgЯОР) хромосом. Так, в околодиплоидных клеточных линиях число Ag-положительных ядрышкообразующих (AgЯО) хромосом варьировало от 4 (U266) до 8 (L363), в околотриплоидных составляло 12 (RPMI 8226) и 14 (U1996). Наименьший средний суммарный размер AgЯОР — 7.19 ± 0.03 усл. ед. обнаружен в клетках U266, наибольший — 24.82 ± 0.09 усл. ед. — в клетках U1996. Доля клеток с ассоциациями AgЯО хромосом варьировала от 0 (Karpas 707) до 41 % (U1996), а доля хромосом, участвующих в ассоциациях — от 1.5 % (U266) до 11.25 % (L363). Сопоставление значений среднего суммарного размера AgЯОР хромосом клеток ММ, длительно существующих в условиях *in vitro*, и ФГА-стимулированных лимфоцитов периферической крови здоровых индивидов (данные литературы) показывает, что клеточные линии ММ характеризуются низкой копийностью активных рибосомных генов, что возможно соответствует уровню дифференцировки клеток, вовлекающихся в трансформацию при ММ *in vivo*.