

ОСНОВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ НА КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУРАХ В УЧРЕЖДЕНИЯХ РОССИИ

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ИНФИЦИРУЮЩИХ ДОЗ ВИРУСОВ ГРИППА А НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ ПЕРЕВИВАЕМЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

Т.Д. Смирнова, Д.М. Даниленко, Т.М. Гудкова, М.М. Писарева, Р.А. Кадырова, А.В. Слита

ФГБУ НИИ гриппа Минздравсоцразвития РФ, Санкт-Петербург, cellcultures@influenza.spb.ru

Проведено инфицирование разными дозами вирусов гриппа A/Brisbane/10/07 (H3N2) и A/C.-Петербург/56/09 (H1N1v) 8-ми клеточных линий человека: ECV-304, T-98G, A-172, RD, CaCo-2, HeLa, L-41 и ФЛЭЧ. На третьи сутки после заражения культур вирусами отмечено дозозависимое снижение количества выросших клеток, обнаружены цитопатические изменения в виде мелкоклеточной очаговой деструкции монослоя. При инфицировании культур высокими дозами вирусов в клетках наблюдался апоптоз, причем он наступал раньше, чем проявлялись первые признаки цитопатических изменений. Только в двух клеточных линиях – ECV-304 (эндотелий) и T-98 G (глиобластома) после заражения низкими дозами вирусов было отмечено усиление пролиферации клеток, которое не сопровождалось индукцией апоптоза. С помощью метода флуоресцирующих антител и полимеразной цепной реакции было показано, что в клетках линии ECV-304, зараженных низкими дозами вируса гриппа A/Brisbane/10/07, на протяжении трех пассажей сохранялась латентная вирусная инфекция: в клетках был выявлен нуклеопротеин вируса и вирусная РНК. Показано, что противовирусные препараты рибавирин, ремантадин и триазавирин снижали пролиферацию перевиваемых клеток эндотелия, стимулированную низкими дозами вируса, что подтверждало специфичность вирусного воздействия на клетки. Результаты проведенных экспериментов свидетельствуют о различном ответе исследуемых клеточных культур на вирусную инфекцию в зависимости от величины заражающей дозы. Обсуждается вопрос о возможной связи инфицирования вирусами гриппа клеток эндотелия и нейроглии больного с развитием у него, впоследствии, сердечнососудистых патологий и заболеваний нервной системы.

Ключевые слова: вирусы гриппа А, перевиваемые клеточные линии человека, пролиферация, апоптоз.

Взаимоотношение вируса гриппа и клетки остается актуальной проблемой, изучением которой заняты исследователи самых различных специальностей.

Появление нового реассортантного варианта пандемического вируса гриппа А свиного происхождения, содержащего фрагменты генома гриппа свиней, птиц и человека, заставляет вновь обратиться к изучению вопросов тропизма и чувствительности клеток к вирусу гриппа и к его способности репродуцироваться в клетках человека. В настоящее время самой чувствительной клеточной линией к вирусам гриппа А различного происхождения остается клеточная линия MDCK, полученная из почки собаки. Клеточные линии, полученные из клеток различных органов человека, которые, за исключением линии диплоидных фибробластов, имеют опухолевое происхождение, как правило, слабо поддерживают репродукцию эпидемических вирусов гриппа А, демонстрируя не ярко выраженную деструкцию клеток, и, практически, нечувствительны к пандемическим вирусам гриппа А свиного происхождения (1, 2).

Невысокая чувствительность этих линий к вирусу гриппа А, помимо биологических особенностей самих вирусов, может быть отражением морфофункциональных особенностей клеток. Прежде всего, это наличие на клеточной мембране соответствующих рецепторов, позволяющих вирусу адсорбироваться на клетке (3), а, также, наличие эндогенных протеаз, расщепляющих гемагглютинин (ГА) вируса, что облегчает слияние мембран вируса и клетки и проникновение вируса внутрь клетки (4, 5); наличие в клетке условий, неблагоприятных для нормальной репродукции вируса и процессинга всех вирусных белков, к которым относятся функционирование системы интерферона (6, 7), аппарата Гольджи (8), особенности организации сети цитоскелета (9); уровень глутатиона и функционирование белков из семейства bcl-2 (10, 11, 12).

Ранее нами было показано усиление пролиферации перевиваемых клеток гемобластозов человека и индукции апоптоза при заражении их низкими дозами вируса гриппа А (13). В задачу настоящего исследования входило изучение пролиферации и апоптоза монослойных клеточных линий человека при заражении их разными дозами вирусов гриппа А: Brisbane/10/07 (H3N2) и СПб/56/09 (H1N1v).

Материал и методы

Вирусы. Исследования проводили с двумя вирусами гриппа А: эпидемический вирус гриппа Brisbane/10/07 (H3N2) и пандемический вирус гриппа СПб/56/09 (H1N1v). В работе использовали вирусосодержащую аллантоисную жидкость от инфицированных 9-дневных

куриных эмбрионов. Титр цитопатического действия (ТЦД), характеризующий инфекционную активность вируса, определяли на клетках MDCK. Титр, как правило, составлял 6-7 lg ТЦД₅₀. Используемое нами обозначение «доза заражения» соответствует наибольшему десятикратному разведению вируса, т.е. разведение вируса 10⁻⁷ соответствует 1 дозе заражения, 10⁻⁶-10 дозам, 10⁻⁵-100 дозам и т.д.

Клеточные линии. Эксперименты проводили на 7 перевиваемых клеточных линиях: клетки эндотелия (ECV-304), глиобластомы (T-98G и A-172), рабдомиосаркомы (RD), карциномы ободочной кишки (CaCO-2), карциномы шейки матки (HeLa), костного мозга (L-41) и одном штамме диплоидных клеток легкого эмбриона человека (ФЛЭЧ). Для определения инфекционной активности вируса по его цитопатическому действию (lgТЦД₅₀) использовали перmissive клеточную линию почки собаки (MDCK). Все клеточные линии получены из Коллекции клеточных культур ФГБУ НИИ гриппа Минздравсоцразвития РФ.

Для пересева перевиваемых клеточных линий использовали питательную среду альфа MEM (без антибиотиков) с добавлением 2% фетальной сыворотки (ф.с.) и с 5% ф.с. для диплоидных клеток линии ФЛЭЧ. Питательные среды и фетальная сыворотка получены из фирмы БИОЛОТ.

Проведение экспериментов.

Для изучения чувствительности клеточных линий к вирусам гриппа применяли традиционный метод заражения клеток вирусом, используя 1-суточный монослой клеток (с посевной концентрацией 2,0 x 10⁵ клеток/мл), выращенный на 96-луночных платах. Контакт вируса и клеток проходил при +37⁰ С в течение 45 мин, после чего добавляли питательную среду для поддержания репродукции вируса (альфа MEM без сыворотки с добавлением 2 мкг/мл трипсина). Изучение состояния монослоя клеток для определения ТЦД вируса на 3 сутки проводили при просмотре плат под инвертированным микроскопом.

Для изучения влияния вируса гриппа на пролиферацию клеток использовали 24-луночные платы, посевная концентрация клеток была снижена до 1,0 x 10⁴ клеток/мл. Инокулят с вирусом (0,1 мл) вносили в суспензию клеток после их посева (по 1 мл) по лункам в среде альфа MEM +1% ф.с. с добавлением 2 мкг/мл трипсина. Подсчет количества выросших клеток проводили в камере Фукса-Розенталя на 3-и сутки после отторжения монослоя клеток от подложки раствором версена. Долю выросших, зараженных вирусом клеток, выражали в проценте от контрольных незараженных клеток, количество которых принимали за 100 %.

На каждую точку использовали не менее 2-х лунок. Каждый эксперимент повторяли не менее 3-х раз.

Изучение клеток ECV-304, зараженных вирусом гриппа в процессе пассирования. Клетки ECV-304, зараженные 1 и 10 дозами вируса гриппа A/Brisbane/10/07 пересевали на 6-7 сутки еще 3 пассажа. В момент каждого пассажа клетки отсеивали для выращивания в пенициллиновых флаконах (для определения синтеза РНК вируса с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени - ПЦР) и в пенициллиновых флаконах с покровными стеклами (для определения нуклеопротеина вируса с помощью флуоресцирующих антител и выявления апоптоза).

Апоптоз клеток определяли по деградации ядерного хроматина, выявляемой при окрашивании красителем Hoechst-33258. Методика описана в статье Смирновой с соавторами (13).

Метод флуоресцирующих антител (МФА). Использовали непрямой МФА с моноклональными антителами (МКА) к нуклеопротеину (НП) вируса гриппа, полученными в ФГБУ НИИ гриппа Минздравсоцразвития РФ. Методика описана в статье Даниленко с соавторами (2).

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) в реальном времени. Исследование проводили с использованием наборов ЦНИИ эпидемиологии серии «АмплиСенс» для детекции вирусов гриппа подтипа H3 и H1 согласно приложенной инструкции.

Противовирусные препараты. Ремантадин (Sigma, Германия) использовали в концентрации 10 мкг/мл, рибавирин (ICN, США) - в концентрации 100 мкг/мл, триазавирин (отечественный препарат, разработанный в Институте органического синтеза Уро РАН, находится на II фазе клинических испытаний) - в концентрации 50 мкг/мл. Все препараты разводили в среде альфа MEM.

Статистическая обработка. Статистическую обработку количественных данных проводили с использованием пакета программ MS Office Excel 2007 и Statistica 6.0.

Результаты

Результаты опытов показали, что клеточные линии человеческого происхождения обладали невысокой чувствительностью к исследуемым вирусам гриппа А. Цитопатические изменения в виде мелкоклеточной очаговой деструкции клеток, хотя и в невысоких титрах (3-4 lg ТЦД₅₀), вызывались эпидемическим вирусом гриппа A/Brisbane/10/07 во всех исследуемых клеточных линиях, тогда как деструкция клеток, вызванная пандемическим вирусом

A/СП6/56/09, отмечена только в клеточных линиях ECV-304, T-98G, RD, A-172 и титры составляли 1-2 lgТЦД₅₀. Плотность монослоя, выращенного с использованием разных посевных концентраций клеток, не влияла на усиление их чувствительности к вирусам. Цитопатические изменения, вызванные эпидемическим вирусом гриппа A/Brisbane/10/07 и пандемическим вирусом A/СП6/56/09, как при высокой посевной концентрации клеток, так и при низкой, были на том же уровне и в тех же клеточных линиях.

Изучение влияния вирусов на пролиферацию клеток на 3-и сутки после заражения показало, что во всех исследуемых клеточных линиях, независимо от проявления в них ЦПД, отмечалось дозозависимое снижение количества выросших клеток, что указывает на наличие, хотя и невысокой, чувствительности всех исследуемых клеточных линий к цитодеструктивному действию вирусов, как A/Brisbane/10/07 (H3N2), так и A/СП6/56/09 (H1N1v) (табл.). Визуально это выражалось в постепенном разрежении монослоя клеток и напоминало вид стареющих культур.

Таблица. Влияние заражающих доз вирусов гриппа A Brisbane/10/07 (H3N2) и СП6/56/09 (H1N1v) на пролиферацию клеточных линий человека

Клеточная линия	Вирус гриппа A/Brisbane/10/07 (H3N2)				Вирус гриппа A/СП6/56/09 (H1N1v)			
	Доля выросших клеток, % от контроля							
	Дозы заражения вирусом				Дозы заражения вирусом			
	1	10	100	1000	1	10	100	1000
ECV-304	132,6±10,6	120,6±5,8	79,2±4,7	20,3±2,1	142,3±10,1	139,5±10,3	100±6,7	76±6,2
T-98G	125,4±6,3	98±4,1	82±4,2	42,9±1,7	125,6±11,0	114,8±10,6	84±4,8	68±3,8
A-172	98±3,6	75,4±2,9	52,7±2,0	18,4±1,3	100±4,8	80,4±5,8	70±3,7	65±2,8
RD	100±4,9	75±3,8	68±3,9	45±1,4	98±5,3	75±3,6	67±4,5	59±4,7
CaCo-2	89±3,4	60±2,4	45±1,1	32±1,9	91,2±5,6	83,8±4,9	68,5±4,1	53±3,1
HeLa	92±6,9	84±7,8	56±3,6	45±3,5	98±6,3	80±3,7	62±4,2	56,8±4,6
L-41	89±6,8	78±5,9	67±3,1	42±3,6	95,5±8,4	86,3±6,9	71,4±5,7	65,2±6,1
ФЛЭЧ	100±7,3	89±4,9	75±4,7	54±3,9	100±4,8	89±5,7	80±4,8	75±5,6

Апоптоз клеток во всех исследуемых линиях обнаруживался только после заражения монослоя клеток высокими дозами вируса и по времени предшествовал появлению цитопатических или других изменений (в виде разрежения монослоя клеток).

Из 8 исследуемых клеточных линий только две (клетки эндотелия ECV-304 и глиобластомы человека T-98G) ответили усилением пролиферации на заражение самыми низкими дозами вирусов гриппа A/Brisbane/10/07 (H3N2) и A/СПб/56/09 (H1N1v). Доля выросших клеток (% от контроля) на 3-и сутки эндотелиальной клеточной линии ECV-304 была $132,6 \pm 10,6$ - $120,6 \pm 5,8$ при 1 и 10 дозах заражения вирусом гриппа A/Brisbane/10/07 и $142,3 \pm 10,1$ - $139,5 \pm 10,3$ при 1 и 10 дозах заражения вирусом гриппа A/СПб/56/09 соответственно. Для клеток глиобластомы T-98G эти показатели были $125,4 \pm 6,3$ и $125,6 \pm 11,0$ при заражении 1 дозой вируса гриппа A/Brisbane/10/07 и A/СПб/56/09 соответственно. При окрашивании клеток этих линий флуоресцентным красителем Hoechst-33258 на 3-и сутки после заражения вирусом не были обнаружены ядра с признаками деградации хроматина. Это свидетельствует о том, что стимуляция пролиферации этих клеток под воздействием низких доз вируса не сопровождалась индукцией апоптоза, в отличие от того, что наблюдалось нами ранее при исследовании лимфобластоидных клеток (13).

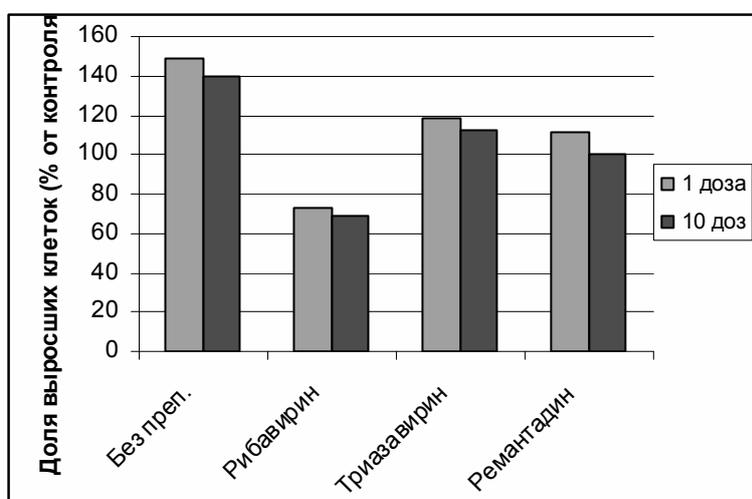
Попытки выделить вирус из культуральной жидкости клеток ECV-304, зараженных низкими дозами вируса, на клетках МДСК были отрицательны. Инфекционный вирус обнаруживался только в гомогенате клеток, зараженных максимальными дозами вируса и разрушенных с помощью замораживания-оттаивания, что свидетельствует о преимущественно внутриклеточной локализации вируса.

В эндотелиальных клетках ECV-304, зараженных низкими дозами (1 и 10 доз) вируса A/СПб/56/09 на протяжении трех последующих пассажей не обнаружено каких-либо цитопатических изменений. При исследовании на апоптоз инфицированных вирусом клеток, выращенных на покровных стеклах после 1-го и 2-го пассажа, было выявлено в 1-суточных культурах небольшое количество клеток с апоптозом (в контрольных клетках признаки апоптоза отсутствовали). Это свидетельствует о сохранении в клетках эндотелия, зараженных очень низкими дозами вируса гриппа, инфекционного процесса. Это подтверждается, также, обнаружением в этих клетках положительной флуоресценции нуклеопротеина (NP) вируса гриппа, выявленного с помощью МКА. Исследования ПЦР в реальном времени показали, что на 3-м пассаже в 3-х суточных культурах клеток ECV-304 происходит синтез вирусной РНК, однако, количество ее невелико (циклы 27 и 30 при заражении дозами 10 и 1 соответственно).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что на протяжении, по меньшей мере, одного месяца в клетках эндотелия человека, зараженных очень низкими дозами вируса гриппа А, сохраняется внутриклеточный инфекционный процесс.

Применение противовирусных препаратов (рибавирин, триазамирин и ремантадин) снижало стимулированную низкими дозами вируса пролиферацию клеток, что подтверждает специфичность вирусного участия в этом процессе. Наибольший ингибирующий эффект на стимуляцию пролиферации клеток ECV-304 под воздействием низких доз вируса гриппа А обнаружил противовирусный препарат рибавирин. Доля выросших клеток при 1 и 10 дозах заражения вирусом были соответственно $142,3 \pm 10,1$ и $139,5 \pm 10,3$ (без добавления препаратов), $73 \pm 4,8$ и $69 \pm 5,7$ (в присутствии рибавирина), $118 \pm 9,6$ и $112 \pm 8,9$ (в присутствии триазамирин), $111 \pm 7,1$ и $100 \pm 8,4$ (в присутствии ремантадина) (рис.1).

Рис. 1. Влияние противовирусных препаратов на пролиферацию клеток эндотелия человека линии ECV-304, зараженных низкими дозами вируса гриппа А/СПб/56/09 (H1N1)



Обсуждение

В вирусологической практике при изучении поведения вируса гриппа в клетках, как правило, используются достаточно высокие дозы заражения вирусом, что может представлять собой модель острой гриппозной инфекции. Однако на пути вируса после проникновения в верхние дыхательные пути встает защита в виде врожденного клеточного иммунитета, а позже, и гуморального. Преодолевшие этот барьер вирусные частицы могут разноситься либо с током крови, либо инфицированными лимфоцитами и лейкоцитами, во всяком случае,

количество вирусных частиц в клетках крови очень невелико. Эту сторону латентного инфекционного процесса может моделировать заражение клеток *in vitro* очень низкими дозами вируса.

Ранее нами было обнаружено, что низкие дозы вируса способны стимулировать пролиферацию и апоптоз практически во всех перевиваемых клеточных линиях, имеющих происхождение из клеток крови: Т-лимфобласты (Jurkat), В-лимфобласты (NC-37, Namalva), макрофаги (U-937) (13), а, также, клетки промиелоцитарного происхождения (Kg-1, HL-60), эритробластоидного (K-562) и миеломного (U-266, IM-9, RPMI-1788, RPMI-8226) (данные не опубликованы). Стимуляция пролиферации в этих клеточных линиях всегда сопровождалась увеличением количества клеток в состоянии апоптоза. Влияние низких доз вируса гриппа на лимфоциты человека является подтверждением отдаленных последствий гриппозной инфекции, которая может вызвать вспышку лимфолейкозов или обострение после ремиссии, поскольку всегда существует вероятность присутствия в организме трансформированных клеток крови.

Обнаруженное нами стимулирующее действие низких доз вируса на пролиферацию клеток только в двух монослойных клеточных линиях, происходящих из эндотелия и глиобластомы человека, по-видимому, не случайно. Обращает на себя внимание тот факт, что вирус гриппа А в эндотелиальных клетках человека ECV-304, зараженных низкими дозами вируса, поддерживал латентную репродукцию при отсутствии внешних морфологических признаков в виде ЦПД, и не обнаруживался в культуральной жидкости. Латентное инфицирование клеток подтверждается присутствием нуклеопротеина вируса в клетках и синтезом вирусной РНК. Подобная латентная инфекция наблюдалась и при заражении низкими дозами вируса гриппа А Т-лимфобластоидных клеток линии Jurkat (13).

Антивирусные препараты рибавирин, ремантадин и триазавирин, как и в опытах на лимфобластоидных клетках, снижали пролиферацию клеток, стимулированную низкими дозами вируса гриппа.

Интересно отметить тот факт, что две клеточные линии глиобластомы человека Т-98G и А-172, хотя и имели одинаковое происхождение, но отличались как по морфологии, так и функционально. Более мелкие и распластанные клетки Т-98G отвечали усилением пролиферации в ответ на заражение низкими дозами вируса гриппа А, в отличие от более крупных и веретеновидных клеток А-172, хотя и в той и другой линии оба исследуемых вируса вызывали ЦПД. Другими авторами также отмечены отличия между этими клеточными

линиями: нечувствительность клеток A-172, в отличие от клеток T-98, к стимулирующему действию на пролиферацию клеток инсулиноподобного фактора роста I (14) и устойчивость клеток A-172 к апоптоз-индуцирующему действию энзастаурина, ингибитора протеин киназы С-бета, который вызывал апоптоз в клетках T-98 (15).

Хорошо известно, какую роль играют в организме клетки эндотелия, и известно особое сродство к этим клеткам вирусов птичьего гриппа (16). Давно обсуждается вопрос об участии вируса гриппа в возникновении заболеваний сердца и сосудов (17).

Существует достаточно много сообщений о роли вируса гриппа в возникновении заболеваний ЦНС, энцефалопатий, энцефалитов, как при экспериментальных, так и клинических исследованиях. Эти заболевания могут явиться результатом отдаленных последствий гриппозной инфекции или врожденных патологий (18, 19, 20). Обсуждается вопрос об участии вируса гриппа в инфицировании микроглии и возникновении болезни Паркинсона, Альцгеймера и множественного склероза (21, 22).

Список литературы

1. **Li I., Chan K., To K., Wong S., Ho P., Lau S., Woo P., Tsou H., Chan J., Cheng V., Zheng B., Chen H., Yuen K.** Differential susceptibility of different cell lines to swine-origin influenza A H1N1, seasonal human influenza A H1N1, and avian influenza A H5N1 viruses. *J. Clin. Virol.* 2009, 46, 4: 325-330.
2. **Даниленко Д.М., Смирнова Т.Д., Гудкова Т.М., Еропкин М.Ю., Киселев О.И.** Сравнительное изучение чувствительности клеточных линий различного происхождения к вирусам пандемического гриппа H1N1v, вирусам гриппа птиц, свиней и вирусам гриппа человека. *Вопр. вирусол.* 2010, в печати.
3. **Matrosovich M., Matrosovich T., Carr J., Roberts N., Klenk H-D.** Overexpression of the α -2,6-sialyltransferase in MDCK cells increases influenza virus sensitivity to neuraminidase inhibitors. *J. Virol.* 2003, 77, 15: 8418-8425.
4. **Zirnov O., Klenk HD.** Human influenza A viruses are proteolytically activated and do not induce apoptosis in CaCo-2 cells. *Virology.* 2003, 313, 1: 198-212.
5. **Kido H., Okumura Y., Takahashi E., Pan HY., Wang S., Chida J., Le T., Yano M.** Host envelope glycoprotein processing proteases are indispensable for entry into human cells by seasonal and highly pathogenic avian influenza viruses. *J. Mol. Genet. Med.* 2009, 3, 1: 167-175.
6. **Ершов Ф.И., Киселев О.И.** Интерфероны и их индукторы (от молекул до лекарств). Москва, «ГЭОТАР-Медиа». 2005, 356 с.
7. **Goodman A., Zeng H., Proll S., Peng X., Cilloniz C., Carter V., Korth M., Tumpey T., Katze M.** The alpha/beta interferon receptor provides protection against influenza virus replication but is dispensable for inflammatory response signaling. *J. of Virol.* 2010, 84, 4: 2027-2037.
8. **Ueda M., Yamate M., du A., Daidoji T., Okuno Y., Ikuta K., Nakaya T.** Maturation efficiency of viral glycoproteins in the ER impacts the production of influenza A virus. *Virus Res.* 2008, 136, 1-2: 91-97.

- 9 **Arcangellitti M., De Condo F., Ferraglia F., Pinardi F., Gatti R., Orlandini G., coven S., Motta F., Rodighiero I., Dettori G., Chezzi C.** Host-cell-dependent role of actin cytoskeleton during the replication of a human strain of influenza A virus. *Arch. Virol.* 2008, 153: 1209-1221.
- 10 **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.
- 11 **Nencioni L., Iuvara A., Aquilano K., Ciriolo M., Cozzolino F., Rptilio G., Garaci E., Palamara A.** Influenza A virus replication is dependent on an antioxidant pathway that involves GSH and Bcl-2. *The FASEB J.* 2003, 19.
- 12 **Nencioni L., De Chiara G., Sgarbanti R., Amatore D., Aquilano K., Marrocchi M., Serafino A., Torcia M., Cozzolino F., Ciriolo M., Garaci E., Palamara A.** Bcl-2 expression and p38MAPK activity in cells infected with influenza A virus. *J. Biol. Chem.* 2009, 284, 23: 16004-16015.
- 13 **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. Информационный бюллетень.* 2009, 24:25-34.
- 14 **Schlenska-Lange A., Knupfer H., Lange T., Kiess W., Knupfer M.** Cell proliferation and migration in glioblastoma multiforme cell lines are influenced by insulin-like growth factor I in vitro. *Anticancer Res.* 2008, 28, 2A:1 055-1060.
- 15 **Rieger J., Lemke D., Maurer G., Weiler M., Frank B., Tabatabai G., Weller M., Wick W.** Enzastaurin-induced apoptosis in glioma cells is caspase-dependent and inhibited by BCL-XL. *J. Neurochem.* 2008, 106, 6: 2436-2448.
- 16 **Feldmann A., Schafer M., Garten W., Klenk HD.** Targeted infection of endothelial cells by avian influenza virus A/FPV/Rostock/34 (H7N1) in chicken embryos. *J. Virol.* 2000, 74, 17: 8018-8027.
- 17 **Madjid M., Aboshady I., Awan I., Litovsky S., Casscells S.** Influenza and cardiovascular disease. *Tex. Heart Inst. J.* 2004, 31, 1: 4-13.
- 18 **Зуев В.А., Тенцов Ю.Ю., Шевченко А.М., Ржаникова А.А., Нефедова Н.Б., Игнатова Н.Г., Букринская А.Г.** Персистенция вируса гриппа у детей с врожденной патологией ЦНС. *Вопр. вирусол.* 1990, 35, 6: 452-456.
- 19 **Morishima T.** Influenza-associated encephalopathy. *Rinsho Shinkeigaku.* 2004, 44, 11: 965-969.
- 20 **Wang G., Li W., Li K.** Acute encephalopathy and encephalitis caused by influenza virus infection. *Curr. Opin. Neurol.* 2010, 23, 3: 305-311.
- 21 **Long-Smith C., Sullivan A., Nolan Y.** The influence of microglia on the pathogenesis of Parkinsons disease. *Prog. Neurobiol.* 2009, 89, 3: 277-287.
- 22 **Majde J.** Neuroinflammation resulting from covert brain invasion by common viruses – a potential role in local and global neurodegeneration. *Med. Hypotheses.* 2010, 75, 2: 204-213.