

ПРИМЕНЕНИЕ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР В ВИРУСОЛОГИИ

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ РАЗНЫХ СУБТИПОВ ВИРУСА ГРИППА А В ПРИСУТСТВИИ ПРОТИВОВИРУСНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ И ИНДУКЦИЮ ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛИ В КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЯХ ЧЕЛОВЕКА А-549 И ECV-304

***Т.Д. Смирнова, Д.М. Даниленко, М.А. Плотникова, Р.А. Кадырова,
А.В. Слита, М.Ю. Еропкин***

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

Продолжено изучение стимулирующего действия низких доз вируса гриппа А при заражении перевиваемых клеточных линий человека. В настоящем исследовании показано, что клетки эндотелия человека линии ECV-304 отвечали усилением пролиферации не только на субтипы вируса пандемического гриппа А (H1N1pdm) и субтипы вируса эпидемического гриппа А (H3N2, H1N1 и H2N2), но не реагировали на вирус птичьего гриппа H5N1. В отличие от клеток эндотелия, пневмоциты линии А-549 отвечали усилением пролиферации только на вирусы пандемического гриппа А H1N1pdm и на вирус гриппа субтипа H2N2. Слабая биологическая активность клеток А-549 в отличие от клеток ECV-304 отмечена, также, в отношении экспрессии фактора некроза опухоли (ФНО), одного из важнейших провоспалительных цитокинов, играющих определяющую роль в патогенезе инфекции вируса гриппа А. Изучение влияния противовирусных препаратов различной направленности на вирус-индуцированную пролиферацию клеток и экспрессию ФНО не обнаружило корреляции воздействия препаратов на изучаемые эффекты: только ремантадин одновременно ингибировал как вирус-индуцированную пролиферацию клеток, так и экспрессию ФНО. Полученные данные свидетельствуют о различной чувствительности клеток линий ECV-304 и А-549 к вирусам разных субтипов и о различной способности клеток к экспрессии цитокина ФНО. Обсуждается необходимость введения дополнительных критериев для оценки взаимоотношения вируса гриппа А и клеток-хозяина, а также для понимания механизмов действия противовирусных препаратов различной направленности.

Ключевые слова: вирусы гриппа А, клеточные линии А-549, ECV-304, экспрессия ФНО, пролиферация.

В последние годы для изучения вируса гриппа *A in vitro* широко используются клеточные линии человеческого происхождения. Основной мишенью вируса гриппа являются клетки эпителия верхних и нижних дыхательных путей, поэтому наибольшее распространение получила клеточная линия карциномы легких человека A-549, представляющая собой пневмоциты. В клетках A-549 происходит репродукция вируса гриппа А, но титры вируса ниже, чем в клетках почки собаки линии МДСК из-за пониженного синтеза вирусного гемагглютинина (ГА) в результате замедления его транспорта из эндоплазматического ретикулума в транс-Гольджи сеть, где созревание и фолдинг ГА также снижены; цитопатическое действие (ЦПД) вируса в этих клетках выражено слабо (1). Клеточная линия A-549 широко используется для изучения особенностей метаболизма клетки под воздействием вируса гриппа на молекулярном уровне: изучение индукции цитокинов, хемокинов и анализа вовлеченных в репродукцию вируса клеточных белков и генов (2, 3).

Другой мишенью, играющей важную роль в вирусном патогенезе, особенно при инфекции высоко патогенным вирусом птичьего гриппа, являются клетки эндотелия (4, 5). Первичная культура эндотелия сосудов пупочного канатика человека (HUVEC) достаточно давно используется для изучения репродукции вируса гриппа в эндотелиоцитах. Несмотря на невысокую перmissивность клеток HUVEC к вирусу гриппа, показана коагулянтная активность и продукция различных цитокинов в этих клетках при вирусной инфекции (6, 7, 8, 9). Поскольку первичная культура клеток HUVEC имеют ряд недостатков для исследования: сложность получения, низкий клеточный пул, ограниченный жизненный срок и индивидуальные различия полученных клеточных культур (10), мы использовали для своих исследований постоянную клеточную линию эндотелия человека ECV-304, полученную Takahashi с соавт. (11) из спонтанно трансформированных эндотелиоцитов пуповинной вены человека. Многочисленные морфологические, иммунохимические и биохимические исследования, а также проведенная цитогенетическая характеристика показали, что клетки ECV-304 могут быть использованы в качестве эндотелиальной клеточной модели для решения ряда медико-биологических вопросов (12, 13, 14). Известно, что клетки ECV-304 широко используются для изучения фармакологических препаратов, однако, эти клетки пока редко используются при изучении вируса гриппа (15, 16).

В связи с возможностью появления новых штаммов с пандемическим потенциалом, таких как вирус пандемического гриппа 2009 г. A(H1N1)*pdm*, а также с постоянной регистрацией новых случаев заболеваемости птичьим гриппом, возникает необходимость более

углубленного изучения взаимодействия вируса гриппа А с клетками человека. Ранее нами было обнаружено, что вирус гриппа А субтипов H3N2 и H1N1pdm при низких дозах заражения оказывает стимулирующее действие не только на клетки человека лимфобластоидного происхождения (17), но и на клетки эндотелия человека линии ECV-304 (15). В настоящем исследовании было продолжено изучение влияния низких заражающих доз других подтипов вируса гриппа А как на клетки ECV-304, так и на клетки А-549.

По-прежнему остается актуальным вопрос о рекомендации противовирусных препаратов для лечебного и профилактического применения. Несмотря на то, что все штаммы пандемического гриппа *in vitro* являются ремантадин-резистентными, в клинической практике существуют противоречивые данные об эффективности применения ремантадина в качестве противовирусного препарата при лечении гриппа.

Традиционный метод оценки противовирусной активности препарата *in vitro* состоит в оценке его способности подавлять ЦПД вируса в перmissive клетках почки собаки линии МДСК, однако, этот метод не применим для большинства клеточных линий человеческого происхождения, в которых вирус гриппа А не вызывает ЦПД (18). Более того, существует ряд препаратов, которые не демонстрируют антивирусной активности *in vitro*, тем не менее, в условиях *in vivo* оказываются эффективными. В этой связи, необходимо вводить дополнительные критерии для оценки действия противовирусных препаратов.

Ранее нами была исследована активность ряда противовирусных препаратов по их воздействию на транслокацию вирусного нуклеопротеина (НП) из клеточного ядра в цитоплазму, а также на эффекты, оказываемые вирусом на клетку: пролиферацию и апоптоз. Нами было показано, что исследуемые препараты (триазавирин, ремантадин, рибавирин) как в случае резистентности к ним вирусов, так и в отсутствие противовирусной активности в стандартном тесте *in vitro* на клетках МДСК, проявляют либо ингибирующие свойства (в виде подавления транслокации вирусного РНП из ядра в цитоплазму и подавления пролиферации клеток и апоптоза, индуцированных вирусом), либо стимулирующие действие (усиление апоптоза в присутствии рибавирина) (19).

В задачу настоящего исследования входило изучение влияния разных субтипов вируса гриппа А на пролиферацию клеток линий А-549 и ECV-304 при разных дозах заражения вирусом и на экспрессию в этих условиях фактора некроза опухоли, являющегося одним из основных цитокинов, индуцируемых вирусом гриппа, а также оценка влияния на эти критерии

противовирусных препаратов различной направленности действия (подавляющих и не подавляющих ЦПД вируса, индукторов апоптоза, иммуномодуляторов).

Материал и методы

Вирусы. В работе использовали следующие вирусы гриппа А: Санкт-Петербург/5/09 (H1N1pdm), Санкт-Петербург/2/10 (H1N1pdm), Брисбен/10/07 (H3N2), Сингапур/1/57 (H2N2), Хабаровск/74/77 (H1N1), Курица/Курган/5/05 (H5N1). Вирус-содержащим материалом являлась аллантоисная жидкость от инфицированных 9-дневных куриных эмбрионов. Титр цитопатического действия (ТЦД), характеризующий инфекционную активность вируса, определяли на клетках МДСК и, который, как правило, составлял 6-7 Ig ТЦД₅₀. Используемые нами обозначение «доза заражения» соответствует наибольшему десятикратному разведению вируса, т.е. разведение вируса 10^{-7} равно 1 дозе заражения, 10^{-6} - 10 дозам, 10^{-5} - 100 дозам и т.д..

Клеточные линии. Перевиваемые клеточные линии карциномы легких человека А-549 и эндотелия человека ECV-304 получены из Коллекции клеточных культур ФГБУ НИИ гриппа Минздравсоцразвития. Для пересева перевиваемых клеточных линий использовали питательную среду альфа MEM (без антибиотиков) с добавлением 2% фетальной сыворотки (ф.с.). Питательные среды и фетальная сыворотка получены из фирмы «БИОЛОТ».

Противовирусные препараты. Триазавирин (отечественный препарат, разработанный в Институте органического синтеза Уро РАН, находится на II фазе клинических испытаний), использовали в концентрации 50 мкг/мл. Ремантадин (Sigma, Германия) - в концентрации 20 мкг/мл. Рибавирин (ICN, США) - в концентрации 100 мкг/мл. Ингавирин (аптечный препарат фирмы ОАО «Валента Фармацевтика») - в концентрации 100 мкг/мл. Все препараты разводили в среде альфа MEM.

Проведение опыта. Методика определения влияния вируса гриппа на пролиферацию клеток описана в статье Смирновой с соавт. 2011. Опыт проводили в 24-луночных пластинах. Для проведения опыта по определению экспрессии ФНО методика заражения клеток вируса была несколько изменена. Заражение клеток вирусом проводили в суспензии, для чего 1×10^5 клеток /мл соединяли с 1 мл вируса соответствующего разведения, с контактом 1 час при $+37^{\circ}$ С, после чего клетки освобождали от вирусосодержащей жидкости центрифугированием, осадок клеток ресуспендировали среде альфа MEM+2% ф.с. с добавлением 2 мкг/мл трипсина и разливали в лунки по 1мл. Подсчет 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.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) в реальном времени. Оценку уровня экспрессии ФНО проводили методом ОТ-ПЦР в реальном времени с использованием специфических праймеров, синтезированных фирмой «ДНК-синтез», Россия (согласно инструкции). Все используемые реагенты получены от фирмы «Promega». Результаты амплификации регистрировали в реальном времени с последующим анализом ампликонов по кривой плавления и электрофореза в агарозном геле с бромистым этидием. Анализ данных проводили прямым сравнением графиков накопления. Уровень экспрессии ФНО определяли как $2^{-\Delta n}$, где n-значение порогового цикла C(t), Δn – разность между значениями C(t) анализируемого образца и C(t) контроля.

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

Результаты

Изучение пролиферации клеток ECV-304 и A-549 при заражении высокими и низкими дозами вирусов гриппа А разных субтипов.

Ранее нами было обнаружено, что в эндотелиальных клетках человека линии ECV-304 происходит увеличение пролиферации при заражении их очень низкими дозами эпидемического вируса гриппа А Брисбен/10/07 (H3N2) и пандемического вируса гриппа А СПб/56/09 (H1N1)pdm (15).

В настоящем работе мы продолжили эти исследования с другими подтипами вируса гриппа А: Хабаровск /74/77 (H1N1), Сингапур/1/57 (H2N2) и Курица/Курган /5/05 (H5N1) не только на клетках эндотелия человека ECV-304, но также на клеточной линии пневмоцитов человека A-549. Данные, представленные в табл. 1 свидетельствуют, что все исследуемые подтипы вируса гриппа А, за исключением вируса птичьего гриппа Курица/Курган/5/05 (H5N1), были способны стимулировать пролиферацию клеток эндотелия человека ECV-304 при очень низкой дозе заражения, тогда как клетки пневмоцитов человека A-549 реагировали усилением пролиферации только при заражении пандемическим вирусом (H1N1)pdm и вирусом Сингапур/1/57 подтипа H2N2. Ремантадин подавлял как цитотоксическое действие вирусов на клетки, вызываемое высокими дозами заражения вирусов, на что указывает увеличение их

количества (но не выше, чем в контроле), так и ингибировал пролиферацию клеток, стимулированных низкими дозами вирусов (табл.1).

Таблица 1. Влияние разных подтипов вируса гриппа А на пролиферацию клеток человека А-549 и ECV-304 при заражении разными дозами в присутствии и отсутствии ремантадина.

	А/СПб/5/09 H1N1pdm		А/Брисбен/10/07 H3N2		А/Хабаровск/74/77 H1N1		А/Сингапур/1/57 H2N2		А/Курица/Курган/5/ 05 H5N1	
Дозы заражения										
	100 доз	1 доза	100 доз	1 доза	100 доз	1 доза	100 доз	1 доза	100 доз	1 доза
Клетки А-549. Доля выросших клеток, % от контроля										
Без препарата	69,4 ±5,9	135,5 ±10,4	62 ±4,8	98,1 ±7,2	61,1 ±5,2	95,8 ±7,8	67,3 ±4,9	127,7 ±11,3	14,9 ±0,9	100 ±8,6
Ремантадин	75 ±6,7	77,3 ±6,1	70,4 ±5,8	74,5 ±5,1	71,3 ±6,4	99,3 ±8,3	92,5 ±8,2	98,5 ±7,7	68,3 ±4,7	88,7 ±5,9
Клетки ECV-304. Доля выросших клеток, % от контроля										
Без препарата	64,3 ±5,3	120,9 ±10,2	54,4 ±4,0	127,5 ±10,2	48,4 ±3,8	120 ±9,7	75,2 ±5,6	124 ±8,9	2,3 ±0,1	79,3 ±5,7
Ремантадин	80 ±6,8	89 ±5,9	84,5 ±6,3	98,9 ±7,4	90,5 ±7,4	99 ±6,9	89,8 ±6,6	93 ±6,5	9,8 ±0,7	91,9 ±7,2

Изучение экспрессии ФНО в клетках ECV-304 и А-549 при заражении высокими и низкими дозами вируса гриппа А/СПб/02/10 (H1N1pdm).

В следующей серии опытов мы попытались проследить влияние репродукции вируса гриппа СПб/2/10 (H1N1)pdm в клетках А-549 и ECV-304 при высокой и низкой дозах заражения (100 и 1 доза соответственно) на пролиферацию клеток и индукцию экспрессии в них фактора некроза опухоли (ФНО) в присутствии противовирусных препаратов: триазавирин, ингавирин, ремантадин и рибавирин.

Как уже было показано выше, высокие дозы вируса пандемического гриппа вызывали снижение пролиферации клеток, тогда как при низких дозах заражения наблюдалось усиление пролиферации как эндотелиоцитов (ECV-304), так и пневмоцитов (А-549). Действие противовирусных препаратов было сходным на обеих клеточных линиях: стимулированную вирусом пролиферацию клеток подавляли триазавирин, ремантадин и рибавирин, в то время

как ингавирин усиливал пролиферацию клеток ECV-304 и A-549, зараженных низкими дозами вируса (рис.1 и 2).

Рис.1. Влияние противовирусных препаратов на вирус-индуцированную пролиферацию клеток A-549.

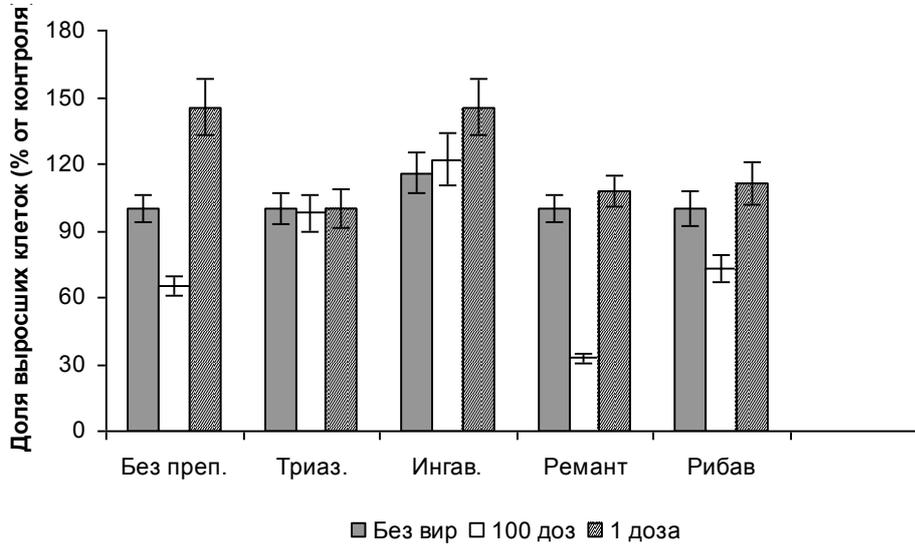


Рис. 2. Влияние противовирусных препаратов на вирус-индуцированную пролиферацию клеток ECV-304.

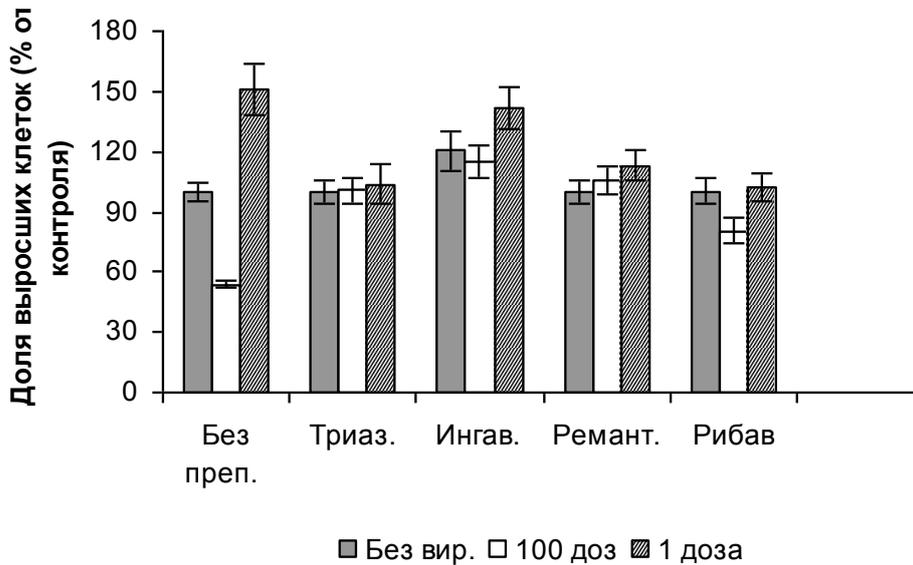


Рис.3. Влияние противовирусных препаратов на вирус-индуцированную экспрессию ФНО в клетках А-549.

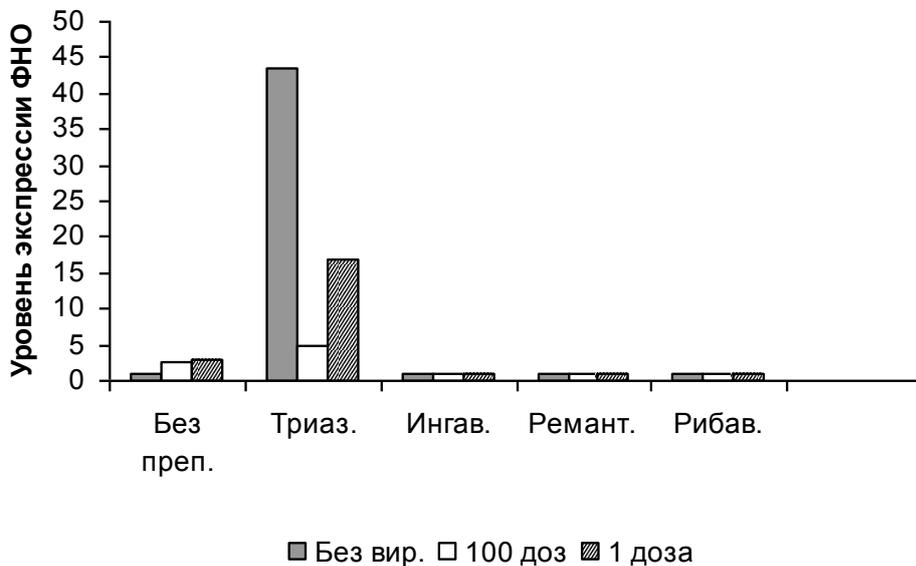
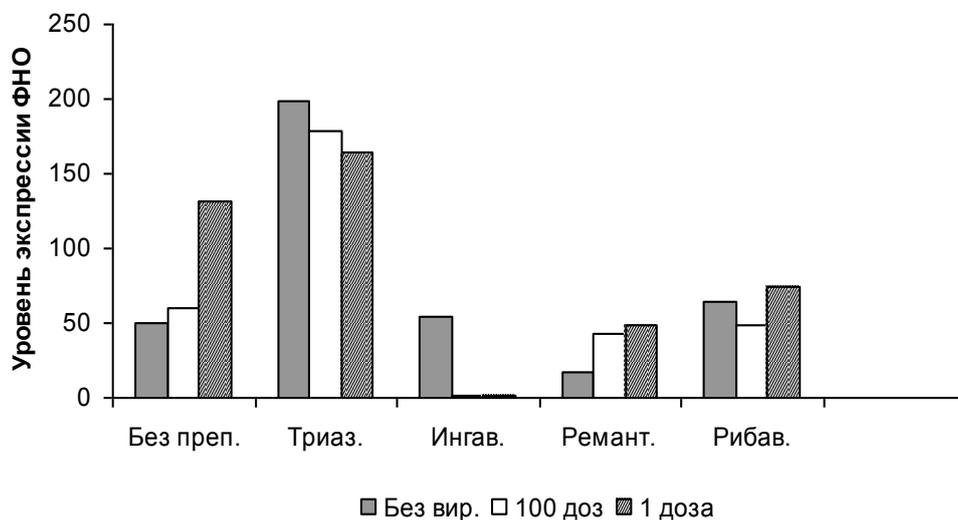


Рис. 4. Влияние противовирусных препаратов на вирус-индуцированную экспрессию ФНО в клетках ECV-304



По отношению к экспрессии ФНО клетки ECV-304 и А-549 обнаружили различную биологическую активность. В клетках эндотелия активность цитокина определялась как в контрольных, незараженных вирусом клетках, так и зараженных вирусом гриппа, причем экспрессия ФНО возрастала по мере снижения дозы вируса, что соответствовало изменению

пролиферации клеток. В то же время в контрольных клетках A-549 экспрессия ФНО отсутствовала, а в присутствии вируса отмечался очень низкий ее уровень. Из всех изучаемых препаратов только триазавирин индуцировал высокую экспрессию ФНО в контрольных клетках, как эндотелия, так и в пневмоцитах человека. В присутствии вируса в клетках ECV-304 триазавирин вызывал снижение экспрессии ФНО при уменьшении дозы заражения вирусом, тогда как в клетках A-549 экспрессия ФНО была значительно снижена при высокой дозе заражения, но повышалась при низкой дозе заражения. Другие препараты показали в незараженных вирусом клетках ECV-304 очень невысокий уровень экспрессии ФНО: ингавирин примерно на уровне контроля, ремантадин несколько ниже, а рибавирин не намного выше. В зараженных вирусом клетках добавление ингавирина полностью подавляло экспрессию ФНО, а в присутствии ремантадина и рибавирина экспрессия этого цитокина оставалась низкой. В клетках A-549 при добавлении ингавирина, ремантадина или рибавирина экспрессия ФНО не отмечалась ни в контроле, ни при заражении вирусом.

Обсуждение

Различия между клеточными линиями эпителиального (A-549) и эндотелиального (ECV-304) происхождения проявились прежде всего в их реакции на заражение очень низкими дозами вируса гриппа А различных субтипов. Клетки эндотелия отвечали усилением пролиферации практически на все субтипы вируса гриппа А, за исключением вируса птичьего гриппа, тогда как только вирусы пандемического гриппа (H1N1)pdm и вирус Сингапур1/57 подтипа H2N2 были способны вызвать стимуляцию пролиферации клеток A-549.

Клетки ECV-304 и A-549 обнаружили также большое различие в способности экспрессировать ФНО, как контрольными незараженными вирусом клетками, так и в присутствии разных доз вируса, и, особенно, при добавлении противовирусных препаратов: наблюдалась активная экспрессия ФНО в клетках ECV-304 и либо слабая, либо полное отсутствие экспрессии ФНО в клетках A-549.

По данным He et. al. (20) вирус гриппа вызывает в зараженных клетках задержку прохождения клеточного цикла в фазе $G_0 - G_1$, при этом происходит уменьшение количества гиперфосфорилированного белка ретинобластомы, необходимого для прохождения через позднюю фазу G_1 в S фазу, а также изменяется количество других ключевых молекул, участвующих в регуляции клеточного цикла (p21, циклин E, циклин D1). Фаза $G_0 - G_1$ клеточного цикла наиболее благоприятна для репродукции вируса гриппа, после чего клетка может подвергаться апоптозу или цитолизу (20). Известно, что в процессе вирусной инфекции

происходит увеличение активности белка p53, который вовлекается не только в остановку клеточного цикла, но и в индукцию гибели клетки через апоптоз. Апоптоз в клетках, инфицированных вирусом гриппа, может индуцироваться многими факторами, из них основными являются цитокины ФНО и интерферон (ИФН) 2 типа, и обнаружена тесная связь этих цитокинов с белком p53 (21, 22). Указанные выше работы проведены, в основном, на клетках A-549, инфицированных вирусом гриппа с очень высокой множественностью инфекции (МОИ). В наших опытах при дозе заражения вирусом 100, МОИ соответствовала 0,001, а при 1 дозе заражения МОИ=0,00001. При МОИ 0,001 нами наблюдалось проявление вирусной инфекции в виде апоптоза, цитолиза, ЦПД, но при очень низких дозах заражения (МОИ 0,00001) происходила стимуляция пролиферации клеток как лимфобластоидных, с последующим увеличением апоптоза (17), так и некоторых монослойных клеточных линий ECV-304, T-98 (15), а также, как показано в настоящей работе, под воздействием только некоторых подтипов вируса гриппа А (H1N1pdm и H2N2), в клетках A-549. По нашим данным усиление пролиферации в клетках ECV-304 и A-549 сопровождалось усилением экспрессии ФНО, уровень которой был намного выше, чем при более высокой дозе заражения клеток вирусом.

Исследуемые нами противовирусные препараты (триазавирин, ремантадин, рибавирин) оказывали одинаковое – ингибирующее - действие на стимулированную вирусом гриппа А пролиферацию клеток ECV-304 и A-549, тогда как ингавирин, являющийся иммуномодулятором, в наших опытах показал усиление пролиферации контрольных, незараженных вирусом клеток ECV-304 и A-549, как при заражении высокими, так и низкими дозами вируса гриппа. Апоптоз, индуцируемый вирусом гриппа А в клетках ECV-304 и A-549 только высокими дозами заражения, подавлялся исследуемыми препаратами (триазавирин, ремантадин, ингавирин), за исключением рибавирина, который повышал апоптоз в зараженных вирусом гриппа клетках (19).

Результаты, полученные нами при изучении экспрессии одного из важнейших провоспалительных цитокинов - фактора некроза опухоли, играющего также значительную роль в патогенезе гриппозной инфекции, оказались интересными и неоднозначными. Отмечены также значительные различия в биологической активности между пневмоцитами (A-549) и эндотелиоцитами (ECV-304): разная чувствительность к различным субтипам вируса гриппа А, а также активная экспрессия ФНО в клетках эндотелия в отсутствии вируса и еще более усиливающаяся в его присутствии, особенно при очень низких дозах вируса, и полное

отсутствие экспрессии ФНО в клетках А-549 без вируса и очень низкая экспрессия с вирусом. Наши результаты о различной биологической активности клеток разного происхождения только подтверждают данные, полученные другими авторами, свидетельствующие о низкой экспрессии ФНО в клетках А-549, зараженных вирусом гриппа, которая усиливалась после предобработки этих клеток ФНО или ИФН (23) и активной экспрессии этого цитокина в эпителиальных клетках легкого свиньи (24).

Полученные нами данные по влиянию противовирусных препаратов (триазавирин, ремантадин, рибавирин и ингавирин) на пролиферацию, апоптоз и индукцию ФНО в клетках, зараженных разными дозами вируса, не дают какого-либо определенного ответа о механизмах противовирусного действия этих препаратов. Повышение экспрессии ФНО в инфицированных вирусом гриппа клетках в присутствии триазавирин невозможно связать с ингибирующим действием препарата как на апоптоз, так и на усиленную пролиферацию вирус-инфицированных клеток. Так же как и снижение экспрессии ФНО в присутствии рибавирин, трудно согласовать с его влиянием на повышение апоптоза в зараженных вирусом клетках. В то же время, подавление экспрессии ФНО в клетках, зараженных вирусом в присутствии ингавирин, вполне согласуется с усилением их пролиферации и подавлением апоптоза (неопубликованные данные). Ингибирующее влияние ремантадин на апоптоз, индуцированный вирусом, вполне согласуется с понижением экспрессии ФНО, но не объясняет его ингибирующего действия на пролиферацию клеток.

Таким образом, изучение участия только одного ФНО в исследуемых нами процессах совершенно недостаточно. Полученные нами данные свидетельствуют, что для понимания механизмов взаимоотношения вируса гриппа А различных субтипов с клетками человека в разных условиях инфицирования, а также, действия противовирусных препаратов, необходимо вводить дополнительные критерии и клеточные тест-системы, в частности, изучение экспрессии и продукции интерферона, в дополнение к традиционным методам *in vitro* определения подавления ЦПД вируса гриппа на клетках МДСК и *in vivo* на мышях. Используемые нами клетки эндотелия человека ECV-304 являются подходящей клеточной моделью для изучения экспрессии различных цитокинов в инфицированных вирусом гриппа клетках и определения их роли в механизме действия противовирусных препаратов.

Список литературы

1. **Ueda M., Yamate M., Du A., Daidoji T., Okuno Y., Ikita 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.
2. **Vester D., Rapp E., Gade D., Genzel Y., Reichl U.** Quantitative analysis of proteome alterations in human influenza A virus-infected mammalian cell lines. *Proteomics.* 2009, 9: 3316-3327.
3. **Zang C., Yang Y., Zhou X., Liu X., Song H., He Y., Huang P.** Highly pathogenic avian A virus H5N1 NS1 protein induces caspase-dependent apoptosis in human alveolar basal epithelial cells. *Virology.* 2010, 7: 51-57.
4. **Swayne D.** Understanding the complex pathobiology of high pathogenicity avian influenza viruses in birds. *Avian Dis.* 2007, 51(1 Suppl): 242-249.
5. **Yao L., Korteweg C., Hsueh W., Gu J.** Avian influenza receptor expression in H5N1-infected and noninfected human tissues. *FASEB J.* 2008, 22 (3): 733-740.
6. **Visseren F., Verkerk M., Bouter K., Diepersloot R., Erkelens D.** Interleukin-6 production by endothelial cells after infection with influenza virus and cytomegalovirus. *J Lab Clin Med.* 1999, 134 (6): 623-630.
7. **Visseren F., Bouwman J., Bouter K., Diepersloot R., de Groot P., Erkelens D.** Procoagulant activity of endothelial cells after infection with respiratory viruses. *Thromb Haemost.* 2000, 84 (2): 319-324.
8. **Ishiguro N., Takada A., Yoshioka M., Ma X., Kikuta H., Kobayashi K.** Induction of interferon-inducible protein-10 and monokine induced by interferon-gamma from human endothelial cells infected with influenza A virus. *Arch Virol.* 2004; 149(1): 17-34.
9. **Sumikoshi M., Hashimoto K., Kawasaki Y., Sakuma H., Suzutani T., Suzuki H., Hosoya M.** Human influenza virus infection and apoptosis induction in human vascular endothelial cells. *L. Med Virol.* 2008, 80 (6): 1072-1078.
10. **Склянкина Н.Н., Болдырева Н.В., Щегловитова О.Н.** Различия в функциональной активности культивируемых клеток эндотелия кровеносных сосудов человека, полученных от разных доноров. *Цитология.* 2011, 53 (4): 341-346.
11. **Takahashi K., Sawasaki Y., Hata J., Mukai K., Goto T.** Spontaneous transformation and immortalization of human endothelial cells. *In vitro Cell Develop.* 1990, 26: 265-274.
12. **Functional characterization of spontaneously transformed human umbilical vein endothelial cell line ECV-304: use in an in vitro model of angiogenesis.** *Exp Cell Res.* 1996, 225: 171-185.
13. **Гильяно Н.Я., Семенова Е.Г., Федорцева Р.Ф., Коневега Л.В.** Характеристика спонтанно трансформированной эндотелиальной клеточной линии человека ECV304. *Цитология.* 2008, 50 (7): 576-584.
14. **Ярцева Н.М., Федорцева Р.Ф.** Характеристика спонтанно трансформированной эндотелиальной клеточной линии человека ECV304. *Цитология.* 2008, 50 (7): 568-575.
15. **Смирнова Т.Д., Даниленко Д.М., Гудкова Т.М., Писарева М.М., Кадырова Р.А., Слита А.М.** Влияние различных инфицирующих доз вирусов гриппа А на пролиферацию перевиваемых клеток человека. *Клеточные культуры. Информационный бюллетень.* 2011, 27: 3-12.
16. **Kido H., Okumuro Y., Takahashi E., Pan H-Y., Wang S., Yao D., Yao M., Chida J., Yano M.** Role of host cellular proteases in the pathogenesis of influenza and influenza-induced multiple organ failure. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2012, 1824: 186-194.
17. **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 противовирусных препаратов. Клеточные культуры. Информационный бюллетень. 2009, 24: 25-34.

18. 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 человека. Вопросы вирусологии .2011, 56 (6): 14-19.

19. Даниленко Д.М., Смирнова Т.Д., Еропкин М.Ю., Деева Э.Г., Киселев О.И. Изучение влияния ремантадина, рибавирина и триазавирина на репродукцию вирусов гриппа А в монослойных и лимфобластоидных клеточных линиях человеческого происхождения. Вопросы вирусологии .2012 (в печати).

20. He Y., Xu K., Keiner B., Zhou J., Czudai V., Li T., Chen Z., Liu J., Klenk H-D., Shu Y., Sun B. Influenza A virus replication induces cell cycle arrest in G₀/G₁ phase. J. Virol. 2010, 84 (24): 12832-12840.

21. Turpin E., Luke K., Jones J., Tumpey T., Konan K., Schultz-Cherry S. Influenza virus infection increases p53 activity: role of p53 in cell death and viral replication. J. Virol. 2005, 79(14): 8802-8811.

22. Rivas C., Aaronson S., Munoz-Fontela C. Dual role of p53 in innate antiviral immunity. Viruses. 2010, 2 : 298-313.

23. Veckman V., Osterland P., Fagerland R., Melen K., Matikainen S., Julkinen I. TNF- α and IFN- α enhance influenza-A-virus-induced chemokine gene expression in human A-549 lung epithelial cells. Virillogy. 2006, 345: 96-104.

24. Seo S., Webster R. Tumor necrosis factor alpha exerts powerful anti-influenza virus effects in lung epithelial cells. J.Virol.2002, 76(3): 1071-1076.