

**Санкт-Петербургский политехнический университет
Петра Великого
Институт биомедицинских систем и технологий**

На правах рукописи

Смирнова Светлана Сергеевна

**Разработка клеточной модели для изучения дисфункции клеток
эндотелия человека под воздействием вируса гриппа и бактериального
LPS и ее применение для оценки активности препаратов**

Направление подготовки 06.06.01 Биологические науки

Код и наименование

Направленность 06.06.01_02 Биофизика

Код и наименование

НАУЧНЫЙ ДОКЛАД

об основных результатах научно-квалификационной работы
(диссертации)

Автор работы: Смирнова С.С.
Научный руководитель: профессор,
д.б.н., Воробьев К.В.

Санкт Петербург – 2019

Научно-квалификационная работа выполнена на кафедре «Медицинская физика» Института биомедицинских систем и технологий федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого»

Директор института/
Зав. кафедрой:

– *Власова Ольга Леонардовна,*
д.ф.-м.н, доцент

Научный руководитель:

– *Воробьев Константин*
Владимирович,
д.б.н., профессор кафедры
«Медицинская физика»

Рецензент:

– *Вартанян Наталья Левоновна,*
к.б.н., с.н.с. лаборатории
гибридной технологии ФГБУ
"Российский научный центр
радиологии и хирургических
технологий им. академика
А.М.Гранова" Минздрава России

С научным докладом можно ознакомиться в библиотеке ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого» и на сайте Электронной библиотеки СПбПУ по адресу: <http://elib.spbstu.ru>

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Вирус гриппа инфицирует клетки эпителия верхних и нижних дыхательных путей, что приводит к их повреждению, апоптозу и десквамации. Патологическое состояние при гриппе зачастую осложняется наложением вторичной бактериальной инфекции. Вирус гриппа типа А и вторичная бактериальная инфекция способны вызывать не только острое заболевание, но и могут быть причиной отдаленных последствий в виде сердечно-сосудистых осложнений или фиброза различных органов [1, 2, 3]. Вирус гриппа и бактериальный липополисахарид (LPS – компонент клеточной стенки грамотрицательных бактерий) вызывают дисфункцию сосудистого эндотелия [1, 3]. Клетки эндотелия являются непермиссивными для вирусов гриппа человеческого происхождения, но играют значительную роль в патогенезе гриппозной инфекции, являясь наиболее важным источником цитокинов в легких и регулируя проницаемость альвеолярно-капиллярного барьера [4]. В большинстве *in vitro* исследований оценивают репродукцию вируса гриппа и изменение состояния клеток при их инфицировании высокими дозами вируса и, как правило, в ранние сроки после заражения, что моделирует острую вирусную инфекцию. Но практически нет данных об изменениях, происходящих в клетках при их заражении очень низкими дозами вируса гриппа А, а также при более продолжительном культивировании и воздействии LPS совместно с вирусом гриппа, что может моделировать хроническую вирусную инфекцию и связанные с ней отдаленные осложнения. Эти неизученные аспекты и вошли в задачи данной работы.

Высокий уровень мутаций многих сегментов РНК вируса гриппа А приводит к возникновению новых вариантов вируса, позволяющих ему ускользать от иммунитета, а также является причиной появления резистентности к противовирусным препаратам. В этой связи существует острая потребность в разработке новой стратегии противовирусной терапии с использованием мишеней как вирусного, так и клеточного происхождения.

Необходимо также расширять и панель методов тестирования препаратов, поскольку исследование активности препаратов преимущественно ограничивается краткосрочными тестами на специфическую активность и токсичность, тогда как неспецифическая активность, механизм действия и отдаленные последствия воздействия препаратов зачастую остаются неизученными.

Поэтому разработка клеточной модели для изучения процессов, происходящих в инфицированных клетках легочного эндотелия и приводящих к развитию отдаленных патологических состояний, является актуальной задачей и имеет не только теоретический интерес, но и практическую значимость, поскольку позволяет оценить на данной клеточной модели биологическую активность препаратов различной направленности.

Цель и задачи исследования. Цель исследования заключается в разработке клеточной модели на основе клеток эндотелия человека ECV-304 для изучения дисфункции клеток под воздействием вируса гриппа А и (или) LPS и в ее применении для оценки способности препаратов нормализовать состояние клеток.

Для достижения указанной цели были поставлены и решены следующие задачи:

1. Разработка методики проведения на клетках эндотелия ECV-304 экспериментов, моделирующих острую и хроническую вирусную инфекцию: подбор условий культивирования клеток в течение короткого и длительного периода времени после заражения различными инфицирующими дозами (ИД) вируса гриппа А и после воздействия бактериального LPS.
2. Математическое моделирование пролиферативной активности клеток в ранние сроки после инфицирования вирусом гриппа.
3. Определение особенностей репродукции вируса гриппа А в клеточной линии ECV-304 при различной степени инфицированности клеток.

4. Оценка изменения функциональной активности клеток эндотелия под воздействием вируса гриппа и (или) бактериального LPS: а) оценка пролиферативной активности; б) уровня апоптоза; в) продукции оксида азота (NO) клетками; г) миграционной активности; д) экспрессии мРНК генов ряда цитокинов, ферментов и других белков в клетках.
5. Применение разработанной клеточной модели для дополнительной характеристики биологической активности ряда фармакологических препаратов.

Научная новизна. Научная новизна выпускной квалификационной работы определяется тем, что в ней представлены результаты, полученные на разработанной автором работы методике проведения экспериментов, моделирующих *in vitro* острую и хроническую вирусную инфекцию. Показано снижение формирования полноценных вирусных частиц и постепенное снижение экспрессии вирусных РНК в клетках эндотелия ECV-304 в течение нескольких пассажей после инфицирования. Впервые *in vitro* комплексно исследовано влияние гриппозной инфекции, бактериального LPS и их сочетанного воздействия на различные параметры функционального состояния клеток эндотелиального происхождения: пролиферативную и миграционную активность, уровень апоптоза, продукцию NO и экспрессию мРНК генов ряда цитокинов и других клеточных белков. Впервые показано, что функциональные изменения в клетках эндотелия после заражения вирусом гриппа и (или) воздействия LPS происходят в два этапа и могут развиваться в разных направлениях, в зависимости от воздействующего фактора (вирус или LPS). На основе экспериментальных данных впервые проведено математическое моделирование пролиферации инфицированных вирусом клеток. На разработанной клеточной модели проведена оценка способности ряда препаратов, обладающих противовирусной, антиоксидантной, противовоспалительной и ангиопротекторной активностью, нормализовать функциональное состояние клеток эндотелия,

измененное воздействием вируса гриппа и (или) LPS, и тем самым препятствовать развитию отдаленных осложнений гриппозной инфекции.

Теоретическая и практическая значимость. Полученные результаты позволяют более глубоко понять механизм развития дисфункции клеток эндотелия при инфекции вирусом гриппа и воздействии бактериального LPS. Разработанная клеточная модель позволяет наблюдать переход от острой вирусной инфекции (первые несколько суток после заражения клеток высокими дозами вируса) к хронической (пассажи после заражения клеток низкой или высокой дозами вируса и (или) воздействия LPS) и исследовать возможные отдаленные последствия гриппозной инфекции. Данная клеточная модель пригодна для практического применения: для оценки способности препаратов различной направленности восстанавливать нормальное состояние клеток эндотелия. Что позволит получить дополнительные данные для обоснования целесообразности применения данных препаратов и подбора наиболее эффективных препаратов для комплексной терапии неосложненной гриппозной инфекции и гриппа, осложненного вторичной бактериальной инфекцией.

Апробация работы. Результаты исследования докладывались на научной конференции с международным участием Неделя науки СПбПУ (Санкт-Петербург, 2014) и на Научно-практической конференции-биеннале «Грипп: вирусология, эпидемиология, профилактика и лечение» (Санкт-Петербург, 2016).

Публикации. По результатам научно-квалификационной работы опубликовано 11 научных работ, в том числе 5 статей в изданиях, входящих в перечень ВАК (из них 3 напечатаны также в англоязычной версии журнала), 2 статьи в изданиях, не вошедших в перечень ВАК, а также 4 работы в сборниках по материалам конференций.

Представление научного доклада: основные положения

В результате исследования были сформулированы следующие основные положения:

1. Ответ клеток эндотелия человека ECV-304 на инфицирование вирусом гриппа зависит от многих факторов, в частности, от времени инкубации и степени инфицированности клеток вирусом – множественности инфекции (multiplicity of infection – MOI).
2. Для математического моделирования пролиферации клеток в ранние сроки после инфицирования разными дозами вирусов гриппа подходит линейная модель со смешанными эффектами.
3. В клетках эндотелия ECV-304 происходит снижение формирования полноценных вирусных частиц и постепенное снижение экспрессии вирусных РНК в течение 3-х пассажей после инфицирования.
4. Функциональные изменения в клетках эндотелия после заражения вирусом гриппа и (или) воздействия LPS происходят в два этапа: изменения на 1-м этапе (на 1-м пассаже) моделируют острую вирусную инфекцию, а на 2-м этапе (при последующем длительном культивировании) – хроническую инфекцию и развитие отдаленных осложнений.
5. На 1-м пассаже при инфицировании клеток ECV-304 обнаружен обратный дозозависимый эффект от воздействия вируса гриппа на пролиферацию клеток: подавление пролиферации при высокой дозе вируса и стимуляция пролиферации при низких дозах. Тогда как апоптоз клеток индуцируется вирусом в прямой дозовой зависимости.
6. При дальнейшем длительном культивировании показано, что клетки, однократно инфицированные низкой дозой вируса, сохраняют в течение всего времени наблюдения повышенную пролиферативную активность, а клетки, изначально зараженные высокой дозой вируса, также приобретают повышенную пролиферативную активность. При

этом уровень апоптоза клеток снижается до уровня апоптоза в контрольных (интактных) клетках.

7. Воздействие LPS вносит дополнительный вклад в изменение состояния инфицированных вирусом клеток: на 1-м этапе LPS стимулирует пролиферацию клеток, но чуть менее выражено, чем низкая доза вируса, тогда как на 2-м этапе, начиная с 5-го пассажа, отмечено ингибирование клеточной пролиферации.
8. Вирус гриппа в прямой дозовой зависимости стимулирует продукцию NO в 1 сутки после инфицирования клеток, при этом продукция NO постепенно снижается и к 5 суткам становится ниже контроля. При добавлении LPS к инфицированным и неинфицированным клеткам данная зависимость сохраняется.
9. Воздействие вируса гриппа и (или) LPS изменяет миграционную активность клеток эндотелия, причем изменения обнаруживаются в течение длительного времени после воздействия.
10. Воздействие вируса гриппа и (или) LPS значительно изменяет профиль экспрессии мРНК генов цитокинов ($\text{TNF}\alpha$, $\text{TGF}\beta$, $\text{IFN-}\gamma$) и других клеточных белков: MMP-9, NF- κ B, RhoA и NO-синтаз (eNOS, iNOS).
11. Обнаружена способность нормализации пролиферативной активности и апоптоза клеток у большой группы препаратов различного происхождения и терапевтической направленности, в том числе у ремантадина, алпизарина, восстановленного глутатиона, ресвератрола, мелатонина, тимохинона и других.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В работе исследовано изменение функционального состояния клеток эндотелия человека ECV-304 при инфицировании клеток различными дозами вируса гриппа и под воздействием бактериального LPS. Культивирование инфицированных клеток в течение короткого периода времени (1-й пассаж) моделирует острую вирусную инфекцию, тогда как длительное культивирование инфицированных клеток моделирует хроническую инфекцию и развитие отдаленных осложнений. Изменение функционального состояния (дисфункцию) клеток эндотелия оценивали по следующим параметрам: пролиферативная и миграционная активность, уровень апоптоза, продукция NO и экспрессия мРНК генов ряда цитокинов и других клеточных белков. Показано, что функциональные изменения в клетках эндотелия после заражения вирусом гриппа и (или) воздействия LPS происходят в два этапа и могут развиваться в разных направлениях, в зависимости от воздействующего фактора (вирус или LPS).

На разработанной клеточной модели проведена оценка способности ряда препаратов нормализовать функциональное состояние клеток эндотелия, измененное воздействием вируса гриппа и (или) бактериального LPS. Эти сведения могут быть полезны для обоснования целесообразности применения данных препаратов и подбора наиболее эффективных препаратов для комплексной терапии гриппозной инфекции и предотвращения развития постгриппозных осложнений.

Объекты, (предмет) и методы исследования

Объектом исследования выпускной квалификационной работы аспиранта являются перевиваемые клетки эндотелия человека ECV-304.

Предметом исследования выпускной квалификационной работы являются показатели функционального состояния клеток эндотелия, такие как пролиферативная и миграционная активность, уровень апоптоза, продукции NO и экспрессии мРНК генов ряда клеточных белков в условиях

инфицирования клеток разными дозами вируса гриппа и (или) под воздействием LPS.

В ходе работы над выпускной квалификационной работой применялись следующие **методы**: культивирование перевиваемых культур клеток; вирусологические методы (титрование вирусов гриппа на клетках почки собаки MDCK, реакция гемагглютинации, оптимизированная методика заражения клеток вирусом гриппа и дальнейшего культивирования инфицированных клеток); микроскопические методы (световая микроскопия для учета пролиферации клеток: подсчет не окрашенных трипановым синим клеток в камере Фукса-Розенталя; флуоресцентная микроскопия для подсчета апоптотических ядер клеток, окрашенных флуоресцентным красителем Hoechst-33258); биохимические методы с детекцией продукта методом абсорбционной спектрофотометрии (определение продукции NO с помощью реагента Грисса, определение токсичности препаратов в МТТ-тесте); методы молекулярной биологии (выделение РНК, постановка ПЦР с детекцией в режиме реального времени); метод застывания раны (scratch-test) для оценки миграционной активности; методы статистической обработки результатов.

Результаты и их обсуждение

Определение факторов, влияющих на ответ клеток эндотелия на инфицирование вирусом гриппа. При заражении клеток эндотелия человека ECV-304 разными ИД вируса гриппа А/Санкт-Петербург/05/09 (H1N1pdm) был обнаружен обратный дозозависимый эффект от воздействия вируса на пролиферацию клеток, тогда как апоптоз клеток индуцировался в прямой дозовой зависимости. Степень выраженности эффекта зависела также от времени учета опыта: 1 – 5 сутки (рис. 1). Результаты оценки пролиферативной активности клеток выражали в долях от контроля (где за 100 % принимали количество выросших клеток в контрольных образцах, не подвергавшихся воздействию вируса гриппа). Результаты оценки апоптоза клеток выражали в виде индекса апоптоза (ИА): $ИА = (b/c) \times 100 \%$, где b –

количество апоптотических клеток, s – общее количество просмотренных клеток в данном образце. Минимальная доза заражения (1 ИД) соответствует последнему десятикратному разведению вируса (предварительно титруемого на клетках почки собаки MDCK), вызывающему поражение 50% монослоя клеток MDCK. Статистический анализ для сравнения двух групп непараметрических выборок был выполнен с использованием теста U–Манна-Уитни, значимыми считали различия при $p < 0.05$.

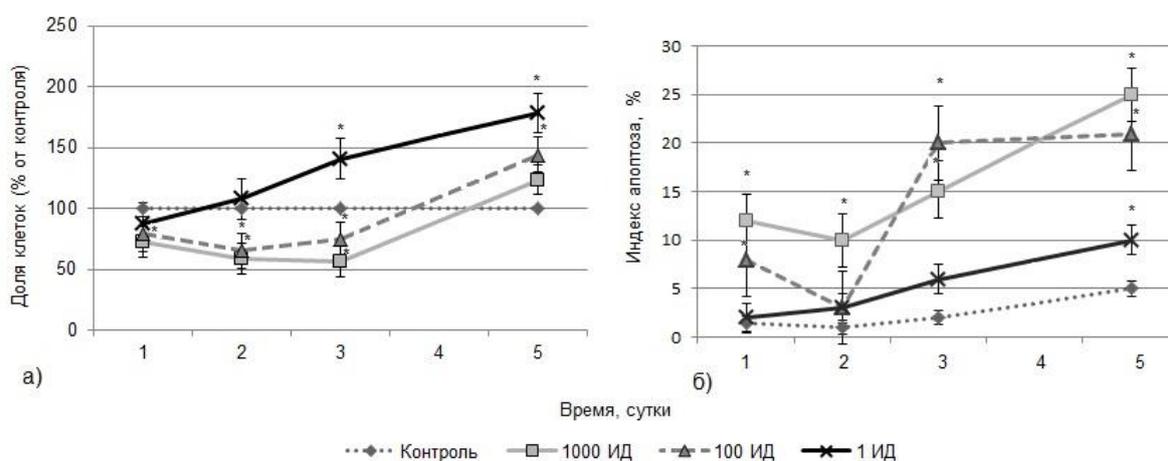


Рис. 1. а) Динамика пролиферации и б) индукции апоптоза клеток ECV-304, зараженных разными дозами вируса гриппа А/Санкт-Петербург/05/09 (H1N1pdm) (Здесь и далее ИД – инфицирующая доза, * – отличие от контроля, $p < 0.05$).

Далее была проведена серия экспериментов для оценки влияния происхождения (субтипа, штамма, условий наработки) вируса гриппа на пролиферативную активность клеток. Результаты показали, что эффект стимуляции пролиферации клеток при их инфицировании низкой дозой (1 ИД) вируса характерен для вирусов разных штаммов, субтипов и условий вирусной наработки (на куриных эмбрионах – аллантоисный вирус или в культуре клеток MDCK – культуральный вирус) (таблица). Различия наблюдались лишь в степени выраженности эффекта стимуляции пролиферации.

Таблица. Анализ пролиферативной активности клеток ECV-304 под воздействием разных штаммов вирусов гриппа А при низкой дозе заражения (1 ИД). Учет на 3 сутки; ал – аллантаисный вирус, ^{культ} – культуральный вирус.

Субтип вируса	H3N2			H1N1pdm		H2N2
Штамм вируса	Брисбен/10/07 ^{ал}	Перт/16/11 ^{ал}	Астрахань/06/12 ^{культ}	Санкт-Петербург г/05/09 ^{ал}	Санкт-Петербург г/06/14 ^{ал}	Сингапур/01/57 ^{ал}
Доля клеток, % от контроля	182.6±10.3*	149.4±7.8*	203.4±14.2*	152.7±9.3*	155.9±8.4*	124,9±4.6*

Математическое моделирование пролиферативной активности инфицированных вирусом гриппа клеток выполнено с использованием языка программирования для статистической обработки R. Моделирование проводили для оценки пролиферации клеток в ранние сроки (1 – 5 сутки) после заражения вирусом гриппа. При моделировании учитывали такие переменные, как: время в днях (t); исходная посевная концентрация клеток (ИПКК, варьирующая от 50 тыс. до 250 тыс. клеток на лунку); доза заражения вирусом, представленная в виде множественности инфекции (МОИ), где $МОИ = ИД / ИПКК$; штамм вируса гриппа. Пролиферативную активность клеток при моделировании выражали в виде индекса пролиферации (ИП): $ИП = (КВК / ИПКК) \times 100 \%$, где КВК – количество выросших клеток на определенном сроке культивирования. Для улучшения восприятия разбили данные на группы по МОИ, назвав новую переменную МОИ-2: 1. Контроль (МОИ = 0), 2. $0 < МОИ \leq 0.0001$ (низкие дозы), 3. $0.0001 < МОИ \leq 0.01$ (средние дозы) и 4. $0.01 < МОИ \leq 1$ (высокие дозы). Поскольку наши данные не описываются нормальным распределением, провели логарифмирование переменных ИП и ИПКК.

В результате пригодную модель удалось получить при использовании линейной модели со смешанными эффектами (пакет lme4 в R), поскольку мы имеем большие различия между экспериментами (exp). Случайный эффект, добавленный в модель (t | exp), отражает в целом варьирование пролиферации клеток от эксперимента к эксперименту. Анализ показал, что

статистическую значимость ($p < 0.001$) для нашей модели имеют параметры время инкубации (t), множественность инфекции (различия по всем группам MOI-2 достоверно отличаются от контрольной группы, причем в группах с низкой и средней дозой заражения наблюдается усиление пролиферации (коэффициенты 0.072 и 0.056 соответственно), а в группе с высокой дозой вируса – подавление пролиферации (коэффициент -0.069)), а также совместный эффект времени инкубации и ИПКК ($t:\log_{10}(\text{ИПКК})$), отражающий скорость роста клеток (причем увеличение ИПКК отрицательно сказывается на пролиферации клеток) (рис. 2). Сравнение экспериментальных данных с предсказанными моделью значениями выявило их высокую корреляцию (коэффициент корреляции Спирмена составил 0.845, $p < 0.001$), что свидетельствует об адекватности полученной модели.

```

Linear mixed model fit by REML. t-tests use Satterthwaite's method
['lmerModLmerTest']
Formula: log10(ИП) ~ t + MOI-2 + t :log10(ИПКК) + (t | exp)
Data: res

REML criterion at convergence: -1639.4

Scaled residuals:
  Min       1Q   Median       3Q      Max
-6.4782 -0.6110  0.0368  0.5833  3.1305

Random effects:
 Groups   Name                Variance Std.Dev. Corr
 exp      (Intercept)          0.0010505 0.03241
          t                  0.0004532 0.02129  0.56
 Residual                    0.0073077 0.08548
Number of obs: 840, groups: exp, 15

Fixed effects:
              Estimate Std. Error      df t value Pr(>|t|)
(Intercept)  1.984284    0.011274 21.634306 176.009 < 2e-16 ***
t             0.850884    0.036508 688.767063  23.307 < 2e-16 ***
MOI-2<=0.0001 0.072072    0.008547 806.857441   8.433 < 2e-16 ***
MOI-2<=0.01  0.055820    0.008456 808.866572   6.601 7.36e-11 ***
MOI-2<=1     -0.068531    0.008749 807.374025  -7.833 1.50e-14 ***
t:log10(ИПКК) -0.157073    0.007187 766.139935 -21.855 < 2e-16 ***
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

```

Рис. 2. Результаты моделирования в R пролиферации инфицированных вирусом гриппа клеток ECV-304. Использована линейная модель со смешанными эффектами.

Изучение репродукции вируса гриппа А в клетках ECV-304 с применением разных вирусологических и иммунологических методов показало низкую чувствительность этих клеток к цитопатическому действию

вируса гриппа А, что подтверждалось как снижением синтеза полноценных вирусных частиц (данные не показаны), так и постепенным снижением экспрессии вирусных РНК в течение нескольких пассажей (рис. 3).

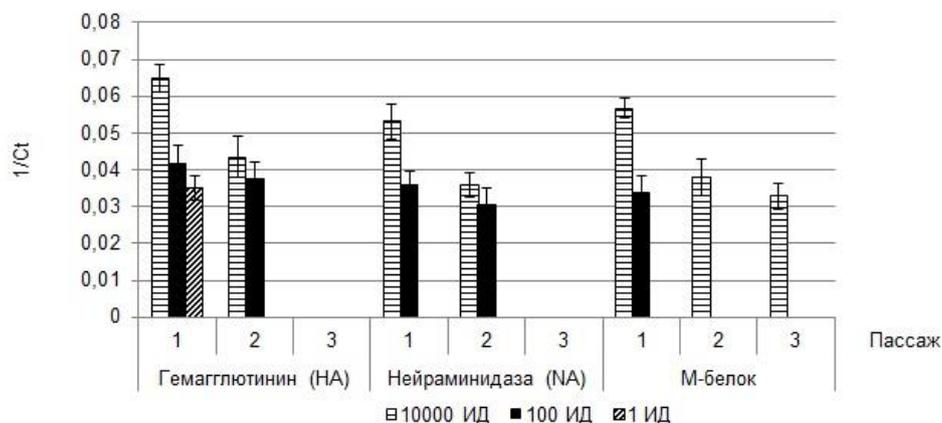


Рис. 3. Экспрессия РНК вирусных белков в инфицированных вирусом гриппа клетках ECV-304 по результатам ПЦР в реальном времени; Ct – значение порогового цикла обнаружения продукта реакции в анализируемом образце.

Оценка изменения пролиферативной активности клеток эндотелия.

При длительном культивировании однократно инфицированных вирусом гриппа клеток учет опыта проводили на 4 – 5 сутки, когда наблюдался наиболее выраженный эффект. В результате обнаружено, что клетки ECV-304, инфицированные 1 ИД вируса, стабильно сохраняют повышенную пролиферативную активность в течение всего времени наблюдения (до 10 пассажей). В клетках, зараженных высокой дозой (1000 ИД) вируса, также наблюдали усиление пролиферации, но позже (со 2-го пассажа) и на более низком уровне. Причиной этого может быть снижение вирусной нагрузки на клетки вследствие неполноценной репродукции вируса гриппа в непермиссивных клетках эндотелия.

Воздействие на клетки LPS *E. coli* или LPS совместно с вирусом гриппа тоже стимулировало клеточную пролиферацию, но при культивировании более 4-х пассажей пролиферативная активность клеток, находящихся под воздействием LPS, значительно снижалась (рис. 4).

Оценка изменения уровня апоптоза клеток эндотелия. Обнаружено, что вирус гриппа в прямой дозовой зависимости индуцирует апоптоз клеток

ECV-304 в ранние сроки после заражения (начиная с 1-х суток), индукция апоптоза достигает максимума на 2 пассаже, а затем происходит резкий спад апоптотической гибели клеток. При дальнейшем культивировании уровень апоптоза во всех исследуемых образцах клеток был низким и не превышал уровня апоптоза в образцах контрольных (интактных) клеток (рис. 5). Высокий уровень апоптоза в клетках ECV-304 на первом этапе, по всей вероятности, способствует отбору клеток с повышенным пролиферативным потенциалом, но устойчивых к апоптозу, появление которых наблюдается при дальнейшем культивировании (начиная с 3-го пассажа). Можно сказать, что происходит образование новых сублиний клеток с их изменением в сторону повышенного ангиогенеза.

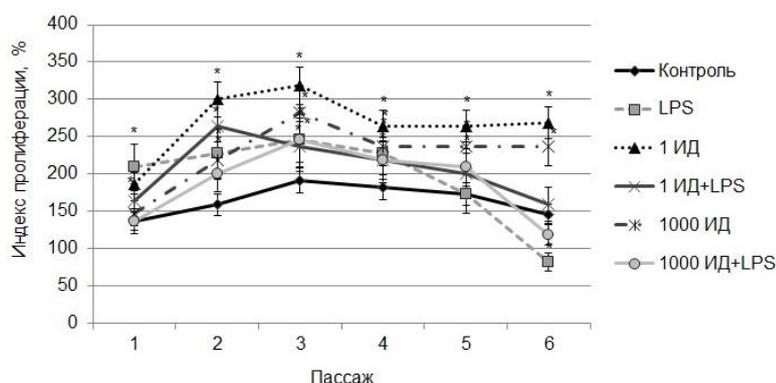


Рис. 4. Динамика пролиферации на протяжении 6 пассажей клеток ECV-304, однократно зараженных разными ИД вируса гриппа А/Санкт-Петербург/05/09 (H1N1pdm) и (или) под воздействием LPS *E. coli* (100 нг/мл).

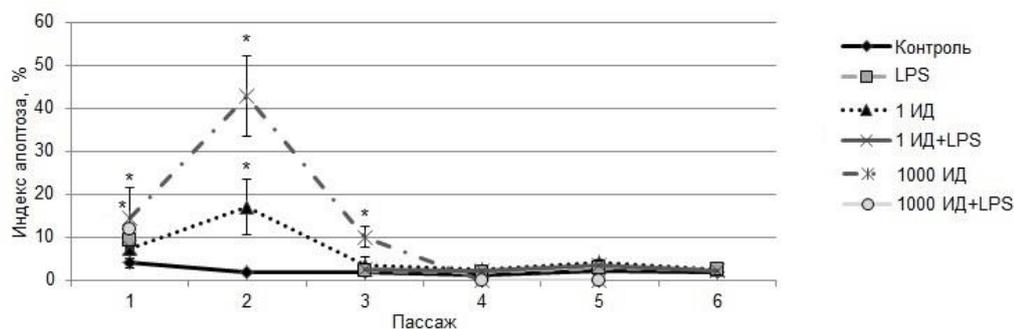


Рис. 5. Изменение уровня апоптоза клеток ECV-304 на протяжении 6 пассажей, однократно зараженных разными ИД вируса гриппа и (или) под воздействием LPS *E. coli* (100 нг/мл).

Определение продукции NO. В культуральной жидкости обнаружено повышение продукции NO как при раздельном воздействии LPS или вируса гриппа, так и при их совместном воздействии на клетки ECV-304. Максимум продукции NO наблюдался в 1-е сутки, к 3-м суткам уровень NO снижался, но оставался выше контроля, а к 5-м суткам уровень NO был уже ниже контроля (рис. 6). Вирус гриппа стимулировал продукцию NO в прямой зависимости от ИД, причем при добавлении к вирусу LPS данная зависимость сохранялась. Поскольку продукция NO к 5-м суткам падала ниже контроля, данный тест посчитали нецелесообразным проводить при дальнейшем длительном культивировании клеток.

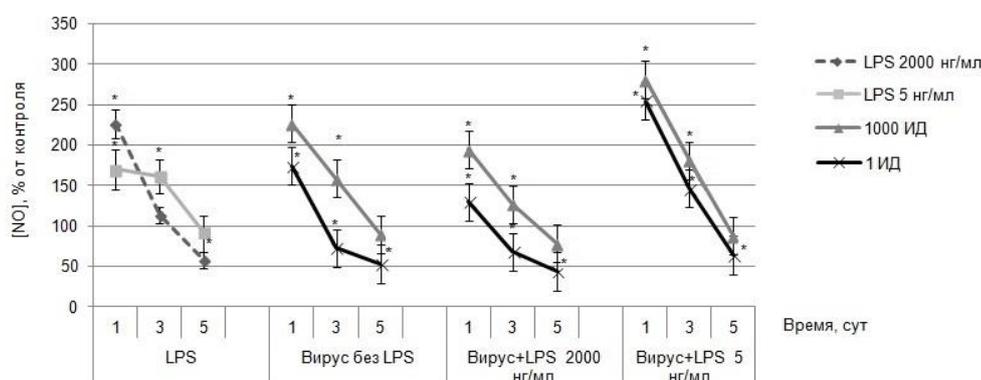


Рис. 6. Влияние вируса гриппа А/Санкт-Петербург/05/09 (H1N1pdm) и LPS *E. coli* на продукцию оксида азота NO в клетках ECV-304.

Определение миграционной активности клеток эндотелия было проведено на клетках с измененной вирусом и (или) LPS пролиферативной активностью, находящихся на 3 – 6 пассажах после воздействия. Проводили широко используемый тест на застывание раны (Scratch-test) в течение 24 ч после ее нанесения. Как известно, в первые 4 – 6 ч после разрушения монослоя клеток застывание раны происходит преимущественно за счет миграции клеток в область раны, после 8 ч уже больший вклад вносит пролиферация клеток. В результате было обнаружено, что в течение 4 – 8 ч наиболее активно мигрируют клетки, подвергавшиеся заражению низкой дозой вируса, и клетки под воздействием LPS. Миграция клеток, зараженных высокой дозой вируса, была подавлена. При этом при совместном

воздействии LPS и вируса, как в высокой, так и низкой дозах, миграция клеток наблюдалась преимущественно на уровне контроля (рис. 7). Интересно, что эти результаты коррелируют с данными по пролиферации клеток на 1-м пассаже. Таким образом, даже в отдаленные сроки после воздействия вируса и (или) LPS клетки эндотелия обладают измененной миграционной активностью, коррелирующей с изначальным (на 1-м пассаже) воздействием агентов на пролиферацию клеток.

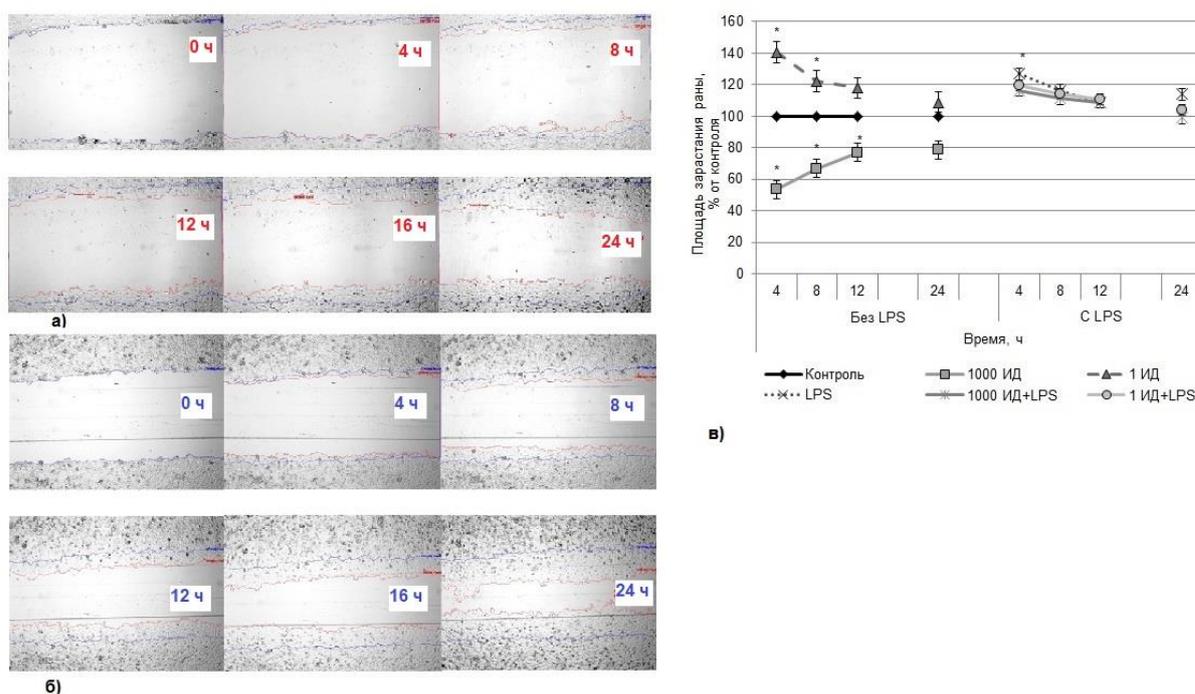


Рис. 7. Миграционная активность клеток ECV-304 на 6-м пассаже после однократного воздействия на 1-м пассаже вируса гриппа А/Брисбен/10/07 (H3N2) и (или) 100 нг/мл LPS *E. coli*; обработка исходных данных в а) контроле и б) в образце после 1 ИДВ вируса; в) конечный результат в виде площади застывания раны, выраженной в процентах от контроля.

Определение экспрессии мРНК клеточных белков. В ранние сроки после инфицирования клеток (1 – 5 сутки) было показано, что вирус гриппа и LPS могут влиять на экспрессию генов цитокинов и других клеточных факторов. При заражении клеток эндотелия вирусом гриппа А в присутствии LPS наблюдалось значительное усиление экспрессии ряда генов и замена экспрессии одних генов на экспрессию других генов. Экспрессия гена *MMP-9*, ингибируемая при раздельном воздействии вируса и LPS, значительно

повышается в первые сутки при одновременном добавлении вируса и LPS так же, как и активность гена *IFN-γ*. Ген *TNFα* наиболее активен в течение 1–3 суток, тогда как экспрессия генов других факторов (*TGFβ*, *eNOS*, *iNOS*, *NF-κB* и *Rho A*) значительно усиливалась на 5-е сутки, как и в случае воздействия одного LPS (рис. 8). Таким образом, под воздействием вируса гриппа А и (или) LPS происходит изменение состояния клеток эндотелия за счет изменения профиля экспрессии генов. Активность генов *TNFα*, *MMP-9* и *IFN-γ* (больше связанных с изменением проницаемости клеток, чем с изменением пролиферации), более выраженная в 1 – 3 сутки, сменялась при последующем культивировании активностью генов *TGFβ*, *RhoA*, *NF-κB*, *eNOS* и *iNOS*, которые связаны как с повышением пролиферации, так и с изменением проницаемости клеток.

Применение клеточной модели для оценки активности препаратов.

Полученная клеточная модель была использована в дальнейшем для тестирования большого количества препаратов различного назначения: противовирусных, сердечно-сосудистых, антиоксидантных, антиангиогенных и противоопухолевых. В качестве параметров, по которым оценивалось влияние препаратов, были выбраны пролиферативная активность и уровень апоптоза клеток, поскольку учет данных параметров состояния клеток наиболее подходит для скрининговой методики и дает наиболее демонстративные данные. Предварительно была проведена оценка токсичности препаратов в МТТ-тесте, после чего в дальнейших исследованиях препараты использовались в нетоксичных концентрациях. В результате исследований выявлено, что препараты ремантадин, алпизарин, восстановленный глутатион, ресвератрол, карведилол, рутин, мелатонин и тимохинон способны подавлять повышенную пролиферацию и апоптоз в клетках эндотелия на 1 этапе, препятствуя отбору клеток с повышенной пролиферативной активностью, но с очень низким уровнем апоптоза, т.е. появлению клеток с новыми характеристиками (2 этап).

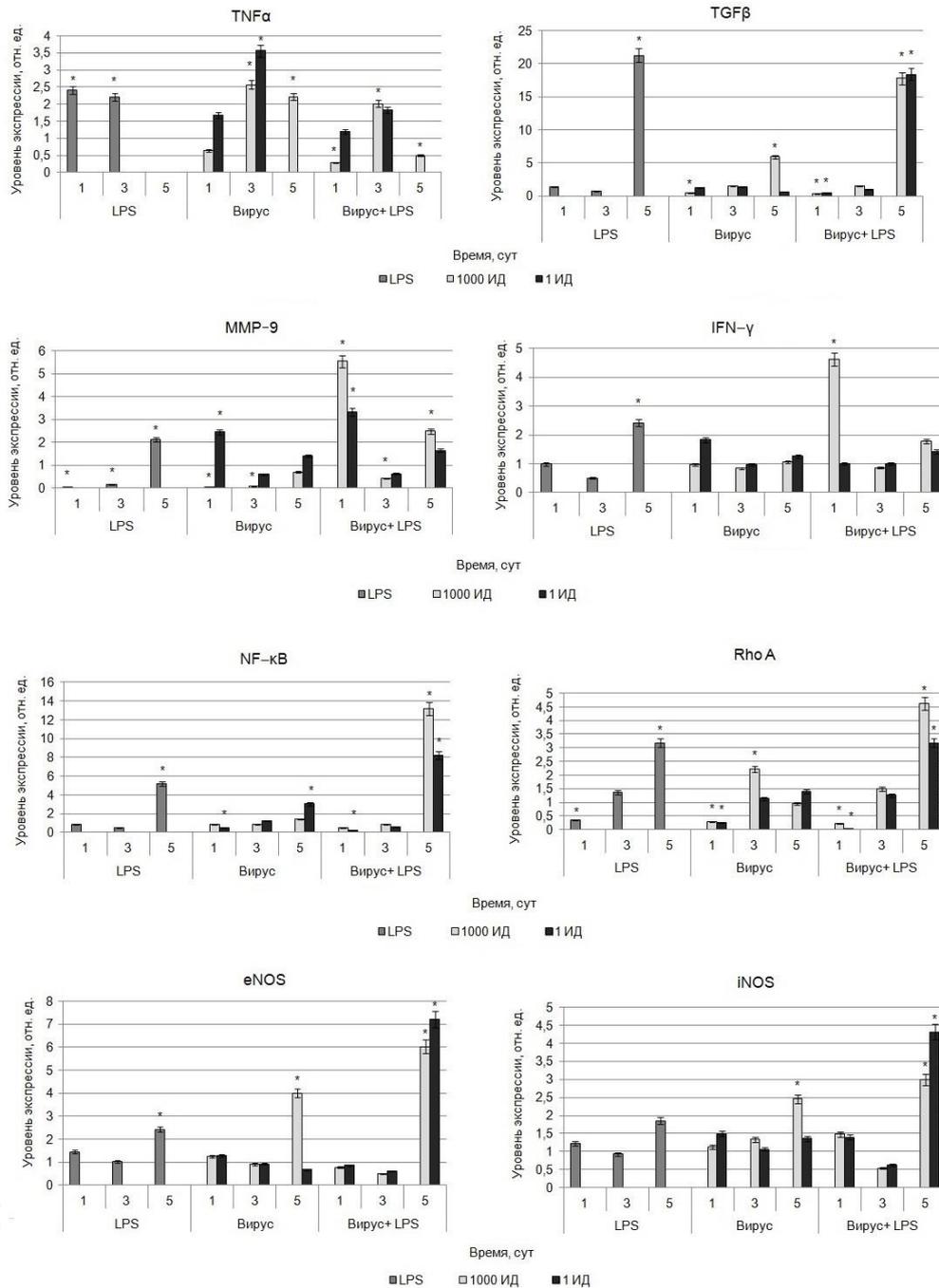


Рис. 8. Изменение экспрессии мРНК генов *TNFα*, *TGFβ*, *MMP-9*, *IFN-γ*, *NF-κB*, *RhoA*, *eNOS* и *iNOS* в клетках ECV-304 в течение 5 суток под воздействием вируса гриппа А/Перт/16/11 (H3N2) и (или) 100 нг/мл LPS *E. coli*. Контроль – клетки, культивируемые в среде без воздействий, контроль =1 по формуле $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

И эти же препараты ингибируют пролиферацию и повышают уровень апоптоза в клетках на 2 этапе, что свидетельствует об их антиангиогенной активности (рис. 9 – 10). Иными словами, данные препараты способны восстанавливать нормальное функционирование клеток. По всей видимости,

эти препараты способны препятствовать возникновению сердечно-сосудистых и других осложнений в процессе гриппозной инфекции.

Для более углубленного анализа активности препаратов проводилась оценка влияния препаратов ремантадина и алпизарина на миграционную активность клеток и экспрессию генов клеточных белков. В результате было показано, что данные препараты способны снижать повышенную экспрессию цитокинов $TNF\alpha$ и $TGF\beta$, а также еще сильнее активировать миграцию клеток (данные не представлены). Но поскольку данные методики наиболее трудоемкие в анализе, их рекомендуется использовать не для скрининга препаратов, а для дополнительной характеристики активных препаратов.

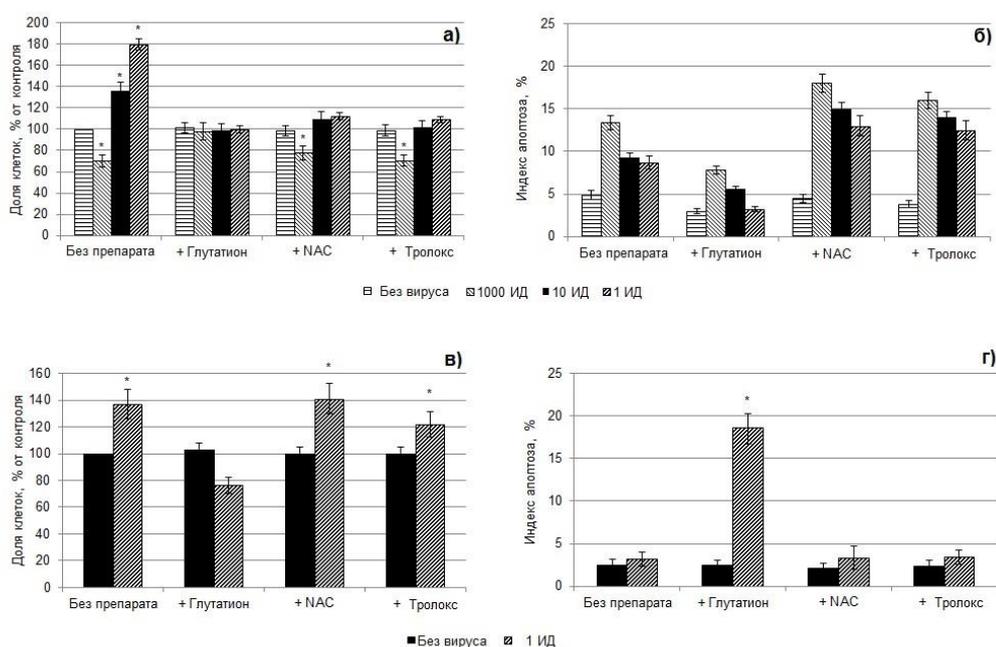


Рис. 9. Влияние восстановленного глутатиона, N-ацетил-цистеина (NAC) и тролокса на пролиферацию (а, в) и апоптоз (б, г) клеток ECV-304, инфицированных разными ИД вируса гриппа А/Брисбен/10/07 (H3N2) (учет на 4-е сут 1-го пассажа – а, б), а также инфицированных 1 ИД вируса – учет на 6-8 пассажах после заражения (в, г).

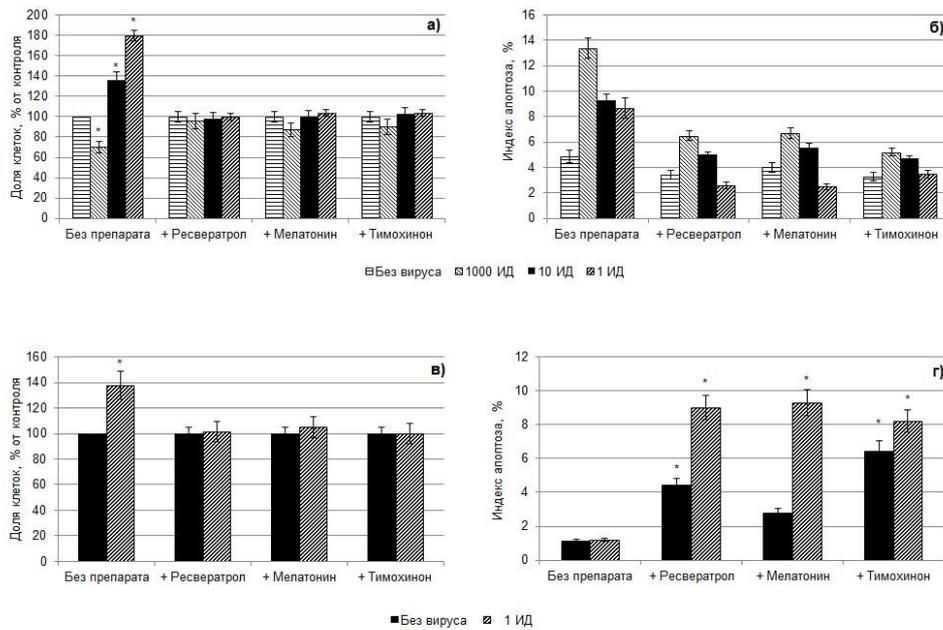


Рис. 10. Влияние ресвератрола, мелатонина и тимохинона на пролиферацию (а, в) и апоптоз (б, г) клеток ECV-304, инфицированных разными ИД вируса гриппа А/Брисбен/10/07 (H3N2) (учет на 4-е сут 1-го пассажа – а, б), а также инфицированных 1 ИД вируса – учет на 6 пассаже после заражения (в, г).

Список литературы

1. Armstrong S., Mubareka S., Lee W. The lung microvascular endothelium as a therapeutic in severe influenza // *Antiviral Res.* – 2013. – № 9. – P. 113-118.
2. Lin F., Wang N., Zhang T-C. The role of endothelial-mesenchymal transition in development and pathological process // *Life.* – 2012. – № 64. – P. 717-723.
3. Echeverria C., Montorfano I., Sarmiento D., Becerra A., Nunez-Villena F., Figueroa X., Cabello-Verrugio C., Elorza A., Riedel C., Simon F. Lipopolysaccharide induces a fibrotic-like phenotype in endothelial cells // *J. Cell. Mol. Med.* – 2013. – № 17. – P. 800-814.
4. Teijaro J., Walsh K., Cahalan S., Fremgen D., Roberts E., Scott F., Martinborough E., Peach R., Oldstone M., Rosen H. Endothelial cells are central orchestrators of cytokine amplification during influenza virus infection // *Cell* – 2011. – № 146. – P. 980-991.

Заключение

В результате исследования было показано, что изменение функционального состояния инфицированных вирусом гриппа клеток эндотелия происходит в два этапа. На ранних сроках наблюдения (3–5 сутки) после заражения клеток низкими дозами вируса значительно повышается как пролиферация клеток, так и уровень апоптоза. На этом этапе постепенно снижается уровень экспрессии мРНК вирусных генов, нарушается нормальная репродукция вирусных частиц и изменяется уровень экспрессии мРНК клеточных факторов, в частности повышается экспрессия цитокинов $TNF\alpha$ и $TGF\beta$. После третьего пассажа (уже при полном отсутствии репродукции вируса гриппа) клетки приобретают новые черты: сохраняется повышенная пролиферация, но уровень апоптоза резко падает (2-й этап). Обнаружено, что LPS также стимулирует пролиферацию и апоптоз клеток эндотелия на ранних сроках, но при последующем культивировании (5–6 пассаж) отмечено значительное снижение клеточной пролиферации. По совокупности исследованных параметров физиологического состояния клеток эндотелия (пролиферация, апоптоз, продукция NO, экспрессия генов цитокинов и других клеточных факторов) установлено, что вирус гриппа и LPS (как по отдельности, так и совместно) вызывают дисфункцию клеток эндотелия на данной модели. На основании полученных данных, разработанная клеточная модель позволяет наблюдать переход от острой вирусной инфекции (первые несколько суток после заражения клеток высокими дозами вируса) к хронической (пассажи после заражения клеток низкой или высокой дозами вируса и (или) воздействия LPS) и исследовать возможные отдаленные последствия гриппозной инфекции. Таким образом, разработанная клеточная модель пригодна не только для оценки изменений функционального состояния (дисфункции) клеток эндотелия под воздействием вируса гриппа и (или) бактериального LPS, но и также для оценки способности препаратов различного происхождения и лечебной направленности восстанавливать функциональное состояние клеток.

**Список работ, опубликованных по теме научно-квалификационной
работы (диссертации)**

Публикации в изданиях, рецензируемых ВАК

1. Смирнова Т.Д., Даниленко Д.М., Ильинская Е.В., Смирнова С.С., Еропкин М.Ю. Влияние заражения вирусом гриппа А при различной множественности инфекции на пролиферацию и индукцию апоптоза перевиваемых клеток лимфоцитарного и моноцитарного происхождения (Jurkat, NC-37, THP-1 и U-937). Цитология. 2015. 57(7). С. 526-532.
2. Даниленко Д.М., Смирнова С.С., Смирнова Т.Д., Писарева М.М., Плотникова М.А., Дробинцева (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). С. 192-200. (Danilenko D.M., Smirnova S.S., Smirnova T.D., Pisareva M.M., Plotnikova M.A., Drobintseva (Durnova) A.O., Eroпкиn M.Yu. Human lung carcinoma (A-549) continuing cell line and human endothelial (ECV-304) continuing cell line responses to the influenza virus at different multiplicities of infection. Cell and Tissue Biology. 2016. 10(4). P. 305–313.)
3. Смирнова С.С., Писарева М.М., Смирнова Т.Д., Плотникова М.А., Сивак К.В., Воробьев К.В. Влияние вируса гриппа А и бактериального липополисахарида на пролиферацию и экспрессию генов цитокинов и других клеточных факторов в клетках перевиваемой линии эндотелия ECV-304. Цитология. 2016. 58(12). С. 916-923. (Smirnova S.S., Pisareva M.M., Smirnova T.D., Plotnikova M.A., Sivak K.V., Vorobiev K.V. Effect of influenza A virus and bacterial lipopolysaccharide on proliferation and expression of cytokines and other cellular factors in the endothelial cell line ECV-304. Cell and Tissue Biology. 2017. 11(2). P. 147–154.)
4. Смирнова С.С., Смирнова Т.Д., Сивак К.В., Воробьев К.В. Изменение функционального состояния клеток эндотелия человека перевиваемой

линии ECV-304 под воздействием вируса гриппа А, липолисахарида *E. coli* и ряда препаратов. Цитология. 2018. 60(4). С. 287-296.

5. Смирнова С.С., Писарева М.М., Смирнова Т.Д., Сивак К.В., Воробьев К.В. Длительное сохранение функциональных изменений, индуцированных вирусом гриппа А и (или) ЛПС, в сублиниях клеток эндотелия человека ECV-304. Цитология. 2019. 61(3). С. 226-234. (Smirnova S.S., Pisareva M.M., Smirnova T.D., Sivak K.V., Vorobiev K.V. Long-term maintenance of the functional changes induced by influenza A virus and/or LPS in human endothelial ECV-304 cell sublines. Cell and Tissue Biology. 2019. 13(4). P. 283–291.)

Публикации в других изданиях

1. Смирнова С.С., Смирнова Т.Д. Разработка метода изучения промоторной активности противовирусных препаратов с использованием первичных и перевиваемых клеточных линий человека. Неделя науки СПбГПУ: материалы научно-практической конференции с международным участием. Институт физики, нанотехнологий и телекоммуникаций СПбГПУ. Ч. 2. 2014. С. 199-202.
2. Смирнова С.С., Смирнова Т.Д. Разработка метода изучения промоторной активности противовирусных препаратов с использованием первичных и перевиваемых клеточных линий человека. Неделя науки СПбГПУ: материалы научно-практической конференции с международным участием. Лучшие доклады. 2014. С. 250-253.
3. Смирнова С.С., Даниленко Д.М., Смирнова Т.Д., Дунаева Н.В., Сивак К.В. Изучение влияния противовирусных препаратов на пролиферацию, апоптоз и дифференцировку культивируемых клеток человека. Клеточные культуры. Информ. бюл. 2015. 31. С. 54-67.
4. Смирнова Т.Д., Смирнова С.С., Сивак К.В., Еропкина Е.М., Еропкин М.Ю. Клеточная линия ECV-304 как модель для изучения влияния антиоксидантных препаратов на пролиферацию и апоптоз клеток при

инфицировании вирусом гриппа А и в присутствии бактериального липополисахарида. Клеточные культуры. Информ. бюл. 2016. 32. С. 14-28.

5. Смирнова С.С., Смирнова Т.Д. Роль вируса гриппа А и LPS E. Coli в индукции дисфункции клеток эндотелия (на модели перевиваемой линии клеток эндотелия человека ECV-304). Научно-практическая конференция-биеннале «Грипп: вирусология, эпидемиология, профилактика и лечение». Сборник материалов. 2016. С. 46-47.
6. Смирнова С.С., Смирнова Т.Д., Воробьев К.В. Разработка клеточной модели для изучения дисфункции клеток эндотелия человека под воздействием вируса гриппа и бактериального липополисахарида и ее применение для оценки активности препаратов. Неделя науки СПбПУ: материалы научной конференции с международным участием. Институт биомедицинских систем и технологий. 2018. С. 184-187.

Аспирант _____ Смирнова С.С.
(подпись)

СОДЕРЖАНИЕ

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ	3
Актуальность работы.....	3
Цель и задачи исследования	4
Научная новизна	5
Теоретическая и практическая значимость.....	6
Апробация работы	6
Публикации	6
Представление научного доклада: основные положения.....	7
СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ	9
Объекты, (предмет) и методы исследования	9
Результаты и их обсуждение	10
Определение факторов, влияющих на ответ клеток эндотелия на инфицирование вирусом гриппа	10
Математическое моделирование пролиферативной активности инфицированных вирусом гриппа клеток.....	12
Изучение репродукции вируса гриппа А в клетках ECV-304..	13
Оценка изменения пролиферативной активности клеток эндотелия	14
Оценка изменения уровня апоптоза клеток эндотелия.....	14
Определение продукции NO.....	16
Определение миграционной активности.....	16
Определение экспрессии мРНК клеточных белков	17
Применение клеточной модели для оценки активности препаратов	18
Список литературы.....	21
Заключение.....	22
Список работ, опубликованных по теме научно-квалификационной работы (диссертации)	23
Публикации в изданиях, рецензируемых ВАК.....	23
Публикации в других изданиях	24