

ИССЛЕДОВАНИЕ *IN VITRO* ИНТЕРФЕРОНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГРИППОЗНОЙ ИНФЕКЦИИ

А.Н. Лисаков¹, Ф.Г. Нагиева¹, Е.П. Баркова¹, Л.А. Гайдерова², А.Ю. Федотов¹, В.Г. Никулина¹, М.В. Гаврилова¹

¹ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова РАМН, Москва, Россия

²ФГБНУ НЦ экспертизы средств медицинского применения МЗ РФ, Москва, Россия

Резюме. *Введение.* Известно, что интерферон (IFN), представляющий собой цитокин, является важной частью иммунной системы и необходим для полного выражения иммунного ответа на антигенный стимул. Также считается, что каждый антиген является интерфероногеном. В связи с тем, что интерфероны индуцируют антивирусное состояние посредством связывания со специфическими рецепторами, то эти рецепторы можно определять непосредственно на клеточных мембранах иммунокомпетентных клеток человека. *Цель.* Оценить интерфероногенность некоторых серотипов вирусов гриппа А по показателям функциональной активности α - и γ -интерфероновых рецепторов (IFNAR и IFNGR) на мононуклеарных клетках периферической крови человека (МКПК), индуцированных *in vitro* вирусами гриппа А различных серотипов. *Материалы и методы.* Метод основан на выделении лимфоцитов из венозной гепаринизированной крови человека, индуцировании лимфоцитов *in vitro* при 36,5°C в атмосфере 5% CO₂, забора образцов в различные временные интервалы, окраске их ФИТЦ-конъюгатом на основе мышиных антиидиотипических антител, структурно имитирующих IFN α и IFN γ человека, то есть антирецепторных антител для IFN α и IFN γ человека, фиксации окрашенных образцов параформальдегидом и оценке показателей экспрессии интерфероновых рецепторов (IFNAR) на проточном цитометре. *Результаты.* В экспериментах *in vitro* выявляли интерфероногенность трех серотипов вируса гриппа А/PR8/34 (H1N1), Краснодар/101/59 (H2N2) и Рязань/6103/87 (H3N2). Мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) донора с группой крови «0», резус плюс, индуцировали облученной неинфекционной аллантоисной жидкостью с гемагглютинирующей активностью. Экспрессию IFNAR и IFNGR на МКПК выявляли с помощью маркеров IFNR человека, меченых флуоресцеинизотиоцианатом и оценивали в проточном цитофлуориметре. Параллельно сравнивали экспрессию IFNAR и IFNGR на МКПК, праймированных и непраймированных малыми дозами IFN α человека. Было установлено, что экспрессия IFNAR на МКПК, индуцированных антигеном вируса гриппа А/PR8/34 (H1N1) с высокой гемагглютинирующей активностью была выше у праймированных МКПК в сравнении с непраймированными и выше в сравнении с экспрессией IFNAR на МКПК, индуцированных антигенами вирусов гриппа А/Краснодар/101/59 (H2N2) и А/Рязань/6103/87 (H3N2) с более низкой гемагглютинирующей активностью. Необходимо отметить, что экспрессия IFNAR на МКПК, индуцированных антигеном вируса гриппа А/PR8/34 (H1N1) и праймированных малыми дозами IFN α , держалась на высоком уровне, начиная с 1 часа с момента индукции антигеном и продолжалась на высоких цифрах в течение 5 часов. Анализ уровня экспрессии IFNGR на МКПК, индуцированных антигенами вируса гриппа А различных серотипов показал, что, во-первых, усиление экспрессии IFNGR на МКПК, праймированных низкими дозами IFN α не происходило.

Адрес для переписки:

Нагиева Фирая Галиевна
115088, Россия, Москва, ул. 1-я Дубровская, 15, стр. 1,
ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова РАМН.
Тел.: 8 (495) 674-76-45 (моб.).
E-mail: fgn42@yandex.ru

Contacts:

Firaya G. Nagieva
115088, Russian Federation, Moscow, 1st Dubrovskaya str., 15/1,
Research Institute Vaccine and Serum named after I.I. Mechnikov.
Phone: +7 (495) 674-76-45 (mobile).
E-mail: fgn42@yandex.ru

Библиографическое описание:

Лисаков А.Н., Нагиева Ф.Г., Баркова Е.П., Гайдерова Л.А., Федотов А.Ю., Никулина В.Г., Гаврилова М.В. Исследование *in vitro* интерфероновых рецепторов иммунокомпетентных клеток при экспериментальной гриппозной инфекции // Инфекция и иммунитет. 2015. Т. 5, № 3. С. 273–278. doi: 10.15789/2220-7619-2015-3-273-278

Citation:

Lisakov A.N., Nagieva F.G., Barkova E.P., Gaiderova L.A., Fedotov A.Y., Nikulina V.G., GavriloVA M.V. The immunocompetent cells receptors research under experimental influenza infection *in vitro* // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2015, vol. 5, no. 3, pp. 273–278. doi: 10.15789/2220-7619-2015-3-273-278

Во-вторых, усиление экспрессии IFN α на МПК не было связано с уровнем гемагглютинирующей активности антигенов вирусов гриппа А. **Выводы.** Результаты экспериментов однозначно показывают, что все использованные в работе серотипы вирусов гриппа А обладают интерфероногенностью, о чем косвенно можно судить по уровню экспрессии IFN α и IFN γ на МПК, индуцированных указанными вирусными антигенами. Степень интерфероногенности у различных серотипов вируса гриппа А связана с одной стороны, с уровнем гемагглютинирующей активности вируса при оценке IFN α , с другой стороны, с серотипами вирусов при оценке IFN γ .

Ключевые слова: мононуклеарные клетки, периферическая кровь, активация лимфоцитов, культивирование *in vitro*, вирусы гриппа, интерфероновые рецепторы, экспрессия рецепторов, проточная цитометрия.

THE IMMUNOCOMPETENT CELLS RECEPTORS RESEARCH UNDER EXPERIMENTAL INFLUENZA INFECTION *IN VITRO*

Lisakov A.N.^a, Nagieva F.G.^a, Barkova E.P.^a, Gaiderova L.A.^b, Fedotov A.Y.^a, Nikulina V.G.^a, Gavrilova M.V.^a

^a Research Institute Vaccine and Serum named after I.I. Mechnikov, Moscow, Russian Federation

^b Research Center for Expertise of Means Medical Application, Moscow, Russian Federation

Abstract. Introduction. It is known that interferon is a cytokine and is a substantial part of the immune system necessary for antigenic challenge immune response full expression. Also it is considered that every antigen is an interferon inducer. Interferon induces antiviral response via binding to specific receptors, these receptors can be revealed straight on cell membranes of immune cells. **Research objective.** To evaluate the interferon inducer ability of some Influenza A virus strains upon indications of receptors functional activity (capacity) to alpha and gamma interferons on peripheral mononuclear blood cells (PBMC) induced *in vitro* by different Influenza A virus strains. **Material and methods.** The method is based on lymphocytes separation from the venous heparinized blood, with followed by *in vitro* lymphocytes inducing at temperature 36.5°C in the presence of 5% CO₂. Blood samples were taken in different time intervals, labelled by mouse anti-idiotypic FITC-conjugated antibodies, structurally simulated human alpha and gamma interferon, samples were fixed with paraformaldehyde. Interferon receptors expression were performed by flow cytometer. **Results.** The *in vitro* experiments have determined the interferon-inducing ability of three influenza virus strains: A/PR8/34 (H1N1), A/Krasnodar/101/59 (H2N2) and A/Ryazan/6103/87 (H3N2). MPBC blood sample (blood group was 0, Rh factor – positive) was induced by irradiated non-infectious allantoic fluid with hemagglutinating activity. Expression of alpha and gamma interferon receptors (alpha and gamma IFNR) on MPBC was determined by IFNR markers labelled with FITC and its (expression) was estimated by flow cytometer. In parallel we compared expression of alpha and gamma IFNR on MPBC in primed and non primed cells by low doses of human alpha interferon. It was found that expression of alpha and gamma IFNR on MPBC, induced influenza A/PR8/34 (H1N1) antigen, with high hemagglutinating activity was higher in primed MPBC in comparison with non primed and higher than expression was induced by influenza virus A/Krasnodar/101/59 (H2N2) and A/Ryazan/6103/87 (H3N2) with lower hemagglutinating activity. It should be noted that IFN α receptor (IFN α R) expression on induced by influenza virus strain A/PR8/34 (H1N1) and primed by low doses of alpha interferon, repose on high level from induction point (1 hour) and protract during high level during 5 hours. Evaluation of gamma IFNR (IFN γ R) expression level on MPBC induced by different influenza virus strains testify that firstly up-regulation IFN γ R expression on MPBC primed by low doses of alpha interferon is absent and secondly up-regulation IFN γ R on MPBC bear no relation with hemagglutinating activity of Influenza virus antigen. **Conclusion.** Experiment results clearly suggest that all influenza strains used carry the interferon induced ability which is possible to see by expression of IFN α R and IFN γ R on MPBC induced by described above virus antigens. Rate of interferon induce ability in different influenza virus A connected on one side with virus hemagglutinating activity level in estimating IFN α R and on the other side with virus strains in estimating IFN γ R.

Key words: mononuclear cells, peripheral blood, lymphocyte activation, cultivation *in vitro*, influenza viruses, interferon receptors, receptors expression, flow cytometry.

Введение

Ранее нами было показано, что мышинные моноклональные антиидиотипические антитела с альфа и гамма интерфероподобными свойствами, обладали способностью связываться с интерфероновыми рецепторами (IFNR), экспрессированными на мембране иммунокомпетентных клеток человека. С помощью моноклональных антиидиотипических антител, меченых флуоресцеинизотиоцианатом (ФИТЦ) было показано, что активация иммунной системы, связанная с инфекцией, отражается на степе-

ни экспрессии α - и γ -интерфероновых рецепторов (IFN α R и IFN γ R) на иммунокомпетентных клетках человека. При этом, у лиц с глубокими нарушениями иммунной системы, например, у ВИЧ-инфицированных, выявляется высокая степень экспрессии IFN α R и IFN γ R, а при развитии клинически выраженного СПИД, возрастает экспрессия рецепторов только для IFN γ [1, 2].

В последние годы в научной прессе широко дискутируется вопрос об интерфероногенности вирусов гриппа и других респираторных вирусов и о механизмах ингибции ими интерферонов. Так, было показано, что неструктурный белок

NS 1 вируса гриппа А ингибирует врожденный иммунный ответ организма путем угнетения индукции интерферона [5]. Также было показано, что неструктурный белок NS 1 респираторного синцитиального вируса ингибирует синтез $IFN\alpha/\beta$, хотя механизмы, ответственные за это известны не полностью [6].

В работах Скуркович С.В. с соавт. было сделано предположение, что интерферон в организме необходим для полного выражения иммунного ответа на антигенный стимул и что любой антиген является интерферогеном [8].

Целью настоящей работы является оценка интерферогенности некоторых серотипов вирусов гриппа А по показателям функциональной активности $IFNAR$ и $IFNGR$ на мононуклеарных клетках периферической крови человека (МПК), индуцированных *in vitro* вирусами гриппа А различных серотипов.

Материалы и методы

Антирецепторные маркеры со специфичностью для $IFN\alpha$ и $IFN\gamma$ человека получены из мышиных лимфоцитарных гибридом, секретирующих антиидиотипические моноклональные антитела, путем их культивирования в брюшной полости сингенных мышей после предварительного введения пристана. Собранные асцитические жидкости концентрировали и очищали каприловой кислотой и сульфатом аммония и конъюгировали с ФИТЦ по методикам [3, 9].

Вирусы. Аллантаисные варианты вирусов гриппа А получали в развивающихся 9-дневных куриных эмбрионах. В экспериментах были использованы следующие серотипы вирусов гриппа А/PR8/34 (H1N1), Краснодар/101/59 (H2N2) и Рязань/6103/87 (H3N2). Полученные вирусосодержащие аллантаисные жидкости были адаптированы к культурам клеток линии MDCK. Инфекционный титр вируса, полученный с инфицированных клеток MDCK, оценивали по цитопатическому действию вирусов на клетки (ЦПД₅₀), который подтверждали в реакции прямой иммунофлуоресценции со специфическими мышиными сыворотками мечеными ФИТЦ, а также по гемагглютинирующей активности вирусосодержащей жидкости (ВСЖ) с 0,4% взвесью эритроцитов морских свинок. Для получения флуоресцирующих иммунных сывороток мышей линии BALB/c иммунизировали внутрибрюшинно аллантаисными вариантами вирусов гриппа А и полученные сыворотки после очистки и концентрации сульфатом аммония и каприловой кислотой, конъюгировали с ФИТЦ.

Культивирование вирусов гриппа А в клеточной культуре MDCK. В культуральных флаконах площадью 75 см² выращивали клетки MDCK в питательной среде ДМЕМ с 5% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) и гентамицином 40 мкг/мл. Перед заражением клеток вирусами, сформиро-

вавшийся монослой трижды промывали фосфатно-буферным раствором (ФБР), содержащим ионы Ca^{2+} и Mg^{2+} и вносили аллантаисную вирусосодержащую жидкость. Множественность заражения составляла 0,01. Поддерживающая среда состояла из среды ДМЕМ с 2 мкг/мл кристаллического трипсина и 40 мкг/мл гентамицина. Контакт ВСЖ с клетками проводили при 36,5°C в течение 1 ч. Неадсорбированный ВСЖ удаляли и вносили поддерживающую среду ДМЕМ с 2 мкг/мл трипсина. Через 72 ч культивирования после деструкции клеточного монослоя на 70–80% культуральные флаконы с инфицированными клетками двукратно замораживали на минус 70°C с последующим размораживанием, клеточную взвесь центрифугировали и надосадочную вирусосодержащую жидкость распределяли на небольшие пулы и замораживали на минус 70°C до использования. Перед использованием ВСЖ вирусов гриппа А, определяли их инфекционную активность методом предельного разведения на клетках MDCK, выращенных на 24-луночных культуральных планшетах. Для индукции МПК человека один из пулов ВСЖ размораживали и облучали под УФ бактерицидной лампой дважды по 20 мин с расстояния 30 см.

Выделение лимфоцитов. МПК выделяли из гепаринизированной (20 ед/мл) крови человека «0» группы, Rh⁺, в градиенте фикола при плотности 1,077 г/см³ (ПанЭко, США) путем центрифугирования в течение 20 мин при 1500 об./мин. Клеточную фракцию трижды промывали холодным фосфатно-солевым буферным раствором (ФБР), осадок клеток ресуспендировали в среде RPMI-1640 с 1% бычьего сывороточного альбумина (БСА), индуцировали антигенами вирусов гриппа различных серотипов и в разные временные интервалы готовили образцы для проточной цитометрии.

Пробоподготовка лимфоцитов для проточной цитометрии. В две пробирки (Эппендорф) вносят по 100 мкл тщательно перемешанного образца лимфоцитов и добавляют по 5 мкл флуоресцирующих α - и γ -антиидиотипических антител, перемешивают на вортексе в течение 5 с, инкубируют 45 мин при комнатной температуре в темноте. Окрашенные лимфоциты центрифугируют при 800g в течение 7 мин, надосадок удаляют пипеткой со сменным наконечником, осадок промывают центрифугированием с ФБР комнатной температуры 2 раза, затем фиксируют дважды свежешелуфированным 2% параформальдегидом. Суспензию окрашенных и фиксированных лимфоцитов переносят в специальные пробирки для установки в прибор. Пробу встряхивают на вортексе в течение 5 с и помещают в проточный цитометр Coulter EPICS XL (4-цветный; Product for Beckman Coulter/COULTER EPICS XL). Цитометрию проводят по стандартной методике. Полученные результаты анализируют.

Праймирование лимфоцитов. Праймирование лимфоцитов проводилось за 30 мин до внесения вируса гриппа А путем внесения лейкоцитарного IFN α в дозе 8–20 ед на 2×10^6 лимфоцитов [4].

Статистическая обработка проведена по программе Prism 4 (Graph Red).

Результаты и обсуждение

Эксперименты для оценки экспрессии интерфероновых рецепторов (IFNR) на мононуклеарных клетках периферической крови человека (МПК), индуцированных антигенами вирусов гриппа А были поставлены в шестилуночных планшетах (Costar, США). Суспензию МПК после подсчета клеток в камере Горяева распределяли по 2 мл в каждую лунку шестилуночной планшеты с концентрацией 1×10^6 лимфоцитов в 1 мл в среде RPMI-1640 с 1% бычьего сывороточного альбумина (БСА). При этом, за 30 мин до внесения ВСЖ, предварительно, в три лунки вносили по 0,5 мл IFN α с 20 ед. активности, а в три другие лунки вносили по 0,5 мл среды RPMI-1640 с 1% БСА. Через 30 мин культивирования при 36,5°C в атмосфере с 5% CO $_2$ при периодическом перемешивании клеточной суспензии, во все 6 лунок вносили по 0,5 мл облученной ВСЖ, содержащей различные серотипы вирусов гриппа А. Далее планшеты продолжали культивировать в инкубаторе с 5% CO $_2$ при температуре 36,5°C. Образцы проб извлекали через 1, 3, 5 и 24 ч.

К отобраным образцам МПК после пятисекундного встряхивания на вортексе вносили равный объем меченых ФИТЦ моноклональных антиидиотипических антирецепторных антител, выдерживали в течение 45 мин в темноте и продолжали пробоподготовку для проточной цитофлуориметрии, описанной подробно в материалах и методах.

В таблице 1 представлены результаты исследования инфекционной и гемагглютинирующей активности вирусов гриппа А с инфицированных клеток МДСК до и после облучения.

Результаты, представленные в таблице 1 показывают, что инфекционная активность облученной ВСЖ, оцененная на клетках МДСК отсутствовала, а гемагглютинирующая активность не изменилась.

В таблице 2 отражены данные уровня экспрессии IFNAR на МПК человека, индуцированных вирусами гриппа А различных серотипов.

Анализ уровня экспрессии IFNAR на МПК, индуцированных вирусом гриппа А серотипа H1N1 с более высокой гемагглютинирующей активностью в сравнении с другими серотипами, показывает, что максимальная экспрессия IFNAR наблюдается через 3 ч с момента индукции — как без праймирования IFN α , так и с праймированием. Однако уровень экспрессии IFNAR у праймированных лимфоцитов выше, в сравнении с непраймированными. Так, сравнивая уровень экспрессии IFNAR у прай-

ТАБЛИЦА 1. ИНФЕКЦИОННАЯ И ГЕМАГГЛЮТИНИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ ВИРУСОВ ГРИППА А РАЗЛИЧНЫХ СЕРОТИПОВ С ИНФИЦИРОВАННЫХ КЛЕТОК МДСК ДО И ПОСЛЕ ОБЛУЧЕНИЯ

Вирусы гриппа А	Инфекционная активность в Ig ИФ** 50/0,5 мл		Гемагглютинирующая активность (в обратных величинах)	
	до облучения	после облучения	до облучения	после облучения
PR8/34 (H1N1)	5,0	0	1024	1024
Краснодар/101/59 (H2N2)	4,0	0	256	256
Рязань/6103/87 (H3N2)*	4,0	0	256	256

Примечание. *изolat вируса гриппа А, выделен в нашей лаборатории в период эпидемии гриппа в г. Рязани в 1987 г.;

**инфекционные фокусы.

ТАБЛИЦА 2. ЭКСПРЕССИЯ IFNAR НА МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА, ИНДУЦИРОВАННЫХ ВИРУСАМИ ГРИППА А РАЗЛИЧНЫХ СЕРОТИПОВ ПО ДАННЫМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ

Вирусы гриппа А	Время индукции (в часах)	Уровень экспрессии IFNAR на мононуклеарных клетках человека (в %)			
		Без праймирования	С праймированием	Разница между показателями (абс./%)	P
PR/8/34 (H1N1)	1	1,86±0,02	4,03±0,09	2,17/53,8%	< 0,0001
	3	4,72±0,06	7,52±0,04	2,8/37,2%	< 0,0001
	5	2,07±0,03	5,17±0,13	3,1/59,9%	< 0,0001
	24	0,96±0,07	1,54±0,05	0,58/30,6%	0,0001
Краснодар/101/59 (H2N2)	1	0,86±0,04	0,80±0,05	0,06/6,9%	ns
	3	1,56±0,05	4,36±0,04	2,8/64,2%	< 0,0001
	5	2,90±0,04	2,59±0,03	0,31/10,6%	< 0,0001
	24	1,38±0,06	1,03±0,05	0,35/25,3%	< 0,0001
Рязань/6103/87 (H3N2)	1	0,42±0,04	0,57±0,04	0,15/2,6%	ns
	3	1,43±0,03	3,38±0,06	1,95/57,6%	< 0,0001
	5	2,55±0,04	3,72±0,06	1,17/31,4%	< 0,0001
	24	1,10±0,06	1,11±0,09	0,01/9,0%	ns

ТАБЛИЦА 3. ЭКСПРЕССИЯ IFNGR НА МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА, ИНДУЦИРОВАННЫХ ВИРУСАМИ ГРИППА А РАЗЛИЧНЫХ СЕРОТИПОВ

Вирусы гриппа А	Время индукции (в часах)	Уровень экспрессии IFNGR на мононуклеарных клетках человека (в %)			
		Без праймирования	С праймированием	Разница между показателями (абс./%)	P
PR/8/34 (H1N1)	1	1,18±0,04	0,96±0,03	0,22/18,6%	< 0,0001
	3	1,31±0,03	2,39±0,05	1,08/45,1%	< 0,0001
	5	3,33±0,06	2,94±0,02	0,39/11,7%	0,0002
	24	1,84±0,03	0,95±0,03	0,89/48,3%	< 0,0001
Краснодар/101/59 (H2N2)	1	0,93±0,05	0,99±0,04	0,06/6,0%	ns
	3	4,11±0,06	3,22±0,12	0,89/21,6%	< 0,0001
	5	5,75±0,04	3,64±0,04	2,11/36,6%	< 0,0001
	24	0,71±0,07	0,73±0,04	0,02/2,7%	ns
Рязань/6103/87 (H3N2)	1	1,21±0,05	1,16±0,03	0,05/4,1%	
	3	3,35±0,05	3,56±0,05	0,21/5,8%	ns
	5	4,54±0,01	3,56±0,1	0,20/4,4%	0,0064
	24	0,61±0,02	1,43±0,08	0,82/57,3%	0,0004

мированных и непраймированных лимфоцитов, необходимо отметить, что уже через 1 ч после индукции лимфоцитов антигеном вируса гриппа А (H1N1), у праймированных лимфоцитов на 53,8% уровень экспрессии был выше, чем у непраймированных. Разница статистически достоверна при уровне значимости $p < 0,0001$. Разница уровней экспрессии IFNGR у праймированных и непраймированных лимфоцитов через 3 ч после индукции антигеном вируса гриппа А (H1N1) составляла 37,2%. Этот показатель также статистически достоверен при уровне значимости $p < 0,0001$.

Через 5 ч после индукции лимфоцитов антигеном вируса гриппа А/PR8/34 (H1N1) уровень экспрессии IFNGR у непраймированных лимфоцитов резко снижался на 59,9% в сравнении с праймированными лимфоцитами, то есть у праймированных лимфоцитов экспрессия IFNGR держалась на высоком уровне, начиная с первого часа с момента индукции антигеном вируса гриппа А/PR8/34 (H1N1) и продолжалась на высоких цифрах в течение 5 ч.

Из литературы известно, что клетки, до индукции вирусом, обработанные низкими дозами интерферона, образуют больше интерферона, чем необработанные. Механизм усиливающего действия предварительной обработки интерфероном остается неясным. Предполагают, что при такой обработке увеличивается базальный уровень мРНК интерферона, которая и обуславливает более быструю и его эффективную индукцию [4].

Анализ уровня экспрессии IFNGR на МПК, индуцированных антигенами вирусов гриппа А серотипов (H2N2) и (H3N2) с более низкой гемагглютинирующей активностью, показывает, что у праймированных лимфоцитов более высокий уровень экспрессии IFNGR на МПК наблюдается к 3 часам с момента индукции и по абсолютной величине выше по сравнению с непраймированными лимфоцитами у которых максимальный показатель экспрессии ниже

и достигается к 5 часам после индукции. Возможно различия в показателях экспрессии IFNGR на МПК, индуцированных антигенами вирусов гриппа А различных серотипов, связаны с различной гемагглютинирующей активностью вирусов, а не с серотипами.

В таблице 3 представлены результаты экспрессии IFNGR на МПК человека, индуцированных вирусами гриппа А различных серотипов.

Анализ уровня экспрессии IFNGR на МПК, индуцированных антигенами вируса гриппа А различных серотипов показывает, что, во-первых, усиление экспрессии IFNGR на лимфоцитах, праймированных низкими дозами IFN α не происходит. Во-вторых, усиление экспрессии IFNGR на МПК не связано с уровнем гемагглютинирующей активности индуцирующих антигенов. Так, максимальный уровень экспрессии IFNGR на лимфоцитах наблюдался через 3 ч с момента индукции антигеном вируса гриппа А серотипа H1N1 и резко снижался к 5 часам, а экспрессия IFNGR на МПК, индуцированных антигенами вируса гриппа А серотипов H2N2 и H3N2 продолжалась в течение 5 ч на высоких показателях экспрессии IFNGR.

Таким образом, по результатам, полученным в наших экспериментах с использованием меченых ФИТЦ антирецепторных моноклональных антител для IFN α и IFN γ человека, можно однозначно утверждать, что все использованные в работе серотипы вирусов гриппа А обладают интерферогенностью, о чем косвенно судят по индукции ими на мононуклеарных клетках человека IFNGR для IFN α и IFN γ человека. Степень интерферогенности у различных серотипов вируса гриппа А связана с одной стороны, как с уровнем гемагглютинирующей активности, например, у серотипа H1N1 вируса гриппа А/PR8/34 в случае экспрессии IFNGR, так и с серотипами в случае экспрессии IFNGR.

Как известно, из наших предыдущих экспериментов [1, 2] и данных литературы [7], у лиц с глубокими нарушениями иммунной системы,

выявляется высокая степень экспрессии рецепторов для IFN γ . Экстраполируя эти данные на полученные нами результаты, относящиеся к более высокому уровню экспрессии IFN γ у серотипов H2N2 и H3N2, в частности, вирусов

гриппа А/Краснодар/101/59 и Рязань/6103/87, соответственно, можно предположить, что вирусы указанных серотипов в случае эпидемической вспышки могут вызвать более глубокие нарушения иммунной системы организма.

Список литературы/References

1. Баркова Е.П., Вдовина Е.Т., Нагиева Ф.Г., Юшук Н.В., Знойко О.О., Никулина В.Г., Воробьев А.С. Функциональная активность интерфероновых рецепторов мононуклеаров периферической крови пациентов с вирусными гепатитами // Биопрепараты. 2001. № 4. С. 18–21. [Barkova E.P., Vdovina E.T., Nagieva F.G., Ushuk N.V., Znoiko O.O., Nikulina V.G., Vorobev A.S. Functional activity (capacity) interferon receptors peripheral blood mononuclear cells of patients with viral hepatitis. *Biopreparaty = Biopharmaceuticals*, 2001, no. 4, pp. 18–21. (In Russ.)]
2. Баркова Е.П., Нагиева Ф.Г., Кузнецов В.П., Беляев Д.Л., Никулина В.Г., Бабаянц А.А., Крель П.Е., Анджапаридзе О.Г. Экспрессия рецепторов для человеческих интерферонов альфа и гамма на поверхности мононуклеарных клеток периферической крови при некоторых вирусных инфекциях // Вопросы вирусологии. 1998. Т. 43, № 6. С. 16–18. [Barkova E.P., Nagieva F.G., Kuznetsov V.P., Belyaev D.L., Nikulina V.G., Babayants A.A., Krel P.E., Andzaparidze O.G. Expression receptors to human alpha and gamma interferon on surface of peripheral blood mononuclear cells in some virus infections. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 1998, vol. 43, no. 6, pp. 16–18. (In Russ.)]
3. Лимфоциты. Методы / Под ред. Дж. Клаус. М.: Мир, 1990. 395 с. [Lymphocytes. Methods / Ed. Klaus G.]. Moscow: Mir, 1990, 395 p. (In Russ.)]
4. Соловьев В.Д., Бектемиров Т.А. Интерфероны в теории и практике медицины. М.: Медицина, 1981. 283 с. [Solovov V.D., Bektemirov T.A. *Interferony v teorii i praktike meditsiny* [Interferons in theory and practice in medicine]. Moscow: Meditsina, 1981. 283 p. (In Russ.)]
5. Mizukoshi E., Kaneko S., Yanagi M., Ohno H., Kaji K., Terasaki S., Shimoda A., Matsushita E., Kobayashi K. Expression of interferon alpha/beta receptor in the liver of chronic hepatitis C patients. *J. Med. Virol.*, 1998, vol. 56, no. 3, pp. 217–223.
6. Reik L.M., Maines S.L., Ryan D.E., Levin W., Bandiera S., Thomas P.E. A simple, non-chromatographic purification procedure for monoclonal antibodies. Isolation of monoclonal antibodies against cytochrome P450 isozymes. *J. Immunol. Methods*, 1987, vol. 100, no. 1–2, pp. 123–130.
7. Ren J., Liu T., Pang L., Li K., Garofalo R.P., Casola A., Bao X. A novel mechanism for the inhibition of interferon regulatory factor-3-dependent gene expression by human respiratory syncytial virus NS1 protein. *J. Gen. Virol.*, 2011, 92 (Pt. 9), pp. 2153–2159. doi: 10.1099/vir.0.032987-0
8. Skurkovich S.V., Eremkina E.I. The probable role of interferon in allergy. *Ann. Allergy*, 1975, vol. 35, no. 6, pp. 356–360.
9. Woo H.M., Kim K.S., Lee J.M., Shim H.S., Cho S.J., Lee W.K., Ko H.W., Keum Y.S., Kim S.Y., Pathinayake P., Kim C.J., Jeong Y.J. Single-stranded DNA aptamer that specifically binds to the influenza virus NS1 protein suppresses interferon antagonism. *Antiviral Res.*, 2013, vol. 100, no. 2, pp. 337–345. doi:10.1016/j.antiviral.2013.09.004.

Авторы:

Лисаков А.Н., младший научный сотрудник лаборатории гибридных клеточных культур отдела вирусологии ФГБУ НИИВС им. И.И. Мечникова РАМН, Москва, Россия;
Нагиева Ф.Г., д.м.н., доцент, зав. лабораторией гибридных клеточных культур отдела вирусологии ФГБУ НИИВС им. И.И. Мечникова РАМН, Москва, Россия;
Баркова Е.П., к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории гибридных клеточных культур отдела вирусологии ФГБУ НИИВС им. И.И. Мечникова РАМН, Москва, Россия;
Гайдерова Л.А., к.м.н., зав. лабораторией иммунологии ФГБУ НЦЭСМП МЗ РФ, Москва, Россия;
Федотов А.Ю., младший научный сотрудник лаборатории гибридных клеточных культур отдела вирусологии ФГБУ НИИВС им. И.И. Мечникова РАМН, Москва, Россия;
Никулина В.Г., к.м.н., доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории гибридных клеточных культур отдела вирусологии ФГБУ НИИВС им. И.И. Мечникова РАМН, Москва, Россия;
Гаврилова М.В., научный сотрудник лаборатории синтеза иммуноглобулинов ФГБУ НИИВС им. И.И. Мечникова РАМН, Москва, Россия.

Authors:

Lisakov A.N., Junior Researcher, Laboratory of Hybrid Cell Cultures, Department of Virology, Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;
Nagieva F.G., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Head of the Laboratory of Hybrid Cell Cultures, Department of Virology, Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;
Barkova E.P., PhD (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Hybrid Cell Cultures, Department of Virology, Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;
Gaiderova L.A., PhD (Medicine), Head of the Laboratory of Immunology, Scientific Center for Expertise of Means Medical Application, Ministry of Health Care, Russian Federation, Moscow, Russian Federation;
Fedotov A.Y., Junior Researcher, Laboratory of Hybrid Cell Cultures, Department of Virology, Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;
Nikulina V.G., PhD (Medicine), Associate Professor, Leading Researcher, Laboratory of Hybrid Cell Cultures, Department of Virology, Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation;
Gavrilova M.V., Researcher, Laboratory of Synthesis of Immunoglobulins, Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation.

Поступила в редакцию 21.04.2015
 Отправлена на доработку 14.05.2015
 Принята к печати 23.07.2015

Received 21.04.2015
 Revision received 14.05.2015
 Accepted 23.07.2015