

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАЗВИТИЯ ИНФЕКЦИИ ВИРУСОМ ГРИППА А ПОДТИПОВ H1, H5 И H9 В МАКРОФАГАХ, ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ ИЗ МОНОЦИТОВ ТНР-1

Т.М. Соколова, В.В. Полосков, А.Н. Шувалов, И.А. Руднева, Т.А. Тимофеева, Р.Р. Климова, О.В. Масалова, А.А. Куш

ФГБУ Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи, подразделение НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского МЗ РФ, Москва, Россия

Резюме. Макрофаги (Мф) играют важную роль в патогенезе гриппозной инфекции, однако получение Мф в больших количествах затруднительно. В связи с этим в настоящей работе для изучения гриппозной инфекции были использованы ТНР-1 моноциты, дифференцированные флорболовым эфиром (РМА) в макрофаги (Мф). Дифференцированные клетки — ТНР-РМА Мф заражали пандемическим А(H1N1)pdm09 и птичьими вирусами гриппа А(H5N2) и А(H9N2). Обнаружены различия в уровнях проникновения вирусных РНК (ген М1) и белков нуклеокапсида (NP) исследованных вирусов. Уровни экспрессии вирусных РНК и белков были значительно выше в клетках, зараженных птичьими вирусами, по сравнению с пандемическим. Особый интерес представляет феномен длительного внутриклеточного присутствия вирусных РНК и ядерная локализация белка NP. Однако инфекционной и гемагглютинирующей активности вирусов всех изученных подтипов в культуральной жидкости вплоть до 96 ч обнаружено не было. Это указывает на abortивный характер гриппозной инфекции в ТНР-РМА Мф. Тем самым Мф выполняет особую функцию депонирования вирусных компонентов и доставки их в места воспаления. Блокирующий механизм у вирусов гриппа А человека и птиц с разной патогенностью может различаться вследствие существования многообразных механизмов ускользания от иммунного ответа. В результате заражения человеческим вирусом А(H1N1)pdm09 инфекция развивалась медленно и к 72 ч вызывала гибель 25% клеток, тогда как при заражении птичьими вирусами уже через 24 ч наблюдалась гибель 50% клеток и к 72 ч все ТНР-РМА Мф погибали. Предобработка рекомбинантным IFN α 2b оказывала защитный эффект, подавляя накопление NP белка вируса А(H5N2) в ядрах ТНР-РМА Мф. Полученные данные позволяют заключить, что одной из причин различного течения и исхода гриппозной инфекции при заражении человека вирусами гриппа А является чувствительность макрофагов человека к вирусам гриппа птиц подтипов H5 и H9 по сравнению с пандемическим вирусом. Наш результат на модели ТНР-РМА Мф согласуется с сообщениями о блокировании этапов высвобождения инфекционных вирионов гриппа А в первичных культурах моноцитарных и альвеолярных Мф. Массивная гибель Мф, вызываемая вирусами гриппа птиц, объясняет их высокую патогенность.

Ключевые слова: инфекция, вирусы гриппа А, ТНР-РМА макрофаги, цитопатогенное действие, вирусные РНК, NP-белки.

Адрес для переписки:

Соколова Татьяна Михайловна
123098, Россия, Москва, ул. Гамалеи, 18,
ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи МЗ РФ.
Тел.: 8 (499) 190-30-49 (служебн.). Факс: 8 (499) 193-61-83.
E-mail: tmsokolovavir@mail.ru

Contacts:

Tatiana M. Sokolova
123098, Russian Federation, Moscow, Gamaleya str., 18,
N.F. Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology.
Phone: +7 (499) 190-30-49 (office). Fax: +7 (499) 193-61-83.
E-mail: tmsokolovavir@mail.ru

Библиографическое описание:

Соколова Т.М., Полосков В.В., Шувалов А.Н., Руднева И.А., Тимофеева Т.А., Климова Р.Р., Масалова О.В., Куш А.А. Сравнительная характеристика развития инфекции вирусом гриппа А подтипов H1, H5 и H9 в макрофагах, дифференцированных из моноцитов ТНР-1 // Инфекция и иммунитет. 2018. Т. 8, № 1. С. 25–32. doi: 10.15789/2220-7619-2018-1-25-32

Citation:

Sokolova T.M., Poloskov V.V., Shuvalov A.N., Rudneva I.A., Timofeeva T.A., Klimova R. R., Masalova O.V., Kushch A.A. Comparative characteristics of the development of infection influenza A viruses of subtypes H1, H5 and H9 in macrophages differentiated from monocytes of THP-1 // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2018, vol. 8, no. 1, pp. 25–32. doi: 10.15789/2220-7619-2018-1-25-32

COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF THE DEVELOPMENT OF INFLUENZA INFECTION IN MACROPHAGES DIFFERENTIATED FROM MONOCYTES OF THP-1 (INFLUENZA A VIRUSES OF SUBTYPES H1, H5 AND H9)

Sokolova T.M., Poloskov V.V., Shuvalov A.N., Rudneva I.A., Timofeeva T.A., Klimova R.R., Masalova O.V., Kushch A.A.
N.F. Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

Abstract. Macrophages (Mf) play an important role in the pathogenesis of influenza infection, but the obtaining of Mf in large quantities is difficult. In connection with this, in the present study, THP-1 monocytes differentiated by phorbol ether (PMA) into macrophages (MF) were used to study influenza infection. Differentiated cells — THP-PMA Mf were infected with pandemic A(H1N1)pdm09 and avian influenza A viruses H5N2 and H9N2. Differences in the levels of penetration of viral RNA (gene M1) and nucleocapsid (NP) proteins of the investigated viruses were found. The levels of expression of viral RNA and proteins were significantly higher in cells infected with avian viruses compared to pandemic viruses. Of particular interest is the phenomenon of prolonged intracellular presence of viral RNAs and nuclear localization of NP protein. However, no infectious or haemagglutinating activity of the virus of all subtypes studied in the culture liquid was detected up to 96 h. This indicates the abortive nature of influenza infection in THP-PMA Mf. Thus, MF performs a special function of depositing viral components and delivering them to the sites of inflammation. The blocking mechanism in human and avian influenza A viruses with different pathogenicity may differ, due to the existence of multiple mechanisms of escape from the immune response. As a result of infection with the human virus A(H1N1)pdm09, the infection developed slowly and caused death of 25% of the cells by 72 h, whereas in the case of infection with avian viruses, 50% of the cells died after 24 hours and by 72 h all the THP-PMA MF died. Preprocessing with recombinant IFN α 2b had a protective effect, suppressing the accumulation of the NP protein of the A/H5N2 virus in the THP-PMA Mf nuclei. The obtained data allow us to conclude that one of the reasons for the different course and outcome of influenza infection in human infection with influenza A viruses is the sensitivity of human macrophages to avian influenza viruses of subtypes H5 and H9 as compared to the pandemic virus. Our result on the THP-PMA Mf model is consistent with reports on the blocking of the stages of the release of infectious influenza A virions in primary cultures of monocytic and alveolar MF. Massive death of MF caused by avian influenza viruses explains their high pathogenicity.

Key words: *infection, influenza A viruses, THP-PMA macrophages, cytopathogenic effect, intracellular level, viral RNAs, NP proteins.*

Вирусы гриппа A(H1N1) вызвали крупные пандемии 1918 и 2009 гг., вирусы гриппа птиц подтипов H5, H7 и H9 становились причиной спорадических случаев заболеваний у людей с высокой смертностью среди населения в разных странах мира, начиная с 90-х гг. [26]. Человеческие и птичьи вирусы гриппа имеют разную рецепторную специфичность. Большинство высокопатогенных птичьих вирусов, включая выделенные от человека, связываются с клеточными рецепторами «птичьего» типа (Neu5Ac α 2-3Gal), но не связываются с рецепторами «человеческого» типа (Neu5Ac α 2-6Gal). Эти различия служат основным объяснением ограниченной трансмиссии вирусов гриппа птиц к человеку. Дополнительно на макрофагах (Мф) и дендритных клетках (Дк) есть специализированные рецепторы семейства CRLs (C-type lectin receptor), используемые вирусами гриппа для усиления проникновения внутрь клеток [16]. В чувствительных эпителиальных клетках вирусы гриппа А вызывают высокопродуктивную инфекцию с освобождением инфекционного вируса [18]. Эффективность развития гриппозной инфекции в клетках иммунной системы Мф и Дк может быть различной, и причина различий остается предметом дискуссий.

По данным ряда исследователей вирусы гриппа А(H1N1) и А(H3N2) (сезонные и пандемические варианты) вызывают в человеческих Мф, произошедших из моноцитов периферической крови (ММФ), и в альвеолярных Мф (АМФ)

преимущественно abortивную инфекцию, хотя некоторые высокопатогенные штаммы H5N1 способны давать инфекционное потомство [20, 27]. Стадии, на которых прерывается вирусная инфекция в Мф, а также механизмы, участвующие в рестрикции, точно не определены. Тем не менее, зараженные вирусами гриппа клетки вызывают дифференцировку моноцитов в Мф [24]. Клетки THP-1 представляют удобную модель для изучения действия вирусов на иммунную систему, так как моноциты периферической крови и тканевые макрофаги трудно получить в количествах, необходимых для масштабных экспериментов [9]. Нами для изучения развития гриппозной инфекции, использованы THP-1 моноциты, дифференцированные фоболовым эфиром (PMA) в Мф (THP-PMA Мф). Процесс дифференцировки влияет на чувствительность моноцитов и макрофагов к вирусам гриппа [13, 24]. По свойствам THP-PMA Мф похожи на первичные моноцитарные Мф (ММф), полученные из клеток крови доноров [10]. Цель работы состояла в сравнительном анализе развития гриппозной инфекции, вызванной вирусами гриппа А разных подтипов, а также в оценке цитопатического действия пандемического вируса гриппа А(H1N1)pdm09 и вирусов гриппа птиц А(H5N2) и А(H9N2) на макрофаги. Для этого изучали динамику экспрессии гена М1 и белка NP в клетках THP-PMA Мф, зараженных человеческим и птичьими вирусами гриппа А с разными подтипами гемагглютининов (H1, H5 и H9).

Материалы и методы

Вирусы. Штаммы вирусов гриппа А/IV-Moscow/01/09(H1N1)sw1 [3]; A/Mallard/Pennsylvania/10218/84-MA(H5N2) [21] и A/Swine/Hong Kong/9/98-MA(H9N2) [15] с разной антигенной и рецепторной специфичностью [7] получены из лаборатории физиологии вирусов Подразделения «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского» ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» МЗ РФ. Вирусы были размножены в 10-дневных куриных эмбрионах и исследованы на инфекционную, антигенную, рецепторсвязывающую и гемагглютинирующую активности (табл. 1). Вирусы хранили при -80°C в аликвотах по 0,5 мл.

Клетки ТНР-1, выделенные от больного с острым моноцитарным лейкозом (АТСС Т1В-202) [23], получены из коллекции клеточных культур лаборатории экспериментальной диагностики РОНЦ им. Н.Н. Блохина. Ранее эта клеточная линия охарактеризована нами в отношении уровней экспрессии генов TLR/RLR-рецепторов и представленности в популяции CD-фенотипов [5]. Количество и жизнеспособность клеток определяли в тесте исключения красителя с помощью трипанового синего. Подсчет клеток проводили в автоматическом счетчике клеток (BioRad TC-20). Суспензию клеток ТНР-1 пересевали с концентрацией 2×10^5 клеток/мл в среде RPMI-1640 с глутамином, 10% эмбриональной сывороткой телят и антибиотиками в пластиковых матрицах 25 см² (Costar, США). Изображения живых клеток получали с помощью инвертированного микроскопа Olympus (Япония) при увеличении $\times 400$.

Обработка клеток ТНР-1 для получения макрофагов. ТНР-1 клетки были дифференцированы в макрофаги добавлением 50–100 нг/мл phorbol-12-myristate 13-acetate (РМА, P1585, Sigma-Aldrich, США) в течение 5 дней согласно [10] и обозначены как ТНР-РМА Мф.

Заражение вирусами гриппа А ТНР-РМА макрофагов. Аллантаоисные варианты вирусов, приготовленные в 10-дневных куриных эмбрионах, разводили в среде RPMI-1640 до концентрации 64 ГА/мл и добавляли к адгезивным культурам Мф (адсорбция 1 ч при 37°C). Несвязанный с клетками вирус дважды отмывали. К контрольным клеткам образцы вирусов не добавляли. Обработку препаратом рекомбинантного

IFN α 2 (Реаферон-ЕС липинт) 5×10^4 ед/мл проводили в течение 1 ч при 37°C до заражения вирусом H5N2, затем интерферон удаляли.

Зараженные и контрольные клетки инкубировали в среде RPMI-1640 без сыворотки с добавлением трипсина-ТРСК (Tosyl phenylalanyl chloromethyl ketone) в течение 24, 48, 72 и 96 ч при 37°C . В динамике инфекции в культуральной жидкости определяли инфекционную и гемагглютинирующую активности. В клетках оценивали развитие цитопатогенного действия (ЦПД).

Титрование инфекционности вирусов гриппа проводили на чувствительных клетках CaCo-2 (АТСС США, приготовленные в РОНЦ им. Н.Н. Блохина) микрометодом в 96-луночных планшетах [14]. Делали 4-кратные разведения вирусосодержащих культуральных жидкостей (ВКЖ), собранных в динамике инфекции — через 24, 48 и 72 ч. Пробы инкубировали с клетками без добавления трипсина-ТРСК в атмосфере 5% CO₂. Результат цитопатического действия оценивали через 48 ч под световым микроскопом, определяя концентрацию, при которой погибали 50% клеток (TCID₅₀), и выражали величиной обратного разведения ВКЖ.

Реакция гемагглютинации куриных эритроцитов. К 2-кратным разведениям культуральных вирусов в круглодонных микроплатах добавляли на 30 мин 0,75% взвесь куриных эритроцитов в физиологическом растворе NaCl при pH 7,0. Результат учитывали визуальным стандартным методом.

Выделение вирусных РНК. Суммарную РНК выделяли из контрольных и зараженных вирусами клеток, лизированных реагентом PureZol (Bio-Rad, США, Cat#732-6890) согласно инструкции производителя. ДНК удаляли ДНК-азой с помощью набора «RNA-free» (Ambion, США). На матрице РНК получали кДНК в объеме 30 мкл в реакции обратной транскрипции (ОТ) со случайными праймерами. Использовали фермент MMuLV и 5x буфер ОТ, ингибитор RNAsin и 4 вида dNTP (Promega, США).

Метод ОТ-ПЦР в реальном времени. Полученную кДНК в разведении 1/3 и 1/6 тестировали в количественной ПЦР с парами специфических олигонуклеотидных праймеров. Использовали 2-кратную смесь SsoFast EvaGreen Supermix (Bio-Rad, США). ПЦР ставили на приборе CFX-96 (Bio-Rad, США) в режиме реального времени.

Таблица 1. Свойства вирусов гриппа А подтипов Н1, Н5 и Н9

Table 1. Properties of influenza A viruses of subtypes H1, H5 and H9

Штаммы вирусов гриппа А* Strains influenza A virus*	Адаптация к мышам Adaptation to mice	Тип рецептора Receptor's type	Титр ГА/TCID ₅₀ ** Titer HA/TCID ₅₀ **	Ссылки References
H1N1/Moscow/IV01/2009	–	α 2,6-gal	256/256	[7]
H5N2/Mallard/Pennsylvania/10218/84-MA	+	α 2,3-gal	512/256	[1, 21]
H9N2/Swine/Hong Kong/9/98-MA	+	α 2,3-gal	1024/1024	[19]

Примечания. *Вирусы получены размножением в 10-дневных куриных эмбрионах; **инфекционный титр TCID₅₀ в клетках CaCo-2.

Notes. *Viruses are obtained by multiplying in 10-day embryonated chicken eggs; **infectious titer of TCID₅₀ in CaCo-2 cells.

Протокол ПЦР: 96°C 2 мин, далее 55 циклов 94°C, 10 с, 50–54°C 20 с, 72°C 30 с. Пороговые циклы (Cq) регистрировали в логарифмической фазе нарастания сигнала флюоресценции красителя EvaGreen. Относительная оценка уровней экспрессии генов (дельтаCq) сделана в программе CFX Manager «Gene expression analysis» в автоматическом режиме с определением средних значений и стандартных отклонений в повторных образцах. В конечной точке ПЦР устанавливали специфичность ДНК-амплификатов по температурным пикам плавления и размерам ПЦР-продуктов (электрофорез в 1,5% агарозном геле с бромистым этидием).

ПЦР-праймеры к консервативному 7 сегменту РНК (ген М1) вирусов гриппа А описаны в литературе [11] и использованы в настоящей работе. Синтез праймеров выполнен фирмой «Синтол» (Россия). М1-праймеры дают специфические ДНК-продукты размером 245 п.н. с исследованными человеческими и птичьими вирусами гриппа А.

Иммунофлюоресцентный анализ белка NP вируса гриппа А. Макрофаг-подобные клетки ТНР-1 выращивали в присутствии РМА в концентрации 50 нг/мл в течение 5 дней на стеклах с полилизинном при 37°C в ростовой среде RPM1-1640 в атмосфере 5% CO₂. Опытные варианты заражали вирусами гриппа А подтипов Н1, Н5 и Н9 как описано выше, контрольные оставляли незараженными. После инкубации 24 ч при 37°C в питательной среде RPM1-1640 стекла с клетками тщательно отмывали в 0,1М фосфатном буфере (ФБ) и подсушивали. Клетки последовательно фиксировали в холодных 96% этаноле и ацетоне по 5 мин. Клетки блокировали от неспецифического связывания 2% БСА в 0,1 М ФБ и затем на них наносили специфические мышиные моноклональные антитела (МКА7F5, изотип IgG2, разведение 1/100) к NP вируса гриппа Н1N1 на 30 мин при 37°C [2]. Клетки, отмытые от NP-МКА раствором ФБ, инкубировали с антимышиными FITC-мечеными МКА (IgG2 Alexa Fluor-488, разведение 1/100, Invitrogen, США), 30 мин при 20°C. Для окраски клеточных ядер использован Hoechst 33258 (Sigma, США) в разведении 1/100. После каждого этапа окраски клетки трехкратно отмывали. Препараты анализировали с использованием флюоресцентного микроскопа Axio Scope (Carl Zeiss, Германия) при увеличении в 200 раз.

Результаты

Цитопатогенное действие вирусов гриппа А на ТНР-РМА макрофаги. В ТНР-РМА Мф, зараженных птичьими вирусами гриппа А (Н5N2) и А(Н9N2) в дозе 64 ГА ед/мл, через 24 ч наблюдались внутриклеточные гранулы (выраженная зернистость) и другие признаки цитопатогенного действия (ЦПД) — изменение размеров, формы клеток и проницаемости мембраны. ЦПД виру-

са А(Н1N1)pdm09 развивалось медленно, и через 24 ч инфекции этим вирусом морфология зараженных Мф не отличалась от контроля (рис. 1).

При многоциклового гриппозной инфекции в среду культивирования добавляли протеазный ингибитор ТРСК — трипсин в дозе 1,2 мкг/мл. ЦПД птичьих вирусов было максимальным к 72 ч, когда гибель клеток достигала 100%, ЦПД человеческого вируса было значительно слабее: к 96 ч инфекции гибель составляла 50% (табл. 2).

В культуральной жидкости ТНР-РМА Мф, зараженных 3-мя исследованными вирусами гриппа, инфекционная активность не обнаружена на всех сроках инфекции 24–96 ч (< 4 ед TCID₅₀ в клетках Сасо-2). Реакция ГА с куриными эритроцитами также дала отрицательный результат (< 2 ГА ед/мл).

Уровни экспрессии РНК вирусов гриппа в ТНР-РМА макрофагах. Изучение внутриклеточных уровней РНК вирусов гриппа Н1N1, Н5N2 и Н9N2 с праймерами к гену М1 показало (рис. 2А), что уровни вирусных РНК-М1 в Мф высокие и существенно не изменяются в динамике инфекции. Результаты электрофореза в 1,5% агарозном геле подтверждают специфичность полученных ПЦР-продуктов генов М1 вирусов подтипов Н1, Н5 и Н9 (рис. 2Б). Уровни содержания РНК-М1 птичьих вирусов Н9N2 и Н5N2 (Cq16-19) оказались значительно выше, чем человеческого Н1N1pdm (Cq 26-29). Расчет уровней РНК вирусов в динамике инфекции показывает, что накопление птичьих вирусов Н9N2 и Н5N2 происходит быстрее относительно РНК вируса Н1N1pdm (табл. 3). Проникшие вирусные РНК длительно (по крайней мере в течение 3 сут) сохраняются в Мф.

Выявление NP-белков вирусов гриппа в ТНР-РМА макрофагах. Результаты исследования методом иммунофлюоресценции белка NP в ТНР-РМА Мф через 24 ч после заражения вирусами подтипов Н1, Н5 и Н9 приведены на рис. 3 (III обложка). Использовали моноклональные антитела МКА7F5 к консервативному участку белка NP вирусов гриппа А [2]. В контрольных ТНР-РМА Мф белок NP не выявлялся. В Мф, зараженных пандемическим вирусом Н1N1, выявлены единичные клетки с NP белком (зеленый) среди множества клеток, не содержащих белок и идентифицированных по окраске ядер Hoechst 33258.

Иная картина наблюдалась в Мф, зараженных вирусом Н5N2. На фоне выраженной клеточной деструкции, вызванной вирусом Н5N2, в большинстве неразрушенных клеток была обнаружена метка, свидетельствующая о локализации вирусного белка NP в цитоплазме и в ядрах. Обработка Мф IFNα2 в дозе 5 × 10⁴ МЕ/мл за 1 ч до заражения вирусом Н5N2 снижала число клеток с NP белком до единичных. При этом в обработанных IFN зараженных клетках наблюдался антивирусный эффект, который проявлялся заметным снижением ко-

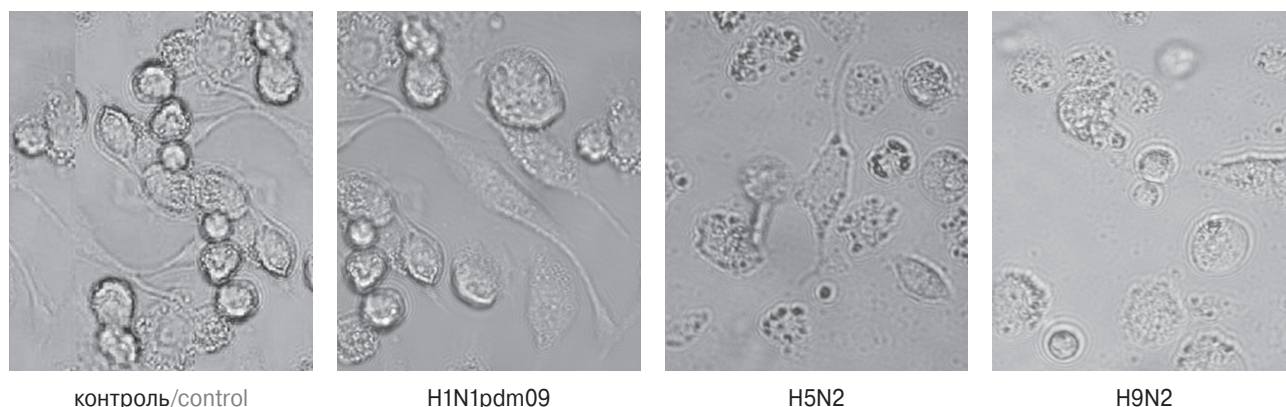


Рисунок 1. Цитопатогенное действие вирусов гриппа А на клетки ТНР-РМА. Мф через 24 ч после заражения

Figure 1. The cytopathogenic effect of influenza A viruses in THP-1 macrophages 24 h after infection

личества клеток с вирусным NP-белком в цитоплазме и в ядрах. Антивирусный эффект IFN проявлялся также в значительном увеличении количества жизнеспособных клеток с нормальной морфологией.

В ТНР-РМА Мф, зараженных вирусом H9N2, белок NP выявлялся несколько слабее (по интенсивности флуоресценции), чем в зараженных вирусом H5N2. Ранее было показано, что МКА 7F5 активно взаимодействуют в ИФА с широким набором вирусов гриппа А человека и животных различных подтипов [2], но с вирусом подтипа H9 не были изучены. Возможно, полученные результаты могут объясняться меньшей аффинностью взаимодействия МКА 7F5 с NP вируса гриппа А подтипа H9 по сравнению с другими изученными подтипами вируса А. Не исключено также, что эпитоп, с которым взаимодействует МКА 7F5, по-разному экспонирован на белке NP вируса H9N2 и 2-х других исследованных вирусов гриппа.

Обсуждение

Для анализа развития гриппозной инфекции в настоящей работе применена клеточная модель ТНР-РМА макрофагов, которая по характеристикам напоминает активированные моноцитарные макрофаги из периферической крови типа M1 [10]. В активированных ТНР-РМА Мф нами ранее показаны высокие уровни

экспрессии генов TLR/RLR-рецепторов и продукции воспалительных цитокинов, что указывает на существенную роль Мф в иммунных реакциях на вирусные патогены. Под действием РМА суспензионная культура ТНР-1 моноцитов приобретает адгезивные свойства, макрофаг-подобную морфологию и фенотип макрофагов M1 [10]. Механизмы активации моноцитов и их дифференцировки связаны с активацией группы киназ, прежде всего протеинкиназы С, а также AMPK и Syk [8, 22]. Наши исследования в ТНР-РМА Мф с вирусами гриппа А подтипов H1, H5 H9 с рецепторной специфичностью «человеческого» (Neu5Acα2-6Gal) и «птичьего» (Neu5Acα2-3Gal) типов показали, что инфекция имеет абортный характер и не сопровождается выходом из клеток инфекционных вирионов вплоть до 96 ч (время наблюдения). Полученный результат на модели ТНР-РМА Мф согласуется с сообщениями о блокировании этапов высвобождения инфекционных вирионов гриппа А в первичных культурах моноцитарных (ММф) и альвеолярных (АМф) макрофагов [17, 20, 25]. Латентная форма инфекции наблюдалась и в культурах моноцитов ТНР-1 и U-937 при низкой множественности инфекции вирусами гриппа H3N2 (Брисбен 10/07) и H1N1pdm09 (Санкт-Петербург, 2009) [4]. По мнению ряда исследователей наиболее вероятная стадия блока репликации птичьих вирусов гриппа в ММф и АМф — сборка вирионов [17, 20, 25].

Таблица 2. Цитопатогенное действие вирусов гриппа А на ТНР-РМА макрофаги

Table 2. Cytopathogenic effect of influenza A viruses on THP-1 macrophages

Название штаммов вирусов гриппа А Name of strains of influenza A viruses	Доза заражения, ГА ед. Dose infection, HA unit	Цитопатический эффект*/Cytopathic effect*			
		24 ч/24 h	48 ч/48 h	72 ч/72 h	96 ч/96 h
Контроль клеток/Cell Control	0	0	0	0	0
H1N1/Moscow/IIV01/2009	64	0	25	25	50
H5N2/Mallard/Pennsylvania/10218/84	64	50	75	100	100
H9N2/Swine/HongKong/9/98	64	50	75	100	100

Примечание. *Процент нежизнеспособных клеток к общему количеству клеток.

Note. *Percent of not viable cells to the total cell number.

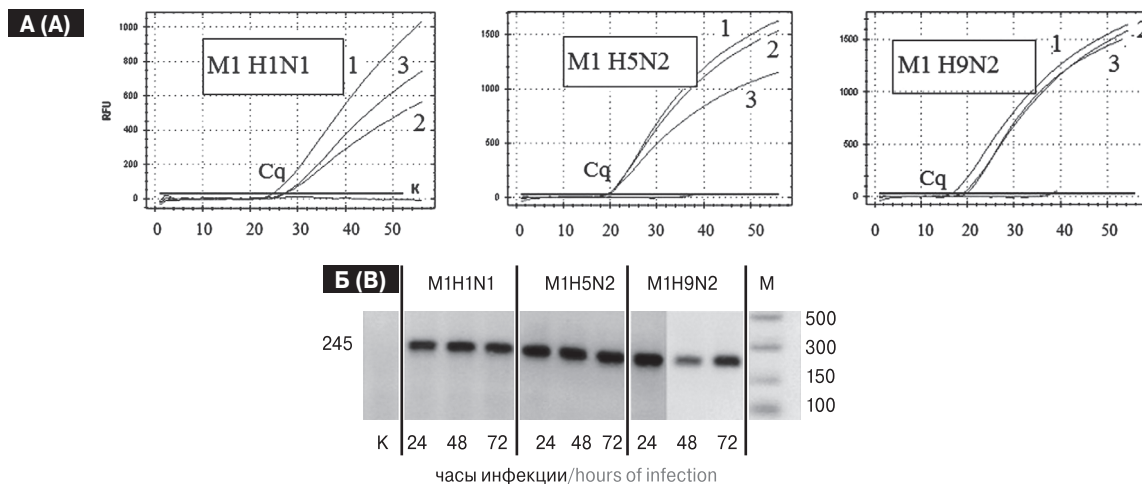


Рисунок 2. Внутриклеточные уровни вирусных РНК М1 в ТНР-РМА макрофагах в динамике инфекции

Figure 2. Intracellular levels of viral RNA M1 in THP-PMA macrophages in the course of infection

А) ОТ-ПЦР РНК-М1. Сроки инфекции: 24 ч (1), 48 ч (2), 72 ч (3). Б) электрофорез ПЦР-продуктов в 1,5% агарозном геле с бромистым этидием. Размер специфического ДНК-амплификата 245 п.н., М — маркеры молекулярной массы.

A) RT-PCR RNA M1. Infection time is 24 h (1), 48 h (2), 72 h (3). B) electrophoresis of PCR products in a 1.5% agarose gel with ethidium bromide. The size of the specific DNA amplificate is 245 bp, M — markers of molecular weight.

Блокирующий механизм у вирусов гриппа А с разной патогенностью может различаться вследствие существования многообразных механизмов ускользания от иммунного ответа [18].

Важно отметить различия в abortивном течении инфекции пандемическим H1N1 (2009 г.) и птичьими вирусами H5N2 и H9N2. Вирусы отличаются уровнями проникновения и экспрессии вирусной РНК (ген М1) и белка нуклеокапсида (NP). Птичьи вирусы с подтипами гемагглютининов H5N2 и H9N2 эффективно взаимодействуют с активированными Мф и вызывают в них быстрое цитодеструктивное действие. Человеческий вирус H1N1pdm09 проникает в такие Мф медленно и до 72 ч не вызывает гибели клеток. Предобработка ТНР-РМА Мф рекомбинантным IFN α 2 оказывает защитный эффект, подавляя накопление NP белка вируса H5N2 в ядрах Мф. По данным литературы

проникновение птичьих вирусов гриппа H5N2 и H9N2 связано не только с рецепторной активностью гемагглютинаина, но и с использованием ими дополнительных рецепторов, усиливающих связывание с Мф, а также эндоцитоза (С-тип лектины и Fc-иммуноглобулины) [12, 16]. Рекомбинантный пандемический вирус гриппа А(H1N1) с геном гемагглютинаина птичьего вируса H5N1, приобрел способность размножаться в Мф продуктивно [17].

Особый интерес представляет феномен длительного внутриклеточного присутствия вирусных РНК и ядерная локализация белка NP. Тем самым Мф выполняет особую функцию депонирования вирусных компонентов и доставки их в места воспаления [18]. Подобная картина с вирионными РНК вируса H5N1 и его эскейп-мутанта в динамике наблюдения описана нами ранее в лимфоцитах 2-х доноров [6]. Начиная с ранних сроков инфекции, в лимфоцитах выявлялись вирионные РНК ГА и их количество менялось незначительно до 48 ч. При этом в культуральной жидкости лимфоцитов ни гемагглютинирующей активности, ни инфекционного вируса не было обнаружено.

Полученные данные показали, что различное течение и исход гриппозной инфекции при заражении человека вирусом гриппа А подтипов H5 и H9 или вирусом гриппа А(H1N1)pdm09, является следствием быстрой и массивной гибели макрофагов человека при заражении вирусами гриппа птиц по сравнению с пандемическим вирусом. Необходимы дальнейшие исследования влияния вирусных нуклеиновых кислот и белков на иммунные функции Мф, которые позволят раскрыть молекулярные и клеточные механизмы регуляции гриппозной инфекции в иммунокомпетентных клетках.

Таблица 3. Относительные уровни РНК М1 в ТНР-РМА макрофагах в динамике инфекции вирусами гриппа А разных подтипов

Table 3. Relative levels of M1 RNA in THP-PMA macrophages in dynamics of infection with influenza A viruses of different subtypes

Вирусы гриппа А Influenza A viruses	deltaCq РНК-М1*/deltaCq RNA-М1*		
	24 ч/24 h	48 ч/48 h	72 ч/72 h
H1N1pdm*	1±0,8	2±1,5	16±1,7
H5N2	512±12	496±14	256±16
H9N2	4096±43	512±11	512±14

Примечание. *ДельтаCq±SD рассчитаны в программе «Gene expression manager CFX-96» относительно РНК М1 вируса А(H1N1)pdm09 в 3-х повторных образцах на сроке 24 ч после заражения.
Note. *DeltaCq±SD are calculated in the «Gene expression manager CFX-96» program relatively M1 RNA virus А(H1N1)pdm09 in 3 replicate samples at a time of 24 h after infection.

Список литературы/References

- Игнатъева А.В., Тимофеева Т.А., Руднева И.А., Шилов А.А., Масалова О.В., Климова Р.Р., Куш А.А., Ильюшина Н.А., Каверин Н.В. Влияние аминокислотных замен в малой субъединице гемагглютинина вируса гриппа птиц H5N2 на селекцию мутантов, резистентных к нейтрализующим моноклональным антителам // Молекулярная биология. 2015. Т. 49, № 2. С. 342–350. [Ignatieva A.V., Timofeeva T.A., Rudneva, I.A., Shilov A.A., Masalova O.V., Klimova R.R., Kusch A.A., Ilyshina N.A., Kaverin N.V. Effect of amino acid substitutions in the small subunit of the avian H5N2 influenza virus hemagglutinin on selection of the mutants, resistant to neutralizing monoclonal antibodies. *Molekulyarnaya biologiya = Molecular Biology*, 2015, vol. 49, no. 2, pp. 342–350. doi: 10.7868/S0026898415020044 (In Russ.)]
- Климова Р.Р., Масалова О.В., Бурцева Е.И., Чичев Е.В., Леснова Е.И., Оскерко Т.А., Мукашева Е.А., Руднева И.А., Львов Д.К., Куш А.А. Моноклональные антитела к пандемическому вирусу гриппа А/ИВ-Москва/01/2009 (H1N1) swl, обладающие вируснейтрализующей активностью // Вопросы вирусологии. 2011. Т. 56, № 3. С. 15–20. [Klimova R.R., Masalova O.V., Burtseva E.I., Chichev E.V., Lesnova E.I., Oskerko T.A., Mukasheva E.A., Rudneva I.A., L'vov D.K., Kusch A.A. Monoclonal antibodies with high neutralizing activity against pandemic influenza virus A/IV-Moscow/01/2009 (H1N1)swl. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 2011, vol. 56, no. 3, pp. 15–20. (In Russ.)]
- Львов Д.К., Бурцева Е.И., Прилипов А.Г., Базарова М.В., Колобухина Л.В., Меркулова Л.Н., Малышев Н.А., Дeryabin П.Г., Федякина И.Т., Садыкова Г.К., Усачев Е.В., Щелканов М.Ю., Шевченко Е.С., Трушакова С.В., Иванова В.Т., Белякова Н.В., Оскерко Т.А., Алипер Т.И. Изоляция 24.05.09 и депонирование в государственную коллекцию вирусов (ГКВ 2452 от 24.05.09) первого штамма А/ИВ-Москва/01/09 (H1N1)swl, подобного свиному вирусу А(H1N1) от первого выявленного 24.05.09 больного в Москве // Вопросы вирусологии. 2009. Т. 54, № 5. С. 10–14. [L'vov D.K., Burtseva E.I., Prilipov A.G., Bazarova M.V., Kolobukhina L.V., Merkulova L.N., Malyshev N.A., Deryakina I.T., Sadykova G.K., Usachev E.V., Shchelkanov M.Yu., Shevchenko E.S., Trushakova S.V., Ivanova V.T., Belyakova N.V., Oskerko T.A., Aliper T.I. The 24 May, 2009 isolation of the first A/IV-Moscow/01/2009 (H1N1)swl strain similar to swine A(H1N1) influenza virus from the first Moscow case detected on May 21, 2009, and its deposit in the State Collection of Viruses (SCV No. 2452 dated May 24, 2009). *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 2009, vol. 54, no. 5, pp. 10–14. (In Russ.)]
- 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, ТНР-1, U-937) // Цитология. 2015. Т. 57, № 7. С. 527–532. [Smirnova T.D., Danilenko D.M., Ilyinskaya E.V., Smirnova S.S., Eroptkin M.Yu. Impact of various multiplicity of infection of influenza A virus on proliferation and apoptosis induction in cultured cell lines of lymphocytic and monocytic origin (JURKAT, NC-37, TNP-1 and U-937). *Tsitologiya = Cytology*, 2015, vol. 57, no. 7, pp. 527–532. (In Russ.)]
- Соколова Т.М., Полосков В.В., Бутова О.С., Шувалов А.Н., Соколова З.А., Иншаков А.Н., Шишкин Ю.В., Ершов Ф.И. Действие интерферонов и ИФН-индукторов на экспрессию генов TLR/RLR-рецепторов и дифференцировку опухолевых линий клеток ТНР-1 и НСТ-116 // Российский биотерапевтический журнал. 2016. Т. 15, № 3. С. 28–33. [Sokolova T.M., Poloskov V.V., Burova O.S., Shuvalov A.N., Sokolova Z.A., Inshakov A.N., Shishkin Yu.V., Ershov F.I. Action interferons and IFN-inductors on TLR/RLR genes expression and differentiation of tumor cell lines TNP-1 and HCT-116. *Rossiiskii bioterapevticheskii zhurnal = Russian Biotherapeutic Journal*, 2016, vol. 15, no. 3, pp. 28–33. doi: 10.17650/1726-9784-2016-15-3-28-33 (In Russ.)]
- Соколова Т.М., Полосков В.В., Шувалов А.Н., Руднева И.А., Ершов Ф.И. Рекомбинантный птичий вирус гриппа H5N1(A/Vietnam/1203/04) и его «эскейп» мутант m13(13) индуцируют в лимфоцитах человека ранние сигнальные реакции иммунитета // Вопросы вирусологии. 2016. Т. 61, № 1. С. 22–26. [Sokolova T.M., Poloskov V.V., Shuvalov A.N., Rudneva I.A., Ershov F.I. Avian recombinant virus H5N1 influenza(A/Vietnam/1203/04) and its “escape” mutant m13(13) induce early signaling reactions of immunity in human lymphocytes. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 2016, vol. 61, no. 1, pp. 22–26. doi: 10.18821/0507-4088-2016-61-1-21-26 (In Russ.)]
- Тимофеева Т.А., Игнатъева А.В., Руднева И.А., Мочалова Л.В., Бовин И.В., Каверин Р.В. Влияние мутаций, меняющих антигенную специфичность, на рецептор связывающую активность гемагглютинина вирусов гриппа А подтипов H1 и H5 // Вопросы вирусологии. 2013. Т. 58, № 1. С. 24–27. [Timofeeva T.A., Ignatieva A.V., Rudneva I.A., Mochlova L.V., Bovin N.V., Kaverin N.V. Effect of mutations changing the antigenic specificity on the receptor-binding activity of the influenza virus hemagglutinin of H1 and H5. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 2013, vol. 58, no. 1, pp. 24–27. (In Russ.)]
- Chang M.-Y., Huang D.-Y., Ho F.M., Huang K.-C., Lin W.-W. PKC-dependent human monocyte adhesion requires AMPK and Syk activation. *PLoS ONE*, 2012, vol. 7, no. 7:e40999. doi: 10.1371/journal.pone.0040999
- Chanput W., Mes J.J., Wichers H.J. TNP-1 cell line: an in vitro cell model for immune modulation approach. *Int. Immunopharmacol.*, 2014, vol. 23, no. 1, pp. 37–45. doi: 10.1016/j.intimp.2014.08.002
- Daigneault M., Preston J.A., Marriott H.M., Whyte M.K.B., Dockrell D.H. The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated TNP-1 cells and monocyte-derived macrophages. *PLoS ONE*, 2010, vol. 9, no. 1:e8668. doi: 10.1371/journal.pone.0008668
- Fouchier R.A.M., Bestebroer T.M., Herfst S., van der Kemp L., Rimmelzwaan G.F., Osterhaus A.D.M.E. Detection of influenza A viruses from different species by PCR amplification of conserved sequences in the matrix gene. *J. Clin. Microbiol.*, 2000, vol. 38, no. 11, pp. 4096–4101.
- Goffard A., Alidjinou E.K., Sané F., Choteau L., Bouquillon C., Caloone D., Lobert P.E., Hober D. Antibodies enhance the infection of phorbol-ester-differentiated human monocyte-like cells with coxsackievirus B4. *Microbes Infect.*, 2013, vol. 15, no. 1, pp. 18–27. doi: 10.1016/j.micinf.2012.10.005
- Hoeve M.A., Nash A.A., Jackson D., Randall R.E., Dransfield I. Influenza virus A infection of human monocyte and macrophage subpopulations reveals increased susceptibility associated with cell differentiation. *PLoS ONE*, 2012, vol. 7, no. 1:e29443. doi: 10.1371/journal.pone.0029443
- Jahangir A., Ruenphet S., Hara K., Shoham D., Sultana N., Okamura M., Nakamura M., Takehara K. Evaluation of human intestinal epithelial differentiated cells (CaCo-2) for replication, plaque formation and isolation of avian influenza viruses. *J. Virol. Meth.*, 2010, vol. 169, iss. 1, pp. 232–238. doi: 10.1016/j.jviromet.2010.07.023

15. Kaverin N.V., Rudneva I.A., Ilyushina N.A., Lipatov A.S., Krauss S., Webster R.G. Structural differences among hemagglutinins of influenza A virus subtypes are reflected in their antigenic architecture: analysis of H9 escape mutants. *J. Virol.*, 2004, vol. 78, no. 1, pp. 240–249. doi: 10.1128/JVI.78.1.240-249.2004
16. Londrigan S.L., Tate M.D., Brooks A.G., Reading P.C. Cell-surface receptors on macrophages and dendritic cells for attachment and entry of influenza virus. *J. Leukoc. Biol.*, 2012, vol. 92, iss. 1, pp. 97–106. doi: 10.1189/jlb.1011492
17. Marvin S.A., Russier M., Huerta C.T., Russell C.J., Schultz-Cherry S. Influenza overcomes cellular blocks to productively replicate impacting macrophage function. *J. Virol.*, 2017, vol. 91, no. 2:e01417-16. doi: 10.1128/JVI.01417-16
18. Pulendran B., Maddur M.S. Innate immune sensing and response to influenza. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 2015, vol. 386, pp. 23–71. doi: 10.1007/82_2014_405
19. Rudneva I.A., Timofeeva T.A., Ignatieva A.V., Shilov A.A., Ilyushina N.A. Effects of hemagglutinin amino acid substitutions in H9 influenza A virus escape mutants. *Arch. Virol.*, 2016, vol. 161, iss. 12, pp. 3515–3520. doi: 10.1007/s00705-016-3038-x
20. Short K.R., Brooks A.G., Reading P.C., Londrigan S.L. The fate of influenza A virus infection of human macrophages and dendritic cells. *J. Gen. Virol.*, 2012, vol. 93, pp. 2315–2325. doi: 10.1099/vir.0.045021-0
21. Smirnov Y.A., Lipatov A.S., Van Beek R., Gitelman A.K., Osterhaus A.D., Claas E.C. Characterization of adaptation of an avian influenza A (H5N2) virus to mammalian host. *Acta Virol.*, 2000, vol. 44, no. 1, pp. 1–8.
22. Sumiya Y., Ishikawa M., Inoue T., Inui T., Kuchiike D., Kubo K., Uto Y., Nishikata T. Macrophage activation mechanisms in human monocytic cell line-derived macrophages. *Anticancer Res.*, 2015, vol. 35, no. 8, pp. 4447–4451.
23. Tsuchiya S., Yamabe M., Yamaguchi Y., Kobayashi Y., Konno T., Tada K. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int. J. Cancer*, 1980, vol. 26, no. 2, pp. 171–176.
24. Uchida N., Ohya K., Yuan B., Bessho T., Yamakawa T. Differentiation of monocytes to macrophages induced influenza virus infected apoptotic cells. *J. Gen. Virol.*, 2002, vol. 83, iss. 4, pp. 747–751. doi: 10.1099/0022-1317-83-4-747
25. Van Riel D., Leijten L.M., van der Eerden M., Hoogsteden H.C., Boven L.A., Lambrecht B.N., Osterhaus A.D., Kuiken T. Highly pathogenic avian influenza virus H5N1 infects alveolar macrophages without virus production or excessive TNF-alpha induction. *PLoS Pathog.*, 2011, vol. 7, no. 6:e1002099. doi: 10.1371/journal.ppat.1002099
26. Webster R.G., Govorkova E.A. Continuing challenges in influenza. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2014, vol. 1323, iss. 1, pp. 115–139. doi: 0.1111/nyas.12462
27. Yu W.C.L., Chan R.W.Y., Wang J., Traventy E.A., Nichoilis J.M., Peiris J.S., Mason R.J., Chan M.C.W. Viral replication and innate host response in primary human alveolar epithelial cells and alveolar macrophages infected with influenza H5N1 and H1N1 viruses. *J. Virol.*, 2011, vol. 85, no. 14, pp. 6844–6855. doi: 10.1128/JVI.02200-10

Авторы:

Соколова Т.М., академик РАЕН, д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной инженерии, подразделение НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ НИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи МЗ РФ, Москва, Россия;

Полосков В.В., научный сотрудник лаборатории цитокинов ФГБУ НИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи МЗ РФ, Москва, Россия;

Шувалов А.Н., к.м.н., научный сотрудник лаборатории онтогенеза и коррекции системы интерферона ФГБУ НИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи МЗ РФ, Москва, Россия;

Руднева И.А., к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории физиологии вирусов, подразделение НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ НИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи МЗ РФ, Москва, Россия;

Тимофеева Т.А., к.б.н., руководитель лаборатории физиологии вирусов, подразделение НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ НИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи МЗ РФ, Москва, Россия;

Климова Р.Р., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории клеточной инженерии, подразделение НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ НИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи МЗ РФ, Москва, Россия;

Масалова О.В., д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной инженерии, подразделение НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ НИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи МЗ РФ, Москва, Россия;

Куц А.А., д.б.н., профессор, руководитель лаборатории клеточной инженерии, подразделение НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ НИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи МЗ РФ, Москва, Россия.

Authors:

Sokolova T.M., RANS Full Member, PhD, MD (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Cell Engineering, N.F. Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;

Poloskov V.V., Researcher, Laboratory of Cytokines, N.F. Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;

Shuvalov A.N., PhD (Medicine), Researcher, Laboratory of Ontogenesis and Correction of the Interferon System, N.F. Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;

Rudneva I.A., PhD (Biology), Leading Researcher, N.F. Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;

Timofeeva T.A., PhD (Biology), Head of Laboratory of Physiology of Viruses, N.F. Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;

Klimova R.R., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Cell Engineering, N.F. Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;

Masalova O.V., PhD, MD (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Cell Engineering, N.F. Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;

Kushch A.A., PhD, MD (Biology), Professor, Head of Laboratory of Cell Engineering, N.F. Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation.

Поступила в редакцию 11.07.2017
Отправлена на доработку 23.01.2018
Принята к печати 27.02.2017

Received 11.07.2017
Revision received 23.01.2018
Accepted 27.02.2017