

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ВИРУСА ГРИППА А(H1N1)pdm09 С МОНОЦИТАРНЫМИ МАКРОФАГАМИ *IN VITRO*: ИНДИВИДУАЛЬНЫЕ РЕАКЦИИ ГЕНОВ TLR7 И RIG1 РЕЦЕПТОРОВ

**Соколова Т.М., Полосков В.В., Шувалов А.Н., Руднева И.А.,
Тимофеева Т.А.**

ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Резюме. Дифференцировка моноцитов крови доноров в макрофаги (Мф) под действием GM-CSF сопровождается значительным увеличением уровней транскрипции генов сигнальных рецепторов TLR7 или RIG1. В динамике инфекции Мф вирусом гриппа А H1N1pdm (Москва, 2009) уровни внутриклеточных вирусных РНК (ген М1) сохраняются на высоком уровне. Вызываемые вирусом гриппа А реакции генов рецепторов врожденного иммунитета имеют индивидуальный характер: в Мф донора 1 с исходно высокими уровнями эндосомального гена TLR7 активность снижается, а в Мф донора 2 с исходно низкими уровнями активность гена TLR7 возрастает. Вирус H1N1pdm слабо стимулирует экспрессию гена RIG1 и продукцию воспалительных цитокинов в Мф донора 1. Различия могут быть связаны с индивидуальной чувствительностью 2-х доноров к гриппозной инфекции.

Ключевые слова: вирус гриппа А (H1N1)pdm09, моноцитарные макрофаги, экспрессия генов TLR7, RIG1 рецепторы

***IN VITRO* INTERACTION OF INFLUENZA VIRUS A(H1N1)pdm09 WITH MONOCYtic MACROPHAGES: INDIVIDUAL RESPONSES OF TLR7 AND RIG1 RECEPTOR GENES**

**Sokolova T.M., Poloskov V.V., Shuvalov A.N., Rudneva I.A.,
Timofeeva T.A.**

N.F. Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

Abstract. *In vitro* differentiation of donor blood monocytes to macrophages (Mph) following GM-CSF treatment was accompanied by a significant increase in the levels of gene transcription signaling receptors TLR7 or RIG1. The levels of intracellular viral RNA (M1 gene) in Mph remained high upon infection by influenza virus A H1N1pdm (Moscow 2009) for 24-96 hours. The innate immunity reactions caused by influenza virus show individual features: they are decreased in Mph from donor 1 which had initially high level of endosomal TLR7 gene activity, and it increased by influenza virus in MPh from donor 2 who had a very low level of TLR7 gene expression. The influenza H1N1pdm virus weakly stimulated expression of gene RIG1 and production of inflammatory cytokines in Mf in donor 1. The differences may be connected with individual sensitivity of the donors to influenza infection.

Keywords: influenza virus A (H1N1)pdm09, monocytic macrophages, gene expression TLR7, RIG1 receptors

Адрес для переписки:

Соколова Татьяна Михайловна
ФГБУ «Национальный исследовательский центр
эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика
Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ
123098, Россия, Москва, ул. Гамалеи, 18.
Тел.: 8 (499) 190-30-49.
E-mail: tmsokolovavir@mail.ru

Address for correspondence:

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

Образец цитирования:

Т.М. Соколова, В.В. Полосков, А.Н. Шувалов,
И.А. Руднева, Т.А. Тимофеева «Взаимодействие вируса
гриппа А(H1N1)pdm09 с моноцитарными макрофагами
in vitro: индивидуальные реакции генов TLR7 и RIG1
рецепторов» // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19,
№ 6. С. 721-730.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-6-721-730

© Соколова Т.М. и соавт., 2017

For citation:

T.M. Sokolova, V.V. Poloskov, A.N. Shuvalov, I.A. Rudneva,
T.A. Timofeeva "In vitro interaction of influenza virus A
(H1N1) pdm09 with monocytic macrophages: individual
responses of TLR7 and RIG1 receptor genes", *Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2017,
Vol. 19, no. 6, pp. 721-730.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-6-721-730

DOI: 10.15789/1563-0625-2017-6-721-730

Введение

Вирус гриппа А (H1N1)pdm09, вызвавший пандемию 2009 г., возник в результате реассортации двух свиных генотипов вируса гриппа А(H1N1) на территории Мексики и быстро распространился в человеческую популяцию [1, 3, 17]. Макрофаги (Мф) являются важнейшими составляющими врожденной иммунной системы [16]. Благодаря Мф в организме поддерживается тканевой гомеостаз и баланс взаимодействия с клетками микроокружения. Популяции Мф, образованные из дифференцированных моноцитов, гетерогенны по составу и являются долгоживущими клетками.

На Мф представлены рецепторы PRRs (pattern-recognition receptors), узнающие вирусные структуры. Защитные реакции Мф во многом зависят от способности этих рецепторов распознавать вирусные структуры и инициировать внутриклеточные сигнальные процессы индукции синтеза воспалительных цитокинов и интерферонов типа 1 [25].

Вирусы гриппа А на ранних стадиях инфекции стимулируют реакции TLR/RLR-врожденного и адаптивного иммунитета [19, 21]. На клеточной мембране рецептор TLR4 и С-тип лектиновых рецепторов (MMR-манозный и MGL-галактозный) взаимодействуют с гликопротеинами оболочки — гемагглютинином (ГА) и нейраминидазой (НА) [22]. Внутри клеток эндосомальные рецепторы TLR3, TLR7, TLR10 и цитоплазматический RIG1 реагируют на вирусные РНК и РНП [18, 29, 32].

Исследования на нескольких моделях Мф показывают, что результат взаимодействия с вирусами гриппа А зависит от многих факторов. Имеет значение источник получения и способ активации Мф, достигаемый Мф уровень дифференцировки. Со стороны вируса влияют особенности углеводной структуры гликопротеинов вирусной оболочки, прежде всего ГА и НА, и степень патогенности штаммов и изолятов вирусов гриппа А [14, 27]. На поверхности Мф присутствуют α -2,3- и α -2,6-связанные сиаловые кислоты, с которыми взаимодействуют ГА вирусов гриппа [31].

С пандемическим свиным H1N1, высокопатогенным птичьим H5N1 и сезонными вирусами гриппа А H1N1и H3N2 на моделях Мф проведен ряд исследований [13, 27, 28, 30]. Альвеолярные Мф играют центральную роль в реакциях врожденного и адаптивного иммунитета при респираторных инфекциях. В большинстве экспериментов А-Мф оказались резистентными к вирусам H1N1, но чувствительными к птичьим вирусам H5N1. Для получения А-Мф *in vitro* используется классический способ дифференцировки моноцитов периферической крови добавлением

GM-CSF (гранулоцитарно-макрофагальный-колониестимулирующий фактор) на 7-14 дней, имитируя условия образования А-Мф с фенотипом M1 в легких человека [9, 15].

В настоящей работе для выяснения влияния пандемического вируса H1N1 на систему рецепторов врожденного иммунитета Мф мы применили GM-CSF-способ. В GM-Мф оценили экспрессию 2-х генов сигнальных рецепторов TLR7 и RIG1 и фермента гликолиза GAPDH. Активность рецепторных генов сопоставили с уровнями вирусной РНК в GM-Мф и секрецией группы воспалительных цитокинов (IFN α , IFN γ , TNF α , IL-1 β , IL-10). Эксперименты проводили в динамике вирусной инфекции, моделируя длительный контакт моноцитарных GM-Мф с вирусом гриппа АH1N1pdm. Известно, что TLRs являются IFN-стимулированными генами в клетках крови человека, и, по нашим данным, вирус гриппа А (H1N1)pdm09 чувствителен к рекомбинантному альфа2-IFN [6].

Материалы и методы

Вирус гриппа А/HIV-Moscow/01/09 (H1N1)sw1 [2, Патент RU № 2412244] получен из лаборатории физиологии вирусов Подразделения «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского» ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи. Вирус размножен в 10-дневных куриных эмбрионах и ранее исследован на антигенную и рецепторную специфичность гемагглютинина [8]. Приготовленные образцы аллантаоисных вирусов с титром 64-128 ГА/мл и ЭИД₅₀ = 7,2 хранили при -80 °С в аликвотах по 0,5 мл. ГА активность вирусов определяли микрометодом в реакции с 1% куриными эритроцитами, приготовленными на физиологическом растворе NaCl с рН 7,2.

Моноцитарные макрофаги получали из 20 мл периферической крови 2-х доноров (мужчины 25 и 27 лет). В градиенте фикола выделяли фракцию лимфоцитов, которую отмывали, разводили в питательной среде RPMI-1640 с глутамином и 10% эмбриональной сывороткой телят до концентрации 4×10^6 кл/мл и разливали в пластиковые матрацы 25 см². Прикрепленные к пластику моноциты культивировали в питательной среде с человеческим рекомбинантным GM-CSF 40 нг/мл (SRP 3050 Sigma-Aldrich) в течение 7 дней при 37 °С. Микроскопическое исследование GM-Мф проводили в инвертированном световом микроскопе DMIL (Leica Microsystems, Германия) при увеличении в 200 раз (рис. 1).

Заражение GM-Мф вирусом гриппа А (H1N1) pdm09. Аллантаоисный вирус 64-128 ГА ед/мл разводили в 10 раз питательной средой RPMI-1640 добавляли в количестве 1 мл к монослойным культурам Мф для адсорбции вируса на 1 ч при

37 °С. Контрольные клетки (моноциты без GM-CSF и моноциты с GM-CSF) не заражали вирусом. Несвязанный с клетками вирус дважды отмывали и зараженные клетки инкубировали в питательной среде RPMI-1640 без сыворотки. Для получения многоциклового инфицирования зараженные GM-Мф культивировали в присутствии ТРСК-трипсина 1 мкг/мл в течение 24, 48, 72 и 96 ч при 37 °С. В динамике инфекции оценивали развитие цитопатогенного эффекта (ЦПЭ) и собирали пробы культуральной жидкости для определения ГА активности вирусов и секретируемых цитокинов. В клетках тестировали уровни экспрессии клеточных и вирусных РНК. Собранные пробы хранили при -70 °С.

Метод ОТ-ПЦР в реальном времени

Суммарную РНК выделяли из клеток по методике, рекомендованной производителем реагента PureZol (Cat#732-6890 Bio-Rad, США). ДНК удаляли с помощью набора "RNA-free" (Ambion, США). На матрице РНК получали кДНК в реакции обратной транскрипции (ОТ) с random (случайные) праймерами. Использовали фермент MMuLV и 5 × буфер ОТ, ингибитор RNAsin и 4 вида dNTP (Promega, USA).

С полученной кДНК, разведенной в 3 и 6 раз, парами специфических олигонуклеотидных праймеров ставили ПЦР, добавляя 2-кратную смесь SsoFast EvaGreen Supermix (Bio-Rad, США).

ПЦР проводили на приборе CFX-96 (Bio-Rad, США) в режиме реального времени. Протокол ПЦР: 96 °С 2 мин, далее 55 циклов 94 °С 10 с, 50-54 °С 20 с, 72 °С 30 с. Пороговые циклы (Cq) регистрировали в логарифмической фазе нарастания сигнала флуоресценции красителя EvaGreen. Относительная оценка кратности экспрессии генов (дельтаCq) сделана в программе CFX Manager "Gene expression analysis" в автоматическом режиме с оценкой средних стандартных ошибок в повторных образцах. Показатели контролей принимали равными 1. Относительные уровни экспрессии генов нормализовали на ген «домашнего хозяйства» GAPDH, используя 2delta-CT метод. В конечной точке ПЦР по температурным пикам плавления устанавливали специфичность ДНК-амплификатов. ДНК-амплификаты анализировали электрофорезом в 1,5% агарозном геле с бромистым этидием.

ПЦР-праймеры

Праймеры к консервативному 7 сегменту РНК (ген М1) вирусов гриппа описаны в литературе [12]. Их нуклеотидная последовательность F5-cttctaaccsgaggtcgaaacsg и R5'-agggcattttggacaagaagctcta является гомологичной участку гена М1 вируса гриппа А/Moscow/IV01/2009 (H1N1) (Генбанк NCBI accession GQ219584.1 L'vov D.K., Prilipov A.G., Sadykova G.K., Usachev E.V.). На ма-

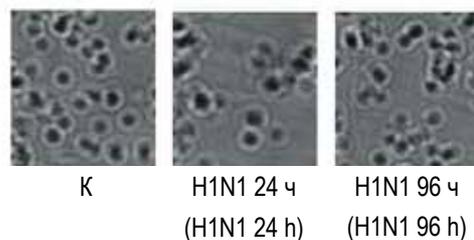


Рисунок 1. Моноциты крови, культивированные с GM-CSF в течение 7 дней

Примечание. Клетки, зараженные вирусом гриппа А H1N1pdm09, через 24 ч и 96 ч.

К – незараженные моноцитарные макрофаги. Увеличение 200×.

Figure 1. Blood monocytes cultured with GM-CSF for 7 days
Note. Cells infected with influenza virus H1N1pdm09 for 24 h or 96 h.
K, non-infected monocytic macrophages. 200× magnification.

трице вирусной мРНК специфический ДНК-продукт имеет размер 245 н.п. [6].

ПЦР-праймеры к клеточным мРНК TLR7, RIG1 и GAPDH опубликованы ранее [4, 5, 7, 20]. Синтез праймеров выполнен фирмой «Синтол» (Россия).

Иммуноферментный анализ

Секретируемые клетками цитокины IL-1β, TNFα, IL-10, IFNα и IFNγ тестированы с помощью ИФА-наборов фирмы «Вектор-Бест» (Россия) согласно прилагаемой инструкции. Измерение оптической плотности и расчет средних концентраций повторных образцов в пг/мл выполнен на Микропланшетном фотометре модель «Anthos 2010» в программе ADAP+ (Биохим-Мак, Россия).

Статистическая обработка

Данные ОТ-ПЦР в реальном времени получены с 3 повторными образцами кДНК и представлены как средние значения дельтаCq со стандартными отклонениями (SD). Величины SD не превышали 15% от значений средних. Значимость различий между образцами оценена по t-критерию Стьюдента при p < 0,05 в программе Medcalc.

Результаты

Дифференцировка моноцитов периферической крови доноров в макрофаги

Культивирование моноцитов крови доноров с GM-CSF воспроизводит условия образования альвеолярных макрофагов в легких человека [9]. Согласно стандартной методике, из периферической крови доноров выделена фракция очищенных лимфоцитов и получены прикрепившиеся к пластику моноциты. К ним добавлена питательная среда RPMI-1640, содержащая 40 нг/мл GM-CSF, на 7 дней. Не обнаружено существенных изменений в морфологии моноцитов 2-х доноров,

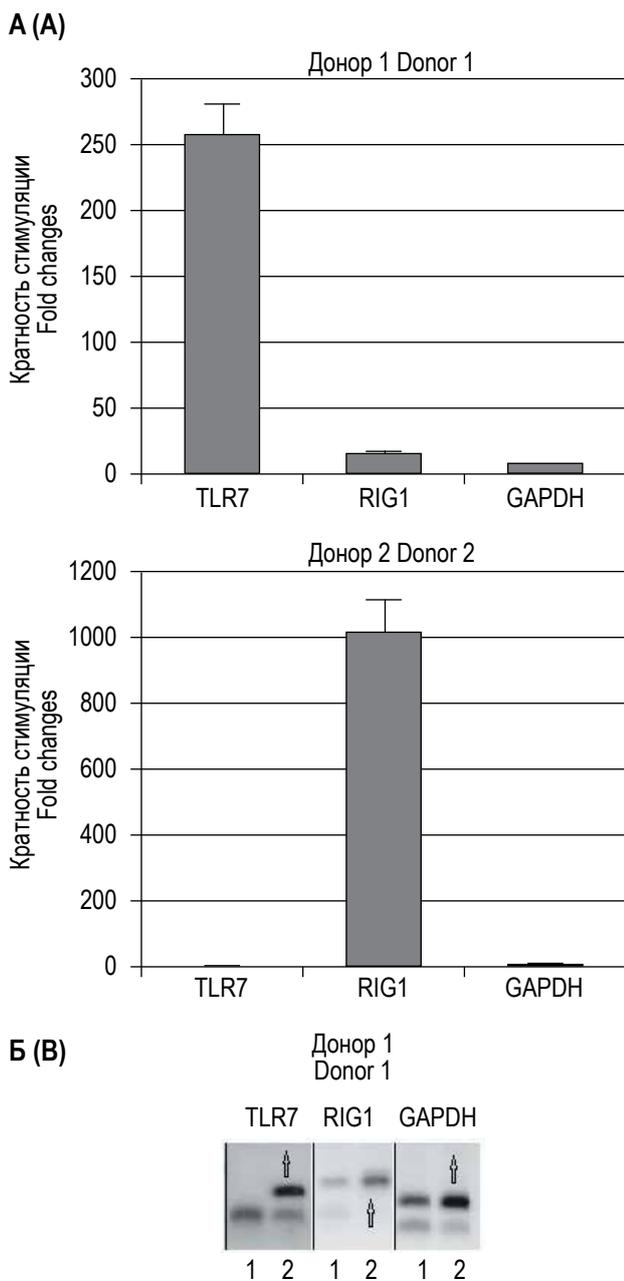


Рисунок 2. Действие GM-CSF на экспрессию генов TLR7, RIG1 и GAPDH в моноцитах крови

Примечание. (А) Моноциты культивировали с GM-CSF 40 нг/мл 7 дней. Кратность стимуляции относительно контроля клеток = 1.

(Б) Электрофорез ПЦР-продуктов в 1,5% агарозном геле. 1 – моноциты крови, 2 – моноциты крови + GM-CSF (донор 1). Стрелки показывают ПЦР-продукты TLR7 150 н.п., RIG1 163 н.п. и GAPDH 127 н.п.

Figure 2. Effect of GM-CSF on expression of TLR7, RIG1 and GAPDH genes in blood monocytes

Note. (A) Monocytes cultured with GM-CSF (40 ng/ml) for 7 days. Fold changes compared to control cell values taken as 1.

(B) Electrophoretic patterns of PCR-products in 1.5% agarose gel. 1, blood monocytes; 2, blood monocytes + GM-CSF (donor 1). Arrows show specific PCR-products (TLR7, 150 bp; RIG1, 163 bp, and GAPDH, 127 bp.)

культивированных с GM-CSF 40 нг/мл и зараженных вирусом гриппа А (H1N1)pdm через 24 и 96 ч (рис. 1). Представленные на рисунке 1 GM-Мф имеют характерную округлую форму. Цитопатогенное действие вируса (ЦПД) H1N1pdm09 в GM-Мф, как видно из рисунка 1, не развивалось. ГА-активность вируса H1N1 в культуральной жидкости не была выявлена на всех сроках гриппозной инфекции (данные не приводятся). Полученный результат подтверждает резистентность альвеолярных макрофагов с фенотипом M1 к пандемическому и сезонным вирусам гриппа А H1N1 [27].

Влияние GM-CSF на экспрессию генов сигнальных иммунных рецепторов TLR7 и RIG1 в моноцитах

GM-CSF является членом семейства цитокинов, которые регулируют рост, дифференциацию, миграцию и эффекторные функции гемопоэтических клеток и иммунцитов [10].

Сравнили действие GM-CSF на уровни экспрессии клеточных генов TLR7, RIG1 и GAPDH в контрольных моноцитах (рис. 2А, Б). Моноциты 2-х доноров имеют низкие конститутивные уровни транскрипции генов TLR7 и RIG1 (Cq43-44). Транскрипционная активность гена фермента GAPDH довольно высокая (Cq29-31), что характерно для гена «домашнего хозяйства». Этот ген часто используется в качестве показателя клеточного метаболизма и референс-нормализатора генной экспрессии.

Реакции рецепторных генов на гемопоэтический фактор имеют у 2-х доноров индивидуальный характер.

В моноцитах донора 1 под действием GM-CSF активность TLR7 возрастает в 256 раз, а в моноцитах донора 2 активность гена TLR7 остается на первоначальном низком уровне. В моноцитах донора 2, с очень низким конститутивным уровнем экспрессии гена RIG1, фактор GM-CSF стимулирует транскрипцию гена RIG1 в 1024 раза, а в моноцитах донора 1 только в 16 раз. Гемопоэтический фактор GM-CSF повышает экспрессию гена «домашнего хозяйства» GAPDH в 8 раз, по-видимому, стимулируя пролиферацию клеток.

Присутствие РНК вирусов гриппа А(H1N1)pdm09 в GM-макрофагах

Уровни внутриклеточной мРНК вируса гриппа А (H1N1)pdm09 определяли методом ОТ-ПЦР в реальном времени, используя праймеры к консервативному гену M1 [12].

На рисунке 3 (А) показаны кривые накопления вирусного генетического материала в GM-Мф 2-х доноров в динамике инфекции. В контролях незараженных клеток (К) вирусный материал отсутствует.

В динамике инфекции (24-96 ч) уровни внутриклеточной вирусной РНК M1 поддерживаются на высоком уровне (Cq26-29). Нормализация

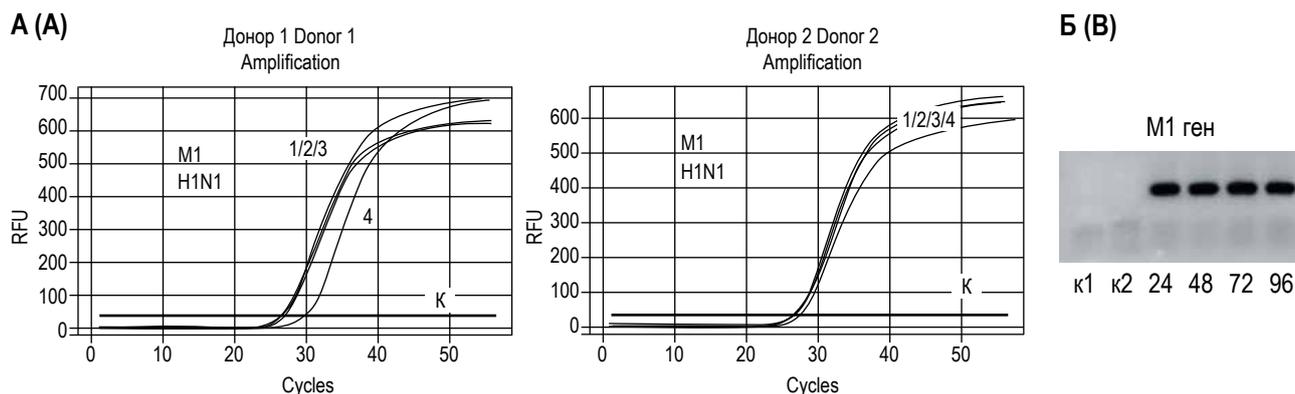


Рисунок 3. Уровни РНК М1 вируса гриппа А (H1N1)pdm09 в GM-макрофагах

Примечание. (А) накопление специфических ДНК-амплификатов гена М1 вируса гриппа. По оси абсцисс С_q – циклы амплификации ОТ-ПЦР в реальном времени, по оси ординат – уровни флюоресценции ПЦР-продуктов.

(Б) электрофорез ПЦР-продуктов гена М1 вируса гриппа А в 1,5% агарозном геле (донор 1). Специфический ДНК-продукт 245 н.п. К – контроль клеток.

Figure 3. Levels of RNA M1 influenza virus A (H1N1)pdm09 in GM-macrophages

Note. (A) Accumulation of specific DNA amplicons of M1 gene of influenza virus. Abscissa, number of cycles in real-time (RT-) PCR; ordinate, levels of fluorescent PCR-products. Numbers 1 to 4 correspond to 24, 48, 72, 96 h after virus infection; K, control cells.

(B) electrophoretic patterns of PCR-products of M1 influenza virus gene separated in 1,5% agarose gel (donor 1). Specific DNA-product 245 bp. K- control cells.

уровней вирусной РНК (2deltaC_q) на референс-ген GAPDH подтверждает сделанный вывод. Поэтому есть основания считать, что GM-Мф становятся надежным депо вирусных РНК структур.

Действие вируса гриппа А (H1N1)pdm09 на экспрессию генов сигнальных иммунных рецепторов и гена GAPDH в GM-макрофагах

В GM-Мф, зараженных вирусом гриппа А (H1N1)pdm09, исследовали уровни экспрессии генов рецепторов врожденного иммунитета: эндосомального TLR7 и цитоплазматического RIG1 (рис. 4А, Б, В, Г). Оба вида рецепторов участвуют в узнавании РНК и РНП вируса гриппа А и индуцируют сигнальные реакции антивирусного ответа [18, 21, 32].

Параллельно в динамике гриппозной инфекции у 2-х доноров оценивали активность гена фермента GAPDH (рис. 4Д, Е). Активность клеточного гена GAPDH незначительно меняется в динамике инфекции и это согласуется с данными об отсутствии выраженного ЦПД вируса гриппа pdmH1N1 в GM-Мф с 24 до 96 ч (см. рис. 1). Изменения генной активности рецепторов TLR7, RIG1 и фермента GAPDH у 2-х доноров имеют индивидуальный характер.

У донора 1 на всех сроках гриппозной инфекции уровни экспрессии 3-х исследованных генов в GM-Мф были ниже контрольных (рис. 4А, Б, В). В динамике инфекции сила ингибирующего эффекта вируса на гены иммунных рецепторов у донора 1 варьирует (рис. 4А, Б). В GM-Мф донора 2 действие вируса гриппа А H1N1pdm на экспрессию генов иммунных рецепторов отличается от донора 1. В исследованные сроки вирус стимулирует низкую транскрипционную активность

гена TLR7 относительно контроля. Уровни экспрессии гена RIG1 в GM-Мф донора 2 не меняются в динамике инфекции, оставаясь на уровне контроля (рис. 4Д). Вирус гриппа А pdmH1N1 в GM-Мф 2-х доноров незначительно снижает экспрессию гена митохондриального фермента GAPDH в динамике инфекции, оставаясь на достаточно высоких уровнях (рис. 4В, Е).

В таблице 1 приведены уровни относительной экспрессии генов TLR7 и RIG1 в Мф 2-х доноров, нормализованные на референс-ген GAPDH (2дельтаС_q). Из данных следует, что вызываемые вирусом H1N1pdm09 изменения генной активности рецепторов врожденного иммунитета носят в Мф доноров индивидуальный характер. Так, в Мф донора 1, с высоким исходным уровнем активности рецепторного гена TLR7 (С_q35), пандемический вирус гриппа А подавляет генную экспрессию, а в Мф донора 2, с низким базовым уровнем гена TLR7 (С_q44), наоборот, стимулирует активность. Имеются отличия и в реакции гена RIG1 на вирус H1N1pdm в Мф 2-х доноров. Известно, что активность рецепторных генов TLR7 и RIG1 является причиной разной восприимчивости человека к гриппозной инфекции [21].

Продукция цитокинов GM-макрофагами, зараженными вирусом гриппа А H1N1pdm09

По данным литературы, пандемический вирус гриппа А H1N1 – слабый индуктор воспалительного ответа в Мф, по сравнению с птичьими вирусами [6, 7, 24]. В наших опытах также наблюдалась очень низкая продукция цитокинов контрольными моноцитами и зараженными макрофагами донора 1 (табл. 2). Небольшие количества IFN α 2 выявлены только через 72 ч

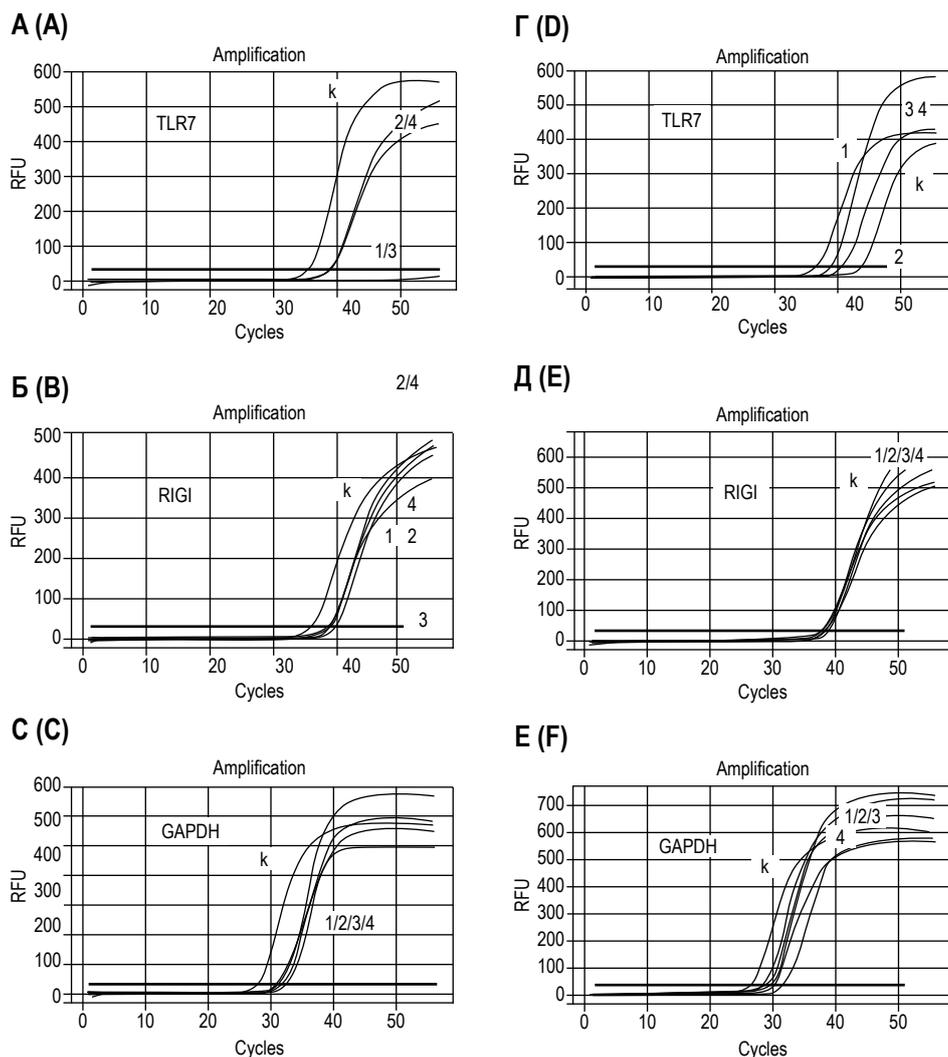


Рисунок 4. Действие вируса гриппа А (H1N1)pdm09 на экспрессию генов сигнальных иммунных рецепторов TLR7 и RIG1 и фермента GAPDH в GM-макрофагах донора 1 (А, Б, В) и донора 2 (Г, Д, Е)

Примечание. По оси абсцисс Cq – циклы амплификации ОТ-ПЦР в реальном времени, по оси ординат – уровни флюоресценции ПЦР-продуктов. Номера 1,2,3,4 (24, 48, 72, 96 часы после заражения вирусом). К – контроль клеток.

Figure 4. Effect of influenza virus A (H1N1)pdm09 upon expression of signal immune receptors TLR7 and RIG1 genes, and reference GAPDH enzyme in GM-induced macrophages from donor 1 (A, B, C) and donor 2 (D, E, F)

Note. Abscissa, number of PCR cycles in real time RT; ordinate, levels of fluorescent PCR products. Numbers 1 to 4 correspond to 24, 48, 72, 96 h after virus infection; K, control cells.

инфекции. Секретция других видов воспалительных цитокинов была на уровне чувствительности ИФА-тест систем (ЗАО «Вектор-Бест», Россия). По данным ряда исследователей и представленных нами, это связано с отсутствием продуктивной инфекции в GM-Мф, зараженных пандемическим вирусом H1N1 [28].

Обсуждение

Анализ взаимодействия структур вируса гриппа А с иммунокомпетентными клетками дает понимание их ключевой роли в развитии инфекционного процесса [25]. Известно, что вирус гриппа А активно взаимодействует с клеточными струк-

турами на этапах проникновения и синтеза вирусных компонентов. Вирусы гриппа проникают в клетки рецепторным эндоцитозом. В этом процессе участвуют белки оболочки гемагглютинин (HA) и нейраминидаза (NA), являющиеся главными вирусными антигенами.

В экспериментальных исследованиях с разными подтипами вирусов гриппа А на нескольких моделях Мф, отличающихся способами дифференциации, получены неоднозначные результаты [28]. В чувствительных эпителиальных клетках вирусы гриппа А вызывают высокопродуктивную инфекцию с освобождением инфекционного вируса. В клетках иммунной системы, макрофагах

ТАБЛИЦА 1. ИНДИВИДУАЛЬНЫЕ РЕАКЦИИ ГЕНОВ TLR7 И RIG1 МАКРОФАГОВ В ДИНАМИКЕ ИНФЕКЦИИ ВИРУСОМ ГРИППА А(H1N1)pdm09

TABLE 1. INDIVIDUAL REACTION OF TLR7 AND RIG1 GENES IN MACROPHAGES UPON INFECTION WITH INFLUENZA A VIRUS H1N1pdm09

Гены/мРНК Genes/ mRNA	Контроль Control	H1N1 24 ч H1N1 24 h	H1N1 48 ч H1N1 48 h	H1N1 72 ч H1N1 72 h	Эффект Effect
	Cq* /2dCq**	Cq*/2dCq**	Cq*/dCq**	Cq*/2dCq**	
TLR7 донор 1 donor 1	35/1	> 45/0	38/0,1	39/0,1	↓
донор 2 donor 2	44/1	36/256	39/32	40/16	↑
RIG1 донор 1 donor 1	37/1	39/0,3	39/0,3	39/0,3	↓
донор 2 donor 2	38/1	37/2	35/8	34/16	↑

Примечание. Cq* – пороговые циклы амплификации ПЦР-продуктов;
2dCq** – относительные уровни нормализованной экспрессии генов.

Note. Cq*, threshold cycle number for amplification of PCR products;
2dCq**, relative levels of normalized gene expression.

ТАБЛИЦА 2. ДЕЙСТВИЕ ВИРУСА ГРИППА А(H1N1)pdm09 НА ПРОДУКЦИЮ ЦИТОКИНОВ В GM-МАКРОФАГАХ

TABLE 2. EFFECT OF INFLUENZA A VIRUS (H1N1)pdm09 UPON PRODUCTION OF CYTOKINES IN GM-MACROPHAGES

Цитокины пг/мл* Cytokines pg/ml*	Варианты Variants				
	Контроль моноциты Control monocytes	GM-макрофаги GM-macrophages	H1N1 24 ч 24 h	H1N1 48 ч 48 h	H1N1 72 ч 72 h
IFN γ	2-6	4-4	3-5	4-6	3-6
IFN α	0,7-1	1-1	3-7	1-2	10-12
TNF α	1-1	1-2	1-1	1-1	1-2
IL-1 β	1-4	2-4	1-2	1-2	2-2
IL-10	1-0	0,7-1	0,4-2	2-2	1-2

Примечание. * – диапазон повторных измерений в 2-х опытах.

Note. *, ranges for repeated measurements in two separate experiments.

(Мф) и дендритных клетках (Дк) эффективность развития гриппозной инфекции может быть как продуктивной, так и abortивной. Это зависит от субтипа HA, патогенности вируса и уровня клеточной дифференцировки.

В настоящем исследовании гриппозная инфекция была вызвана вирусом H1N1pdm в Мф, полученных культивированием с GM-CSF моноцитов 2-х случайных доноров [9, 15]. Свойства GM-Мф похожи на альвеолярные Мф (А-Мф), которые играют главную роль в респираторных инфекциях. Известно, что GM-Мф, подобно клеткам MDCK, содержат на своей поверхности $\alpha 2,6$ - и $\alpha 2,3$ -сиаловые кислоты, взаимодействующие с ГА человеческих и птичьих вирусов [31]. По-

этому рецепторная специфичность ГА ($\alpha 2,6$ -gal) исследованного штамма вируса H1N1/Moscow/IV01/2009 позволяет ему взаимодействовать с GM-Мф и вызывать индукцию воспалительных сенсоров TLR/RLRs/NLPR3 [27, 28].

Инфекция вирусом H1N1pdm развивалась GM-Мф по abortивному типу без клеточной деструкции и секреции гемагглютининов. В зараженных GM-Мф длительно присутствовали вирусные РНК – агонисты эндоплазматического TLR7 и цитоплазматического RIG1 рецепторов [18, 32]. От активности этих рецепторов во многом зависят антивирусные функции Мф и степень воспалительного ответа [25]. По-видимому, баланс между этими функциями Мф существенен

для патогенеза. Пока остается неясным, является ли длительное присутствие РНК-лигандов в макрофагах защитной клеточной реакцией (абортная инфекция) или, наоборот, абортная инфекция – результат антагонизма пандемического вируса гриппа А с TLR/RLR/NLRP3 сигнальными путями и процессами апоптоза [23].

Функциональная гетерогенность Мф, получаемых с помощью разных стимулирующих факторов, во многом определяет их свойства [15].

По данным литературы, GM-Мф относятся к воспалительному фенотипу М1 и отличаются от макрофагов, полученных с M-CSF (макрофаг-колониестимулирующим фактором) с фенотипом М2 [15]. Разные виды моноцитарных Мф отличаются по морфологии и спектрам экспрессируемых генов. Реакции TLR/RLR-генов в дифференцированных типах Мф остаются малоизученными. В тучных клетках GM-CSF стимулировал активность генов TLR3 и TLR7 с участием сигнальных протеинкиназ MAPK и PI3K/Akt [33]. Напротив, в человеческих моноцитах GM-CSF снижал экспрессию генов других видов TLR1, TLR2 и TLR4 и транскрипционного фактора Мф PU.1 [26].

В работе получена новая информация о влиянии GM-CSF на гены TLR/RLR-рецепторов в GM-Мф. По нашим данным, дифференцировка моноцитов в Мф под действием GM-CSF сопровождается увеличением транскрипционной активности генов рецепторов врожденного иммунитета TLR7 или RIG1, а также фермента клеточного метаболизма GAPDH. Выбор стимули-

руемого GM-CSF рецепторного гена может быть индивидуален. Различная индивидуальная чувствительность клеток крови доноров к вирусам гриппа А и препаратам интерферонов отмечается в ряде сообщений [4, 5, 6, 19].

По данным литературы, в моноцитах крови больных гриппом А наблюдается повышение уровней экспрессии рецепторов TLR3 и TLR7 и подавление экспрессии рецепторов TLR2 и TLR4 [19]. Видимо, стимуляция рецепторов TLR7 и RIG1 – сенсоров вирусных РНК характерна для активно протекающей гриппозной инфекции. Параллельно на фоне вирусной инфекции падает активность TLRs – сенсоров бактериальных патогенов. Необходимо установить корреляцию наблюдаемых *in vitro* индивидуальных реакций рецепторов врожденного иммунитета с состоянием иммунных ответов в организме.

Заключение

Впервые изучено взаимодействие пандемического штамма вируса гриппа А H1N1/Moscow/IV01/2009 с дифференцированным GM-CSF макрофагами. В модельной клеточной системе Мф 2-х доноров охарактеризованы индивидуальные реакции генов рецепторов врожденного иммунитета TLR7 и RIG1 на дифференцирующий фактор и внутриклеточные вирусные РНК в динамике абортной инфекции.

Список литературы / References

1. Киселев О.И. Геном пандемического вируса гриппа А/H1N1v-2009. СПб. – М.: Димитрейд График групп, 2011. [Kiselev O.I. Genome of pandemic influenza A/H1N1v-2009virus]. St. Petersburg – Moscow: Dimitreid Graphic group, 2011.
2. Львов Д.К., Бурцева Е.И., Прилипов А.Г., Базарова М.В., Колобухина Л.В., Меркулова Л.Н., Малышев Н.А., Дерябин 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/IV-Moscow/01/09 (H1N1) sw1, подобного свиному вирусу А(H1N1) от первого выявленного 24.05.09 больного в Москве // Вопросы вирусологии, 2009. Т. 54, № 5. С.10-14. [Lvov D.K., Burtseva E.I., Prilipov A.G., Bazarova M.V., Kolobukhina L.V., Malyshev N.A. et al. The 24 May, 2009 isolation of the first A/IV-Moscow/01/2009(H1N1)sw1 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.)]
3. Львов Д.К., Бурцева Е.И., Щелканов М.Ю., Прилипов А.Г., Колобухина Л.В., Малышев Н.А. и др. Распространение нового пандемического вируса гриппа А(H1N1)v в России // Вопросы вирусологии, 2010. Т. 55, № 3. С. 4-9. [Lvov D.K., Burtseva E.I., Shchelkanov M.Yu., Prilipov A.G., Kolobukhina L.V., Malyshev N.A. et al. Spread of new pandemic influenza A (H1N1)v virus in Russia. *Voprosy virusologii = Problems of Virology, 2010, Vol. 55, no. 3, pp. 4-9.* (In Russ.)]
4. Соколова Т.М., Шувалов А.Н., Шаповал И.М., Соколова З.А., Ершов Ф.И. Активация генов сигнальных путей иммунитета: различная индивидуальная чувствительность клеток крови человека к препаратам интерферонов и индукторов IFN // Медицинская иммунология, 2015. № 1. С. 7-18. [Sokolova T.M., Shuvalov A.N., Shapoval I.M., Sokolova Z.A., Ershov F.I. Activation of genes controlling the immune signaling pathways: differential individual sensitivity of human blood cells for interferon preparations and IFN inducers. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia), 2015, no. 1, pp. 7-18.* (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2015-1-7-18.
5. Соколова Т.М., Шувалов А.Н., Полосков В.В., Ершов Ф.И. Стимуляция генов сигнальной трансдукции препаратами «Ридостин», «Циклоферон» и «Ингавирин» // Цитокины и воспаление, 2015. Т. 14, № 2.

C. 26-34. [Sokolova T.M., Shuvalov A.N., Poloskov V.V., Ershov F.I. Stimulation of signaling transduction gene expression with drugs Ridostin, Cycloferon and Ingavirin. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation*, 2015, no. 2, pp. 26-34. (In Russ.)]

6. Соколова Т.М., Шувалов А.Н., Полосков В.В. Действие рекомбинантного альфа-2 интерферона на вирус гриппа H1N1 (Москва 2009): активность генов врожденного и адаптивного иммунитета и воспалительных цитокинов // Евразийский Союз Ученых (ЕСУ) 2015. № 17, Ч. 2. С. 49-52. [Sokolova T.M., Shuvalov A.N., Poloskov V.V. Action of recombinant alpha-2 interferon the influenza virus H1N1 (Moscow 2009): activity of genes innate and adaptive immunity and inflammatory cytokines. *Evrasiyskiy Soyuz Uchenykh (ESU) = Eurasian Union of Scientists (EUS)*, 2015, no. 17, Pt 2, pp. 49-52. (In Russ.)]

7. 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. (In Russ.)]

8. Тимофеева Т.А., Игнатьева А.В., Руднева И.А., Мочалова Л.В., Бовин И.В., Каверин Р.В. Влияние мутаций, меняющих антигенную специфичность, на рецептор связывающую активность гемагглютинаина 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.)]

9. Akagawa K.S., Komuro I., Kanazawa H., Yamazaki T., Mochida K., Kishi F. Functional heterogeneity of colony-stimulating factor-induced human monocyte-derived macrophages. *Respirology*, Vol. 2006, no. 11, S32-S36.

10. Broughton S.E., Dhagat U., Hercus T.R., Nero T.L., Grimbaldston M.A., Bonder C.S., Lopez A.F., Parker M.W. The GM-CSF/IL-3/IL-5 cytokine receptor family: from ligand recognition to initiation of signaling. *Immunological Reviews*, 2012, Vol. 250, pp. 277-202.

11. 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 THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. *PLoS ONE*, 2010, Vol. 9, no.1, e8668. doi: 10.1371/journal.pone.0008668.

12. Fouchier R.A.M., Bestebroer T.M., Herst S., van der Kemp L., Rimmerlzwaan 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. Clinical Microbiology*, 2000, Vol. 38, no. 11, pp. 4096-4101.

13. Geiler J., Michaelis M., Sithisarn P., Cinatl Jr. Comparison of pro-inflammatory cytokine expression and cellular signal transduction in human macrophages infected with different influenza A viruses. *Med. Microbiol. Immunol.*, 2011, Vol. 200, pp. 53-60.

14. 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

15. Janguin M., Houlbert N., Fardel O., Lecureur V. Polarization profiles of human M-CSF-generated macrophages and comparison of M1-markers in classically activated macrophages from GM-CSF and M-CSF origin. *Cell Immunol.*, 2013, Vol. 281, pp. 51-61.

16. Juhas U., Ryba-Stanislawowska M., Szargiej P., Mysliwska J. Different pathways of macrophage activation and polarization. *Postery Hig Med Dosw. (online)*, 2015, Vol. 69, pp. 496-502.

17. Khan K., Arino J., Hu W., Raposo P., Sears J., Calderon F., Heidebrecht C., Macdonald M., Liauw J., Chan A., Gardam M. Spread of a novel influenza A (H1N1) virus via global airline transportation. *N. Engl. J. Med.*, 2009, Vol. 361, no. 2, pp. 212-214.

18. Koyama S., Ishii K.J., Kumar H., Tanimoto T., Coban C., Uematsu S., Kawai T., Akira S. Differential role of TLR- and RLR-signaling in the immune responses to influenza A virus infection and vaccination. *J. Immunol.*, 2007, Vol. 179, no. 7, pp. 4711-4720.

19. Lee N., Wong C.K., Hui D.S., Lee S.K., Wong R.Y., Ngai K.L., Chan M.C., Chu Y.J., Ho A.W., Lui G.C., Wong B.C., Wong S.H., Yip S.P., Chan P.K. Role of human Toll-like receptors in naturally occurring influenza A infections. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, 2013, Vol. 7, no. 5, pp. 666-675.

20. Li J. Hu S., Zhou L., Ye L., Wang X., Ho J., Ho W. Interferon lambda inhibits herpes simplex virus type 1 infection of human astrocytes and neurons. *Glia*, 2011, Vol. 59, no. 1, pp. 58-67.

21. Liu Y., Chen H., Sun Y., Chen F. Antiviral role of Toll-like receptors and cytokines against the new 2009 H1N1 virus infection. *Mol. Biol. Rep.*, 2012, Vol. 39, no. 2, pp. 1162-1172.

22. 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. Leukocyte Biology*, 2012, Vol. 92, pp. 97-106.

23. Loregian A., Mercorelli B., Nannetti G., Compagnin G., Palu G. Antiviral strategies against influenza virus: towards new therapeutic approaches. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2014, Vol. 71, no. 19, pp. 3659-3683.

24. Osterlund P., Pirhonen J., Ikonen N., Rönkkö E., Strengell M., Mäkelä S.M., Broman M., Hamming O.J., Hartmann R., Ziegler T., Julkunen I. Pandemic H1N1 2009 influenza A virus induces weak cytokine responses in human macrophages and dendritic cells and is highly sensitive to the antiviral actions of interferons. *J. Virology*, 2010, Vol. 84, no. 3, pp. 1414-1422.

25. Pulendran B., Maddur M.S. Innate Immune Sensing and Response to Influenza. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 2015, Vol. 386, pp. 23-71.

26. Sadeghi K., Wisgrill L., Wessely I., Diesner S.C., Schuller S., Durr C., Heinle A., Sachet M., Pollak A., Forster-Waldl E., Spittler A. GM-CSF Down-Regulates TLR Expression via the Transcription Factor PU.1 in Human Monocytes. *PLoS ONE*, 2016, Vol. 11, no. 10, e0162667. doi: 10.1371/journal.pone.0162667.

27. Sakabe S., Iwatsuki-Horimoto K., Takano R., Nidom C.A., Le M., Nagamura-Inoue T., Horimoto T., Yamashita N., Kawaoka Y. Cytokine production by primary human macrophages infected with highly pathogenic H5N1 or pandemic H1N1 2009 influenza viruses. *J. General Virology*, 2011, Vol. 92, pp. 1428-1434.
28. 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. General Virology*, 2012, Vol. 93, pp. 2315-2325.
29. Suki M.Y., Lee K.-H., Jaumea M., Cheung T.K.W., Yip T.-F., Laia J.C.C., Guanb Y., Webster R.G. Toll-like receptor 10 is involved in induction of innate immune responses to influenza virus infection. *PNAS*, 2014, Vol. 111, no. 10, pp. 3793-3798.
30. 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, e1002099. doi: 10.1371/journal.ppat.1002099.
31. Viswanathan K., Chandrasekaran A., Srinivasan A., Raman R., Sasisekharan V., Sasisekharan R. Glycans as receptors for influenza pathogenesis. *Glycoconj J.*, 2010, Vol. 27, pp. 561-570.
32. Weber M., Gawanbacht A., Habjan M., Rang A., Borner C., Schmidt A.M., Veitinger S., Jacob R., Devignot S., Kochs G., Garcia-Sastre A., Weber F. Incoming RNA virus nucleocapsids containing a 5-triphosphorylated genome activate RIG-I and antiviral signaling. *Cell Host Microbe*, 2013, Vol. 13, pp. 336-346.
33. Yang H., We J., Zhang H., Lin L., Zhang W., He S. Upregulation of Toll-like receptor (TLR) expression and release of cytokines from P815 mast cells by GM-CSF. *BMC Cell Biology*, 2009, Vol. 10, pp. 1-10.

Авторы:

Соколова Т.М. — д.б.н., академик РАЕН, ведущий научный сотрудник, лаборатория клеточной инженерии, ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Полосков В.В. — младший научный сотрудник, лаборатория цитокинов, ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Шувалов А.Н. — к.м.н., младший научный сотрудник, лаборатория онтогенеза и коррекции системы интерферона, ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Руднева И.А. — к.б.н., ведущий научный сотрудник, лаборатория физиологии вирусов, ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Тимофеева Т.А. — к.б.н., руководитель лаборатории физиологии вирусов, ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Authors:

Sokolova T.M., PhD, MD (Biology), Full Member, Academy of Natural Sciences, Leading Research Associate, Laboratory of Cellular Engineering, N.F. Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

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

Shuvalov A.N., PhD (Medicine), Junior Research Associate, 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 Research Associate, Laboratory of Viral Physiology, N.F. Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

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

Поступила 06.03.2017
Отправлена на доработку 14.03.2017
Принята к печати 17.03.2017

Received 06.03.2017
Revision received 14.03.2017
Accepted 17.03.2017