

О.П. Жирнов<sup>1</sup>, И.В. Воробьева<sup>1</sup>, О.А. Сафонова<sup>2</sup>, Н.А. Малышев<sup>2</sup>, F. Schwalm<sup>3</sup>, H.-D. Klenk<sup>3</sup>

## Патогенетическое действие пандемического вируса гриппа H1N1 при размножении в культурах клеток человека

<sup>1</sup>ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского» Минздрава России, 123098, Москва; <sup>2</sup>Инфекционная больница № 1, 125367, Москва; <sup>3</sup>Институт вирусологии, Марбург, Германия

Изучали размножение пандемического вируса гриппа H1N1pdm в культурах дифференцированного эпителия бронхов (линия Calu-3) и кишечника (линия Caco-2) человека. Для сравнения исследовали культуру слабодифференцированного эпителия клеток почки собаки (линия MDCK-2 и MDCK-H). Установили, что обе культуры клеток человека были высокочувствительны для штаммов пандемического вируса гриппа A/Hamburg/05/2009 и A/Moscow/501/2011 и поддерживали их размножение без добавления трипсина в культуральную жидкость. Сходным образом размножались близкородственные лабораторные штаммы сезонного вируса гриппа A/Moscow/450/2003, A/Memphis/14/96 (H1N1) и лабораторного штамма A/Puerto Rico/8/34 (H1N1). При размножении в клетках Caco-2 и Calu-3 выявляли внутриклеточное разрезание HA0 → HA1 + HA2 у всех исследованных штаммов, что указывало на присутствие в этих клетках протеазы, активирующей вирус гриппа (ИАП). В клетках MDCK-H и MDCK-2 либо не отмечали расщепления, либо отмечали слабое расщепление HA0, что указывало на низкий уровень активной протеазы в клетках MDCK. Размножение вирусов пандемического и сезонного гриппа в культурах клеток человека Calu-3 и Caco-2 оказывало цитопатическое действие и характеризовалось слабой индукцией признаков аутофагии и клеточного апоптоза. Полученные данные позволяют рекомендовать культуры клеток человека для изоляции и размножения клинических изолятов вируса пандемического гриппа H1N1.

Ключевые слова: вирус гриппа; клетки человека; аутофагия; апоптоз

### Pathogenic Effect of Pandemic Influenza Virus H1N1 under Replication in Cultures of Human Cells

O. P. Zhirnov<sup>1</sup>, I. V. Vorobjeva<sup>1</sup>, O. A., Saphonova<sup>2</sup>, N. A. Malyshev<sup>2</sup>, F. Schwalm<sup>3</sup>, H. D. Klenk<sup>3</sup>

<sup>1</sup> D. I. Ivanovsky Institute of Virology, Ministry of Health of the Russian Federation, 123098, Moscow, Russia; <sup>2</sup> Municipal Clinical Hospital of Infectious Diseases No. 1, 125367, Moscow, Russia; <sup>3</sup> Institute of Virology, Marburg, Germany

The propagation of the pandemic influenza virus H1N1 in cultures of bronchial (Calu-3) and intestinal (Caco-2) differentiated epithelial cells of human origin was studied. The canine epithelial cell lines, MDCK-H and MDCK-2, were comparatively tested. The two human cell lines were found to be highly sensitive to the influenza pandemic strains A/Hamburg/05/09 and A/Moscow/501/2011 and maintained their replication without addition of trypsin to culture medium. Virus strains of seasonal influenza H1N1, such as A/Moscow/450/2003, A/Memphis/14/96, and laboratory strain A/PR/8/34, multiplied in these human cells in similar manner. The intracellular cleavage HA0 → HA1+HA2 by the host virus-activating protease (IAP) occurred in both human cell lines under infection with each influenza virus H1N1 including pandemic ones. Comparatively, this cleavage of all influenza H1N1 virus strains appeared to be either undetectable or low-detectible in MDCK-H and MDCK-2, respectively, thereby implying low levels of active IAP in these cells. Multiplication of pandemic and seasonal influenza H1N1 viruses in Calu-3 and Caco-2 cells caused cytopathic effect, which was accompanied with low autophagy and apoptosis events. These data allow recommending human cell lines, Calu-3 and Caco-2, for optimized isolation and passaging of clinical strains of influenza pandemic viruses H1N1.

Key words: influenza virus, human cells, autophagy, apoptosis

В геноме вируса гриппа А закодировано 13 белков, из которых 10, так называемые структурные белки, входят в состав вирусных частиц [7, 29]. Два гликозилированных белка, гемагглютинин (HA) и нейраминидаза (NA) локализованы на поверхности частиц и формируют так называемые наружные шипы. С помощью этих шипов вирус специфически распознает клетки-мишени и внедряется в них. Для выполнения функции внедрения большое значение имеет структурная форма гликопротеида HA. Этот белок синтезируется в форме предшественника HA0 (мол. масса 75 кД) и затем расщепляется клеточной протеазой трипсиновой специфичности на два фрагмента – HA1 (55 кД) и HA2 (20 кД), которые сохраняют дисульфидную связь. В вирионах могут присутствовать обе формы, HA0 и HA1/HA2, но при этом вирионы с HA0

не инфекционны и не способны внедряться в клетку-мишень, а вирионы, содержащие хотя бы часть молекул в расщепленной форме HA1/HA2, имеют высокую инфекционность для клеток [31].

Расщепление гликопротеида HA0 → HA1+HA2 зависит от наличия в клетках расщепляющей протеазы [31]. При ее наличии клетка, в которой размножается вирус, продуцирует инфекционные вирионы с HA1/HA2, способные заражать соседние клетки и инициировать многоцикловый процесс размножения вируса. Напротив, клетки, лишённые вирусактивирующей протеазы, продуцируют неинфекционные вирионы с HA0, которые не способны инфицировать соседние клетки. Для поддержания многоциклового инфицирования вируса в таких клеточных культурах необходимо добавление экзогенного трипсина в культуральную

Контактная информация:

Жирнов Олег Петрович; e-mail: zhirnov@inbox.ru

жидкость для протеолиза  $HA0 \rightarrow HA1 + HA2$  и искусственной активации вновь синтезированного вируса.

В настоящей работе исследовали культуры эпителиальных клеток человека для пассирования образцов клинических вирусов гриппа H1N1 и изучения их протеолитической активации при размножении в этих клетках. Актуальность исследования клеточных культур человека обуславливалась тем, что вирусы гриппа при размножении в организме человека адаптируются к факторам организма-хозяина. В частности, факторы хозяина имеют значение для функционирования практически всех вирусных белков, включая гликопротеиды HA и NA [21], нуклеопротеин NP [11, 15, 23], полимеразные белки PB1, PB2 и PA [10, 11], неструктурный белок NS1 [17, 33] и т. п. В результате такого приспособления вируса к факторам человека попытки пассирования вирусов из клинических материалов в культурах гетерологичного происхождения, таких как клетки почки собаки MDCK, часто оказываются малоэффективными. Для понижения этого адаптационного барьера в репликации клинических вирусов логично применить культуры клеток человека. Две такие культуры, Caco-2 и Calu-3, апробировали для характеристики размножения пандемического вируса гриппа H1N1. Этот вирус появился в популяции людей в 2009 г. и к настоящему моменту практически вытеснил из популяции людей доминировавший прежде вирус сезонного гриппа H1N1 [3]. Обнаружено, что при размножении в клетках Caco-2 и Calu-3 происходили заметное внутриклеточное разрезание  $HA0 \rightarrow HA1 + HA2$  и многоцикловая репродукция у всех исследованных штаммов вируса гриппа H1N1, что указывало на присутствие в этих клетках протеазы, активирующей вирусы гриппа. Такие культуры клеток человека позволяют оптимизировать выделение и пассирование клинических изолятов вируса пандемического гриппа H1N1.

#### Материалы и методы

**Клетки.** Культуры эпителиальных клеток почки собаки (линии MDCK-2 и MDCK-H) и кишечника (линия Caco-2) человека культивировали в минимальной среде Дульбекко (DMEM) с добавлением 10% фетальной сыворотки коров (Gibco BRL) и антибиотиков гентамицина (25 мкг/мл), пенициллина (50 ЕД/мл), стрептомицина (50 мкг/мл) [29]. Культуру клеток дифференцированного эпителия бронхов человека (линия Calu-3) выращивали в среде аналогичного состава с той лишь разницей, что использовали среду DMEM/F12 (Gibco BRL). Все клеточные линии получены из коллекции клеточных культур Института вирусологии Марбургского университета (Марбург, Германия).

**Вирусы.** Вирус гриппа A/Moscow/501/2011 (H1N1) выделили в феврале 2011 г от больного, поступившего в инфекционную больницу № 1 Москвы. Для этого делали смыв из носоглотки фосфатным буферным раствором (ФБ; 10 mM  $Na_2HPO_4/NaH_2PO_4$ , pH 7,2; 2,7 mM KCl; 137 mM NaCl), центрифугировали при 4000 об/мин, полученные клеточные осадки суспендировали в 250 мкл ФБ, обрабатывали ультразвуком в течение 2 мин для дезинтеграции конгломератов, вносили в культуру клеток Calu-3 и инкубировали в среде DMEM с антибиотиками без сыворотки. Через 72–96 ч определяли накопление вируса в культураль-

ной жидкости в титрах  $2^4$ – $2^6$  гемагглютинирующих единиц (ГАЕ) с эритроцитами человека группы I(0). Затем проводили дополнительный пассаж в культуре клеток MDCK-2 в присутствии трипсина (пассаж 1) и этот вирус использовали в экспериментах. Использовали вирус пандемического гриппа А субтипа H1N1 A/Hamburg/05/2009 (H1N1) (штамм изолирован в первую волну пандемии гриппа в Германии) и сезонного гриппа A/Moscow/450/2003 (H1N1), A/Memphis/14/96 (H1N1), A/WSN/33 (H1N1) и A/Puerto Rico/8/34 (H1N1), которые пассировали в куриных эмбрионах.

**Очистка вирусов.** Культуральную жидкость в объеме 2,5 мл центрифугировали при 8000 об/мин в течение 20 мин ( $5^\circ\text{C}$ ) для удаления клеточных обломков. Полученный супернатант наслаивали на 2,5 мл 20% сахарозы, приготовленной на ФБ, и центрифугировали в роторе SW 55.1 (Spinco L7) при 25 000 об/мин в течение 2 ч ( $10^\circ\text{C}$ ). Полученные вирусные осадки суспендировали в 1% растворе додецилсульфата натрия (ДСН) и исследовали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле (ПАГ).

**Электрофорез в ПАГ и вестерн-блот (WB)-анализ.** Полипептиды зараженных клеток фракционировали в ПАГ, содержащем ДСН. Из геля белки переносили на нитроцеллюлозную бумагу Protran 0,45 мк (Schleicher & Schull) полусухим методом [24]. Мембрану промывали в ФБ, инкубировали 2 ч в 3% обезжиренном молоке и далее в течение 2 ч в ФБ, содержащем 0,5% бычьего сывороточного альбумина (Sigma) и специфические антивирусные антитела. Затем мембрану промывали ФБ и обрабатывали видоспецифическим конъюгатом пероксидазы хрена (Dako) с последующей идентификацией позитивных компонентов с помощью усиленной хемилюминесценции (ECL) с суперсубстратом (Pierce) [25].

**Анализ апоптозного профиля хроматиновой ДНК.** Осадки клеток суспендировали в 50 мкл ФБ и смешивали с 250 мкл ФБ, содержащего 0,6% ДСН, 10 mM EDTA и 15 mM трис-HCl (pH 8), к полученной суспензии добавляли 70 мкл 5 M NaCl. Полученную смесь оставляли на ночь при  $4^\circ\text{C}$  и центрифугировали при 14 000 об/мин в течение 20 мин для удаления агрегатов хроматина. Супернатант последовательно обрабатывали рибонуклеазой А (0,1 мг/мл) и протеиназой К (0,5 мг/мл) при  $37^\circ\text{C}$  по 30 мин каждой. Суспензию смешивали с тремя объемами 96% этанола, инкубировали при  $-20^\circ\text{C}$  в течение 2 ч. Сформированные преципитаты ДНК осаждали при 14 000 об/мин 20 мин, растворяли в 10 mM трис-HCl (pH 8) и анализировали в 1% агарозном геле, как описано ранее [25].

**Метод вирусных центров в клеточной культуре.** Двудневную культуру клеток MDCK инкубировали в течение 1 ч при  $37^\circ\text{C}$  с разведениями исследуемых вирусов, приготовленными на среде DMEM. Через 7–8 ч клеточные культуры фиксировали 4% параформальдегидом и последовательно инкубировали с антителами анти-НА(H1) и антивидовым конъюгатом пероксидазы хрена. Единичные инфицированные клетки (вирусные центры) окрашивали тетраметилбензидиновым субстратом "True Blue" (KPL). Центробразующие единицы (ЦОЕ) подсчитывали на 1 мл исследуемой суспензии в световом микроскопе при 75-кратном увеличении [30].

## Результаты

Таблица 1

**Инфекционные титры пандемических вирусов H1N1 при размножении в различных клеточных культурах**

Культура клеток и вирусы	Инфекционный титр (ЦОЕ/мл)	
	без обработки трипсином	с обработкой трипсином
<b>Calu-3</b>		
A/Hamburg/05/2009 (H1N1)	$0,2 \cdot 10^5$	$0,3 \cdot 10^5$
A/Moscow/501/2011 (H1N1)	$0,6 \cdot 10^6$	$0,9 \cdot 10^6$
A/Moscow/450/2003 (H1N1)	$0,3 \cdot 10^7$	$0,5 \cdot 10^7$
A/Memphis/14/96 (H1N1)	$0,1 \cdot 10^8$	$0,2 \cdot 10^8$
A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)	$0,6 \cdot 10^7$	$1,4 \cdot 10^7$
<b>Caco-2</b>		
A/Hamburg/05/2009 (H1N1)	$0,4 \cdot 10^5$	$1,0 \cdot 10^5$
A/Moscow/501/2011 (H1N1)	$0,2 \cdot 10^7$	$0,4 \cdot 10^7$
A/Moscow/450/2003 (H1N1)	$0,8 \cdot 10^7$	$0,5 \cdot 10^7$
A/Memphis/14/96 (H1N1)	$0,1 \cdot 10^8$	$0,3 \cdot 10^8$
<b>MDCK-H</b>		
A/Hamburg/05/2009 (H1N1)	$0,2 \cdot 10^3$	$0,5 \cdot 10^5$
A/Moscow/501/2011 (H1N1)	$0,5 \cdot 10^4$	$1,1 \cdot 10^7$
A/Moscow/450/2003 (H1N1)	$0,5 \cdot 10^5$	$1,3 \cdot 10^7$
A/Memphis/14/96 (H1N1)	$1,7 \cdot 10^6$	$0,8 \cdot 10^7$
A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)	$0,7 \cdot 10^7$	$1,4 \cdot 10^8$

В первой части работы исследовали вирус гриппа A/Moscow/501/2011 (H1N1), выделенный от больного в феврале 2011 г. Для этого вирусом заражали клетки Calu-3, из клеток выделяли РНК, проводили обратную транскрипцию и полимеразную цепную реакцию (ОТ-ПЦР) с праймерами, специфичными для сегментов HA, NA, NP, PB2 вирусов гриппа А [13]. Полученные ДНК-фрагменты фракционировали в агарозном геле и после экстракции из геля определяли последовательность нуклеотидов (GenBank KC895861, KC895862, KC895863). Данные секвенирования показали, что изолированный вирус имел антигенную формулу H1N1 и относился к вирусам пандемического гриппа человека. После идентификации клинического изолята изучали его размножение в различных клеточных культурах и сравнивали с другими штаммами вируса пандемического и сезонного гриппа субтипа H1N1: A/Hamburg/05/2009 (H1N1), A/Moscow/450/2003 (H1N1), A/Memphis/14/96 (H1N1), A/Puerto Rico/8/34 (H1N1).

Далее исследовали протеолитическую активацию вирусов пандемического и сезонного гриппа H1N1 в культурах клеток человека Caco-2 и Calu-3. Вирусы выращивали в культуре клеток, инкубируемых после заражения в среде без сыворотки, и определяли инфекционность синтезируемого вируса с применением теста искусственной активации вируса обработкой трипсином *in vitro*. Тест основан на том, что обработка трипсином приводит к повышению инфекционности неактивированного вируса с HA0 в 50 раз и более и не оказывает влияния на инфекционность активированного вируса с HA1/HA2 [22]. Оказалось, что все штаммы как пандемического, так и сезонного вируса гриппа H1N1, синтезируемые в клеточных культурах Calu-3 и Caco-2, имели высокоактивированную инфекционную форму, которая не активировалась после обработки трипсином (табл. 1). Напротив, при размножении в культуре MDCK-H указанные вирусы имели низкую инфекционность, которая повышалась под действием трипсина более чем в 50 раз. Обращали внимание более низкие титры во всех клеточных культурах вируса A/Hamburg/05/2009 (H1N1), который выделен в первую волну пандемического гриппа H1N1, по сравнению с таковыми современного изолята A/Moscow/501/2011 (H1N1). Это указывало на улучшение генного соответствия у современных штаммов, что вело к повышению продуктивности

Примечание. Клеточные культуры заражали вирусами МИ около 0,1 и культивировали в среде без сыворотки. Через 24 (MDCK-H) и 40 (Calu-3 и Caco-2) ч после заражения определяли инфекционный титр вируса в культуральной жидкости методом единичных центров без и с предобработкой трипсином.

пандемических вирусов H1N1 в ходе их эволюции в популяции людей.

Полученные результаты говорили о том, что в культуре клеток Calu-3 и Caco-2 происходило расщепление вирусного белка HA0 → HA1 + HA2, ведущее к продукции инфекционных вирионов. Для того чтобы проверить этот вывод, исследовали профиль белков HA0/HA1/HA2 в вирусе с помощью метода ПАГ-ВБ (рис. 1, а). Полученные результаты подтвердили этот вывод и показали присутствие в вирусах, выращенных в Calu-3 и Caco-2, существенного количества расщепленной формы HA1/HA2. Результаты исследования инфекционной активности препаратов вируса подтверждали этот вывод и указывали на синтез в клеточных культурах Calu-3 и Caco-2 высокоинфек-

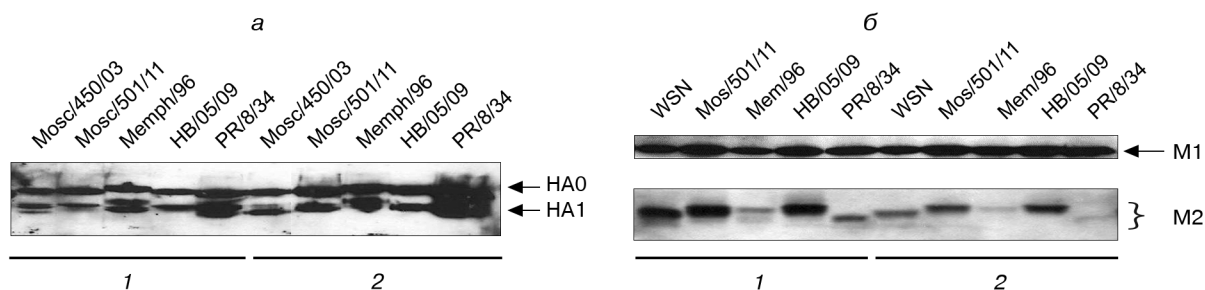


Рис. 1. Расщепление белка HA0 в клетках Calu-3, зараженных вирусами гриппа H1N1.

Культуру клеток Calu-3 заражали вирусами A/Hamburg/05/2009 (H1N1), A/Moscow/501/2011 (H1N1), A/Moscow/450/2003 (H1N1), A/Memphis/14/96 (H1N1), A/Puerto Rico/8/34 (H1N1), A/WSN/33 (H1N1) с МИ около 1. Через 35 ч после заражения из культуральной жидкости выделяли вирус методом центрифугирования. Белки препаратов вируса и инфицированных клеток подвергали электрофорезу в ПАГ с последующей идентификацией белков HA0, HA1, M1 и M2 с помощью метода ВБ и антител, специфичных к белку HA (а), M1 и M2 (б) вируса A/Puerto Rico/8/34 (H1N1). 1 – клетки; 2 – вирусы.

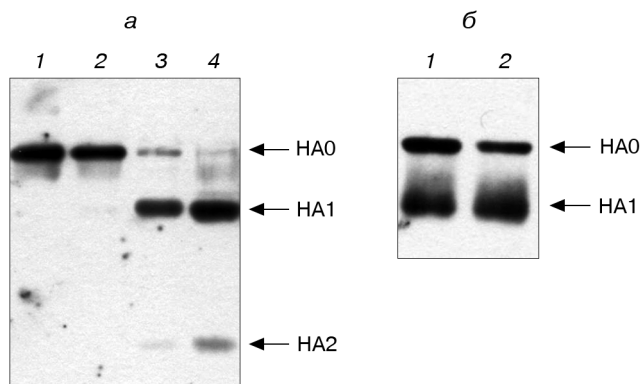


Рис. 2. Профиль белков HA0 и HA1 в вирусах H1N1, выращенных в культуре MDCK-H и MDCK2.

Культуру клеток MDCK-H (а) и MDCK2 (б) заражали вирусами A/Moscow/501/2011 (дорожки 1, 3) и A/Moscow/450/2003 (2, 4) с МИ около 1. Через 17 ч после заражения культуральную жидкость делили на две части, одну из которых не обрабатывали (1, 2) и обрабатывали трипсином (5 мкг/мл в течение 1 ч при 37°C) (3, 4). Далее из культуральной жидкости выделяли вирус методом центрифугирования. Белки препаратов вируса подвергали электрофорезу в ПАГ с последующей идентификацией белков HA0, HA1 и HA2 методом ВБ с усиленной хемилюминесценцией с помощью антител, специфичных к белку HA вируса A/PR/8/34.

ционных вирионов, которые не нуждались в активации трипсином (см. табл. 1). У различных вирусов субтипа H1N1 выявляли существенные вариации электрофоретической подвижности трансмембранного белка ионных каналов M2 и его содержания в инфицированных клетках и вирусных частицах (рис. 1, б). Наиболее высокую подвижность в геле имел белок M2 вирусов A/PR/8/34 и A/WSN/33 (H1N1), тогда как у вирусов A/Hamburg/05/2009 (H1N1), A/Moscow/501/2011 (H1N1), A/Moscow/450/2003 (H1N1) и A/Memphis/14/96 (H1N1) отметили его низкую подвижность. Такие различия в подвижности белка M2 между вирусными штаммами могут служить маркером для идентификации и характеристики вирусов. В зависимости от содержания белка M2 в инфицированных клетках и вирусе штаммы можно разделить на две группы: A/WSN/33 (H1N1), A/Moscow/501/2011 (H1N1), A/Hamburg/05/2009 (H1N1) – с высоким содержанием и A/Memphis/14/96 (H1N1) и A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) – с низким. Содержание M2 оценивали относительно уровня белка M1 (см. рис. 1, б). Поскольку белок M2 играет важную роль в индукции клеточной аутофагии [12] и воспаления [14], различия в уровне его внутриклеточного накопления у вирусных штаммов могут определять штаммоспецифические вариации в стимулировании аутофагии и воспалительного действия вирусов и влиять на патогенез процесса в инфицированных клетках.

Интересное наблюдение сделано при размножении вирусов в культуре MDCK-2. Эта линия клеток была получена ранее для изучения клеточной поляризации [9]. Вирусы, выращенные в этой клеточной культуре, имели незначительное количество расщепленной формы HA1/HA2, которое варьировало от штамма к штамму (рис. 2). При количественной оценке, выполненной на основе сканирования ВБ-мембраны, установили варьирующее содержание белка HA1 в диапазоне 5–20% (относительно HA0) для различ-

ных вирусных штаммов. Такой уровень расщепления HA0 → HA1 + HA2 был достаточным для поддержания многоциклового репродукции вирусов в культуре MDCK-2 без добавления экзогенного трипсина в культуральную среду. По сравнению с линией MDCK-2 клетки MDCK-H имели более низкий протеазный потенциал по расщеплению HA0 → HA1 + HA2 и активации синтезируемого вируса для подавляющего большинства вирусных штаммов (табл. 2). Аналогичная оценка содержания HA1, выполненная для вирусов в культуре Calu-3 и Caco-2, давала величину 30–50%. Полученные данные позволяли сделать вывод о том, что клеточные культуры клеток MDCK, используемые в различных лабораториях, могут иметь существенные фенотипические вариации в уровне протеаз, активирующих вирусы гриппа, и существенно различаться по способности поддерживать многоциклового репродукции вирусов гриппа.

В заключительной части работы исследовали цитопатическое действие вирусов гриппа H1N1 в культурах клеток человека. Все исследованные вирусы оказывали выраженное цитопатическое действие (ЦПД) как в MDCK, так и в Calu-3 и Caco-2 (рис. 3, а–в). Выраженное цитопатическое действие развивалось через 30–45 ч после заражения и характеризовалось округлением и фрагментацией клеток и их откреплением от матрикса. В клетках MDCK вирусиндуцированное ЦПД развивалось быстрее и формировалось уже к 15–18 ч после заражения (см. рис. 3, в). При молекулярном анализе в незараженных клетках отмечали значительное образование липидизированной формы белка микротрубочек LC3-II, что указывало на высокий эндогенный уровень аутофагии в культуре клеток Calu-3 и Caco-2 (рис. 4, а, б). Напротив, в клетках MDCK эндогенный уровень LC3-II был минимальным и значительно возрастал после инфекции вирусом гриппа H1N1 (рис. 4, в), что говорило о выраженной стимуляции аутофагии в клетках MDCK после вирусной инфекции. При инфекции вирусами гриппа H1N1 не отмечалось заметного прироста липидизированной формы LC3-II, что указывало на отсутствие значимой стимуляции аутофагии в инфицированных клетках. Заметный прирост накопления обе-

Таблица 2

**Вариации в содержании расщепленного HA1/HA2 в вирусе гриппа, выращенного в клетках MDCK-H и MDCK-2**

Вирусный штамм	Наличие расщепленного HA1/HA2 в вирусе*	
	MDCK-H	MDCK-2
A/Hamburg/05/09 (H1N1)	-	+
A/Moscow/501/11 (H1N1)	-	±
A/Memphis/14/96 (H1N1)	+	+
A/Moscow/450/03 (H1N1)	-	+
A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)	±	+
A/Aichi/2/68 (H3N2)	-	+

Примечание. Вирусы выращивали в клеточных культурах MDCK-H и MDCK-2 без добавления трипсина в течение 17 ч, выделяли вирус из культуральной жидкости и анализировали профиль белков HA0 и HA1 с помощью электрофореза в ПАГ и ВБ-анализа. Обнаружение расщепленной формы HA1 в вирусе в количестве более и менее 15% относительно HA0 показано знаками + и ± соответственно. Пробы, в которых не удалось выявить расщепленный HA1/HA2, показаны знаком -.

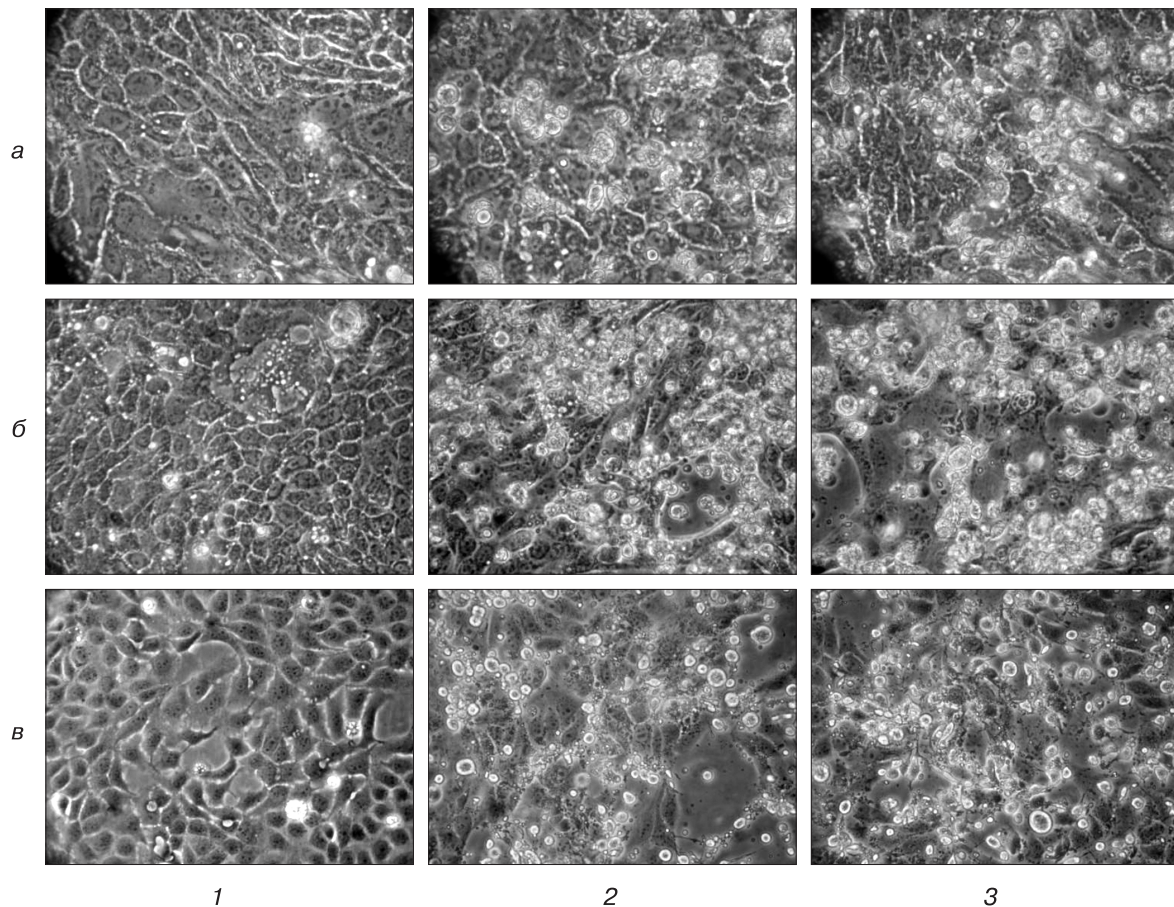


Рис. 3. Цитопатическое действие в клетках Calu-3 и MDCK-2, зараженных вирусами гриппа H1N1. Культуру клеток Calu-3 (а, б) и MDCK2 (в) заражали штаммами пандемического A/Moscow/501/2011 (H1N1) (2), сезонного A/Moscow/450/2003 (H1N1) (3) вирусов гриппа H1N1 с МИ около 1. Через 18 (а, в) и 35 (б) ч после заражения клеточные культуры незараженных (1) и зараженных клеток фотографировали в световом микроскопе. Ув. 250.

их форм, LC3-I и LC3-II, наблюдали в клетках Calu-3 и Caco-2, инфицированных лабораторным штаммом A/PR/8/34 (см. рис. 4, а, б), что говорит о возможных вирусспецифических особенностях, влияющих на регуляцию аутофагии в инфицированных клетках. Вполне вероятно, что такие особенности штаммов обусловлены вариациями гена М, кодирующего белки М1 и М2, из которых М2 взаимодействует с программой клеточной аутофагии [12]. Важно отметить, что вирусы H1N1 пандемического и сезонного гриппа, включая штамм A/Puerto Rico/8/34 (H1N1), имеют гены М соответственно птичьего и человеческого происхождения, обуславливающие вирусспецифические различия в белке М2.

В зараженных клетках Calu-3 обнаруживали образование продуктов активной каспазы 3а по сравнению с их отсутствием в незараженных клетках. Однако отмечали преимущественное формирование промежуточных форм ее активации (продукты р35 и р32) в отличие от клеток MDCK, где при заражении вирусами гриппа доминировали конечные продукты активации р28 и р17 (рис. 4, в). Это наблюдение указывало на неполноценное развитие апоптоза в Calu-3 по сравнению с таковым в клетках MDCK при их инфекции вирусами гриппа H1N1 (см. рис. 4, в). Сходную слабую индукцию каспаз наблюдали в культуре Caco-2 при заражении вирусами гриппа H1N1 (не показано). Неполноценное развитие апоптоза в инфицирован-

ных клетках Calu-3 Caco-2 подтверждалось также отсутствием его главного признака – ступенчатой деградации хроматиновой ДНК. В клетках MDCK, инфицированных вирусами гриппа H1N1, обнаруживали характерный апоптотный профиль, так называемую ДНК-лестницу, тогда как в инфицированных клетках Calu-3 (рис. 4, д) и Caco-2 (не показано) в сравнении с незараженными клетками не выявили ступенчатой деградации ДНК. Эти результаты указывали на отсутствие выраженных апоптотных признаков в клетках Calu-3 и Caco-2 при их гибели под действием вирусов гриппа, включая вирус пандемического гриппа H1N1.

Активация клеточных каспаз, как известно [24], определяет расщепление белка NP в сайте каспазного нарезания у всех вирусов гриппа человека. Обнаружили, что уровень активации каспаз в клетках Calu-3 был достаточным для расщепления белка NP в каспазном сайте и накопления апоптотной формы белка aNP при инфекции вирусами сезонного гриппа при отсутствии такового у пандемических вирусов (рис. 5). Аналогичный профиль накопления aNP у вирусов сезонного гриппа и его отсутствие у вирусов пандемического вируса H1N1 наблюдали в культуре клеток MDCK-H и MDCK-2 (не показано). Отсутствие внутриклеточного расщепления белка NP у вирусов пандемического гриппа A/Hamburg/05/2009 (H1N1) и A/Moscow/501/2011 (H1N1) хорошо коррелирова-

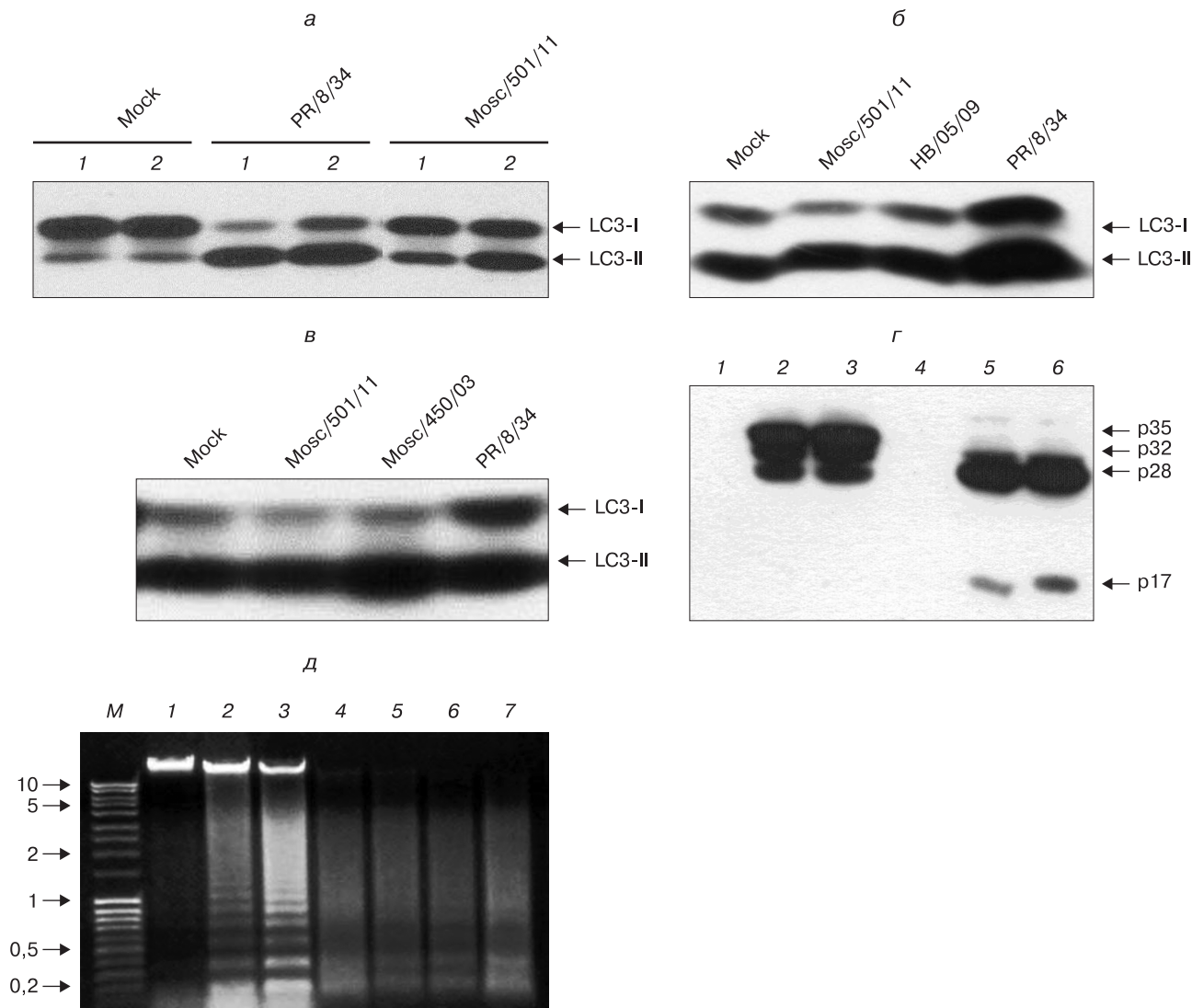


Рис. 4. Профиль аутофагосомного белка LC3-II, активированной каспазы 3a и хроматиновой ДНК в клетках MDCK-H, Calu-3 и Caco-2, зараженных вирусами гриппа H1N1.

Клетки MDCK-H (a), Caco-2 (б) и Calu-3 (в) заражали вирусами A/Hamburg/05/2009 (H1N1), A/Moscow/501/2011 (H1N1), A/Moscow/450/2003 (H1N1), A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) при МИ около 1. Через 17 (MDCK-H) и 35 (Calu-3, Caco-2) ч после заражения равное количество по белку клеточного лизата подвергали электрофорезу в ПАГ с последующей идентификацией белков LC-3 (a-в) и активированной каспазы 3a (г) методом ВБ с использованием техники усиленной хемилюминесценции со специфическими антителами анти-LC3 и анти-3a, а также анализу профиля хроматиновой ДНК в агарозном геле (д); 1-3 – клетки Calu-3 (1-3) и MDCK (4-6), незараженные (1, 4) и зараженные вирусами A/Moscow/501/2011 (2, 5) и A/PR/8/34 (3, 6); 4 – клетки MDCK (1-3) и Calu-3 (4-7), незараженные (1, 4) и зараженные вирусами A/Moscow/501/2011 (2, 5), A/Moscow/450/2003 (6) и A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) (3, 7).

ло с птичьим происхождением их гена NP, который, как известно, лишен полноценного каспазного сайта в белке NP [2, 23]. Путем секвенирования гена NP мы установили, что NP вирусов сезонного гриппа человека имел полноценный сайт каспазного расщепления QMETD<sub>16</sub>G, тогда как у пандемических вирусов H1N1, включая вирус A/Moscow/501/2011 (H1N1), так же, как у вирусов птиц, NP имел нерасщепляемый мотив QMETG<sub>16</sub>G птичьего типа.

### Обсуждение

Клеточные культуры широко используют для выделения вирусов гриппа от больных пациентов. При таком выделении важно сохранить исходную популяцию вирусных квази-видов, присутствующую в организме человека, и избежать искусственной селекции вирусных видов в результате адаптации к той или иной гетерологичной клеточной культуре, исполь-

зуемой для его выделения. Такая клеточная селекция вирусного варианта может проходить при взаимодействии со специфическими клеточными рецепторами, факторами внутриядерной миграции вирусного РНП, клеточными кофакторами для вирусной полимеразы и другими факторами, имеющими структурно-функциональные особенности, специфичные для вида животного, из которого получена клеточная культура. Поэтому поиск клеточных культур человека, чувствительных для размножения вирусов гриппа, представляет научный и практический интерес. В настоящее время спектр клеточных культур человека, которые чувствительны и высокопродуктивны для вирусов гриппа, крайне ограничен. К таким клеточным культурам человека, применяющимся для размножения вирусов гриппа, можно отнести линии клеток кишечного (Caco-2) и бронхиального (Calu-3) эпителия человека [1, 6, 8, 20, 28, 30, 32]. Результа-

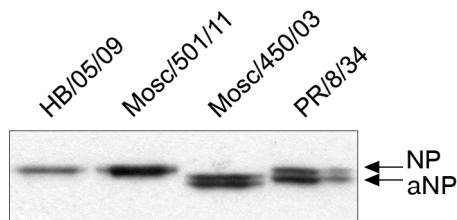


Рис. 5. Профиль белка NP в клетках Calu-3, зараженных вирусами гриппа H1N1.

Клетки Calu-3 заражали вирусами A/Hamburg/05/2009 (H1N1), A/Moscow/501/2011 (H1N1), A/Moscow/450/2003 (H1N1), A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) с МИ около 1. Через 35 ч после заражения инфицированные клетки подвергали электрофорезу в ПАГ с последующей идентификацией белка NP с помощью метода ВБ и антител, специфичных к этому белку.

ты настоящей работы показывают, что обе клеточные линии высоковосприимчивы для вирусов пандемического гриппа H1N1 и поддерживают репродукцию этих вирусов на высоком уровне.

Дополнительное достоинство использованных в работе клеток Сасо-2 и Calu-3 заключается в их способности расщеплять вирусный белок HA0. Такое расщепление HA0 → HA1 + HA2 говорит о наличии в этих культурах компетентных протеаз, способных осуществлять этот протеолиз. Примечательно, что эти протеазы расщепляют белок HA0 вирусов гриппа H1N1, для которых характерно наличие единичного остатка Arg в протеолитическом сайте HA0. Роль таких протеаз в респираторном тракте человека, по всей видимости, выполняют мембранно-связанные клеточные сериновые протеазы, TMPRSS-2, TMPRSS-4, HAT, эпителиазин, имеющие трипсиноподобную специфичность расщепления по остатку Arg или Lys [4,5,31]. Эти протеазы синтезируются в эндоплазматическом ретикулуме и мигрируют внутри клеток тем же мембранно-связанным маршрутом, что и вирусный белок HA0. Такая совместная миграция приводит к расщеплению части молекул белка HA0 уже в инфицированных клетках, в результате чего инфицированные клетки продуцируют в культуральную среду уже активированный вирус. Сходная внутриклеточная активация эпидемических вирусов человека H1N1, включая вирус пандемического гриппа H1N1, H3N2, H2N2, по всей видимости, имеет место в эпителии респираторного тракта больных гриппом людей [27, 30, 31].

При размножении вирусов гриппа H1N1 в культурах Calu-3 и Сасо-2 обращало внимание более позднее развитие ЦПД по сравнению с таковым в культуре MDCK. Поскольку клеточные культуры Сасо-2 и Calu-3 имеют опухолевое происхождение, в них имеются повреждения и дисбаланс биохимических путей, регулирующих пролиферацию и гибель клеток. В частности, в клетках Сасо-2 не выявляли существенной индукции каспазных апоптозных путей, тогда как в культуре MDCK отмечали их массивную активацию и обнаруживали типичные признаки апоптоза на поздних сроках инфекции вирусом гриппа H1N1 [25, 26]. В динамике развитие аутофагии, поддерживающей выживание клеток, также различалось в клетках Сасо-2 и Calu-3, с одной стороны, и клетках MDCK – с другой. В первых двух культурах отмечали высокий эндогенный уровень аутофагии, который слабо изменялся в результате инфекции большинством вирусов гриппа H1N1, и лишь

вирус A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) вызывал заметный подъем аутофагии в этих культурах. Такие вирусзависимые влияния на аутофагию, вероятно, связаны со свойствами мембранного вирусного белка M2 [12]. В культуре MDCK выявляли слабый эндогенный уровень аутофагии, который претерпевал значительный подъем при инфекции всеми изученными вирусами гриппа.

Известно, что супериндукция аутофагии может провоцировать апоптоз клеток [16], и, возможно, аналогичный механизм мог иметь место в клетках MDCK в ответ на вирусную инфекцию, индуцирующую аутофагию. Возможно, что повреждение апоптозных путей и высокий уровень аутофагии в клетках Сасо-2 и Calu-3 обуславливали более позднее развитие гибели инфицированных клеток, которая развивалась преимущественно по некротическому (неапоптозному) типу. Отсутствие признаков апоптоза и развитие некротической гибели клеток Сасо-2 обнаруживали ранее при инфекции лабораторными штаммами вирусов гриппа субтипов H1N1 и H3N2 [28]. Совокупность этих данных указывает на то, что вирус гриппа может вызывать гибель инфицированных клеток посредством многочисленных молекулярных механизмов и вовлекать в этот процесс многие биохимические пути и провоцировать их специфические сочетания в различных типах клеток. Для более детального понимания закономерностей процесса клеточной гибели необходимы дальнейшие исследования его молекулярных основ.

Полученные в работе результаты имеют прикладное значение для преодоления затруднений, возникающих нередко при изоляции вирусов гриппа от больных людей в культуре клеток собак MDCK, которые наиболее широко используются в мире для этих целей. Эти трудности связаны, в частности, со слабой рецепцией ряда вирусов гриппа человека в данной клеточной культуре и отсутствием протеаз, активирующих вирусное потомство, что делает невозможной многоцикловую репродукцию вирусов [18, 19, 29]. Культуры клеток человека Calu-3 и Сасо-2 лишены указанных недостатков и представляются более адекватными для выделения вирусов гриппа от людей в плане как эффективности изоляции вирусных штаммов, так и сохранения исходной популяции вирусных квази-видов в получаемых препаратах вирусов гриппа людей.

*Работа выполнена при финансовой поддержке по грантам РФФИ и программы 293 Научного немецкого общества (DFG). Авторы выражают благодарность проф. М. Н. Матросовичу (Институт вирусологии, Марбург, Германия) за предоставление штамма вируса гриппа A/Memphis/96 (H1N1).*

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Даниленко Д.М., Смирнова Т.Д., Гудкова Т.М. и др. Сравнительное изучение чувствительности клеточных линий различного происхождения к вирусам пандемического гриппа H1N1v, вирусам гриппа птиц, свиной и человека. Вопросы вирусологии. 2011; 6: 9–14.
2. Жирнов О.П. Станет ли «свиной грипп» более опасным для людей? В Мире Науки. 2010; 6: 14–15.
3. Amato-Gauci A., Zucs P., Snacken R. et al. On behalf of the European Influenza Surveillance Network (EISN). Surveillance trends of the 2009 influenza A (H1N1) pandemic in Europe. Euro Surv. 2011; 16 (26): pii=19903. <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19903>
4. Bertram S., Glowacka I., Steffen I., K@uhl A., P@ohlmann S. Novel insights into proteolytic cleavage of influenza virus hemagglutinin. Rev. Med. Virol. 2010; 20 (5): 298–310.
5. Böttcher-Friebertshäuser E., Freuer C., Sielaff F. et al. Cleavage of influenza virus hemagglutinin by airway proteases TMPRSS2 and

- HAT differs in subcellular localization and susceptibility to protease inhibitors. *J. Virol.* 2010; 84 (11): 5605–14.
6. *Botcher-Friebertshäuser E., Stein D.A., Klenk H.-D., Garten W.* Inhibition of influenza virus infection in human airway cell cultures by an antisense peptide-conjugated morpholino oligomer targeting the hemagglutinin-activating protease TMPRSS2. *J. Virol.* 2011; 85: 1554–1512.
  7. *Bouvier N.M., Palese P.* The biology of influenza viruses. *Vaccine.* 2008; 26 (Suppl. 4): 49–53.
  8. *Chiapponi C., Zanni I., Garbarino C.* et al. Comparison of the usefulness of the CACO-2 cell line with standard substrates for isolation of swine influenza viruses. *J. Virol. Meth.* 2010; 163: 162–5.
  9. *Fuller S., von Bonsdorff C.H., Simons K.* Vesicular stomatitis virus infects and matures only through the basolateral surface of the polarized epithelial cell line, MDCK. *Cell.* 1984; 38: 65–77.
  10. *Gabriel G., Klingel K., Otte A.* et al. Differential use of importin- $\alpha$  isoforms governs cell tropism and host adaptation of influenza virus. *Nat. Commun.* 2011; 18 (2): 156–63.
  11. *Gabriel G., Herwig A., Klenk H.-D.* Interaction of polymerase subunit PB2 and NP with importin alpha1 is a determinant of host range of influenza A virus. *PLoS Pathog.* 2008; 4 (2): e11.
  12. *Gannagé M., Dormann D., Albrecht R., Dengjel J.* et al. Matrix protein 2 of influenza A virus blocks autophagosome fusion with lysosomes. *Cell. Host. Microb.* 2009; 6 (4): 367–80.
  13. *Hoffmann E., Stech J., Guan Y., Webster R.G., Perez D.R.* Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. *Arch Virol.* 2001; 146 (12): 2275–89.
  14. *Ichinohe T., Pang I.K., Iwasaki A.* Influenza virus activates inflammasomes via its intracellular M2 ion channel. *Nat. Immunol.* 2010; 11 (5): 404–10.
  15. *Kistner O., Müller K., Scholtissek C.* Differential phosphorylation of the nucleoprotein of influenza A viruses. *J. Gen. Virol.* 1989; 70 (Pt 9): 2421–31.
  16. *Levine B., Yuan J.* Autophagy in cell death: an innocent convict? *J. Clin. Invest.* 2005; 115 (10): 2679–88.
  17. *Liu H., Golebiewski L., Dow E.C.* et al. The ESEV PDZ-binding motif of the avian influenza A virus NS1 protein protects infected cells from apoptosis by directly targeting Scribble. *J. Virol.* 2010; 84 (21): 11 164–74.
  18. *Nobusawa E., Ishihara H., Morishita T.* et al. Change in receptor-binding specificity of recent human influenza A viruses (H3N2): a single amino acid change in hemagglutinin altered its recognition of sialyloligosaccharides. *Virology.* 2000; 278: 587–96.
  19. *Romanova J., Katinger D., Ferko B.* et al. Distinct host range of influenza H3N2 virus isolates in Vero and MDCK cells is determined by cell specific glycosylation pattern. *Virology.* 2003; 307 (1): 90–7.
  20. *Tumpey T.M., Basler C.F., Aguilar P.V.* et al. Characterization of the reconstructed 1918 Spanish influenza pandemic virus. *Science.* 2005; 310 (5745): 77–80.
  21. *Wagner R., Matrosovich M., Klenk H.-D.* Functional balance between haemagglutinin and neuraminidase in influenza virus infections. *Rev. Med. Virol.* 2002; 12: 159–66.
  22. *Zhirnov O.P., Ovcharenko A.V., Bukrinskaya A.G.* A modified plaque assay method for accurate analysis of infectivity of influenza viruses with uncleaved hemagglutinin. *Arch. Virol.* 1982; 71 (2): 177–83.
  23. *Zhirnov O.P.* The host origin of influenza A viruses can be assessed by the intracellular cleavage of the viral nucleocapsid protein. *Arch. Virol.* 1988; 99 (3–4): 277–84.
  24. *Zhirnov O.P., Konakova T.E., Garten W., Klenk H.* Caspase-dependent N-terminal cleavage of influenza virus nucleocapsid protein in infected cells. *J. Virol.* 1999; 73 (12): 10 158–63.
  25. *Zhirnov O.P., Konakova T.E., Wolff T., Klenk H.-D.* NS1 protein of influenza A virus down-regulates apoptosis. *J. Virol.* 2002; 76 (4): 1617–25.
  26. *Zhirnov O.P., Klenk H.-D.* Control of apoptosis in influenza virus-infected cells by up-regulation of Akt and p53 signaling. *Apoptosis.* 2007; 12 (8): 1419–32.
  27. *Zhirnov O.P., Ikizler M.R., Wright P.* Cleavage of influenza A virus hemagglutinin in human respiratory epithelium is cell-associated and sensitive to exogenous antiproteases. *J. Virol.* 2002; 76: 8682–9.
  28. *Zhirnov O.P., Klenk H.-D.* Human influenza viruses are proteolytically activated and do not induce apoptosis in CACO-2 cells. *Virology.* 2003; 313: 198–202.
  29. *Zhirnov O.P., Vorobjeva I.V., Saphonova O.A.* et al. Structural and evolutionary characteristics of HA, NA, NS and M genes of clinical influenza A/H3N2 viruses passaged in human and canine cells. *J. Clin. Virol.* 2009; 45 (4): 322–33.
  30. *Zhirnov O.P., Matrosovich T.Y., Matrosovich M.N., Klenk H.-D.* Aprotinin, a protease inhibitor, suppresses proteolytic activation of pandemic H1N1v influenza virus. *Antiviral Chem. Chemother.* 2011; 21: 169–74.
  31. *Zhirnov O.P., Klenk H.-D., Wright P.F.* Aprotinin and similar protease inhibitors as drugs against influenza. *Antiviral Res.* 2011; 92 (1): 27–36.
  32. *Zeng H., Goldsmith C., Thawatsupha P.* et al. Highly pathogenic avian influenza H5N1 viruses elicit an attenuated type I interferon response in polarized human bronchial epithelial cells. *J. Virol.* 2007; 81 (22): 12 439–49.
  33. *Zielecki F., Semmler I., Kalthoff D.* et al. Virulence determinants of avian H5N1 influenza A virus in mammalian and avian hosts: role of the C-terminal ESEV motif in the viral NS1 protein. *J. Virol.* 2010; 84 (20): 10 708–18.

## REFERENCES

1. *Danilenko D.M., Smirnova T.D., Gudkova T.M.* et al. *Voprosy virusologii.* 2011; 6: 9–14 (in Russian).
2. *Zhirnov O.P.* *V mire nauki.* 2010; 6: 14–5 (in Russian).
3. *Amato-Gauci A., Zucs P., Snacken R.* et al. On behalf of the European Influenza Surveillance Network (EISN). Surveillance trends of the 2009 influenza A (H1N1) pandemic in Europe. *Euro Surv.* 2011; 16 (26): pii=19903. <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19903>
4. *Bertram S., Glowacka I., Steffen I., Kühl A., Pöhlmann S.* Novel insights into proteolytic cleavage of influenza virus hemagglutinin. *Rev. Med. Virol.* 2010; 20 (5): 298–310.
5. *Böttcher-Friebertshäuser E., Freuer C., Sielaff F.* et al. Cleavage of influenza virus hemagglutinin by airway proteases TMPRSS2 and HAT differs in subcellular localization and susceptibility to protease inhibitors. *J. Virol.* 2010; 84 (11): 5605–14.
6. *Botcher-Friebertshäuser E., Stein D.A., Klenk H.-D., Garten W.* Inhibition of influenza virus infection in human airway cell cultures by an antisense peptide-conjugated morpholino oligomer targeting the hemagglutinin-activating protease TMPRSS2. *J. Virol.* 2011; 85: 1554–1512.
7. *Bouvier N.M., Palese P.* The biology of influenza viruses. *Vaccine.* 2008; 26 (Suppl. 4): 49–53.
8. *Chiapponi C., Zanni I., Garbarino C.* et al. Comparison of the usefulness of the CACO-2 cell line with standard substrates for isolation of swine influenza viruses. *J. Virol. Meth.* 2010; 163: 162–5.
9. *Fuller S., von Bonsdorff C.H., Simons K.* Vesicular stomatitis virus infects and matures only through the basolateral surface of the polarized epithelial cell line, MDCK. *Cell.* 1984; 38: 65–77.
10. *Gabriel G., Klingel K., Otte A.* et al. Differential use of importin- $\alpha$  isoforms governs cell tropism and host adaptation of influenza virus. *Nat. Commun.* 2011; 18 (2): 156–63.
11. *Gabriel G., Herwig A., Klenk H.-D.* Interaction of polymerase subunit PB2 and NP with importin alpha1 is a determinant of host range of influenza A virus. *PLoS Pathog.* 2008; 4 (2): e11.
12. *Gannagé M., Dormann D., Albrecht R., Dengjel J.* et al. Matrix protein 2 of influenza A virus blocks autophagosome fusion with lysosomes. *Cell. Host. Microb.* 2009; 6 (4): 367–80.
13. *Hoffmann E., Stech J., Guan Y., Webster R.G., Perez D.R.* Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. *Arch Virol.* 2001; 146 (12): 2275–89.
14. *Ichinohe T., Pang I.K., Iwasaki A.* Influenza virus activates inflammasomes via its intracellular M2 ion channel. *Nat. Immunol.* 2010; 11 (5): 404–10.
15. *Kistner O., Müller K., Scholtissek C.* Differential phosphorylation of the nucleoprotein of influenza A viruses. *J. Gen. Virol.* 1989; 70 (Pt 9): 2421–31.
16. *Levine B., Yuan J.* Autophagy in cell death: an innocent convict? *J. Clin. Invest.* 2005; 115 (10): 2679–88.
17. *Liu H., Golebiewski L., Dow E.C.* et al. The ESEV PDZ-binding motif of the avian influenza A virus NS1 protein protects infected cells from apoptosis by directly targeting Scribble. *J. Virol.* 2010; 84 (21): 11 164–74.
18. *Nobusawa E., Ishihara H., Morishita T.* et al. Change in receptor-binding specificity of recent human influenza A viruses (H3N2): a single amino acid change in hemagglutinin altered its recognition of sialyloligosaccharides. *Virology.* 2000; 278: 587–96.
19. *Romanova J., Katinger D., Ferko B.* et al. Distinct host range of influenza H3N2 virus isolates in Vero and MDCK cells is determined by cell specific glycosylation pattern. *Virology.* 2003; 307 (1): 90–7.
20. *Tumpey T.M., Basler C.F., Aguilar P.V.* et al. Characterization of the reconstructed 1918 Spanish influenza pandemic virus. *Science.* 2005; 310 (5745): 77–80.
21. *Wagner R., Matrosovich M., Klenk H.-D.* Functional balance between haemagglutinin and neuraminidase in influenza virus infections. *Rev. Med. Virol.* 2002; 12: 159–66.
22. *Zhirnov O.P., Ovcharenko A.V., Bukrinskaya A.G.* A modified plaque assay method for accurate analysis of infectivity of influenza viruses with uncleaved hemagglutinin. *Arch. Virol.* 1982; 71 (2): 177–83.
23. *Zhirnov O.P.* The host origin of influenza A viruses can be assessed by the intracellular cleavage of the viral nucleocapsid protein. *Arch. Virol.* 1988; 99 (3–4): 277–84.



24. Zhirnov O.P., Konakova T.E., Garten W., Klenk H. Caspase-dependent N-terminal cleavage of influenza virus nucleocapsid protein in infected cells. *J. Virol.* 1999; 73 (12): 10 158–63.
25. Zhirnov O.P., Konakova T.E., Wolff T., Klenk H.-D. NS1 protein of influenza A virus down-regulates apoptosis. *J. Virol.* 2002; 76 (4): 1617–25.
26. Zhirnov O.P., Klenk H.-D. Control of apoptosis in influenza virus-infected cells by up-regulation of Akt and p53 signaling. *Apoptosis.* 2007; 12 (8): 1419–32.
27. Zhirnov O.P., Ikizler M.R., Wright P. Cleavage of influenza A virus hemagglutinin in human respiratory epithelium is cell-associated and sensitive to exogenous antiproteases. *J. Virol.* 2002; 76: 8682–9.
28. Zhirnov O.P., Klenk H.-D. Human influenza viruses are proteolytically activated and do not induce apoptosis in CACO-2 cells. *Virology.* 2003; 313: 198–202.
29. Zhirnov O.P., Vorobjeva I.V., Saphonova O.A. et al. Structural and evolutionary characteristics of HA, NA, NS and M genes of clinical influenza A/H3N2 viruses passaged in human and canine cells. *J. Clin. Virol.* 2009; 45 (4): 322–33.
30. Zhirnov O.P., Matrosovich T.Y., Matrosovich M.N., Klenk H.-D. Aprotinin, a protease inhibitor, suppresses proteolytic activation of pandemic H1N1v influenza virus. *Antiviral Chem. Chemother.* 2011; 21: 169–74.
31. Zhirnov O.P., Klenk H.-D., Wright P.F. Aprotinin and similar protease inhibitors as drugs against influenza. *Antiviral Res.* 2011; 92 (1): 27–36.
32. Zeng H., Goldsmith C., Thawatsupha P. et al. Highly pathogenic avian influenza H5N1 viruses elicit an attenuated type I interferon response in polarized human bronchial epithelial cells. *J. Virol.* 2007; 81 (22): 12 439–49.
33. Zielecki F., Semmler I., Kalthoff D. et al. Virulence determinants of avian H5N1 influenza A virus in mammalian and avian hosts: role of the C-terminal ESEV motif in the viral NS1 protein. *J. Virol.* 2010; 84 (20): 10 708–18.

Поступила 15.11.12

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2013

УДК 616.98:578.828.6:578.53]-092:612.017.1.064(575)

**Е.В. Казеннова<sup>1</sup>, А.В. Васильев<sup>1</sup>, И.А. Лаповок<sup>1</sup>, А.Е. Гришечкин<sup>1</sup>, В.Ю. Лага<sup>1</sup>, Г.Г. Саламов<sup>2</sup>, А.С. Туманов<sup>1</sup>, О.А. Парыгина<sup>3</sup>, Л.А. Рузаева<sup>3</sup>, Л.А. Грезина<sup>4</sup>, Т.П. Серкина<sup>5</sup>, О.А. Кауфман<sup>6</sup>, Н.Д. Ооржак<sup>7</sup>, В.В. Лукашов<sup>8</sup>, М.Р. Бобкова<sup>1</sup>**

## Генетические варианты ВИЧ-1 в азиатской части России

<sup>1</sup>ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского» Минздрава России, 123098, Москва; <sup>2</sup>Медицинский информационно-аналитический центр РАМН, 107140, Москва; <sup>3</sup>Красноярский краевой, 660049, Красноярск; <sup>4</sup>Ямало-Ненецкий окружной, 629806, г. Ноябрьск; <sup>5</sup>Якутский республиканский, 677044, Якутск; <sup>6</sup>Курганский областной, 640007, Курган; <sup>7</sup>Тувинский республиканский центры по профилактике и борьбе со СПИДом, 667003, Кызыл; <sup>8</sup>Академический медицинский центр, Университет Амстердама, Нидерланды

Статья посвящена исследованию генетических вариантов ВИЧ-1, циркулировавших в азиатской части Российской Федерации в 2005–2010 гг.

Исследовано 427 образцов ВИЧ-1, собранных от ВИЧ-инфицированных пациентов в Хабаровске, Магадане, Кургане, Красноярске, Ноябрьске (Ямало-Ненецкий округ), Якутии, Алтайском крае и Тыве. В качестве основных методов субтипирования прибегали к секвенированию нескольких областей генома ВИЧ-1 с последующим филогенетическим анализом или применением специализированных Интернет-ресурсов. Во всех обследованных в 2005–2010 гг. регионах продолжал доминировать вирус, принадлежащий к генетическому варианту подтипа А – IDU-A, характерному для эпидемии ВИЧ-инфекции в России. Этот вариант преобладал в группах потребителей инъекционных наркотиков и лиц, инфицированных гетеросексуальным путем.

Наряду с IDU-A в обследованных регионах встречаются и другие варианты ВИЧ-1, в первую очередь подтип В и рекомбинант CRF03\_AB.

Генетическое разнообразие ВИЧ-1 в целом остается невысоким. Отмечен рост генетической изменчивости среди индивидуальных случаев заражения IDU-A на территории азиатской части Российской Федерации в 2005–2010 гг. (2,6–6,8%) по сравнению с вариантами, распространенными на европейской части страны в 1996–1999 гг. (1%).

Ключевые слова: ВИЧ-инфекция; молекулярный мониторинг; азиатская часть России.

### HIV-1 Genetic Variants in the Asian Part of Russia: a Study (2005-2010)

**E. V. Kazennova<sup>1</sup>, A. V. Vasilyev<sup>1</sup>, I. A. Lapovok<sup>1</sup>, A. E. Grishechkin<sup>1</sup>, V. Yu. Laga<sup>1</sup>, G. G. Salamov<sup>2</sup>, A. S. Tumanov<sup>1</sup>, O. V. Parygina<sup>3</sup>, L. A. Ruzaeva<sup>3</sup>, L. A. Grezina<sup>4</sup>, T. P. Serkina<sup>5</sup>, O. A. Kaufman<sup>6</sup>, N. D. Oordjak<sup>7</sup>, V. V. Lukashov<sup>8</sup>, M. R. Bobkova<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> D. I. Ivanovsky Institute of Virology, Ministry of Health of the Russian Federation, 123098, Moscow, Russia; <sup>2</sup> Medical Center for Information and Analysis, Russian Academy of Medical Sciences, 107140, Moscow, Russia; <sup>3</sup> Krasnoyarsk AIDS Center, Russia; <sup>4</sup> Yamalo-Neenets AIDS Center, Russia; <sup>5</sup> Yakutsk AIDS Center, Russia; <sup>6</sup> Kurgan AIDS Center, Russia; <sup>7</sup> Tyva AIDS Center, Russia; <sup>8</sup> Academic Medical Center of Amsterdam University, Amsterdam, Netherlands

The HIV-1 genetic variants circulated in the Asian part of the Russian Federation in 2005-2010 were studied. The samples of HIV-1 (427 in total) were collected in Khabarovsk, Magadan, Kurgan, Krasnoyarsk, Noyabr'sk, Yakutsk, Altay, and Tyva. Sequencing of some genome regions followed by the phylogenetic analysis or specific Internet resource sampling were used as the main methods of the HIV subtyping. The domination of the IDU-A HIV-1 genetic variant typical of HIV-infection epidemic in Russia was shown in all regions tested in 2005-2010. This variant prevailed both in IDUs and heterosexuals. In addition to IDU-A, some other HIV-1 genetic variants were found among them: subtype B and recombinant CRF03\_AB. The HIV-1 genetic polymorphism in Russia was found to be low. An increase in the genetic distance among studied de novo samples was noted in the Asian part of Russia in 2005-2010 (26-68%) as compared to the European variants in 1996-1999 (10%).

Key words: HIV-infection, molecular monitoring, Asian part of Russia

Контактная информация:

Казеннова Елена Валерьевна; e-mail: kazennova@rambler.ru