

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 РАННИЕ СИГНАЛЬНЫЕ РЕАКЦИИ ИММУНИТЕТА В ЛИМФОЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА

Институт вирусологии им. Д. И. Ивановского ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва

Иммунные рецепторы врожденного иммунитета TLR4, TLR7, TLR8 и RIG1 узнавали структурные компоненты вирусов гриппа в лимфоцитах человека и были активированы рекомбинантным птичьим вирусом гриппа A/Vietnam/1203/04 и его эскейп-мутантом m13(13) в ранние сроки взаимодействия. Уровни активации не были связаны с вирусной репродукцией и были выше у донора с низкими конститутивными уровнями. Воспалительная реакция лимфоцитов проявлялась ростом активности фактора некроза опухоли альфа (ФНО- $\alpha$ ) и интерферона гамма (ИФН- $\gamma$ ). Сигнальные реакции эндосомальных и цитоплазматических рецепторов на родительский и мутантный вирусы были во многом подобны. Эффект мутации в гене гемагглютинаина (S145F) вируса A/Vietnam/1203/04 проявлялся ростом уровня транскрипции гена мембранного рецептора TLR4 и снижением уровня активации гена ФНО- $\alpha$ . Необходимы дальнейшие исследования с природными изолятами вирусов гриппа для понимания роли антигенной изменчивости в вызываемых ими иммунных реакциях у человека.

Ключевые слова: вирус гриппа; врожденный иммунитет; сигнальные рецепторы; лимфоциты человека; цитокины.

Для цитирования: Вопросы вирусологии. 2016; 61(1): 21–26. DOI 10.18821/0507-4088-2016-61-1-21-26

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 THE IMMUNITY IN HUMAN LYMPHOCYTES

D.I. Ivanovsky Institute of Virology "Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya", 123098, Moscow, Russia

The innate immune receptors TLR4, TLR7, TLR8, and RIG1 recognized the structures of the influenza viruses in human lymphocytes and were activated by the recombinant avian influenza virus A/Vietnam/1203/04 and its escape-mutant m13(13) during early period of interaction. The stimulated levels are not connected with viral reproduction. Donor cells with the low constitutive immune receptors gene expression levels showed higher stimulation. Inflammation virus effects resulted in increasing production of TNF-alpha and IFN-gamma by lymphocytes. Signaling gene reactions of the parent and mutant viruses endosomal as well as cytoplasmic receptors are very similar. The mutant virus A/Vietnam/1203/04 (HA S145F) stimulated an increase in the transcription level of the membrane receptor gene TLR4 and a decrease in the level of activation of TNF-alpha gene. Further studies of natural influenza virus isolates are necessary to estimate the role of HA antigenic changes on immune reactions in humans.

Key words: influenza virus; innate immunity; signaling receptors; human lymphocytes; cytokines.

Citation: Voprosy virusologii. 2016; 61(1): 21–26. (in Russian). DOI 10.18821/0507-4088-2016-61-1-21-26

For correspondence: Tatyana Sokolova, Doctor of Biological Sciences, Academician of the Russian Academy of Natural Sciences; e-mail: tmsokolovavir@mail.ru

Received 22.09.14

Птичий вирус гриппа H5N1 способен преодолевать видовые барьеры и инфицировать человека, вызывая тяжелые формы заболевания с возможным смертельным исходом [1]. Причина опасности заключается в отсутствии у людей иммунитета к вирусам гриппа птиц. Высокий эволюционный потенциал молекулы гена гемагглютинаина (ГА) вирусов гриппа обусловлен мутациями в антигенных участках [2]. Трехмерная структура ГА высокопатогенного штамма A/Vietnam/1203/04 имеет некоторое сходство с человеческим вирусом H1N1 пандемии 1918 г. [3]. Исследованный вирус является рекомбинантом, созданным методом обратной генетики из высокопродуктивного штамма A/Puerto Rico/34 (H1N1) (VCH5N1-PR8/CDC-RG, предоставленный R. Donis из Центра по контролю и борьбе с болезнями, Атланта, США). Гены ГА и нейраминида-

зы заменены на птичий H5N1 A/Vietnam/1203/04. Эскейп-мутант m13(13) A/Vietnam/1203/04 имеет аминокислотную замену S145F, локализованную на поверхности ГА в антигенном сайте 1 [4]. Эта мутация позволяет вирусу ускользать от действия моноклональных антител (МКА) и может оказаться существенной для патогенеза. Мутации в ГА и нейраминидазе вируса A/Vietnam/1203/04 влияют на рецепторную специфичность (SA $\alpha$ 2,6 или SA $\alpha$ 2,3), которая во многом обуславливает патогенность для человека и животных [5]. В настоящей работе мы впервые исследовали свойства рекомбинантного вируса H5N1(A/Vietnam/1203/04) и одного из его эскейп-мутантов m13(13), связанные с индукцией генов врожденного и адаптивного иммунитета и синтеза воспалительных цитокинов в лимфоцитах человека.

Для корреспонденции: Соколова Татьяна Михайловна, д-р биол. наук, акад. РАЕН, ведущий научный сотрудник; e-mail: tmsokolovavir@mail.ru

Структура олигонуклеотидных ПЦР-праймеров

Ген/мРНК	Последовательность нуклеотидов 5'—————3'	Размер ПЦР- продукта, н. п.
H5N1 A/Vietnam/1203/04	П – AAG TAA ACG GGC AAA GTG GAA	314
	О – TTG AGG GCT ATT TCT GAG CCC	
TLR4	П – GTC AGA CGG TGA TAG CGA GC	270
	О – TTA GGA ACC ACC TCC ACG CA	
RIG1	П – CCA GAG AAC CAG TTG GGC TT	163
	О – TCT CCA CCA TCT CTG GAC ACC	
TLR7	П – AGA TGC CTT CCA GTT GCG AT	150
	О – AAC CAC ACA GCA TCA CAG GT	
TLR8	П – CCT CGT CTC GAG TTG CTT GA	133
	О – GAA AGC CAG AGG GTA GGT GG	

Примечание. н. п. – нуклеотидные пары.

Известно, что инфицирование человека высокопатогенными птичьими вирусами H5N1 вызывает сильный воспалительный цитокиновый ответ в организме («цитокиновый шторм»). Вирусная активация иммунных реакций происходит в макрофагах и эпителиальных клетках человека, моноцитах, вызывая их дифференциацию в дендритные клетки [6]. Показано, что иммунокомпетентные клетки могут являться своеобразным депо для доставки вирусов гриппа в клетки дыхательных путей человека [7]. Вызываемые в них воспалительные реакции способствуют попаданию вируса в легкие и не связаны с уровнями вирусной репликации [5].

Клеточное узнавание РНК-содержащих вирусов, в том числе вирусов гриппа и их компонентов, осуществляется группой рецепторов врожденного иммунитета, мембранным TLR4, эндосомальными TLR7/8 и цитоплазматическим RIG1 [8–10]. Активация этих рецепторных путей в иммунокомпетентных клетках, по-видимому, является важной составляющей уровня распространения инфекции и проникновения вирусов в чувствительные клетки. Среди иммунорегуляторных цитокинов важную роль играет интерферон-гамма (ИФН- $\gamma$ ) – активатор адаптивных иммунных реакций популяций Т-лимфоцитов (Тх1), естественных киллеров (ЕК) и макрофагов [11], а также фактор некроза опухоли (ФНО- $\alpha$ ) и сигнальный интерлейкин 1-бета (ИЛ-1 $\beta$ ), ассоциированные с вирусным патогенезом. Таких исследований с птичьими вирусами гриппа на уровне транскрипции генов – рецепторов врожденного иммунитета в клетках крови человека крайне мало, и пока не получено однозначных ответов о связи разных сигналов между собой. Для количественной оценки экспрессии генов-рецепторов (TLR4, TLR7/8, RIG1) и цитокинов (ИФН- $\gamma$  и ФНО- $\alpha$ ) применили метод обратной транскрипции -полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) в режиме реального времени, обладающий высокой чувствительностью и специфичностью. Продукция цитокинов измерена с помощью иммуноферментного анализа (ИФА).

### Материал и методы

**Вирусы гриппа.** Использовали рекомбинантный вирус, утративший высокую патогенность. Вирус создан методом обратной генетики из высокопродуктивного штамма A/Puerto Rico/34 (H1N1) (VCH5N1-PR8/CDC-RG, предоставленный R. Donis из Центра по контролю и профилактике болезней, Атланта, США), в котором гены ГА и нейраминидазы заменены на птичьи H5N1 A/Vietnam/1203/04. Эскейп-мутант m13(13) этого вируса получен селекцией с МКА в Лаборатории физиологии Института вирусологии им. Д. И. Ивановского [4]. Ген ГА модифицирован специфическим мутагенезом, и в белке отсутствует сайт расщепления молекулы. Вирусы хорошо размножаются в аллантоисной полости 10-дневных куриных эмбрионов. Образцы аллантоисных вирусов хранили при -80°C.

**Постановка опытов в лимфоцитах.** Лимфоциты изолированы из периферической крови двух доноров в градиенте фикола с применением стандартной процедуры. Для проведения опытов очищенные лимфоциты приготовлены в виде суспензии с концентрацией 10 млн/мл в питательной среде RPMI-1640 с 10% сыворотки эмбрионов коров и антибиотиком гентамицином. Рекомбинантный вирус A/Vietnam/1203/04 и его мутант m13(13) добавлены к суспензионным культурам лимфоцитов донора 1 и донора 2 в коли-

честве 0,1 мл (16–32 ГА). Контрольные культуры лимфоцитов двух доноров приготовлены параллельно без вирусов. После адсорбции вирусов лимфоциты дважды отмыты средой и разведены до концентрации 2 млн в питательной среде с сывороткой для продолжения инкубации при 37°C в культуральных пробирках с крышками. В сроки исследования 2, 24, 48 и 72 ч из опытных и контрольных проб отбирали образцы 0,5 мл, которые центрифугировали при 1000 об/мин для получения осадков клеток и супернатантов культуральной жидкости. Клетки лизированы в реагенте TRIZOL («Invitrogen», США) и использованы для выделения РНК. В супернатантах измеряли уровень цитокинов методом ИФА, определяли инфекционность вирусов в чувствительной культуре клеток CaCo-2 и количество вирусных ГА в реакции с куриными эритроцитами. Пробы хранили при -80°C.

**Процедуры выделения РНК и проведение ОТ-ПЦР в реальном времени** подробно описаны в работах [12, 13]. Количественную ПЦР в реальном времени ставили на приборе CFX-96 («Bio-Rad», США) с готовой двукратной смесью SsoFast EvaGreen Supermix. К разведенной 1/3 или 1/9 кДНК добавляли пары прямого и обратного специфических праймеров. Праймеры к вирионной РНК (ген ГА) A/Vietnam/1203/04 (HM006759) и эскейп-мутанту m13(13) (EU122399) и мРНК клеточных рецепторов TLR4, TLR7, TLR8 и RIG1 рассчитаны в программе Primer 3 Blast NCBI GenBank и приведены в табл. 1. ПЦР-праймеры к рибосомальной 18S РНК, мРНК бета-2-микроглобулин (B2M), мРНК ФНО- $\alpha$  и мРНК ИФН- $\gamma$  опубликованы ранее [12–14]. Все праймеры были синтезированы фирмой «Синтол» (Россия). Полученный ПЦР-продукт соответствовал расчетному по температуре плавления и подвижности в агарозном геле. Относительная оценка экспрессии генов (дельта Сq) сделана в программе CFX Manager «Gene expression analysis» в автоматическом режиме.

**Определение цитокинов** ИЛ-1 $\beta$ , ИФН- $\gamma$ , ФНО- $\alpha$  в культуральной жидкости выполнено с помощью ИФА-наборов фирмы «Вектор-Бест» согласно прилагаемой инструкции. Количественное измерение оптической плотности и расчет средних концентраций двух повторных образцов (в пг/мл) выполнен на микропланшетном фотометре модели «Anthos 2010» в программе ADAP+ («Biochrom», Великобритания). Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы Statistica 6. Оценку статистической значимости

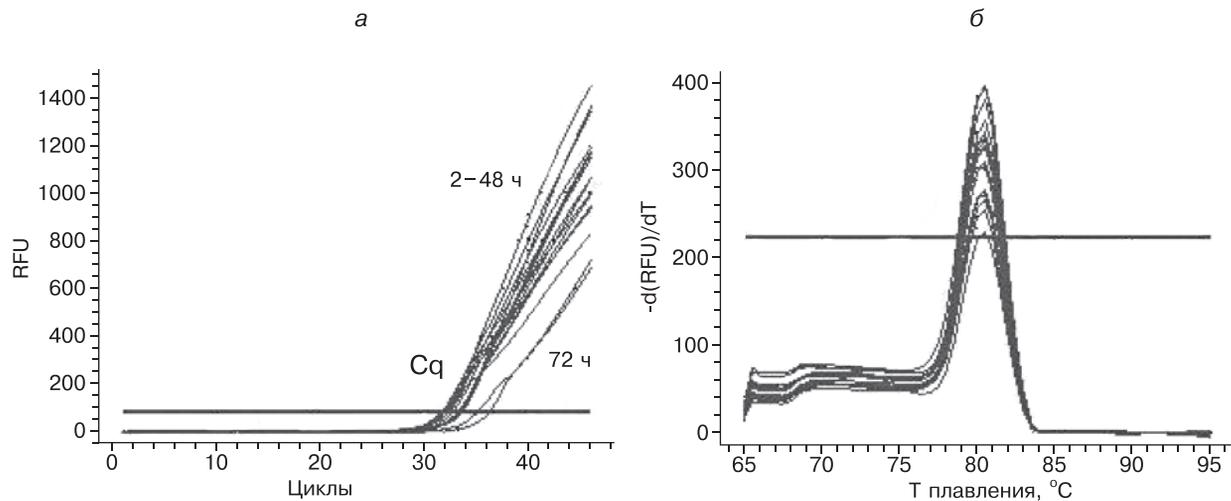


Рис. 1. Взаимодействие вируса A/Vietnam/1203/04 и эскейп-мутанта m13(13) с лимфоцитами человека.

*a* - амплификация вирионной РНК в лимфоцитах. По оси абсцисс – циклы, по оси ординат – уровни флюоресценции синтезированных ДНК-продуктов в разные сроки исследования; *б* - пики плавления специфических ПЦР-продуктов. По оси абсцисс – температура плавления, по оси ординат – производная флюоресценции.

Т а б л и ц а 2

Показатели инфекционности и ГА-активности культуральных вирусов

Вирусы	Фоноры	Сроки исследования $\log_2$ ЦПД <sub>50</sub> /ед. ГА, ч			
		2	24	48	72
H5N1	1	5/<2	4/2	4/2	н.и*/2
	2	5/<2	2/4	3/4	4/4
m13-мутант	1	4/<2	5/<2	5/<2	<2/2
	2	4/<2	5/4	5/4	4/4

выполняли с применением *t*-критерия Стьюдента при  $p < 0,05$ .

**Титрование инфекционности** вирусов A/Vietnam/1203/04 и мутанта m13(13) в культуральной жидкости лимфоцитов проводили на чувствительных клетках CaCo-2 (РОНЦ им Н. Н.Блохина) микрометодом в 96-луночных плато. Под световым микроскопом появление ЦПД<sub>50</sub> вирусов определяли в двукратных разведениях. Величины обратного разведения считали титром и выражали в  $\log_2$ . Реакцию ГА куриных эритроцитов (0,75 % взвесь в физиологическом растворе NaCl, pH 7,0) с культуральными вирусами выполняли в круглодонных микроплатах стандартным методом.

### Результаты и обсуждение

Возможность размножения птичьего вируса H5N1(A/Vietnam/1203/04) и его эскейп-мутанта m13(13) в клетках крови человека была неизвестной. Поэтому нам предстояло выяснить, происходит ли накопление вирионной РНК в инфицированных лимфоцитах и освобождение инфекционных вирионов и их ГА в среду культивирования в динамике наблюдения (сроки исследования 2, 24, 48 и 72 ч). На рис. 1 представлены данные амплификации вирионной РНК в ПЦР в лимфоцитах 2-х доноров и показатели инфекционности и ГА-активности в культуральной жидкости в динамике (табл. 2). Видно, что во все сроки (с 2 до 48 ч) в лимфоцитах присутствовала вирионная РНК, и ее количество менялось незначительно (у донора 1 пороговые циклы  $C_q = 32-33$ , у донора 2  $C_q = 28-30$ ), снижаясь к 72 ч (см. рис. 1, *a*). Рассчи-

танные праймеры к гену ГА (фрагмент S4) вируса A/Vietnam/1203/04 и его эскейп-мутанту m13(13) давали 1 специфический ПЦР-продукт 314 н. п. с характерной температурой плавления 80°C (см. рис. 1, *б*). Показатели инфекционности и ГА-активности были на низком уровне (порядка 4–5  $\log_2$  ЦПД<sub>50</sub>/ 2–4 ед. ГА) и также мало изменялись в динамике наблюдения (см. рис. 1; табл. 2). Согласно данным, приведенным ниже, этого оказалось вполне достаточно для выраженных эффектов птичьего вируса H5N1(A/Vietnam/1203/04) и его эскейп-мутанта m13(13) на сигнальные реакции иммунитета в лимфоцитах человека.

Нами определена экспрессия 4 генов–рецепторов врожденного иммунитета, которые участвуют в узнавании вируса гриппа: вирионной РНК – внутриклеточные рецепторы RIG1, TLR7, TLR8 и гликолипопротеидов ГА оболочки — мембранный рецептор TLR4. На рис. 2, *a–e* показаны изменения экспрессии этих рецепторных генов в лимфоцитах двух доноров в разные сроки исследования. Кратность изменений генной активности рассчитана относительно соответствующих временных контролей без вирусов, принятых равными 1. Для генов «узнающих» рецепторов наблюдается очень ранняя (2 ч) стимуляция вирусами (эскейп-мутантом m13 (черные столбики) и исходным вирусом H5N1 (белые столбики)). В обоих случаях за активацией следует падение генной активности (исключением являются гены TLR7 и RIG1 у донора 2, которые продолжают быть активированы вирусами в срок 24 ч). Следует отметить, что мутантный вирус в ряде случаев опережает исходный вирус по уровню и времени генной активации, что особенно заметно в случае мембранного рецептора TLR4. У донора 1 стимулирующее действие обоих вирусов на экспрессию генов TLR4 и RIG1 достигает высоких 100-кратных уровней, тогда как у донора 2 не превышает 10 раз. Оба вируса стимулируют экспрессию генов TLR7 и TLR8 в лимфоцитах донора 2.

Мы сопоставили конститутивные уровни экспрессии рецепторных генов TLR4, TLR7 и RIG1 в лимфоцитах доноров 1 и 2 и нашли, что они в срок 2 ч существенно различаются (рис. 3, *a–z*). Пороговые циклы  $C_q$  амплификации ДНК у донора 1 очень низкие (TLR4 40, TLR7 42, RIG1  $C_q > 45$ ). Напротив, у донора 2 генные уровни TLR4 30, TLR7 и RIG1 37 намного выше (см. рис. 3, *a–z*). Нами обнаружен важный, на наш взгляд, факт

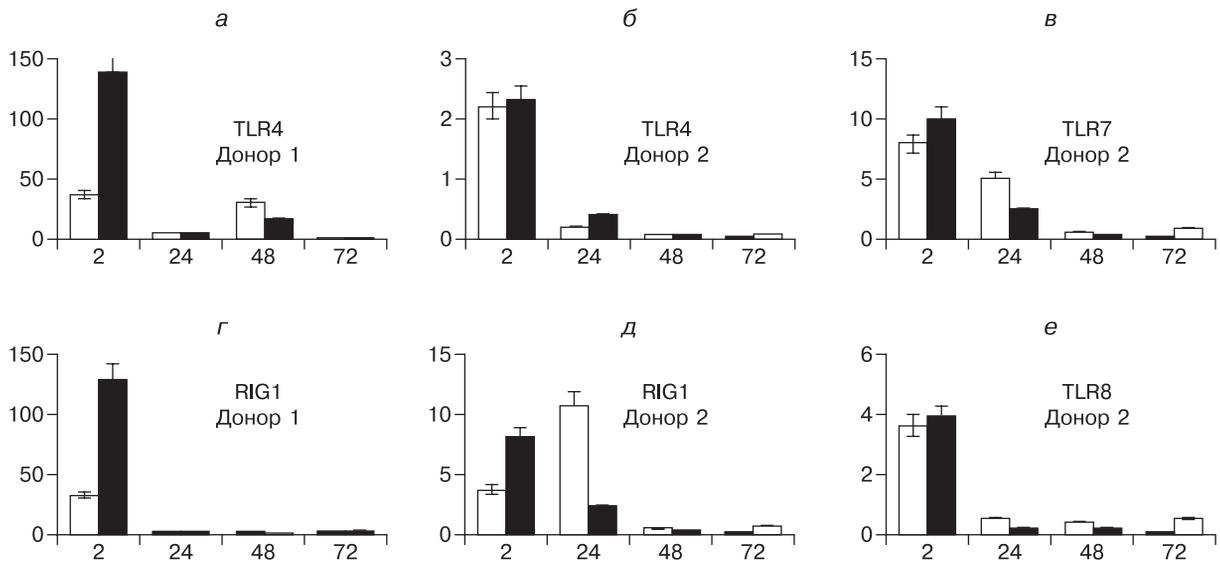


Рис. 2. Стимуляция вирусами A/Vietnam/1203/04 и эскейп-мутантом m13(13) транскрипции генов TLR4 (а, б), TLR7 (в), TLR8 (е) и RIG1 (г, д) в лимфоцитах двух доноров.

Здесь и на рис. 4: по оси абсцисс – сроки исследования в часах, по оси ординат – кратность стимуляции транскрипции относительно контролей, принятых равными 1.

– значительный рост уровней экспрессии рецепторов врожденного иммунитета в процессе культивирования лимфоцитов двух доноров в питательной среде (RPMI-1640 с 10% сыворотки эмбрионов коров) в контролях в отсутствие вирусов (см. рис. 3, а–г). Это указывает на активацию защитных реакций лимфоцитов в условиях культивирования *ex vivo*.

Экспрессия гена ФНО- $\alpha$  в присутствии вирусов была у 2-х доноров повышенной, но постепенно ослабевающей (рис. 4, а, б). У донора 1 наблюдалось более длительное цитотоксическое действие исходного вируса H5N1 по сравнению с мутантным, который показывал

более выраженный ФНО-эффект преимущественно в ранний срок 2 ч.

Считается, что экспрессия рибосомальной РНК (рРНК) мало меняется при разного рода воздействиях на клетки, поэтому ее используют как референс-РНК для нормализации данных генной экспрессии. Однако этот ген «домашнего хозяйства», по нашим данным, меняется при действии интерферонов, dsРНК и иммуномодулятора на клетки человека [13, 14]. Сравнительный анализ транскрипционной активности 18S рРНК в лимфоцитах с вирусами гриппа подтвердил, что активность рибосомального гена возрастает через 2 и 24 ч, подобно

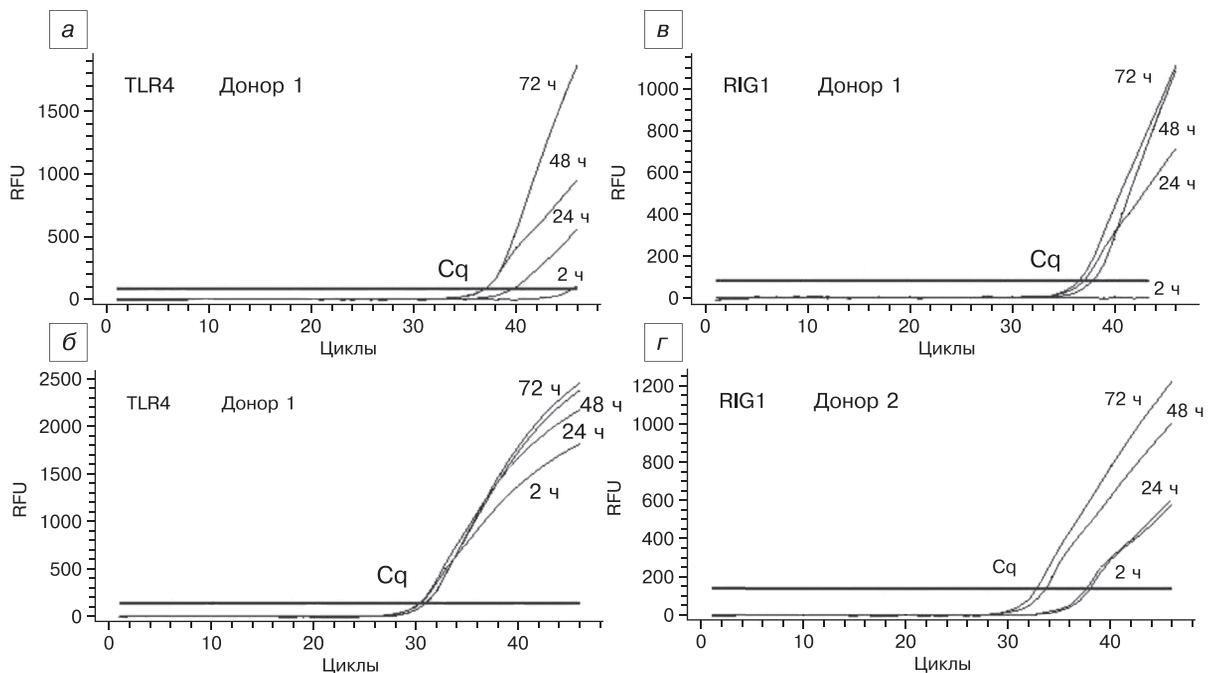


Рис. 3. Сравнение конститутивных уровней экспрессии генов рецепторов TLR4 (а, б) и RIG1 (в, г) в лимфоцитах двух доноров. По оси абсцисс – циклы амплификации, по оси ординат – флюоресценция ДНК-ампликатов. Кривые накопления в разные сроки исследования. Cq – пороговые циклы.

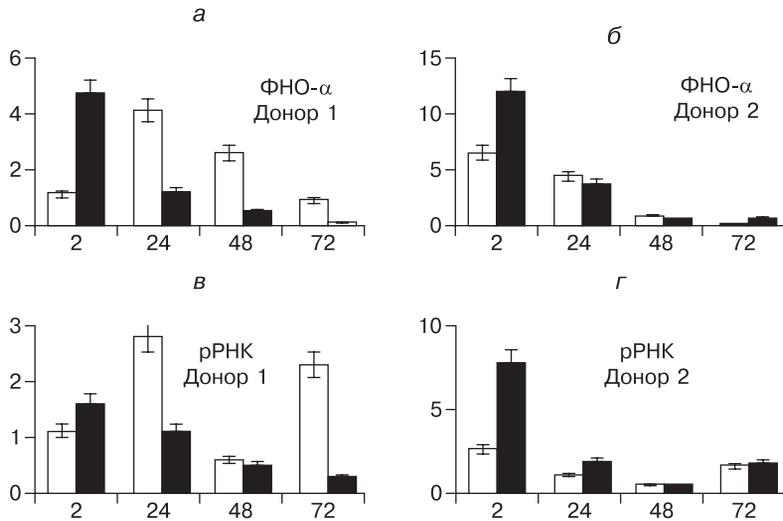


Рис. 4. Влияние вирусов A/Vietnam/1203/04 и эскейп-мутанта m13(13) на транскрипцию гена ФНО- $\alpha$  (а, б) и 18S рРНК (в, з) в лимфоцитах.

генам рецепторов, и затем к 48–72 ч снижается у обоих доноров (рис. 4, в, з). Кратность изменений рибосомального гена у донора 1 меньше, чем у донора 2, но это не позволяет рассматривать рРНК как стабильный референсный ген в наших опытах.

Транскрипционная активность гена ИФН- $\gamma$  у 2-х доноров в контрольных лимфоцитах человека была не выявляемой во все сроки исследования (45 циклов амплификации). Исходный вирус H5N1 стимулировал экспрессию этого гена на 41 цикле и эскейп-мутант на 43–45 циклах только у донора 2 (данные не приводятся). Продукция лимфоцитами цитокинов ИФН- $\gamma$ , ФНО- $\alpha$  и ИЛ-1 $\beta$  в ответ на мутантный и исходный H5N1-вирусы гриппа была определена методом ИФА (табл. 3). На фоне низкой спонтанной секреции ИФН- $\gamma$  и ФНО- $\alpha$  в контролях (до 10 пг/мл) добавление вирусов вызывало мощный цитокиновый взрыв (> 500 пг/мл). Более сильным индуктором ИФН- $\gamma$  был мутантный вирус гриппа m13(13). Исходный вирус H5N1 вызывал в большей степени секрецию ФНО- $\alpha$ . Индукция вирусами гриппа ИЛ-1 $\beta$  была незначительной (3–4 пг/мл, лишь в 1,5–2 раза выше контрольных показателей; данные не приводятся).

Представленные нами данные подтверждают участие рецепторов врожденного иммунитета TLR4, TLR7, TLR8 и RIG1 в «узнавании» вирусов гриппа [7, 15] и открывают новые закономерности этого процесса. Поиск на рецепторных уровнях чувствительных мишеней позволит найти более эффективные анти-вирусные препараты. Сигнальные иммунные реакции на рекомбинантный вирус гриппа А с птичьим ГА

(Vietnam/1203/04) являются очень быстрыми и преходящими, не зависят от его репликации и происходят на этапах адсорбции и проникновения вируса. Вместе с тем степень проявления и скорость реакций, возможно, зависят от конститутивных уровней активности генов рецепторов врожденного иммунитета. В наших опытах вирусная стимуляция рецепторных генов была сильнее выражена в лимфоцитах донора с низкими уровнями. Кроме того, у этого донора при культивировании лимфоцитов без вирусов наблюдался рост активности генов иммунных рецепторов, но в меньшей степени, чем с вирусами. Такие индивидуальные различия могут быть связаны с количеством лимфоцитов в образцах крови доноров, хотя в условиях параллельно проводимых нами экспериментов первоначальные концентрации очищенных лимфоцитов в образцах были приблизительно равными (2 млн/мл). Поэтому более вероятно, что лимфоциты разных доноров отличаются конститутивными уровнями экспрессии рецепторных генов. Однако насколько такие индивидуальные характеристики генной экспрессии стабильны, предстоит выяснить в дальнейшем при повторных анализах. В данном случае мы имеем лишь наблюдение, демонстрирующее разные уровни стимуляции генов – иммунных рецепторов вирусами гриппа птиц у доноров. Подобный эффект уже был отмечен нами ранее в клетках цельной крови разных людей при действии ИФН и его индукторов на рецепторы врожденного иммунитета.

На основании вирусологических данных с рекомбинантными вирусами птиц и результатов ПЦР с вирионными РНК мы пришли к выводу, что на лимфоцитах происходила адсорбция вируса и внутриклеточное проникновение РНК, но за этим не следовало вирусной репликации или ее уровень был минимальным. Тем не менее, вирионные РНК сохранялись в клетках по крайней мере на протяжении 72 ч. Поэтому наблюдаемая ранняя активация иммунных рецепторов не связана с вирусной репликацией. К такому же выводу пришли и другие исследователи в опытах с вирусом гриппа, инактивированным УФ, который утратил инфекционность, но сохранял цитокиноиндуцирующие свойства [7].

Изменения в антигенной структуре ГА, позволяющие вирусу m13(13) A/Vietnam/1203/04 H5N1 ускользать от иммунного ответа, приводят к некоторым отличиям от исходного вируса H5N1. Так, при взаимодействии мутантного вируса с лимфоцитами повышается скорость индукции гена мембранного рецептора TLR4 и снижается уровень продукции цитотоксического гена ФНО- $\alpha$ . Тем не менее между исходным и мутантными вирусами много общего в регуляции генов – иммунных рецепторов и секретируемых лимфоцитами цитокинов. Поэтому замена в антигенном сайте 1 (S145F) птичьего ГА не является критической для проявления вирусами иммуномодулирующих свойств, хотя и вносит в их свойства некоторые модификации. Длительность сохранения вируса в лимфоцитах, о чем можно судить по содержанию в них вирионной РНК, подтверждает мнение о возможности использования лимфоцитов в качестве депо для доставки в чувствительные клетки-мишени дыхательных путей. Процессам вирусной целевой доставки во многом способствует иммунная активация лимфоцитов, продукция ими воспалительных цитокинов и ИФН типа 1 [15]. Показанные в нашей работе высокие уровни

Таблица 3

Продукция цитокинов лимфоцитами человека

Цитокины, пг/мл	Вирусы	Сроки исследования, ч		
		2	24	48
ИФН- $\gamma$	Контроль	10,4	4,2	9,2
	Мутант m13	5,6	135	152
	H5N1	10,4	99	102
ФНО- $\alpha$	Контроль	9,3	8,2	10,1
	Мутант m13	107	462	> 500
	H5N1	140	> 500	> 500

продукции ИФН- $\gamma$  в лимфоцитах, по-видимому, не позволяют вирусам гриппа размножаться в этих клетках. Наши модельные исследования с рекомбинантным вирусом гриппа H5N1 (Vietnam/1203/04) не исключают, что белки эталонного вируса высокопродуктивного штамма A/Puerto Rico/34 (H1N1) также могли влиять на иммунные реакции лимфоцитов. Поэтому необходимы дальнейшие исследования на природных изолятах вирусов гриппа, чтобы понять, как антигенная изменчивость ГА вирусов связана с рецепторной специфичностью и как это влияет на иммунные реакции лимфоцитов.

**ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1–7, 9–11, 15, 16  
см. REFERENCES)**

8. Соколова Т.М. Иммунное узнавание вирусных нуклеиновых кислот приводит к индукции интерферонов и воспалительных цитокинов. В кн.: Ершов Ф.И., ред. *Сборник научных трудов «Интерферон-2011»*. М.: НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи МЗ РФ; 2012: 52–62.
12. Соколова Т.М., Шувалов А.Н. Подавление рекомбинантным альфа-2-интерфероном репродукции вируса Карельской лихорадки в клетках крови человека. *Вопросы вирусологии*. 2011; 57(2): 27–31.
13. Соколова Т.М., Шувалов А.Н., Телков М.В., Колодяжная Л.В., Ершов Ф.И. Препарат «Ридостин» индуцирует транскрипцию широкого спектра генов системы интерферона в клетках человека. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2013; 156(8): 179–82.
14. Шувалов А.Н., Соколова Т.М., Шаповал И.М., Ершов Ф.И. Модуляция клеточных генов препаратом Иммуномакс: активация генов интерферонов и интерлейкинов. *Иммунология*. 2014; 35(1): 16–20.

**REFERENCES**

1. Webster R.G., Govorkova E.A. H5N1 influenza-containing evolution and spread. *N. Engl. J. Med.* 2006; 355: 2174–7.
2. Kaverin N.V., Rudneva I.A., Ilyushina N.A., Varich N.L., Lipatov A.S., Smirnov Y.A. et al. Structure of antigenic sites on the hemagglutinin molecule of H5 influenza virus and phenotypic variation of escape mutants. *J. Gen. Virol.* 2002; 83(Pt. 10): 2497–505.
3. Stevens J., Blixt O., Tumpey T.M., Taubenberger J.K., Paulson J.C., Wilson I.A. Structure and receptor specificity of the hemagglutinin from an H5N1 influenza virus. *Science*. 2006; 312(5772): 404–10.
4. Kaverin N.V., Rudneva I.A., Govorkova E.A., Timofeeva T.A., Shilov A.A., Kochergin-Nikitsky K.S. et al. Epitope mapping of

- the hemagglutinin molecule of highly pathogenic H5N1 influenza virus by using monoclonal antibodies. *J. Virol.* 2007; 81(23): 12911–7.
5. Ramos I., Bernal-Rubio D., Durham N., Belicha-Villanueva A., Lowen A.C., Steel J. et al. Effects of receptor binding specificity of avian influenza virus on the human innate immune response. *J. Virol.* 2011; 85(9): 4421–31.
  6. Hou W., Gibbs J.S., Lu X., Brooke C.B., Roy D., Modlin R.L. et al. Viral infection triggers rapid differentiation of human blood monocytes into dendritic cells. *Blood*. 2012; 119(13): 3128–31.
  7. Pang I.K., Pillai P.S., Iwasaki A. Efficient influenza virus replication in respiratory tract requires signals from TLR3 and RIG1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2013; 110(34): 13910–5.
  8. Sokolova T. M. Immune recognition viral nucleic acids result in interferon and inflammatory cytokines induction. In: Ershov F.I., ed. *Collection of Scientific Works “Interferon-2011.”* [Sbornik nauchnykh trudov «Interferon-2011»]. Moscow: NIIEM im. N.F. Gamalei MZ RF; 2012: 52–62. (in Russian)
  9. Kawai T., Akira S. Toll-like receptor and RIG1-like receptor signaling. *Ann. NY Acad. Sci.* 2008; 1143: 1–20.
  10. Lester S.N., Li K. Toll-like receptors in antiviral innate immunity. *J. Mol. Biol.* Available at: [http:// dx.doi.org/10.1016.jmb.2013.11.024](http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2013.11.024).
  11. Saha B., Prasanna S.J., Chandrasekar B., Nandi D. Gene modulation and immunoregulatory roles of interferon gamma. *Cytokine*. 2010; 50(1): 1–14.
  12. Sokolova T. M., Shuvalov A. N. Recombinant interferon- $\alpha$  suppression of Karelian fever virus replication in human blood cells. *Voprosy virusologii*. 2011; 57(2): 27–31. (in Russian)
  13. Sokolova T.M., Shuvalov A.N., Telkov M.V., Kolodyazhnaya L.V., Ershov F.I. Preparation “Ridostin” induces transcription wide genes spectrum of interferon system in human cells. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2013; 156(8): 179–82. (in Russian)
  14. Shuvalov A.N., Sokolova T.M., Shapoval I.M., Ershov F.I. Modulation of cellular gene transcription by drug «Immunomax»: activation of Interferon and Interleukine genes. *Immunologiya*. 2014; 35(1): 16–20. (in Russian)
  15. Cao W., Taylor A.K., Biber R.E., Davis W.G., Kim J.H., Reber A.J. et al. Rapid differentiation of monocytes into type I IFN-producing myeloid dendritic cells as an antiviral strategy against influenza virus infection. *J. Immunol.* 2012; 189(5): 2757–65.
  16. Cheng X., Xu Q., Song E., Yang C.F., Kemble G., Jin H. The hemagglutinin protein of influenza A/Vietnam/1203/2004(H5N1) control to hyperinduction of proinflammatory cytokines in human epithelial cells. *Virology*. 2010; 406(1): 28–36.

Поступила 22.09.14