

**ВЛИЯНИЕ ЗАРАЖЕНИЯ ВИРУСОМ ГРИППА А  
ПРИ РАЗЛИЧНОЙ МНОЖЕСТВЕННОСТИ ИНФЕКЦИИ НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ  
И ИНДУКЦИЮ АПОПТОЗА ПЕРЕВИВАЕМЫХ КЛЕТОК ЛИМФОЦИТАРНОГО  
И МОНОЦИТАРНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ (Jurkat, NC-37, THP-1 И U-937)**

© Т. Д. Смирнова, Д. М. Даниленко, Е. В. Ильинская,  
С. С. Смирнова, М. Ю. Еронкин

*Научно-исследовательский институт гриппа Министерства здравоохранения РФ,  
Санкт-Петербург, 197022;  
электронный адрес: cellcultures@influenza.spb.ru*

Тяжесть заболевания, вызванного вирусом гриппа А, зависит как от биологических особенностей возбудителя, так и от количества вирусных частиц, попавших в организм. Решающую роль в создании клеточного и гуморального иммунитета, а также элиминации вируса гриппа из организма играют Т- и В-лимфоциты, а также моноциты (макрофаги). Цель работы состояла в изучении влияния вируса гриппа А на пролиферацию и индукцию апоптоза клеточных линий человека Т-, В-лимфоцитарного и моноцитарного происхождения, зараженных разными дозами вируса. Обнаружено, что низкие дозы вируса гриппа оказывают стимулирующее влияние на пролиферацию клеток; максимальная стимуляция пролиферации клеток, зараженных низкой дозой вируса гриппа, была выявлена на 3—4-е сут после заражения. Но дальнейшая судьба Т-лимфобластов, В-лимфобластов и моноцитов была различна: клетки Jurkat продолжали интенсивно размножаться, тогда как пролиферативная активность клеток NC-37, THP-1 и U-937 снижалась. Продолжительное (на протяжении трех пассажей) культивирование клеток Jurkat, NC-37 и U-937 показало, что заражение клеток не только низкими, но и средними и высокими дозами вируса также приводит к стимуляции клеточной пролиферации. Использование различных методов для обнаружения репродукции вируса показало, что при заражении непермиссивных Т-, В-лимфобластоидных и моноцитарных перевиваемых клеток человека вирусом гриппа А возникает латентная инфекция. При этом при низких дозах заражения клеток вирусом происходит нарушение нормального процесса образования вирусных частиц, что, возможно, и является причиной усиления пролиферации клеток, которое при этом сопровождается индукцией апоптоза. Антивирусные препараты ремантадин и рибавирин снижали пролиферацию клеток, повышенную при низком уровне инфицированности их вирусом; в то же время индукция апоптоза снижалась только под воздействием ремантадина и усиливалась под воздействием рибавирина. Эти результаты служат подтверждением решающей роли вируса гриппа А в развитии наблюдаемых эффектов.

**Ключевые слова:** Т-, В-лимфобластоидные и моноцитарные клеточные линии, вирус гриппа А, пролиферация клеток, апоптоз, инфицирующая доза.

**Принятые сокращения:** ДК — доля от контроля, ИА — индекс апоптоза, ИД — инфицирующая доза, ИП — индекс пролиферации, ТЦД<sub>50</sub> — титр цитопатического действия, вызывающего поражение 50 % монослоя клеток, ЦПД — цитопатическое действие, ЭТС — эмбриональная телячья сыворотка, НА — гемагглютинин, NP — нуклеопротеин.

Вирус гриппа А продолжает оставаться лидирующим среди вирусов, вызывающих респираторные заболевания. Заражение вирусом гриппа А осуществляется через верхние дыхательные пути, и в случае преодоления барьера врожденного иммунитета вирус может проникнуть в нижние отделы дыхательных путей, а также распространиться по всему организму. Значение Т- и В-лимфоцитов, а также моноцитов (макрофагов) в патогенезе вируса гриппа А исключительно велико, поскольку эти клетки участвуют в создании клеточного и гуморального иммунитета и элиминации вируса из организма. Инфицированные вирусом гриппа А лимфоциты и моноциты, обладающие слабой пермиссивностью для полноценной репро-

дукции вируса, могут разноситься по всему организму либо депонироваться в лимфоузлах (Kuiken, Taubenberger, 2008). Тяжелое течение заболевания гриппом сопровождается резким снижением количества лимфоцитов в периферической крови, что особенно характерно при птичьем гриппе (Peiris, Yu, 2004). В процессе инфицирования вирусом гриппа может возникнуть как острые, так и ослабленные инфекции, вызванные проникновением небольшого количества вирусных частиц или подавлением вирусной репродукции в результате применения антивирусной терапии.

Первичные культуры клеток крови человека и мышей широко используются для изучения гриппозной инфек-

ции на клеточном и молекулярном уровнях, но в основном для моделирования острой инфекции с высокой степенью заражения клеток вирусом. Информации же о состоянии клеток при низкой инфицированности недостаточно (Van Campen et al., 1989; Oh, Eichelberger, 1999; Oh et al., 2000; Sturlan et al., 2009).

Цель нашей работы состояла в изучении влияния вируса гриппа А при разной степени зараженности клеток на пролиферацию и индукцию апоптоза клеточных линий человека Т-, В-лимфоцитарного и моноцитарного происхождения. Исследовали изменение пролиферации клеток при продолжительном культивировании (на протяжении трех пассажей) после однократного заражения клеток различными дозами вируса. Применение вирусологических, иммуноцитохимических методов и электронной микроскопии показало, что при снижении заражающей дозы происходит нарушение репродукции вируса гриппа А в непермиссивных лимфобластоидных клеточных линиях человека, что сопровождается повышением пролиферации клеток и последующим их апоптозом. Подтверждение решающей роли вируса гриппа А в полученных результатах показано при добавлении антивирусных препаратов ремантадина и рибавирина.

## Материал и методика

**Клеточные линии.** Клетки перевиваемой линии почки собаки (MDCK) использовали для определения титра вируса гриппа А по его цитопатическому действию (ЦПД) и для выявления вируса в опытных образцах. Клетки культивировали в среде α-МЕМ, содержащей 2 % эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС). Перевиваемые линии клеток человека — Т-лимфобластоидные (Jurkat), В-лимфобластоидные (NC-37), моноцитарные (THP-1) и гистиоцитарные (U-937) — культивировали в среде RPMI-1640, содержащей 2 % ЭТС, и пересевали 1 раз в 5—6 сут с кратностью 1 : 3—1 : 5. Все клеточные линии культивировали без добавления антибиотиков. Для проведения опытов использовали 3-суточные культуры с концентрацией клеток 300 тыс./мл.

**Вирусы гриппа.** Использовали А/Брисбен/10/07 (H3N2) и А/Санкт-Петербург/5/09 (H1N1pdm). Вирусы поддерживали заражением в аллантоисную полость 9—11-суточных куриных эмбрионов. Через 48 ч аллантоисную жидкость собирали, разливали на аликовты и замораживали при  $-70^{\circ}\text{C}$ . Титры вирусов составляли 5—6 Ig ТЦД<sub>50</sub> (титр цитопатического действия, вызывающего поражение 50 % монослоя клеток MDCK). За одну инфицирующую дозу (ИД) в 1 мл принимали последнее десятикратное разведение титруемого вируса. Множественность инфекции (отношение величины ИД к количеству зараженных клеток) при низкой дозе заражения вирусом (1—10 ИД) соответствовала 0.000003—0.00003, при высокой дозе заражения (1000 ИД) — 0.003.

**Заражение тестируемых клеточных культур вирусом** проводили путем инкубации клеток с заранее оттитрованной вирусосодержащей аллантоисной жидкостью при  $37^{\circ}\text{C}$  в течение 45 мин в бессывороточной среде RPMI-1640 с добавлением трипсина (1 мкг/мл) и антибиотиков (пенициллина и стрептомицина). Затем клетки однократно отмывали от вируса центрифугированием, суспендировали в среде RPMI-1640, содержащей 1 % ЭТС, трипсин и антибиотики, и рассевали в 24-лунечные планшеты по 1 мл в лунку. Пересев клеток в лун-

ках на пассажах проводили на 5-е сут с кратностью 1 : 3. Контролем служили клеточные культуры, которые инкубировали с интактными, не содержащими вируса, аллантоисными жидкостями.

Пролиферацию клеток определяли по подсчету клеток, не окрашенных трипановым синим, в камере Фукса—Розенталя. Для этого в определенные сроки после рассева клеток отбирали пробы клеточных суспензий из контрольных и зараженных вирусом культур. Пролиферативную активность клеток оценивали двумя способами: 1) по индексу пролиферации (ИП), который рассчитывали по формуле  $\text{ИП} = (a/b) \cdot 100\%$ , где  $a$  — число выросших клеток на определенном сроке культивирования,  $b$  — число исходно посевных клеток; 2) по доле от контроля (ДК), которую рассчитывали по формуле  $\text{ДК} = (a/c) \cdot 100\%$ , где  $a$  — число выросших клеток на определенном сроке культивирования,  $c$  — число клеток в контроле на этом же сроке культивирования. На каждую временну точку использовали по 2 лунки, все эксперименты проводили не менее 3 раз.

Апоптоз клеток оценивали по степени деградации ядерного хроматина. Препараты на предметных стеклах фиксировали смесью метанола с уксусной кислотой в соотношении 3 : 1, окрашивали флуоресцентным красителем Hoechst-33258 и определяли долю апоптотических клеток, просчитывая не менее 10 полей зрения под люминесцентным микроскопом, используя масляную иммерсию. Результаты выражали в виде индекса апоптоза (ИА) по формуле  $\text{ИА} = (b/c) \cdot 100\%$ , где  $b$  — число апоптотических клеток,  $c$  — общее число просмотренных клеток. Окрашивание клеток красителем Hoechst-33258 являлось одновременно контролем за контаминацией клеток бактериями, Л-формами бактерий и микоплазмами.

**Электронная микроскопия.** Контрольные клетки и клетки, зараженные вирусом гриппа А, фиксировали через 72 ч после заражения. Фиксацию проводили 2.5%-ным глутаральдегидом на 0.1 М какодилатном буфере (рН 7.4) и постфиксировали 1%-ной четырехокисью осмия на том же буфере. Затем материал обезвоживали в этаноле восходящей концентрации. На одном из этапов обезвоживания в 70%-ном этаноле клетки механически шпателем отделяли от дна флаконов. После обезвоживания материал заключали в смесь эпоксидных смол Эпона и Арапдига. Ультратонкие срезы изготавливали на ультратономе LKB, контрастировали цитратом свинца и анализировали в просвечивающем электронном микроскопе JEM-1011 (Япония).

Для выявления и оценки вирусной репродукции в тестируемых клетках использовали несколько методов. Выход вируса из клеток определяли путем обнаружения в культуральной жидкости гемагглютинина (НА) вируса в реакции гемагглютинации с эритроцитами курицы или человека 0 (I) группы. Для выявления внутриклеточного вируса клетки разрушали замораживанием—оттаиванием, затем полученные лизаты вносили в культуру пермиссивных клеток MDCK. Присутствие вируса в лизатах клеток оценивали по ЦПД вируса в клетках MDCK, а также по обнаружению в этих же клетках вирусного нуклеопротеина (NP) методом иммуноферментного анализа с использованием моноклональных антител к вирусному NP (антитела получены в НИИ гриппа). Вирусный белок NP выявляли также в лимфоидных и моноцитарных культурах методом иммунофлуоресценции с помощью моноклональных антител к NP. Для обнаружения и оценки состояния вирусных частиц в клетках

**Влияние низкой дозы вирусов гриппа А/Брисбен/10/07 (H3N2) и А/Санкт-Петербург/5/09 (H1N1pdm) на пролиферацию и индукцию апоптоза в клетках Т-лимфобластов (Jurkat), В-лимфобластов (NC-37) и гистиоцитов (U-937) на 3-и сут после заражения в отсутствие или при добавлении противовирусных препаратов ремантадина и рибавирина**

Вирус гриппа А (1 ИД)	Доля клеток, % от контроля			Индекс апоптоза, %		
	без препарата	ремантадин	рибавирин	без препарата	ремантадин	рибавирин
<b>Клетки Jurkat</b>						
Контроль	100.0	97.0 ± 5.3	78.0 ± 3.5	4.0 ± 0.5	4.4 ± 0.5	6.0 ± 0.7
A/Брисбен/10/07	152.0 ± 7.2	102.0 ± 3.2 <sup>a</sup>	89.0 ± 4.7 <sup>a</sup>	29.0 ± 1.2	17.0 ± 1.0 <sup>a</sup>	39.0 ± 2.3 <sup>a</sup>
A/Санкт-Петербург/5/09	157.0 ± 6.9	128.0 ± 8.9 <sup>a</sup>	119.0 ± 11.0 <sup>a</sup>	30.0 ± 2.1	14.0 ± 0.6 <sup>a</sup>	41.0 ± 2.2 <sup>a</sup>
<b>Клетки NC-37</b>						
Контроль	100.0	98.0 ± 4.8	81.0 ± 3.7	2.0 ± 0.1	2.0 ± 0.1	3.0 ± 0.4
A/Брисбен/10/07	144.0 ± 7.3	102.0 ± 3.2 <sup>a</sup>	106.0 ± 7.6 <sup>a</sup>	27.0 ± 2.2	6.0 ± 0.2 <sup>a</sup>	42.0 ± 2.5 <sup>a</sup>
A/Санкт-Петербург/5/09	168.0 ± 4.9	118.0 ± 4.7 <sup>a</sup>	108.0 ± 9.9 <sup>a</sup>	22.0 ± 1.2	5.0 ± 0.8 <sup>a</sup>	40.0 ± 3.6 <sup>a</sup>
<b>Клетки U-937</b>						
Контроль	100.0	95.0 ± 3.2	80.0 ± 4.4	3.0 ± 0.4	3.0 ± 0.4	5.0 ± 0.6
A/Брисбен/10/07	267.0 ± 12.0	210.0 ± 12.1 <sup>a</sup>	222.0 ± 15.2 <sup>a</sup>	25.0 ± 1.5	6.0 ± 0.5 <sup>a</sup>	38.0 ± 1.5 <sup>a</sup>
A/Санкт-Петербург/5/09	221.0 ± 13.4	105.0 ± 4.7 <sup>a</sup>	169.0 ± 9.8 <sup>a</sup>	19.0 ± 1.1	3.0 ± 0.3 <sup>a</sup>	28.0 ± 1.7 <sup>a</sup>

П р и м е ч а н и е . За 1 инфицирующую дозу (ИД) в 1 мл принимали последнее десятикратное разведение титруемого вируса. <sup>a</sup>Достоверность отличия от соответствующего образца без препарата,  $P < 0.05$  (U-критерий Манна—Уитни).

лимфоидного и моноцитарного происхождения использовали метод трансмиссивной электронной микроскопии.

Для подтверждения решающей роли вируса гриппа А в наблюдаемом ответе клеток, зараженных низкими дозами вируса гриппа, использовали прием одновременной инкубации клеток с вирусом и с противовирусными препаратами, различающимися по механизмам действия. Ремантадин, являющийся блокатором образования вирусным НА-2 ионных каналов в эндосомах, использовали в конечной концентрации 10 мкг/мл. Рибавирин — антиметаболит, представляющий собой аналог нуклеотида гуанозина, добавляли в культуру в концентрации 50 мкг/мл.

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программ MS Office Excel 2007 и Statistica. Использовали U-тест Манна—Уитни для сравнения двух групп непараметрических выборок. Отличие от контроля считали достоверным при уровне значимости  $P < 0.05$ .

Р е а г е н т ы : питательные среды и эмбриональная сыворотка (Биолот, Россия), ремантадин (Sigma, Германия) и рибавирин (ISN, США).

## Результаты и обсуждение

Пролиферация и индукция апоптоза клеток, зараженных низкой дозой вируса гриппа А. Предстояло выяснить влияние заражения вирусом гриппа, используемого в низких концентрациях, на три клеточные линии, представляющие Т-лимфобlastы (Jurkat), В-лимфобlastы (NC-37) и гистиоциты (U-937). Для заражения были использованы два разных вируса гриппа — A/Брисбен/10/07 (H3N2) и A/Санкт-Петербург/5/09 (H1N1pdm), ИД составляла 1. На 3-и сут после заражения в пробах контрольных и инфицированных культур определяли число выросших клеток в 1 мл и апоптотических (по ИА) (см. таблицу).

Действие вирусов гриппа А двух субтипов (H3N2 и H1N1pdm) на исследуемые клетки лимфоцитарного и моноцитарного происхождения было одинаковым и выражалось в стимуляции пролиферации клеток, а также в индукции апоптоза. Индекс спонтанного апоптоза в контрольных культурах клеток Jurkat, NC-37 и U-937 на 3-и сут не превышал 2—4 % (см. таблицу). Для подтверждения специфической роли вирусов в наблюдавшихся эффектах были поставлены эксперименты, в которых инкубацию клеток с вирусами проводили в присутствии противовирусных препаратов. Оба использованных препарата (ремантадин и рибавирин) снижали вирусиндукционную стимуляцию пролиферации клеток лимфоидного (Jurkat и NC-37) и моноцитарного (U-937) происхождения. Во всех трех культурах ремантадин также снижал долю апоптотических клеток, при этом апоптоз, индуцированный самим ремантадином, на 3-и сут составлял 2—4 %. Рибавирин, наоборот, стимулировал апоптоз клеток, зараженных вирусом гриппа, но апоптоз, индуцированный в клетках самим рибавирином, не превышал 3—6 % (см. таблицу).

Известно, что соединения адамантана, производным которого является ремантадин, способны блокировать раздевание вируса, а также ингибировать вирусиндукционный апоптоз (Morris et al., 1999). Рибавирин является упрощенным аналогом гуанозина, лишенного пиримидинового кольца, и обладает свойствами антиметаболита, ингибирующего репликацию ДНК- и РНК-содержащих вирусов. Известно, что рибавирин является также мощным индуктором апоптоза в раковых клетках и рассматривается некоторыми авторами как потенциальный противоопухолевый препарат (Kokeny et al., 2009). По нашим данным, рибавирин значительно увеличивает апоптоз, индуцированный низкими дозами вируса гриппа.

Таким образом, показано, что заражение клеток вирусом гриппа А в низких дозах стимулирует пролиферацию, а также вызывает индукцию апоптоза лимфобласто-

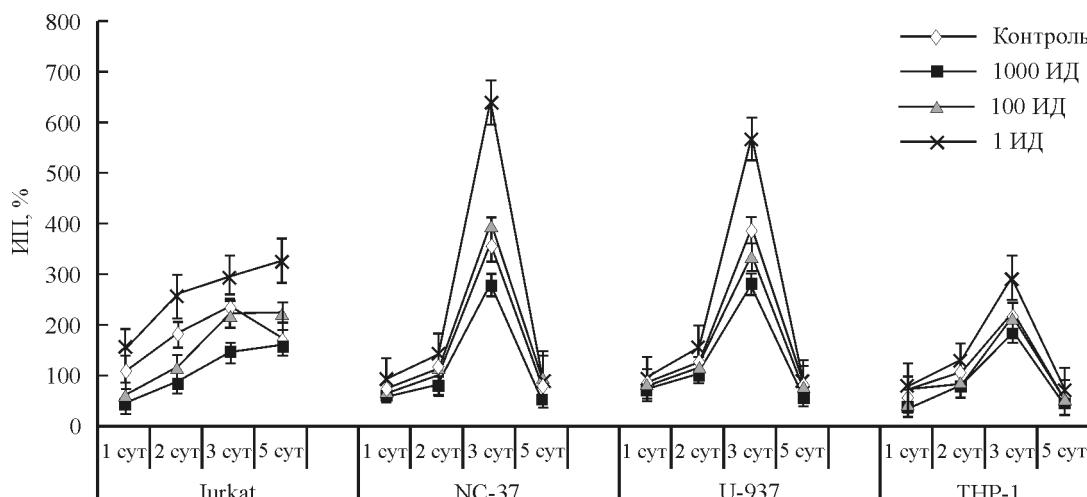


Рис. 1. Кривые пролиферации клеток Т-лимфобластов (Jurkat), В-лимфобластов (NC-37), гистиоцитов (U-937) и моноцитов (THP-1), культивируемых на протяжении 5 сут после заражения разными дозами вируса гриппа А/Брисбен/10/07 (H3N2).

ИД — инфицирующая доза, ИП — индекс пролиферации.

идных и моноцитарных клеточных линий. Изменение этих клеточных процессов в присутствии противовирусных препаратов свидетельствует о специфической роли вируса в наблюдаемых эффектах стимуляции.

Пролиферация инфицированных вирусом клеток при продолжительном культивировании. Поскольку определение уровня пролиферации клеток обычно проводится на 3-и сут, в настоящей работе для лучшего понимания состояния клеток, зараженных разными дозами вируса гриппа, мы провели оценку пролиферации клеток на протяжении 5 сут на одном пассаже, а также на протяжении последующих трех пассажей. Клетки Jurkat, NC-37, THP-1 и U-937 заражали вирусом гриппа А/Брисбен/10/07 (H3N2) с использованием разных доз (1000, 100, 10 и 1 ИД). Подсчет выросших клеток в определенные сроки проводили двумя способами и выражали с помощью ИП и ДК (%). ИП позволяет сравнить кривые роста клеток, зараженных разными дозами вируса, с контрольными клетками на протяжении 5 сут на одном пассаже (рис. 1). В то же время данные в ДК позволяют сравнить между собой результаты, полученные в разные сроки при последующем культивировании на протяжении трех пассажей (рис. 2). Сравнение данных, полученных в течение 5 сут на 1-м пассаже разными методами подсчета клеток, показало сходство результатов 1-го пассажа на рис. 2 с данными на рис. 1. Уже в течение 5 сут культивирования обнаруживаются различия между пролиферацией контрольных и зараженных клеток, а также между клетками различного происхождения (рис. 1). На 1-м пассаже наибольшая стимуляция (пик пролиферации) клеток всех исследованных линий происходила на 3-и сут при минимальной дозе заражения вирусом (рис. 1). Одновременно с этим наблюдали разницу интенсивности размножения клеток различного происхождения: Т-лимфобластоидные клетки, инфицированные вирусом, на 5-е сут культивирования продолжали пролиферировать более активно, чем контрольные клетки, не инфицированные вирусом, тогда как В-лимфобластоидные и моноцитарные от 3-х к 5-м сут 1-го пассажа снижали пролиферативную активность (рис. 1).

Результаты, приведенные на рис. 2, также свидетельствуют о том, что при заражении низкой дозой вируса

(1 ИД) у всех линий повышается пролиферация клеток: кривая пролиферации расположена выше линии контроля. При заражении клеток высокой дозой вируса (1000 ИД) пролиферация клеток снижена и кривая пролиферации располагается ниже линии контроля. На рис. 2, так же как и на рис. 1, наблюдаются четкие различия пролиферативной активности между клетками различного происхождения к концу срока культивирования (1 пассаж в течение 5 сут). Со 2-го пассажа во всех линиях наблюдали усиление размножения клеток, зараженных более высокими дозами вируса (100 и 1000 ИД), при которых пролиферация клеток на 1-м пассаже была снижена (данные не представлены). Эта же закономерность особенно отчетливо проявляется на 3-м пассаже для всех клеточных линий. Все кривые пролиферации клеток Jurkat, полученные при разных дозах заражения, расположены выше линии контроля; в клеточных линиях NC-37 и U-37 прослеживается та же особенность: повышается пролиферация клеток при заражении их высокими (1000) и средними (100) ИД вируса (рис. 2). При последующем культивировании на протяжении 7–8 пассажей клеток Jurkat и U-937, зараженных минимальной дозой вируса, было выявлено, что клетки Т-лимфобластов продолжают пересеваться с кратностью пересева 1 : 3—1 : 5, в то время как клетки макрофагального происхождения резко снижают свою пролиферативную активность даже при пересеве с кратностью 1 : 1 (данные не представлены). В качестве одной из возможных причин такого замедления пролиферации можно рассматривать активацию вирусом гриппа А продукции в клетках В-лимфоцитарного и моноцитарного происхождения альфа-интерферона, обладающего антитрополиферативными свойствами (Ершов, Киселев, 2005).

Выявление вируса гриппа и оценка его способности к репродукции в клетках. Для понимания природы стимуляции пролиферации лимфобластоидных и моноцитарных клеток при заражении очень низкими дозами вируса гриппа А проведено исследование по обнаружению вируса или его белков в клетках Jurkat, NC-37 и U-937. В контрольных образцах, инкубированных с аллантоинской жидкостью от незараженных куриных эмбрионов, а также в экспериментах без добав-

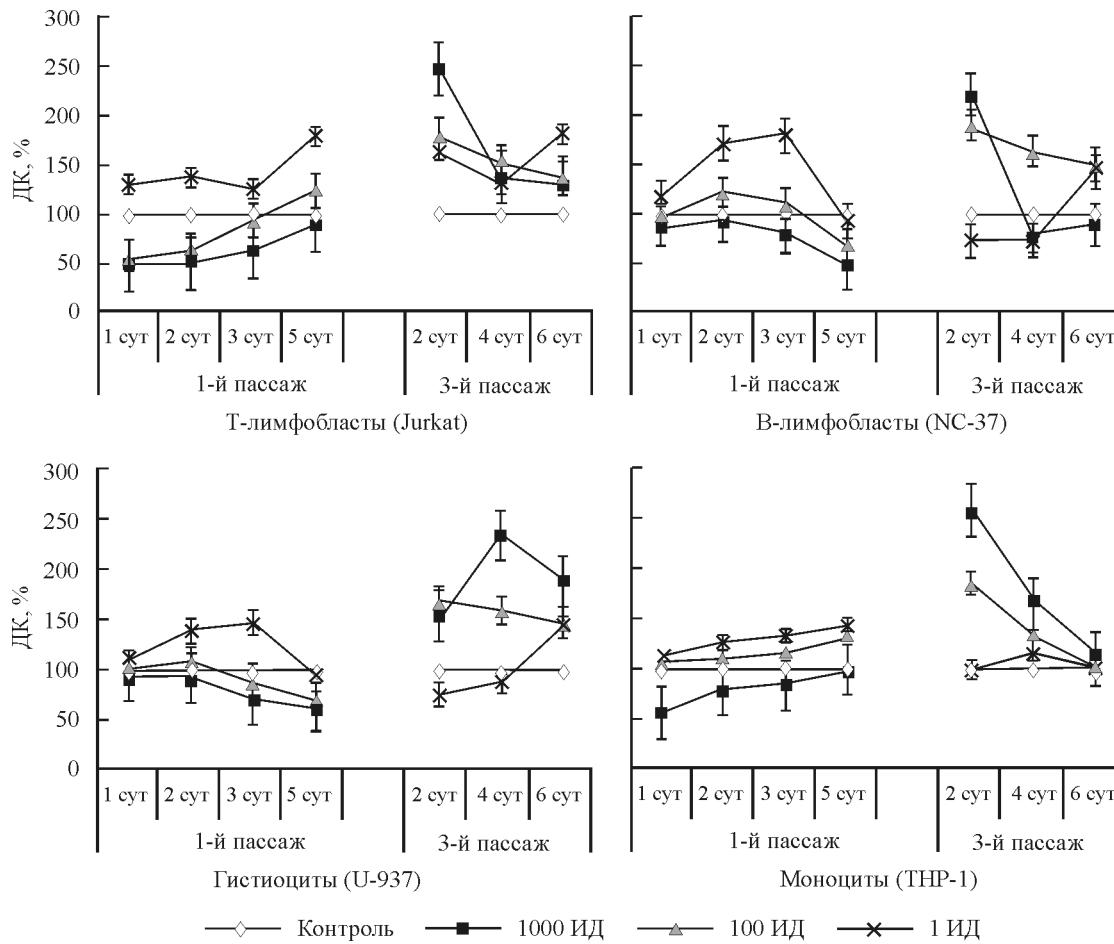


Рис. 2. Пролиферация лимфоцитарных (Jurkat и NC-37) и макроцитарных (U-937 и THP-1) клеток, зараженных разными ИД вируса гриппа А/Брисбен/10/07 (H3N2) и культивируемых на протяжении трех пассажей.

ИД — инфицирующая доза, ДК — доля от контроля.

ления трипсина (где неинфекционный гемагглютинин НА0 вируса не расщеплялся на НА1 и НА2, вследствие чего не происходило и проникновения вируса в клетки) стимуляции пролиферации клеток не было. Анализ культуральных жидкостей всех трех инфицированных клеточных культур в реакции гемагглютинации не выявил присутствия НА вируса гриппа, что свидетельствовало об отсутствии выхода вируса из клеток. Метод титрования клеточных лизатов на пермиссивных клетках MDCK и выявления ЦПД позволил обнаружить внутриклеточный вирус только в пробах, полученных из культур, зараженных высокими дозами вируса. Однако с помощью иммуноферментного анализа присутствие вирусного NP было обнаружено в клетках MDCK, инкубированных со всеми лизатами, независимо от дозы вируса и природы клеток. Методом иммунофлуоресценции с использованием моно克лональных антител к NP вируса гриппа в клетках Jurkat и U-937, зараженных низкими дозами вируса, на 1–2-м пассажах было обнаружено свечение единичных клеток (1–2 %), что также свидетельствовало о синтезе вирусного NP. Полученные результаты свидетельствуют о нарушении нормального процесса репродукции вируса гриппа А в лимфобластоидных и макроцитарных клетках при низкой степени их инфицированности. Синтез отдельных вирусных белков, в частности NP, при этом сохраняется, однако выход вирусных частиц из клеток отсутствует. Подтверждением образования дефектных вирусных

частиц при низкой дозе заражения служат результаты электронной микроскопии.

Результаты изучения ультраструктуры клеток NC-37 и U-937 на 3-и сут после заражения низкой дозой (1 ИД) вируса гриппа А/Брисбен/10/07 (H3N2) свидетельствуют о наличии инфекционного процесса. В клетках, в основном в их вакуолях, обнаружены немногочисленные вирусные частицы, большинство из которых являются дефектными. Характерными особенностями всех исследуемых клеток после заражения низкими дозами вируса гриппа были увеличение количества полисом, отчетливое расширение цистерн аппарата Гольджи, возрастание количества крупных митохондрий, а также более частое, чем в норме, присутствие миелоидных образований (рис. 3).

Таким образом, в клетках перевиваемых клеточных линий гемобластозов человека заражение низкой дозой вируса гриппа А приводит к развитию латентной инфекции, при которой нарушен нормальный цикл репродукции вируса, на что указывает отсутствие выхода вирусных частиц и вирусного белка НА во внеклеточное пространство. Полноценная репродукция вируса могла восстанавливаться только в том случае, если лизат клеток, зараженных высокой дозой вируса, переносили в культуры пермиссивных клеток MDCK. При пассировании на клетках MDCK лизатов культур, зараженных вирусом в низких дозах, не происходило восстановления полноценной репродукции вируса. В то же время при

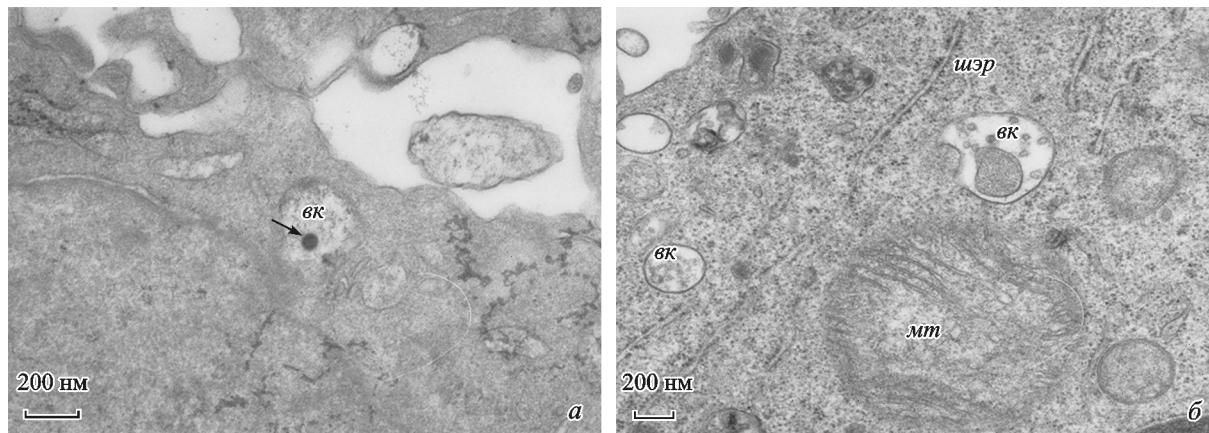


Рис. 3. Электронно-микроскопические фотографии клеток NC-37 (а) и U-937 (б), зараженных вирусом гриппа А/Брисбен/10/07 (H3N2) в дозе 1 ИД.

В вакуоли (вк) клетки NC-37 (а) видна полноценная вирусная частица (стрелка), а в вакуоли клетки U-937 (б) — неполноценные вирусные частицы. мт — митохондрии, шэр — шероховатый эндоплазматический ретикулум.

низких дозах заражения вирусом в клетках лимфоидного и моноцитарного происхождения с помощью высокочувствительных иммунохимических методов выявлялся вирусный белок NP, а с помощью электронной микроскопии — вирусные частицы, преимущественно дефектной структуры. В непермиссивных лимфобластоидных клетках, зараженных высокими дозами вируса гриппа, в процессе последующего культивирования, вероятно, происходило снижение репродукции вируса или нарушение синтеза отдельных вирусных белков, что вызывало усиление пролиферации клеток, подобно тому как это наблюдалось при заражении клеток низкими дозами вируса гриппа.

Самое раннее упоминание о необычном стимулирующем эффекте низких заражающих доз вируса гриппа относится к 1989 г., когда было обнаружено, что клетки лимфоцитов, зараженные низкими дозами вируса птичьего гриппа A/Turkey/Ont/7732/66 (H5N9), отвечают (после митогенной стимуляции конканавалином А) усилением пролиферации, в то время как заражение клеток вирусом в высокой дозе вызывает подавление их пролиферации (Van Campen et al., 1989). Через 10 лет было обнаружено (Oh, Eichelberger, 1999), что при заражении дендритных клеток невысокими дозами вируса гриппа A/PR/8/34 (H1N1) происходит увеличение пролиферации Т-клеток, контактирующих с зараженными дендритными клетками. Стимуляция Т-клеток не требовала присутствия вирусных частиц, но зависела от вирусной нейраминидазы, повышение уровня которой при высокой дозе заражения вирусом дендритных клеток вызывало не активацию, а подавление пролиферации Т-клеток. По мнению авторов (Oh et al., 2000), прямая инфекция дендритных клеток низкими дозами вируса гриппа А вызывает значительную продукцию провоспалительных цитокинов и вслед за этим усиление ответа CD8 Т-клеток, тогда как при высокой дозе вирусной инфекции происходит увеличение антивоспалительных цитокинов, таких как IL-10 и TGF- $\beta$ , что вызывает подавление ответа CD8 Т-клеток.

Позже показали (Sturlan et al., 2009) стимулирующее влияние дефектного вакцинного вируса гриппа А (del NS1) на клетки иммунной системы, которые после заражения вирусом действовали цитотоксически на раковые клетки. Была использована очень низкая множественность инфекций клеток крови вирусом, при которой про-

исходила стимуляция пролиферации не только НК-клеток, но также Т- и В-клеток, что вызывало продукцию ряда цитокинов и цитотоксическое действие на раковые клетки (Sturlan et al., 2009). Полученные нами ранее результаты тоже показали, что низкие заражающие дозы вируса гриппа способны вызывать стимуляцию пролиферации Т- и В-лимфобластоидных, а также моноцитарных клеток, что сопровождалось индукцией апоптоза (Смирнова и др., 2009).

Низкий уровень вирусной нагрузки может возникать в организме в случае проникновения небольшого количества вирусных частиц при существовании достаточно сильного иммунитета — как врожденного, так и приобретенного в результате иммунизации. Снижение репродукции вируса гриппа А может происходить также после проведенного курса лечения с использованием противовирусных препаратов. Результаты наших опытов демонстрируют возможность моделирования процесса перехода острой вирусной инфекции в хроническую при использовании различной множественности инфекции и, возможно, являются подтверждением участия латентной гриппозной инфекции в возникновении лимфолейкозов или сокращении времени ремиссии. Серьезные последствия может вызвать инфицирование вирусом гриппа А зародыша или плода во время беременности. В обзорной работе Гендона (2009) приводятся данные о связи перенесенного женщинами во время беременности заболевания гриппом или постгриппозной пневмонией с возникновением у родившихся детей острой лимфобластной лейкемии.

Таким образом, результаты настоящей работы свидетельствуют о том, что при заражении непермиссивных лимфобластоидных клеток человека вирусом гриппа А возникает латентная инфекция, в процессе которой происходит снижение репродукции вируса (или его отдельных белков), что может сопровождаться усилением пролиферации и последующей индукцией апоптоза клеток. Влияние на эти эффекты антивирусных препаратов, снижающих пролиферацию и индукцию апоптоза (ремантадин) или снижающих пролиферацию, но индуцирующих апоптоз (рибавирин), является подтверждением ведущей роли вируса гриппа А в осуществлении стимулирующего эффекта.

### Список литературы

- Гендон Ю. З. 2009. Проблемы профилактики гриппа у беременных женщин и новорожденных. Вопр. вирусол. 4 : 4—7. (Gendon Yu. Z. 2009. Problems in the prevention of influenza in pregnant women and neonatal infants. Vopr. Virusol. 4 : 4—7.)
- Ершов Ф. И., Киселев О. И. 2005. Интерфероны и их индукторы (от молекул до лекарств). М.: ГЭОТАР-Медиа. 368 с. (Ershov F. I., Kiselev O. I. 2005. Interferones and their inducers (from molecules to medicine). Moscow: GEOTAR-Media. 368 p.)
- Смирнова Т. Д., Гудкова Т. М., Кузнецова И. К., Рыжак Г. А. 2009. Разработка модели взаимоотношения вируса гриппа А с перевиваемыми лимфобластоидными клетками человека для изучения биологических особенностей вируса и определения активности антивирусных препаратов. Клеточные культуры. Информ. бюл. 24 : 25—34. (Smirnova T. D., Gudkova T. M., Kuznetsova I. C., Rhyzhack G. A. 2009. Development of the model of interaction of influenza A virus with human lymphoblastoid cell lines for the study of biological features of viruses and determination of activity of antivirals. Cell Cultures. Inform. Bull. 24 : 25—54.)
- Kokeny S., Papp J., Weber G. 2009. Ribavirin acts via multiple pathways in inhibition of leukemia cell proliferation. Anticancer Res. 29 : 1971—1980.
- Kuiken T., Taubenberger J. 2008. Pathology of human influenza revisited. Vaccine. 26 (4) : 59—66.
- Morris S., Price G., Barnet J. 1999. Role neuraminidase in influenza virus-induced apoptosis. J. Gen. Virol. 80 : 137—146.
- Oh S., Eichelberger M. 1999. Influenza virus neuraminidase alters allogeneic T cell proliferation. J. Virol. 264 (2) : 427—435.
- Oh S., McCaffery M., Eichelberger M. 2000. Dose-dependent changes in influenza virus-infected dendritic cells result in increased allogeneic T-cells proliferation at low, but not high, doses of virus. J. Virol. 74 (120) : 5460—5469.
- Peiris J., Yu W. 2004. Re-emergence of fatal human influenza A subtype H5N1 disease. Lancet. 363 : 617—619.
- Sturlan S., Sachet M., Baumann S., Kuznetsova I., Spittler A., Bergmann M. 2009. Influenza A virus induces an immediate cytotoxic activity in all major subsets of peripheral blood mononuclear cells. PLoS ONE. 4 : 1—12.
- Van Campen H., Easterday B. C., Hinshaw V. S. 1989. Virulent avian influenza A viruses: their effect on avian lymphocytes and macrophages *in vivo* and *in vitro*. J. Gen. Virol. 70 : 2887—2895.

Поступила 29 XII 2014

### IMPACT OF VARIOUS MULTIPLICITY OF INFECTION OF INFLUENZA A VIRUS ON PROLIFERATION AND APOPTOSIS INDUCTION IN CULTURED CELL LINES OF LYMPHOCYTIC AND MONOCYTIC ORIGIN (JURKAT, NC-37, THP-1 AND U-937)

T. D. Smirnova, D. M. Danilenko, E. V. Ilyinskaya, S. S. Smirnova, M. Yu. Eropkin

Research Institute of Influenza, Ministry of Health of Russian Federation, St. Petersburg, 197022;  
e-mail: cellcultures@influenza.spb.ru

The severity of disease caused by influenza A infection depends not only on biological characteristics of the virus but also on the number of viral particles than penetrate the body. T- and B-lymphocytes as well as monocytes (macrophages) play a key role in the development of cell-based and humoral immunity as well as influenza virus elimination from the body. The present study describes the effect of influenza A virus infection on cell proliferation and induction of apoptosis in human cultured cell lines of T-, B-lymphocytic and monocytic origin infected with various multiplicity of infection (moi). Low moi of the virus stimulated cell proliferation; maximal effect has been registered 3—4 days after infection. But the fate of T-cells, B-cells and monocytes after initial infection was different: Jurkat cells continued intense proliferation while proliferation of NC-37, THP-1 and U-937 cells lowered. Prolonged (for 3 passages) cultivation of Jurkat, NC-37 and U-937 cell lines has shown that infection of these cell lines not only with low but also with medium and high moi also leads to stimulation of proliferation. Using a variety of methods for the detection of viral reproduction has clearly shown that infection of non-permissive human T-, B-cells and monocytes with influenza A virus leads to latent infection. So, low moi interferes with normal formation of viral particles, which in turn might stimulate cell proliferation and then be followed by induction of apoptosis. Antiviral drugs rimantadine and ribavirin suppressed virus-induced cell proliferation; at the same time, induction of apoptosis was suppressed only by rimantadine and was enhanced by ribavirin. The data obtained provide strong support for the role of influenza A virus in the observed effects.

**Key words:** T- and B-lymphoblastoid and monocytic cell lines, influenza A virus, cell proliferation, apoptosis, multiplicity of infection.