

Е. В. КРАСОТКИН, Т. И. ГЛЕБОВА, Р. ИКРАНБЕГИЙН

ИЗУЧЕНИЕ ЦИТОПАТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ВИРУСА ГРИППА А/АЛМАТЫ/5/98 НА КЛЕТКИ ХОРИОНАЛЛАНТОИСНОЙ ОБОЛОЧКИ КУРИНЫХ ЭМБРИОНОВ

В последние годы в экспериментах с трансфектными вирусами получены данные, указывающие на то, что в проявлении гриппозных симптомов и системных осложнений макроорганизма могут быть вовлечены продукты экспрессии генов NA и NA, гена NS1, а также репликативная форма вирусной РНК — дс РНК, которые могут определять вирулентность штаммов вируса в животном организме [1–6].

При исследовании степени вирулентности вирусов важно знать, какой механизм гибели клеток хозяина задействован, некротический или апоптотический. Некротическая деструкция клеток хозяина сопровождается распространением возбудителя в организме, воспалительными реакциями, что определяет течение и исход заболевания, который характерен для острой гриппозной инфекции. Апоптотический (стерильный) тип гибели клеток в основном прекращает дальнейшую репродукцию вируса, способствует элиминации патогена из организма, предупреждает дисрегулирующие воспалительные реакции в месте инфицирования и индуцирует специфический иммунный ответ против инфекционного вируса [1–7]. Однако вирусная инфекция часто ассоциируется с резко выраженным апоптозом, и этот эффект, по-видимому, является определяющим для характера патологии, связанной, например, со СПИДом, при котором происходит массовая апоптотическая гибель лимфоцитов. С другой стороны, геномы многих вирусов кодируют белки, которые могут ингибировать апоптоз и посредством этого продлевают выживание инфицированных клеток для максимальной продукции вирусного потомства либо способствуют персистенции возбудителя.

В связи с этим нами были изучены цитопатические действия дсРНК различных штаммов вируса гриппа А в целях выявления возможности индуцирования апоптотического типа гибели клеток в условиях *in vitro* на хорионлантоисную оболочку (ХАО) куриных эмбрионов (КЭ).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

ВИРУСЫ

A/swine/Jova/15/30 (H1N1).

A/Алма-Ата/1417/84 (H1N1).

A/Алма-Ата/1044/84 (H1N1).

A/Алматы/5/98 (H1N1) – адаптированный к КЭ изолят персистентной формы вируса гриппа.

ВЫДЕЛЕНИЕ ДСРНК

Выделение дсРНК проводили из гомогенатов ХАО неинфицированных КЭ и инфицированных 1000 ЭИД₅₀ вирусами гриппа КЭ. Замороженные ХАО КЭ гомогенизировали в ступках с жидким азотом, заливали равным объемом лизирующего буфера (10мМ Трис, 10мМ NaCl, 10мМ ЭДТА, 0,5% ДСН) и инкубировали до полного оттаивания раствора. Добавляли равный объем холодного (+4°C) фенола с рН 6,0, инкубировали 10 мин, центрифугировали при 5500 об./мин на центрифуге (VEB MLW Medizintechnik, Германия). К супернатанту приливали равный объем смеси фенол-хлороформа (1:1), инкубировали 10 мин, центрифугировали 5 мин при 5500 об./мин, к супернатанту доливали 2,5 объема 96° этанола и 5М раствора NaCl до конечной концентрации 1,7 М. Осадок отмывали 70° этанолом и растворяли в бидистилляте, обрабатывали ДНК-азой (50 мкг/мл) 45 мин, и РНК-азой А (50 мкг/мл) 45 мин при 37 °С. От ферментов освобождались экстракцией фенол-хлороформом с последующим переосаждением 2,5 объема 96° этанола с 1,7М NaCl. Осадок отмывали 70° этанолом, растворяли в бидистилляте и хранили при – 80°C.

ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК ИЗ КЛЕТОК ХАО КЭ

Выделение клеточной ДНК, качественное и количественное определение НК и белка выполняли по стандартным методикам, описанным в работах [8, 9].

ЭЛЕКТРОФОРЕЗ НК

Определение состояния полимерности ДНК

и чистоты препарата дсРНК проводили с помощью гель-электрофореза в 1,8% агарозном геле с использованием буфера ТАЕ (0,04 Мтрис-ацетат, 0,002 МЭДТА, pH 8,0), при постоянной силе тока 50 мА, с лидирующим красителем бромфеноловым синим. Бромистый этидий вносили в гели при заливке. Гели просматривали и фотографировали в ультрафиолетовом свете транслюминатора (D&R, USA).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В поисках триггеров вирусиндуцированного апоптоза клеток моделирование патологии осуществляли воздействием дсРНК на клетки ХАО КЭ. В отличие от вирусных гликопротеидов дсРНК не входит в состав вириона и не обладает прямыми повреждающими функциями, но в процессе вирусной репликации она может экспонироваться на поверхности клеток, выходить в окружающую среду и опосредованно, по не уточненным пока путям инициировать тот или иной тип гибели клеток.

В последнее время разными авторами получены доказательства того, что дсРНК вирусного происхождения может запускать две программы клеточной защиты при вирусной инфекции. Одна предусматривает снижение скорости синтеза хозяйских клеточных белков и, таким образом, препятствует вирусной репликации. Эта программа действует опосредованно, через протеинкиназы и РНК-азы L, и заключается в самоэлиминации инфицированных клеток путем их апоптоза. Вторая ответственна за продукцию противовирусных интерферонов I и других сигнальных цитокинов и требует выживания инфицированных клеток путем экспрессии антиапоптотических генов через активацию фактора транскрипции NF-карра b. Обе дсРНК-активированные программы функционируют независимо друг от друга [10–14].

Исходя из этого для решения поставленных задач было необходимо получить из вирусинфицированных клеток ХАО КЭ дсРНК, изучить характер цитопатического действия путем электрофоретического анализа ДНК клеток-мишеней (на предмет обнаружения маркера апоптоза – мнфДНК). Неоднозначность мнений в отношении типов гибели клеток различными серовариантами вирусов гриппа побудила проводить исследования характера цитопатического действия миксовирусов в зависимости от штамма и сте-

пени патогенности и в этой связи определить тип гибели клеток при воздействии природного изолята А/Алматы/5/98 персистентной формы вируса гриппа А в сравнении с лабораторными (А/Алма-Ата/1417/84, А/Алма-Ата/1044/84) и эталонными штаммами (А/swine/Jova/15/30).

Электрофоретический анализ ДНК клеток ХАО КЭ, зараженных вирусами гриппа, показал, что апоптотическую деградацию ДНК хориоантлантоисных клеток индуцируют все протестированные штаммы в зависимости от инфекционной дозы и от времени инкубации в разной степени выраженности. Так, по данным таблицы способность исследуемых штаммов вызывать мнфДНК уменьшается с возрастанием 10-кратного разведения, и в предельных разведениях только штамм А/Алматы/5/98 способен вызвать мнфДНК после 24 ч инкубации. При этом наибольшая доля апоптотически измененных клеток наблюдается при заражении вирусами А/Алматы/5/98 и А/Алма-Ата/1417/84 в разведении 10^{-5} (рис. 1).

Для изучения динамики накопления РНКазо-резистентной РНК в разных частях ХАО КЭ заражали с вирусом А/Алматы/5/98 в дозе 10^5 ЭИД. Наибольшая концентрация накопления дсРНК наблюдается в зоне прокола в течение 4–6 ч инкубации. Затем происходит резкий спад накопления дсРНК и начиная с 10 ч до 13 ч инкубации вновь появляется в концентрации 7 мкг/мл (рис. 1,2).

Способность изолята А/Алматы/5/98 вызывать в предельных разведениях мнфДНК, по нашему мнению, возможно, связана с его персистентной формой.

Имеется много примеров цитопатического действия индуцированного неинфекционными вирусными частицами, ts-мутантами вирусов, персистентными формами вирусов, ведущих к нарушению функций дифференцированных клеток хозяина [15]. Кроме того, лимфоциты, в которых чаще всего персистируют вирусспецифические структуры таких оболочечных вирусов, как ВИЧ, вирусы гепатита В и С, гриппа А и В, парагриппа, а также нейтрофилы и макрофаги, утрачивают, вероятно, хемотоксические и адгезивные свойства, в результате чего наблюдается длительное циркулирование иммунных комплексов «вирус – антитело», индуцирующих гломеруло-нефриты, васкулиты, артриты [16]. В свою очередь, агрегация лимфоцитов может стать фак-

Состояние ДНК ХАО КЭ после инкубации с вирусом

Штамм	Условия	Экспозиция, ч	мнфДНК
Разведение -9			
A/Алма-Ата/1044/84	Охлажденный	12	-
		24	-
A/swine/Jova/15/30	«	12	-
		24	-
A/Алма-Ата/1417/84	«	12	-
		24	-
A/Алматы/5/98	«	12	-
		24	+
Контроль	«	12	-
		24	-
Разведение -7			
A/Алма-Ата/1044/84	Охлажденный	12	-
		24	-
A/swine/Jova/15/30	«	12	-
		24	-
A/Алма-Ата/1417/84	«	12	-
		24	-
A/Алматы/5/98	«	12	+
	24	+	
Контроль	«	12	-
		24	-
Разведение -5			
A/Алма-Ата/1044/84	Охлажденный	12	-
		24	-
A/swine/Jova/15/30	«	12	-
		24	-
A/Алма-Ата/1417/84	«	12	+
		24	+
A/Алматы/5/98	«	12	+
		24	+
Контроль	«	12	-
		24	-
Разведение -3			
A/Алма-Ата/1044/84	Охлажденный	12	+
		24	+
A/swine/Jova/15/30	«	12	+
		24	+
A/Алма-Ата/1417/84	«	12	+
		24	+
A/Алматы/5/98	«	12	+
		24	+
Контроль	«	12	-
		24	-
Разведение -1			
A/Алма-Ата/1044/84	Охлажденный	12	+
		24	+
A/swine/Jova/15/30	«	12	+
		24	+
A/Алма-Ата/1417/84	«	12	+
		24	+
A/Алматы/5/98	«	12	+
		24	+

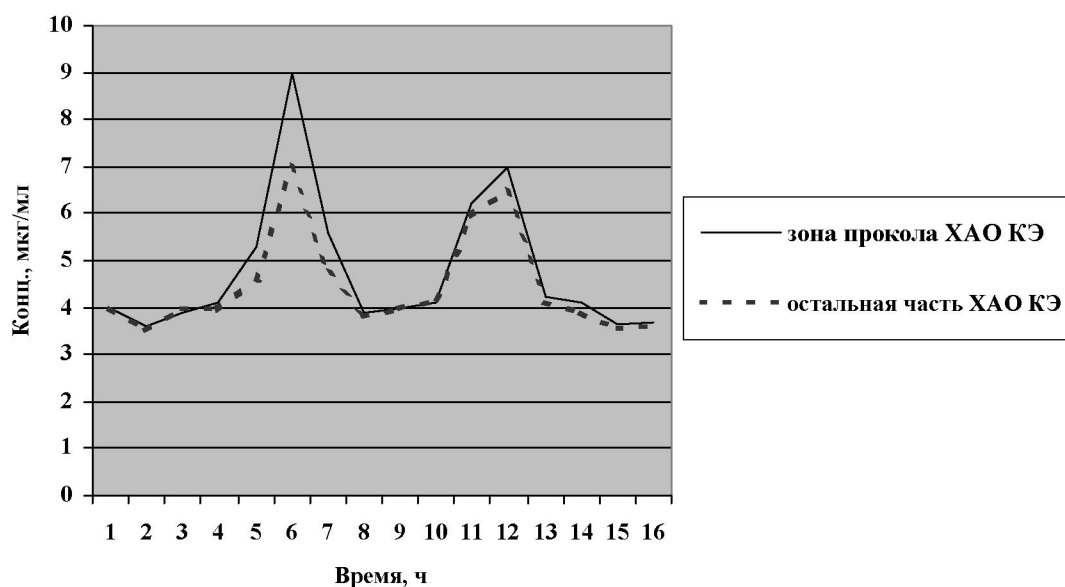


Рис. 1. Динамика накопления РНКазорезистентной РНК в разных частях ХАО КЭ при инкубации с вирусом А/Алматы/5/98 в разведении 10^{-5}

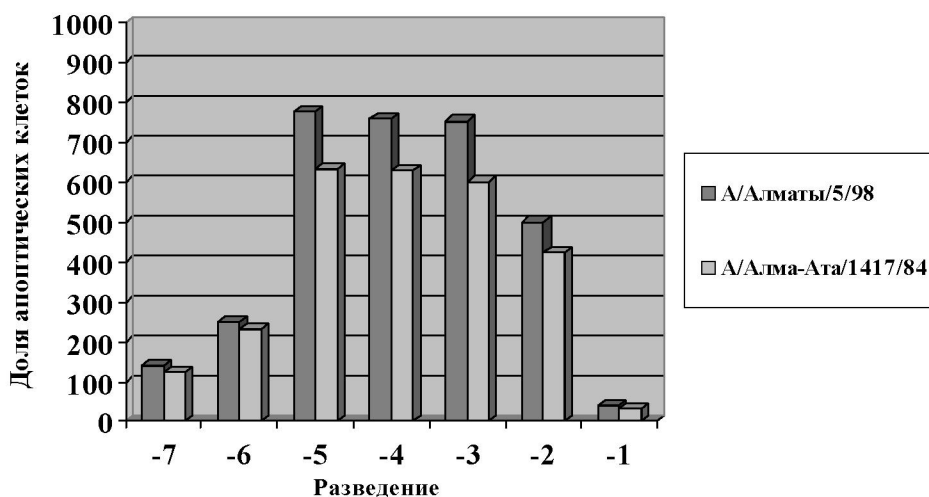


Рис. 2. Динамика развития апоптических изменений в ХАО КЭ при инокуляции штаммами вирусов

тором возникновения апоптической гибели как самих лимфоцитарных клеток, так и клеток-мишеней, т.е. персистирующие формы вирусов могут вызывать не прямой цитопатический эффект [17–19]. Установлен неожиданный факт. Клетки мышинных фибробластов, зараженные вирусом вакцины, погибали по некротическому пути, если клетки обрабатывали ФНО-альфа (фактор некроза опухолей). Этого не происходило, если клетки инфицировали мутантным штаммом вируса вакцины (мутация по отсутствию каспазного ингибитора В13R). Более того, ФНО-альфа также индуцировал некротическую гибель клеток в при-

сутствии пептидных каспазных ингибиторов. В обоих случаях некроз сопровождался генерацией суперкапсидных радикалов. Каспазные ингибиторы сенсibilizировали клетки к гибели под воздействием дсРНК и гамма-ИФ. Во всех случаях гибель клеток блокировалась антиоксидантами или ингибиторами митохондриальной дыхательной цепи. Установлен новый митохондриально-зависимый механизм, играющий свою роль в гибели клеток, инфицированных вирусами, кодирующими каспазные ингибиторы.

Таким образом, не исключено, что персистентные формы вирусов гриппа не только име-

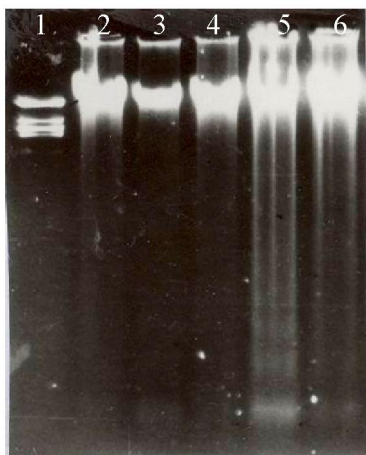


Рис. 3. Электрофореграмма ДНК клеток ХАО КЭ, зараженных различными вирусами.

1 – маркер; 2 – ХАО КЭ при заражении штаммом А/Алма-Ата/247/84; 3 – ХАО КЭ при заражении штаммом А/swine/Jova/15/30; 4 – ХАО КЭ при заражении штаммом А/Алма-Ата/1044/84; 5 – ХАО КЭ при заражении штаммом А/Алматы/5/98; 6 – ХАО КЭ при заражении штаммом А/Алма-Ата/1417/84

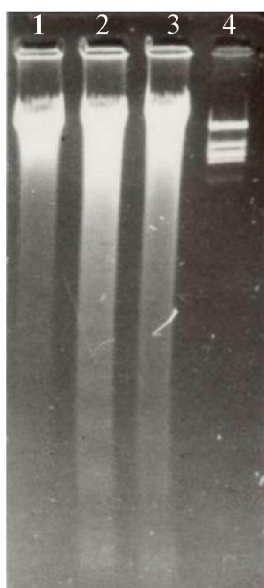


Рис. 4. Электрофореграмма ДНК клеток ХАО КЭ, зараженных различными вирусами в разведений 10^{-5} , 12 ч.

1 – ХАО КЭ при заражении штаммом А/swine/Jova/15/30; 2 – ХАО КЭ при заражении штаммом А/Алматы/5/98; 3 – ХАО КЭ при заражении штаммом А/Алма-Ата/1417/84; 4 – маркер

ют мутации по определенным генам, возможно, они также имеют мутации по отсутствию каспазного ингибитора В13R. Так или иначе в нашей постановке опыта по изучению цитопатического действия дсРНК изолята А/Алматы/5/98 в предельных разведениях и в дозе 10^3 ЕИД₅₀ че-

р е 3
24 чинкубации вызывал апоптическую гибель клеток ХАО КЭ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Zambon M.C. Epidemiology and pathogenesis of influenza // J. Antimicrob.Chemother. 1999. Nov.44. suppl B. P.3-9.
2. Palese P., Muster T., Zheng H., O'Neill R., Gareia-Sastre A. Learning from our foes: a novel vaccine concept for influenza virus // Arch. Virol Suppl. 1999. V.15. P. 131-138.
3. Bergmann M., Gareia-Sastre A., Carnero E., Pehamberger H., Wolff K., Palese P. and Muster T. Influenza virus NS1 protein counteract PKR-mediated inhibition of replication // J. of Virol. 2000. V.74. N 13. P. 6203-6206.
4. Talon J., C.M. Horvath, R.Polley, C.F. Basler, T.Muster, P.Palese, and A.Gareia-Sastre. Activation of Interferon Regulatory Factor 3 is inhibited by the Influenza A virus NS1 Protein // J. of Virol. 2000. V.74, No17, P.7989-7996.
5. Solorzano A., Zheng H., Fodor E. et al. Reduced levels of neuraminidase of influenza A viruses correlate with attenuated phenotypes in mice // J.Gen. Virol. 2000. Mar. 81, V 3 P.737-742.
6. Schickli J.H., Flandorfer A., Nakaya T., Martinez-Sobrido L., Gareia-Sastre A., Palese P. Plasmid-only rescue of influenza A virus vaccine candidates // Philos Trans R.Soc.Lond B Biol Sci. 2001., dec 29. 356(1416). P.1965-1973.
7. Koyama A.H., Fukumori T., Fujita M., Irie H., Adachi A. Physiological significance of apoptosis in animal virus infection // Microbes Infect, 2000 Jul; 2(9):1111-7.
8. Досон П. Справочник биохимика. М.: Мир, 1991. 575 с.
9. Маниатис Т. Методы генной инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984.
10. Sweet C. and Smith H. Pathogenicity of Influenza Virus // Microbiological Reviews. 1980. June. P.303-330.
11. Чувакова З.К., Фурсова Л.М., Исаева Е.С. Демьяненко И.В. Влияние гликопротеидов вируса гриппа на состоянии проницаемости легочных капилляров мышей // Вопр. вирусологии. 1985. №1. С.43-46.
12. Bisbal C.T., Salehzada. Characterization of two murine (2'-5')(A) – dependent endonucleases of different molecular mass // Eur. J. Biochem. 1989. 179: 595-602.
13. Maran A.R. et al. Blockage of NF-κB signaling by selective ablation of an mRNA target by 2-5A antisense chimeras // Science. 1994. 265: P. 789-792.
14. Leib D.A., Machalek M.A. Specific phenotypic restoration of an attenuated virus by knockout of a host resistance gene // Microbiology. 2000. v. 97, N11. P. 6097-6101.
15. Montoomery L.B., Kao C.Y.Y., Verdin E. et al. Infection of a polarized epithelial cell line with wild-type reovirus leads to virus persistence and altered cellular function // J. Gen. Virol. 1991. V.72. P.2939-2946.
16. Oldstone M.B.A. Viral persistence // Cell. 1989. V.56. P.517-520.
17. Amiensen J.C. Programmed cell death and AIDS: from hypothesis to experiment // Immunol. Today. 1991. V.13. N10. P.378-381.

18. *Маянский А.Н., Маянский Н.А., Абаджиди М.А., Заславская М.И.* Апоптоз: начало будущего // ЖМЭИ. 1997. №2. С.88-94.

19. *Thompson C.D.* Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease // Science, 1995, V.267. P.1456-1462.

Summary

In article are resulted given cytopathic actions dsRNA by way electrophoresis analysis DNA of cells - targets (for detection markers of apoptosis – internucleosomal damage of DNA) various strains of influenza viruses and in conditions in vitro on chorionallantoic environment of chicken embryos. The electrophoresis analysis DNA of cells on chorionallantoic environment of chicken embryos infected with viruses of influenza has shown, that apoptosis degradation of DNA chorionallantoic cells is induced by all testing strains depending

on an infectious doze and from time of incubation in a different degree of expressiveness. Ability of isolate A/Almaty/5/98 to cause in limiting cultivations internucleosomal damage of DNA, in our opinion, it is probably connected from it persistent by the form.

Резюме

А тымау вирусының әр түрлі штамдарының екі спиральдық РНҚ-ының in vitro жағдайында қауызын жармаған тауық балапанының (ҚЖТБ) хорионаллантоистық қабығына (ХАҚ) көрсететін цитопатикалық әсері нәтижелері берілген. ҚЖТБ-ының ХАҚ торшаларының ДНҚ электрофорез анализі зерттелген барлық штамдар инфекциялық мөлшеріне және уақытқа байланысты әр түрлі деңгейде ДНҚ-ның апотикалық ыдырауын тудыратыны белгіленді. А/Алматы/5/98 изолятының ең жоғарғы деңгейдегі араластыру мөлшерінде ДНҚ-нофлық қасиетін оның персистенциялық түріне қатысты екені анықталды.

УДК578:23 578.1/2 578.08