

УДК 145

Ультраструктурные особенности поражения эпителия бронхов мышей при заражении разными штаммами вируса гриппа А/Н5N1

О.С. Таранов,^{a, b} Е.М. Малкова^a, А.А. Сергеев^a,
А.Н. Шиков^a, Е.И. Рябчикова^{b, c, *}

^a ФГУН Государственный научный центр вирусологии
и биотехнологии «Вектор»
Россия 630559, НСО Новосибирский район, р. п. Кольцово

^b Институт химической биологии
и фундаментальной медицины СО РАН
Россия 630090, Новосибирск, пр. ак. Лаврентьева, 8

^c Новосибирский государственный университет,
Россия 630090, Новосибирск, ул. Пирогова, 2¹

Received 1.06.2009, received in revised form 8.06.2009, accepted 15.06.2009

Вирус гриппа субтипа Н5N1 вызывает тяжелое заболевание у людей и широкого спектра видов птиц и животных. Динамику патологических изменений бронхов изучали на мышях, интраназально зараженных штаммами вируса гриппа А/Chicken/Kurgan/05/2005, А/Duck/Kurgan/08/2005 и А/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005, обладающими разной патогенностью для этого вида животных. Размножение вируса выявлено в реснитчатых клетках бронхиального эпителия. Описаны выраженные деструктивные изменения эпителия бронхов, развивающиеся уже через 24 ч после заражения мышей и нарастающие в ходе инфекции. Отмечен интенсивный апоптоз клеток бронхиального эпителия мышей, зараженных штаммом А/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005.

Ключевые слова: вирус гриппа, Н5N1, эпителий бронхов, патологические изменения.

Введение

Вирус гриппа, ежегодно вызывающий сезонную волну заболеваний по всему миру, с появлением субтипа А/Н5N1 (вирус гриппа птиц) стал угрозой новой пандемии гриппа. Именно вирус гриппа субтипа А/Н5N1 считается наиболее вероятным источником нового высоко патогенного варианта, который будет способен быстро передаваться от человека к

человеку, вызывая гибель миллионов людей.

В последние годы вирус гриппа субтипа А/Н5N1 проявил себя как смертельный агент, приводящий к гибели птиц как в природных условиях, так и в промышленном и домашнем птицеводстве. Десятки миллионов кур и уток погибли и были уничтожены в последние годы по всему миру в связи с распространением вируса гриппа А/Н5N1. Отличительной

* Corresponding author E-mail address: lenryab@yandex.ru

¹ © Siberian Federal University. All rights reserved

и потенциально наиболее опасной особенностью этого вируса является способность вызывать тяжелое высоколетальное заболевание у людей, передаваясь непосредственно от птиц, без промежуточного хозяина.

Эпизоотия гриппа птиц А/Н5N1 в России началась 10 июля 2005 г. в селе Суздалка Доволенского района Новосибирской области, затем вирус распространился на территорию шести областей Сибирского и Уральского федеральных округов. Вирус поражал как домашнюю, так и дикую птицу, наиболее тяжелая клиническая картина отмечалась у куриц, при этом характер поражений органов и течение инфекции не отличались от описанных в литературе (Онищенко, 2006). Вирусы гриппа А/Н5N1, выделенные на территории России, относятся к Цинхайской группе (Qinghai) вирусов и были занесены на территорию страны перелетными птицами (Онищенко и др., 2006).

Респираторный тракт служит главной мишенью для вируса гриппа у большинства чувствительных организмов, включая людей. Изучение патогенеза гриппа, эффективности лечебных и профилактических препаратов против этого вируса проводится на различных животных, в том числе мышах, которые являются самыми доступными экспериментальными моделями. Наиболее распространенный вариант вируса гриппа А/Н3N2, вызывающий сезонные вспышки заболевания людей, для мышей не патогенен и был специально адаптирован к этим животным путем серийных пассажей (штамм А/Aichi/2/68 (Н3N2)). При интраназальном заражении этот вирус вызывает выраженные воспалительно-некротические изменения легких, через 2-3 суток после заражения вирус накапливается в легких до 10^8 ЭИД на 1 г ткани (Stephen et al., 1975; Larson et al., 1976). Штаммы вируса гриппа А/Н5N1, выделенные как от птиц, так

и от людей, вызывают заболевание мышей без предварительной адаптации. Патогенность вируса гриппа Н5N1 для мышей варьирует и зачастую совпадает с патогенностью для организма-источника вируса, что служит еще одним доводом в пользу разработки экспериментальных моделей гриппа на мышах (Gao et al., 1999; Dybing et al., 2000; Perrone et al., 2008). Публикации о характере поражения легких при инфекции разными штаммами вируса гриппа немногочисленны и не дают исчерпывающего представления о развитии патологических изменений дыхательного тракта в ходе инфекции. Задачей настоящего исследования стало сравнительное изучение поражения воздухоносных путей при заражении мышей выделенными в России штаммами вируса гриппа А/Н5N1, обладающими разной патогенностью для этого вида животных.

Материалы и методы

Вирус гриппа: штамм А/Chicken/Kurgan/05/2005 (ЛД₅₀ при интраназальном заражении мышей составляла $1,1 \pm 0,4$ lg ЭИД₅₀) штамм А/Duck/Kurgan/08/2005 (ЛД₅₀ при интраназальном заражении была $4,7 \pm 0,6$ lg ЭИД₅₀) и штамм А/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005 (ЛД₅₀ при интраназальном заражении равнялась $6,7 \pm 0,7$ lg ЭИД₅₀). Контрольной группе мышей вводили физиологический раствор.

В работе использовали белых беспородных мышей весом 12-15 г для исключения влияния генотипа на патогенез заболевания. Мышей заражали интраназально вышеперечисленными штаммами в дозе 10 ЛД₅₀. Животных получали из питомника ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор».

Образцы легких отбирали каждые 24 ч в течение 8 суток после заражения, умерщвляя животных методом цервикальной дислокации. В экспериментах использовали по

три мыши на временную точку для каждого штамма вируса гриппа. После вскрытия у мышей иссекали трахею и легкие, которые фиксировали в 4 %-ном растворе параформальдегида при 4 °С в течение 48 ч. Дальнейшую обработку образцов проводили по ранее описанной методике (Виноградов и др., 2003; Afzelius, Maunsbach, 2004). Полутонкие и ультратонкие срезы готовили на микротоме Райхерт-Янг (Австрия). Полутонкие срезы окрашивали раствором азура-2, изучали в световом микроскопе AxioImager Z1 с цифровой фотокамерой AxioCam HRc (Carl Zeiss, Германия) и выбирали участки для последующего ультраструктурного исследования, с которых готовили ультратонкие срезы и контрастировали их уранилацетатом и цитратом свинца. Ультратонкие срезы исследовали в электронном микроскопе JEM 1400 (Jeol, Япония), фотосъемку проводили с помощью встроенной цифровой камеры Jeol и цифровой камеры бокового ввода Veleta (SIS, Германия).

Результаты и обсуждение

Электронная микроскопия является единственным методом, позволяющим непосредственно увидеть вирусные частицы и вирус-специфические структуры, а также проследить изменения клеточных структур в зараженных клетках. Штаммы вируса гриппа H5N1 размножались в реснитчатых клетках бронхиального эпителия. Ядра и цитоплазма инфицированных клеток содержали скопления глыбок электронно-плотного вещества и трубчатые структуры, морфология которых была идентична наблюдаемому в культурах клеток, зараженных этими же штаммами (Онищенко и др., 2009). В инфицированных клетках регистрировались просветление цитоплазмы, вакуолизация мембранных структур и митохондрий. Клетки приобретали сферическую форму и отделялись от эпите-

лиального пласта. Почкование вируса происходило на апикальной поверхности плазмалеммы реснитчатых клеток и не было связано с ресничками и микроворсинками (рис. 1).

Интраназальное заражение мышей всеми штаммами вируса гриппа H5N1 уже через сутки вызывает ярко выраженные деструктивные изменения эпителия бронхов и трахеи. На светооптическом уровне наблюдаются спазм мелких бронхов, дистрофические изменения бронхиального эпителия и вакуолизация его клеток. Степень изменений варьирует в разных бронхах, на срезах некоторых бронхов и участков трахеи регистрируются признаки отслойки эпителия. В просвете бронхов содержится клеточный детрит, встречаются форменные элементы крови (рис. 2). Вследствие отека и воспалительно-клеточной инфильтрации стромы снижается воздушность респираторной ткани, отмечаются дистония сосудов системы легочной артерии, полнокровие капилляров, агрегация и сладж эритроцитов. Следует подчеркнуть, что патологические изменения носят очаговый характер, который прослеживается на протяжении всего периода инфекции.

В участках бронхов и трахеи с высокой степенью поражения при заражении всеми штаммами вируса гриппа A/H5N1 наблюдаются дистрофические изменения бокаловидных клеток, в которых происходят уплотнение ядра и цитоплазмы, расширение перинуклеарного пространства, отек, набухание и деструкция митохондрий, вакуолизация аппарата Гольджи и цистерн ЭПР (рис. 2). Интересно, что бокаловидные клетки были опустошены, секреторные гранулы в их цитоплазме практически отсутствовали. Это явление наблюдалось как в зонах патологических изменений воздухоносных путей, так и в участках, не вовлеченных в патологический процесс. Реснитчатые клетки в основном со-

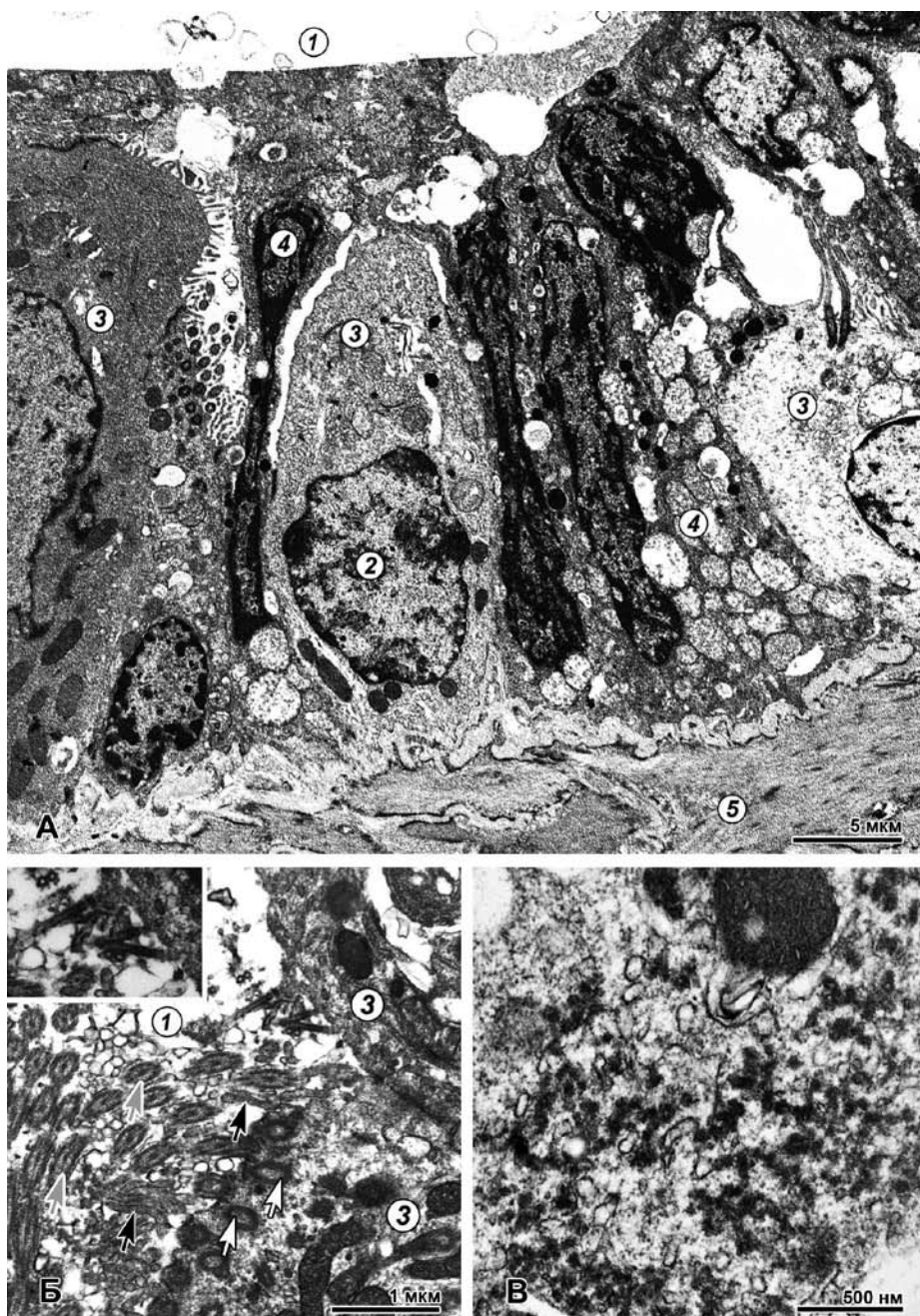


Рис. 1. А – Реснитчатая клетка с признаками репродукции вируса гриппа в ядре (2) в эпителии бронха мышцы. 24 ч после заражения вирусом гриппа H5N1 (штамм A/Chicken/ Kurgan/05/2005). В бокаловидных клетках наблюдается просветление матрикса и разрушение крист митохондрий. Б – Почкование частиц вируса гриппа H5N1 (штамм A/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005) на апикальной поверхности реснитчатой клетки бронха мышцы. 24 ч после заражения. Увеличенный фрагмент показывает формирование нитевидных вирусных частиц. В – Участок цитоплазмы реснитчатой клетки, содержащий вирус-специфические структуры. 24 ч после заражения вирусом гриппа H5N1 (штамм A/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005): 1 – просвет бронха, к клеткам эпителия прилежит слизь и клеточный детрит; 2 – ядро; 3 – цитоплазма реснитчатых клеток; 4 – дистрофические измененные опустошенные бокаловидные клетки; 5 – мышечный слой бронхиальной стенки. Черными стрелками показаны микроворсинки, схожие с вирусными частицами, серыми – реснички, белыми – базальные тельца ресничек

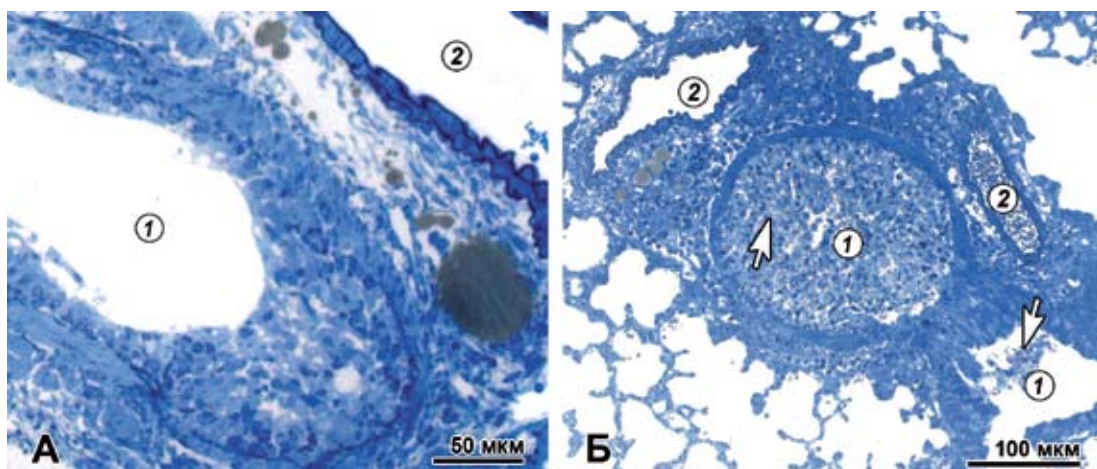


Рис. 2. А – Выраженные дистрофические изменения и десквамация эпителиоцитов слизистой оболочки бронха мыши, скопление секрета и десквамированных клеток в его просвете. 24 ч после заражения вирусом гриппа H5N1 (штамм A/Chicken/Kurgan/05/2005). Б – Воспалительно-деструктивные изменения бронха мыши через 7 суток после заражения вирусом гриппа H5N1 (штамм A/Duck/Kurgan/08/2005). Некроз эпителия бронха, клеточный детрит в просвете бронха. Перибронхиальная мононуклеарная инфильтрация. 1 – просвет бронха; 2 – кровеносный сосуд. Стрелкой показан клеточный детрит. Полутонкие срезы, окраска азуром-II

храняли морфологию, свойственную незараженным животным, однако некоторые клетки набухали, и в них выявлялся отек митохондрий.

Характер морфологических изменений трахеи и бронхов в участках с высокой степенью поражения отчетливо различался у мышей, зараженных разными штаммами вируса гриппа H5N1. Так, при инфекции штаммами A/Chicken/Kurgan/05/2005 и A/Duck/Kurgan/08/2005 наблюдались деструктивные изменения эпителиальных клеток: отек митохондрий и разрушение крист, просветление цитоплазмы, фрагментация и вакуолизация мембранных структур, завершающиеся некрозом клеток. В бронхах мышей, зараженных штаммом A/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005, регистрировалось большое число эпителиальных клеток, содержащих многочисленные крупные фагосомы, в которых присутствовали апоптотические тельца (рис. 3). Известно, что эпителиальные клетки способны фагоцитировать фрагменты погибших путем апоптоза соседних клеток (Bursch W., 2001; Chen Z.-H.

et al., 2008; Shen Z.-Y. et al., 2008). В случае инфекции штаммом A/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005 вируса гриппа H5N1, очевидно, апоптозу подвергаются зараженные клетки. Это подтверждается обнаружением в некоторых апоптотических клетках морфологических признаков инфекции (рис. 3). Процесс апоптоза, судя по большому количеству фагосом и клеток, их содержащих, протекал в течение первых суток инфекции очень интенсивно и приводил к гибели большого числа зараженных эпителиальных клеток. В участках бронхов, где локализуются эпителиальные клетки, заполненные фагосомами, регистрировалась инфильтрация эпителиального пласта нейтрофилами, прослеживались признаки фагоцитоза разрушенных эпителиальных клеток. Апоптоз клеток бронхиального эпителия, зараженных вирусом гриппа A/WSN (H1N1), и последующий фагоцитоз погибших клеток нейтрофилами был отмечен при интраназальной инфекции у мышей (Hashimoto et al, 2007). По всей видимости, наблюдаемая гибель инфицированных клеток на начальных этапах

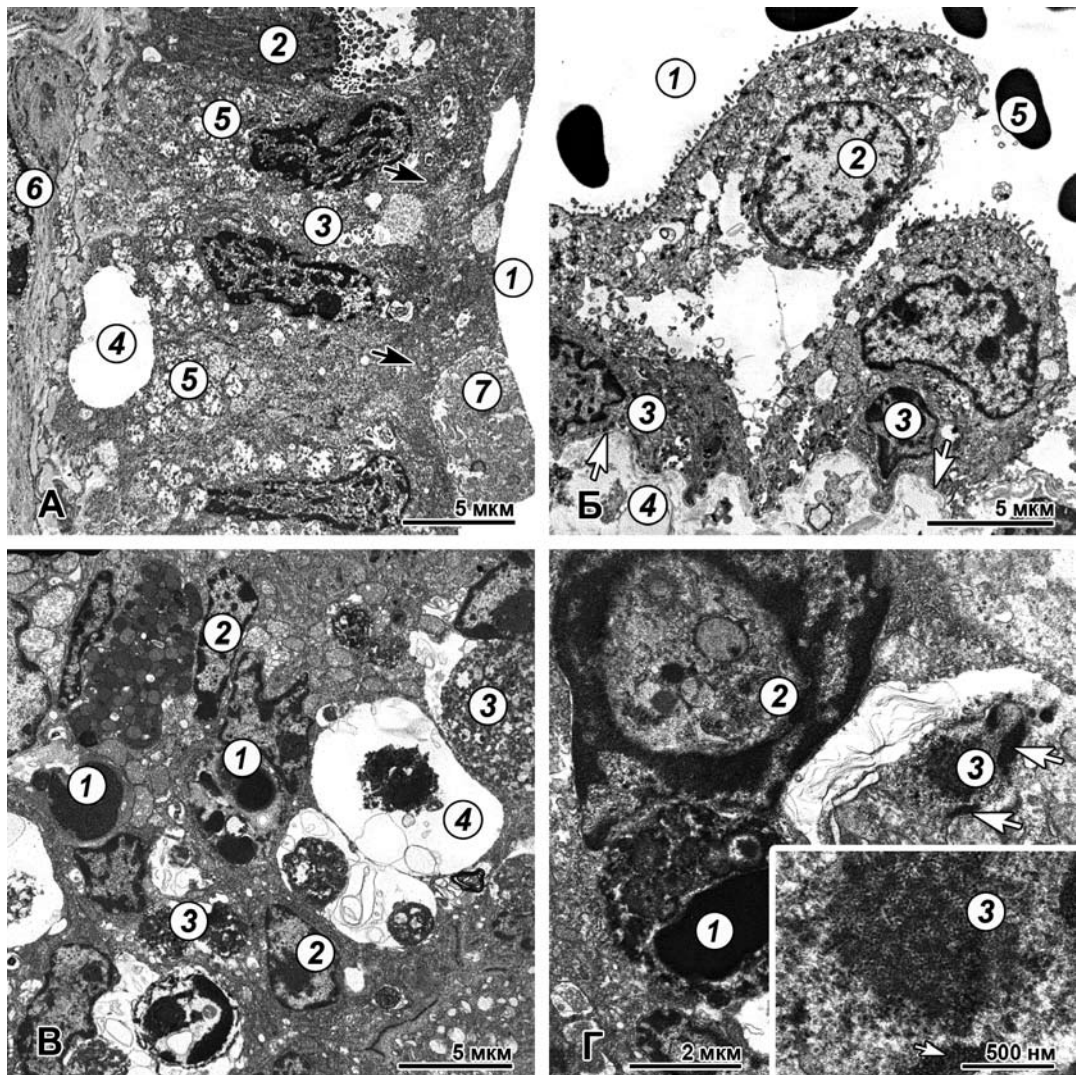


Рис. 3. А – Развитие некротических изменений в стенке бронха мыши. 24 ч после заражения вирусом гриппа H5N1 (штамм A/Chicken/Kurgan/05/2005): 1 – просвет бронха; 2 – реснитчатая клетка; 3 – бокаловидная клетка; 4 – участок отслойки бокаловидной клетки от базальной мембраны; 5 – митохондрии; 6 – гладкомышечная клетка. Стрелками показана апикальная поверхность эпителия, к которой плотно прилежат клеточный детрит и слизь (7). Б – Разрушение и десквамация клеток эпителия трахеи мыши. 2 суток после заражения вирусом гриппа H5N1 (штамм A/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005): 1 – просвет трахеи; 2 – разрушающиеся клетки эпителия; 3 – базальные клетки; 4 – собственная пластинка слизистой оболочки трахеи; 5 – эритроциты. Стрелками показана базальная мембрана эпителия трахеи. В – Деструкция эпителия бронха мыши через 24 ч после заражения вирусом гриппа H5N1(штамм A/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005). Поперечный срез стенки бронха: 1 – апоптозные тельца, 2 – ядра, сохранившие нормальную цитологическую структуру; 3 – фагосома; 4 – образование полости на месте разрушенной эпителиальной клетки. Г – Разрушающиеся клетки эпителия бронха мыши через 24 ч после заражения вирусом гриппа H5N1(штамм A/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005): 1 – апоптозное тельце, 2 – фагосома; 3 – вирус-специфическое включение в ядре. Стрелкой показан участок конденсации хроматина, которая происходит в процессе апоптоза

инфекции является одним из механизмов, обеспечивающих устойчивость мышей к низкопатогенному для них штамму A/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005 вируса гриппа H5N1.

Таким образом, интраназальное заражение мышей вирусом гриппа H5N1 в течение первых суток приводит к выраженным очаговым патологическим изменениям воздухоносных путей, характер которых зависит от штамма вируса.

Степень патологических изменений легких мышей, зараженных всеми штаммами вируса гриппа A/H5N1, нарастает в ходе инфекции. Через 2-3 суток после заражения на светооптическом уровне наблюдаются явления бронхоспазма, перибронхиальный отек, в просвете трахеи и бронхов накапливаются слизь, клеточный детрит и форменные элементы крови, просвет некоторых бронхов полностью закрыт (рис. 1). У мышей, зараженных штаммом A/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005, в бронхах содержится большое число нейтрофилов, патологический процесс можно охарактеризовать как гнойный бронхит. Интересно, что в просвете бронхов мышей, зараженных вирусом гриппа A/H5N1, отсутствовали бактерии, что еще раз подтверждает вирусную природу выявленных изменений. Заражение мышей штаммом A/Chicken/Kurgan/05/2005 вызывает выраженный бронхоспазм.

Ультраструктурное исследование показало также нарастание степени деструктивных изменений эпителиальной выстилки трахеи и бронхов, некроз как отдельных, так и групп клеток у всех мышей. В некоторых участках трахеи и бронхов разрушаются и слущиваются все эпителиальные клетки, за исключением базальных (недифференцированных) элементов. В разрушенных клетках не наблюдалось признаков размножения вируса гриппа, что позволяет предположить,

что клетки погибают на ранних этапах его репродуктивного цикла, до формирования видимых вирус-специфических структур. Однако гибель клеток может происходить и без прямого воздействия вируса, вследствие влияния токсических факторов, выделяемых погибшими клетками.

Несмотря на нарастание патологических процессов, через 2-3 суток после заражения всеми штаммами вируса гриппа H5N1 у мышей сохраняется очаговый характер поражения легких. Наряду с участками интенсивных патологических изменений, наблюдаются зоны, в которых морфология и бронхов, и альвеолярного эпителия заметно не отличается от таковых у интактных животных.

Период заболевания через 4-5 суток после заражения тремя штаммами вируса гриппа A/H5N1 характеризуется наибольшей степенью воспалительно-деструктивных изменений легких мышей. Очаговый характер поражения легких сохраняется, по-прежнему наблюдаются участки, в которых морфология бронхов не отличается от таковой у незараженных животных.

Характер поражения бронхов на ультраструктурном уровне по сравнению с предыдущим периодом инфекции заметно не изменился, наблюдались участки дистрофических и некротических изменений, десквамация бронхиального эпителия. В просвете бронхов локализовались клетки крови, клеточный детрит и фибриновые волокна. Встречались лимфоциты, инфильтрирующие эпителиальный пласт.

Период 6-8 суток после заражения вирусом гриппа A/H5N1 является критическим в развитии инфекции у мышей, именно в это время наступает гибель животных, инфицированных высокопатогенными штаммами. У всех животных сохранился очаговый характер поражения легких на фоне нарастания пато-

логических изменений, однако при инфекции разными штаммами проявились различия в их характере. У мышей, инфицированных штаммом A/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005, отмечались гнойно-некротическое воспаление бронхов, дистелектаз респираторной ткани, очаги мононуклеарной инфильтрации различных размеров в респираторной зоне, парез сосудистого русла, лейкостаз. При заражении штаммом A/Duck/Kurgan/08/2005 изменения имели меньшую степень, чем в случае двух других штаммов. На срезах легких всех мышей наблюдались дистрофически-некротические изменения бронхиального эпителия, интенсивная мононуклеарная инфильтрация стромы, умеренное снижение воздушности респираторной ткани, полнокровие капилляров, очаговые интраальвеолярные кровоизлияния, умеренное полнокровие вен, лейкостаз.

Ультраструктурное исследование обнаружило нарастание патологических изменений легких мышей по сравнению с предыдущим периодом инфекции и варьирование степени изменений не только в зависимости от штамма, но и между мышами, зараженными одним и тем же вирусом. Очевидно, это обусловлено индивидуальными различиями реакции животных на инфекцию, проявляющимися наиболее ярко на последних стадиях заболевания. Изучение ультратонких срезов бронхов, в просветах которых на светоптическом уровне выявлялось большое количество клеточного детрита, обнаружило лежащие на оголенной базальной мембране пласты разрушенных клеток альвеолярного и бронхиального эпителия вперемежку с лейкоцитарными клетками крови. Клетки и клеточный детрит в пластах плотно прилежали друг к другу, между ними не было заметных отложений слизи и фибрина (рис. 4).

В некоторых бронхах мышей, зараженных штаммами A/Duck/Kurgan/08/2005 и

A/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005, просветы которых были свободны, наблюдались процессы регенерации эпителия, который состоял в основном из базальных клеток, регистрировалось их митотическое деление (рис. 4). Отмечались также мало- и среднедифференцированные бокаловидные и реснитчатые клетки. В бронхах мышей, зараженных штаммом A/Chicken/Kurgan/05/2005, признаков регенерации не выявлялось.

На фоне глубоких патологических изменений легочной ткани по-прежнему сохранялись области с низкой степенью деструктивных изменений, в которых наблюдались лишь дистрофические изменения клеток бронхиального и альвеолярного эпителия. Следует отметить появление секреторных гранул в бокаловидных клетках в этот период инфекции.

Проведенное исследование легких белых беспородных мышей, зараженных тремя штаммами вируса гриппа A/H5N1, отличающимися по патогенности для этого вида животных, установило отчетливый очаговый характер поражения этого органа: на протяжении всего периода инфекции сохранялись области, не затронутые патологическим процессом. Все штаммы вызвали выраженные деструктивные изменения эпителиальной выстилки воздухоносных путей: уже через 24-48 ч разрушалось большое число клеток. В ходе инфекции у всех мышей усиливались патологические изменения бронхов, в их просвете накапливался клеточный детрит, развивалась перибронхиальная инфильтрация. Следует подчеркнуть, что в разрушенных клетках не выявлялось морфологических признаков вирусной инфекции, не удалось обнаружить и вирусные частицы в скоплениях клеточного детрита. Это говорит о том, что разрушение клеток происходит либо на ранних этапах репродукции вируса, до появления морфоло-

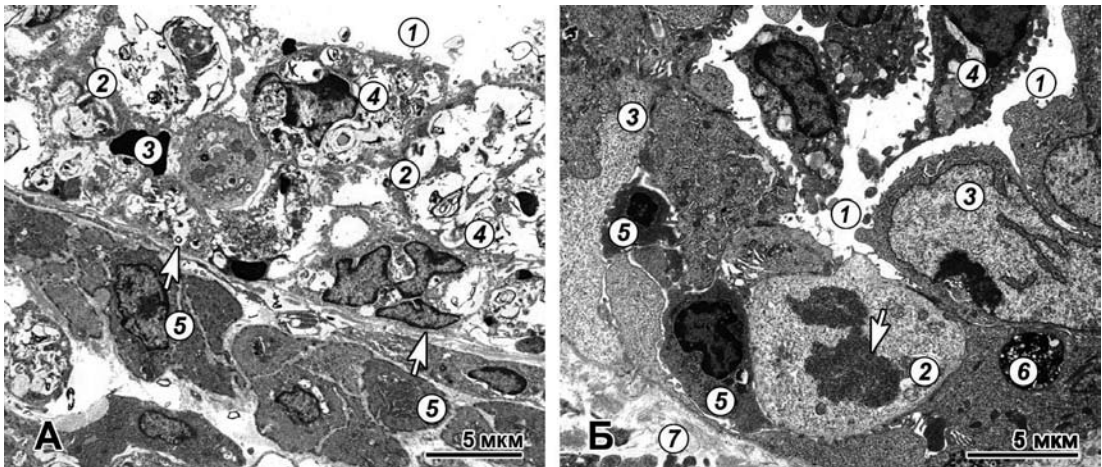


Рис. 4. А – Пласт разрушенных клеток, клеточного детрита и клеток крови на поверхности оголенной базальной мембраны бронхиального эпителия мыши. 7 суток после заражения вирусом гриппа H5N1 (штамм A/Duck/ Kurgan/08/2005): 1 – просвет бронха; 2 – разрушенные клетки альвеолярного и бронхиального эпителия; 3 – эритроцит; 4 – альвеолоцит II типа; 5 – гладкомышечные клетки стенки бронха. Стрелками показана базальная мембрана эпителия бронха. Б – Регенерация бронхиального эпителия мыши через 8 суток после заражения вирусом гриппа H5N1 (штамм A/Duck/ Kurgan/08/2005). В эпителии сохраняются признаки воспаления, в просвете бронха находятся десквамированные клетки: 1 – просвет бронха; 2 – базальная клетка в состоянии митоза; 3 – базальная клетка; 4 – бокаловидная клетка; 5 – лимфоцит; 6 – крупная фагосома; 7 – соединительная ткань собственной пластинки слизистой оболочки бронха. Стрелкой показаны хромосомы.

гических признаков инфекции, либо вызывается воздействием токсических соединений, продуцируемых погибшими клетками. В последние сутки наблюдения у мышей, зараженных штаммом A/Duck/Kurgan/08/2005, была обнаружена регенерация эпителия бронхов, очевидно, отражающая начало процесса выздоровления животных.

Штамм A/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005 низкопатогенный для мышей, животные не погибают даже при введении очень высоких доз вируса. Используемая в данной работе схема эксперимента, несомненно, далека от природной инфекции, однако она позволила выявить некоторые аспекты взаимодействия организма и вируса, по-видимому, обеспечивающие элиминацию патогена и блокирование развития заболевания при низких инфицирующих дозах. Так, репродукция штамма A/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005 в клетках бронхиального эпителия сопровождалась формированием большого числа дефектных

вирионов, что, очевидно, отражает неспособность клеток бронхиального эпителия мышей продуцировать полноценный вирус, эта неспособность может лежать в основе устойчивости мышей к данному штамму. Другой особенностью инфекции штаммом A/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005 служит гибель большого числа эпителиальных клеток путем апоптоза. Существуют различные точки зрения на роль апоптоза в патогенезе гриппа. В соответствии с одной из них апоптоз - первичный механизм защиты хозяина, ограничивающий репродукцию вируса (Kurokawa et al., 1999). Приверженцы другой точки зрения считают апоптоз главной причиной гибели клеток при инфекции, вызванной вирусами гриппа А и В, и приписывают ему отрицательную роль (Hinshaw et al., 1994). Было предпринято много попыток связать способность вируса гриппа индуцировать апоптоз с его белками, однако данные этих исследований противоречивы и не внесли ясности в пони-

мание роли апоптоза в патогенезе гриппа (см. анализ опубликованных работ в Morris et al., 2005). Исследование с использованием методов обратной генетики показало, что индукция апоптоза при репликации вируса гриппа не связана с каким-то одним белком, а обусловлена штамм-специфичной комбинацией генов. Не удалось получить и доказательств связи апоптоза с уровнем вирус-продукции (Morris et al., 2005). Таким образом, роль апоптоза в патогенезе гриппа может быть различной, и у мышей, зараженных штаммом A/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005 вируса гриппа H5N1, апоптоз, по всей вероятности, играет роль защитного фактора. Детальное изучение механизмов индукции апоптоза в инфицированных вирусом гриппа клетках представляет особый интерес, поскольку они могут быть ключом к созданию новых противовирусных препаратов.

Отчетливый тропизм вируса гриппа H5N1 к легким отмечается во всех опубликованных работах, посвященных этой инфекции (Gao et al., 1999; Uiprasertkul et al., 2005; Ibricevic et al.,

2006; Perrone et al., 2008). Наши исследования выявили выраженное поражение воздухоносных путей и альвеолярной зоны легких, а также показали глубокие нарушения клеточного состава крови и изменения системы кровотока легких мышей, зараженных тремя штаммами вируса гриппа A/H5N1. В последних публикациях, посвященных изучению патогенных свойств вируса гриппа A, в том числе и субтипа H5N1, подчеркивается высокая вариабельность биологических свойств вируса в зависимости даже от минимальных изменений его генетической структуры (Morris et al., 2005; Lee et al., 2007; Newby et al., 2007). Эти факты указывают на необходимость накопления и систематизации данных о патологических изменениях органов экспериментальных животных, зараженных разными штаммами вируса. Полученные в настоящем исследовании результаты расширяют существующие представления о поражении легких вирусом гриппа A/H5N1 и могут быть использованы для анализа взаимосвязи генетической структуры вируса гриппа и его патогенных свойств.

Список литературы

Виноградов И.В., Кочнева Г.В., Малкова Е.М., Щелкунов С.Н., Рябчикова Е.И. (2003) Изучение инфекции, вызываемой штаммом EP-2 вируса оспы коров у мышей разного возраста. Вопросы вирусологии 5: 34-38.

Онищенко Г.Г. (2006) Грипп птиц в Сибири. Лабораторные и эпидемиологические исследования, противоэпидемические и противоэпизоотические мероприятия в период эпизоотии вируса гриппа среди домашней птицы в Сибирском и Уральском федеральных округах Российской Федерации (июль-ноябрь 2005 г.). «ЦЭРИС», Новосибирск. 192 с.

Онищенко Г.Г., Шестопапов А.М., Терновой А., Евсеенко В.А., Дурыманов А.Г., Рассадкин Ю.Н., Разумова Ю.В., Зайковская А.В., Золотых С.И., Нетёсов С.В., Сандахчиев Л.С. (2006) Выявление в Западной Сибири высокопатогенных H5N1 вирусов гриппа, генетически родственных вирусам, циркулирующим в Юго-Восточной Азии в 2003-2005 гг. Докл. РАН. 406: 278-280.

Онищенко Г.Г., Рябчикова Е.И., Сергеев А.Н., Дроздов И.Г. (2009) Вирус гриппа A/H5N1: Атлас репродукции и патологических изменений внутренних органов мышей. Новосибирск, Арта, 207 с.

Afzelius B.A., Maunsbach A.B. (2004) Biological ultrastructure research; the first 50 years. Tissue Cell 36(1): 83-94.

Bursch W. (2001) The autophagosomal – lysosomal compartment in programmed cell death. *Cell Death Differ.* 8: 569 – 581.

Chen Z.H., Kim H.P., Sciruba F.C., Feghali-Bostwick C., Stolz D.B., Dhir R., Landreneau R.J., Schuchert M.J., Yousem S.A., Nakahira K., Pilewski J.M., Lee J.S., Zhang Y., Ryter S.W., Choi A.M. (2008) Egr-1 regulates Autophagy in Cigarette Smoke-Induced Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *PLoS ONE.* 3(10): e3316. doi:10.1371/journal.pone.0003316.

Dybing J.K., Schultz-Cherry S., Swayne D.E., Suarez D.L., Perdue M.L. (2000) Pathogenesis of Hong Kong-Origin H5N1 Viruses in Mice Compared to That of Other Highly Pathogenic H5 Avian Influenza Viruses. *J Virol.* 74: 1443-1450.

Gao P., Watanabe S., Ito T., Goto K., Wells M., McGregor A., Cooley J., Kawaoka Y. (1999) Biological Heterogeneity, Including Systemic Replication in Mice, of H5N1 Influenza A Virus Isolates from Humans in Hong Kong. *J. Virol.* 73: 3184-3189.

Hashimoto Y., Moki T., Takizawa T., Shiratsuchi A., Nakanishi Y. (2007) Evidence for Phagocytosis of Influenza Virus-Infected, Apoptotic Cells by Neutrophils and Macrophages in Mice. *J. Immunol.* 178: 2448-2457.

Hinshaw V.S., Olsen C.W., Dybdahl-Sissoko N., Evans D. (1994) Apoptosis: a mechanism of cell killing by influenza A and B viruses. *J.Virol.* 68: 3667-3673.

Ibricevic A., Pekosz A., Walter M., Celeste Newby J., Battaile J.T., Brown E.G., Holtzman M.J., Brody S.L. (2006) Influenza Virus Receptor Specificity and Cell Tropism in Mouse and Human Airway Epithelial Cells. *J.Virol.* 80: 7469-7480.

Kurokawa M., Koyama A.H., Yasuoka S., Adachi A. (1999) Influenza virus overcomes apoptosis by rapid multiplication. *Int.J.Mol.Med.* 3: 527-530.

Larson E.W., Dominik J.W., Rowberg A.H., Higbee G.A. (1976) Influenza Virus Population Dynamics In The Respiratory Tract Of Experimentally Infected Mice. *Infect.Immun.* 1976. 13: 438-447.

Lee D.C.W., Lau A. (2007) Avian influenza virus signaling: implications for the disease severity of H5N1 infection. *Signal Transduction* 7: 64-80.

Morris S.J., Nightingalea K., Smith H., Sweet C. (2005) Influenza A virus-induced apoptosis is a multifactorial process: Exploiting reverse genetics to elucidate the role of influenza A virus proteins in virus-induced apoptosis. *Virology* 335: 198-211.

Newby C.M., Sabin L., Pekosz A. (2007) The RNA Binding Domain of Influenza A Virus NS1 Protein Affects Secretion of Tumor Necrosis Factor Alpha, Interleukin-6, and Interferon in Primary Murine Tracheal Epithelial Cells. *J.Virol.* 81: 9469-9480.

Perrone L.A., Plowden J.K., Garcí'a-Sastre A., Katz J.M., Tumpey T.M. (2008) H5N1 and 1918 Pandemic Influenza Virus Infection Results in Early and Excessive Infiltration of Macrophages and Neutrophils in the Lungs of Mice. *PLoS Pathog.* 4(8): e1000115. doi:10.1371/journal.ppat.1000115.

Shen Z.Y., Li E.M., Lu S.Q., Shen J., Cai Y.M., Wu Y.E., Zheng R.M., Tan L.J., Xu L.Y. (2008) Autophagic and Apoptotic Cell Death in Amniotic Epithelial Cells. *Placenta* 29: 956-961.

Stephen E.L., Dominik J.W., Moe J.B., Spertzel R.O., Walker J.S. (1975) Treatment of Influenza Infection of Mice by Using Rimantadine Hydrochlorides by the Aerosol and Intraperitoneal Routes. *Antimic.Agents Chemother.* 8: 154-158.

Uiprasertkul M., Puthavathana P., Sangsiriwut K., Pooruk P. Srisook K., Peiris M., Nicholls J.M., Choekphaibulkit K., Vanprapar N., Auewarakul P. (2005) Influenza A H5N1 Replication Sites in Humans. *Emerg.Infec.Dis.*11: 1036-1041.

Submicroscopic Features of Bronchial Epithelium Damage in Mice After Intranasal Infection with Different H5N1 Influenza Virus Strains

**Oleg S. Taranov,^{a,b} Elena M. Malkova,^a Artemii A. Sergeev,^a
Andrei N. Shikov,^a Elena I. Ryabchikova^{b,c}**

^a *State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector»
p. Koltsovo, Novosibirsk region, 630559 Russia*

^b *Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine,
Siberian Branch of Russian Academy of Science
8 Lavrent'eva, Novosibirsk, 630090 Russia*

^c *Novosibirsk State University
2 Pirogova st., Novosibirsk, 630090 Russia*

Influenza H5N1 virus is able to cause severe disease in humans and wide spectrum of animal and bird species. We examined time course changes of bronchi in mice after intranasal infection with influenza H5N1 virus strains having different pathogenicity for this animal species: A/Chicken/Kurgan/05/2005, A/Duck/Kurgan/08/2005 and A/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005. Replication of influenza H5N1 strains was revealed in mouse bronchial ciliated cells. Pathological changes of mice bronchi appearing after 24 h post infection and increasing during the disease have been described in all mice. Massive apoptosis of infected bronchial cells was found in mice infected with A/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005 strain. Signs of bronchial epithelium regeneration were observed in mice on days 7-8 post infection with strain A/Duck/Kurgan/08/2005 of H5N1 influenza virus.

Keywords: influenza virus, H5N1, bronchial epithelium, pathological changes.
